



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y
TECNOLOGÍA QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE MANTEQUILLA ALTA EN EPA+DHA,
OMEGA 3 DE CADENA LARGA A PARTIR DE
TRIACILGLICÉRIDOS ESTRUCTURADOS”.**

Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos

CAMILA PAZ HERNÁNDEZ MONTES

Profesor Patrocinante:

Mg. Alicia Rodríguez Melis

Departamento de Ciencia de los

Alimentos y Tecnología Química.

Universidad de Chile

Director:

Dr. Santiago Aubourg M.

Instituto de Investigaciones

Marinas Consejo Superior de

Investigaciones Científicas. Vigo, España.

Director:

Mg. Alicia Rodríguez Melis

Departamento de Ciencia de los

Alimentos y Tecnología Química.

Universidad de Chile

Santiago - Chile

Junio 2015

Circulación restringida

La presente memoria forma parte del proyecto Fondecyt titulado:

“Process optimization of structured triacylglycerols by enzymatic transesterification of caprylic acid and n-3 PUFA concentrate salmon oil under supercritical carbon dioxide: Effect on physical and chemical properties and stability of food systems”.

PROYECTO FONDECYT N° 1120627. 2012-2014.

Agradecimientos

En primera instancia me gustaría agradecer a Dios y a mi familia, por darme la gran oportunidad de crecer como persona y profesional, por su apoyo incondicional, su amor y comprensión a lo largo de todos los años de mi carrera. Especialmente a mis padres, Catalina Ester Montes Ríos y Luis Raimundo Hernández Araya, que me dieron las herramientas necesarias para enfrentar el mundo y me enseñaron a luchar por mis sueños sin importar lo difícil que se vea la situación. A mi hermana, Cynthia Hernández, por sus consejos, sus risas y ánimo para seguir adelante. Y a mis abuelos, Cecilia Ríos y Daniel Montes, por cuidarme, amarme y mostrarme que con perseverancia y esfuerzo todo es posible.

De igual manera quisiera agradecer sinceramente a mi directora y profesora patrocinante de Tesis, Alicia Rodríguez Melis, por acogerme en su equipo de trabajo, depositar su confianza en mí y hacer posible finalmente el término de este difícil pero enriquecedor proceso, ser una Ingeniera en Alimentos.

A mis compañeros de laboratorio, Elizabeth Contreras, María Elsa Pando, María Macarena Berrios, Matías Rivera y José Manuel Cedano, que con el pasar del tiempo se convirtieron en amigos, enseñándome más allá de procedimientos y reacciones, logrando transformar este período tedioso y angustiante, en risas, bromas y momentos gratos.

A mis amigas incondicionales, Carolina Crisóstomo, Macarena Díaz y Samanta Lillo, que desde el colegio me han acompañado siendo un soporte fundamental, entregándome su cariño y ayudándome a disfrutar de los momentos importantes de la vida.

Finalmente, agradezco a mis amigos de carrera Francisco Agurto, Eliana Álvarez, Camila Meza, Catalina Urzúa y Carolina Plaza, por formar parte de este camino haciéndolo único e inolvidable, saliendo adelante de esas pruebas e informes interminables, aprovechando al máximo esos pequeños tiempos libres y apoyándonos en todas las circunstancias. Gracias por su amistad sincera y formar estos lazos que espero sean para toda la vida.

Índice

Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción.....	11
1.1 Antecedentes Generales	13
1.1.1 Aceites: Composición general.....	13
1.1.3 Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).....	15
1.1.4 Beneficios de los ácidos grasos Omega-3, EPA y DHA	15
1.1.5 Triacilglicéridos estructurados y acción enzimática.....	17
1.1.6 Fluido supercrítico	19
1.1.7 Mantequilla: Elaboración de un producto alto en EPA y DHA	21
II. Hipótesis.....	22
III. Objetivos	23
3.1 Objetivo General.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
IV. Materiales y Métodos	24
4.1 Materiales.....	24
4.1.1 Materias primas	24
4.1.2 Equipos.....	24
4.2 Metodología	25
4.2.1 Caracterización de aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos y cromatografía gas-líquido.....	25
4.2.2 Obtención de TAGs con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (EPA y DHA) y ácido caprílico, a partir de aceite crudo y refinado de salmón.	25
4.2.3 Desarrollo de triacilglicéridos estructurados con EPA y DHA, mediante la acidólisis enzimática (Lipasa B., <i>Candida antarctica</i>) de aceite refinado de salmón, ácido caprílico y concentrado AGPICL n-3 en dióxido de carbono supercrítico.....	27
4.2.4 Obtención de mantequilla de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga a partir de triacilglicéridos estructurados.....	28
4.2.5 Efecto del proceso de homogeneización sobre las propiedades térmicas de mantequilla con contenido “alto” de EPA y DHA n-3 cadena larga.....	29
4.2.6 Caracterización de mantequillas con “alto” contenido de EPA y DHA a partir de triacilglicéridos estructurados por cromatografía de gas-líquido y microscopía de luz polarizada.....	31

4.2.7 Análisis estadístico.	32
V. Resultados y discusión	33
5.1 Caracterización del aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos y cromatografía de gas-líquido.....	33
5.2 Obtención de concentrado AGPCLI n-3 con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.....	35
5.3 Desarrollo de triacilglicéridos estructurados purificados, mediante la acidólisis enzimática (Lipasa B., <i>Candida antarctica</i>) de aceite refinado de salmón, ácido caprílico y concentrado AGPICL n-3 en CO ₂ supercrítico.	40
5.4 Obtención de mantequilla con contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga a partir de triacilglicéridos estructurados.	43
5.4.1 Validación de formulaciones de mantequilla alta en contenido de EPA+DHA con TAGs obtenidas en el proceso de homogeneización mediante cromatografía en capa fina (TLC).....	49
5.5 Estudio del efecto del proceso de homogeneización de mantequilla “alta” en EPA+DHA con triacilglicéridos estructurados, sobre el comportamiento térmico mediante el método superficie de respuesta.	50
5.5.1 Validación de formulaciones de mantequilla alta en contenido de EPA+DHA con triacilglicéridos estructurados obtenidas en el proceso de homogeneización mediante comportamiento de fusión por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	51
5.5.2 Efectos de las variables del proceso de homogeneización sobre las propiedades térmicas de las mantequillas con alto contenido de EPA y DHA.	55
5.5.3 Superficies de respuestas del efecto del proceso de homogeneización sobre los valores de las propiedades térmicas de las mantequillas con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga.	57
5.6 Estudio de la influencia de las variables del proceso de homogeneización, en una matriz de mantequilla de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga..	60
5.7 Caracterización de las formulaciones de mantequillas de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga por cromatografía de gas-líquido y microscopía de luz polarizada.	63
5.7.1 Caracterización de mantequillas por cromatografía de gas-líquido	63
5.7.2 Efecto de las variables del proceso de homogeneización sobre la morfología de los cristales de grasas de mantequillas por microscopía óptica con luz polarizada. ..	65
VI. Conclusiones.....	69
VII. Referencias.....	71
VIII. Anexos.....	77

Índice de tablas

Tabla 1: Ingesta recomendada de EPA y DHA para individuos de distintas condiciones y edades.

Tabla 4: Información nutricional mantequilla comercial marca Colún Ltda., pasteurizada, con sal, 125 g.

Tabla 4.1: Información nutricional crema para batir comercial marca Colún Ltda., 1 Kg.

Tabla 4.2: Determinación analítica y métodos para caracterización de materias primas.

Tabla 5: Caracterización del aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos.

Tabla 5.1: Rango y valores experimentales de las variables de proceso en el diseño para la producción de concentrado AGPICL n-3 (EPA + DHA).

Tabla 5.2: Composición de ácidos grasos de aceite crudo de salmón y de concentrado AGPICL optimizado (expresado como g/100 g ácidos grasos totales).

Tabla 5.3: Diseño compuesto central para el desarrollo de triacilglicéridos estructurados (TAGs) mediante acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo condiciones de CO₂ supercríticas.

Tabla 5.4: Composición de ácidos grasos de TAGs purificados mediante acidólisis enzimática con enzima (*Candida antarctica*) bajo condiciones de CO₂ supercríticas (expresado como g/100 g AG totales).

Tabla 5.5: Diseño compuesto central bidimensional 2² más estrella del proceso de homogeneización de mantequillas con contenido “alto” de EPA+DHA proveniente de TAGs, con velocidad y tiempo de agitación como variables independientes.

Tabla 5.6: Validación de formulaciones de mantequilla con triacilglicéridos estructurados con alto contenido de EPA+DHA y ácido caprílico en los diversos

experimentos del diseño de mantequillas con TAGs, mediante aplicación de la técnica de cromatografía de gas-líquido.

Tabla 5.7: Composición de ácidos grasos y diferentes grupos de ácidos grasos en mantequilla comercial (Colún), mantequilla control (elaborada en el laboratorio), AGPICL n-3, TAGs purificados y formulación 7 de mantequilla con alto contenido de EPA y DHA (6000 r.p.m; 0 min), expresado como g/100 g de AGT.

Tabla 5.8: Comportamiento térmico del diseño compuesto central 2² más estrella del proceso de homogeneización de mantequillas con TAGs con alto contenido de EPA+DHA y ácido caprílico, mantequilla control, mantequilla comercial (Colún) y TAGs purificados.

Tabla 5.9: Comportamiento de fusión de las diferentes formulaciones de mantequillas con contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga, mantequilla control, mantequilla comercial (Colún) y TAGs purificados.

Tabla 5.10: Respuesta optimizada para %CGS a 20°C

Tabla 5.11: Coeficientes de regresión del modelo polinómico de segundo orden predictivo para las variables de respuestas significativas.

Tabla 5.12: Respuestas optimizadas

Tabla 5.13: Porcentajes del contenido de grasa sólida (%CGS) en función de la temperatura, de las diversas formulaciones de mantequilla alta en EPA y DHA, mantequilla comercial (Colún), mantequilla control y TAGs purificados.

Tabla 5.14: Composición de ácidos grasos y diferentes grupos de ácidos grasos en mantequilla comercial (Colún), mantequilla control, concentrado AGPICL n-3, TAGs purificados, formulaciones 7 y 4 de mantequilla con alto contenido de EPA y DHA (6000 r.p.m; 0 min) y (8121 r.p.m; 4,3 min) respectivamente, expresado como g/ 100 g de ácidos grasos totales.

Índice de figuras

Figura 1: Estructura de un triacilglicérido y AGPI n-3 EPA y DHA.

Figura 2: Grupo de reacciones de transesterificación: Acidólisis, alcoholólisis e interesterificación.

Figura 3: Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura.

Figura 5.1: Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a aceite refinado de salmón, aceite crudo de salmón y concentrado de AGPICL n-3 de aceite crudo de salmón. A: Aceite refinado de salmón; B: aceite crudo de salmón; C: AGPICL n-3.

Figura 5.2: Formación de cristales de urea en ausencia y presencia de ácidos grasos de cadena larga.

Figura 5.3: Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a, A: Mantequilla comercial (Colún); B: Mantequilla control; C: AGPICL n-3; D: TAGs purificado; E: Formulación D7 (6000 r.p.m; 0 min).

Figura 5.4: TLC correspondiente a triacilglicéridos de aceite de salmón (TAG), concentrado de AGPICL n-3 con ácidos grasos libres (AGL) de aceite crudo de salmón (PUFA), TAGs no purificados (NO), y TAGs purificados (Purif).

Figura 5.5: TLC correspondiente a TAGs NO purificados, mantequilla comercial Colún (M. Colún), mantequilla formulación 7 (D7 (6000 r.p.m; 0 min)) y mantequilla control (C10).

Figura 5.6: Perfiles de fusión obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). A: Mantequilla comercial (Colún); B: Mantequilla control; C: TAGs purificado; D: Formulación 7 (D7 (6000 r.p.m; 0 min)).

Figura 5.7: Perfiles de fusión obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). A: Mantequilla comercial (Colún); B: Mantequilla control; C: TAGs purificado; D: Formulación 1 -10.

Figura 5.8: Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades térmicas de las formulaciones de mantequillas con alto contenido de EPA y DHA. A: ΔH total; B: *ONSET*; C: %CGS a 20°C; D: *Peak* EPA+DHA; E: ΔH *Peak* EPA+DHA; F: %CGS *peak* EPA+DHA.

Figura 5.9: Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades térmicas de fusión ΔH total, *ONSET* y %CGS 20°C, de las formulaciones de mantequillas con alto contenido de EPA y DHA. A: Superficie de respuesta para ΔH total; B: Superficie de respuesta para *ONSET*; C: Superficie de respuesta para %CGS a 20°C.

Figura 5.10: Contenido de grasa sólida (CGS) en función de la temperatura de las mantequillas con alto contenido de EPA y DHA por DSC. Formulación 1-10; Control (M. control); Colún (M. Comercial) y TAGs purificado.

Figura 5.11: CGS en función de la temperatura de las mantequillas con alto contenido de EPA y DHA por DSC. Formulación 4 (D4 (8121 r.p.m; 4,3 min)); Control (M. control); Colún (M. Comercial) y TAGs purificado.

Figura 5.12: Microfotografías comparativas de microscopía óptica con luz polarizada de mantequillas. A: TAGs purificados; B: Mantequilla Control (M. control); C; Formulación 4 (D4 (8121 r.p.m; 4,3 min)); D: Mantequilla Comercial (M. Colún).

Figura 5.13: Microfotografías comparativas de microscopía óptica con luz polarizada de mantequillas. Formulación 1-10.

Índice de anexos

Anexo 1: Información materias primas para elaboración de mantequilla.

Anexo 2: Obtención de concentrado de AGPCLI n-3 con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.

Anexo 3: Estudio del efecto del proceso de homogeneización de mantequilla con “ALTO” contenido de EPA+DHA OMEGA 3 cadena larga, mediante el método superficie de respuesta.

Anexo 4: Termogramas de fusión por calorimetría diferencial de barrido

Anexo 5: Análisis de varianzas para los resultados obtenidos.

Anexo 6: Estudiar la influencia de las diferentes variables del proceso (tiempo y velocidad de agitación), frente al comportamiento térmico de la matriz de mantequilla.

Anexo 7: Contenido de grasa sólida.

Anexo 8: Microfotografías de los diseños de mantequillas por microscopía óptica con luz polarizada.

Resumen

Se estudió como objetivo de la presente memoria, la elaboración de una matriz de mantequilla con “ALTO” contenido de n-3 de CADENA LARGA, EPA y DHA, provenientes de triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados generados en el proceso de acidólisis enzimática entre aceite refinado de salmón comercial, ácido caprílico y concentrado de AGPICL n-3 de aceite crudo de salmón comercial, bajo condiciones de CO₂ supercrítico. El concentrado AGPICL n-3, se preparó sometiendo previamente el aceite crudo de salmón a un proceso de saponificación y posterior inclusión con cristales de urea, para la obtención de AGPICL, principalmente EPA y DHA. El análisis se llevó a cabo mediante la observación de perfiles de fusión y, contenido de grasa sólida utilizando metodología de superficie de respuesta (MSR) con un diseño compuesto central de 2² más estrella de 2 factores, velocidad y tiempo de agitación del proceso de homogeneización, con 10 corridas experimentales en total. Los resultados fueron medidos a través de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía gas-líquido. De esta forma, se logró la incorporación de TAGs purificados con un “ALTO” contenido de EPA y DHA en las formulaciones de mantequillas, obteniendo en promedio 243 mg de EPA+DHA por porción de consumo habitual, consiguiendo un producto “ALTO en EPA+DHA, OMEGA-3 de CADENA LARGA”, según RSA. Los termogramas de fusión de las formulaciones de mantequillas arrojaron que el rango de aparición del *peak* de bajo punto de fusión, -72,5 a -70,1°C, correspondería a la zona de fusión de los TAG con AGPICL n-3, EPA y DHA. La combinación de niveles de factores del proceso de homogeneización que presentó un óptimo de contenido de grasa sólida (CGS) de 15,96% a 20°C, similar al CSG de una mantequilla comercial en la optimización de respuesta múltiple fue de una velocidad de 8199 r.p.m y un tiempo de 4,4 min.

Abstract

“Obtaining butter with high in EPA + DHA, long-chain OMEGA 3 from structured triglycerides”.

The objective of this research was to study the development of a butter with "high" content of n-3 long-chain EPA and DHA, from structured purified triacylglycerols (TAGs) generated in the process of enzymatic acidolysis between LCPUFA from refined oil commercial salmon and caprylic acid under CO₂ supercritical conditions. The concentrate LCPUFA n-3, was obtained by saponification process and subsequent inclusion with crystals of urea, to obtain mainly EPA and DHA. The analysis was conducted by melting profiles, solid fat content (SFC) and the use of response surface methodology (RSM) with a central rotational composite design, which is composed of two factors, speed and stirring time, with 10 experimental runs in total. The results were measured by Differential Scanning Calorimetry (DSC), thin layer chromatography (TLC) and gas-liquid chromatography. Thus, the addition of purified TAGs was achieved with a high content of EPA and DHA in butter formulations, achieving a average 243 mg of EPA+DHA per portion, resulting in a product with the claim "high in EPA+DHA OMEGA-3 long-chain" according to Chilean regulation. Melting thermograms of the butter formulations showed that the range of appearance of the *peak* of low melting point, -72,5 to -70,1°C, correspond to the melting zone of the n-3 TAG whit LCPUFA EPA and DHA. The combination of factors levels during the homogeinization process that maintains of SFC at 15.96% at 20°C was 8199 r.p.m and 4.4 min, presented a similar behavior to commercial butter. The condition (8199 r.p.m; 4.4 min) was chosen for being employed as optimum formulation in the present research.

I. Introducción

A pesar de ser Chile un país de inmensa riqueza pesquera, con un promedio de producción pesquera-acuícola de 3.592 miles de toneladas el año 2012, el consumo de productos pesqueros y acuícolas por parte de sus habitantes es bastante bajo. Un estudio encargado por el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) determinó que el consumo en Chile alcanza 10,4 kg per cápita, cifra que está muy por debajo del promedio de consumo mundial aparente per cápita, el cual aumentó de 18,9 Kg en 2010 a 19,2 kg en 2012 (ODEPA, 2013; FAO, 2014). Por este motivo, desde hace varios años se están realizando campañas de aumento del consumo, mostrando las ventajas nutritivas y saludables de estos productos (ODEPA, 2013).

Los aceites de origen marino son hoy en día valiosos productos con gran aplicación nutricional y alimentaria por su alto contenido de ácidos grasos n-3 de cadena larga, siendo originalmente solo un sub-producto de la fabricación de harina de pescado. Este sub-producto, que se desechaba inicialmente, comenzó a ser utilizado en la fabricación de pinturas, barnices, resinas, entre otros. Más tarde comenzó a utilizarse en la fabricación de mantecas y margarinas, y posteriormente en la preparación de aceites comestibles. Sin embargo, la investigación en los últimos años ha demostrado sus importantes beneficios en la salud tanto humana como animal, lo cual ha transformado al aceite de pescado en un producto escaso, de alto valor comercial y de creciente demanda por sus propiedades nutricionales (Valenzuela, Sanhueza y De la Barra, 2012).

Debido a esta situación se hace importante tener conocimiento de los grandes beneficios que estos componentes de los aceites marinos tienen sobre la salud humana, los cuales son posibles principalmente por su contenido de triacilglicéridos que en su estructura contienen ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga (AGPICL), de entre los cuales destacan, el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3).

Según información de la FAO en conjunto con la OMS, el consumo recomendado de EPA+DHA es de al menos 250 mg diarios en adultos (FAO, 2012). De esta manera, el beneficio del consumo de EPA se asocia especialmente con la protección de la salud cardiovascular, principal causa de muerte en el mundo; además disminuye los triglicéridos y colesterol sanguíneo, ambos determinantes en el riesgo cardiovascular. Por otro lado el consumo de DHA está relacionado con el desarrollo de la inteligencia de las personas, pues es fundamental para la formación y función del sistema nervioso y visual de los humanos y mamíferos en general, ya que, permite el trabajo neuronal (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Por otro lado, el RSA del Ministerio de Salud, en su artículos 225, define a la mantequilla como el producto lácteo derivado exclusivamente de la crema pasteurizada de leches (RSA, 2013). Entre 2004 y 2013, según ODEPA, la producción de mantequilla aumentó casi 65%, llegando a su punto más alto hasta ahora en 2012 con 22.205 toneladas, el período culmina con una leve caída en la temporada 2013, cuando alcanzó 21.566 toneladas (ODEPA, 2014).

La mantequilla y la margarina se utilizan cada vez más en las dietas en los países en desarrollo, a medida que aumenta el consumo de pan. Chile es uno de los países donde se consume más pan en el mundo. Según análisis de Fechipan, se estima que en 2012 el consumo de pan en Chile fue de 86 kg per cápita (ODEPA, 2014). Es por este motivo, que la elaboración de una matriz de grasa animal como es la mantequilla, “ALTA” en triacilglicéridos estructurados de EPA y DHA, podría significar una solución efectiva frente al cuidado de la salud de la población, ofreciendo un producto de consumo masivo, que permita cumplir con los requerimientos diarios por persona de EPA y DHA según el RSA.

De esta forma, en el presente estudio se abordará el desarrollo de una matriz de mantequilla con “ALTO” contenido de EPA y DHA, OMEGA 3 de CADENA LARGA, provenientes de triacilglicéridos estructurados obtenidos de la mezcla de concentrados AGPICKL n-3 de aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón y ácido caprílico, obtenido por acidólisis enzimática en CO₂ supercrítico.

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 Aceites: Composición general

En términos generales, se distinguen dos tipos de aceites según su origen: los obtenidos a partir de semillas y/o frutos de origen terrestre y los obtenidos a partir de vegetales (algas) y animales de origen marino (peces, crustáceos, moluscos y mamíferos). Ambos tipos de aceites están igualmente constituidos por mezclas de triglicéridos cuyos principales componentes son los ácidos grasos. Los triacilglicéridos (Fig.1), son moléculas formadas por la asociación del glicerol (o glicerina) con tres ácidos grasos, los que pueden ser similares, o con mayor frecuencia, diferentes. 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)

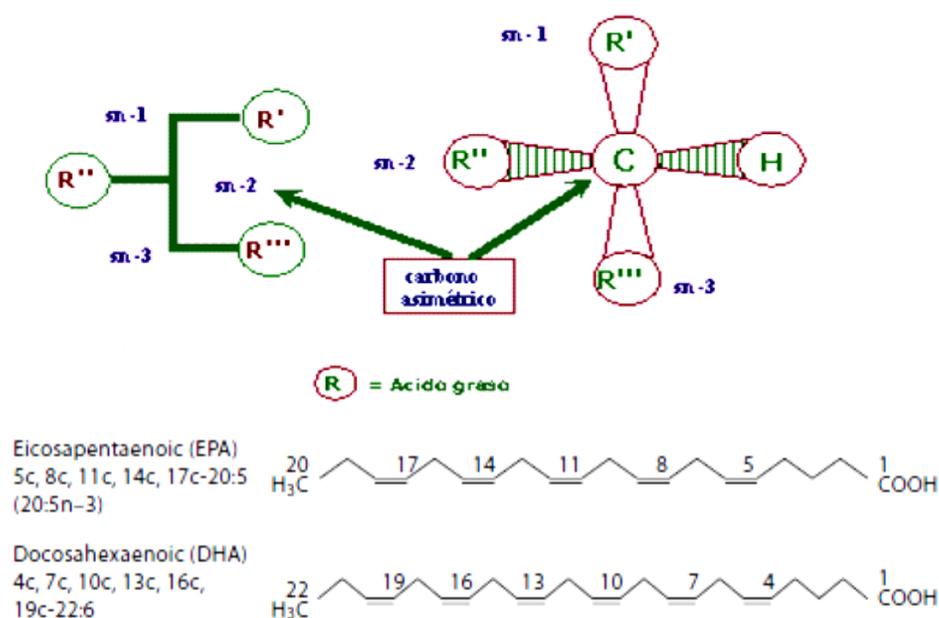


Figura 1: Estructura de un triacilglicérido y AGPICL n-3 EPA y DHA (Valenzuela, Sanhueza y Nieto, 2002; Ratnayake y Gill, 2009).

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).

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) (Fig.1). La denominación omega deriva de la última letra del alfabeto griego, denotando que la enumeración de los ácidos grasos se realiza desde el carbono extremo terminal de la molécula (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

1.1.2 Ácidos grasos de cadena media: Ácido caprílico

Los ácidos grasos de cadena media (AGCM) contienen entre 6 y 12 átomos de carbono y son digeridos, absorbidos y metabolizados de manera distinta que los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (Sáyago-Ayerdi y cols, 2008).

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

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

1.1.3 Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)

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

Existen dos AGPI que el organismo no puede sintetizar, el ácido linoleico (18:2 n-6; AL) y el ácido α -linolénico (18:3 n-3; ALA), que deben obtenerse de la dieta y se les conoce como ácidos grasos esenciales (AGEs) (Rodríguez-Cruz y cols, 2005).

El ácido linoleico (AL) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-6. Posee 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces. Además, el primer doble enlace se encuentra ubicado entre los átomos de carbono 6 y 7, contados a partir del extremo metilo de la cadena de ácidos grasos, y este es el motivo de que se denomine n-6. El ácido α -linolénico (ALA) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-3. Cuenta igualmente con 18 átomos de carbono, pero posee tres dobles enlaces (Ratnayake y Gill, 2009; FAO, 2012).

Los aceites de origen marino se caracterizan por su alto contenido de ácidos grasos n-3, aunque es necesario diferenciar entre los ácidos grasos n-3 de origen vegetal terrestre, y los de origen marino, ya que los primeros solo tienen como principal componente n-3 al ALA, en cambio los de origen marino se caracterizan por su alto contenido de los llamados ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga (AGPICL n-3), siendo los más importantes el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA) (Fig.1) (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

1.1.4 Beneficios de los ácidos grasos Omega-3, EPA y DHA

Las evidencias disponibles indican que la ingesta de EPA y DHA (Rango Aceptable de Distribución de Macronutrientes (RADM), 0,250g-2,0g) pueden ser

parte de una dieta saludable (FAO, 2012). 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). En la tabla 1 se observan los requerimientos establecidos en el año 2012 por FAO para diferentes individuos en diversas condiciones.

Tabla 1: Ingesta recomendada de EPA y DHA para individuos de distintas condiciones y edades.

Condiciones	Ingesta recomendada de EPA y DHA
Adulto	0,250 g/día (EPA+DHA)
Mujer embarazada y Lactancia	0,3 g/día (EPA+DHA) con al menos 0,2 g/día de DHA
Infante (2 – 4 años)	0,1 – 0,15 g/día (EPA+DHA)
Niños (4 – 6 años)	0,15 – 0,2 g/día (EPA+DHA)
Niños (6 – 10 años)	0,2 – 0,3 g/día (EPA+DHA)

Fuente: “Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 2012”.

La nutrición materna es de crucial importancia, dado que la composición de los ácidos grasos de la leche se modifica con la dieta, se ha observado incrementos de DHA en la leche de madres suplementadas con este ácido graso (Rodríguez-Cruz y cols, 2005).

Los bastones de la retina tienen más del 50% de los ácidos grasos de la familia n-3, principalmente DHA. Las membranas de estas células contienen pigmentos fotosensibles que absorben la luz e inician la excitación visual, esto genera señales eléctricas que son transmitidas a la corteza occipital en milisegundos. Estos cambios rápidos requieren la presencia de DHA, ya que se han observado cambios en la función de la retina en ratas alimentadas con una dieta deficiente en ácidos grasos n-3, presentando una disminución en las señales eléctricas generadas por la luz (Rodríguez-Cruz y cols, 2005).

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 y cols, 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 purificado EPA y DHA, fue inversamente asociada con la mortalidad por ECV o promovidos importantes reducciones de 30% a 60% en la mortalidad por ECV (Psota y cols, 2006).

1.1.5 Triacilglicéridos estructurados y acción enzimática

Los triacilglicéridos estructurados (TAGs) son lípidos estructurados que han modificado su composición y/o distribución posicional de los ácidos grasos en la

molécula de glicerol, mediante métodos químicos y/o enzimáticos, con mejoramiento de sus propiedades funcionales y/o nutricionales (Osborn y Akoh, 2002).

Con el fin de diseñar nuevos TAGs, se han investigado una serie de reacciones de transesterificación en aceite de pescado en forma libre o como ésteres etílicos (Ferraro y cols, 2010). La transesterificación consiste en un grupo de reacciones 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 (Shahidi, 2002).

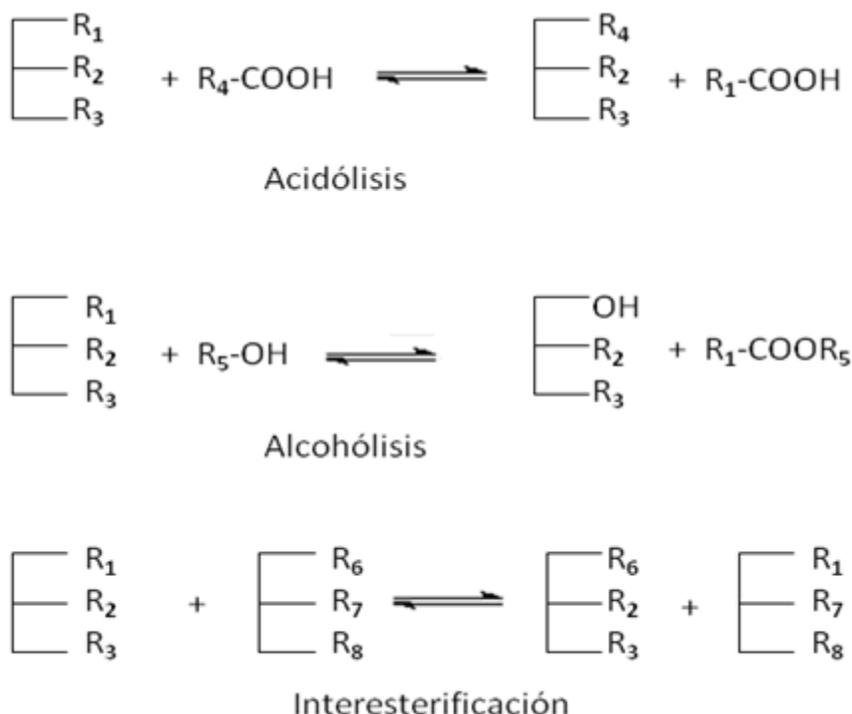


Figura 2: Grupo de reacciones de transesterificación: Acidólisis, alcoholólisis e interesterificación (Shahidi, 2002).

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 y García, 2007).

Una dificultad que presenta la transesterificación química de TAG es que los grupos acil deseados no son introducidos en posiciones específicas del glicerol ya que la reacción ocurre al azar con respecto a la posición (Nieto y cols, 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 (Lyberg y Adlercreutz, 2008).

Para obtener TAGs ricos en EPA y DHA, el uso de lipasas (esterasas que catalizan la hidrólisis y síntesis de esteres de glicerol) es un método económicamente factible, ya que puede concentrar estos ácidos grasos a bajo costo y con alta pureza. Las lipasas son parte de la familia de las hidrolasas, ya que catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase lípido-agua (Speranza y Alves, 2012).

1.1.6 Fluido supercrítico

Un Fluido Supercrítico (FSC) es aquel que al someterlo a una presión y temperatura superiores a sus valores críticos adquiere propiedades intermedias entre líquidos y gases. Por encima del punto crítico (PC) no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar, por ejemplo, para el caso del dióxido de carbono el PC se obtiene a los 31°C y 7,38 MPa (73,8 bar) (Jarzebski y Malinowski, 1994). 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 y cols, 1993). Estas características pueden

proporcionar circunstancia apropiada para la transesterificación en términos del coeficiente de transferencia de masa (Shin y cols, 2012).

Un diagrama de fases general para una sustancia pura (Fig. 3), muestra las regiones de temperatura y presión donde la sustancia existe como una fase única (sólido, líquido o gas). Estas zonas están separadas por las curvas de coexistencia de dos fases sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas, correspondientes a los equilibrios de sublimación, fusión y vaporización, respectivamente. Existe un punto de coexistencia de los tres estados llamado punto triple (PT) (Mendiola, 2008).

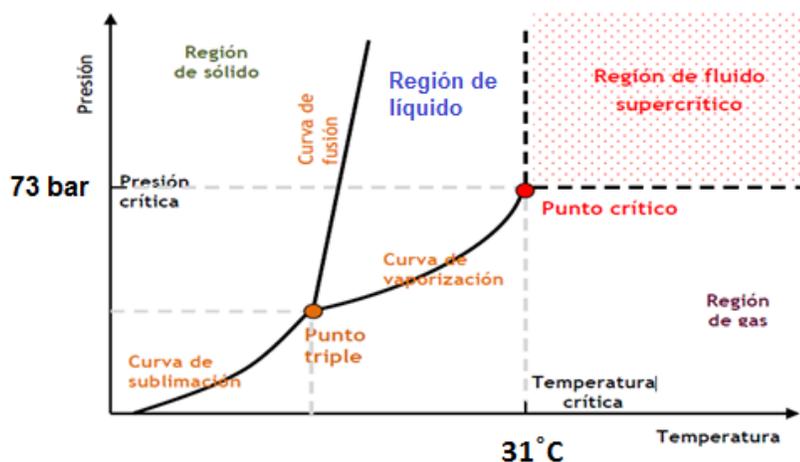


Figura 3: Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura.

Por otra parte, el fluido supercrítico genera menor resistencia a la transferencia de masa que un solvente líquido convencional, siendo utilizado como solvente para reacciones enzimáticas. Además, la solubilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos es mayor que en fases gaseosas y es comparable con solventes líquidos. Entre fluidos supercríticos, el SC-CO₂ es especialmente ventajoso, debido a su baja viscosidad, alta difusividad y baja tensión superficial, lo cual permite la fácil penetración a través de macro y microporos de la materia. También, es una tecnología limpia, no tóxica, amigable con el medio ambiente y requiere leves condiciones de operación. La novedad del proceso reside en su fácil separación post-reacción de los productos de alta pureza sin procesos de

separación costosos, así ofrece ventajas a la industria (Shekarchizadeh y cols, 2009).

1.1.7 Mantequilla: Elaboración de un producto alto en EPA y DHA

El artículo 227 define que la mantequilla deberá responder a las siguientes características: Su composición en ácidos grasos y triglicéridos serán los de la grasa láctea, caracteres organolépticos normales; materia grasa de leche: mínimo 80%; acidez de la materia grasa: máximo 18 mL de hidróxido de sodio 0.1N/100g; índice de peróxidos de la materia grasa en la planta: máximo 0,3 meq O₂/kg de grasa, entre otros (RSA, 2013).

La mantequilla es un producto que se elabora de la nata de la leche y se forma a partir de la inversión de las fases en su composición, es decir, de aceite en agua a agua en aceite, mediante un proceso mecánico de agitación (Tetra Pack, 1996).

Antes de comenzar con el proceso mecánico se debe refrigerar nata, esto provoca no solo la cristalización de una mayor cantidad de glicéridos de bajo punto de fusión, sino también la retracción del contenido de los glóbulos y la ruptura de su membrana envolvente. Esta ruptura determina la expulsión de parte de la grasa líquida que había quedado en el interior de los glóbulos (Veisseyre, 1988).

Para lograr la elaboración de un producto "ALTO" en n-3, específicamente con triacilglicéridos estructurados que contengan EPA y DHA, es necesario cumplir con ciertas especificaciones. Según el RSA el uso de descriptores para EPA/DHA/n-3 de cadena larga, como "ALTO", solo podrá utilizarse cuando la porción de consumo habitual contenga como mínimo 200 mg de EPA, 200 mg de DHA ó 200 mg de EPA + DHA. En el caso de alimentos que cumplan este requisito y que se le adicionen cantidades inferiores a los 90 mg de EPA y/o DHA, no podrán contener más de 2 g de EPA ó 2 g de DHA ó 2 g de EPA + DHA, por porción de consumo habitual (RSA, 2013).

II. Hipótesis

Es posible incorporar a una matriz de mantequilla un “alto” contenido de EPA y DHA, OMEGA 3 de cadena larga, a partir de grasa láctea y triacilglicéridos estructurados, mediante la combinación de las variables del proceso de homogeneización, tiempo y velocidad de agitación, midiendo su efecto sobre el perfil de fusión y el contenido de grasa sólida.

III. Objetivos

3.1 Objetivo General

Desarrollar una matriz de mantequilla con “alto” contenido de EPA y DHA, OMEGA 3 de cadena larga, a partir de triacilglicéridos estructurados provenientes de aceites de salmón.

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar el aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos y cromatografía gas-líquido.
2. Obtener concentrado AGPICL n-3 con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.
3. Desarrollar triacilglicéridos estructurados con EPA y DHA, mediante la acidólisis enzimática (Lipasa B., *Candida antarctica*) de aceite refinado de salmón, ácido caprílico y concentrado AGPICL n-3 en dióxido de carbono supercrítico.
4. Obtener mantequilla de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga a partir de triacilglicéridos estructurados.
5. Estudiar el efecto del proceso de homogeneización de mantequilla “alta” en EPA+DHA con triacilglicéridos estructurados, sobre el comportamiento térmico mediante el método superficie de respuesta.
6. Estudiar la influencia de las variables del proceso de homogeneización, en una matriz de mantequilla de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga.
7. Caracterizar formulaciones de mantequillas de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga por cromatografía de gas-líquido y microscopía de luz polarizada.

IV. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Materias primas

El estudio se realizó en muestras de aceite crudo (ACSC) y refinado de salmón comercial (ARSC), elaboradas por la empresa Salmonoil S.A, (Puerto Montt, Chile). Llegaron a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas en formato de bidones y fueron almacenadas a -80°C en botellas plásticas pequeñas para facilitar su uso. Además se recibieron: 1 L de crema de leche y una mantequilla pasteurizada con sal de 125 g, ambas marca Colún Ltda. La crema fue almacenada a -23°C y la mantequilla a 4°C para su adecuada conservación (Anexo1).

Los solventes utilizados como el etanol absoluto, n- hexano, sulfato de sodio anhidro, cloruro de sodio, metilato de sodio, isooctano, ácido acético glacial, *p*-anisidina, ioduro de potasio, dicromato de potasio, tiofulfato de sodio, hidróxido de sodio, fenoftaleína, acetona, metanol, cloroformo y celite, provienen de Merck S.A. (Santiago, Chile), al igual que la urea, reactivo utilizado en formato de cristales. La enzima inespecífica Lipozyme 435 proveniente de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca) se compró en Blumos S.A.

4.1.2 Equipos

- Balanza Precisa AE Adam Equipment, Modelo: AQT-2600.
- Balanza Analítica, AE Adam Equipment, Modelo: AFA-120LC
- Rotavapor Heidolph Tipo:VV 2000-LIFT, Alemania.
- Agitador Magnético con calefacción, Heidolph MR Hei-Standard, Alemania.
- Microprocessor PHS-3E, PH Meter., BiosLabChile.
- Gas Chromatograph, HP 5890 Series II. USA.
- Columna capilar SPTM -256 de 100 m x 0.25 mm x 0.2 μm .
- Equipo de CO₂ supercrítico Speed SFE system model 7071 (Applied Separation).

- Differential Scanning Calorimeter. Modelo: DSC 6000, PerkinElmer. Incluye: Modelación de temperatura MT-DSC, principio de Heatflux, intracooler para DSC6000 y Computador Dell.
- Ultracongelador a -80°C.
- Ultra Turrax IKA T18 digital.
- Microscopio óptico Carl Zeiss, Modelo: Estándar 20, Alemania. Equipado con un filtro de polarización.

4.2 Metodología

4.2.1 Caracterización de aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos y cromatografía gas-líquido.

Se caracterizó aceite crudo y aceite refinado de Salmón comercial, además de mantequilla control y comercial marca Colún Ltda.

Tabla 4.2: Determinación analítica y métodos para caracterización de materias primas.

Caracterización	Métodos
Ácidos grasos libres	Método oficial AOCS Ca 5a-40
Valor de peróxido	Método oficial AOCS Cd 8b-90
Valor de <i>p</i> -anisidina	Método oficial AOCS Cd 18-19
Valor TOTOX	Wanasundara y Shahidi, 1995

4.2.2 Obtención de TAGs con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (EPA y DHA) y ácido caprílico, a partir de aceite crudo y refinado de salmón.

4.2.2.1 Preparación de ácidos grasos libres a partir de aceite crudo de salmón por proceso de saponificación.

El aceite crudo de salmón (500 g) fue agregado en una mezcla previa de 150 g de KOH, 500 mL agua destilada y 500 mL de etanol 95% (475 mL etanol puro mezclados con 25 mL de agua destilada), en un matraz esmerilado de 2 L,

disuelta con agitador magnético. Posteriormente la mezcla fue saponificada mediante un sistema de reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno, a 60°C por 90 minutos. Se dejó enfriar paulatinamente y se agregaron 250 mL de agua destilada, agitando vigorosamente la mezcla hasta formación de espuma. Luego, la mezcla se traspasó a embudos de decantación para ser lavada con 2,5 L de hexano y 165 mL de etanol absoluto (divididos en 5 lavados aprox.). La fase hexánica debió ser descartada y la fase acuosa se acidificó con HCl 6N (200 mL aprox.) hasta pH 1. Luego la mezcla obtenida fue lavada con 2,5 L de hexano, descartando la fase acuosa. La fase hexánica obtenida se filtró con sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro en papel Whatman N°1, para posteriormente ser rotaevaporada al vacío a 40°C. Finalmente los ácidos grasos libres obtenidos fueron almacenados en el congelador a -80°C, (Wanasundara y Shahidi, 1999; Pando y cols, 2014).

4.2.2.2 Preparación del concentrado de AGPICL n-3 desde ácidos grasos libres de aceite crudo de salmón, por inclusión con urea.

Los ácidos grasos libres (90 g) debieron ser agregados a una mezcla previamente elaborada de 409,5 g de urea disuelta totalmente en 1,5 L aprox. de etanol 95% v/v (etanol = 3,7 x urea), en un sistema con varilla a reflujo, a 60°C y agitación magnética. El cual, luego fue dejado enfriar en agitación continua a -23°C por 22 horas, según las condiciones óptimas obtenidas en trabajos de investigación anteriores (Avance proyecto Fondecyt 1120627). Trascurrido el tiempo, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y fue filtrada por gravedad con papel Whatman N° 1, luego se le agregó 900 mL de agua destilada y fue acidificada con solución HCl 6N hasta pH 4,5 aprox. Posteriormente la mezcla se lavó con 800 mL de hexano (4 lavados) en embudos de decantación, volviendo a repetir la operación con la fase acuosa obtenida. A continuación, las fases hexánicas conseguidas en ambos lavados fueron filtradas con sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro en papel Whatman N°1, para posteriormente ser rotaevaporadas al vacío a 40°C. Finalmente los ácidos grasos poliinsaturados obtenidos se almacenaron en el congelador a -80°C (Pando y cols, 2014).

4.2.3 Desarrollo de triacilglicéridos estructurados con EPA y DHA, mediante la acidólisis enzimática (Lipasa B., *Candida antarctica*) de aceite refinado de salmón, ácido caprílico y concentrado AGPICL n-3 en dióxido de carbono supercrítico.

El proceso de acidólisis enzimática se llevó a cabo utilizando dióxido de carbono (CO₂) como disolvente, el cual es inyectado al proceso mediante el uso de un equipo especializado de CO₂ supercrítico Speed SFE system model 7071 (Applied Separation).

Los rangos fijados para las variables independientes fueron obtenidos a partir del trabajo de investigación anterior (Avance proyecto Fondecyt 1120627). Las variables fijadas fueron: 10 g en total para la relación concentrado AGPICL n-3/aceite refinado de salmón /ácido caprílico (6,25 g de concentrado AGPICL n-3; 3,7 g de aceite refinado y 50 mg de ácido caprílico), 5% según al peso del sustrato para la concentración de enzima (500 mg), 7,5 h para el tiempo, 200 bar para la presión y 50°C para la temperatura. Posteriormente, se procedió a programar la reacción de acuerdo a la temperatura, presión y tiempo establecidos según el diseño. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80°C para su análisis.

4.2.3.1 Purificación de mezcla resultante para obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs).

Para la separación de los productos conforme a la reacción de acidólisis (TAGs y ácidos grasos libres) se desarrolló el siguiente procedimiento: 1 g de mezcla de la reacción final, fue pesado en un balón de fondo plano, se le adicionó 50 mL de sol. de etanol al 95% caliente y 1 mL de sol. de fenofaleína al 1% en etanol. Posteriormente se llevó a cabo una neutralización utilizando sol. de NaOH 1N (en etanol al 50%) hasta que apareciera una coloración rosada permanente. Una vez neutralizada la solución fue trasvasijada a un embudo de decantación de 500 mL, donde se realizaron dos lavados con 10 mL de n-hexano cada uno, adicionando 10 mL de agua destilada recuperando finalmente la fase hexánica en otro embudo de decantación de 250 mL. A continuación se adicionó una gota de fenofaleína al 1% en etanol a las fases hexánicas recolectadas y se realizaron varios lavados

con 10 mL de etanol al 10% cada uno, hasta la completa desaparición de jabones (color rosado).

La fase hexánica libre de jabones fue filtrada con sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro en papel Whatman N°1 y recibida en un matraz de corazón, previamente pesado. Finalmente la mezcla fue rotaevaporada y pesada para obtener el rendimiento de los TAG por diferencia de peso (Hita y cols, 2007).

4.2.3.2 Análisis por cromatografía en capa fina

Para llevar a cabo la cromatografía en capa fina (TLC), se utilizaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄ 20x20 cm, marca Merck, elaborada en Alemania. El eluyente utilizado se compone de: Cloroformo-acetona-metanol, en proporción 95:4,5:0,5 (v/v/v) respectivamente (Gutiérrez, 2002).

4.2.4 Obtención de mantequilla de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga a partir de triacilglicéridos estructurados

4.2.4.1 Preparación de la mantequilla de crema de leche

Una vez recepcionada la crema de leche marca Colún, se sometió a congelación (-23°C) durante 24 h, luego se refrigeró a 4°C para posteriormente agregar la crema a la procesadora. A continuación, se realizó el batido hasta la inversión de fase, posteriormente se eliminó el suero generado. En último lugar se realizó un amasado final para terminar de homogeneizar el producto obtenido (Tetra Pack, 1996).

4.2.4.2 Diseño experimental

Se desarrolló un diseño de compuesto central 2² más estrella, basado en la Metodología Superficie de Respuesta, el cual se compone de 2 factores (velocidad de agitación y tiempo de agitación) con 10 corridas experimentales en total, dentro de las cuales 2 corresponden a punto central, lo que permitirá estimar el error experimental.

4.2.5 Efecto del proceso de homogeneización sobre las propiedades térmicas de mantequilla con contenido “alto” de EPA y DHA n-3 cadena larga

Se determinó el efecto de las variables independientes del proceso de homogeneización de una matriz de mantequilla alta en EPA y DHA: tiempo de 0 a 5 minutos y velocidad de agitación de 3000 a 9000 r.p.m sobre las propiedades térmicas de la mantequilla con incorporación de n-3 de cadena larga.

4.2.5.1 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

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

4.2.5.2 Obtención de perfil de fusión característico y determinación del comportamiento térmico de la mantequilla mediante DSC.

La determinación del perfil de fusión se realizó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En primera instancia se pesaron 5-10 mg de muestra de mantequilla y se colocaron en capsulas de aluminio. Las muestras de mantequillas estuvieron previamente refrigeradas a 4°C.

Una vez listo el equipo, se realizó el siguiente programa de temperaturas, con que fueron analizadas cada muestra en corridas independientes:

- Llevar desde estado basal a una temperatura de 20°C por 1 min.
- Enfriar gradualmente hasta -80°C a una velocidad de enfriamiento de 5°C por min, manteniendo por 5 min a esa temperatura.
- Calentar desde -80°C hasta 70°C a una velocidad de 5°C por min, manteniendo por 5 min a esa temperatura.
- Enfriar gradualmente a una velocidad de 5°C por min desde 70°C a -80°C.
- Mantener isotérmicamente a -80°C por 5 min.

(Rodríguez, 2002).

4.2.5.3 Determinación del rango de fusión, *peaks* de fusión, entalpía de fusión (J/g), *ONSET* (°C) y porcentaje del contenido de grasa sólida (%CGS), de la mantequilla comercial, mantequilla control y las diferentes formulaciones realizadas.

La determinación del rango de fusión de cada uno de los aceites se realizó por DSC, según el programa de temperaturas fijado anteriormente.

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

La determinación de la entalpía de fusión fue dada por el área bajo la curva dH/dt versus tiempo. La entalpía total de fusión de los componentes de la mantequilla fue entregada directamente por el programa del equipo DSC.

El *ONSET* corresponde al punto de temperatura en la cual comienza el proceso térmico de fusión. Fue entregada directamente por el programa del equipo DSC.

El contenido de grasa sólida (CGS) caracterizó las muestras en función de la temperatura mediante integración de áreas parciales, bajo las curvas de fusión respectivas.

4.2.5.4 Determinación del efecto de las variables, tiempo y velocidad de agitación, sobre el contenido de grasa sólida versus temperatura de mantequilla “alta” en n-3.

Las modificaciones de las variables velocidad y tiempo de agitación, determinaron la obtención de una mantequilla estable con incorporación de triacilglicéridos estructurados con “alto” contenido de EPA y DHA. Por lo cual, se analizaron las curvas de contenido de grasa sólida versus temperatura de cada formulación, mediante integración del área de los *peaks* de fusión.

4.2.6 Caracterización de mantequillas con “alto” contenido de EPA y DHA a partir de triacilglicéridos estructurados por cromatografía de gas-líquido y microscopía de luz polarizada.

4.2.6.1 Análisis del perfil de ácidos grasos

4.2.6.1.1 Metilación con estándar interno

La metilación de los ácidos grasos de mantequilla, del aceite crudo y refinado de salmón, los ácidos grasos del concentrado AGPICL y los obtenidos luego de la acidólisis enzimática de AGPICLn-3/aceite refinado de salmón y su respectiva purificación, se realizó con el objetivo de obtener metil-ésteres que luego puedan ser detectados por la técnica de cromatografía de gas-líquido. Se comenzó pesando, en un matraz aforado de 50 mL, 100 mg de muestra, agregado 10 mL de metilato de sodio 0,2 N alcalino, más perlas de ebullición. La mezcla es sometida a un sistema con varilla a reflujo por 10 min a 90°C aprox., luego se deja enfriar hasta 50°C aprox. A continuación, se le adicionó una gota de fenofaleína al 1% en etanol al 95% y se agregó ácido sulfúrico al 4% en metanol hasta la completa desaparición del color rosado, más unas gotas en exceso para asegurar el medio ácido. Nuevamente se trabajó calentando a reflujo con varilla de vidrio por 30 min, transcurridos los cuales se dejó enfriar y se le agregaron 2,5 mL de hexano. A continuación se le adicionaron 0,5 mL de estándar interno metil tricosanoato (triglicérido no contenido en el aceite de pescado), representando el 2,5% aprox. de la muestra como ácido graso (C23:0). Posteriormente el matraz se aforó con solución saturada de NaCl y se dejó reposar por 30 min refrigerada a 4°C. Finalmente las muestras pueden ser almacenadas a -23°C con trazas de sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro para retirar la humedad (Método IUPAC 2.3001, 2.304).

4.2.6.1.2 Caracterización mediante cromatografía de gas-líquido

Se utilizó un cromatógrafo HP 5890 serie II, con detector de ionización de llama, sistema de inyección split y columna capilar SPTM-2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2 um. El programa usado fue: Temperatura del horno (Oven temp) 100°C, temperatura del inyector y del detector 250°C, temperatura inicial 100°C, velocidad (Rate) 3°C/min, temperatura final 140°C, velocidad A (Rate A) 0,5 °C/min,

temperatura final A 170°C, velocidad B (Rate B) 4°C/min con su respectiva temperatura final B de 220°C. Un tiempo inicial de 0 min, un tiempo final de 30 min y un tiempo total de 115,8 min, de acuerdo a AOCS Official Method (AOCS 2009, Ce 1j-7). La identificación de los perfiles se realizó utilizando como referencia el estándar NU-CHEK GCL463 y el programa DataApex Clarity TM.

4.2.6.1.3 Determinación de perfil de ácidos grasos n-3 mediante cromatografía de gas-líquido

La concentración de ésteres metílicos de ácidos grasos FAME se determinó mediante evaluación de la proporción picos/área. La cuantificación de ácidos grasos fue realizada de acuerdo a AOCS Official Method (AOCS 2009, Ce 1j-7). Los resultados se expresaron en g/100 g de muestra y g/100 g de ácidos grasos identificados.

4.2.6.2 Microscopía óptica con luz polarizada

Las muestras se depositaron en portaobjetos, presionadas firmemente con un cubre objeto para fijar las muestras, remover el exceso de líquido, bolsas de aire y por ende obtener una capa fina y clara de cada diseño. En primera instancia las muestras se fotografiaron aun fundidas, luego para las segundas mediciones se atemperaron a 4°C por 72 h. La ampliación microscópica utilizada para el análisis de las muestras fue de 10x, para lo cual se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss equipado con un filtro de polarización (Rodríguez, 2002).

4.2.7 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 2007.

V. Resultados y discusión

5.1 Caracterización del aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos y cromatografía de gas-líquido.

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

Tabla 5: Caracterización del aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón, mantequilla comercial y control, mediante métodos químicos.

Parámetros de calidad	Aceite crudo de salmón	Aceite refinado de salmón	Mantequilla comercial	Mantequilla control
Ácidos grasos libres (AGL; g ácido oleico/100g aceite)	2,20±0,26 ^c	0,30±0,01 ^b	0,30±0,01 ^b	0,40±0,01 ^b
Valor Peróxido (VP; meq oxígeno activo/Kg aceite)	2,10±0,16 ^c	5,23±0,05 ^c	2,06±0,11 ^c	1,66±0,30 ^c
Valor <i>p</i> -anisidina (VA)	5,15±0,29 ^c	6,84±0,46 ^c	-	-
Valor TOTOX (VT)	9,36±0,12 ^c	17,30±0,40 ^c	-	-

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

(2) VA y VT, no realizados en mantequillas.

(a) Significancia en $p < 0,01$.

(b) Significancia en $p < 0,05$

(c) No significativo

Según Pando y cols (2014), en donde se analizan igualmente los aceites comerciales crudos y refinados de salmón, los valores para AGL y VP son concordantes a los obtenidos en este estudio, 1,78±0,04 y 0,23±0,00 (g ácido oleico/100 g aceite) para AGL y 2,73±0,36 y 3,54±0,16 (meq oxígeno activo/kg de aceite) para VP, respectivamente. El aumento en el porcentaje de AGL indica el grado de deterioro hidrolítico que ha sufrido la materia grasa, el que constituye la

medida de rancidez hidrolítica. Para el caso de AGL los valores habituales de materia grasa cruda se encuentra entre 0,5-5%, y para materia grasa refinada deteriorada 0,5-1,5% (Masson, 1985; FAO, 2012).

La rancidez oxidativa es una medida de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes del TAG. El VP mide los hidroperóxidos acumulados correspondientes al primer indicio de rancidez oxidativa, es decir la oxidación primaria. Los valores habituales de VP es de 2–30 meq o más por kg de materia grasa en el caso de materia grasa cruda y para aceites vegetales refinados máximo 10 meq/kg de materia grasa (Codex Alimentarius, 2011).

Pando y cols (2014) encontraron valores de *p*-anisidina, para el aceite crudo y refinado comercial de $5,33 \pm 0,03$ y $5,14 \pm 1,02$, respectivamente a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio indicando que el aceite refinado sufrió mayor deterioro a lo largo del tiempo. El VA es una medida de la formación de compuestos secundarios de oxidación altamente reactivos con predominio de estructuras carbonílicas, como aldehídos y cetonas.

Por otro lado, se observa que en cuanto al VT, el cual indica el valor de oxidación total (Wanasundara y Shahidi, 1995), concuerda con lo obtenido anteriormente, debido a que su valor fue mayor para el aceite refinado que para el aceite crudo, por tanto, se puede concluir que el aceite refinado de salmón presenta deterioro en comparación al aceite crudo de salmón.

Para que una materia grasa sea considerada apta para el consumo humano no debe sobrepasar los límites establecidos en la legislación correspondiente que en el caso de VA y VT los límites recomendados por la International Fish Oil Standards para consumo humano de aceites de pescado son de 15 y 19,5, respectivamente (IFOS, 2014); asimismo, los límites recomendados por Global Organization for EPA and DHA n-3 son de 20 y 26, respectivamente (GOED, 2012). Por consiguiente, los valores obtenidos experimentalmente para los parámetros VA y VT en los aceites crudos y refinados de salmón comercial, se encuentran bajo estos límites recomendados y por ende a pesar de ser uno mayor

a otro, ambos estarían aptos para consumo humano, sin presentar deterioro perjudicial.

Por otro lado, en el caso de las mantequillas tanto comercial como control, los valores obtenidos para acidez libre, fueron de 0,3 y 0,4 (g ácido oleico/ 100 g aceite) respectivamente, los cuales al ser comparados con valores entregados por el RSA, máximo 18 mL de hidróxido de sodio 0,1 N/100g, equivalente a 0,5 (g ácido oleico/ 100 g aceite) y por el Codex, 0,4% m/m, expresado como ácido oleico, evidencian poseer una oxidación controlada dentro de los rangos permitidos (Codex Alimentarius, 2011; RSA, 2013).

Para el caso de índice de peróxidos, las mantequillas comercial y control obtuvieron 2,06 y 1,66 (meq oxígeno activo/Kg materia grasa) respectivamente, superando el valor máximo de 0,3 meq oxígeno activo/kg de grasa, de VP de la materia grasa en la planta entregado por el RSA y los 0,6 meq oxígeno activo/kg de grasa máximo según el Codex Alimentarius. Cabe destacar, que las cifras entregas por ambas referencias son para los productos en planta recién elaborados, por tanto, teniendo en consideración que la mantequilla comercial analizada fue adquirida en góndola de supermercado tiempo después de su elaboración, y en caso similar la crema de leche utilizada para la elaboración de la mantequilla control, los niveles de oxidación lógicamente se ven alterados y aumentados, tanto por el tiempo como por las condiciones de almacenamiento de dichos productos (Codex Alimentarius, 2011; RSA, 2013).

5.2 Obtención de concentrado AGPCLI n-3 con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.

La tabla 5.1 da a conocer las variables y condiciones óptimas arrojadas por un diseño por MSR realizado en trabajos de investigación previos, correspondientes a la realización de la línea del proyecto Fondecyt 1120627. Las cuales fueron utilizadas para llevar a cabo la obtención del concentrado de AGPI n-3, a partir del proceso de complejación con urea. En la literatura varios métodos han sido

reportados para concentrar AGPI de los aceites marinos, con variados rendimientos. Sin embargo, los niveles más altos (65-80%) son alcanzables por los procesos que combinan, ya sea, hidrólisis o esterificación con métodos tales como la extracción de fluido supercrítico, complejación con urea y la destilación molecular, alcanzando concentraciones superiores a 90% (Zuta y cols., 2003).

Tabla 5.1: Rango y valores experimentales de las variables de proceso en el diseño para la producción de concentrado AGPICL n-3 (EPA + DHA).

Variables independientes	Símbolos	Rango y niveles ⁽¹⁾					Variables AGPI optimizadas
		-2	-1	0	1	2	
Proporción urea/AG (g/g)	X ₁	0/(1)	1.5/(1)	3/(1)	4.5/(1)	6/(1)	4,55
Temperatura de cristalización (°C)	X ₂	-30	-15	0	15	30	-23,7
Tiempo de cristalización (h)	X ₃	3.0	14.3	25.5	36.8	48.0	22
Velocidad de agitación (r.p.m)	X ₄	0	250	500	750	1000	500

⁽¹⁾ Rangos y niveles obtenidos a partir de trabajo de investigación anterior (Avance proyecto Fondecyt 1120627).

La complejación con urea se ha aplicado ampliamente para concentrar AGPI a partir de varias fuentes, incluyendo aceites marinos y vegetales. Ratnayake y cols (1988) demostraron a escala piloto la complejación con urea para la concentración de AGPI. En comparación con los otros métodos para producir concentrados de AGPI, el fraccionamiento de urea permite la manipulación de grandes cantidades de materiales en un equipo simple. Dado que el proceso sólo requiere el uso limitado de disolventes orgánicos menos tóxicos tales como etanol, amigables con el medio ambiente. También es rentable, porque la urea es relativamente barata (Zuta y cols, 2003).

La tabla 5.2 muestra el resultado obtenido una vez sometido aceite crudo de salmón por los procesos de saponificación seguido de inclusión con urea, obteniendo de esta manera un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados con alto contenido de n-3 particularmente EPA y DHA. Al observar las cantidades en

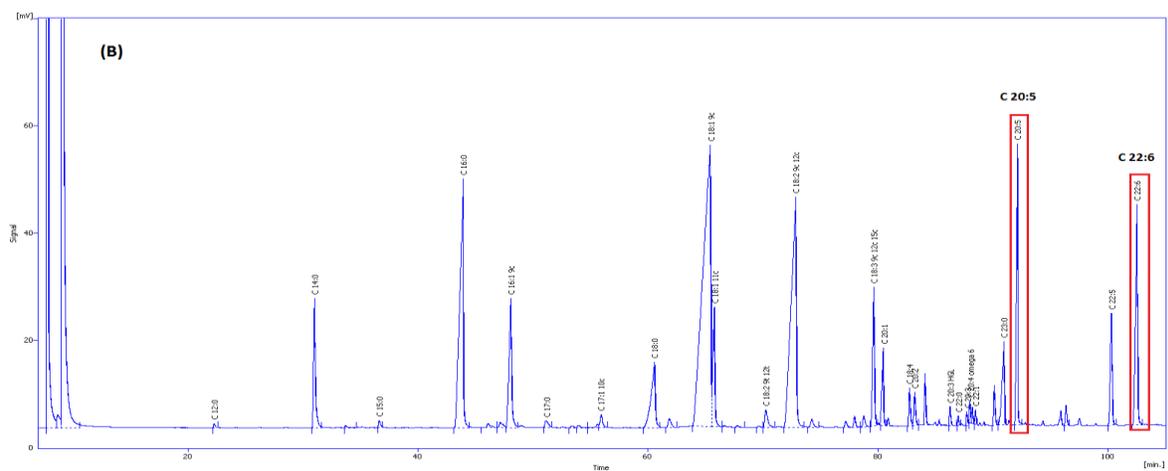
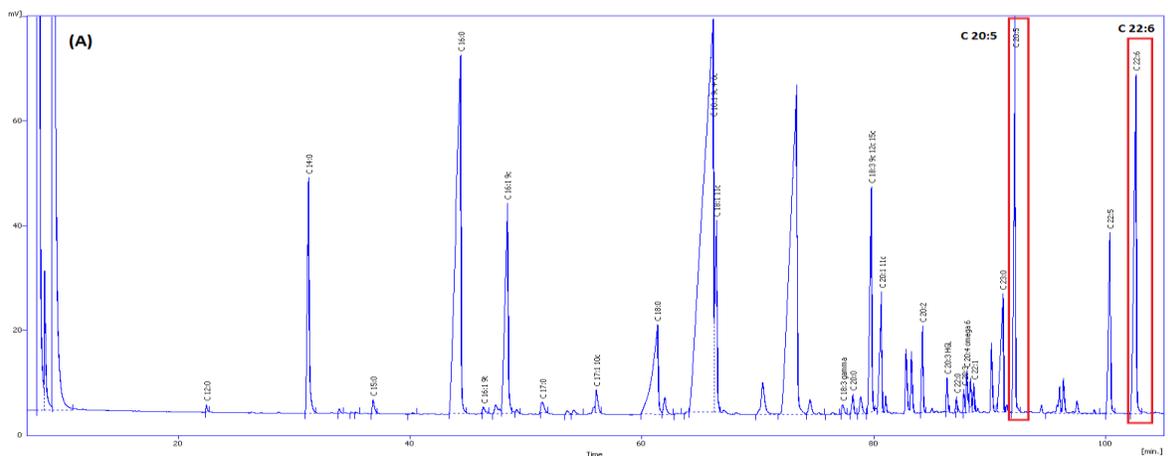
(g/100g AG totales) de los diferentes ácidos grasos que componen ambas muestras, se percibe que los ácidos grasos saturados disminuyen notoriamente su contenido, llegando incluso en algunos casos a desaparecer, por otro lado, el contenido en los ácidos grasos poliinsaturados se ve incrementado en un 60,02%, en especial los ácidos eicosapentaenoico (EPA; C20:5) y docosahexaenoico (DHA; C22:6), correspondientes a un 59,74% (AOCS, 2009).

Lo anterior es corroborado por la figura 5.1, en donde se comparan los cromatogramas tanto del concentrado obtenido como el de los aceites crudo y refinado de salmón. La figura 5.1 muestra claramente cómo las áreas de los *peaks* de EPA y DHA contenidos naturalmente por el aceite refinado (Fig. 5.1A) y crudo (Fig. 5.1B) de salmón se ven aumentados en gran medida en el concentrado AGPICL n-3 de aceite crudo (Fig. 5.1C), mientras que el área de los *peaks* de los ácidos grasos saturados se reducen o desaparecen, como el caso del C14:0 y C12:0, respectivamente.

Tabla 5.2: Composición de ácidos grasos de aceite crudo de salmón y de concentrado AGPICL optimizado (expresado como g/100 g ácidos grasos totales).

N° ácido graso ⁽¹⁾	Ácidos grasos o grupo de ácidos grasos		Aceite crudo de salmón	Concentrado AGPICL n-3 de ACSC
1	Ac. Láurico	C 12:0	0,07	-
2	Ac. Mirístico	C 14:0	3,2	0,36
3	Ac. Pentadecanoico	C 15:0	0,19	-
4	Ac. Palmítico	C 16:0	13,5	-
5	Ac. Palmitoleico	C 16:1 9c	4,58	0,27
6	Ac. Heptadecanoico	C 17:0	0,32	0,48
7	Ac. Heptadecaenoico	C17:1 10c	0,52	0,67
8	Ac. Esteárico	C 18:0	3,76	-
9	Ac. Oleico	C 18:1 9c n-9	29,99	0,36
10	Ac. Vaccenico	C 18:1 11c	3,47	-
11	Ac. Linoeláidico	C 18:2 9t 12t	0,7	5,74
12	Ac. Linoleico	C 18:2 9c 12c n-6	16,42	3,51
13	Ac. γ - Linolenico	C 18:3 6c 9c 12c n-6	0,03	1,42
14	Ac. α -Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c n-3	3,35	1,2

15	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,99	-
16	Ac. Estearidónico	C 18:4 6c 9c 12c 15c n-3	0,79	7
17	Ac. Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c n-6	0,72	3,58
18	Ac. Dihomo γ -linolénico	C 20:3 8c 11c 14c n-6	0,34	0,66
19	Ac. Docosanoico	C 22:0	0,14	-
20	Ac. Eicosatrienoico	C 20:3 11c 14c 17c n-3	0,22	-
21	Ac. Araquidónico	C 20:4 5c 8c 11c 14c n-6	0,38	0,91
22	Ac. Docosenoico	C 22:1 13c	0,21	-
23	Ac. Eicosapentaenoico	C 20:5 5c 8c 11c 14c 7c n-3	5,95	16,48
24	Ac. Docosapentaenoico	C 22:5 7c 10c 13c 16c 19c n-3	2,91	1,56
25	Ac. Docosahexaenoico	C 22:6 4c 7c 10c 13c 16c 19c n-3	6,27	55,76
EPA+DHA			12,22	72,24
ΣTOTAL n-3			19,49	82
ΣAGPI			38,08	97,82
(1) Número de ácido graso o <i>peak</i> del cromatograma				



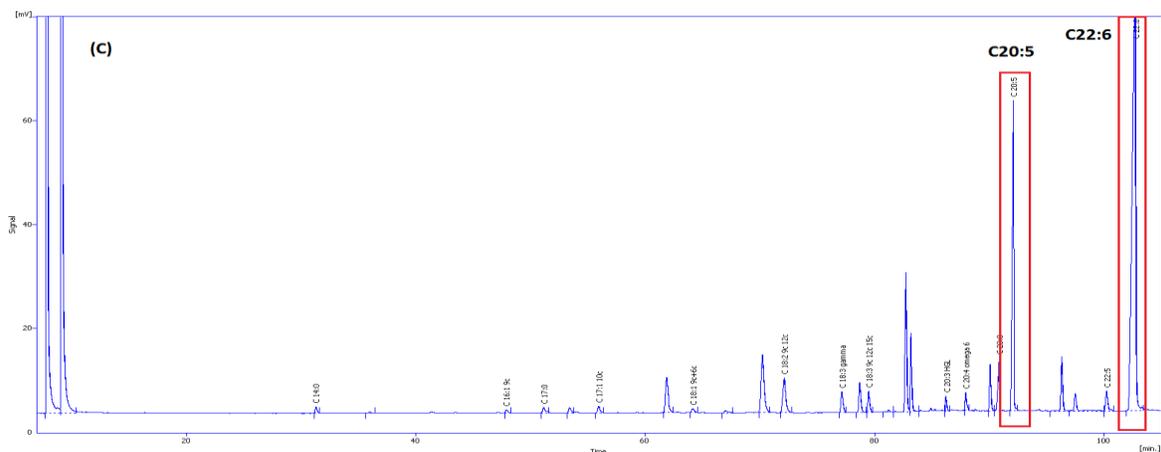


Figura 5.1: Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a aceite refinado de salmón, aceite crudo de salmón y concentrado de AGPICL n-3 de aceite crudo de salmón. A: Aceite refinado de salmón; B: aceite crudo de salmón; C: AGPICL n-3.

Además, el enriquecimiento con ácidos grasos totales n-3 en el concentrado y la recuperación global luego del procesamiento, varía inversamente con el aumento de la relación urea-ácidos grasos, así como con la disminución de la temperatura de cristalización. Por lo tanto, estas variables experimentales deben ser controladas cuidadosamente para lograr un contenido máximo de ácidos grasos totales en el concentrado de n-3 con una recuperación razonable (Wanasundara y Shahidi, 1999).

Según literatura, la urea sola cristaliza en una estructura tetragonal apretada con canales de diámetro 5.67Å. Sin embargo, en presencia de moléculas de cadena lineal larga la urea cristaliza en una estructura de forma hexagonal con canales de 8-12Å de diámetro dentro de los cristales hexagonales. Los canales formados, en presencia de moléculas de cadena larga no ramificadas, son suficientemente grandes para dar cabida a cadenas alifáticas (Figura 5.2, Anexo 2) (Shahidi; Wanasundara, 1998). Mientras las cadenas lineales de los ácidos grasos saturados con seis átomos de carbono o más, son fácilmente aducidas, la presencia de dobles enlaces en las cadenas de carbonos aumenta el volumen de la molécula y reduce la probabilidad de su complejación con urea (Shahidi y Wanasundara, 1998).

Monoenos se complejan más fácilmente en comparación con dienos que, a su vez, forman complejos más fácilmente que trienos. Por lo tanto, la estabilidad de los aductos ácido graso-urea es paralela a la geometría de las moléculas implicadas. Por lo tanto, la formación de compuestos de inclusión con urea depende del grado de insaturación de los ácidos grasos (Shahidi y Wanasundara, 1998).

La fracción de ácidos grasos libres, la cual es mezclada con la solución de alcohol en urea, es a continuación enfriada a una temperatura particular dependiendo del grado de concentración deseada, en este caso $-23,7^{\circ}\text{C}$. Los ácidos grasos saturados, monoenos y, en menor medida, dienos cristalizan con la urea y los ácidos grasos no cristalizados en el solución pueden ser separados por filtración. El líquido o fracción no complejada con urea (NUCF) esta enriquecido con AGPICL n-3 (Shahidi y Wanasundara, 1998).

5.3 Desarrollo de triacilglicéridos estructurados purificados, mediante la acidólisis enzimática (Lipasa B., *Candida antarctica*) de aceite refinado de salmón, ácido caprílico y concentrado AGPICL n-3 en CO_2 supercrítico.

En la tabla 5.3 se aprecian los rangos y condiciones utilizadas para llevar a cabo el proceso de obtención de TAGs “altos” en EPA y DHA mediante acidólisis enzimática con 6,25 g de concentrado AGPICL n-3; 3,7 g aceite refinado de salmón y 0,05 g de ácido caprílico, utilizando 500 mg de enzima inespecífica lipasa B. *Candida antarctica*, bajo condiciones de presión 200 bar y 50°C de temperatura de CO_2 supercrítico. Los datos fueron obtenidos de trabajos anteriores de investigación Fondecyt 1120627, en donde las variables optimizadas escogidas son valores medios.

La tabla 5.4 da a conocer la composición de los AG de los TAGs purificados, obtenidos a partir del proceso de acidólisis enzimática entre concentrado de AGPICL n-3 de aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón y ácido caprílico, bajo condiciones de SCCO_2 , mostrando una clara incorporación de los

ácidos grasos EPA, DHA y ácido caprílico, logrado el objetivo planteado (AOCS, 2009).

Tabla 5.3: Diseño compuesto central para el desarrollo de triacilglicéridos estructurados (TAGs) mediante acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo condiciones de CO₂ supercríticas.

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

⁽¹⁾ Rangos y niveles obtenidos de Fondecyt 1120627.

Tabla 5.4: Composición de ácidos grasos de TAGs purificados mediante acidólisis enzimática con enzima (*Candida antarctica*) bajo condiciones de CO₂ supercríticas (expresado como g/100 g AG totales).

N° ácido graso	Ácidos grasos o grupo de ácidos grasos	Aceite crudo de salmón	Aceite refinado de salmón	AGPIC L n-3 de ACSC	TAGs sin purificar	TAGs purificados
1	Ac. Caprílico	C 8:0	-	-	0,29	0,08
2	Ac. Láurico	C 12:0	0,07	0,09	0,03	0,07
3	Ac. Mirístico	C 14:0	3,2	4	0,36	3,17
4	Ac. Pentadecanoico	C 15:0	0,19	0,27	-	0,09
5	Ac. Palmítico	C 16:0	13,51	16,86	-	7,05
6	Ac. Palmitelaidico	C16:1 9t	-	0,16	-	-
7	Ac. Palmitoleico	C 16:1 9c	4,58	5,72	0,27	2,44
8	Ac. Heptadecanoico	C 17:0	0,32	0,31	0,48	0,25
9	Ac. Heptadecaenoico	C17:1 10c	0,52	0,55	0,67	0,57
10	Ac. Esteárico	C 18:0	3,76	4,55	-	1,67
11	Ac. Oleico	C 18:1 9c n-9	29,99	36,36	0,36	14,91
12	Ac. Vaccenico	C 18:1 11c	3,47	3,72	-	1,66
13	Ac. Linoeláidico	C 18:2 9t 12t	0,7	-	5,74	-
14	Ac. Linoleico	C 18:2 9c 12c n-6	16,42	-	3,51	10,39
15	Ac. γ - Linolenico	C 18:3 6c 9c 12c n-6	0,03	0,2	1,42	1,00
16	Ac. Eicosanoico	C 20:0	-	0,31	-	0,12
17	Ac. α-Linolénico	C 18:3 9c 12c	3,35	3,95	1,2	2,41

		15c n-3					
18	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,99	2,19	-	0,91	1,64
19	Ac. Estearidónico	C 18:4 6c 9c 12c 15c n-3	0,79	-	7,00	-	-
20	Ac. Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c n-6	0,72	1,03	3,58	0,47	0,76
21	Ac. Dihomo γ -linolénico	C 20:3 8c 11c 14c n-6	0,34	0,38	0,66	0,57	0,36
22	Ac. Docosanoico	C 22:0	0,14	0,15	-	0,11	0,16
23	Ac. Eicosatrienoico	C 20:3 11c 14c 17c n-3	0,22	0,24	-	0,11	0,18
24	Ac. Araquidónico	C 20:4 5c 8c 11c 14c n-6	0,38	0,56	0,91	0,86	0,51
25	Ac. Docosenoico	C 22:1 13c	0,21	0,3	-	0,21	0,23
26	Ac. Eicosapentaenoico	C 20:5 5c 8c 11c 14c 7c n-3	5,95	7,15	16,48	13,20	6,67
27	Ac. Docosatetraenoico	C 22:4 7c 10c 13c 16c n-6	-	-	-	0,00	0,19
28	Ac. Docosapentaenoico	C 22:5 7c 10c 13c 16c 19c n-3	2,91	3,43	1,56	2,21	2,63
29	Ac. Docosahexaenoico	C 22:6 4c 7c 10c 13c 16c 19c n-3	6,27	7,52	55,76	38,14	8,86
EPA+DHA			12,22	14,67	72,24	51,34	15,53
ΣTOTAL n-3			19,49	22,29	82	56,07	21,51
ΣAGPI			38,08	24,46	97,82	69,36	39,68

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

A partir del concentrado de AGPICL n-3 de aceite crudo, con 72,24 (g/100 g de AGT) de EPA y DHA, y considerando el aporte de los ácidos grasos del aceite refinado comercial de salmón, 14,67 (g/100 g de AGT) de EPA y DHA, se logra finalmente por medio de acidólisis enzimática en SCCO₂, la cantidad de 51,34 (g/100 g de AGT) de EPA y DHA en la mezcla resultante de TAGs sin purificar, los cuales una vez purificados, es decir eliminando los AGL y compuestos de reacciones secundarias, proporcionan 15,53 (g/100 g de AGT) de EPA+DHA en la estructura de los TAGs purificados, denotando una incorporación del 30,25% del EPA y DHA, provenientes de la mezcla resultante de los TAGs no purificados.

De esta manera, para lograr realizar los diseños posteriores de mantequillas con “ALTO” contenido de EPA y DHA, OMEGA 3 DE CADENA LARGA, se requirió un mínimo de 2,2 g (220 mg) de EPA+DHA para la realización de 10 diseños. Los 15,53 g de EPA+DHA que se encuentran en 100 g de AG totales, se llevaron a 7 g de porción habitual diaria de mantequilla (RSA, 2013), de esta manera se determinó que sería necesario agregar 1,4 g de TAGs purificados, para obtener

una formulación con “ALTO” contenido de EPA y DHA, OMEGA 3 de cadena larga, en la matriz de mantequilla fabricada.

El objetivo del PROYECTO FONDECYT N° 1120627. 2012-2014, consistió en lograr la incorporación de EPA y DHA en posición sn-2 de los TAGs, la cual favorece la posibilidad de absorción en el organismo. Esto es lo que diferencia el contenido de n-3 en los aceites, ya que los ácidos grasos pueden encontrarse tanto como AGL y/o formando parte de la estructura de los TAG, mientras que los TAGs elaborados aseguran en su estructura el contenido de n-3 EPA y DHA disponibles para su absorción. Es probable que las condiciones utilizadas para el diseño MSR, obtenido de trabajos anteriores, hayan sido muy exigente en cuanto al posicionamiento de los ácidos grasos de interés, dejándolos incorporados mayoritariamente en posición sn-2 y por tanto hubo baja incorporación en posición sn-1 y sn-3, transformándose en pérdida, ya que al purificar los TAGs fueron eliminados los AGL, al no haber sido incorporados por la estructura del TAG. Debido a lo anterior, se recomienda la realización en este trabajo de un análisis de la composición en cuanto AG que comprendan la estructura de los TAGs, para verificar posición sn-2.

5.4 Obtención de mantequilla con contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga a partir de triacilglicéridos estructurados.

La Tabla 5.5 muestra un diseño compuesto central bidimensional 2^2 + estrella del proceso de homogeneización de mantequilla para la incorporación de TAGs con contenido “alto” de EPA+DHA correspondiente a una suplementación sobre 200 mg EPA+DHA/por porción de consumo de acuerdo al RSA (2013).

En la tabla se muestran las diferentes formulaciones realizadas, cuya variable independiente velocidad de agitación mínima fue de 3000 r.p.m. y la máxima de 9000 r.p.m., mientras que para la variable tiempo de agitación su mínimo fue de 0 min y su máximo fue de 5 min. El valor medio de 6000 r.p.m. y 2,5 min, está dado por los dos puntos centrales correspondientes a los diseños 9 y 10.

Tabla 5.5: Diseño compuesto central bidimensional 2^2 más estrella del proceso de homogeneización de mantequillas con contenido “alto” de EPA+DHA proveniente de TAGs, con velocidad y tiempo de agitación como variables independientes.

Formulaciones	Velocidad	Tiempo
Unidades	(r.p.m.)	(min)
1	3879	0,7
2	8121	0,7
3	3879	4,3
4	8121	4,3
5	3000	2,5
6	9000	2,5
7	6000	0
8	6000	5
9	6000	2,5
10	6000	2,5

Por cada 7g de mantequilla control, previamente elaborada, fueron adicionados 1,4 g aprox. de TAGs purificados con EPA+DHA, en cada formulación, previo al proceso de homogeneización. Una vez realizadas las formulaciones, según condiciones de tabla 5.5, estas fueron analizadas por cromatografía de gas-líquido, dando como resultado valores cercanos entre sí en la mayoría de los diseños.

Las diez formulaciones realizadas contienen en promedio 243 mg de EPA+DHA en 7 g de mantequilla cada uno (ver tabla 5.6), lo cual denota el cumplimiento de la consigna propuesta en primera instancia en el título de la presenta memoria (“Obtención de mantequilla ALTA en EPA+DHA, OMEGA 3 de CADENA LARGA a partir de triacilglicéridos estructurados”), ya que se logró la elaboración de mantequilla con más de 200 mg de EPA+DHA por porción de consumo habitual, motivo por el cual, según el RSA, se permite nombrar el producto con el descriptor de “ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de CADENA LARGA” (RSA, 2013).

Tabla 5.6: Validación de formulaciones de mantequilla con triacilglicéridos estructurados con alto contenido de EPA+DHA y ácido caprílico en los diversos experimentos del diseño de mantequillas con TAGs, mediante aplicación de la técnica de cromatografía de gas-líquido.

Formulaciones	Velocidad	Tiempo	EPA+DHA	EPA+DHA	Ácido caprílico (C8:0)
Unidades	(r.p.m.)	(minutos)	(g/100 g AG totales)	(mg/7g de mantequilla) ⁽¹⁾	(mg/7g de mantequilla) ⁽¹⁾
1	3879	0,7	3,2	223,7	71,1
2	8121	0,7	3,2	226,6	65,0
3	3879	4,3	3,5	247,9	62,0
4	8121	4,3	3,4	240,6	65,0
5	3000	2,5	4,4	307,0	67,9
6	9000	2,5	3,4	237,5	70,0
7	6000	0	3,4	236,9	72,3
8	6000	5	3,4	241,1	69,1
9	6000	2,5	3,6	248,8	65,8
10	6000	2,5	3,1	219,0	63,8
TAGs purificados			15,5	219,0 ^(*)	1,2 ^(*)
Mantequilla control			-	-	87,1
Mantequilla comercial			-	-	71,7

^(*) Valor obtenido a partir del cálculo de haber adicionado 1,41 g aprox. de TAG purificados en 7 g de mantequilla en cada caso.
⁽¹⁾ Porción mantequilla: 7 g.

La diferencia en cuanto a mg de EPA+DHA entre cada diseño, observados en la tabla 5.6, puede deberse a desviaciones en la pesada, debido a que las muestras fueron pesadas en estado de fusión para mantenerlas homogéneas; por ende la temperatura mayor a la ambiental pudiese haber afectado el peso entregado digitalmente por la balanza de los TAGs purificados agregados posteriormente sobre las muestras fundidas.

Por otra parte, se observa en la tabla 5.6, que las mantequillas control y comercial, en ningún caso presentan AGPICL n-3, como son el EPA y DHA, por tanto la adición de los TAGs purificados queda en evidencia.

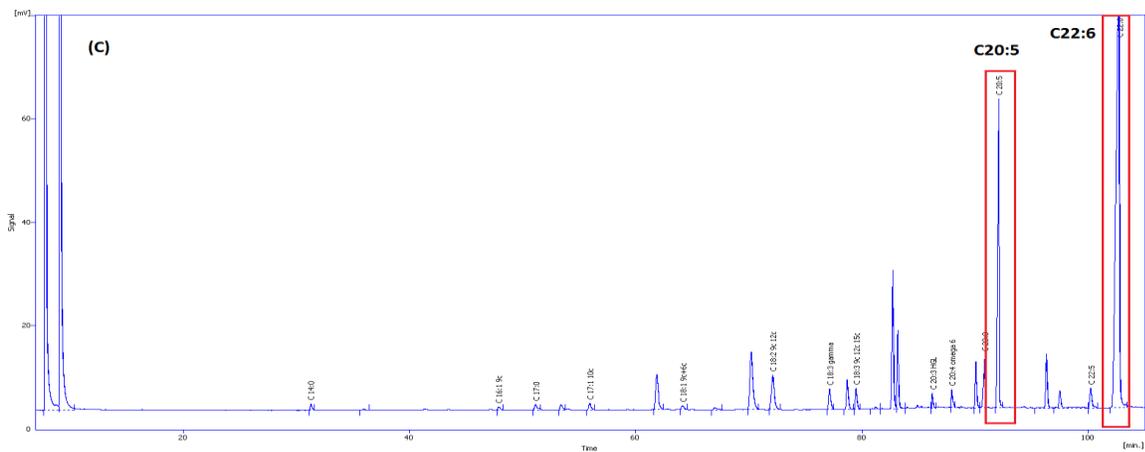
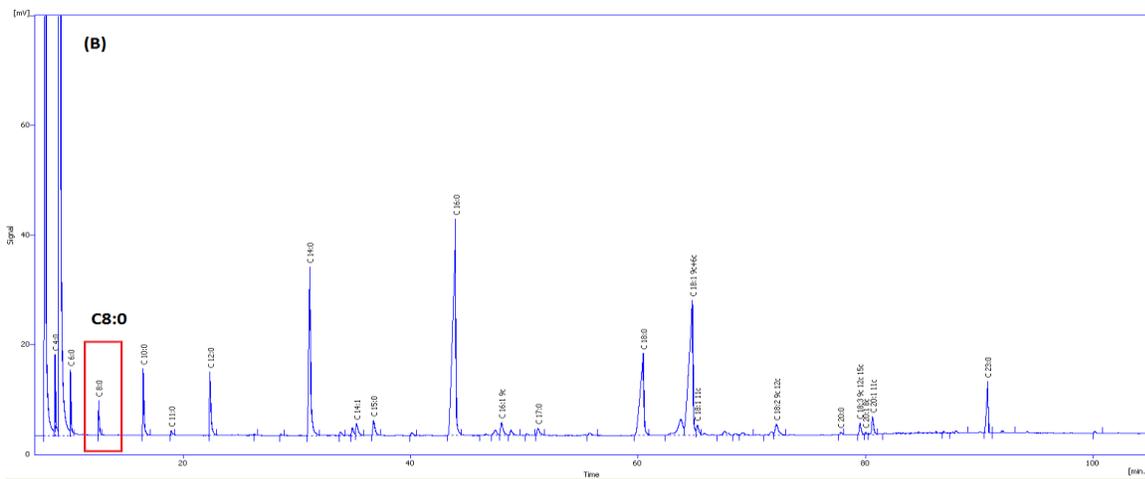
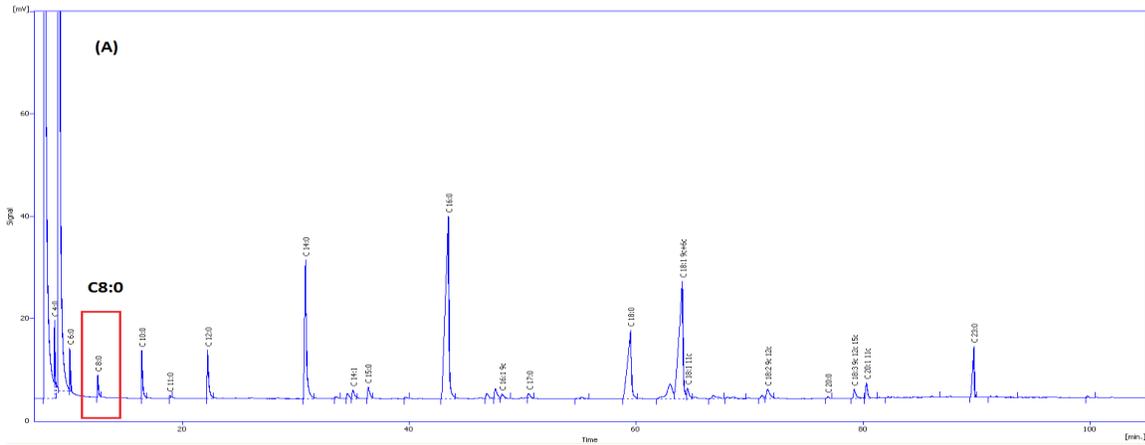
Lo anterior se aprecia de mejor manera en la figura 5.3, en donde se muestran los cromatogramas obtenidos para las mantequillas comercial (Fig. 5.3A) y control (Fig. 5.3B), dando a conocer los *peaks* de los ácidos grasos que las componen, mayoritariamente saturados y monoinsaturados, siendo de mayor relevancia el ácido caprílico (C8:0), sin presentar los *peaks* de EPA y DHA característicos. Se muestran también los cromatogramas de concentrado AGPICL n-3 (Fig. 5.3C), TAGs purificado (Fig. 5.3D) y una de las formulaciones (Fig. 5.3E), los cuales comparados entre ellos muestran claramente la incorporación de los ácidos EPA y DHA contenidos en el concentrado AGPICL n-3 en los TAGs purificados, los cuales a su vez fueron exitosamente adicionados a la formulación de mantequilla, cuyo cromatograma permite ver de manera indudable los *peaks* de EPA y DHA dentro de su composición, en contraste con los cromatogramas de la mantequilla control y comercial (AOCS, 2009; Masson, 1985). La tabla 5.7 con la respectiva composición de ácidos grasos de la figura 5.3, se encuentra en el anexo 3.

Con la intención de respaldar aún mejor los resultados alcanzados, se observa en las figuras 5.4 y 5.5, cromatografías en capa fina (TLC) realizadas para comparar y validar la presencia de TAG, AGL o la mezcla de ambos.

En la figura 5.4, se observan en el primer carril solo TAGs provenientes de aceite de salmón; a su lado encontramos solo concentrado AGPICL n-3, los cuales son solo AGL; finalmente, tenemos TAGs no purificados (NO) compuestos por ácidos AGL y TAG, y TAGs purificados (Purif) compuestos solo por TAG. Por consiguiente, según las marcas dejadas por las muestras (orden de la elución), influenciadas según la polaridad de la fase móvil, podemos determinar la pureza de los TAGs purificados, ya que se asemejan en posición a la banda dejada solo por TAG, mientras que los TAGs NO purificados dejan doble marca en su carril, que se encuentran tanto a la altura de los TAGs como de los AGL (Gutiérrez, 2002).

De manera similar, en la figura 5.5, vemos TAGs NO purificados compuestos de AGL y TAG, mantequilla comercial Colón compuesta solo de TAG naturales, mantequilla formulación 7 (D7) compuesta de TAGs purificados y mantequilla

control compuesta solo con TAG naturales. Por tanto, se verifica la pureza de los TAGs incorporados a la formulación, ya que ésta solo presenta marca a la altura de los TAGs, al igual que la mantequilla control y comercial, y a diferencia del carril de los TAGs NO purificados que muestran tanto TAGs como AGL.



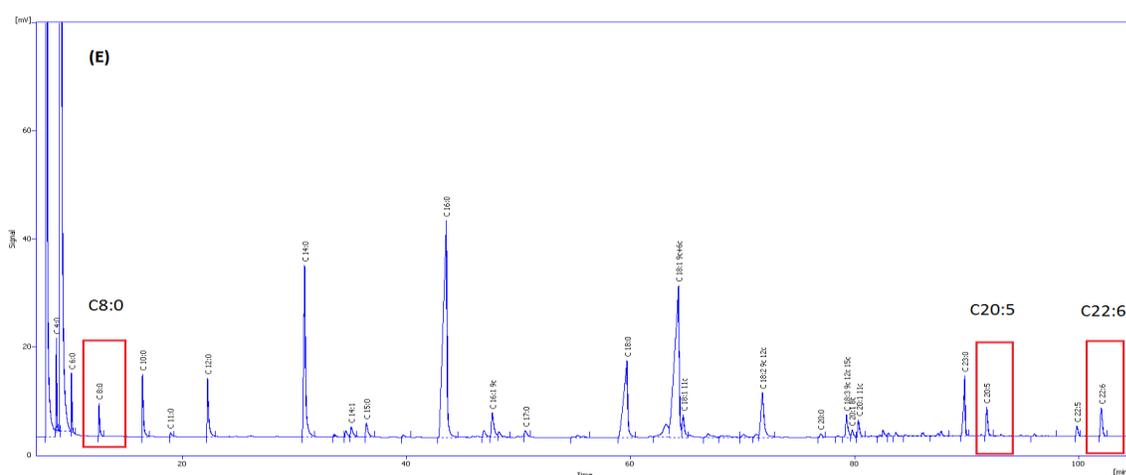
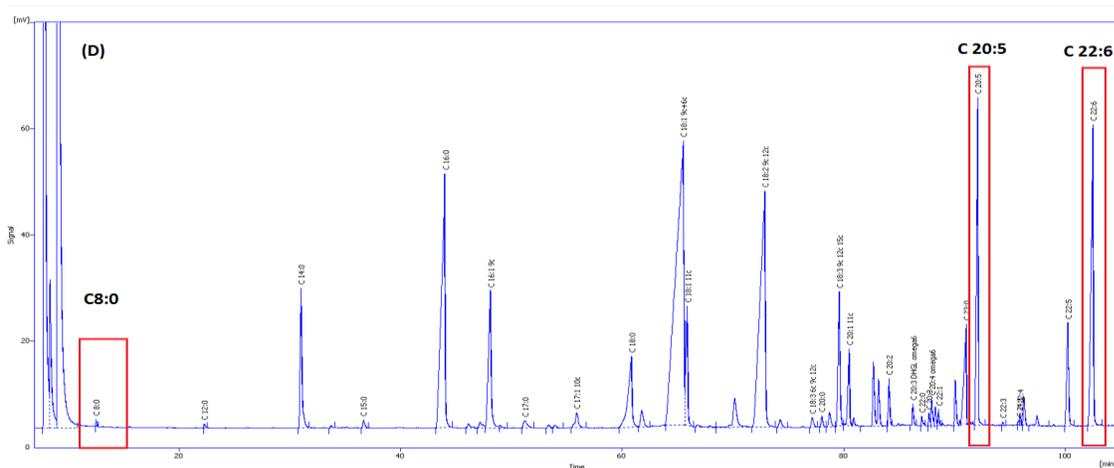


Figura 5.3: Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a, A: Mantequilla comercial (Colún); B: Mantequilla control; C: AGPICL n-3; D: TAGs purificado; E: Formulación D7 (6000 r.p.m; 0 min).

Los cromatogramas de los TAGs purificados de la figura 5.3 obtenidos a partir del proceso de acidólisis enzimática entre AGPI n-3 de ACCS/ ARCS/ácido caprílico, bajo SCCO_2 , muestran la clara incorporación de los ácidos grasos EPA, DHA y ácido caprílico. Al comparar los cromatogramas de TAGs y formulación D7 de la Figura 5.3, en ambos se observa la incorporación de los ácidos EPA y DHA contenidos en el concentrado AGPICL n-3. De la misma forma en las formulaciones de mantequillas del diseño experimental se presentan incorporados los *peaks* de los ácidos n-3 de EPA y DHA en su composición y ácidos grasos de cadena media C8:0, en contraste con los cromatogramas de la mantequilla control y comercial.

5.4.1 Validación de formulaciones de mantequilla alta en contenido de EPA+DHA con TAGs obtenidas en el proceso de homogeneización mediante cromatografía en capa fina (TLC).

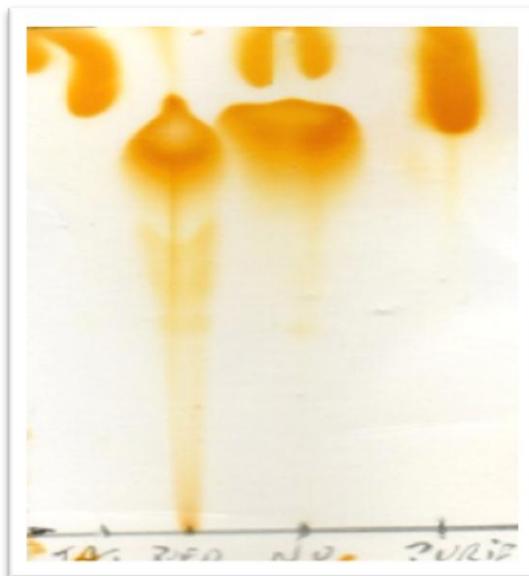


Figura 5.4: TLC correspondiente a triacilglicéridos de aceite de salmón (TAG), concentrado de AGPICL n-3 con ácidos grasos libres (AGL) de aceite crudo de salmón (PUFA), TAGs no purificados (NO) y TAGs purificados (Purif).

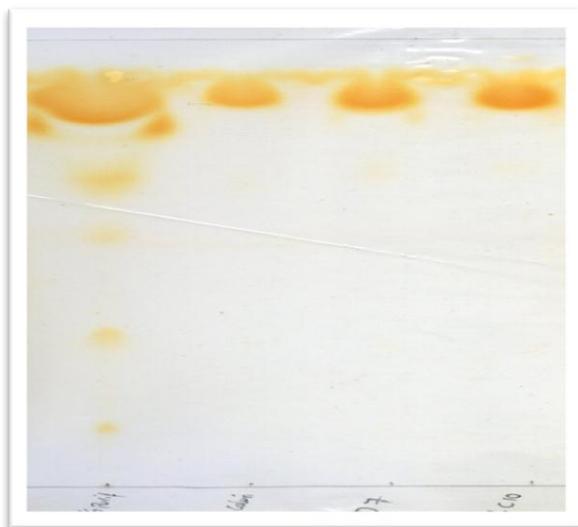


Figura 5.5: TLC correspondiente a TAGs NO purificados, mantequilla comercial Colún (M. Colún), mantequilla formulación 7 (D7 (6000 r.p.m; 0 min)) y mantequilla control (C10).

5.5 Estudio del efecto del proceso de homogeneización de mantequilla “alta” en EPA+DHA con triacilglicéridos estructurados, sobre el comportamiento térmico mediante el método superficie de respuesta.

La materia grasa de la mantequilla con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga, analizada por DSC, posee 3 fracciones representativas: la fracción de TAG con *peak* de alto punto de fusión (PPFA), temperatura de fusión media (PPFM) y una fracción de bajo punto de fusión (PPFB) (ver tabla 5.8). De forma similar, otros estudios presentan análisis de termogramas que muestran la curva de fusión de grasa de leche anhidra, con agrupación de los PF en fracciones similares (Ronholt, 2013; Rodríguez y cols, 2001).

Tabla 5.8: Comportamiento térmico del diseño compuesto central 2² más estrella del proceso de homogeneización de mantequillas con TAGs con alto contenido de EPA+DHA y ácido caprílico, mantequilla control, mantequilla comercial (Colún) y TAGs purificados.

Formulación	Variables de proceso		Variables respuesta					
	Velocidad	Tiempo	Peaks máximos de fusión			ONSET	Rango de fusión	
			PPFB ¹	PPFM ²	PPFA ³			
Unidades	(r.p.m)	(minutos)	(°C)			(°C)	(°C)	
1	3879	0,7	-71,61	8,82	33,88	-78,65	-78	40
2	8121	0,7	-70,99	10,22	35,09	-78,04	-77	50
3	3879	4,3	-70,1	8,79	33,23	-78,51	-78	40
4	8121	4,3	-71,18	9,68	26,47	-77,97	-77	55
5	3000	2,5	-71,75	9,45	32,23	-78,66	-78	50
6	9000	2,5	-72,51	10,39	34,99	-78,36	-78	40
7	6000	0	-71,35	9,66	32,63	-77,5	-77	55
8	6000	5	-71,1	10,09	35,3	-77,63	-77	50
9	6000	2,5	-70,6	11,6	27,7	-77,29	-75	40
10	6000	2,5	-71,86	11,33	28,2	-77,23	-77	40
M. comercial			-25,36	13,65	32,87	-78,07	-40	40
M. control			-0,14	13,95	32,64	-78,19	-44,76	50
TAG purificados			-69,87	-12,12	-	-78,62	-80	-4,55

(1) PPFB: *Peak* punto de fusión bajo

(2) PPFM: *Peak* punto fusión medio

(3) PPFA: *Peak* punto fusión alto

En la tabla 5.8, se observan los diversos PPFB obtenidos para las muestras analizadas por DSC, dando a conocer las diferencias existentes entre los valores arrojados para las mantequillas comercial (-25,4°C) y control (-0,1°C) versus los TAGs purificados (-69,9°C) y las diversas formulaciones de mantequillas “altas” en EPA+DHA (de -72,5°C a -70,1°C). Por consiguiente, las formulaciones de mantequilla con AGPICL n-3 en su estructura poseen PPFB similares a los obtenidos por TAGs purificados, alejándose de los valores observados para las mantequillas, comercial y control, con ausencia de AGPICL n-3. La diferencia en el comportamiento de fusión de las distintas muestras, podría atribuirse a la diferencia en los tipos y, distribución de los ácidos grasos en el triacilglicérido de la materia grasa (Rodríguez, 2002).

Por otro lado, investigaciones recientes en DSC de aceite de arenque revelaron que el intervalo de fusión ha de estar entre -60,7°C y 21,4°C (Tolstorebrov y cols, 2014), valores que caben dentro del rango de fusión detectado para los diseños de mantequillas “ALTAS” en EPA y DHA con adición de TAGs purificados, provenientes de aceites de salmón. Cabe destacar, que los rangos de fusión son similares entre las mantequillas comerciales y control. Según Rodríguez (2002) el rango de fusión de mantequilla de cabra y vaca fue de, -43 a 34°C y -40 a 43,2°C, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los rangos obtenidos en los análisis realizados en la presente tesis.

5.5.1 Validación de formulaciones de mantequilla alta en contenido de EPA+DHA con triacilglicéridos estructurados obtenidas en el proceso de homogeneización mediante comportamiento de fusión por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La realización de la MSR diseño compuesto central 2² más estrella del proceso de homogeneización de mantequillas con un alto contenido de EPA+DHA provenientes de TAGs purificados, fue llevada a cabo obteniendo como resultado una incorporación real de los compuestos n-3 independiente de las variables tiempo y velocidad de agitación, quedando demostrado con la técnica de DSC.

En la figura 5.6, se observan termogramas con distintas curvas de fusión, donde las curvas A y B representan a las mantequillas comercial y control, respectivamente; las cuales no presentan un PPFB a temperaturas cercanas a los -70°C , a diferencia de la curva C, que representa los TAGs purificados, que se componen principalmente de TAG con AGPICL n-3 EPA y DHA, y que presenta un *peak* (PPFB) sobresaliente a una temperatura de $-69,9^{\circ}\text{C}$, dado que los ácidos grasos insaturados son líquidos a temperatura ambiente debido a sus bajas temperaturas para los puntos de fusión (Tetra Pack, 1985).

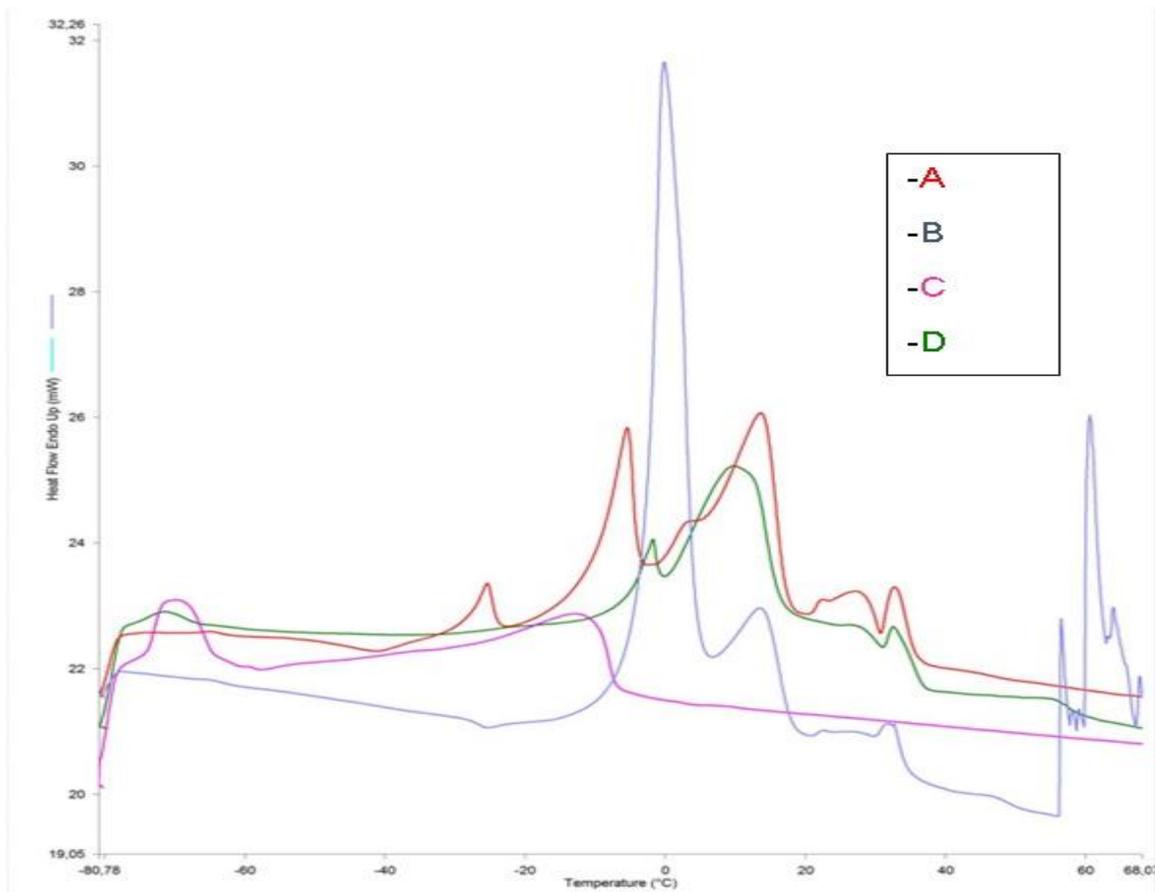


Figura 5.6: Perfiles de fusión obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). A: Mantequilla comercial (Colún); B: Mantequilla control; C: TAGs purificado; D: Formulación 7 (D7 (6000 r.p.m; 0 min)).

En tanto, la curva D correspondiente a la formulación D7 del diseño correspondiente a la matriz de mantequilla suplementada con n-3, muestra como

resultado final la incorporación de TAGs conteniendo concentrado de AGPICL n-3 de ACCS/ácido caprílico y ARCS, luego de la acidólisis enzimática con la enzima *Candida antarctica* bajo SCCO₂, presentando una protuberancia en la zona del *peak* de PPFB, misma zona que la curva C (tabla 5.8). Similar comportamiento presentan las curvas del resto de las formulaciones (Anexo 4). Por ende, se podría presumir que el *peak* PPFB estaría representando el punto de fusión de los TAG con AGPICL n-3 principalmente EPA y DHA.

Al igual que la mantequilla Comercial, la mantequilla control sin adición de TAGs con AGPI n-3, y D7 solo presentan triacilglicéridos en su composición. Según literatura, el punto de fusión de los TAG depende de la longitud de cadena y el nivel de insaturación de los ácidos grasos que los componen. Cabe señalar que el aumento del número de dobles enlaces influye en la temperatura de fusión del TAG de forma más significativa que la disminución de la longitud de la cadena. Por ejemplo, la triestearina (18: 0) muestra un punto de fusión de los β -cristales a 73,0°C, mientras que la disminución de la longitud de la cadena al ácido graso de 14 átomos (trimiristina (14: 0) disminuye la temperatura de fusión a 58°C. Por otro lado, la trioleína (18: 1 ω 9c) tiene un punto de fusión a 1,5°C, pero trilinolenin (18: 3 ω 9c, 12c, 15c) tiene un punto de fusión a -24,8°C (Tolstorebrov y cols, 2014).

Rojas (2013) en estudios sobre análisis termal en concentrado de AGPI de aceite de belly de salmón, arrojaron resultados sobre los rangos donde posiblemente se encontrarían los ácidos grasos EPA y DHA. Se observó que para el EPA (C20:5 n-3) el *peak* de fusión de distintas formulaciones va desde -68°C a -50°C, mientras que para el DHA (C22:6 n-3) el intervalo de temperatura del *peak* va desde -50°C a -40°C. Estos resultados dan a conocer intervalos de aparición para estos AGPICL n-3 (EPA+DHA) concordantes con los valores obtenidos en esta investigación, destacando que en este caso se analizan como TAG y no como ácidos grasos libres por separado. De esta forma, las formulaciones presentaron un intervalo de aparición para el PPFB desde -71,86°C a -70,1°C, similar al PPFB obtenido por los TAGs purificados cercano a los -70°C.

Las variables respuesta ΔH *Peak* EPA+DHA y %CGS *Peak* EPA+DHA, mostradas en detalle en la tabla 5.9, proporcionan resultados en concordancia con lo esperado. La entalpía de fusión de este *peak* en las formulaciones se encuentra en un intervalo de 0,36 a 2,43 (J/g), menor que para la entalpía de fusión de los TAGs purificados, ya que está directamente relacionado con el área bajo la curva del *peak* estudiado. Por otro lado, el %CGS a la temperatura del *peak* de PPFB en cada formulación, se observa elevado, mayor al de los TAGs purificados, debido a que la cantidad de AGPICL en las formulaciones de mantequilla es relativamente bajo (mínimo 200 mg en 7 g), por lo cual su influencia en el grado de fusión de la mantequilla no es lo bastante determinante.

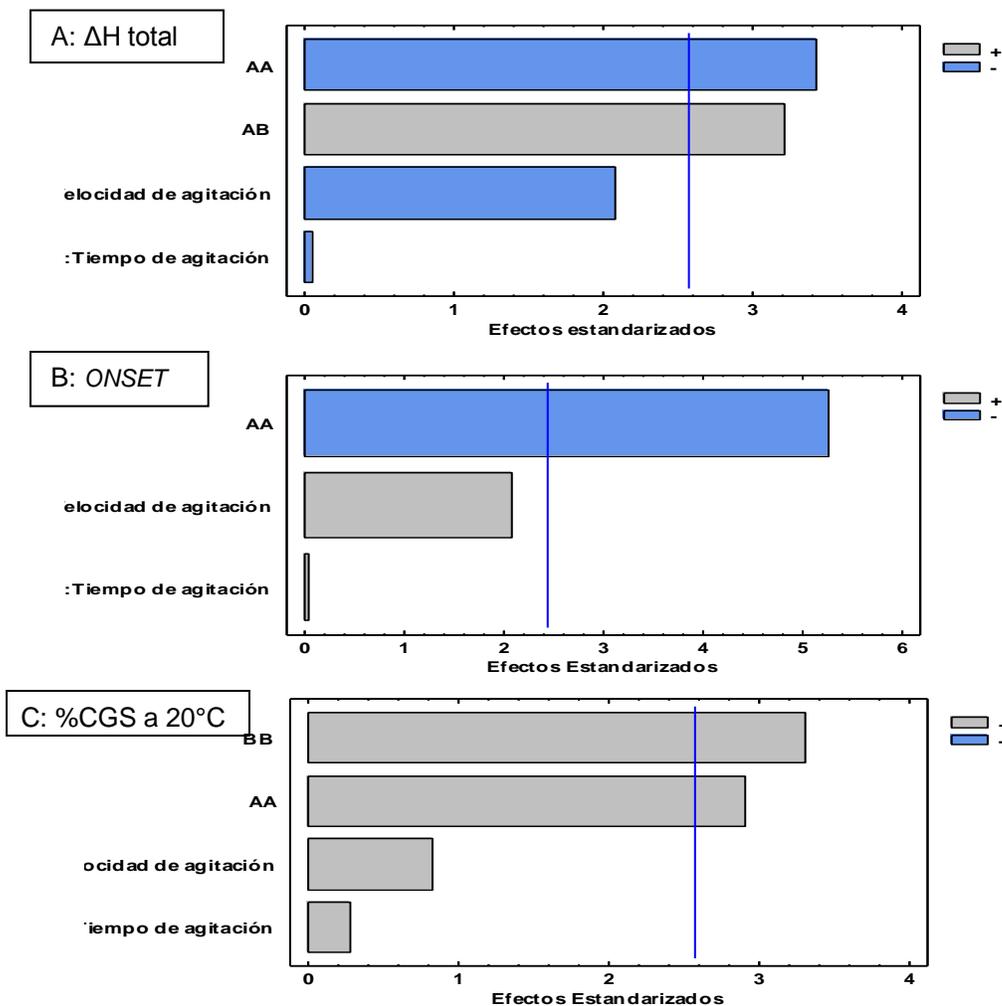
Tabla 5.9: Comportamiento de fusión de las diferentes formulaciones de mantequillas con contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga, mantequilla control, mantequilla comercial (Colún) y TAGs purificados.

Formulación	Variables de proceso			Variables respuesta		
	Velocidad	Tiempo	ΔH total	%CGS a 20°C	ΔH <i>Peak</i> EPA+DHA	%CGS <i>Peak</i> EPA+DHA
Unidades	(r.p.m)	(minutos)	(J/g)	(%)	(J/g)	(%)
1	3879	0,7	356,59	13,94	1,25	93,14
2	8121	0,7	124,63	13,32	0,74	95,24
3	3879	4,3	241,53	12,19	2,43	92,64
4	8121	4,3	282,43	16,53	1,08	94,57
5	3000	2,5	169,69	15,21	1,26	94,75
6	9000	2,5	128,25	15,32	0,36	94,43
7	6000	0	281,96	15,94	1,11	94,35
8	6000	5	247,74	15,85	1,01	94,54
9	6000	2,5	271,20	9,35	0,47	93,71
10	6000	2,5	329,04	10,56	0,63	94,73
M. comercial			353,38	15,96	-	-
M. control			246,03	11,54	-	-
TAG purificados			237,29	8,08	7,22	88,41

Los valores de ΔH total y %CGS a 20°C se analizarán a continuación, según la MSR obtenida por el diseño realizado.

5.5.2 Efectos de las variables del proceso de homogeneización sobre las propiedades térmicas de las mantequillas con alto contenido de EPA y DHA.

En la figura 5.8 se observa las distintas cartas de Pareto para las diferentes respuestas, en donde se puede estudiar los efectos que presentan las variables de proceso de homogeneización, tiempo, velocidad de agitación y sus interacciones, sobre las propiedades térmicas de las mantequillas con “ALTO” contenido de n-3 EPA y DHA. La entalpía de fusión total (ΔH total) (Fig. 5.8A) de cada formulación fue dependiente de la interacción de: velocidad de agitación – tiempo de agitación (AB) y la interacción cuadrática de la velocidad de agitación (AA). Para el caso del *ONSET* (Fig. 5.8B) fue dependiente solo de la interacción cuadrática de la velocidad de agitación (AA), y en el caso del %CGS a 20°C (Fig. 5.8C) fue dependiente de las interacciones cuadráticas tanto del tiempo de agitación (BB) como de la velocidad de agitación (AA), ($p \leq 0,05$).



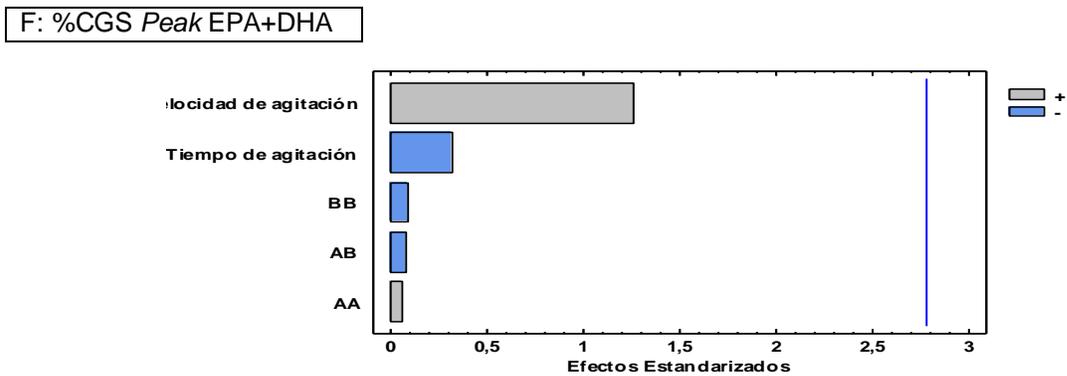
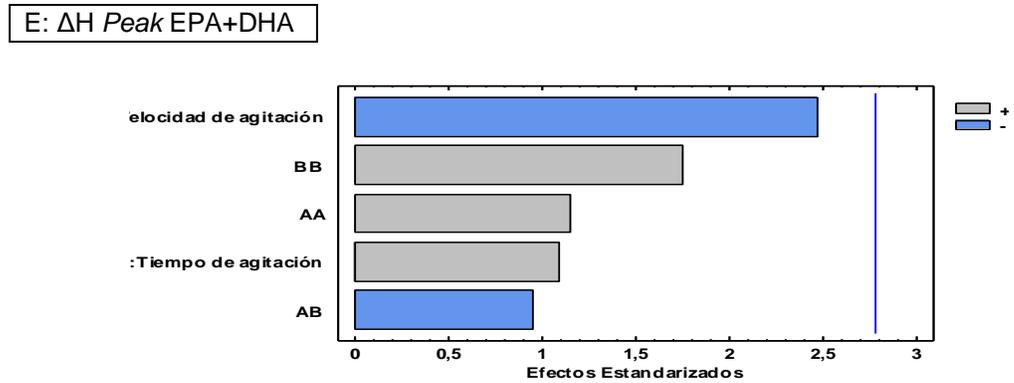
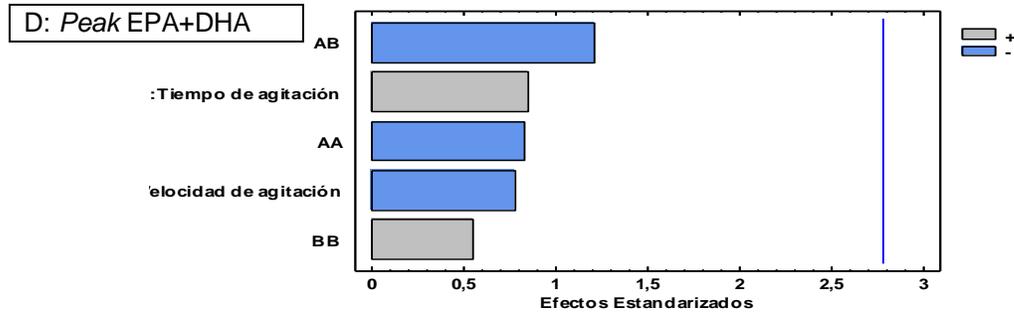


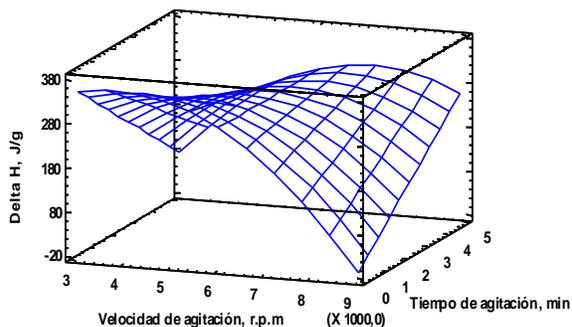
Figura 5.8: Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades térmicas de las formulaciones de mantequillas con alto contenido de EPA y DHA. A: ΔH total; B: *ONSET*; C: %CGS a 20°C; D: *Peak* EPA+DHA; E: ΔH *Peak* EPA+DHA; F: %CGS *peak* EPA+DHA.

Por otro lado, las variables del proceso de homogeneización, tiempo de agitación, velocidad de agitación y las interacciones entre éstas, no afectaron la variable respuesta *Peak* EPA+DHA (Fig. 5.8D), ΔH en el *Peak* EPA+DHA (Fig. 5.8E) y %CGS en el *peak* EPA+DHA (Fig. 5.8F) de las diferentes formulaciones realizadas ($p \geq 0,05$) (ANOVA en anexo 5).

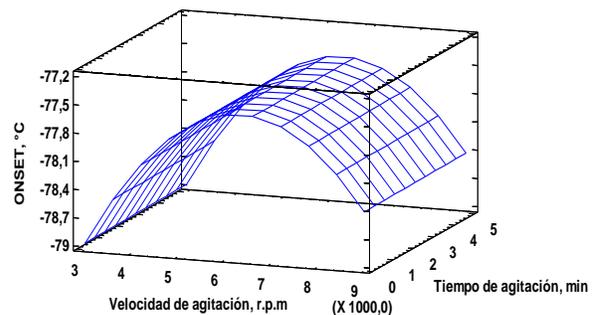
5.5.3 Superficies de respuestas del efecto del proceso de homogeneización sobre los valores de las propiedades térmicas de las mantequillas con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga.

En las figuras 5.9 A-C se observan las superficies de respuestas de los valores de las propiedades térmicas de las mantequillas con ALTO contenido de n-3 EPA y DHA, corroborando el efecto significativo de la interacción cuadrática de la velocidad de agitación y tiempo de agitación del proceso de homogeneización sobre ΔH total, *ONSET* y CGS a 20°C.

A: Superficie de respuesta para ΔH total



B: Superficie de respuesta para *ONSET*



C: Superficie de respuesta para %CGS a 20°C

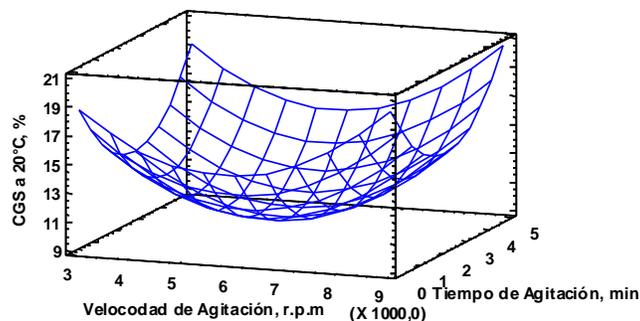


Figura 5.9: Efecto de las variables de proceso sobre las propiedades térmicas de fusión ΔH total, *ONSET* y %CGS 20°C, de las formulaciones de mantequillas con alto contenido de EPA y DHA. A: Superficie de respuesta para ΔH total; B: Superficie de respuesta para *ONSET*; C: Superficie de respuesta para %CGS a 20°C.

A modo de complemento, en la figura 5.9 se exponen las superficies de respuesta correspondientes a las variables dependientes afectadas significativamente por el proceso ($p \leq 0,05$). En la superficie de respuesta para ΔH total (Fig. 5.9A), la gráfica muestra un aumento a medida que el tiempo avanza, mientras que presenta un punto máximo de velocidad entre los 4000 y 5000 r.p.m, después de los cuales el ΔH total comienza a disminuir. Al comparar valores con la mantequilla comercial, la cual presentó 353,38 (J/g), la formulación D1 sería la más similar con un valor de 356,59 (J/g) (Anexo 6). La figura 5.9B, muestra que el tiempo de agitación no afecta el *ONSET* de fusión, pero la velocidad de agitación lo hace en forma de parábola invertida, presentado a los 5500-6500 r.p.m el máximo (Anexo 6). Finalmente, la figura 5.9C da a conocer que para %CGS a 20°C los valores óptimos se obtienen para tiempo y velocidad máximos, debido a que la superficie de respuesta presenta forma parabólica en ambos casos (Anexo 6) (ANOVA en anexo 5).

De este análisis se podría determinar que las variables de respuesta para las propiedades térmicas son dependientes de las interacciones cuadráticas entre las variables que intervienen en el proceso, tiempo y velocidad de agitación, y no de ellas como variables lineales.

Tabla 5.10: Respuesta optimizada para %CGS a 20°C

Respuesta Optimizada			
Objetivo	mantener CGS a 15,96		
Valor óptimo	15,96		
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Velocidad	3000,45	8999,55	8199,13
Tiempo	-0,0455844	5,04558	4,40993

La combinación de niveles de factores del proceso de homogeneización que presentó un óptimo de CGS de 15,96% a 20°C, similar al CSG de la mantequilla comercial en la optimización de respuesta múltiple fue de una velocidad de 8199 r.p.m y un tiempo de 4,4 min. La formulación de mantequilla D4 (8121 r.p.m; 4,3

min), presentó un comportamiento similar a la mantequilla comercial con un valor ajustado de CGS de 16,53% a 20°C. Ver figura 5.9C y tabla 5.10.

La tabla 5.11, resume los coeficientes de regresión significativos de los modelos que predicen el efecto del proceso de homogeneización sobre el comportamiento de las propiedades térmicas de la mantequilla con contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga (ANOVA en anexo 5).

Tabla 5.11: Coeficientes de regresión del modelo polinómico de segundo orden predictivo para las variables de respuestas significativas.

Variables ⁽¹⁾	Coeficiente	P-value	Coeficiente	P-value	Coeficiente	P-value
	ΔH total		ONSET		%CGS a 20°C	
Constante	161,369		-82,8369		31,5667	
Lineal						
A	0,104281 ^c	0,0925	0,00168229 ^c	0,0834	-0,00579496 ^c	0,4472
B	109,547 ^c	0,9643	0,00184921 ^c	0,9736	-4,02376 ^c	0,7881
Interacción						
AxA	-0,0000137059 ^b	0,0186	-1,32E-07 ^a	0,0019	5,02E-07 ^b	0,0336
BxB	-	-	-	-	0,823599 ^b	0,0212
AxB	0,0181912 ^b	0,0238	-	-	-	-
^e R ² (%)	84,0718	-	84,1824	-	74,2693	-
^f R ² (%) (Ajustado)	71,3292	-	76,2736	-	53,6847	-
^g SE	42,5192	-	0,268353	-	1,66193	-
^h MAE	25,6808	-	0,176925	-	0,973294	-
ⁱ DW	1,7796	-	1,00204	-	1,42556	-
Lag 1 autocorrelación residual	0,0010119	-	0,270975	-	0,27257	-

⁽¹⁾A: Velocidad de agitación (rpm); B: Tiempo de agitación (min).

^a Significativo en $p \leq 0.01$; ^b Significativo en $p \leq 0.05$; ^c No significativo en $p > 0.05$ (si el efecto cuadrático o la interacción de cualquier variable independiente es significativo, el termino correspondiente para un efecto lineal es incluido en la ecuación, aunque éste no sea significativo).

^e R², indica que el modelo utilizado explica la variabilidad.

^f R² ajustado, explica la variabilidad para el diseño experimental.

^g Error estandar (SE) of estimate, muestra la desviación estándar de los residuos.

^h Error medio absoluto (MAE), es el valor promedio de los residuos.

ⁱ Durbin-Watson (DW), pone a prueba los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa basada en el orden en el que aparecen en el archivo de datos.

5.6 Estudio de la influencia de las variables del proceso de homogeneización, en una matriz de mantequilla de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga.

En la figura 5.10, se observa una gráfica de los perfiles de CGS en función de la temperatura de fusión en formulaciones de mantequilla con ALTO contenido de EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga (Anexo 7).

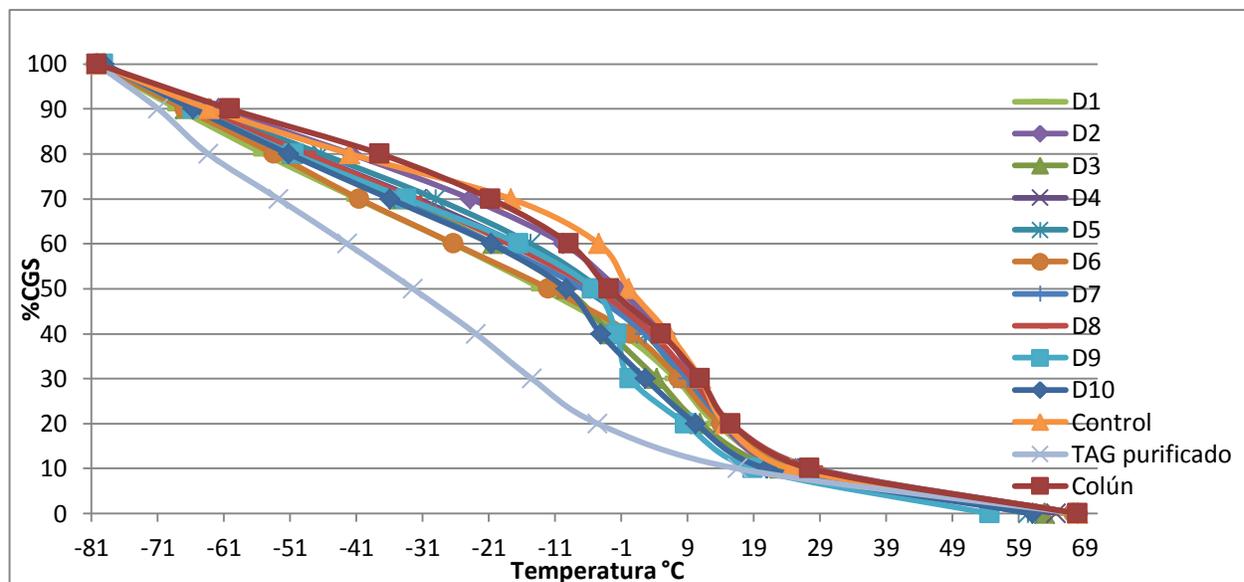


Figura 5.10: Contenido de grasa sólida (CGS) en función de la temperatura de las mantequillas con alto contenido de EPA y DHA por DSC. Formulación 1-10; Control (M. control); Colón (M. Comercial) y TAGs purificado.

Todas las formulaciones con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga del diseño, presentaron curvas similares en cuanto a la disminución del CGS a medida que aumenta la temperatura de fusión, comportándose de manera análoga a la curva correspondiente a la mantequilla comercial (Colón). Las formulaciones en general (Fig.5.10) presentan un %CGS mayor al comienzo de sus curvas, con una fusión rápida, siendo sus gráficas un tanto más lineales en comparación a la mantequilla comercial y control; esto se explica como resultado de la incorporación de AGPI a sus estructuras. El comportamiento de las formulaciones del diseño a diferencia de la mantequilla Colun, es debido a que en

su composición contienen TAG estructurados EPA y DHA y puede ser explicado por la curva de TAGs purificado. De esta manera, en la figura 5.10 el comportamiento de fusión de TAG purificado se observa una disminución en el %CGS casi lineal con respecto a la temperatura, hasta la temperatura de -1°C aprox.; posteriormente, se enlentece la fusión de la muestra y se asimila al resto de las curvas, en particular a la mantequilla comercial.

Para un mejor análisis, la figura 5.11 muestra una comparación de las curvas de %CGS versus temperatura de fusión de la mantequilla control, mantequilla comercial (Colún), TAGs purificados y la formulación D4 (8121 r.p.m; 4,3 min), ya que esta es la que presenta un comportamiento más cercano a la mantequilla comercial.

Si bien se observa que la composición de ácidos grasos de cada muestra, influye en el comportamiento de fusión; debido a que los ácidos grasos saturados que constituyen mayoritariamente la grasa láctea (mantequillas) poseen puntos de fusión altos, estos generalmente son sólidos a temperatura ambiente, al contrario de lo que sucede con los AGPI, los cuales poseen puntos de fusión bajos, por lo que suelen encontrarse líquidos a temperatura ambiente (Tetra Pack, 1996), es en definitiva la composición triacilglicérida en función de la temperatura, es decir, como se distribuyen los ácidos grasos en el triacilglicérido y la temperatura, los factores predominantes que afectan el comportamiento de fusión del producto.

Según esta información, los TAGs purificados se funden mucho más rápido a temperaturas bajas, como resultado de su composición mayoritaria en AGPICL; mientras que la mantequilla comercial y control, funden de forma más lenta al comienzo de la curva, mostrando mayor contenido de grasa sólida a bajas temperaturas. La formulación D4 muestra un comportamiento similar a la curva de fusión de la mantequilla comercial, sobre todo a temperaturas superiores a los 0°C , en donde el %CGS es bastante cercano.

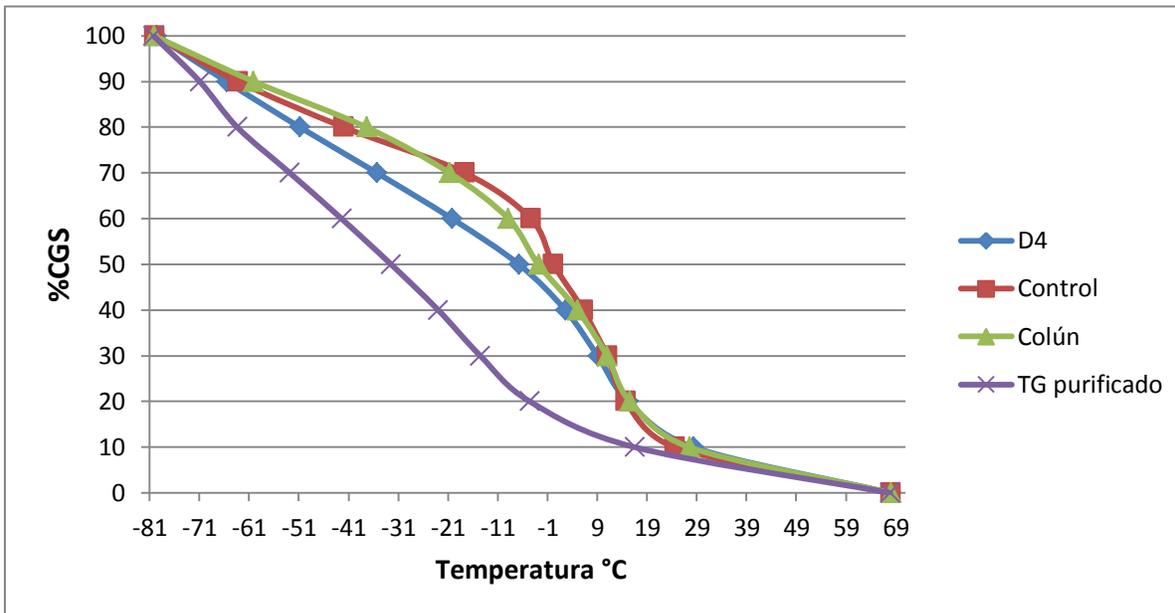


Figura 5.11: CGS en función de la temperatura de las mantequillas con alto contenido de EPA y DHA por DSC. Formulación 4 (D4 (8121 r.p.m; 4,3 min)); Control (M. control); Colón (M. Comercial) y TAGs purificado.

El contenido de grasa sólida de las matrices de mantequillas a temperaturas que bordean los -80°C es de 100%. CGS a 10°C es una medida de la dureza de la mantequilla, tanto la mantequilla con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga del diseño como la mantequilla comercial presentaron un CGS de 30% aprox., respectivamente. Para el caso de temperatura de refrigeración 4°C aprox., la mantequilla comercial presenta CGS cercano al 40%, al igual que la formulación D4, mientras que para el resto de las formulaciones existen pequeñas variaciones, encontrándose entre un 40% a un 30% de CGS. Por tanto, la adición de TAGs purificados con “ALTO” contenido de EPA y DHA no afectaría el comportamiento en el almacenamiento refrigerado comparado con una mantequilla comercial.

Entre las temperaturas $20-25^{\circ}\text{C}$ se requiere que el %CGS sea suficiente para mantener la mantequilla en estado sólido a temperatura ambiente, tanto la mantequilla con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga del diseño como la mantequilla comercial presentaron un CGS entre 20-10%. A 25°C

todas las muestras poseen un %CGS similar, siendo éste de un 10% aproximadamente y a temperatura de la boca 37°C presentaron 7% aprox. de CGS. De esta manera el comportamiento de contenido de grasa sólida en función de la temperatura similar a la mantequilla comercial lo manifiesta la mantequilla con ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga D4 cuyas variables de proceso de homogeneización fueron 4,3 min para tiempo y 8121 r.p.m para velocidad de agitación, respectivamente.

5.7 Caracterización de las formulaciones de mantequillas de contenido ALTO en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga por cromatografía de gas-líquido y microscopía de luz polarizada.

5.7.1 Caracterización de mantequillas por cromatografía de gas-líquido

En la tabla 5.13 se da a conocer la composición obtenida en ácidos grasos, a través del análisis de los datos entregados por cromatografía de gas-líquido, de la mantequilla comercial, control y de algunas formulaciones como la 7 y 4; como prueba de la adición de TAGs purificados con AGPI inexistentes en la mantequilla, a las estructuras de los diseños elaborados. Se observa claramente que la composición de todas las muestras es idéntica en cuanto a los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y algunos poliinsaturados como el ácido linolénico, dejando en evidencia los tres AGPICL adicionados a las formulaciones 7 y 4 en este caso, siendo estos el EPA, DPA y DHA, los cuales no se encuentran en la composición de las mantequillas control y comercial (Tetra Pack, 1996; AOCS, 2009; Masson, 1985).

Tabla 5.14: Composición de ácidos grasos y diferentes grupos de ácidos grasos en mantequilla comercial (Colún), mantequilla control, concentrado AGPICL n-3, TAGs purificados, formulaciones 7 y 4 de mantequilla con alto contenido de EPA y DHA (6000 r.p.m; 0 min) y (8121 r.p.m; 4,3 min) respectivamente, expresado como g/ 100 g de ácidos grasos totales.

N° ácido graso	Ácidos grasos o grupo de ácidos grasos	Mantequilla comercial	Mantequilla control	Diseño 7	Diseño 4
1	Ac. Butírico C 4:0	4,36	4,11	2,98	3,64
2	Ac. Caproico C 6:0	1,69	2,60	1,61	2,34
3	Ac. Caprílico C 8:0	1,02	1,24	1,03	0,93
4	Ac. Cáprico C 10:0	2,67	3,05	2,46	2,26
5	Ac. Undecílico C 11:0	0,14	0,32	0,26	0,25
6	Ac. Láurico C 12:0	3,32	3,47	2,80	2,67
7	Ac. Mirístico C 14:0	12,19	12,14	10,41	10,13
8	Ac. Miristoleico C 14:1	0,96	1,15	0,85	0,84
9	Ac. Pentadecanoico C 15:0	1,22	1,35	1,05	1,05
10	Ac. Palmítico C 16:0	30,60	29,71	26,82	26,41
11	Ac. Palmitelaidico C16:1 9t	-	-	-	-
12	Ac. Palmitoleico C 16:1 9c	0,56	1,38	1,93	2,08
13	Ac. Heptadecanoico C 17:0	0,52	0,77	0,46	0,69
14	Ac. Heptadecaenoico C17:1 10c	-	-	-	-
15	Ac. Esteárico C 18:0	12,61	11,92	10,19	10,15
16	Ac. Oleico C 18:1 9c n-9	22,81	21,48	23,27	23,16
17	Ac. Vaccenico C 18:1 11c	1,28	1,01	1,66	1,55
18	Ac. Linoeláidico C 18:2 9t 12t	-	-	-	-
19	Ac. Linoleico C 18:2 9c 12c n-3	1,50	1,65	4,89	4,82
20	Ac. γ - Linolenico C 18:3 6c 9c 12c n-6	-	-	-	-
21	Ac. Eicosanoico C 20:0	0,19	0,18	0,27	0,20
22	Ac. α-Linolénico C 18:3 9c 12c 15c n-3	0,99	0,86	1,52	1,38
23	Ac. Eicosaenoico C 20:1 5c	-	-	-	-
24	Ac. Eicosaenoico C 20:1 8c	-	0,18	0,52	0,18
25	Ac. Eicosaenoico C 20:1 11c	1,36	1,45	1,00	1,18
26	Ac. Estearidónico C 18:4 6c 9c 12c 15c n-3	-	-	-	-
27	Ac. Eicosadienoico C 20:2 11c 14c n-6	-	-	-	-
28	Ac. Dihomo γ-linolénico C 20:3 8c 11c 14c n-6	-	-	-	-
29	Ac. Docosanoico C 22:0	-	-	-	-
30	Ac. Eicosatrienoico C 20:3 11c 14c 17c n-3	-	-	-	-
31	Ac. Araquidónico C 20:4 5c 8c11c 14c n-6	-	-	-	-

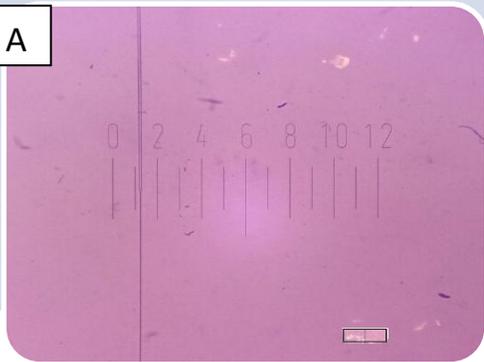
32	Ac. Docosenoico	C 22:1 13c	-	-	-	-
33	Ac. Eicosapentaenoico	C 20:5 5c 8c 11c 14c 7c n-3	-	-	1,52	1,55
34	Ac. Docosatetraenoico	C 22:4 7c 10c 13c 16c n-6	-	-	-	-
35	Ac. Docosapentaenoico	C 22:5 7c 10c 13c 16c 19c n-3	-	-	0,64	0,66
36	Ac. Docosahexaenoico	C 22:6 4c 7c 10c 13c 16c 19c n-3	-	-	1,87	1,89
EPA+DHA			-	-	3,38	3,44
∑TOTAL n-3			-	-	10,43	10,30
∑AGPI			-	-	10,43	10,30

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

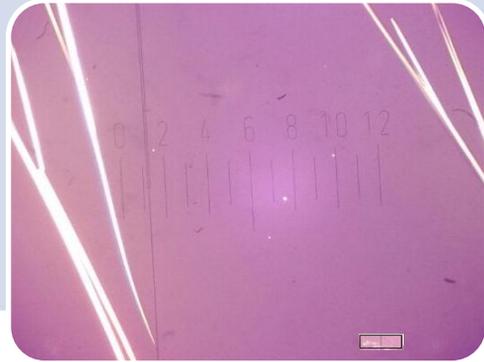
5.7.2 Efecto de las variables del proceso de homogeneización sobre la morfología de los cristales de grasas de mantequillas por microscopía óptica con luz polarizada.

En la figura 5.12 es posible observar imágenes de diferentes microestructuras mediante microscopía óptica con luz polarizada tanto de los TAGs purificados como de las mantequillas con ALTO contenido en EPA+DHA, OMEGA 3 de cadena larga, en donde se aprecian que estas presentan una estructura interna característica de emulsión de agua en aceite (ω/o). Se observa tanto los cristales de materia grasa de color blanco, burbujas de agua con aureola negra y las burbujas de aire en su composición en una fase dispersa o discontinua mientras que, en la fase continua o medio de dispersión se observa una fase de color negra correspondiente a la materia grasa en estado líquida.

A

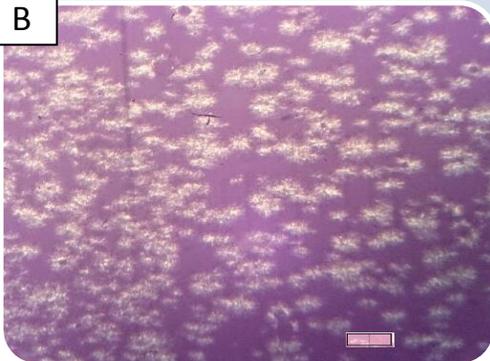


TAGs purificados

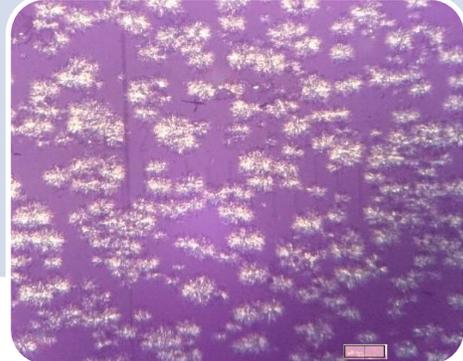


TAGs purificados
72h a 4°C

B



M. control



M. control
72h a 4°C

C



D4



D4.
72h a 4°C

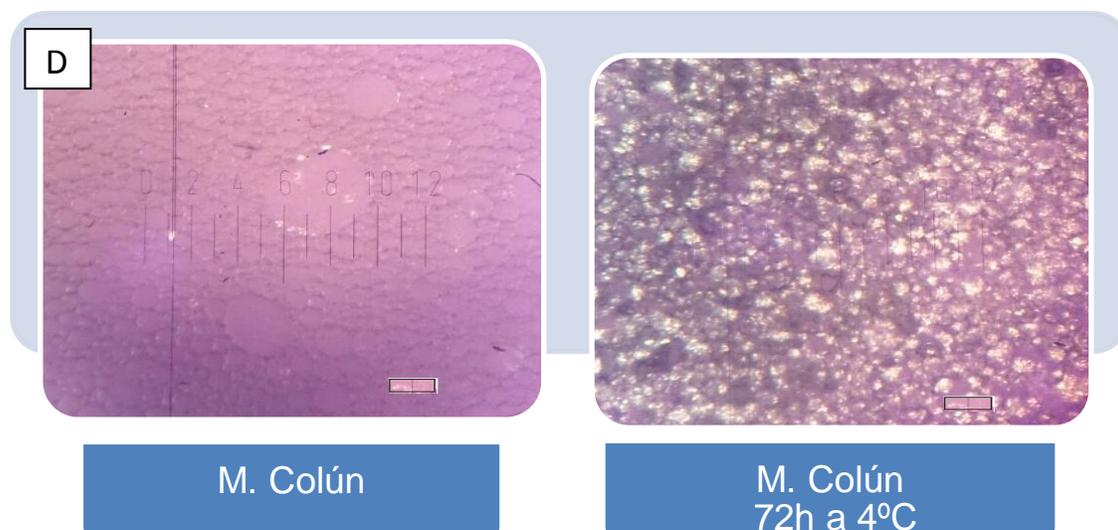


Figura 5.12: Microfotografías comparativas de microscopía óptica con luz polarizada de mantequillas. A: TAGs purificados; B: Mantequilla Control (M. control); C; Formulación 4 (D4 (8121 r.p.m; 4,3 min)); D: Mantequilla Comercial (M. Colón). La barra representa 70 micrones.

Las posibles diferencias evidentes entre las mantequillas control (Fig. 5.12B) y comercial Colón (Fig. 5.12D), versus las formulaciones elaboradores, en este caso las mantequillas D4 (Fig. 5.12A), se deben principalmente a la incorporación en su estructura de TAGs purificados con “alto” contenido de EPA y DHA. Según Rousseau y cols (1996), la composición de los TAG influye en el punto de fusión de las materias grasas y por consiguiente en su estructura (Rodríguez y cols, 2001). Igualmente, la densidad de la red cristalina, el tamaño y la morfología de los cristales de mantequillas y cremas, son influenciados por la composición de los ácidos grasos y esencialmente la composición triglicérida de TAG, además de las variables relacionadas con el proceso de cristalización (Rodríguez, 2002).

El carácter sólido de la mantequilla es el resultado de una mayor proporción de grasa sólida a una determinada temperatura y del tipo de cristales presentes en la red de cristales de grasas (Fig. 5.12B y 5.12D) (Rodríguez, 2002). Se observa que al adicionar una cierta cantidad (243 mg de EPA+DHA aprox.) de AGPICL n-3 en forma de TAG, el tamaño y distribución de los cristales varía (Fig. 5.12C). Cabe destacar, que en la leche de vaca los glóbulos de grasas se visualizan

predominantemente esféricos midiendo entre 0,1 a 10 μm de diámetro (Rodríguez, 2002). El análisis de los glóbulos de grasa de las formulaciones de mantequillas, los cuales provienen de la leche de vaca, arrojó un rango 3,5 a 10,2 μm de diámetro aprox. (Anexo 8).

Al analizar las imágenes se aprecia que los cristales de las figuras 5.15B y 5.12D son mucho más homogéneos en cuanto a distribución y a tamaño, mientras que los cristales de las figuras 5.12C, son dispersos y de tamaños diversos, además presentan agrupaciones de glóbulos grasos aparentemente lineales. Esto se asemeja un tanto al comportamiento de la microestructura observada en los TAGs purificados después de 72 h a 4°C (Fig. 5.12A), el cual es un aceite compuesto por TAG con AGPICL n-3, (Figura 5.12, Anexo 8). Estos resultados coinciden con los de Rousseau y cols. (1996), quienes encontraron que la mezcla de grasa de mantequilla con el aceite de canola [80:20 (w/w) mezcla de la grasa de mantequilla/aceite de canola] modificó posteriormente la morfología de los cristales de grasa de mantequilla (Rodríguez y cols, 2001).

VI. Conclusiones

- La caracterización de los aceites crudo y refinado de salmón comercial, obtuvieron valores experimentales dentro de los límites recomendados según referencias, por ende, no presentaron deterioro perjudicial siendo aptos para consumo humano. La mantequilla control fue similar a la mantequilla comercial en cuanto a sus parámetros de calidad, presentando ambas valores de acidez libre e índice de peróxido, dentro de los límites, presentando ambas un deterioro dentro de los parámetros aceptables y siendo aptas para consumo.
- Se obtuvo un concentrado de AGPICL a partir de aceite crudo de salmón, con un contenido de 72,24 (g/100g AGT) de n-3 EPA+DHA. Este arrojó una disminución significativa en su contenido de ácidos grasos saturados e incrementó el contenido en AGPI, en especial los ácidos EPA (C20:5) y DHA (C22:6), con un 59,74%.
- Se logró la obtención de TAGs purificados con un contenido de 15,53 (g/100 g AGT) de AGPICL n-3 EPA y DHA.
- Se logró la incorporación de TAGs purificados con un alto contenido de EPA y DHA en las 10 formulaciones de mantequillas, obteniendo en promedio 243 mg de EPA+DHA en 7 g de mantequilla cada una.
- Los termogramas de fusión de mantequilla con incorporación de TAGs purificados, indicaron que el PPFB de las formulaciones de mantequilla (-72,5 a -70,1°C) correspondería a la zona de fusión de los TAG con AGPICL n-3, principalmente EPA y DHA.
- La formulación D4 (8121 r.p.m; 4,3 min) fue el experimento óptimo de acuerdo al %CGS a 20°C de una mantequilla comercial, al obtener valores concordantes en cuanto a sus variables de homogeneización al valor óptimo arrojadas por el diseño realizado, 8199 r.p.m y 4,4 min.

- Las diferencias en la morfología de las microestructuras entre las mantequillas control y comercial Colún, versus las formulaciones elaboradores, se deben principalmente a la adición de AGPICL n-3 mediante la incorporación de TAGs purificados con alto contenido de EPA y DHA en su estructura. La composición de los TAG influye en el punto de fusión de las materias grasas y por consiguiente en la cristalización de los glóbulos de grasa y su estructura.
- Fue posible incorporar a una matriz de mantequilla TAGs, obtenidos a partir de acidólisis enzimática entre concentrado AGPICL n-3, ácido caprílico y ARCS, bajo condiciones de SCCO₂, logrando nombrar a la mantequilla con el descriptor de “ALTO en EPA+DHA, OMEGA-3 de CADENA LARGA”.

VII. Referencias

- AOCS OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY. (2009). Determination of *cis*-, *trans*-, Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Extracted Fats by Capillary GLC. Sampling and analysis of commercial fats and oils. AOCS Official Method Ce 1j-7,
- CODEX ALIMENTARIUS. (2011). Leche y Productos Lácteos. FAO y OMS. Segunda edición, Roma.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Oportunidades y desafíos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma.
- FAO. (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: Consulta de Experto. Estudio FAO alimentación y nutrición 91. Publicado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). Edición española. Granada, España.
- 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.
- GOED. (2012). Global Organization for EPA and DHA Omega-3. Voluntary Monograph
<http://www.goedomega3.com/images/stories/files/goedmonograph.pdf>.
<accessed 13022015>.
- GUNSTONE, F.D. (1999). Fatty acid structure. In F.D. Gunstone, J.L. Harwood and F.B. PDHGLAey, eds. *The Lipid Handbook*, pp. 1-19. Second Edition, Chapman and Hall, London, UK.
- GUTIÉRREZ M.C. (2002). La Cromatografía Líquida: Aplicación de la TLC a la separación de colorantes. Boletín INTEXTER (U.P.C.), 122: 29-34.
- HITA E., ROBLES A., CAMACHO B., RAMÍREZ A., ESTEBAN L., JIMÉNEZ M., MUÑO M., GONZÁLEZ P., MOLINA E. (2007). Production of structured

- triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. *Process Biochemistry*, 42: 415–422.
- IFOS. (2014). The international fish oil standards program. <http://www.nutrasource.ca/ifos/post/fish-oil-shelf-life--how-fresh-is-your-fish-oil>. <accessed 13022015>.
 - JARZEBSK A., MALINOWSKI J. (1994). Potentials and Prospects for Application of Supercritical Fluid Technology in Bioprocessing. *Process Biochemistry*, 30 (4): 343-352.
 - LUQUE DE CASTRO M., VALCARCEL M., TENA M. (1993). Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. España, Reverté Cap 1: 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., MELLA M. (1985). Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile: Composición en ácidos grasos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile: 11-29.
 - MENDIOLA J. Extracción de compuestos bioactivos de microalga mediante fluidos supercríticos. Tesis (Doctor en Ciencias y Tecnología de los Alimentos) Madrid, España. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química-física aplicada, (2008).
 - NIETO S., SANHUEZA J. Y VALENZUELA A. (1999). Synthesis of structured triacylglycerols containing medium- chain and long-chain fatty acids by interesterification with a stereoespecific lipase from *Mucor miehei*. *Revista Grasas y Aceites* 50 (3): 199-202.
 - ODEPA. (2014).Mantequilla: situación internacional y evolución de la producción y consumo en Chile. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile.
 - ODEPA. (2013). Sector Pesquero y Acuícola. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile, 7.
 - OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS`SOCIETY (AOCS). Determination of *cis*-, *trans*-,

Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Extracted Fats by Capillary GLC. Sampling and analysis of commercial fats and oils. AOCS Official Method Ce 1j-7, (2009).

- OSBORN H. T., Y AKOH C. C. (2002). Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety* 45, 110-120.
- PANDO M., BRAVO B., 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 J. Food Sci.* 32: 169–176.
- 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.
- RATNAYAKE M., GILL C. (2009). Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper. *Ann Nutr Metab* 55: 8–43.
- RATNAYAKE W.M.N., OLSSON B., MATTHEWS D. Y ACKMAN R.G. (1988). Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oil *via* Urea Complexation. *Fat Sci. Technol.* 90: 381–386.
- REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS (Dto. 977/96), Ministerio de salud. Santiago, Chile. Edición Jurídica Manuel Montt. Título VIII De las Leches y Productos Lácteos. Párrafo VI De las mantequillas (2013).
- RIVERA C. Y GARCÍA F. (2007). Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *Biotecnología* 11(2):37-45.
- RODRÍGUEZ A. Optimización del proceso de fermentación y su efecto sobre las propiedades químicas, sensoriales, reológicas, térmicas y microestructurales de la crema y mantequilla de leche de cabra. Magister en

- Ciencias de los Alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, (2002). 29-136.
- RODRÍGUEZ A., CASTRO E., SALINAS M., LÓPEZ R., MIRANDA M. (2001). Interesterification of Tallow and Sunflower Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78 (4): 431-436.
 - 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*, 57 (3): 457-472.
 - ROJAS C. Efecto 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 a título profesional de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas (2013).
 - RONHOLT S., MORTENSEN K., KNUDSEN J. (2013). The Effective Factors on the Structure of Butter and Other Milk Fat-Based Products. *Food Science and Food Safety*, 12, 468-482.
 - ROUSSEAU D., FORESTIERE K., HILL A., MARANGONI A. (1996). Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(8) 963-971.
 - ROUSSEAU D., HILL A., MARANGONI A. (1996). Restructuring Butterfat Through Blending and Chemical Interesterification. 2. Microstructure and Polymorphism, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73. 973–981.
 - SÁYAGO-AYERDI S., VAQUERO M., SCHULTZ-MOREIRA A., BASTIDA S., SÁNCHEZ-MUNIZ F. (2008). Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. Artículo de revisión. *Nutrición Hospitalaria*. 23(3):191-202.

- SHAHIDI F.; WANASUNDARA U. (1998) Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 230-240.
- SHAHIDI, F Y FINLEY J. Omega-3 Fatty Acids Chemistry, Nutrition, and Health Effects. ACS Symposium series. (2002).
- SHEKARCHIZADEH H., KADIVAR M., GHAZIASKAR H., REZAYAT M. (2009). Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM). *J. of Supercritical Fluids*, 49: 209-215.
- SHIN S., SIM J., KISHIMURA H., CHUN B. (2012). Characteristics of menhaden oil ethanolsis by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol.18: 546–550.
- SPERANZA P., ALVES G. (2012). Review: Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. *Process Biochemistry*, 47: 1699–1706.
- TETRA PACK. (1996). Manual de Industrias Lácteas. Tetra Pack librería S.A. España. Capítulo 2: Química de la Leche, 13-36.
- TETRA PACK. (1996). Manual de Industrias Lácteas. Tetra Pack librería S.A. España. Capítulo 12: Mantequilla y productos lácteos para untar, 263-286p.
- TOLSTOREBROV I., EIKEVIK T., BANTLE M. A. (2014). 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). Fish oil: Yesterday an industrial waste, today a product of high nutritional value. *Rev Chil Nutr.*, (2), 39, 201-209.
- VALENZUELA A., SANHUEZA J. (2009). Marine oils; nutritional and food science relevance. *Rev Chil Nutr.*, (3), 36, 246-257.
- VALENZUELA A., SANHUEZA J., NIETO S. (2002). Structured Lipids in Nutrition: A Technology for the Development of Novelty Products. *Rev Chil Nutr.*,(2), 29, 106-115.

- VEISSEYRE, R. (1988). "Lactologia Técnica". Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- WANASUNDARA U.; SHAHIDI F. (1999). Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry* 65: 41-49.
- WANASUNDARA U.; SHAHIDI F. (1995). Storage stability of microencapsulated seal blubber oil. *J. Food Lipids* 2, 73-86.
- ZUTA C.; SIMPSON B.; CHAN H.; PHILLIPS L. (2003). Concentrating PUFA from Mackerel Processing Waste. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 933–936.

VIII. Anexos

Anexo 1: Información materias primas para elaboración de mantequilla.

Tabla 4: Información nutricional mantequilla comercial marca Colún Ltda., pasteurizada, con sal, 125g.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL		
Porción: 1 cucharadita (7g)		
Porciones por envase: 18 aprox.		
	100g	1 porción
Energía (Kcal)	744	52
Proteínas (g)	0,7	0,05
Grasa total (g)	82	5,7
Grasa saturada (g)	52,48	3,67
Grasa monoinsat. (g)	23,56	1,67
Grasa poliinsat. (g)	2,05	0,14
Grasa trans (g)	3,53	0,25
Colesterol (mg)	262	18
H de C disponibles (g)	0,9	0,1
Azúcares totales (g)	0,9	0,1
Lactosa (g)	0,9	0,1
Sodio (mg)	571	40

Tabla 4.1: Información nutricional crema para batir comercial marca Colún Ltda., 1Kg.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL		
Porción: 2 cucharadas (15 ml)		
Porciones por envase: 67 aprox.		
	100g	1 porción
Energía (Kcal)	317	48
Proteínas (g)	2,0	0,3
Grasa total (g)	33	5
Grasa saturada (g)	21,12	3,17
Grasa monoinsat. (g)	9,6	1,44
Grasa poliinsat. (g)	0,83	0,12
Grasa trans (g)	1,42	0,21
Colesterol (mg)	106	16
H de C disponibles (g)	3,0	0,5
Azúcares totales (g)	3,0	0,45
Lactosa (g)	3,0	0,45
Sodio (mg)	35	5

Anexo 2: Obtención de concentrado de AGPICL n-3 con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.

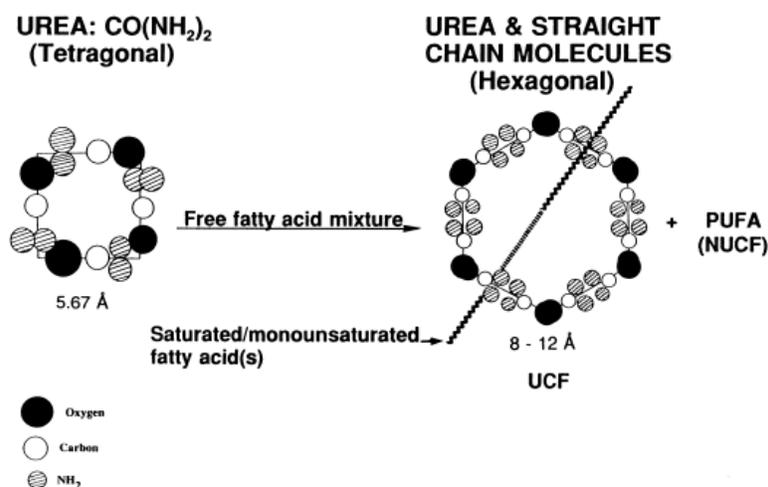


Figura 5.2: Formación de cristales de urea en ausencia y presencia de ácidos grasos de cadena larga (Shahidi; Wanasundara, 1998).

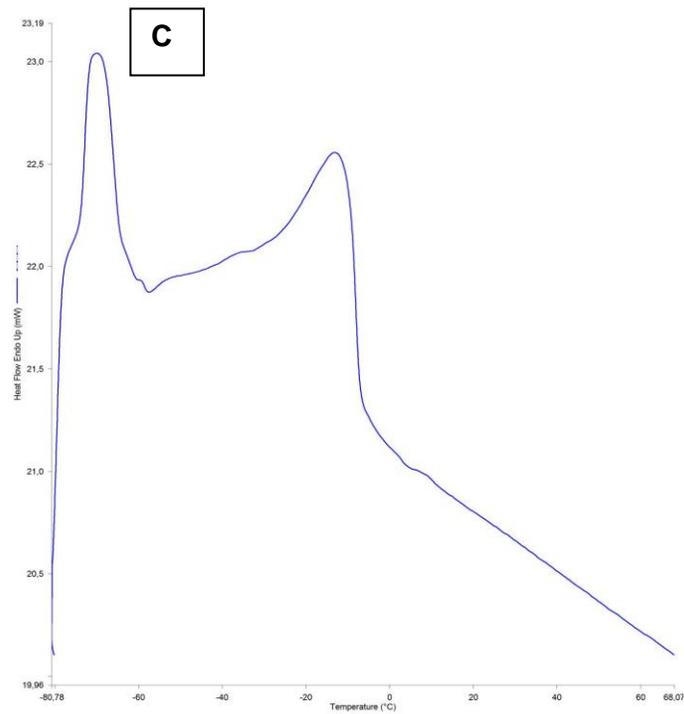
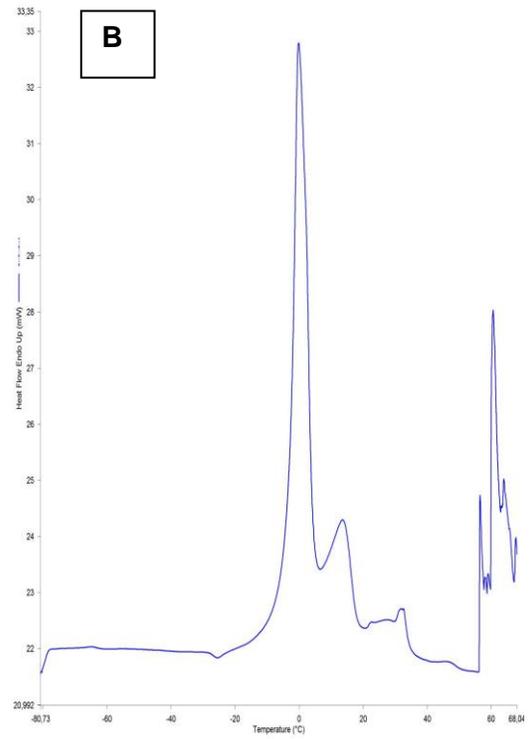
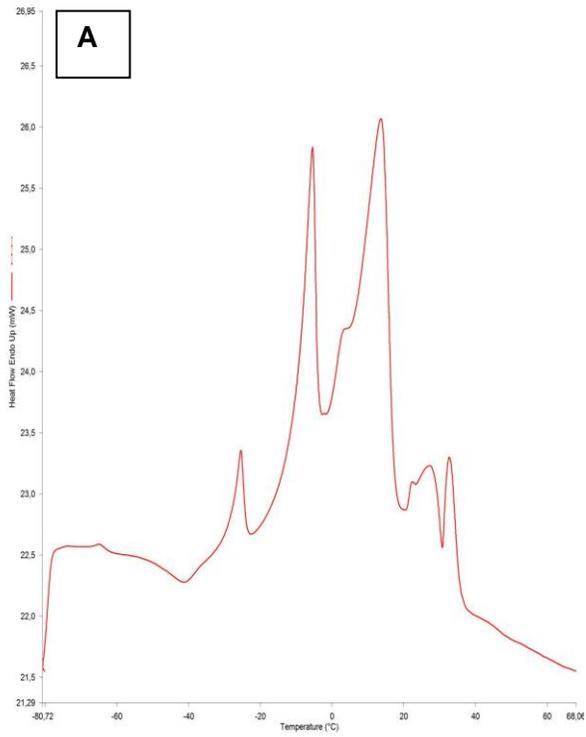
Anexo 3: Estudio del efecto del proceso de homogeneización de mantequilla con “ALTO” contenido de EPA+DHA OMEGA 3 cadena larga, mediante el método superficie de respuesta.

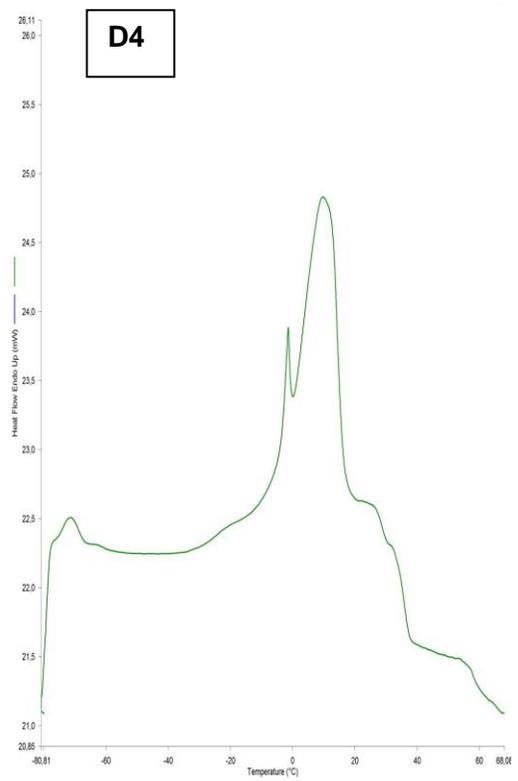
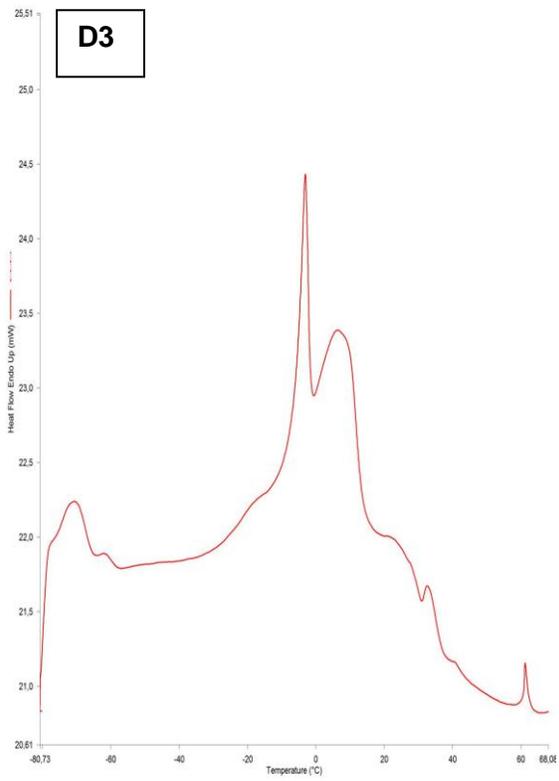
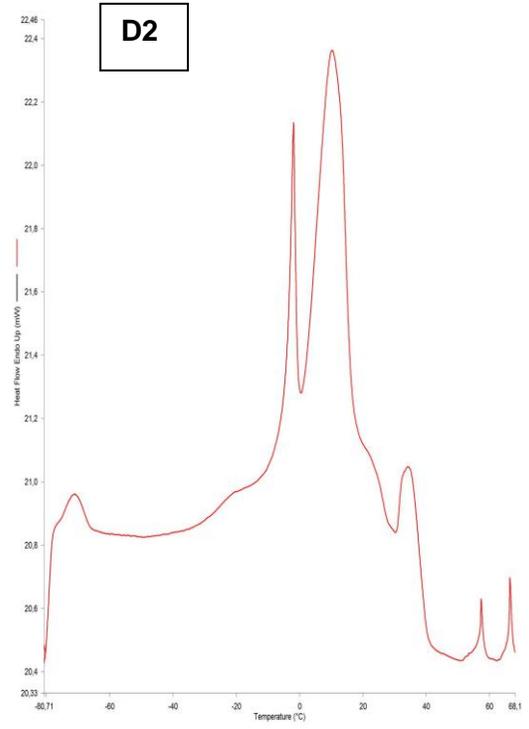
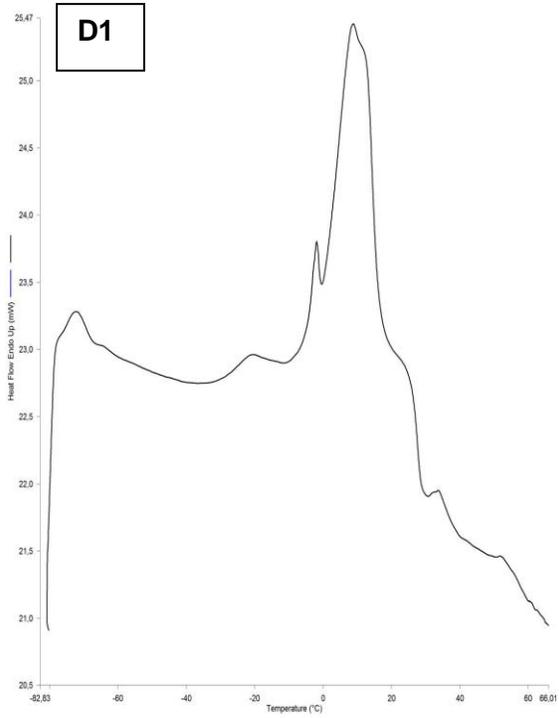
Tabla 5.7: Composición de ácidos grasos y diferentes grupos de ácidos grasos en mantequilla comercial (Colún), mantequilla control (elaborada en el laboratorio), AGPICL n-3, TAGs purificados y formulación 7 de mantequilla con alto contenido de EPA y DHA (6000 r.p.m; 0min), expresado como g/100 g de AGT.

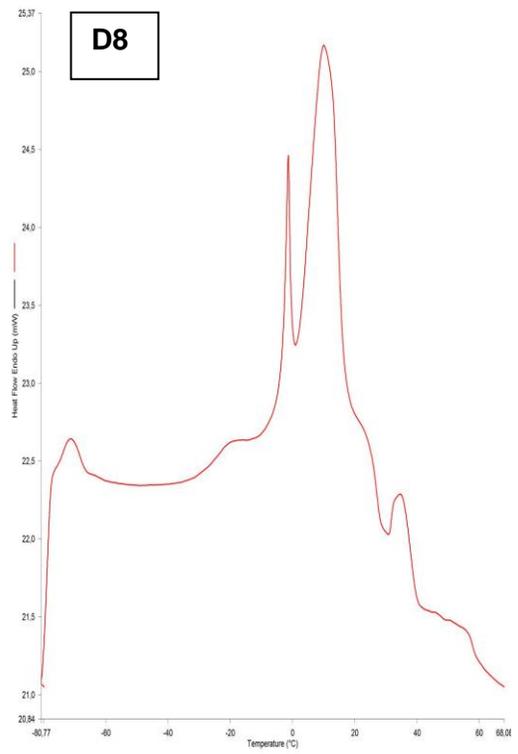
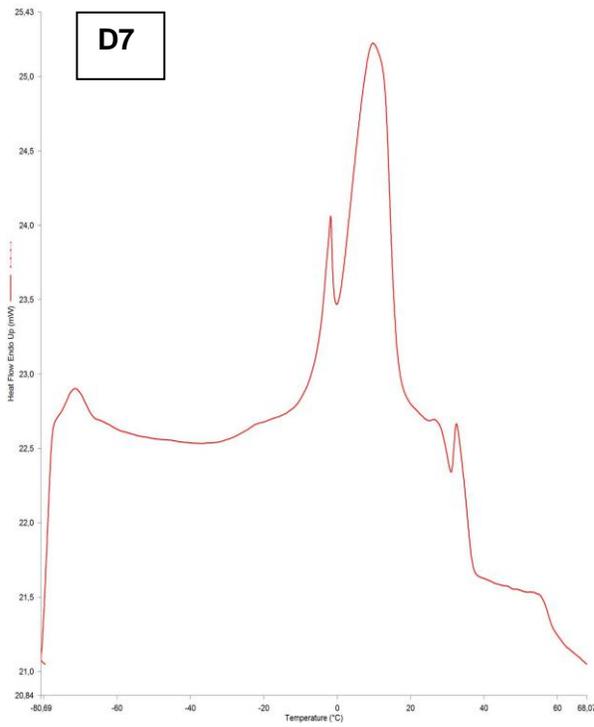
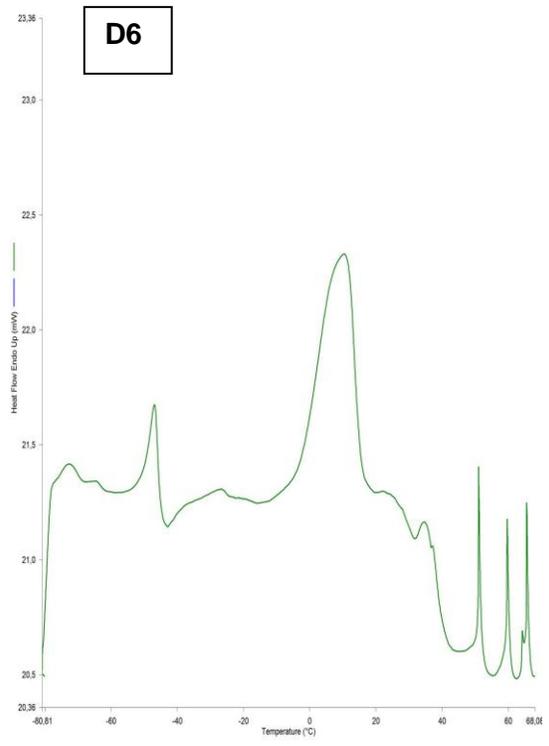
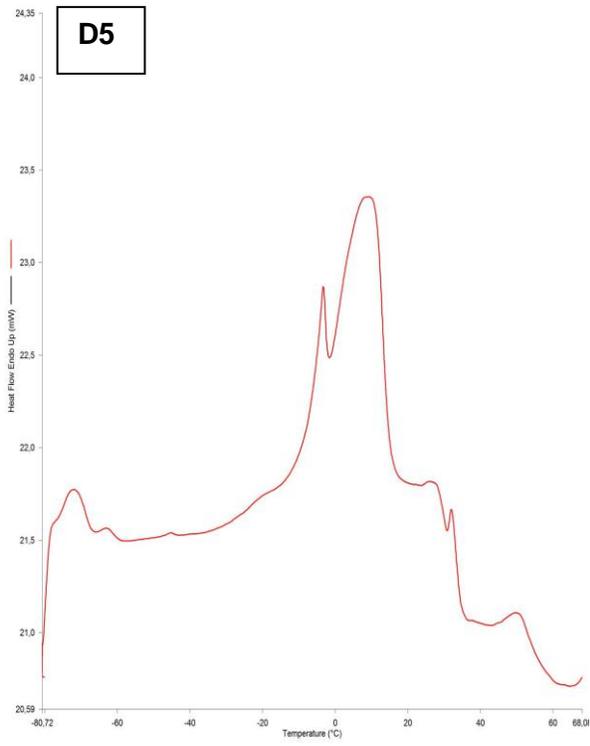
N° ácido gras o	Acido graso o grupo de ácidos grasos	Mantequilla comercial	Mantequilla control	Concentrado AGPICL n-3	TAGs purificados	Diseño 7	
1	Ac. Butírico	C 4:0	4,36	4,11	-	-	2,98
2	Ac. Caproico	C 6:0	1,69	2,60	-	-	1,61
3	Ac. Caprílico	C 8:0	1,02	1,24	-	0,08	1,03
4	Ac. Cáprico	C 10:0	2,67	3,05	-	-	2,46
5	Ac. Undecílico	C 11:0	0,14	0,32	-	-	0,26

6	Ac. Láurico	C 12:0	3,32	3,47	-	0,07	2,80
7	Ac. Mirístico	C 14:0	12,19	12,14	0,36	3,17	10,41
8	Ac. Pentadecanoico	C 14:1	0,96	1,15	-		0,85
9	Ac. Palmítico	C 15:0	1,22	1,35	-	0,23	1,05
10	Ac. Palmitelaídico	C 16:0	30,60	29,71	-	13,26	26,82
11	Ac. Palmitoleico	C 16:1 9c	0,56	1,38	0,27	4,7	1,93
12	Ac. Heptadecanoico	C 17:0	0,52	0,77	0,48	0,34	0,46
13	Ac. Heptadecaenoico	C17:1 10c	-	-	0,67	0,66	-
14	Ac. Esteárico	C 18:0	12,61	11,92	-	3,67	10,19
15	Ac. Oleico	C 18:1 9c n-9	22,81	21,48	0,36	28,73	23,27
16	Ac. Vaccenico	C 18:1 11c	1,28	1,01		3,03	1,66
17	Ac. Linoeláídico	C 18:2 9t 12t	-	-	5,74	0,66	
18	Ac. Linoleico	C 18:2 9c 12c n-6	1,50	1,65	3,51	16,07	4,89
19	Ac. γ - Linolenico	C 18:3 6c 9c 12c n-6	-	-	1,42	0,28	0,27
20	Ac. Eicosanoico	C 20:0	0,19	0,18	-	0,23	-
21	Ac. α-Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c n-3	0,99	0,86	1,2	3,17	1,52
22	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 8c	-	0,18			0,52
23	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,36	1,45	-	1,64	1,00
24	Ac. Estearidónico	C 18:4 6c 9c 12c 15c n-3			7		
25	Ac. Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c n-6	-	-	3,58	0,76	-
26	Ac. Dihomo γ-linolénico	C 20:3 8c 11c 14c n-6	-	-	0,66	0,36	-
27	Ac. Docosanoico	C 22:0	-	-	-	0,16	-
28	Ac. Eicosatrienoico	C 20:3 11c 14c 17c n-3	-	-	-	0,18	-
29	Ac. Araquidónico	C 20:4 5c 8c 11c 14c n-6	-	-	0,91	0,51	-
30	Ac. Docosenoico	C 22:1 13c	-	-	-	0,23	-
31	Ac. Eicosapentaenoico	C 20:5 5c 8c 11c 14c 7c n-3	-	-	16,48	6,67	1,52
32	Ac. Tetracosanoico	C 24:1	-	-	-	0,06	-
33	Ac. Docosatetraenoico	C 22:4 7c 10c 13c 16c n-6	-	-		0,19	-
34	Ac. Docosapentaenoico	C 22:5 7c 10c 13c 16c 19c n-3	-	-	1,56	2,63	0,64
35	Ac. Docosahexaenoico	C 22:6 4c 7c 10c 13c 16c 19c n-3	-	-	55,76	8,86	1,87
	EPA+DHA		-	-	72,24	15,53	3,39
	ΣTOTAL n-3		-	-	82	18,34	5,55
	ΣAGPI		2,48	2,50	97,82	20,67	10,44

Anexo 4: Termogramas de fusión por calorimetría diferencial de barrido







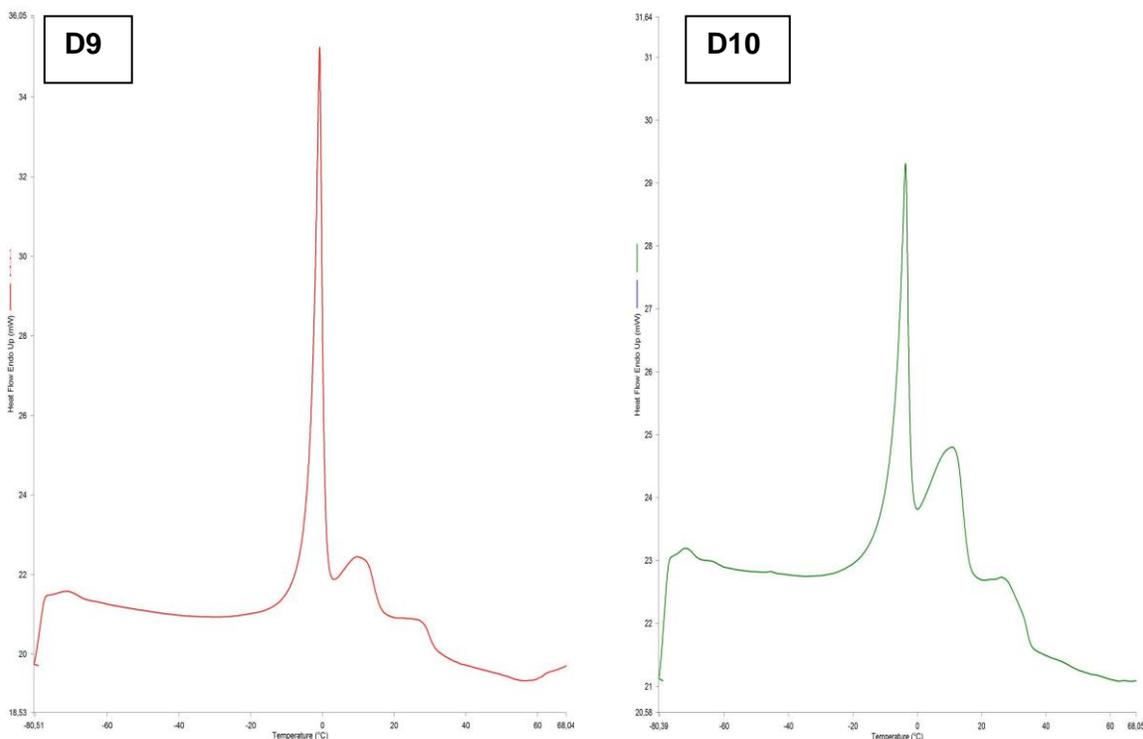


Figura 5.7: Perfiles de fusión obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). A: Mantequilla comercial (Colún); B: Mantequilla control; C: TAGs purificado; D: Formulación 1 -10.

Anexo 5: Análisis de varianzas para los resultados obtenidos.

1. Análisis de varianza para ΔH

Analysis of Variance for Delta H

Source	Sum of Squares	Df	Square	F-Ratio	P-Value
A:Velocidad de agitación	7790,97	1	7790,97	4,31	0,0925
B:Tiempo de agitación	3,99275	1	3,99275	0,00	0,9643
AA	21302,3	1	21302,3	11,78	0,0186
AB	18614,2	1	18614,2	10,30	0,0238
Total error	9039,4	5	1807,88		
Total (corr.)	56750,8	9			

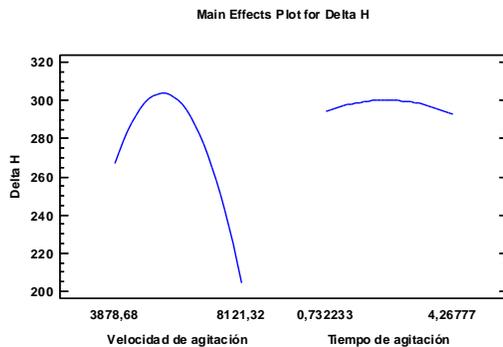
R-squared = 84,0718 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 71,3292 percent
Standard Error of Est. = 42,5192
Mean absolute error = 25,6808

Durbin-Watson statistic = 1,7796 (P=0,4567)
 Lag 1 residual autocorrelation = 0,0010119

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in Delta H into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 2 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 84,0718% of the variability in Delta H. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 71,3292%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 42,5192. The mean absolute error (MAE) of 25,6808 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals at the 5,0% significance level.



Regression coeffs. for Delta H

<i>Coefficient</i>	<i>Estimate</i>
constant	161,369
A:Velocidad de agitación	0,104281
B:Tiempo de agitación	-109,547
AA	-0,0000137059
AB	0,0181912

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{Delta H} = 161,369 + 0,104281 \cdot \text{Velocidad de agitación} - 109,547 \cdot \text{Tiempo de agitación} - 0,0000137059 \cdot \text{Velocidad de agitación}^2 + 0,0181912 \cdot \text{Velocidad de agitación} \cdot \text{Tiempo de agitación}$$

where the values of the variables are specified in their original units. To have STATGRAPHICS evaluate this function, select Predictions from the list of Tabular Options. To plot the function, select Response Plots from the list of Graphical Options.

2. Análisis de varianza para ONSET

Analysis of Variance for ONSET

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Velocidad de agitación	0,309788	1	0,309788	4,30	0,0834
B:Tiempo de agitación	0,0000854894	1	0,0000854894	0,00	0,9736
AA	1,98969	1	1,98969	27,63	0,0019
Total error	0,43208	6	0,0720133		
Total (corr.)	2,73164	9			

R-squared = 84,1824 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 76,2736 percent

Standard Error of Est. = 0,268353

Mean absolute error = 0,176925

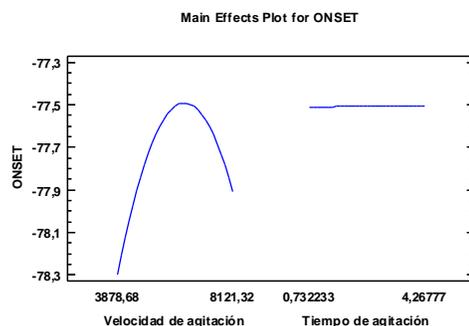
Durbin-Watson statistic = 1,00204 (P=0,0274)

Lag 1 residual autocorrelation = 0,270975

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in *ONSET* into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 1 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 84,1824% of the variability in *ONSET*. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 76,2736%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0,268353. The mean absolute error (MAE) of 0,176925 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is less than 5,0%, there is an indication of possible serial correlation at the 5,0% significance level. Plot the residuals versus row order to see if there is any pattern that can be seen.



Regression coeffs. for ONSET

Coefficient	Estimate
constant	-82,8369
A:Velocidad de agitación	0,00168229
B:Tiempo de agitación	0,00184921
AA	-1,3246E-7

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$ONSET = -82,8369 + 0,00168229 \cdot \text{Velocidad de agitación} + 0,00184921 \cdot \text{Tiempo de agitación} - 1,3246E-7 \cdot \text{Velocidad de agitación}^2$$

where the values of the variables are specified in their original units. To have STATGRAPHICS evaluate this function, select Predictions from the list of Tabular Options. To plot the function, select Response Plots from the list of Graphical Options.

3. Análisis de varianza para %CGS a 20°C

Analysis of Variance for %CGS a 20°C

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Velocidad de agitación	1,8775	1	1,8775	0,68	0,4472
B:Tiempo de agitación	0,222023	1	0,222023	0,08	0,7881
AA	23,3232	1	23,3232	8,44	0,0336
BB	30,282	1	30,282	10,96	0,0212
Total error	13,81	5	2,762		
Total (corr.)	53,6713	9			

R-squared = 74,2693 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 53,6847 percent

Standard Error of Est. = 1,66193

Mean absolute error = 0,973294

Durbin-Watson statistic = 1,42556 (P=0,1009)

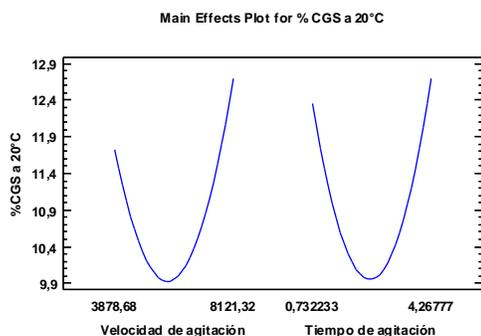
Lag 1 residual autocorrelation = 0,27257

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in %CGS a 20°C into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 2 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 74,2693% of the variability in %CGS a 20°C. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 53,6847%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 1,66193.

The mean absolute error (MAE) of 0,973294 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals at the 5,0% significance level.



Regression coeffs. for %CGS a 20°C

Coefficient	Estimate
constant	31,5667
A:Velocidad de agitación	-0,00579496
B:Tiempo de agitación	-4,02376
AA	5,01944E-7
BB	0,823599

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\%CGS \text{ a } 20^{\circ}C = 31,5667 - 0,00579496 * \text{Velocidad de agitación} - 4,02376 * \text{Tiempo de agitación} + 5,01944E-7 * \text{Velocidad de agitación}^2 + 0,823599 * \text{Tiempo de agitación}^2$$

where the values of the variables are specified in their original units. To have STATGRAPHICS evaluate this function, select Predictions from the list of Tabular Options. To plot the function, select Response Plots from the list of Graphical Options.

4. Análisis de varianza para Peak EPA+DHA

Analysis of Variance for Peak TG con EPA mas DHA

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Velocidad de agitación	0,294453	1	0,294453	0,60	0,4814
B:Tiempo de agitación	0,350099	1	0,350099	0,71	0,4454
AA	0,341016	1	0,341016	0,70	0,4510
AB	0,7225	1	0,7225	1,48	0,2913
BB	0,147088	1	0,147088	0,30	0,6128
Total error	1,95891	4	0,489728		
Total (corr.)	4,15905	9			

R-squared = 52,9 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent

Standard Error of Est. = 0,699805
 Mean absolute error = 0,409
 Durbin-Watson statistic = 1,96649 (P=0,4735)
 Lag 1 residual autocorrelation = -0,0907684

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in *Peak TG con EPA mas DHA* into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 0 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 52,9% of the variability in *Peak TG con EPA mas DHA*. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 0,0%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0,699805. The mean absolute error (MAE) of 0,409 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals at the 5,0% significance level.

5. Análisis de varianza para ΔH Peak EPA+DHA

Analysis of Variance for Delta H *peak TG con EPA y DHA*

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Velocidad de agitación	1,21985	1	1,21985	6,12	0,0686
B:Tiempo de agitación	0,234837	1	0,234837	1,18	0,3387
AA	0,261617	1	0,261617	1,31	0,3158
AB	0,179098	1	0,179098	0,90	0,3968
BB	0,60778	1	0,60778	3,05	0,1557
Total error	0,797055	4	0,199264		
Total (corr.)	3,07716	9			

R-squared = 74,0977 percent
 R-squared (adjusted for d.f.) = 41,7198 percent
 Standard Error of Est. = 0,44639
 Mean absolute error = 0,220105
 Durbin-Watson statistic = 1,85883 (P=0,4015)
 Lag 1 residual autocorrelation = 0,0621623

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in *Delta H peak TG con EPA y DHA* into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 0 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 74,0977% of the variability in Delta H *peak* TG con EPA y DHA. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 41,7198%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0,44639. The mean absolute error (MAE) of 0,220105 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals at the 5,0% significance level.

6. Análisis de varianza para %CGS T° *Peak* EPA+DHA

Analysis of Variance for %CGS T° *peak* Tg con EPA y DHA

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Velocidad de agitación	1,59977	1	1,59977	1,58	0,2776
B:Tiempo de agitación	0,101543	1	0,101543	0,10	0,7676
AA	0,00411424	1	0,00411424	0,00	0,9523
AB	0,00722484	1	0,00722484	0,01	0,9368
BB	0,00825741	1	0,00825741	0,01	0,9325
Total error	4,05939	4	1,01485		
Total (corr.)	5,7892	9			

R-squared = 29,88 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 0,0 percent

Standard Error of Est. = 1,0074

Mean absolute error = 0,54661

Durbin-Watson statistic = 2,71528 (P=0,8935)

Lag 1 residual autocorrelation = -0,448399

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in %CGS T° *peak* Tg con EPA y DHA into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 0 effects have P-values less than 0,05, indicating that they are significantly different from zero at the 95,0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 29,88% of the variability in %CGS T° *peak* Tg con EPA y DHA. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 0,0%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 1,0074. The mean absolute error (MAE) of 0,54661 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is greater than 5,0%, there is no indication of serial autocorrelation in the residuals at the 5,0% significance level.

Anexo 6: Estudiar la influencia de las diferentes variables del proceso (tiempo y velocidad de agitación), frente al comportamiento térmico de la matriz de mantequilla.

Tabla 5.12: Respuestas optimizadas.

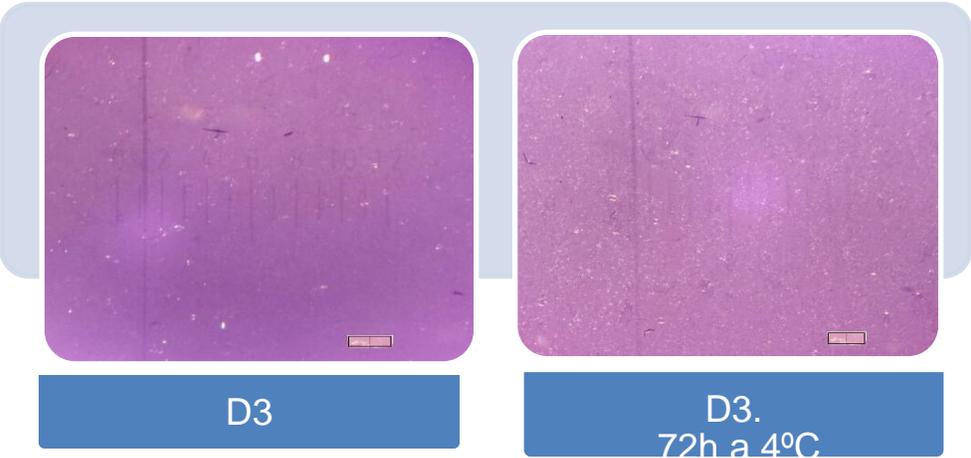
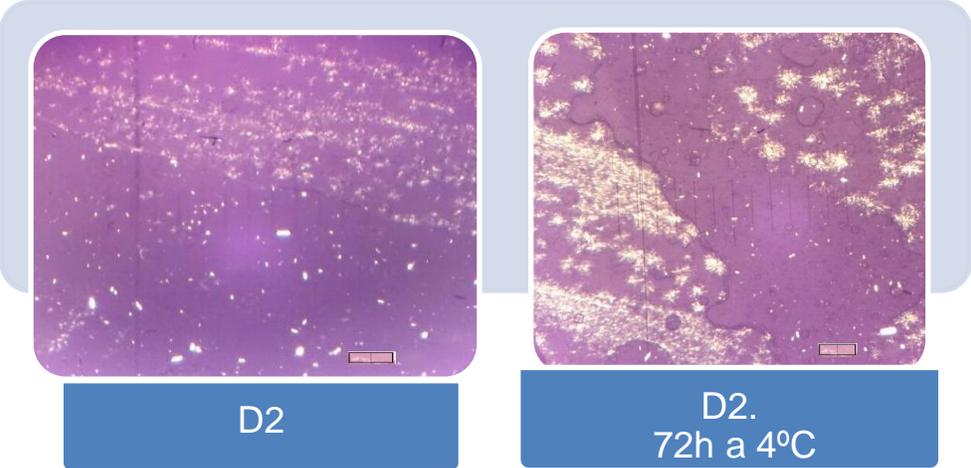
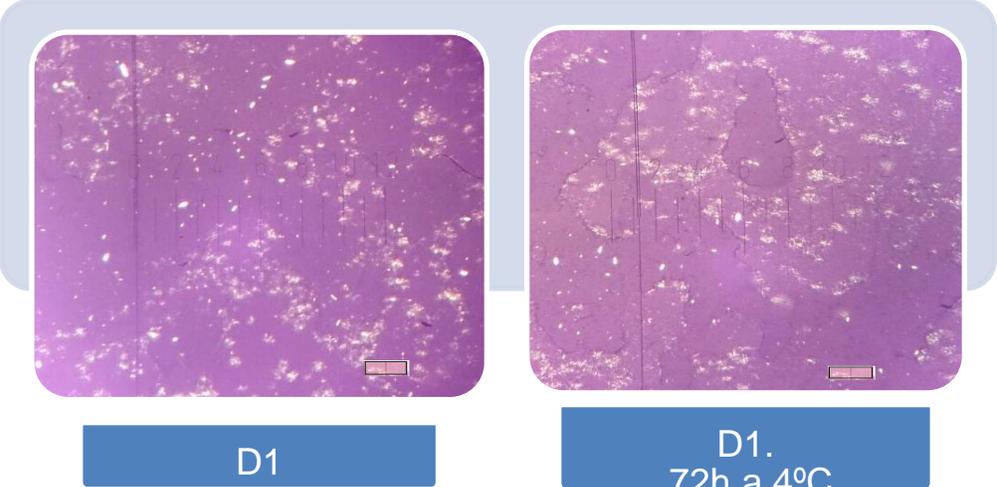
ΔH total			ONSET			%CGS a 20°C			
Unidades	(J/g)			°C			%		
Valor óptimo m.comercial	353,3827			-78,07			15,96		
Factores	Bajo	Alto	Óptimo	Bajo	Alto	Óptimo	Bajo	Alto	Óptimo
Velocidad de agitación	3000	9000	4351,25	3000	9000	4258,28	3000	9000	8199,13
Tiempo de agitación	0	5	0,073782	0	5	2,79379	0	5	4,40993

Anexo 7: Contenido de grasa sólida

Tabla 5.13: Porcentajes del contenido de grasa sólida (%CGS) en función de la temperatura, de las diversas formulaciones de mantequilla alta en EPA y DHA, mantequilla comercial (Colún), mantequilla control y TAGs purificados.

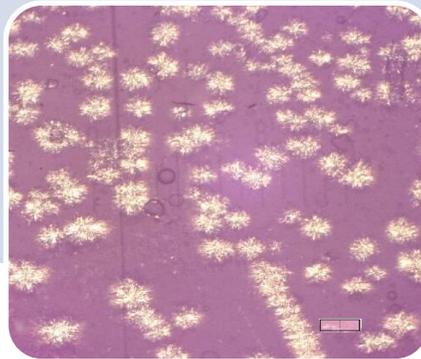
%CGS	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	M. comercial	M. Control	TG purificados
100	-80,22	-80,15	-80,16	-79,91	-80,16	-80,12	-79,56	-79,77	-79,23	-79,07	-80,15	-80,16	-80,22
90	-67,98	-61,82	-66,79	-64,68	-64,29	-66,93	-65,57	-64,56	-65,64	-65,65	-60,09	-44,76	-70,92
80	-54,98	-41,82	-50,66	-48,41	-46,29	-53,43	-50,79	-48,54	-50,48	-51,22	-37,42	-10,27	-63,38
70	-40,88	-23,78	-34,44	-31,76	-29,02	-40,57	-35,27	-32,41	-33,38	-35,93	-20,7	-2,6	-52,8
60	-26,39	-9,74	-20,3	-16,76	-14,65	-26,26	-20,22	-18	-16,49	-20,66	-8,88	-0,68	-42,41
50	-12,99	-1,52	-9,31	-4,32	-4,26	-11,94	-6,76	-5,14	-5,21	-9,27	-2,85	0,63	-32,45
40	-0,91	5,66	-2,61	3,65	2,78	0,48	2,58	3,61	-1,69	-4,07	5,05	2,21	-22,97
30	7,22	10,02	4,37	9,35	8,35	7,74	9,07	9,72	0,31	2,65	10,96	6,35	-14,51
20	13,38	14,23	10,93	15,03	14,31	14,21	15,21	15,55	8,74	10,29	15,58	12,91	-4,55
10	24,75	23,93	23,06	27,11	26,73	27,47	28,3	28,07	18,94	20,99	27,51	22,69	16,56
0	65,97	68,01	62,94	64,66	60,49	67,39	67,98	67,99	54,65	61,19	67,97	55,72	67,91

Anexo 8: Microfotografías de los diseños de mantequillas por microscopía óptica con luz polarizada.

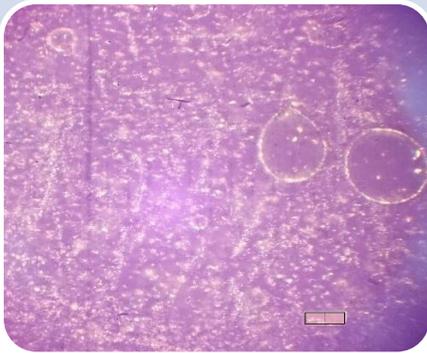




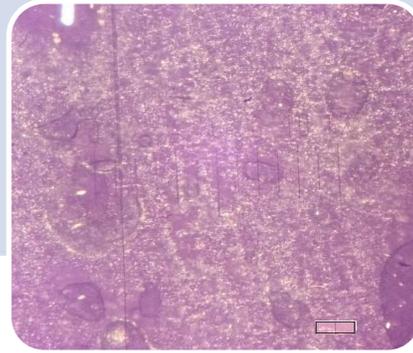
D4



D4.
72h a 4°C



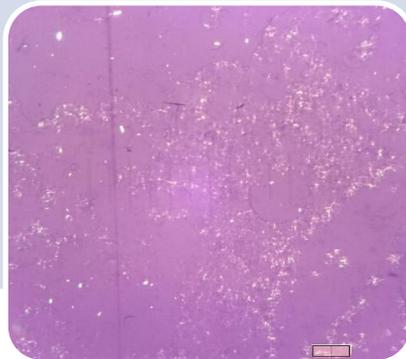
D5



D5.
72h a 4°C



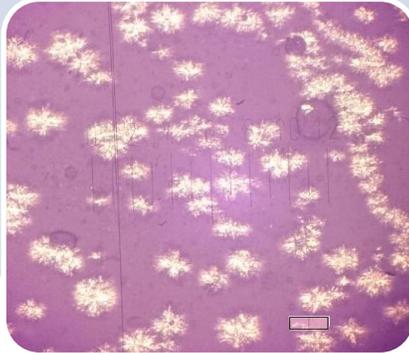
D6



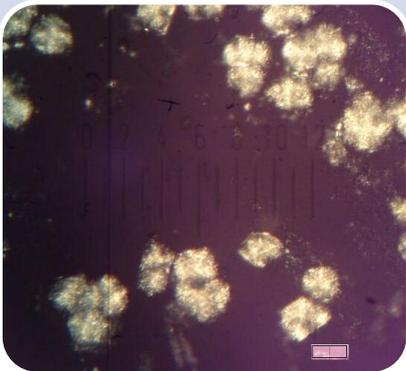
D6.
72h a 4°C



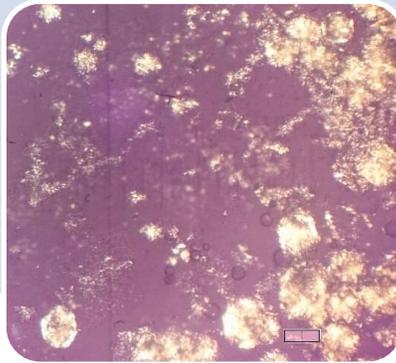
D7



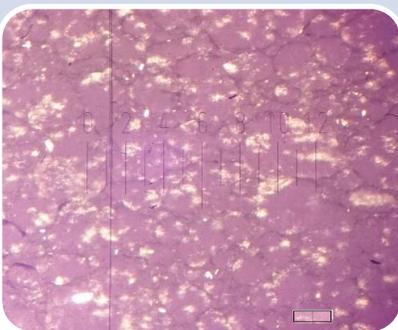
D7.
72h a 4°C



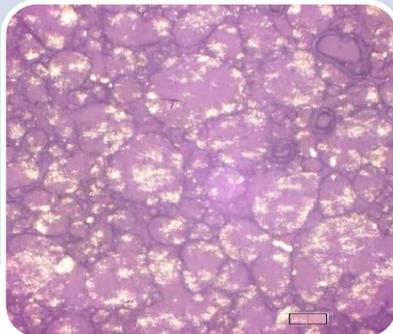
D8



D8.
72h a 4°C



D9



D9.
72h a 4°C

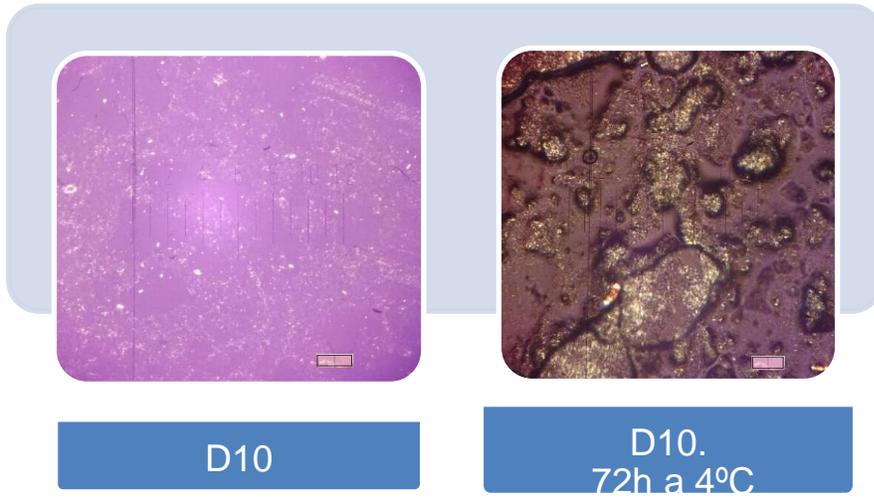


Figura 5.13: Microfotografías comparativas de microscopía óptica con luz polarizada de mantequillas. Formulación 1-10.