

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3 Y OMEGA-6 A PARTIR DE LAS VÍSCERAS DE LA TRUCHA
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) CULTIVADA EN EL CORREGIMIENTO DE EL
ENCANO NARIÑO.

FERNANDO ANTONIO CHAVES VALLEJOS.
ESTEBAN ALEJANDRO ESTRADA CARVAJAL.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2016

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
OMEGA-3 Y OMEGA-6 A PARTIR DE LAS VÍSCERAS DE LA TRUCHA
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) CULTIVADA EN EL CORREGIMIENTO DE EL
ENCANO NARIÑO.

FERNANDO ANTONIO CHAVES VALLEJOS.
ESTEBAN ALEJANDRO ESTRADA CARVAJAL.

Trabajo de grado presentado al Comité Curricular y de Investigaciones del
Departamento de Química como requisito parcial para optar al título de Químico

Director
Jesús Adriano Romo Ramos
Magister Scientiae en Bioquímica Básica (Universidad de La Habana)

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2016

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1ro del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Jesús Adriano Romo Ramos
Director

Jesús Cabrera
Jurado

William Hidalgo
Jurado

San Juan de Pasto, 7 de marzo de 2016.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecer a muchas personas que con su constante apoyo permitieron que alcanzara este logro: a Dios, por su amor, bendición y darme la fuerza para seguir luchando día a día, a mis padres como ejemplo de constancia siempre estuvieron apoyándome y me inspiraron a continuar, a mi tía, Elsa Carvajal, que en situaciones difíciles nunca me permitió desistir, a mi hijo Santiago, mi motor que me impulso a cumplir mis objetivos y metas a pesar de las dificultades me levantaba en las mañanas con ganas de luchar y dar lo mejor por un bienestar para ambos, en general a todas las personas que permitieron culminar esta etapa de mi vida , quisiera también agradecer al Mg, Jesús Romo nuestro director de tesis quien nos orientó y acompañó durante este proceso, a mi compañero y amigo Fernando Chaves, que estuvo a mi lado en este camino y vivió conmigo este enorme reto, muchas gracias.

Esteban Estrada.

A mi padre Antonio Chaves por su apoyo y mostrarme siempre el camino correcto para lograr mis objetivos, a mi hermana Milena Chaves por darme la mano en momento claves de mi desarrollo profesional, a Ana Marcela por estar a mi lado en todo momento y motivarme día a día a ser una gran persona, a ustedes tres muchas gracias y sepan que son el motor en mi vida para esforzarme y dejar huella en este mundo.

Un agradecimiento especial para el profesor Jesús Romo por dirigir la investigación y valiosos consejos, a Esteban Estrada por sacar juntos este proyecto, por ultimo agradezco a mi universidad y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación.

Fernando Chaves.

RESUMEN.

A partir de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) recolectadas en criaderos de la Universidad de Nariño en el Corregimiento de El Encano (Pasto-Nariño), se realizaron extracciones del material lipídico con diferentes técnicas como: extracción con solventes (líquido-líquido), extracción mecánica (cocción y prensado) y extracción enzimática, normalizando sus condiciones. Se realizó la separación, identificación y cuantificación de ácidos grasos, mediante cromatografía de gases. Bajo las condiciones de interés para la investigación se encontró un 9,8% de lípidos totales en las vísceras con la metodología de extracción con solventes, 8,4% con la extracción enzimática y 7,3% con la extracción mecánica. En cuanto a contenido de ácidos grasos, se encontró que el aceite contenía un 30,6% de ácido graso linoléico (omega-6) y un 1.5% de ácido α -linolénico (omega-3), determinado con extracción con solventes, 20.8% de ácido graso linoléico y 0.5% para el ácido graso α -linolénico con extracción mecánica y para la extracción enzimática se encontró un porcentaje de 25.3% para el ácido graso linoléico y un porcentaje de 0.9% para el ácido graso α -linolénico

ABSTRACT.

Starting with entrails of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), collected in fish farms of the University of Nariño in the district of "El Encano" (Pasto-Nariño), extractions of lipid material were performed using different techniques such as solvent extraction (liquid-liquid), mechanical (baking and pressing) and enzymatic extraction, normalizing conditions. Separation, identification and quantification of fatty acids were performed by gas chromatography. Following the conditions of interest for the research, a total lipid of 9.8% was found in the gut with the methodology of solvent extraction, 8.4% with the enzymatic extraction and a 7.3% with the mechanical extraction. In regard to the fatty acid content, it was found that the oil contained a 30.6% of linoleic fatty acid (omega-6) and a 1.5% of α -linolenic acid (omega-3), by solvent extraction, a 20.8% linoleic fatty acid and a 0.5% for the α -linolenic fatty acid with the mechanical extraction and for the enzymatic extraction a 25.3% of linoleic fatty acid and of 0.9% of α -linolenic acid was found.

CONTENIDO.

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1. OBJETIVO GENERAL	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1. LA TRUCHA ARCOÍRIS.	19
2.2. ÁCIDOS GRASOS.....	20
2.2.1 Ácidos grasos poliinsaturados.	21
2.2.2 Ácidos grasos Omega 3.....	21
2.2.3 Beneficios Omega 3 en humanos.....	22
2.2.4 Ácidos grasos Omega-6.....	23
2.2.5 Beneficios Omega-6 en humanos.....	23
2.3. BIOSÍNTESIS Y RUTAS METABÓLICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y 6.	24
2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	26
2.4.1 Extracción con solventes.....	26
2.4.2 Extracción mecánica.....	27
2.4.3 Extracción enzimática.	27
2.5. IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC).....	28
2.6. DERIVATIZACIÓN CATALIZADA POR ÁCIDOS.	29
2.7. MÉTODO DE ESTÁNDAR INTERNO.....	29
3. ANTECEDENTES.....	30
4. METODOLOGIA	33
4.1 TOMA DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO INICIAL	33
4.2. NORMALIZACIÓN DEL PROCESO DE SEPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES LINOLÉNICO (OMEGA-3) Y LINOLÉICO (OMEGA-6).	34
4.3. DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	34

4.4. DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE RESPUESTA DEL ESTÁNDAR INTERNO.....	34
4.5. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.	35
4.6. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.....	35
4.7. EXTRACCIÓN MECANICA.....	37
4.8. EXTRACCIÓN ENZIMATICA.....	38
4.9. COMPARACIÓN DE MÉTODOS.....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1. NORMALIZACIÓN DE PROCESO DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	41
5.1.1 Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención y área de los picos cromatográficos.	41
5.1.2 Determinación del factor de respuesta.	42
5.1.3 Identificación de ácidos grasos presentes en la muestra problema.	43
5.2. EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.....	43
5.2.1 Determinación de factores que afectan la extracción de aceite.	43
5.2.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción para los ácidos grasos α -Linolénico y linoléico..	46
5.3. EXTRACCIÓN MECÁNICA.....	51
5.3.1 Determinación de factores que afectan la extracción de aceite.	51
5.3.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción para los ácidos grasos α -linolénico y linoléico.	54
5.4. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.....	58
5.5. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD.	62
6. CONCLUSIONES.....	66
7. RECOMENDACIONES.....	67
8. DIVULGACIÓN Y RECONOCIMIENTOS	68
BIBLIOGRAFIA.....	69

LISTA DE TABLAS.

	pág.
Tabla 1. Análisis de la reproducibilidad en los tiempos de retención.	41
Tabla 2. Análisis de la reproducibilidad en las áreas.	42
Tabla 3. Calculo de factores de respuesta.	42
Tabla 4. Resultados de aceite extraído con solventes en cada ensayo.	44
Tabla 5. Resultados extracción ácidos α -linolénico y linoléico por solventes.	46
Tabla 6. Optimización proceso de extracción con solventes.	49
Tabla 7. Resultados aceite obtenido por extracción mecánica.	52
Tabla 8. Resultados extracción mecánica de ácidos α -linolénico y linoléico.	54
Tabla 9. Optimización proceso de extracción mecánica.	56
Tabla 10. Resultados extracción enzimática.	58
Tabla 11. Optimización del proceso de extracción enzimática.	60
Tabla 12. Resumen extracción de ácido α -linolénico con cada técnica.	62
Tabla 13. Resumen extracción de ácido linoléico con cada técnica.	63

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Anatomía de la trucha arcoíris.	19
Figura 2. Tripalmitina, estructura de un triglicérido.	21
Figura 3. Estructura ácido alfa-linolénico.	22
Figura 4. Estructura ácido linoléico.	23
Figura 5. Biosíntesis de los ácidos grasos.	25
Figura 6. Ubicación punto de muestreo.	33
Figura 7. Flujograma de la normalización del proceso de extracción con solventes.	36
Figura 8. Flujograma del proceso de normalización de la extracción mecánica de ácidos grasos.	38
Figura 9. Flujograma normalización de la extracción enzimática de ácidos grasos	39
Figura 10. Cromatograma estándares de ácidos grasos	43
Figura 11. Diagrama de Pareto para la extracción de aceite con solventes.	45
Figura 12. Grafico dispersión aceite en función de la temperatura para la extracción con solventes.	45
Figura 13. Superficie de respues extraccion con solventes de acido α -linoléico.	47
Figura 14. Superficie de respuesta extracción con solvente de ácido linoléico.	48
Figura 15. Cromatograma Extraccion con solventes empleando cloroformo/metanol.	50

Figura 16. Cromatograma Extraccion con solventes.	50
Figura 17. Diagrama de Pareto la extraccion mecanica de aceite.	53
Figura 18. Superficie de respuesta extracción mecánica de ácido α -linolénico.	54
Figura 19. Superficie de respuesta extracción mecánica de ácido linoléico.	55
Figura 20. Cromatograma mejores condiciones de extracción mecánica.	57
Figura 21. Superficie de respuesta extracción enzimática de ácido α -linolénico.	59
Figura 22. Superficie de respuesta extracción enzimática ácido linoléico.	60
Figura 23. Cromatograma mejores condiciones extracción enzimática.	61
Figura 24. Grafico dispersión ácido α -linolénico en función de las metodologías.	63
Figura 25. Gráfica dispersión ácido linoléico en función de las metodologías.	64

LISTA DE ANEXOS.

	pág.
Anexo A1. Análisis de Varianza para aceite en extracción con solventes.	74
Anexo A2. Análisis de Varianza para extracción de ácido α -linolénico con solventes.	74
Anexo A3. Análisis de Varianza para extracción de ácido linoléico con solventes.	74
Anexo A4. Análisis de Varianza para aceite extraído mecánicamente.	74
Anexo A5. Análisis de varianza extracción mecánica de ácido α -linolénico.	74
Anexo A6. Análisis de varianza extracción mecánica de ácido linoléico.	75
Anexo A7. Análisis de varianza extracción enzimática de aceite.	75
Anexo A8. Análisis de varianza extracción enzimática ácido α -linolénico.	75
Anexo A9. Análisis de varianza extracción enzimática ácido linoléico.	75
Anexo B. Ficha técnica Fungal proteasa FP 15.	76
Anexo C. Reconocimiento premio al mérito nacional investigativo.	77

ABREVIATURAS.

AA	Ácido Áraquidónico
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AL	Ácido Linoléico
ALA	Alfa-Linoleic Acid
ALN	Ácido Linolénico
CV	Coeficiente de variación
DGLA	Dihomo- γ -linolenic
DHA	Docosaheptaenoic Acid
DPA	Docosapentaenoic Acid
EPA	Eicosapentaenoic Acid
FAO	Food and Agriculture Organization.
FID	Flame ionization detector
FP	Fungal proteasa
GC	Gas chromatography
GLA	Gamma-linolenic Acid
GLP	Good laboratory practice
Kp	kilopondios
LC-PUFA	Long chain polyunsaturated fatty acids
msnm	metros sobre el nivel del mar
N	north
rpm	Revoluciones por minuto
Tn-f.	Tonelada – fuerza
W	West

GLOSARIO.

ÁCIDO LINOLÉICO: Es un ácido graso esencial para el organismo humano, pero el organismo no puede crearlo y tiene que ser ingerido por la dieta.

ÁCIDO LINOLÉNICO: El ácido linolénico es un ácido graso, poliinsaturado, omega-3 (el isómero α) u omega 6 (el isómero γ), formado por una cadena de 18 carbonos con 3 dobles enlaces en las posiciones 9, 12 y 15.

ASTEROSCLEROSIS: Variedad de arteriosclerosis que se caracteriza por el depósito de sustancias grasas en el interior de las arterias.

BICAPA LIPÍDICA: Es una membrana delgada formada por dos capas de moléculas de lípidos. Estas membranas son láminas planas que forman una barrera continua y delimitan las células.

CIEGO PILÓRICO: Conducto relativo al intestino de un pez.

ESTERIFICACIÓN: Se denomina esterificación al proceso por el cual se sintetiza un éster.

IRIDISCENTE: Que muestra o refleja los colores del arco iris.

NUTRACÉUTICO palabra derivada de nutrición y farmacéutico, hace referencia a todos aquellos alimentos que se proclaman como poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud humana.

SALMÓNIDO: Dicho de un pez, del grupo de los teleósteos fisóstomos con el cuerpo cubierto de escamas muy adherentes, excepto en la cabeza, y una aleta adiposa entre la dorsal y la caudal, y que comprende especies dulciacuícolas y marinas, que efectúan importantes migraciones en época de freza; p. ej., el salmón o la trucha.

VERTIENTE DEL PACIFICO: Es el conjunto de todas las cuencas hidrográficas cuyas aguas desembocan en el Océano Pacífico.

VÍSCERA: Cada uno de los órganos contenidos en las principales cavidades del cuerpo humano y de los animales.

INTRODUCCIÓN.

La Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), originaria de la costa este de los Estados Unidos, fue introducida a Colombia en el año de 1939 y desde ese entonces hasta la fecha se han creado más de 87 granjas industriales dedicadas a la Truchicultura de alta producción. Hoy en día esta especie ocupa el cuarto renglón de importancia en la acuicultura comercial, precedida de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), el camarón (*Litopenaeus vannamei*) y cachama (*Piaractus brachypomus*), las cuales representan en conjunto el 96% de la producción acuícola colombiana, en donde el 11,36% corresponde a la producción de la trucha arco iris¹.

La producción de trucha arcoíris en el departamento de Nariño, está centrada en el corregimiento del Encano que se encuentra ubicado a 22 Km de la ciudad de Pasto en dirección sureste. En este sector existen muchos criaderos de trucha y por ende una producción significativa de la misma, su procesamiento genera una cantidad considerable de subproductos, entre los cuales están las vísceras, que son desechadas al medio sin ningún tipo de tratamiento lo que genera contaminación y pérdida de recursos.

La fracción de grasa que se encuentra acumulada en la piel, en los músculos, en las vísceras, en la zona abdominal y torácica de la trucha arco iris se compone de triglicéridos, los cuales contienen ácidos grasos con dos o más insaturaciones (poliinsaturados) entre los cuales se encuentran los ácidos grasos omega-3 y omega-6 (AGPI).² Éstos ácidos grasos son llamados esenciales para los seres humanos, porque su organismo es incapaz de producirlos, por tanto tienen que ser ingeridos con los alimentos de la dieta.

Las enfermedades en especial las cardiovasculares y las enfermedades mentales día a día se convierten en la mayor preocupación por los altos riesgos de muerte que se producen a nivel mundial. Esto ha generado que los productores, investigadores e industriales indaguen sobre los subproductos de origen animal que pueden ser utilizados para mejorar la salud de los consumidores alrededor del mundo y las necesidades que tienen sobre esta. Una de las mayores ventajas para la prevención y el tratamiento en este tipo de enfermedades se encuentra en

¹ MINISTERIO DE AGRICULTURA. Trucha arco iris en Colombia. (2009). Recuperado el 18 de 08 de 2015, de http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/200946111918_Boletin13.pdf

² GONÇALVES, A. A.; SOUZA-SOARES, L. A. Lipídios em Peixes. Vetor, FURG, Rio Grande, v. 8, 1998. p. 35-53.

el aceite de pescado por su contenido de ácidos grasos poliinsaturados que han demostrado tener altos valores nutracéuticos en la alimentación.³

En este trabajo se normalizaron las condiciones de extracción de los ácidos grasos α -Linolénico (omega-3) y linoléico (omega-6), de las vísceras de la trucha con las técnicas de extracción con solventes (liquido-liquido), extracción mecánica (cocción y prensado) y extracción enzimática, adicionalmente se normalizaron las condiciones de separación e identificación de ácidos grasos mediante cromatografía de gases, por último se cuantifico los ácidos grasos α -linolénico y linoléico mediante la metodología de estándar interno, todo esto con el fin de responder la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el método más eficiente para la extracción y separación de ácidos grasos omega-3 y omega-6, a partir de las vísceras de la trucha arcoíris, cultivada en el corregimiento de El Encano?

³ CARRERO, J J, BARÓ, L, FONOLLÁ, J, JIMÉNEZ, J LÓPEZ., BOZA E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta of omega-3-fatty acids and, Nutr. Hosp. XX (1), ISSN 0212-1611. CODEN NUHOEQ S.V.R. 318, (2005). p. 63-69

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL.

Extraer, separar y cuantificar los ácidos grasos esenciales α -linolénico (omega-3) y linoléico (omega-6) a partir de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivada en el municipio de El Encano (Nariño).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

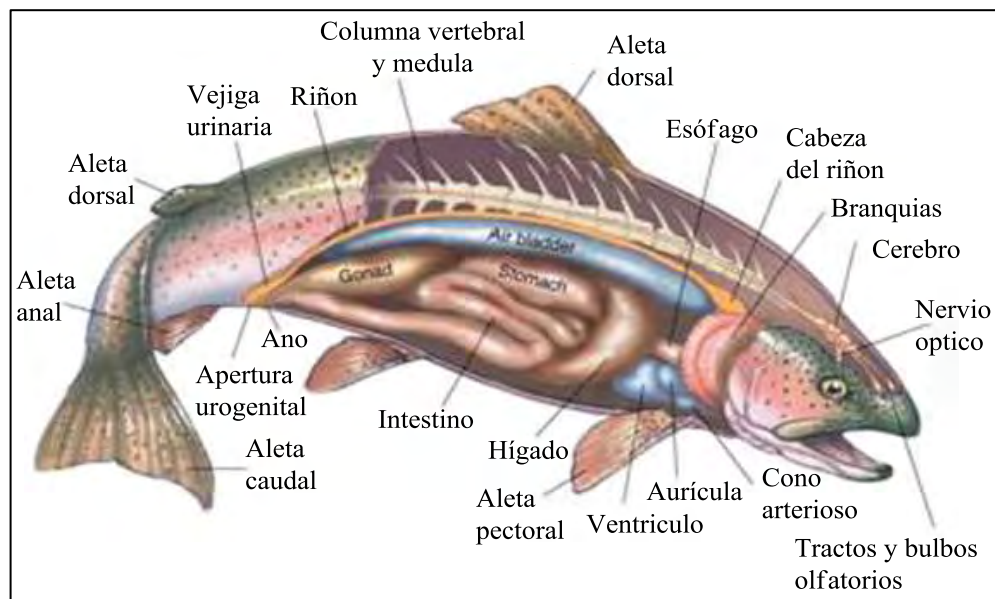
- Normalizar el proceso de extracción del material lipídico de las vísceras de trucha arco iris, mediante los métodos de extracción con solventes, mecánico y enzimático.
- Normalizar el proceso de separación de los ácidos grasos esenciales α -linolénico (omega-3) y linoléico (omega-6) a partir del material lipídico extraído de las vísceras de trucha arco iris.
- Identificar y cuantificar los ácidos grasos α -Linolénico y linoléico extraídos, mediante cromatografía de gases.
- Comparar el contenido y rendimiento de ácidos grasos α -Linolénico y linoléico obtenidos con las diferentes metodologías de extracción empleadas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA TRUCHA ARCOÍRIS.

La trucha arcoíris pertenece a la familia de los salmónidos, habita en las aguas frías, claras y oxigenadas de los lagos y arroyos en alturas considerables. Es originaria de la vertiente del Pacífico de América del Norte desde Alaska hasta California.⁴ Presenta en el dorso un color verde olivo oscuro, con una franja iridiscente que refleja la luz, de donde deriva su nombre, muestra manchas negras y pequeñas distribuidas sobre todo su cuerpo, el cual es alargado y cuya longitud promedio es de 40 a 60 cm. La longitud de la cabeza es el 20% de la longitud total. Presenta dos aletas dorsales, la primera a mitad de cuerpo y la segunda aleta es un repliegue dérmico, sin radios, conocida como aleta adiposa. El aparato digestivo consta de un estomago con un número de ciegos pilóricos de veintisiete a ochenta y un corto intestino.⁵

Figura 1. Anatomía de la trucha arcoíris.



Fuente: Modificado de Camacho (2000).

⁴ ORTEGA J. Manejo y alternativas de desarrollo para el cultivo de la trucha arco iris. SEDAP. México, 2000.p. 5-20.

⁵ BLANCO M., La Trucha, cría industrial. Ed. Mundi-prensa. Madrid.. 2°ed. 1994, p. 76.

La trucha arco iris es una especie carnívora entomófaga, ligeramente ictiófaga, las crías de trucha son zoopláctofagas, consumen cladóceros y copépodos, al pasar a la etapa juvenil o de adulto complementan su alimentación con crustáceos, moluscos, lombrices, etc.⁶ Pertenece al grupo de pescados semigrasos, contiene entre 3% y 7% de lípidos, dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6.⁷

2.2 ÁCIDOS GRASOS.

Un ácido graso es una molécula formada por una cadena larga hidrocarbonada lineal, generalmente de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo, es considerada una biomolécula orgánica lipídica, los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados y estos últimos a su vez pueden ser monoinsaturados o ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), esta clasificación depende de la naturaleza de la cadena hidrocarbonada.⁸

Valenzuela y colaboradores⁹ indican que los ácidos grasos forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, moléculas que constituyen la bicapa lipídica de todas las membranas celulares, por otro lado en los mamíferos, incluido el ser humano, la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos (figura 2), moléculas donde los extremos carboxílico (-COOH) de tres ácidos grasos se esterifican con cada uno de los grupos hidroxilos (-OH) del glicerol (glicerina, propanotriol); formando acilglicéridos (mono-, di o triglicéridos).

Muchos de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por los seres humanos, pero hay un grupo de ácidos grasos poliinsaturados, que el cuerpo humano no puede producir, este grupo se conoce como ácidos grasos esenciales y está constituido

⁶ CAMACHO E., MORENO M., RODRÍGUEZ M., LUNA C., VÁZQUEZ M.,. Guía para el cultivo de la trucha. SEMARNAP. Dirección general de acuacultura. México, 2000. p.17-25.

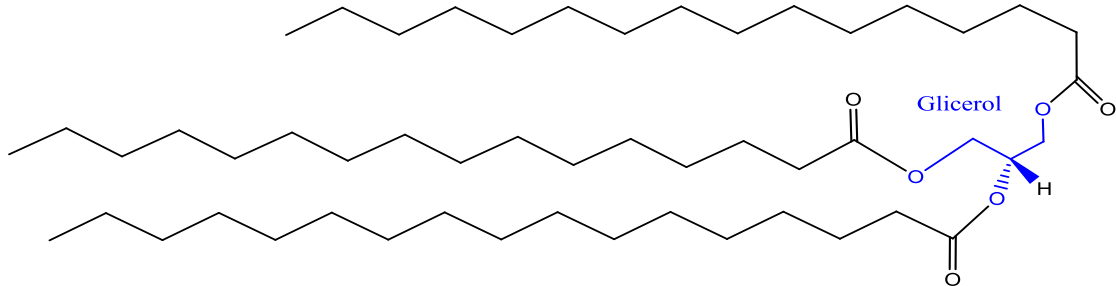
⁷ ANA M. SALVADOR, A., ALONSO D. Impact of Different Dietary Phospholipid Levels on Cholesterol and Canthaxanthin Lipoprotein–Serum Transport and Muscle Deposition in Rainbow Trout. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, p. 2016–2021

⁸ MESA, M.D., AGUILERA, C.M., LINDE, J., RAMIREZ, M.C., GIL, A., Lípidos como alimentos funcionales. En: Alimentos funcionales. (M. Juárez, A. Olano, F. Morais, eds.). Fundación española para la ciencia y la tecnología, Madrid (España), 2005. p. 146-173.

⁹ VALENZUELA, A., MANZINI, J., TOUSSANINT, G., UAUY, R. y PINEDA, J.. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Departamento de Nutrición y Salud Humana. División de Vitaminas Roche México. N°1. 1999a, p.8.

por los ácidos grasos omega-3 que derivan del ácido α -linolénico y omega-6 los cuales derivan del ácido linoléico.¹⁰

Figura 2. Tripalmitina, estructura de un triglicérido.



Fuente: Modificado de Valenzuela (1999).

2.2.1 Ácidos grasos poliinsaturados. La larga cadena de ácidos grasos poliinsaturado se dividen en tres familias principales: omega-3, omega-6 y omega-9. Los ácidos grasos omega-3 son derivados del pescado y algunas plantas, mientras que el omega-6 se derivan principalmente de aceite vegetal.¹¹

Los ácidos grasos omega-9 no son esenciales ya que el organismo humano puede introducir una insaturación a un ácido graso saturado en esa posición. De esta forma, el ácido oleico (omega-9), no requiere estar presente en la dieta humana. No ocurre lo mismo con los ácidos grasos omega-6 y omega-3, ya que nuestro organismo no puede introducir insaturaciones en dichas posiciones. De esta forma, ácidos grasos como el ácido linoléico (C18:2, omega-6, AL) y el ácido alfa linolénico (C18:3, omega-3, ALN) son esenciales, por lo cual nuestra dieta requiere contenerlos en proporciones bien determinadas ya que su carencia o desbalance en la ingesta produce serias alteraciones metabólicas.¹²

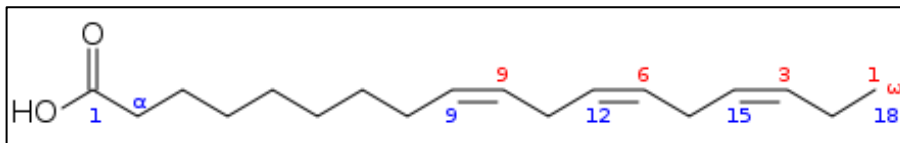
2.2.2 Ácidos grasos Omega 3. El término n-3 (también llamado ω -3 o ácidos grasos omega-3) significa que el primer doble enlace está en la tercera posición de carbono a partir del metilo terminal de la cadena. Existen tres ácidos grasos omega-3 nutricionalmente importantes todos poliinsaturados que son: el ácido alfa-linolénico, el ácido eicosapentaenoico y el ácido Docosahexaenoico.

¹⁰ SANDERS T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. Am J Clin Nutr. 2000; 71: p.176-180.

¹¹ MATAIX, J; QUILES, JL,. Aceites y grasas. En Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española. Madrid, 2001 p. 121-131.

¹² BRENNER R, PELUFFO R. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. Biochim Biophys Acta 1969; 176: p. 471-479.

Figura 3. Estructura Ácido alfa-linolénico.



Fuente: Modificado de Valenzuela (2000).

El ALA, el EPA y el DHA son los ácidos grasos predominantes en los fosfolípidos celulares, de ahí su gran importancia biológica ya que determinan la fluidez de las membranas y por tanto, el comportamiento de las enzimas y receptores de éstas, por otro lado el ALA es el precursor de toda la familia de ácidos grasos omega-3, ya que a partir de este se sintetizan el resto de la familia omega-3 en los mamíferos.¹³

2.2.3 Beneficios de los ácidos grasos omega-3 en humanos. El consumo directo o de ácidos grasos omega-3 han recibido en las últimas tres décadas mucha atención por parte de la comunidad científica, ya que los resultados de los estudios epidemiológicos y de intervención muestran que su consumo puede afectar favorablemente a la salud cardiovascular, incluso tratándose de una ingesta pequeña a la semana.¹⁴ Varios estudios han demostrado que su consumo reducía el riesgo de enfermedad coronaria, lo mismo que se reducía el desarrollo de la aterosclerosis.^{15,16}

De igual manera, otros estudios han demostrado que su ingesta pueden disminuir la concentración de triglicéridos en el plasma,¹⁷ lo mismo que pueden estimular la producción endotelial de óxido nítrico, permitiendo la dilatación de los vasos sanguíneos lo que reduce a su vez la presión sanguínea y la activación

¹³ DONALD B. Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. J Biol Chem 2002; 277 (11): p. 8755.

¹⁴ VON SCHACKY C, n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. Am J Clin Nutr, 2000. 71:224S-7S.

¹⁵ KROMHOUT D, BOSSCHIETER E, DE LEZENNE C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. N Engl J Med, 1985, 312: p. 1205-1209.

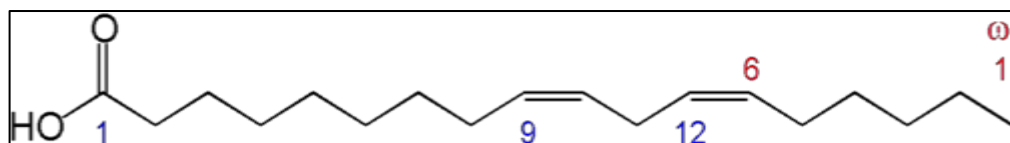
¹⁶ VON SCHACKY C, BAUMANN K, ANGERER P. The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. Lipids. 2001; 36 Suppl: p. 99-102.

¹⁷ ZAMPELAS A, PEEL A, GOULD BJ, WRIGHT J, WILLIAMS C. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apoprotein levels in healthy men. Eur J Clin Nutr. 1994; 48: p. 842-848.

endotelial.¹⁸ En varios estudios se ha demostrado que los ácidos grasos omega-3 disminuyen la osteoclastogénesis, lo que mismo aumentan la absorción de calcio y disminuyen la excreción urinaria de este, inhibiendo la osteoporosis en ratas^{19,20}.

2.2.4 Ácidos grasos Omega-6. El término n -6 (también llamado ω -6 o ácidos grasos omega-6) se debe a que el primer doble enlace está en la sexta posición de carbono a partir del metilo terminal de la cadena. Entre los ácidos grasos omega-6 más importantes están ácido linoléico el cual es el precursor de toda la familia omega-6 (figura 4), ácido gamma-linolénico (GLA), ácido araquidónico (AA).²¹

Figura 4. Estructura ácido linoléico



Fuente: Modificado de Valenzuela (2000)

2.2.5 Beneficios de los ácidos grasos omega-3 en humanos. Los ácidos grasos omega-6, especialmente el ácido araquidónico son necesarios para el desarrollo del cerebro fetal e infantil además se indica que el ácido graso linoléico puede contribuir a la disminución de algunos factores relacionados con enfermedades cardiovasculares humanas.²²

Se requieren ciertos niveles de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 para el normal funcionamiento del metabolismo humano, además se debe tener una correcta proporción de estos ácidos grasos en el organismo humano ya que tienen actividad proinflamatoria que puede jugar un papel importante en la función

¹⁸ HARRIS WS. N-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids*. 1996; 31: p. 243-252.

¹⁹ SUN L, TAMAKI H, Ishimaru T, Teruya T, Ohta Y, Katsuyama N, Chinen I. Inhibition of osteoporosis due to restricted food intake by the fish oils DHA and EPA and perilla oil in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 Dec; 68(12): p.2613.

²⁰ SUN D, KRISHNAN A, ZAMAN K, LAWRENCE R, BHATTACHARYA A, FERNÁNDEZ G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 2003 Jul; 18(7): p.1206.

²¹ POU DYAL H, PANCHAL SK, DIWAN V, BROWN L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res* 2011; 50(4): p. 372-387.

²² DECKELBAUM, R.J., n-6 and n-3 Fatty acids and atherosclerosis: ratios or amounts? *Arterioscler. thromb. Vasc. Biol*. 30, 2010.p. 2325–2326.

inmunológica. Se ha indicado igualmente que el consumo de estos, podrían atenuar el desarrollo de hígado graso no alcohólico y colitis todo este estudio fue realizado dentro de un modelo de ratón obeso.^{23, 24}

2.3 BIOSÍNTESIS Y RUTAS METABÓLICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y 6.

Tras ser adquiridos a través de la dieta, LA y ALA son metabolizados a través de vías enzimáticas de desaturación y elongación que tienen lugar principalmente en el hígado (Figura 5). La enzima Δ^6 -desaturasa convierte el LA en ácido γ -linoléico (GLA, 18:3n-6) que es elongado a ácido dihomo- γ -linoléico (DGLA, 20:3n-6), el cual a su vez es el sustrato de la enzima Δ^5 -desaturasa dando lugar al ácido araquidónico (AA, 20:4n-6). La misma combinación de enzimas que interviene en el metabolismo de los ácidos grasos omega-6 puede metabolizar el ALA dando lugar a toda la familia de ácidos grasos omega-3. Por esta ruta enzimática, ALA se convierte en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y éste a su vez, en ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) a través de tres etapas. Primero EPA gana dos átomos de carbono, dando lugar al ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5n-3). Luego se añaden dos átomos de carbono, dando lugar al ácido 24:5n-3, que es desaturado y se convierte en el ácido 24:6n-3. Finalmente, este ácido pierde dos átomos de carbono mediante β -oxidación originando DHA.

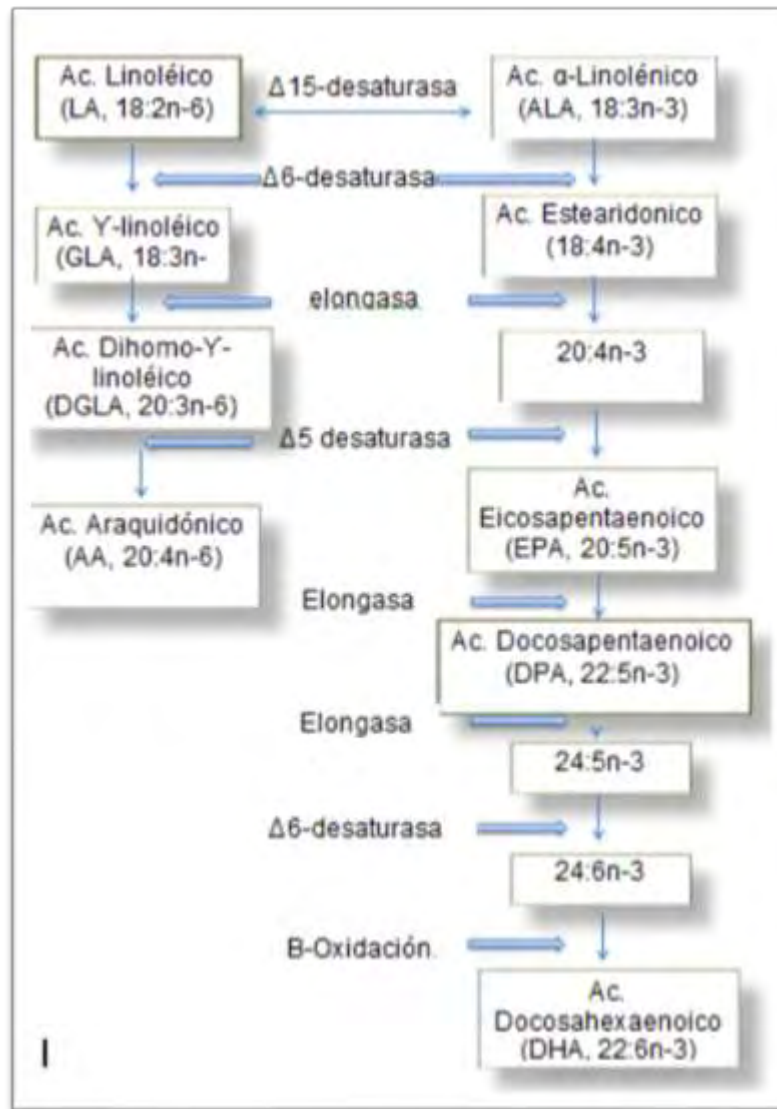
Tal y como muestra la figura 5, el AA puede ser metabolizado de forma paralela por las mismas enzimas, produciendo por los ácidos 22:4n-6, 24:4n-6, 24:5n-6 y 22:5n-6, lo que significa que LA y ALA compiten constantemente por las mismas enzimas.²⁵

²³ PATTERSON, E., WALL, R., FITZGERALD, G.F., ROSS, R.P., STANTON, C.,. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Metab.* 2012, 539426.

²⁴ KIM W, MCMURRAY DN, CHAPKIN RS. n-3 polyunsaturated fatty acids—physiological relevance of dose. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;82:155–8.

²⁵ DAS U.N. *Op. cit.*, p. 939.

Figura 5. Biosíntesis de los ácidos grasos.



Fuente: Modificado de Das (2006).

Las enzimas desaturasas tienen preferencia por los ácidos grasos de la serie n-3 frente a los de la serie n-6 y en último lugar por los de la serie n-9. Las reacciones limitantes en la biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena son aquellas en las que intervienen las Δ^6 y Δ^5 desaturasas.²⁶ La actividad Δ^6 desaturasa es inhibida por altos niveles de sus productos o precursores y por lo tanto, está influenciada por la ingesta en la dieta de dichos ácidos grasos y por

²⁶ LINSCHER WG, VERGROESEN J., Lipids. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. Modern nutrition in health and disease, 8th ed. Philadelphia: Lea and Febiger: 1994. p. 47-88.

gran número de hormonas. Una alta ingesta de carbohidratos, también disminuye la actividad de la Δ^6 desaturasa, mientras que las proteínas la activan. El glucagón, la adrenalina y la tiroxina actúan como depresoras de la actividad Δ^6 desaturasa. Asimismo, una deficiencia de minerales como zinc, selenio y magnesio reducen la actividad de la Δ^5 y Δ^6 desaturasa, mientras la insulina puede actuar como activador.²⁷

2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

2.4.1 Extracción con solventes. La extracción líquido-líquido a menudo llamada extracción con solventes, consiste en la separación de los constituyentes de una mezcla líquida por contacto con otro líquido inmiscible (parcial o totalmente inmiscible), por lo tanto, no supone cambio de estado físico. Si los componentes de la mezcla original se distribuyen de forma diferenciada entre las dos fases líquidas, se produce un cierto grado de separación, que puede acentuarse por la combinación de etapas múltiples, tal como ocurre en operaciones como la destilación o la absorción.²⁸

Para determinar los ácidos grasos de la grasa o del tejido muscular, los métodos más usados son los de Bligh y Dyer²⁹. Este método ha sido modificado con variantes pero que mantienen el mismo principio de extracción basado en la mezcla de cloroformo y metanol para poder extraer tanto lípidos neutros como polares. Dado el uso de cloroformo, se han propuesto otras soluciones de extracción como el hexano y 2-propanol, pero que no han sido aplicadas de modo importante.

²⁷ SMITH, W. L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002, 68-69, p. 115-118.

²⁸ MARCILLA G. Introducción a las operaciones de separación contacto continuo. Publicaciones de la Universidad de Alicante, 1999, p:11

²⁹ BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 1959. p. 911-917

2.4.2 Extracción mecánica. En este método se emplea calor que desnaturaliza las proteínas, las coagula, rompe su cadena y separa el agua. Las principales fases de este método consisten en la cocción para coagular las proteínas, con lo que se liberan el agua y el aceite retenidos; la separación, al prensar los elementos coagulados con los cuales se obtiene una fase sólida que contiene de 60 a 80% de materia seca excedente de aceite, formada fundamentalmente de proteínas no disueltas; y una fase líquida llamada líquido de prensadora que contiene el resto de los componentes: aceites, proteínas disueltas y en suspensión, vitaminas y elementos minerales. En el proceso las fases sólida y líquida se separan por presión, mientras que la separación final del aceite de la fase acuosa y de otras sustancias, se hace por centrifugación.³⁰

2.4.3 Extracción enzimática. Las enzimas son catalizadores biológicos muy potentes y eficaces que actúan en pequeña cantidad y se recuperan inalterados después de su actividad. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, no modifican el sentido de los equilibrios químicos sino que aceleran su consecución y muchas de ellas poseen una elevada especificidad. Las enzimas generalmente son sensibles a los cambios de pH, y de temperatura.³¹ Pueden obtenerse a partir de tejidos animales, tejidos vegetales o mediante procesos de fermentación empleando microorganismos seleccionados. Las plantas han sido la fuente tradicional de ciertas enzimas³².

Las enzimas proteolíticas llamadas también proteasas, degradan los sustratos de origen proteico, hidrolizando los enlaces peptídicos dejando libres péptidos o aminoácidos. Cuando las proteínas están unidas a otras moléculas, las proteasas contribuyen a separar estas moléculas. Por tanto, estas se han utilizado en la industria de los alimentos, como ablandadores de carne, entre otros. Las enzimas proteolíticas se ha utilizado para dar valor agregado a los subproductos de pescado, convirtiéndolos en hidrolizados. De esta forma, la parte proteica y a fase lipídica pueden ser aprovechadas. Las enzimas más comúnmente usadas

³⁰ ORTIZ, A. DORANTES, L. GALINDEZ, C. «Desarrollo de un proceso para la obtención de aceite de aguacate de alta calidad empleando una tecnología emergente [online].» (2005). Disponible en <http://www.pncta.org.co/investigaciones_03>. (Último acceso: 26 de agosto de 2015)

³¹ SORIANO, M. «Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PeLA de Paenibacillus sp. BP - 23 eYvPA de Bacillus Subtilis.» Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología. Facultad de Biología., Universidad de Barcelona, Barcelona (2004).p:35-41.

³² YEGRES, S. SANCHEZ, J. BELMAR, M. RIVEROS W. BELMAR, D. «Producción de enzimas pépticas a escala piloto.» Departamento de Bioanálisis. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Caracas, Venezuela (2000), p: 54-56.

son las de origen bacteriano, como la Alcalaza®, Neutrasa y Protamex® o vegetales como papaína, bromelina y ficina.³³

2.5 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC).

Los ácidos grasos presentes en las grasas se pueden identificar por varios métodos, entre ellos mediante cromatografía de gases (GC) la cual es una técnica analítica utilizada en la separación, identificación y cuantificación de los componentes de una mezcla realizada en un equipo llamado cromatógrafo de gases, se basa en la diferencia de velocidades de migración de sus componentes al ser arrastrado por un gas inerte a través de una columna.³⁴

Esta técnica permite la separación de sustancias volatilizables, teniendo como base la distribución de las sustancias entre una fase estacionaria (sólida o líquida) y una fase móvil, la muestra es introducida en una columna que contiene la fase estacionaria, a través del sistema de inyección. Temperaturas apropiadas en el sitio de la inyección y en la columna, posibilitan la volatilización de los componentes de la muestra, los cuales, de acuerdo con sus propiedades y las de la fase estacionaria, son retenidos por tiempos variables y llegan al final de la columna en tiempos diferentes. Un detector adecuado, a la salida de la columna, permite la detección y cuantificación de las sustancias de la muestra.³⁵

Los ácidos grasos presentan puntos de ebullición muy elevados, no es posible su análisis directo en el cromatógrafo por lo que se necesita realizar previamente una derivatización para la conversión de los mismos en sus correspondientes esteres metílicos, los cuales tienen puntos de ebullición que se encuentran dentro del rango de temperatura en que se manejan las fases en el cromatógrafo.³⁶

³³ ASPMO, S. I., HORN, S. J. & H. EIJSINK, V. G.. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 2005. p. 1957-1966

³⁴ STAMBUK, J.. *Manual práctico de cromatografía de gases*. Perkin-Elmer Corporation. Norwalk. Estados Unidos, 1970. p. 40.

³⁵ SHARAPIN, N. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Santa Fé de Bogotá. Colombia, 2000. p. 247.

³⁶ CHRISTIE, W.W., Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in lipid methodology*, 1993. p. 69 - 111.

2.6 DERIVATIZACIÓN CATALIZADA POR ÁCIDOS.

Los ácidos carboxílicos pueden ser esterificados por los alcoholes en presencia de un catalizador ácido conveniente, las condiciones preferidas para la esterificación catalizada por ácidos requieren de un exceso del alcohol apropiado y de ausencia de agua, el método más empleado es el ácido sulfúrico metanólico, el cual usa una solución del 1-2% (v/v) de ácido sulfúrico concentrado en metanol.³⁷

2.7 MÉTODO DE ESTÁNDAR INTERNO.

La precisión más alta para un análisis cuantitativo por cromatografía de gases se obtiene con el empleo de estándares internos, ya que se reducen al mínimo los errores asociados a la inyección de la muestra, la velocidad de flujo y las variaciones en las condiciones de la columna. A cada uno de los estándares y la muestra, se añade una cantidad perfectamente conocida de un estándar interno y el parámetro analítico que se mide es la relación entre el área (o altura) del pico del estándar interno. Para que este método funcione, es necesario que el pico correspondiente al estándar interno esté bien separado de los picos de todos los componentes de la muestra; aunque también debe aparecer muy cerca del pico del analito.³⁸

³⁷ CHRISTIE. Op. cit., p. 80.

³⁸ SKOOG, D. HOLLER, J. NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. Madrid: Mc Graw-Hill, 1992.p. 42.

3. ANTECEDENTES.

Para Bergé y Barnathan³⁹ las fuentes naturales más importantes de ácidos grasos esenciales son organismos acuáticos, que son alimentados directa o indirectamente del fitoplancton, el cual es el principal productor de ácidos grasos esenciales en la cadena trófica. Hoy en día, el pescado es la fuente más común de ácidos grasos esenciales en la dieta humana, peces como las familias Scombridae, Clupeidae y salmónidae son las especies de peces con el mayor porcentaje de DHA y EPA. Con base a esto para Mataix y Martínez⁴⁰ el pescado debe ser considerado para la producción a gran escala de ácidos grasos esenciales.

Adeniyi y Bawa⁴¹ emplearon éter de petróleo para la extracción de aceite de pescado de la caballa (*Scomber scombrus*), encontraron un 28,24% de lípidos mediante esta metodología, además concluyeron que la extracción con solventes aumenta en proporción directa con el tiempo de extracción.

Bligh y Dyer⁴² desarrollaron un método sencillo y rápido para la extracción y purificación de lípidos a partir de materiales biológicos. Ellos emplearon tejido animal húmedo el cual se homogeneizó con mezclas de cloroformo y cloroformo-metanol, reportan 5 g como la cantidad máxima de lípidos extraídos a partir de 100 g de filete de pescado. Por último los autores mencionan que el método puede ser fácilmente adaptado para su uso con otros tejidos.

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas describe el método de prensado en húmedo como el proceso más común para obtener aceite de pescado crudo desde pescado fresco a escala industrial. Este proceso implica la producción de aceite de pescado y harina de pescado a través

³⁹ BERGÉ, J. P., & BARNATHAN, G.. Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 96, 2005 p. 49–125.

⁴⁰ MATAIX, J., MAÑAS, M., LLOPIS, J., & MARTÍNEZ-DE-VICTORIA, E.. Tabla de composición de alimentos, 4a Ed. Granada: Universidad de Granada, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. 2003.

⁴¹ ADENIYI O.D., BAWA A.A., MACKEREL (*Scomber scombrus*) oil extraction and evaluation as raw materials for industrial utilization. *Leonardo Journal of Sciences* (8) (2006), p. 33–42.

⁴² BLIGH, E. G., & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Candaian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 1959. p. 911–917.

de varios pasos, los cuales son: cocción de la materia prima, prensado del material cocido y filtración final o centrifugación para recuperar el aceite.⁴³

Chantachum, Benjakul y Sriwirat⁴⁴ publicaron un estudio sobre la extracción de aceite de pescado a partir de las cabezas de atún, ellos emplearon la metodología de prensado en húmedo con dos tipos de muestra, una pre cocida y otra sin cocción. Encontraron que tanto la temperatura como el tiempo de calentamiento afectaron la calidad y cantidad de aceite extraído. Determinaron las condiciones óptimas para la extracción a 85 ° C durante 30 min, seguido por prensado a 140 toneladas / m² utilizando una prensa hidráulica. Reportaron los rendimientos de aceite crudo extraídos en 2,8 y 4,8%, para las muestras pre cocida y sin cocción respectivamente.

Liaset, Julshamn, y Espe⁴⁵ estudiaron la hidrólisis enzimática con proteasas en filete de salmón, mediante este proceso obtuvieron aproximadamente el 77% de los lípidos totales presentes en el filete, además encontraron alta presencia de EPA y DHA y lograron obtener subproductos de interés como aminoácidos esenciales.

Linder, Fanni, y Parmentier⁴⁶ desarrollaron un método enzimático para extraer aceite de pescado a partir de cabezas de salmón utilizando diferentes enzimas comerciales: una proteasa (Alcalasa), un exo-peptidasa (Neutrasa) y una endo-peptidasa (Flavourzyme) a temperatura media de 55 ° C. La recuperación de aceite más alto que obtuvieron fue de 17,4% después de 2 h de reacción y empleando la enzima Alcalasa.

Šližyte⁴⁷ estudió la hidrólisis enzimática utilizando Flavourzyme y Neutrasa sobre subproductos de bacalao, los autores además estudiaron la influencia del calentamiento inicial sobre las muestras y la composición química del aceite obtenido, encontrando DHA y EPA con una pureza de 85,02% y un rendimiento de

⁴³ FAO, F. I. D.. The production of fish meal and oil. F. F. T. Paper, vol. 142. Rome (Italy): FAO (1986). 63 pp

⁴⁴ CHANTACHUM, S., BENJAKUL, S., & SRIWIRAT, N. Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry*, 69, 2000. p. 289–294

⁴⁵ LIASET, B., JULSHAMN, K., & ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutrition evaluation of the produced fractions from enzyme hydrolysis of salmon with Protamex™. *Process Biochemistry*, 38, 2003.1747–1759.

⁴⁶ LINDER, M. FANNI, J. PARMENTIER M.. Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases *Marine Biotechnology*, 7 (1), 2005, pp. 70–76

⁴⁷ ŠLIŽYTE, R Rustad, T. Storrø I., Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40, 2005, p. 3680–3692

25,10%, además de encontrar un efecto positivo en la extracción de aceite al aumentar la temperatura siempre y cuando esta no sobrepase los 55°C.

Al-Sayed-Mahmoud, y M. Linder⁴⁸ determinaron los lípidos presentes en ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), para su extracción emplearon hidrólisis enzimática por Alcalasa, Neutrasa y Proteasa, seguido de centrifugación. Los mejores resultados se obtuvieron con Alcalasa donde las proteínas hidrolizadas fueron de 7,8%. El rendimiento de aceite extraído después de la proteólisis fue del 3,7%, la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados obtenidas fue 34,7% presentes en los lípidos totales.

⁴⁸ AL-SAYED-MAHMOUD, M. LINDER, J. FANNI, M. PARMENTIER. Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe Process Biochemistry, 43. 2008, p. 376–383

4. METODOLOGIA

4.1 TOMA DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO INICIAL.

El muestreo se realizó en la estación de Jaulas Flotantes, Intiyaco, de la Universidad de Nariño ubicada en la vereda El Puerto, sobre el Lago Guamuez, corregimiento de El Encano, del municipio de Pasto, departamento de Nariño; al sur occidente de Colombia a aproximadamente 20 km de la zona urbana de Pasto, a 2.800 msnm, sobre las coordenadas geográficas: $01^{\circ} 06' 3,80''$ N y $77^{\circ} 07' 2,26''$ W (figura 6).

Se tomaron 30 truchas adultas, con un peso aproximado de 300 g. Posteriormente se extrajo toda su parte visceral, las cuales fueron limpiadas completamente, seguido fueron almacenadas en refrigeración a -4°C para ser transportadas al laboratorio de bioquímica de la universidad de Nariño. En el laboratorio todas las vísceras recolectadas fueron licuadas hasta garantizar la homogeneidad de la muestra, para luego ser almacenadas a -4°C , a partir de esta matriz se realizaron todos los ensayos de esta investigación.

Figura 6. Ubicación del punto de muestreo en el corregimiento de El encano.



Fuente: Google maps.

4.2 NORMALIZACIÓN DEL PROCESO DE SEPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES LINOLÉNICO (OMEGA-3) Y LINOLÉICO (OMEGA-6).

Para separar los ácidos grasos presentes en la muestra se empleó cromatografía de gases en un cromatografo Shimadzu GC- 17A con detector FID (CG-FID) y columna capilar DB-5 J&W (30m x 0.25mm ID 0.25µm), bajo las condiciones estandarizadas por Arturo y colaboradores⁴⁹ las cuales son:

- Temperatura del detector FID 280 °C
- Temperatura del Inyector Split 20:1 250 °C
- Flujo de gas de arrastre: Helio 1mL/min
- Programación de temperatura: 40°C a 130°C (15 °C/min) a 240 (30 °C/min).
- Presión del gas: 80kpa

En la normalización del método se emplearon estándares de metil esteres de ácidos grasos alltech de concentración 70 ppm, cinco inyecciones diarias de 1 µL durante tres días, de esta manera se calculó la reproducibilidad del método, mediante un análisis de varianza en los tiempos de retención y área de las señales obtenidas.

4.3 DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

Se empleó la derivatización catalizada por ácidos descrita por Christie⁵⁰. Se tomó 200 µl del material lipídico extraído en cada muestra, a este se adiciono 5 mL de agente derivatizante (solución al 5% v/v de HCl en metanol) y 1g de sulfato de sodio anhidro. Se dejó en baño de agua a 50°C durante 12 horas. La fase orgánica formada donde estaban los ésteres metílicos se separó de la fase acuosa, el exceso de ácido en la fase orgánica se eliminó con una solución bicarbonato de potasio al 5% w/v.

4.4 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE RESPUESTA DEL ESTÁNDAR INTERNO.

⁴⁹ ARTURO D, DELGADO O, DIAZ W. Identificación de grasas y aceites en el agua potable del municipio de Pasto por cromatografía de gases y cromatografía de gases/espectometria de masas. San Juan de Pasto, trabajo de grado (Quimico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Química.

⁵⁰ CHRISTIE. Op. cit., p. 80.

El factor de respuesta relativo se determinó por triplicado inyectando al cromatografo de gases 1µL de patrones de concentración 6ppm para el Linoleato de metilo y el Linolenato de metilo, mientras que para el undecanoato de metilo se utilizó una concentración de 12,5ppm, se empleó las condiciones cromatograficas descritas en la sección 4.2, el factor de respuesta del estándar interno con respecto a los demás estándares se calculó empleando la ecuación 1.

$$Fr = \frac{A_{is} \times C_{sc}}{C_{is} \times A_{sc}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Dónde, Fr es el factor de respuesta, A_{is} es el área del estándar interno, C_{is} es la concentración del estándar interno, A_{sc} representa el área compuesto de interés y C_{sc} es la concentración del compuesto de interés.

4.5 IDENTIFICACION Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

A cada muestra derivatizada se adiciono 20 µl de undecanoato de metilo (estándar interno) de concentración 40 ppm, a partir de la solución resultante se tomó 1 µL para ser inyectada en el cromatografo de gases. Los compuestos de la muestra problema se identificaron por comparación de los tiempos de retención con estándares, mientras que para la cuantificación se empleó las áreas obtenidas en cada muestra para ser remplazadas en la ecuación 1.

4.6 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.

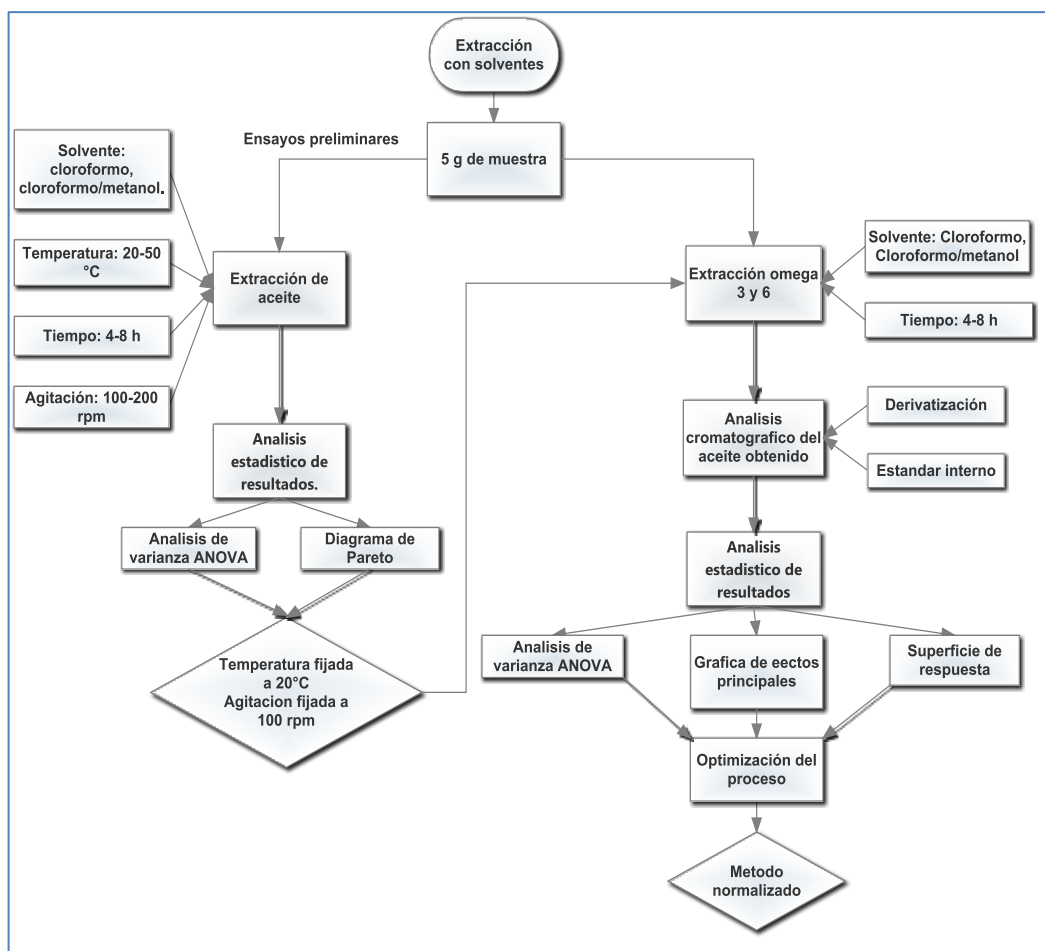
4.6.1 Determinación de factores que afectan la extracción del aceite. Se utilizó 5 g de muestra homogénea de vísceras, la cual fue depositada en un erlenmeyer de 25 ml y se agregaron 15 mL de solvente, este sistema se llevó a una plancha de agitación y calentamiento.

Para determinar qué factores afectan la extracción del aceite se realizó un diseño experimental factorial de cribado del tipo media de fracción 2^{4-1} con 4 puntos centrales aleatorios y una réplica. Se definió como variable respuesta la cantidad de aceite obtenido en miligramos. Como factores experimentales se tuvo en cuenta la temperatura en un rango de 20 a 50 °C, el tiempo de extracción variando entre 4 a 8 horas y la agitación en un rango de 100 a 200 rpm. El tipo de solvente utilizado se tomó como factor experimental categórico en dos niveles: cloroformo y cloroformo/metanol mezclados en una proporción 1:1. Bajo estas condiciones se obtuvo un diseño experimental con 24 ejecuciones.

4.6.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción para los ácidos grasos α -linolénico y linoléico. Una vez establecidos los factores que afectan la extracción del aceite con solventes, se llevó 5 g de muestra a un erlenmeyer, en donde se agregó 15 mL de solvente para luego ser llevado a la plancha de agitación a una temperatura de 20°C y una agitación de 100 rpm.

Para determinar las mejores condiciones de extracción se realizó un diseño experimental factorial 2^2 , con dos puntos centrales aleatorios y una réplica. Se definió como variable respuesta la cantidad en miligramos extraída de ácidos grasos α -linolénico y linoléico, utilizando 2 factores experimentales: el tiempo de extracción en un rango de 4 a 8 horas y el tipo de solvente en dos niveles: cloroformo y cloroformo/metanol 1:1, obteniendo un experimento con 12 ejecuciones. El aceite extraído bajo estas condiciones en cada ejecución se analizó mediante cromatografía de gases, para cuantificar los ácidos grasos α -linolénico y linoléico presentes.

Figura 7. Flujograma normalización del proceso de extracción con solventes.



Fuente: Esta investigación.

4.7 EXTRACCIÓN MECÁNICA.

Para realizar este método de extracción fue necesario fabricar un sistema de presión, el cual consistía de un cilindro embolo de 1 cm², accionado por una prensa hidráulica de capacidad 2 Tn-f.

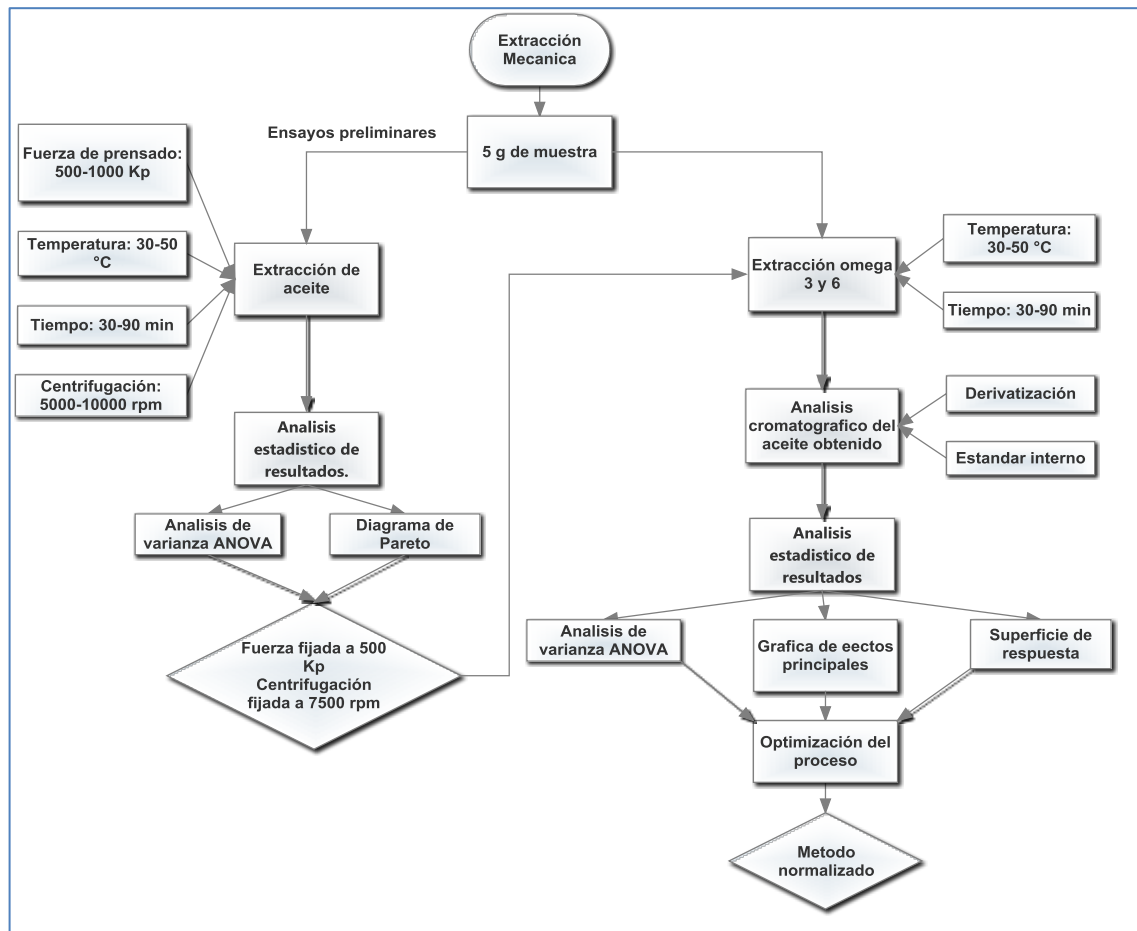
4.7.1 Determinación de factores que afectan la extracción de aceite. Se utilizaron 5 g de muestra la cual se depositó en un beaker de 25 ml en donde se agregó 10 ml de agua. Este se llevó a calentamiento en baño maría y posteriormente se prensó. Por último la muestra se centrifugo para separar el material lipídico obtenido.

Para establecer qué factores intervienen en esta extracción, se realizó un diseño experimental de fracción irregular $2^{4*3/4}$ con 2 puntos centrales aleatorios y una réplica. Se definió como variable de respuesta la cantidad de aceite obtenido en miligramos, utilizando como factores experimentales la temperatura en un rango de 30 a 50 °C, el tiempo de extracción entre 30 y 90 minutos, la fuerza de presión en un rango de 500 a 1000 Kilopondios y la centrifugación variando entre 5000 y 10000 rpm. Bajo estas condiciones se realizaron 28 ensayos experimentales.

4.7.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción para los ácidos grasos α -Linolénico y linoléico. Ya determinado los factores que afectan la extracción mecánica, se tomó 5 g de muestra la cual se depositó en un beaker de 25 ml en donde se agregó 10 ml de agua, el beaker se llevó a calentamiento en baño María y posteriormente se preno a 500 Kp, por último la muestra se centrifugo a 7500 rpm.

Se realizó un diseño experimental factorial 3^2 , con un punto central aleatorio y una réplica. Se definió como variable respuestas la cantidad extraída de ácidos grasos α -linolénico y linoléico cada uno en mg, se utilizaron 2 factores experimentales continuos: el tiempo de extracción entre 30 a 90 minutos y la temperatura en un rango de 30 a 50 °C, bajo estas condiciones se realizaron 14 ejecuciones, el aceite extraído en cada ensayo se analizó por cromatografía de gases para identificar los compuestos de interés y cuantificarlos.

Figura 8. Flujoograma del proceso de normalización de la extracción mecánica de ácidos grasos.



Fuente: Esta investigación.

4.8 EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.

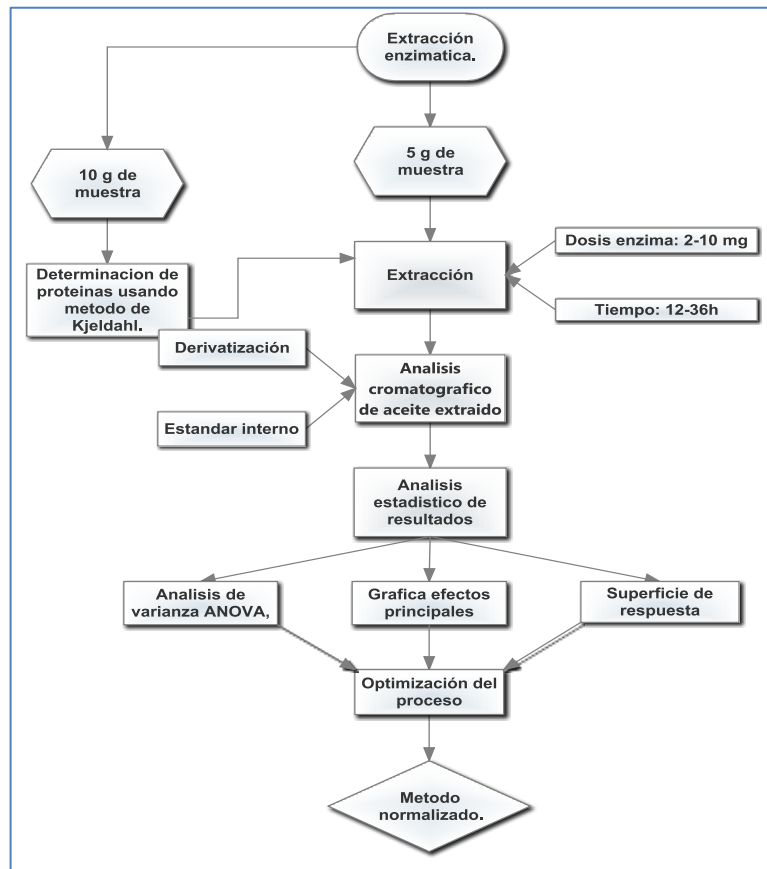
4.8.1 Cuantificación de proteína en vísceras. Se determinó la cantidad nitrógeno(N) contenido en la muestra mediante el método Kjeldhal. Se utilizaron 10 g de muestra húmeda, a la cual se realizó el proceso de digestión adicionando 10 mL de reactivo digestor (K_2SO_4 13,4%,p/v $CuSO_4$ 0,73% p/v, H_2SO_4 13,4% V/V). La destilación se realizó agregando NaOH al 40% en exceso y el NH_3 liberado se recogió sobre 50 mL de H_3BO_3 al 4% p/v, posteriormente se tituló con H_2SO_4 0.3N.⁵¹

⁵¹ AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th Edition. 3rd Revisión. 1997 METODO AOAC 954.01 (coeficiente 6.25) Método kjeldhal.

4.8.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción. Para normalizar las condiciones experimentales de esta metodología se usó Fungal proteasa FP 15, donde el fabricante reporta que la enzima es altamente específica para sustratos como pescado, también menciona que su máxima actividad es a pH 5 a 30°C pero recomienda hacer ensayos para determinar tiempos y cantidad de enzima óptimos. Se usó 5 g de muestra la cual fue depositada en un beaker de 25 ml en donde se adiciono 10 mL de agua destilada y la enzima Fungal proteasa, seguido a esto se llevó el beaker a baño María a 30°C fijando el pH a 5 con buffer de fosfato, al finalizar el tiempo de reacción la muestra se centrifugo a 7500 rpm.

Se realizó un diseño experimental factorial de tres niveles 3^2 con una réplica, se definió como variable respuesta la cantidad obtenida de aceite y de ácidos grasos α -linolénico y linoléico todas ellas en mg, mientras que se utilizó como factores experimentales, el tiempo de extracción en un rango de 12 a 36 horas y la dosis de enzima entre 2 y 10 mg. Se obtuvo de acuerdo al diseño 18 ejecuciones, el aceite obtenido en cada ensayo se cuantifico y analizo por cromatografía de gases. La figura 9 muestra el diagrama de flujo para normalizar esta técnica.

Figura 9. Flujograma normalización de la extracción enzimática de ácidos grasos.



Fuente: Esta investigación.

4.9 COMPARACIÓN DE MÉTODOS.

Determinadas las mejores condiciones de extracción para los ácidos α -linolénico y linoléico, se realizaron extracciones por triplicado de cada uno de los métodos de extracción para determinar su reproducibilidad mediante análisis de los coeficientes de variación. Se hizo una comparación de los tres métodos teniendo como base el rendimiento mediante un análisis de dispersión.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 NORMALIZACIÓN DEL PROCESO DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

5.1.1 Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención y área de los picos cromatográficos. Bajo las condiciones reportadas para el análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases, se evaluó la separación y detección de estos analitos determinando los coeficientes de variación para los tiempos de retención y área en estándares. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en los tiempos de retención.

Tabla 1. Análisis de la reproducibilidad en los tiempos de retención.

compuesto	Tiempo de retención promedio por día (min)			Desviación estándar (σ)	Coeficiente de variación (CV%)
	1	2	3		
Undecanoato de metilo	10,1796	10,2162	10,1878	0,0233	0,2288
Palmitato de metilo	13,3890	13,4474	13,4006	0,0343	0,2559
Palmitoleato de metilo	13,5508	13,6106	13,5708	0,0349	0,2574
Oleato de metilo	15,5772	15,6590	15,5956	0,0471	0,3017
Linoleato de metilo	16,1540	16,2286	16,1724	0,0468	0,2897

Fuente: Esta investigación.

En la tabla se observa que los coeficientes de variación para cada uno de los compuestos no excede el 2%, valor máximo establecido por las normas GLP (Good Laboratory Practice)⁵², para los tiempos de retención, por lo tanto las condiciones cromatográficas empleadas en la investigación presentan una alta reproducibilidad para este factor experimental.

La tabla 2 muestra los coeficientes de variación obtenidos experimentalmente para las áreas de cada uno de los estándares estudiados.

⁵² GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP), Quality practices for regulated non-clinical research and development. 2009. P:102

Tabla 2. Análisis de la reproducibilidad en las áreas.

Compuesto	Área promedio por día (uv ²)			Desviación estándar (σ)	Coeficiente de variación (CV%)
	1	2	3		
Undecanoato de metilo	933930	940308	926161	13052,9	1,4
Palmitato de metilo	1469400	1493900	1473820	16079,4	1,1
Palmitoleato de metilo	246406	254723	230515	10673,1	4,3
Oleato de metilo	1220520	1229560	1243490	21940,3	1,8
Linoleato de metilo	627414	652545	630799	23247,3	3,6

Fuente: Esta investigación.

Según las normas GLP, los coeficientes de variación para las áreas de los picos en cromatogramas no deben superar el 10%. En la tabla 2 se observa que los CV para las áreas no superan este valor, lo que indica una buena reproducibilidad en los análisis cromatográficos bajo las condiciones experimentales trabajadas.

5.1.2 Determinación del factor de respuesta. La tabla 3 muestra la desviación estándar y los coeficientes de variación obtenidos para el cálculo del factor de respuesta para el metil undecanoato con respecto a los componentes metil linoleato y metil linolenato.

Tabla 3. Calculo de factores de respuesta.

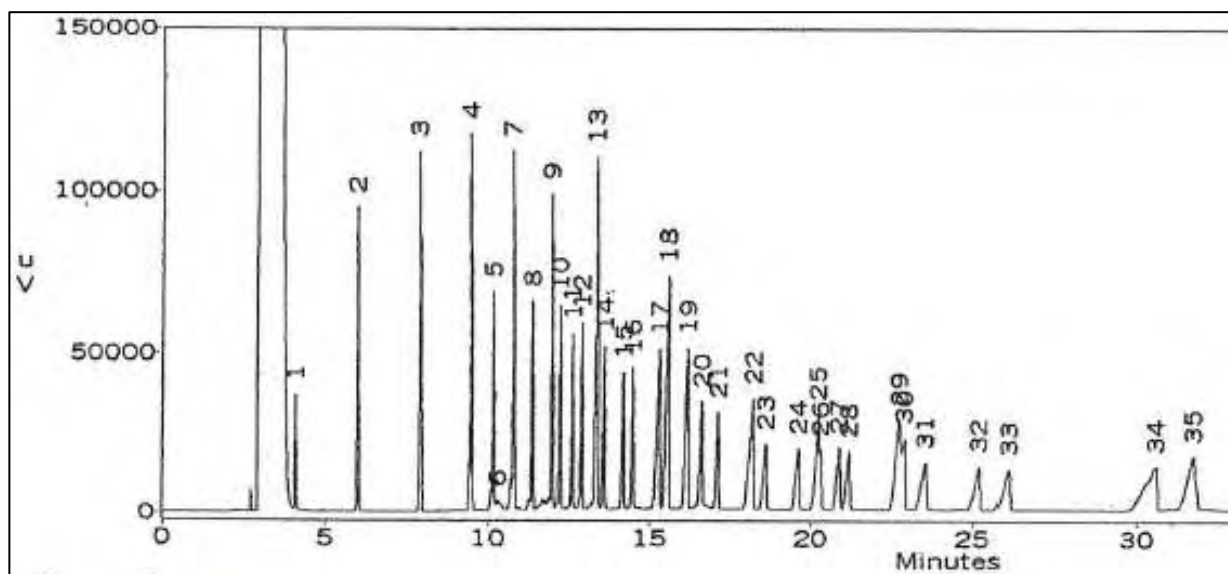
Compuesto	Concentración ppm	Área Promedio	Desviación estándar	Coeficiente de variación	Factor de respuesta
Linoleato de metilo	6,0	522	28,355	4,210	1,145
Linolenato de metilo	6,0	389	26,587	6,870	1,518
undecanoato de metilo	12,5	1241	102,604	8,650	

Fuente: esta investigación.

De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencio coeficientes de variación por debajo del 10% razón por la cual los factores de respuesta son válidos para la cuantificación de ácido linoléico y ácido linolénico presentes en cada una de las muestras a analizar.

5.1.3 Identificación de ácidos grasos presentes en la muestra problema. Ya normalizadas las condiciones de separación y cuantificación de ácidos grasos, se inyecta en el cromatógrafo un estándar el cual contiene todos los ácidos grasos identificables por cromatografía de gases (figura 10), a partir de este se determinó los ácidos grasos presentes en la muestra, comparando los tiempos de retención.

Figura 10. Cromatograma de estándares de ácidos grasos.



Fuente: esta investigación.

El tiempo de retención obtenido para el ácido linoléico fue de 16,199 minutos (pico 19) mientras que para el ácido α -Linoléico (pico 21) se obtuvo un tiempo de retención de 17,001 minutos

5.2 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES.

5.2.1 Determinación de factores que afectan la extracción de aceite. Para normalizar el método de extracción de ácidos grasos con la metodología de solventes para los homogenizados de las vísceras de la trucha arcoíris, fue necesario realizar un diseño experimental de cribado para establecer que factores experimentales afectan esta extracción y descartar variables que no influyen en los resultados, se emplearon los tiempos de extracción reportados por Adeniy⁵³, los cuales varían entre 2 a 7 horas, se optó por variar la temperatura ya que este mismo autor reporta un aumento en la cantidad de ácidos grasos extraídos conforme se incrementa esta variable. Se empleó los solventes reportados por Bligh,⁵⁴ los cuales permiten obtener mejores resultados. Por último se introdujo la

⁵³ ADENIYI, Op. cit., p. 40

⁵⁴ BLIGH, E, Op. cit., p. 912

agitación durante la extracción como posible factor experimental ya que no existen reportes de cómo puede afectar el experimento. La tabla 4 muestra los resultados obtenidos en la extracción de aceite por cada 5 g de homogenizado de víscera.

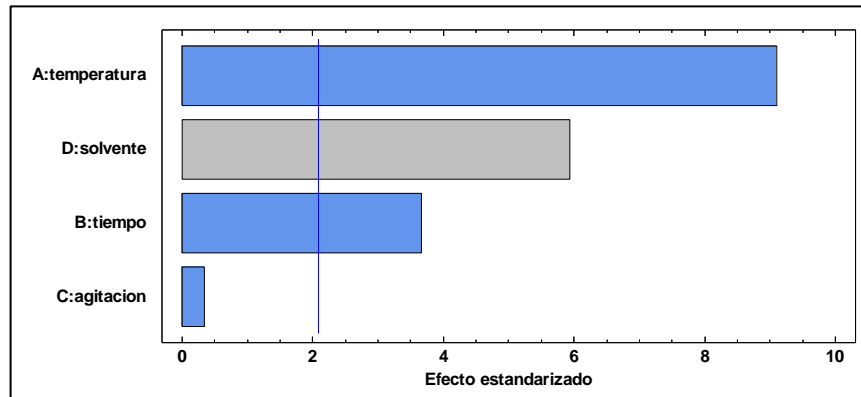
Tabla 4. Cantidad de aceite extraído con solventes en cada ensayo.

Ensayo	Temperatura °C	Tiempo h	Agitación rpm	Solvente	aceite mg
1	35,0	6,0	150,0	cloroformo	60
2	20,0	4,0	200,0	cloroformo/metanol	704
3	20,0	4,0	100,0	cloroformo	479
4	35,0	6,0	150,0	cloroformo	65
5	50,0	8,0	100,0	cloroformo	20
6	50,0	8,0	200,0	cloroformo/metanol	140
7	50,0	4,0	200,0	cloroformo	32
8	50,0	4,0	100,0	cloroformo/metanol	194
9	20,0	8,0	100,0	cloroformo/metanol	450
10	35,0	6,0	150,0	cloroformo/metanol	284
11	20,0	8,0	200,0	cloroformo	230
12	35,0	6,0	150,0	cloroformo/metanol	296
13	35,0	6,0	150,0	cloroformo	51
14	20,0	4,0	200,0	cloroformo/metanol	716
15	20,0	4,0	100,0	cloroformo	482
16	35,0	6,0	150,0	cloroformo	57
17	50,0	8,0	100,0	cloroformo	28
18	50,0	8,0	200,0	cloroformo/metanol	131
19	50,0	4,0	200,0	cloroformo	25
20	50,0	4,0	100,0	cloroformo/metanol	204
21	20,0	8,0	100,0	cloroformo/metanol	438
22	35,0	6,0	150,0	cloroformo/metanol	300
23	20,0	8,0	200,0	cloroformo	224
24	35,0	6,0	150,0	cloroformo/metanol	284

Fuente: Esta investigación.

A partir de los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza ANOVA (anexo A1), el coeficiente de determinación R^2 obtenido fue de 87,39%, lo que garantiza la validez del experimento, se comprobó la significancia estadística de cada factor experimental y empleando el Diagrama de Pareto (figura 11) se determinó que la temperatura, el tiempo de extracción y el tipo de solvente tienen influencia significativa en el experimento, mientras que la agitación tiene un aporte mínimo. Si bien, a partir de este análisis se determina que la agitación no es un factor significativo en el rango empleado, debe estar presente en el experimento ya que esta variable garantiza el constante contacto entre el solvente y la muestra, por esta razón se fijó su valor en 100 rpm.

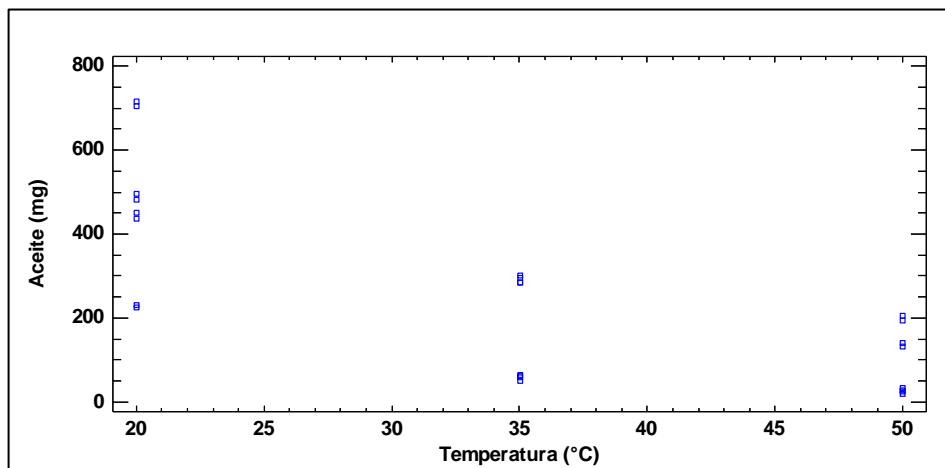
Figura 11. Diagrama de Pareto para la extracción de aceite con solventes.



Fuente: Esta investigación.

Mediante el Análisis de Dispersión de aceite en función de la temperatura (Figura 12) se comprueba que a 20°C se obtienen los mejores resultados, además se observa como la cantidad de aceite obtenido disminuye al aumentar la temperatura, debido a estas observaciones se fijó la temperatura a 20°C para futuros ensayos. Posiblemente, la razón por la cual se obtiene menos cantidad de aceite al aumentar la temperatura, se deba a que los solventes empleados son volátiles y por lo tanto pueden escapar del medio de reacción disminuyendo su concentración, por lo que habría menos interacciones entre la muestra y el solvente lo que se ve reflejado en la disminución de la cantidad de aceite obtenido.

Figura 12. Grafico dispersión aceite en función de la temperatura



Fuente: Esta investigación.

5.2.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción para los ácidos grasos α -Linolénico y linoléico. Una vez determinado los factores experimentales relevantes y fijado las variable de agitación y temperatura, con el diseño experimental planteado, se determinaron las mejores condiciones de extracción de los ácidos α -linolénico y linoléico, variando el tipo de solvente y el tiempo de reacción. La tabla 5 muestra la cantidad de aceite obtenido por cada 5 g de muestra en cada ensayo.

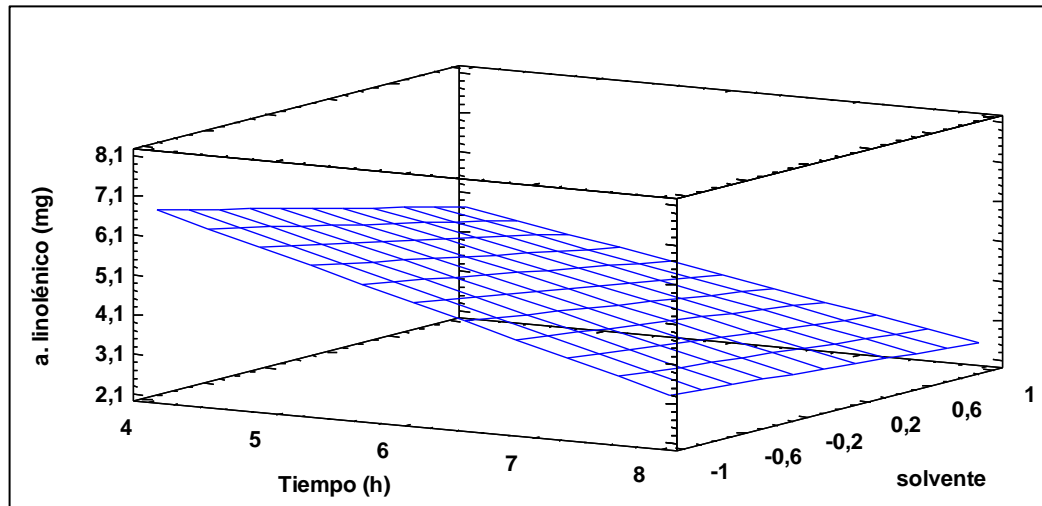
Tabla 5. Cuantificación de los ácidos α -linolénico y linoléico extraídos por solventes

Experimento	tiempo h	solvente	α-linolénico mg	linoléico mg
1	8,0	cloroformo/metanol	2,9	40,47
2	6,0	cloroformo/metanol	4	62
3	4,0	cloroformo/metanol	5	91,14
4	8,0	cloroformo	3,7	68,8
5	4,0	cloroformo	7,34	148,4
6	6,0	cloroformo	4	98
7	8,0	cloroformo/metanol	2,1	43
8	6,0	cloroformo/metanol	3,7	69
9	4,0	cloroformo/metanol	4,47	97,2
10	8,0	cloroformo	3,4	60,4
11	4,0	cloroformo	6,7	156
12	6,0	cloroformo	4,7	90

Fuente: Esta investigación.

Para el estudio de resultados, se realizó un análisis de varianza a partir de los resultados obtenidos en la extracción del ácido α -linolénico (anexo A2). Se obtuvo un coeficiente de determinación R^2 de 87,3478% para este diseño experimental, siendo un valor aceptable garantizando la confiabilidad del método. Los valores-P calculados muestran que el tiempo de extracción y el tipo de solvente son estadísticamente significativos para el experimento. La figura 13 muestra la superficie de respuesta obtenida en esta extracción, el solvente cloroformo se representa como -1 mientras que la mezcla de solventes cloroformo/metanol se representa como 1.

Figura 13. Superficie de respuesta en la extracción de ácido α -linolénico.



Fuente: Esta investigación.

En esta gráfica se observa como las mayores cantidades de ácido graso α -linolénico se obtienen con un tiempo de extracción de 4 horas para ambos solventes, también se observa como el rendimiento disminuye a medida que aumenta el tiempo de extracción.

La ecuación matemática del modelo para la obtención de ácido α -linolénico (ω -3) incluyendo los parámetros determinados como significativos, que permite predecir la cantidad de este compuesto a extraer al establecer condiciones experimentales es:

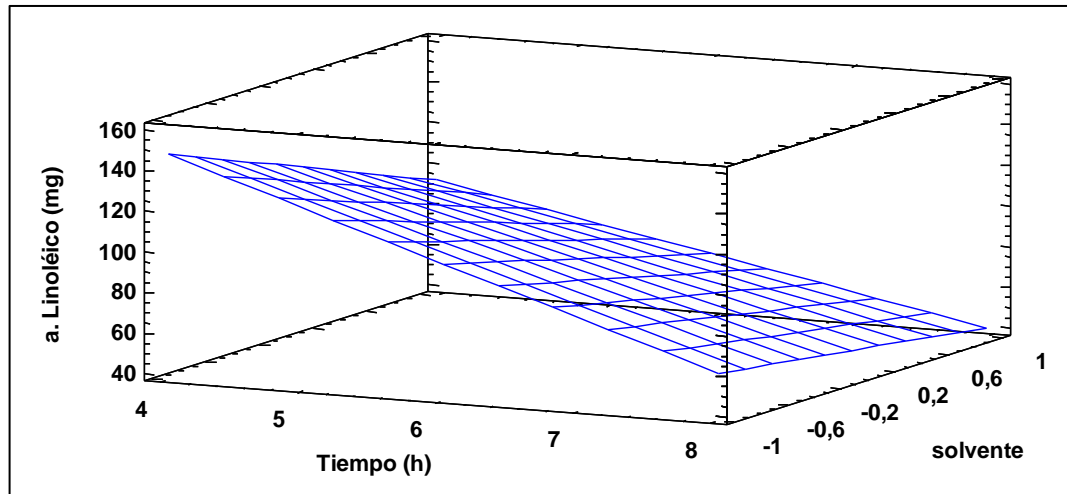
$$Y = 8,6 - 0,7xA - 1,6xB + 0,1xAxB \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde Y equivale a la cantidad de ácido graso α -linolénico, A corresponde a la temperatura y B corresponde al solvente. Las variables se encuentran especificados en sus unidades originales, la ecuación permite predecir resultados a obtener cuando se especifican tiempos de reacción y solvente a emplear, disminuyendo de esta manera la cantidad de ensayos a realizar en futuras experimentaciones.

En el análisis de varianza para el ácido graso linoléico (anexo A3) se obtuvo un valor de R^2 de 95,52%. En comparación con los anteriores resultados este estadístico tubo un valor alto debido a que el ácido graso linoléico se encuentra en mayor cantidad en la muestra, además este experimento tiene menos factores experimentales lo cual disminuye la variabilidad en la respuesta. En este diseño experimental, el tiempo de extracción y el tipo de solvente tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativos para el experimento en un nivel de confianza del 95,0%.

En la Superficie de respuesta mostrada en la figura 14 se observa que las mayores cantidades de ácido linoléico se obtienen con un tiempo de extracción de 4 horas para ambos solventes. También se observa como el rendimiento disminuye a medida que aumenta el tiempo de extracción. Por tanto se concluye que los mejores resultados se obtienen empleando cloroformo como solvente con un tiempo de extracción de 4 horas.

Figura 14. Superficie de respuesta extracción ácido linoléico.



Fuente: Esta investigación.

Se determinó la ecuación del modelo experimental para la obtención de ácido linoléico (omega-6) incluyendo los parámetros determinados como significativos, todo basado en los análisis anteriores, la ecuación obtenida fue:

$$Z = 190 - 17,5xA - 44,6xB + 4,4xAxB \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde Z equivale a la cantidad de ácido graso linoléico obtenido, A corresponde a la temperatura y B corresponde al solvente, las variables se encuentran especificados en sus unidades originales.

Empleando el software estadístico Statgraphics, se optimizo los resultados obtenidos fijando como meta maximizar la cantidad de ácido α -linolénico y ácido linoléico obtenido, la tabla 6 muestra los resultados predichos por el software

Tabla 6. Optimización proceso de extracción con solventes.

Variable	Valor óptimo
Tiempo	4 h
solvente	Cloroformo
a. α -linolénico	6,7 mg
a. Linoléico	147,4 mg

Fuente: Esta investigación.

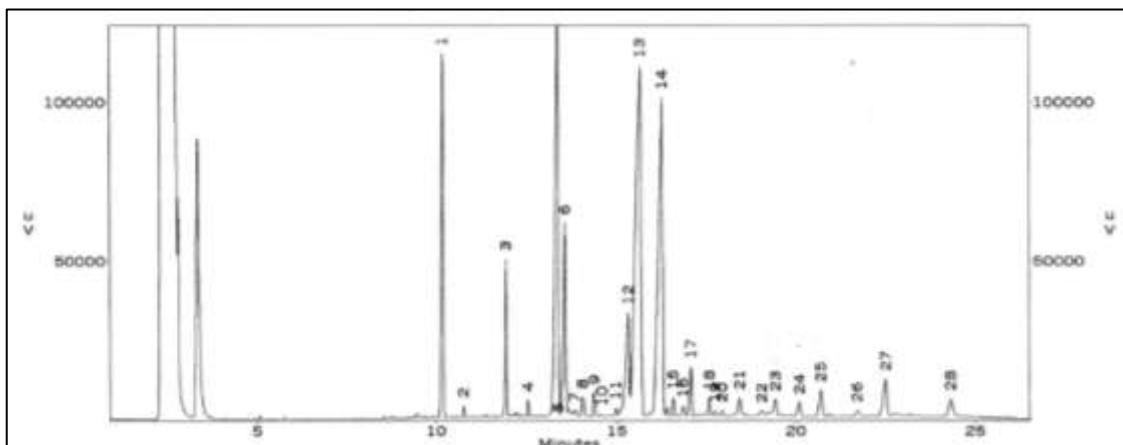
Los mejores tiempos de extracción tanto para el ácido linoléico como para el ácido α -linolénico fueron de 4 horas. Posterior a este tiempo la cantidad extraída de estos compuestos se mantuvo constante y en algunos casos disminuyó. Este efecto se puede atribuirse a la volatilidad de los solventes empleados ya que al dejarlos más tiempo expuestos a estas temperaturas, estos disminuirán su concentración porque escapan del medio de reacción. Este efecto es más notorio a partir de las 4 horas, porque antes de este tiempo no se aprecia una considerable disminución en los solventes. Adeniyi⁵⁵ obtuvo un efecto similar en la extracción de ácidos grasos a partir de Caballa, ya que el porcentaje óptimo de lípidos extraídos fue constante después de 6 horas, para posteriormente decaer. El autor atribuye este efecto a un aumento relativo de la viscosidad del solvente utilizado con el transcurso del tiempo, lo que provoca menos interacciones solvente-muestra disminuyendo los lípidos extraídos.

Por otro lado, en la extracción de los dos ácidos grasos de interés se obtuvieron mejores resultados empleando cloroformo como solvente, ya que este es apolar y según Bernardini los triglicéridos, forma en que se encuentran nuestros analitos, son solubles en solventes apolares⁵⁶. Sin embargo se observa que la mayor cantidad de aceite (716 mg) se obtuvo empleando la mezcla de cloroformo/metanol como solvente (tabla 4). Esto se debe a que el metanol es un compuesto polar que permite separar lípidos polares y otros componentes que no son de interés para la investigación, evidenciándose en el cromatograma de la figura 15.

⁵⁵ ADENIYI, Op. cit., p. 38-40

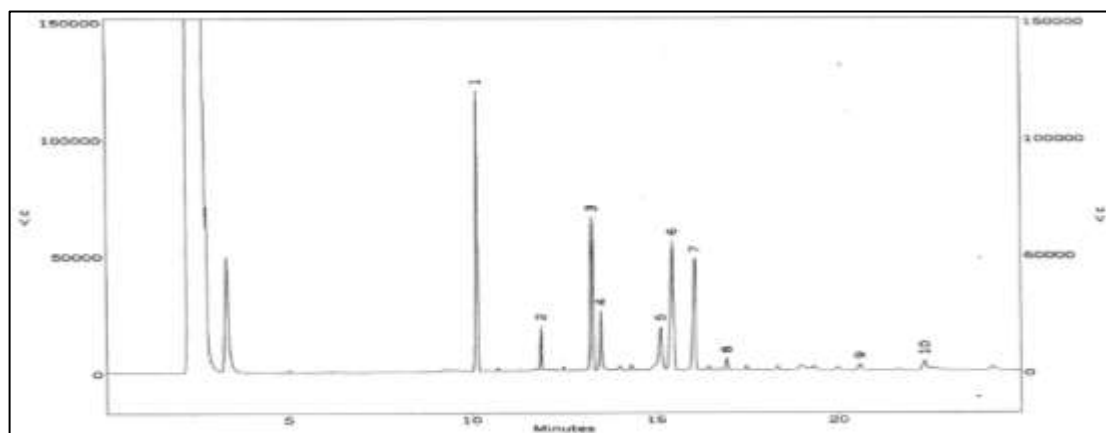
⁵⁶ BERNARDINI E., Tecnología de aceites y grasas, Alhambra (1981), ISBN 8420508187, p: 232.

Figura 15. Cromatograma extracción con solventes empleando cloroformo/metanol.



Fuente: Esta investigación.

Figura 16. Cromatograma extracción con solventes empleando cloroformo.



Fuente: Esta investigación.

Del cromatograma mostrado en la figura 16 el cual fue obtenido bajo las mejores condiciones de extracción se identificó los ácidos grasos mirístico (pico 2), palmítico (pico 3), palmitoleico (pico 4), esteárico (pico 5) y por último los compuestos de interés linoléico y α -Linoléico en las (picos 7 y 8) respectivamente, el pico 1 corresponde al estándar interno metil undecanoato.

Kotzamanis⁵⁷, en cabezas de trucha encontró 12,59% de aceite y para el esqueleto de esta misma especie hallaron 11,1% de aceite. En el presente estudio se obtuvo un 9,8 % de lípidos totales. En el trabajo referenciado el autor empleo solventes apolares y polares que extraen la totalidad de lípidos presentes en la muestra, mientras que bajo las condiciones del presente estudio únicamente se utilizó cloroformo que extrajo únicamente lípidos apolares, sin embargo se evidencia buena recuperación de lípidos.

García y colaboradores⁵⁸ determinaron la composición química del filete fresco de truchas arcoíris, mediante extracción con solventes, dichos autores encontraron valores de 2,57 % de grasa, en comparación con nuestro estudio existe una diferencia bastante significativa, que se debe a que en el estudio citado se analizaron filetes, los cuales tienden a ser más magros que las vísceras del animal.

5.3 EXTRACCIÓN MECÁNICA.

5.3.1 Determinación de factores que afectan la extracción de aceite. Con el diseño experimental planteado, en donde se involucran los factores como tiempo, temperatura y prensado, la FAO⁵⁹ reporta buenos resultados en la obtención de aceite de pescado. Chantachum⁶⁰ reporta tiempos óptimos de extracción de 30 min para metodologías similares a las tratadas por la FAO, sin embargo es necesario evaluar este factor en un rango más amplio para determinar sus efectos en el experimento. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos en esta metodología.

⁵⁷ KOTZAMANIS YP, ALEXIS MN, ANDRIOPOULOU A, Fotis G. Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata* L.) diets. Aquac Res. 32, 2001.p:288-295.

⁵⁸ GARCÍA JA, NÚÑEZ FA, CHACÓN O, ALFARO RH, ESPINOSA MR.. Calidad de canal y carne de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, producida en el noroeste del Estado de Chihuahua. Hidrobiológica. 2004. P:19-26

⁵⁹ FAO, F. I. D. (1986), Op. cit., p. 63

⁶⁰ CHANTACHUM, S., Op. cit., p. 292

Tabla 7. Cantidad aceite obtenido por extracción mecánica.

ensayo	temperatura °C	tiempo min	prensado Kp	centrifugación rpm	aceite mg
1	30,0	30,0	500,0	5000,0	92
2	30,0	30,0	1000,0	5000,0	90
3	30,0	90,0	1000,0	5000,0	144
4	30,0	30,0	1000,0	10000,0	112
5	50,0	30,0	500,0	10000,0	280
6	50,0	90,0	1000,0	10000,0	402
7	30,0	90,0	500,0	10000,0	180
8	30,0	90,0	500,0	5000,0	142
9	40,0	60,0	750,0	7500,0	325
10	40,0	60,0	750,0	7500,0	321
11	50,0	90,0	500,0	5000,0	350
12	30,0	30,0	500,0	10000,0	110
13	30,0	90,0	1000,0	10000,0	182
14	50,0	30,0	1000,0	5000,0	205
15	30,0	30,0	500,0	5000,0	95
16	30,0	30,0	1000,0	5000,0	88
17	30,0	90,0	1000,0	5000,0	140
18	30,0	30,0	1000,0	10000,0	109
19	50,0	30,0	500,0	10000,0	274
20	50,0	90,0	1000,0	10000,0	398
21	30,0	90,0	500,0	10000,0	185
22	30,0	90,0	500,0	5000,0	137
23	40,0	60,0	750,0	7500,0	330
24	40,0	60,0	750,0	7500,0	326
25	50,0	90,0	500,0	5000,0	356
26	30,0	30,0	500,0	10000,0	108
27	30,0	90,0	1000,0	10000,0	178
28	50,0	30,0	1000,0	5000,0	200

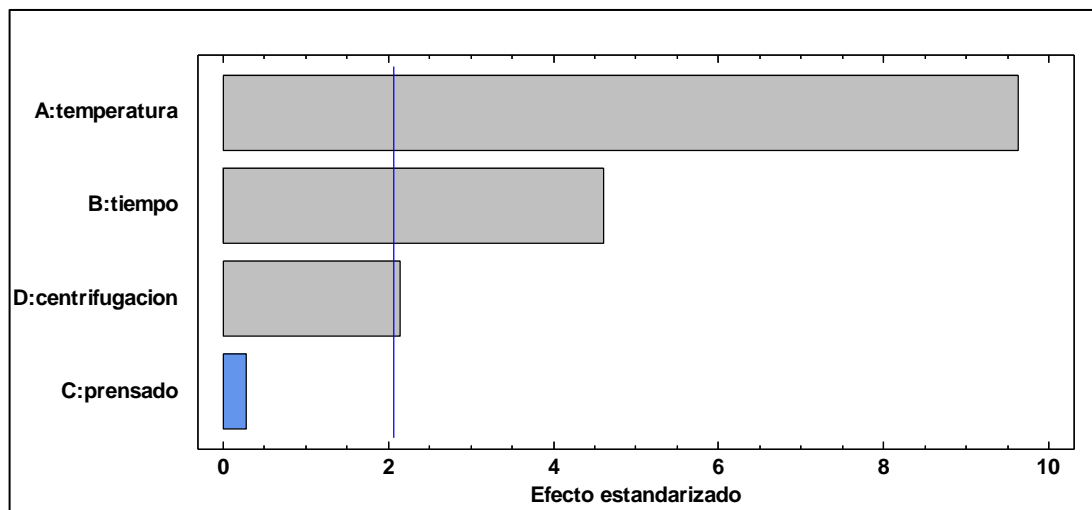
Fuente: Esta investigación.

Se realizó un análisis de varianza empleando los resultados obtenidos, con el fin de determinar qué factores aportan significativamente al experimento (anexo A4). El valor de R^2 obtenido fue 83,77%, lo cual es un valor alto teniendo en cuenta las múltiples variables experimentales empleadas y el número de corridas que se realizaron. El estadístico valor-P, determinó que la temperatura, el tiempo de extracción y la centrifugación tienen influencia significativa en el experimento

El diagrama de Pareto (Figura 17) muestra que los factores más importantes que intervienen en el experimento son la temperatura y el tiempo de extracción, ya que influyen considerablemente en la cantidad de aceite obtenido. Si bien es cierto que la centrifugación obtuvo un valor-p que indica que tiene significancia en el experimento, a partir del gráfico nos damos cuenta que su aporte es mínimo, por lo tanto se fijó esta variable a 7500 rpm. Por otro lado, el prensado no muestra un aporte importante en el experimento pero eso no quiere decir que se pueda descartar esta variable, ya que hace parte fundamental al momento de la

extracción del material lipídico de la muestra, su bajo aporte según el estadístico valor-p y según la gráfica se puede entender que es irrelevante la fuerza que se ejerza al momento de realizar la extracción siempre y cuando esta se encuentra dentro de un rango entre 500 a 1000 Kp, razón por la cual esta variable se fijó a 750Kp que corresponde al punto central del rango anterior.

Figura 17. Diagrama de pareto la extraccion mecanica de aceite.



Fuente: Esta investigación.

En la tabla 7 se observa que los mejores resultados de extracción de aceite se obtienen a 50 °C, sin embargo se evidencian buenos resultados a 40 °C. Además debido a la volatilidad de los analitos y teniendo en cuenta que a mayores temperaturas se pueden obtener otro tipo de componentes que provoca un aumento en la cantidad de aceite obtenido, se optó por estudiar esta variable y analizar qué efectos tiene en la extracción de los ácidos grasos linoléico y α -linolénico. Por otro lado, se observa un efecto similar con el tiempo de extracción en donde los mejores resultados se evidencian a 90 minutos de extracción. Sin embargo no se puede garantizar la calidad de este aceite, como tampoco se puede probar que haya una buena presencia de los ácidos grasos de interés para la investigación, por esta razón esta variable también fue objeto de estudio en la extracción del ácido graso linoléico y del ácido graso linolénico.

Gracias a este diseño experimental se logró fijar la fuerza de prensado a 750 Kp y la centrifugación a 7500 rpm, lo que permitió realizar un diseño experimental con menos ensayos para determinar las mejores condiciones de extracción de ácidos grasos α -linolénico y linoléico

5.3.2 Determinación de las mejores condiciones de extracción para los ácidos grasos α -linolénico y linoléico. Con el diseño experimental factorial planteado, variando el tiempo y temperatura de reacción se obtuvo los resultados que se muestran en la tabla 8 por cada 5 g de muestra.

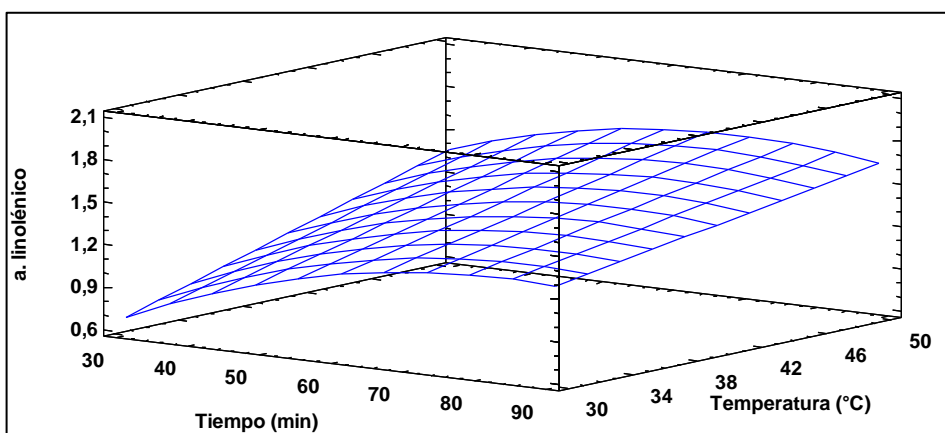
Tabla 8. Resultados extracción mecánica de ácidos α -linolénico y linoléico

<i>ejecución</i>	<i>tiempo min</i>	<i>temperatura °C</i>	<i>α-linolénico mg</i>	<i>linoléico mg</i>
1	60,0	50,0	1,825	75,92
2	30,0	50,0	1,4	56
3	30,0	30,0	0,7	22,4
4	90,0	30,0	1,26	37,8
5	60,0	30,0	0,98	30,1
6	90,0	50,0	1,62	62,3
7	60,0	40,0	1,7	67,3
8	60,0	50,0	1,72	73,02
9	30,0	50,0	1,2	53
10	30,0	30,0	0,84	21
11	90,0	30,0	1,45	40
12	60,0	30,0	0,8	32,4
13	90,0	50,0	1,5	60,6
14	60,0	40,0	1,6	68,4

Fuente: Esta investigación.

El ANOVA realizado por separado para cada variable de respuesta (anexo A5), muestra que para el ácido graso α -linolénico se obtuvo un R^2 de 78,12%, siendo un valor aceptable, explicándose su bajo rendimiento porque la presencia de ácido α -linolénico en la muestra es muy poca, por lo tanto los rangos estadísticos serán menores produciendo errores más significativos.

Figura 18. Superficie de respuesta extracción ácido α -linolénico.



Fuente: Esta investigación.

En la superficie de respuesta (Figura 18) se observa un comportamiento lineal en la cantidad de ácido linolénico extraído al aumentar la temperatura, obteniendo los mejores resultados en la máxima temperatura experimental trabajada. El tiempo de extracción sigue un modelo cuadrático puesto que se evidencia un máximo en la extracción a 70 min y posterior a este tiempo la cantidad de analito obtenido disminuye.

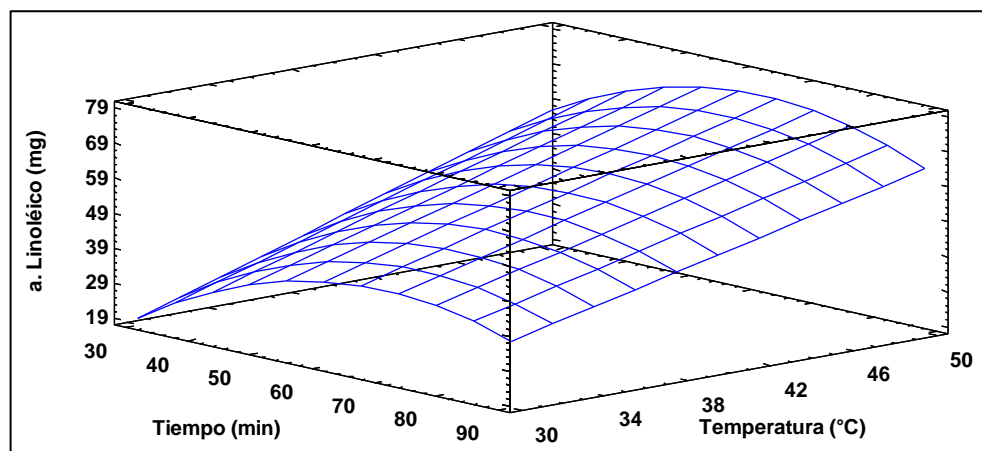
A partir de los resultados anteriores se realizó la ecuación de regresión con el objetivo de ajustar los datos y predecir posible resultados al conocer variables como el tiempo y temperatura de extracción, la ecuación obtenida fue:

$$Y = -1,4 + 0,04xA + 0,04xB - 0,002xA^2 - 0,0003xAxB. \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde Y es la cantidad de ácido linolénico obtenida, A es el tiempo de extracción en minutos (min) y B es la temperatura en grados centígrados (°C).

El ANOVA realizado para el ácido linoléico obtenido a partir de la metodología de extracción mecánica (Anexo A6), muestra un valor R^2 de 89,85% para el experimento. Este valor es alto en comparación con el mismo estadístico obtenido en la extracción de ácido graso α -linolénico (omega-3) debiéndose esto a que la cantidad de ácido linoléico presente en la muestra es mucho mayor y por lo tanto el experimento será menos susceptible a errores estadísticos puesto que el rango de análisis es más amplio.

Figura 19. Superficie de respuesta extracción ácido linolénico.



Fuente: Esta investigación.

De acuerdo a la gráfica (Figura 19) la temperatura posee un comportamiento lineal, es decir, que a medida que se aumenta la temperatura aumenta la cantidad de ácido linolénico extraído, obteniendo los mejores resultados en la máxima temperatura experimental trabajada. Por otro lado el tiempo de extracción sigue un

modelo cuadrático ya que se observa un máximo en la extracción a 60 minutos y posterior a este tiempo la cantidad de analito obtenido disminuye.

Basado en los resultados anteriores se realizó la ecuación de regresión para ajustar los datos y predecir posible resultados al conocer variables como el tiempo y temperatura de extracción, la ecuación obtenida fue:

$$Z = -95,3 + 2,3xA + 2,1xB - 0,015xA^2 - 0,008xAxB. \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde Z es la cantidad de ácido linoléico obtenido, A es el tiempo de extracción en minutos (min) y B es la temperatura en grados centígrados (°C).

Empleando la herramienta de optimización del software estadístico Statgraphics, se optimizo los resultados obtenidos fijando como meta maximizar la cantidad de ácido α -linoléico y ácido linoléico obtenido, la tabla 9 muestra los resultados predichos por el software con una deseabilidad del 94%.

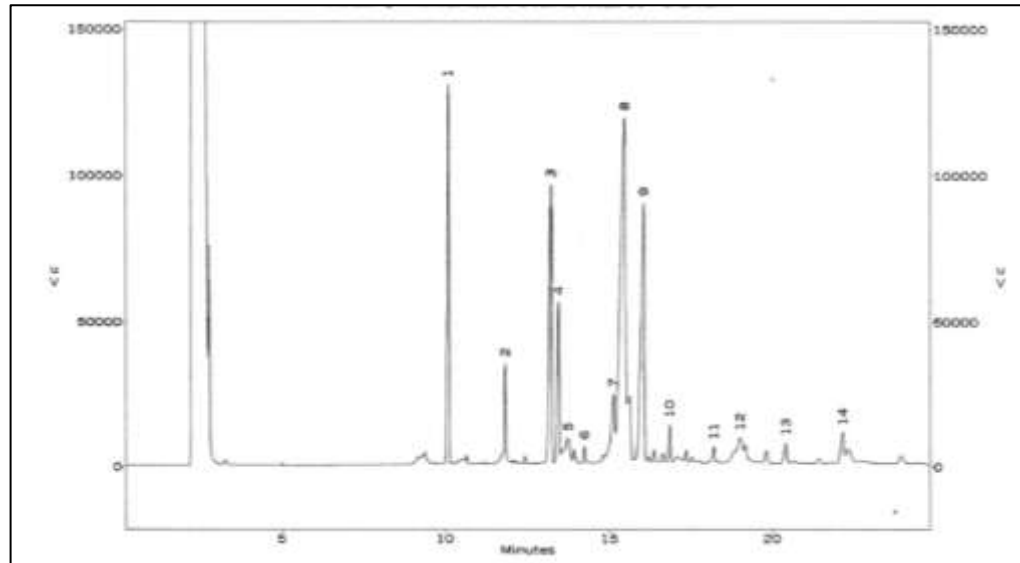
Tabla 9. Optimización proceso de extracción mecánica.

Variable	Valor óptimo
Tiempo	66,50 minutos
Temperatura	50 °C
a. Linoléico	1,726 mg
a. Linoléico	74,393 mg

Fuente: Esta investigación.

Empleando el cromatograma obtenido bajo las mejores condiciones de extracción mecánica mostrado en la figura 20, se identificó los ácidos grasos mirístico (pico 2), palmítico (pico 3), palmitoleico (pico 4), esteárico (pico 8) y por último los compuestos de interés linoléico y α -Linoléico en los picos 9 y 10 respectivamente, el pico 1 corresponde al estándar interno metil undecanoato.

Figura 20. Cromatograma mejores condiciones de extracción mecánica.



Fuente: Esta investigación.

En la tabla 8 se observa que las mejores condiciones de extracción se obtuvieron a 50°C y 60 min, tanto para el ácido α -linolénico como para el ácido linoléico. Este resultado es coherente puesto que estos dos componentes tienen propiedades fisicoquímicas similares, e igual número de carbonos. Comparando estos resultados con los obtenidos en la tabla 7 se observa que en la extracción de aceite se obtuvo los mejores resultados a 50 °C y a 90 min de extracción. Si bien es cierto que a mayor tiempo de extracción se obtiene mayor cantidad de aceite este será de menor calidad puesto que su contenido en ácidos grasos esenciales disminuyó tal como se encontró en la presente investigación.

Chantachum⁶¹ en su investigación extrajo ácidos grasos bajo condiciones experimentales similares y encontró 4,8% de lípido extraídos de cabezas de atún. Sin embargo en ensayos que realizó durante tiempos de extracción mayores a 90 minutos observó que ácidos grasos volátiles eran liberados provocando una disminución de estos en el material lipídico extraído, un efecto similar al presentado en nuestra investigación.

Se trabajó en un rango de temperatura hasta 50°C ya que según Bimbo⁶² esta temperatura es suficiente para desnaturalizar las proteínas que encapsulan a los ácidos grasos y facilitar la extracción de estos mediante el prensado y de esta

⁶¹ CHANTACHUM, S., Op. cit., p. 290-292.

⁶² BIMBO, A. P. (1990). Production of fish oil. In M. E. Stansby, Fish oil in nutrition. New York: Reinhold Publishing Co. Ltd. p: 141

manera evitar posibles degradaciones y pérdidas de los compuestos de interés a causa de temperaturas elevadas.

5.4 EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.

La Enzima Fungal proteasa es una enzima de grado alimenticio que tiene una significativa actividad proteolítica, con actividades endo y exopeptidasas lo que permite hidrolizar enlaces peptídicos internos y externos en la proteína, su ficha técnica se muestra en el anexo B.

Fue necesario determinar la cantidad de proteína que contiene las vísceras de la trucha arco iris para establecer un aproximado de enzima a emplear. Se obtuvo un 25% de proteína empleando el método de Kjeldhal por tanto se trabajó en un rango de cantidad de enzima que va desde 2 a 10 mg, para descartar errores por cuantificación de proteína. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados extracción enzimática.

Ejecución	tiempo h	dosis mg	aceite mg	omega 3 mg	omega 6 mg
1	12,0	2,0	26	0	3,14
2	24,0	6,0	413	3,78	106
3	24,0	10,0	415	3,2	109
4	36,0	10,0	482	0,3	51,3
5	12,0	10,0	87,5	0,78	22
6	24,0	2,0	40	0	14,3
7	36,0	2,0	161	0	6,7
8	12,0	6,0	90	0,6	24
9	36,0	6,0	491,4	1	52
10	12,0	2,0	21	0	3,9
11	24,0	6,0	418	3,50	115
12	24,0	10,0	421	4	105
13	36,0	10,0	475	0,52	47,6
14	12,0	10,0	81	0,66	24
15	24,0	2,0	43,2	0	9
16	36,0	2,0	154	0	8
17	12,0	6,0	92	0,8	25,3
18	36,0	6,0	482,5	0,6	45,8

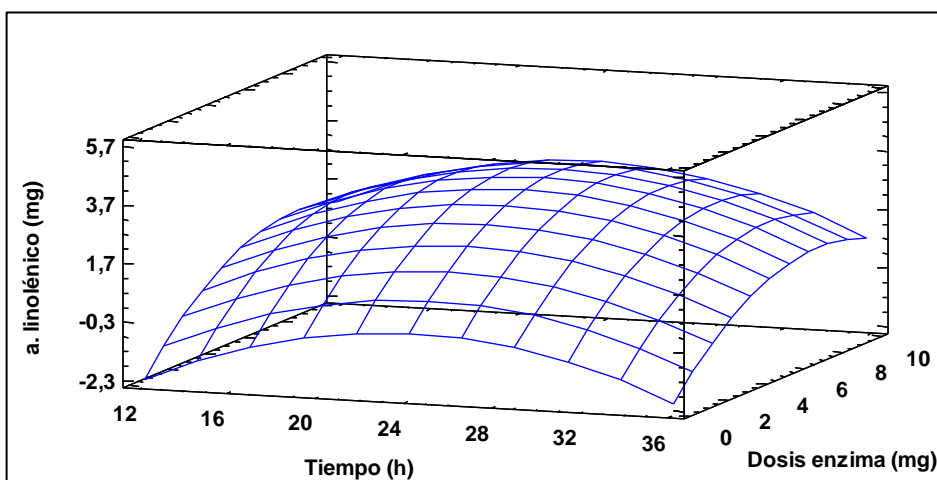
Fuente: Esta investigación.

El ANOVA realizado para verificar la validez del experimento para cada una de las variables de respuesta (Anexos A7, A8, A9), muestra un valor de R^2 para la extracción del aceite de 79,34%. Los valores-p muestran que tanto la dosificación de enzima como el tiempo de extracción son significativos ya que aportan considerablemente en la extracción del aceite.

Para la extracción de ácido α -linolénico mediante la metodología enzimática se obtuvo un valor de R^2 de 76,07%, siendo este un valor bajo, pero teniendo en cuenta que este ácido graso presenta baja concentración en la matriz estudiada, se puede considerar este valor como aceptable.

El gráfico de superficie de respuesta (figura 21) construido a partir de los resultados obtenidos para la cantidad de ácido graso α -linolénico, indica que existe un comportamiento cuadrático para el tiempo de extracción y la dosis de enzima, puesto que estos valores alcanzan un máximo para posteriormente disminuir la cantidad de ácido extraído, se pudo determinar las mejores condiciones de extracción, las cuales son a 24 horas de tratamiento y 6 mg de enzima.

Figura 21. Superficie de respuesta estimada para el ácido graso α - linolénico.



Fuente: Esta investigación.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se realizó la ecuación de regresión que se ajusta a los datos, con el propósito de predecir posibles resultados, la ecuación resultante fue:

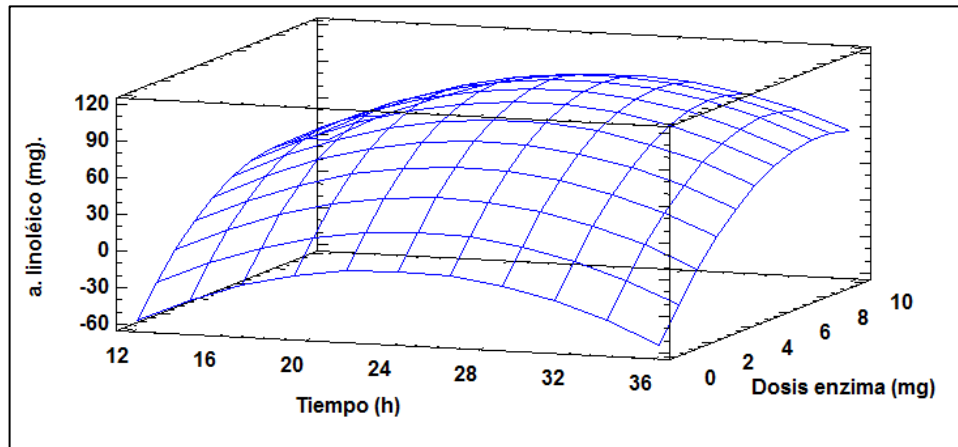
$$Y = -8,3 + 0,7xA + 0,9xB - 0,01xA^2 + 0,002AxB - 0,06xB^2 \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde Y es la cantidad de ácido graso linolénico en mg, A es el tiempo de extracción en horas y B es la cantidad de enzima empleada en mg.

Para la extracción de ácido graso linoléico se determinó un valor de R^2 de 84,87%, los valores-p indican que el modelo se ajusta más a un modelo cuadrático ya que las interacciones tiempo y dosis al cuadrado son muy significativas.

Usando los resultados obtenidos en la cantidad de ácido graso linoléico se construyó el gráfico de superficie de respuesta el cual se muestra en la figura 18.

Figura 22. Superficie de respuesta estimada para el ácido graso linoléico.



Fuente: Esta investigación.

A partir de la gráfica se observa un comportamiento similar al obtenido en la extracción de ácido graso α -linolénico mediante la metodología de extracción enzimática, cada variable alcanza un máximo en la extracción, para luego disminuir conforme estas aumentan los valores del tiempo y dosis de enzima.

Experimentalmente se obtuvieron las mejores condiciones de extracción para el ácido graso linoléico empleando 24 horas como tiempo de reacción y 6 mg como cantidad de enzima, teniendo en cuenta los resultados anteriores se realizó la ecuación de regresión que se ajusta a los datos, con el propósito de predecir posibles resultados, la ecuación resultante fue:

$$Z = -208,8 + 16,8xA + 24,5xB - 0,3xA^2 + 0,1AxB - 1,7xB^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde Z es la cantidad de ácido graso linolénico en mg, A es el tiempo de extracción en horas y B es la cantidad de enzima empleada en mg.

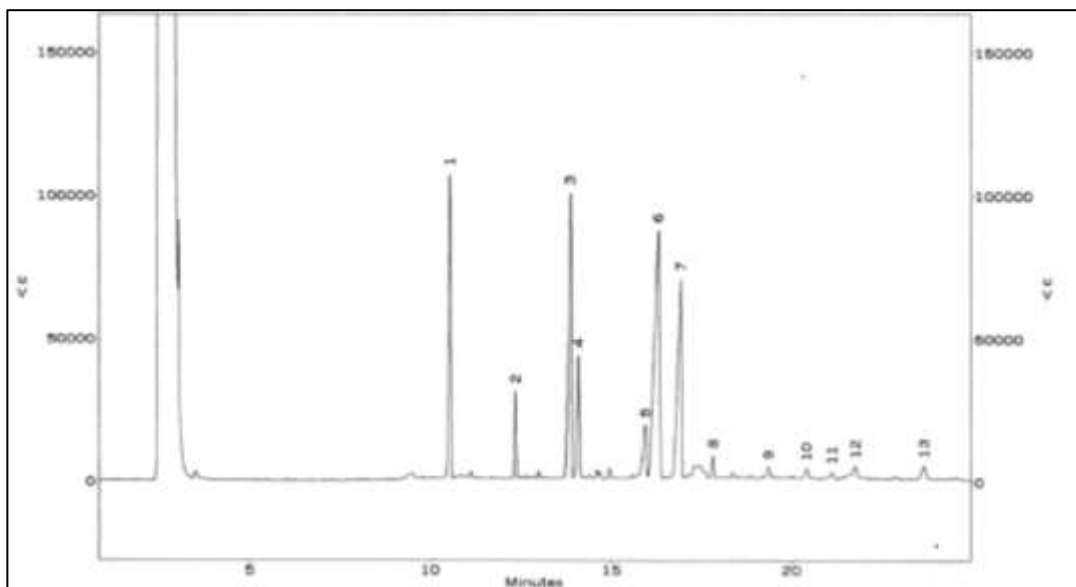
Usando el software estadístico Statgraphics, se optimizo los resultados obtenidos fijando como meta maximizar la cantidad de ácido graso linolénico y ácido graso linoléico obtenido, la tabla 11 muestra los resultados predichos por el software con una deseabilidad del 86%.

Tabla 11. Optimización del proceso de extracción enzimática.

Variable	Valor optimo
Tiempo	24,52 h
Dosis	7,81 mg
a. Linolénico	3,19 mg
a. Linoléico	101,42 mg

A partir del cromatograma obtenido bajo las mejores condiciones de extracción enzimática mostrado en la figura 23, se identificó los ácidos grasos mirístico (pico 2), palmítico (pico 3), palmitoleico (pico 4), esteárico (pico 5) y por último los compuestos de interés linoléico y α -Linolénico en los picos 7 y 8 respectivamente, la señal 1 corresponde al estándar interno metil undecanoato.

Figura 23. Cromatograma mejores condiciones extracción enzimática.



Fuente: Esta investigación.

Las condiciones óptimas de extracción indicaron que en un tiempo de reacción de 24 horas y usando 6 miligramos de enzima se obtuvo 8,4% de lípidos totales, en nuestro estudio. Por su parte Al-Sayed-Mahmoud⁶³ empleando hidrólisis enzimática con Protamex en ovas de trucha arco iris extrajo 9,7% de aceite, resultado más o menos similar, aunque la composición específica de las ovas es diferente. Sin embargo el método empleado en la investigación presenta una buena recuperación de aceite ya que sus valores están cercanos a la extracción con solventes empleada en esta investigación.

En la extracción de los ácidos α -linolénico y linoléico se evidencia que se alcanza los máximos rendimientos en un tiempo de reacción de 24 horas y posterior a este tiempo se observa una disminución en los resultados obtenidos. Este efecto lo explican Chávez y colaboradores⁶⁴ al analizar filetes de trucha después de 45 días

⁶³ AL-SAYED-M, Op. cit., p. 290-292

⁶⁴ CHÁVEZ, C., GARCÍA, J. A., ALARCÓN, A. D., ORTEGA, J. Á., HOLGUÍN C., Comparison of fatty acid content of fresh and frozen fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Walbaum. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57(1), (2014). p: 103–109.

de almacenamiento en congelación a -15 °C, ellos encontraron que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados decrecen en un 12,4% para omega-6 y 32,55% para omega-3 convirtiéndose en ácidos grasos saturados, ellos atribuyen esto a reacciones oxidativas y hidrolíticas influenciadas por el contenido de DHA presente en los filetes. Este efecto puede ser más notorio y ocurrir en menor tiempo en nuestra investigación puesto que se trabajó a temperaturas más elevadas las podrían favorecer la conversión de ácidos grasos insaturados a ácidos grasos saturados. Además nuestro sistema de reacción no se encontraba protegido de la luz ni el oxígeno y según Chen⁶⁵ estos dos factores son causantes directos de las reacciones de oxidación en ácidos grasos poliinsaturados. Otra posible explicación a lo observado se debe a la liberación de enzimas de las membranas celulares al realizar la hidrólisis de dichas proteínas, Hsieh⁶⁶ encontró que algunas enzimas liberada en filetes de pescado catalizan específicamente la oxidación de los carbonos en la posición 6 de ambos ácidos grasos omega-3 y 6 produciendo aldehídos, cetonas y alcoholes.

5.5 DETERMINACIÓN DE LA MEJOR METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE REPRODUCIBILIDAD.

Bajo las condiciones optimizadas para cada técnica se realizó por triplicado la extracción de los ácidos grasos linolénico y linoléico, se encontró 9,8% de lípidos totales en las vísceras con la metodología de extracción con solventes, 8,4% con la extracción enzimática y 7,3% con la extracción mecánica. La tabla 12 muestra los promedios obtenidos en las extracciones de ácido linolénico para cada metodología y los coeficientes de variación para analizar la reproducibilidad de cada técnica.

Tabla 12. Resumen extracción de ácido α -linolénico con cada técnica.

metodología	Promedio (mg)	Porcentaje en aceite	Porcentaje en muestra	Coefficiente de Variación
Solventes	7,35	1,5%	0,147%	4,2%
Mecánica	1,8	0,5%	0,036%	7,1%
Enzimática	3,8	0,9%	0,076%	5,3%

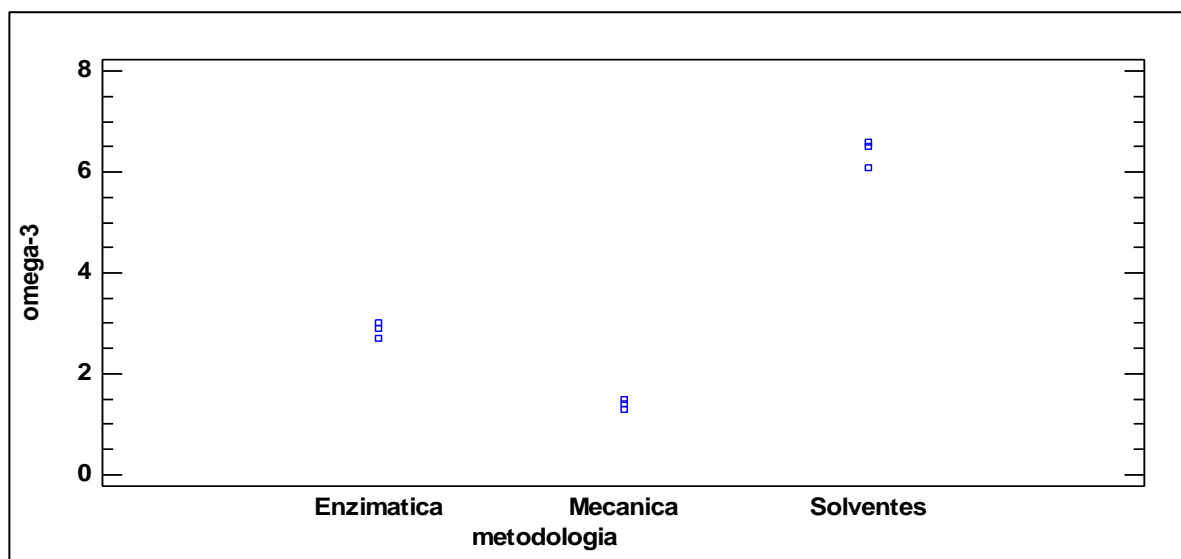
Fuente: Esta investigación.

⁶⁵ CHEN YC, NGUYEN J, SEMMENS K, BEAMER S, JACZYNSKI J. Physicochemical changes in ω -3 enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated storage. *Food Chem.* 2007; 104, p: 1143- 1152.

⁶⁶ HSIEH RJ, KINSELLA JE. Lipooxygenase-catalyzed oxidation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Food Sci.* 1986; 51: p. 940-945.

Se recomienda valores de coeficiente de variación por debajo del 2% según GLP, los coeficiente de variación obtenidos para cada técnica están por encima de este valor razón por la cual no se puede garantizar la reproducibilidad de cada uno de los métodos para la extracción de ácido α -linolénico, estos malos resultados se deben a la poca cantidad presente de este analito en la muestra, provocando bajos rangos de análisis estadístico, sin embargo se utilizó estos datos para realizar un aproximado del comportamiento de esta variable respuesta con cada una de las metodologías empleadas, la figura 24 muestra un gráfico de dispersión realizada a partir de los resultados obtenidos.

Figura 24. Grafico dispersión ácido α -linolénico en función de las metodologías



Fuente: Esta investigación.

Basado en la figura 21 y en la tabla 12 se concluye que la mejor metodología para la extracción de ácido α -linolénico es la extracción con solventes, aunque también se obtuvieron buenos resultados en la extracción enzimática. Por último se estudió la reproducibilidad de cada metodología en la extracción del ácido graso linoléico (omega-6), además se evaluó la mejor técnica de extracción para este compuesto, la tabla 13 muestra el resumen estadístico que se obtuvo.

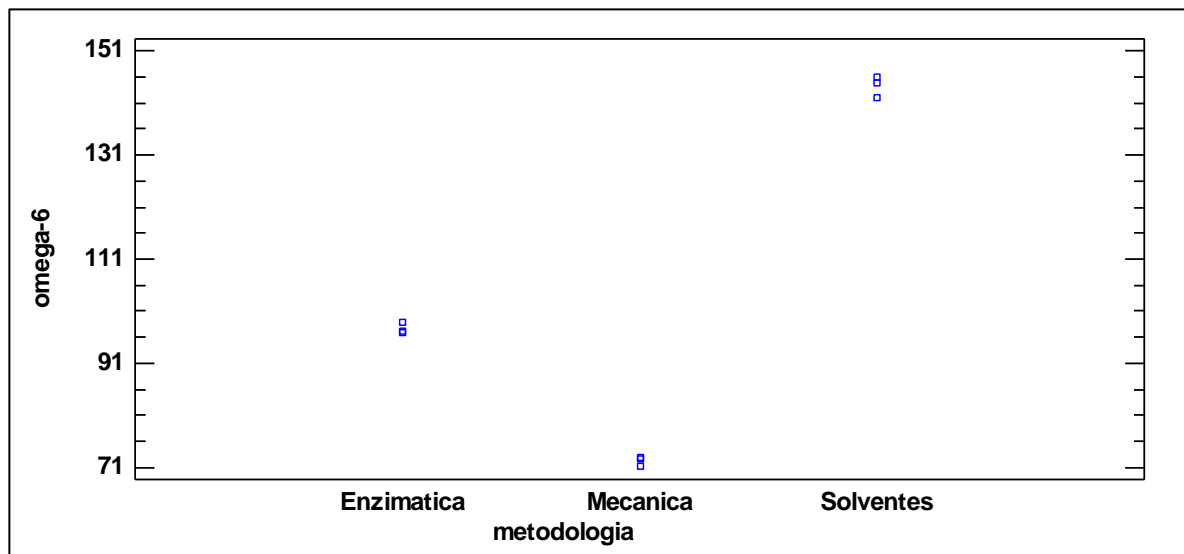
Tabla 13. Resumen extracción de ácido linoléico con cada técnica.

metodología	Promedio (mg)	Porcentaje en aceite	Porcentaje en muestra	Coefficiente de Variación
Solventes	149,9	30,6%	2,9%	1,4%
Mecánica	75,9	20,8%	1,5%	1,3%
Enzimática	106,2	25,3%	2,4%	1,1%

Fuente: Esta investigación.

Los coeficientes de variación obtenidos para el análisis de ácido linoléico están por debajo del 2%, esto nos permite garantizar que cada una de las técnicas es reproducible bajo las condiciones experimentales trabajadas, la figura 22 muestra la gráfica de dispersión obtenida para esta variable respuesta.

Figura 25. Gráfica dispersión ácido linoléico en función de las metodologías.



Fuente: Esta investigación.

Según la gráfica la mejor metodología para la extracción de ácido graso linoléico es la extracción con solventes, resultados similares se obtuvieron en la extracción de ácido linoléico, si bien es cierto que la extracción con solventes garantiza una mayor cantidad de analitos extraídos, en esta investigación no se recomienda esta metodología puesto que los productos extraídos no pueden ser utilizados para su comercialización en la alimentación humana o animal, por esta razón se plantea la extracción enzimática como alternativa ya que todos los reactivos empleados son de grado alimenticio lo que garantizan que los compuestos extraídos se puedan usar para su comercialización.

En un trabajo de Osorio⁶⁷ se logró extraer 15% de lípidos a partir de cabezas de trucha arcoíris empleando extracción soxhlet, además encontró 14,24% de ácido linoléico y 1,24% de ácido linoléico en el aceite extraído. Por su parte Usydus⁶⁸ reporta 7,4% de lípidos totales en filete de trucha de los cuales 37% equivalen a

⁶⁷ OSORIO A, WILLS A, MUÑOZ AP. Caracterización de coproductos de la industria del fileteado de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Colombia, Rev Fac Med Vet Zoot. 62(3). 2013. p: 182-195

⁶⁸ USYDUS Z, SZLINDER-RICHERT J, ADAMCZYK M, SZATKOWSKA U. 2011. Marine and farmed fish in the Polish market: Comparison of the nutritional value. Food Chem. 126. p: 78-84.

ácidos grasos omega-3 totales y 8,8% equivalen a ácidos grasos omega-6. Los rendimientos de extracción obtenidos en esta investigación muestra relación cercana con los resultados obtenidos por otros autores, tenido en cuenta que se trata de diferente tipo de muestras analizadas, condiciones de crianza del animal diferentes, la temporada del muestreo, entre otras.

6. CONCLUSIONES

Empleando un diseño experimental descrito en esta investigación se logró normalizar las condiciones de extracción de ácido linoléico ya que los coeficientes de variación obtenidos se encontraron por debajo del 2% garantizando la reproducibilidad de cada método, además se logró expresar los métodos en función matemática lo que permitirá predecir resultados en futuras investigaciones reduciendo significativamente los ensayos experimentales.

Se encontró una buena presencia de lípidos totales en las vísceras de la trucha arcoíris, logrando determinar la composición de ácidos grasos presentes en este aceite, el cual contiene cantidad apreciable de ácido linoléico y en menor proporción de ácido α -linolénico, que han sido los ácidos grasos de interés en esta investigación.

Mediante el método de extracción con solventes se extrajo la mayor cantidad de aceite a partir de las vísceras que representa el 9,8%, lo que equivalen a 490 mg a partir de 5 g de muestra, de los cuales 30.6% corresponden a ácido linoléico y 1,5% a ácido α -linolénico.

Con el método de extracción enzimática se obtuvieron resultados parecidos al método de extracción con solventes, con un rendimiento de aceite de 8,4% equivalente a 420 mg en 5 g de muestra, de los cuales 25,3% corresponden ácido linoléico y 0,9% a ácido α -linolénico.

Con el método de extracción mecánica se obtuvieron los rendimientos más bajos con un 7,3 % de aceite equivalente a 365 mg en 5 g de muestra, de los cuales 20,8% corresponden a ácido linoléico y 0,5% a ácido α -linolénico,

Para la extracción de ácido α -linolénico no fue posible normalizar ninguna técnica, pero los coeficientes de variación obtenidos están ligeramente desfasados por lo que se pueden tomar los resultados como referencia para realizar futuros ensayos.

Con el método de extracción con solventes se obtienen mejores resultados, pero este producto al contener trazas del solvente impide que los productos analizados tengan uso para alimentación. De los métodos limpios, con el de extracción enzimática se obtiene más producto, pero al analizar el costo beneficio no es tan rentable como el de extracción mecánica.

7. RECOMENDACIONES.

Se recomienda realizar nuevas extracciones combinando la metodología de extracción mecánica con la enzimática, puesto que estas dos técnicas son limpias y podrían dar mejores resultados si se emplean en conjunto.

Se debe continuar con investigaciones adicionales que permitan un mayor conocimiento de la composición de los subproductos de la truchicultura con miras a generar nuevas tecnologías de utilización de estos productos.

Varios autores reportan que los hidrolizados obtenidos en la extracción enzimática de aceite a partir del filete, huesos y cabezas de trucha contienen aminoácidos altas cantidades de aminoácidos de alto valor comercial, es recomendable analizar el contenido de aminoácidos obtenido en la hidrolisis de las proteínas presentes en las vísceras de la trucha y evaluar su valor nutricional y comercial.

8. DIVULGACIÓN Y RECONOCIMIENTOS.

Ponencia oral en el III congreso latinoamericano de estudiantes de Química, realizado en marzo de 2015 en la ciudad de Cali, en la Universidad Santiago de Cali.

IV premio Nacional al mérito investigativo, por obtener la mejor ponencia oral en el III congreso latinoamericano de Química. (Anexo C.)

BIBLIOGRAFÍA.

AL-SAYED-MAHMOUD, M. LINDER, M. Parmentier Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe *Process Biochemistry*, 43 (2008), p. 376–383.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. 16th Edition. 3rd Revisión. 1997 METODO AOAC 954.01 (coeficiente 6.25) Método kjeldhal.

ARTURO, D, DELGADO O, DIAZ W: Identificación de grasas y aceites en el agua potable del municipio de pasto por cromatografía de gases y cromatografía de gases/espectrometría de masas. San Juan de Pasto, trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Química (2005).

ASPMO, S. I., HORN, S. J. & H. EIJSINK, V. G. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40, p. 1957-1966.

BERGÉ, J. P., & BARNATHAN, G. (2005). Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 96, p. 49–125.

BIMBO, A. P. (1990). Production of fish oil. In M. E. Stansby, *Fish oil in nutrition*. New York: Reinhold Publishing Co. Ltd. P. 141.

BLANCO M., 1994, *La Trucha, cría industrial*. Ed. Mundi-prensa. Madrid. 2ª ed. p. 76.

BLIGH, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, p. 911–917.

BRENNER R, PELUFFO RO: Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1969; 176: p. 471-479.

CAMACHO E., MORENO M., RODRÍGUEZ M., LUNA C., VÁZQUEZ M., 2000. Guía para el cultivo de la trucha. SEMARNAP. Dirección general de acuicultura. México, p.17-25.

CARRERO, J J, BARÓ, L, FONOLLÁ, J, JIMÉNEZ, J LÓPEZ-. 2005. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su

ingesta of omega-3-fatty acids and, *Nutr. Hosp.* (2005) XX (1), ISSN 0212-1611. CODEN NUHOEQ S.V.R. 318, p. 63-69.

CHANTACHUM, S., BENJAKUL, S., & SRIWIRAT, N. (2000). Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry*, 69, 289–294.

CHÁVEZ-M, C., GARCÍA-M, J. A., Alarcón-Rojo, Comparison of fatty acid content of fresh and frozen fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Walbaum. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 2014. p: 103–109.

CHEN YC, NGUYEN J, SEMMENS K, BEAMER S, JACZYNSKI J. Physicochemical changes in ω -3 enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated storage. *Food Chem.* 2007; 104, p: 1143- 1152.

CHRISTIE, W.W., Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in lipid methodology*, 1993. 2: p. 69 - 111.

DECKELBAUM, R.J., 2010. n-6 and n-3 Fatty acids and atherosclerosis: ratios or amounts? *Arterioscler. thromb. Vasc. Biol.* 30, p. 2325–2326.

DONALD B. Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Biol Chem* 2002; 277 (11): p. 8755.

E. BERNARDINI, Tecnología de aceites y grasas, Alhambra (1981), ISBN 8420508187, p: 232.

FAO, F. I. D. (1986). The production of fish meal and oil. F. F. T. Paper, vol. 142. Rome (Italy): FAO 9. 63.

GARCÍA JA, NÚÑEZ FA, CHACÓN O, ALFARO RH, ESPINOSA MR. 2004. Calidad de canal y carne de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, producida en el noroeste del Estado de Chihuahua. *Hidrobiológica*. P:19-26

GONÇALVES, A. A.; SOUZA-SOARES, L. A. 1998. Lipídios em Peixes. *Vetor, FURG*, Rio Grande, v. 8, p. 35-53.

GOOD LABORATORY PRACTICE (GLP), Quality practices for regulated non-clinical research and development. 2009.

HARRIS WS. N-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids.* 1996; 31: p. 243-252.

HSIEH RJ, KINSELLA JE. Lipooxygenase-catalyzed oxidation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Food Sci.* 1986; 51: p. 940-945.

KIM W, MCMURRAY DN, CHAPKIN RS. n-3 polyunsaturated fatty acids—physiological relevance of dose. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;82:155–8.

KOTZAMANIS YP, ALEXIS MN, ANDRIOPOULOU A, CASTRITSI I, FOTIS G. 2001. Utilization of waste material resulting from trout processing in gilthead bream (*Sparus aurata* L.) diets. *Aquac Res.* 32 P:288-295.

KROMHOUT D, BOSSCHIETER EB, The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*, 1985, 312: p. 1205-1209.

LIASET, B., JULSHAMN, K., & ESPE, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutrition evaluation of the produced fractions from enzyme hydrolysis of salmon with Protamex™. *Process Biochemistry*, 38, 1747–1759.

LINSCHAEER WG, VERGROESEN J, 1994. Lipids. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern nutrition in health and disease*, 8th ed. Philadelphia: Lea and Febiger: p. 47-88.

LINDER, J. FANNI, M. Parmentier Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases *Marine Biotechnology*, 7 (1) (2005), pp. 70–76.

MARCILLA GOMIZ A.. *Introducción a las operaciones de separación contacto continuo*. Publicaciones de la Universidad de Alicante, 1999, p:11

MATAIX, J., MAÑAS, M., LIOPIS, J., & MARTÍNEZ-DE-VICTORIA, E. (2003). *Tabla de composición de alimentos*, 4a Ed. Granada: Universidad de Granada, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.

MATAIX, J; QUILES, JL, 2001a. Aceites y grasas. En *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española*. Madrid, p. 121-131.

MESA, M.D., AGUILERA, C.M., LINDE, J., RAMIREZ, M.C., GIL, A., 2005. Lípidos como alimentos funcionales. En: *Alimentos funcionales*. (M. Juárez, A. Olano, F. Morais, eds.). Fundación española para la ciencia y la tecnología, Madrid (España), p. 146-173.

ORTEGA J. 2000. Manejo y alternativas de desarrollo para el cultivo de la trucha arco iris. SEDAP. México, p. 5-20.

ORTIZ, A. DORANTES, L. GALINDEZ, C. «Desarrollo de un proceso para la obtención de aceite de aguacate de alta calidad empleando una tecnología emergente [online].» (2005). Disponible en <http://www.pncta.org.co/investigaciones_03>. (Último acceso: 26 de agosto de 2015)

OSORIO A, WILLS A, MUÑOZ AP. 2013. Caracterización de coproductos de la industria del fileteado de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Colombia, Rev Fac Med Vet Zoot. 62(3). p: 182-195.

PATTERSON, E., WALL, R., FITZGERALD, G.F., Ross, R.P., Stanton, C., 2012. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. J. Nutr.Metab. 2012, 539426.

POUDYAL H, PANCHAL SK, DIWAN V, BROWN L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. Prog Lipid Res 2011; 50(4): p. 372-387.

ŠLIŽYTE, T. RUSTAD, I. STORRØ, Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. Process Biochemistry, 40 (2005), p. 3680–3692.

SALVADOR, M., ALONSO, D. Impact of Different Dietary Phospholipid Levels on Cholesterol and Canthaxanthin Lipoprotein–Serum Transport and Muscle Deposition in Rainbow Trout. J. Agric. Food Chem. 2009, 57, p. 2016–2021.

SANDERS TA. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. Am J Clin Nutr. 2000; 71: p.176-180.

SHARAPIN, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Santa Fé de Bogotá. Colombia, p. 247.

SKOOG, D. HOLLER, J. NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. Madrid: Mc Graw-Hill, 1992.p. 42.

SMITH, W. L.; SONG, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002, 68-69, p. 115-118.

SORIANO, M. «Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PeLA de *Paenibacillus* sp. BP - 23 eYvPA de *Bacillus Subtilis*.» Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología. Facultad de Biología., Universidad de Barcelona, Barcelona (2004).p:35-41.

STAMBUK, J. 1970. Manual práctico de cromatografía de gases. Perkin-Elmer Corporation. Norwalk. Estados Unidos, p. 40.

SUN D, KRISHNAN A, ZAMAN K, LAWRENCE R, BHATTACHARYA A, FERNÁNDEZ G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2003 Jul; 18(7): p.1206.

SUN L, TAMAKI H, ISHIMARU T, TERUYA T, OHTA Y, KATSUYAMA N, CHINEN I. Inhibition of osteoporosis due to restricted food intake by the fish oils DHA and EPA and perilla oil in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 Dec; 68(12): p.2613.

USYDUS Z, SZLINDER-RICHERT J, ADAMCZYK M, SZATKOWSKA U. 2011. Marine and farmed fish in the Polish market: Comparison of the nutritional value. *Food Chem.* 126. p: 78-84.

VALENZUELA, A., MANZINI, J., TOUSSANINT, G., UAUY, R. y PINEDA, J. 1999a. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Departamento de Nutrición y Salud Humana. División de Vitaminas Roche México. Nº1, p.8.

VON SCHACKY C, 2000. n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*, 71:224S-7S.

VON SCHACKY C, BAUMANN K, ANGERER P. The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. *Lipids.* 2001; 36 Suppl: p. 99-102.

YEGRES, S. SANCHEZ, J. BELMAR, M. RIVEROS W. BELMAR, D. «Producción de enzimas pépticas a escala piloto.» Departamento de Bioanálisis. Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Caracas, Venezuela (2000), p: 54-56.

ZAMPELAS A, Peel AS, Gould BJ, Wright J, Williams CM. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr.* 1994; 48: p. 842-848.

ANEXOS.

Anexo A1. Análisis de Varianza para aceite en extracción con solventes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:temperatura	549822,	1	549822,	82,89	0,0000
B:tiempo	88804,0	1	88804,0	13,39	0,0017
C:agitación	756,25	1	756,25	0,11	0,7393
D:solvente	234235,	1	234235,	35,31	0,0000
Error total	126033,	19	6633,34		
Total (corr.)	999651,	23			

Anexo A2. Análisis de Varianza para extracción de ácido α -linolénico con solventes.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	16,2735	1	16,2735	58,17	0,0001
B:solvente	4,90241	1	4,90241	17,52	0,0031
AB	0,762612	1	0,762612	2,73	0,1373
Error total	2,23796	8	0,279745		
Total (corr.)	24,1765	11			

Anexo A3. Análisis de Varianza para extracción de ácido linoléico con solventes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	9804,9	1	9804,9	183,82	0,0000
B:solvente	3989,09	1	3989,09	74,79	0,0000
AB	618,289	1	618,289	11,59	0,0093
Error total	426,722	8	53,3402		
Total (corr.)	14839,0	11			

Anexo A4. Análisis de Varianza para aceite extraído mecánicamente

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:temperatura	192970,	1	192970,	92,77	0,0000
B:tiempo	44290,0	1	44290,0	21,29	0,0001
C:prensado	155,042	1	155,042	0,07	0,7873
D:centrifugacion	9560,04	1	9560,04	4,60	0,0428
Error total	47840,0	23	2080,0		
Total (corr.)	294815,	27			

Anexo A5. Análisis de varianza extracción mecánica de ácido α -linolénico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	0,357013	1	0,357013	8,15	0,0189
B:temperatura	0,872102	1	0,872102	19,92	0,0016
AA	0,125405	1	0,125405	2,86	0,1248
AB	0,0528125	1	0,0528125	1,21	0,3006
Error total	0,394048	9	0,0437831		
Total (corr.)	1,80138	13			

Anexo A6. Análisis de varianza extracción mecánica de ácido linoléico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	291,611	1	291,611	5,50	0,0437
B:temperatura	3238,68	1	3238,68	61,04	0,0000
AA	645,31	1	645,31	12,16	0,0069
AB	52,5313	1	52,5313	0,99	0,3457
Error total	477,498	9	53,0553		
Total (corr.)	4705,63	13			

Anexo A7. Análisis de varianza extracción enzimática de aceite.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	284715,	1	284715,	30,00	0,0001
B:dosis	191597,	1	191597,	20,19	0,0005
AB	33865,0	1	33865,0	3,57	0,0798
Error total	132856,	14	9489,72		
Total (corr.)	643033,	17			

Anexo A8. Análisis de varianza extracción enzimática ácido α -linoléico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	0,0147	1	0,0147	0,02	0,8868
B:dosis	7,45763	1	7,45763	10,72	0,0067
AA	15,6025	1	15,6025	22,42	0,0005
AB	0,04805	1	0,04805	0,07	0,7972
BB	3,4225	1	3,4225	4,92	0,0466
Error total	8,34922	12	0,695768		
Total (corr.)	34,8946	17			

Anexo A9. Análisis de varianza extracción enzimática ácido linoléico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:tiempo	991,174	1	991,174	2,95	0,1115
B:dosis	8209,01	1	8209,01	24,44	0,0003
AA	10095,6	1	10095,6	30,06	0,0001
AB	255,832	1	255,832	0,76	0,3999
BB	3066,58	1	3066,58	9,13	0,0106
Error total	4029,83	12	335,819		
Total (corr.)	26648,0	17			

Anexo B. Ficha técnica Fungal proteasa FP 15.

SN Chemical Co. Enzymes for food

FP 15
Fungal Proteasa

Descripción

FP 15 es una enzima grado alimenticio, obtenido por fermentación controlada del *Aspergillus oryzae*, aislada y purificada, que despliega un significativo nivel de actividad proteolítica, con actividades endo y exopeptidasas.

La endopeptidasa hidroliza enlaces peptídicos interiores de la proteína, liberando peptidos de variados tamaños y longitudes.

La exopeptidasa libera aminoácidos por hidrólisis de la proteína. La enzima cumple con las especificaciones recomendadas por el Código Alimentario (FCC) para enzimas grado alimenticio. La enzima es ampliamente específica por sustratos como gluten, yema de huevo, caseína, soya, gelatina, hemoglobina, pescado, etc.

Fuente	<i>Aspergillus spp</i>
Actividad	15.000 HU / g
Forma	Polvo Amarillo
Color	Ligeramente cremoso a tostado
Olor	Típico fongo a fermentación
Solubilidad	Soluble en agua.

Análisis de Actividad

Una unidad de hemoglobina (HU) es aquella actividad que liberará 0.0447 miligramo de nitrógeno no proteico en 30 minutos, bajo las condiciones del ensayo. Una copia del análisis de actividad está disponible a solicitud.

Aplicación y Usos

Para una evaluación inicial, un nivel de uso recomendado de FP 15 es de 0.35 % a 0.7 %, basado en el peso de la proteína contenida en el sustrato. Preferiblemente calcule el nivel de uso con base en el peso de harina de trigo, maíz, cebada, papa, tapioca, etc. El desempeño varía con la concentración de proteína, grado de hidrólisis deseado, pH, temperatura y tiempo de hidrólisis. Si se usa más proteasa, la velocidad de reacción aumenta y recorta el tiempo para la reacción.

PROENZIMAS
ENZIMAS PARA PROCESOS INDUSTRIALES

PROENZIMAS S.A.

Calle 59 No. 5N - 88

PBX: 447 6050

FAX: 446 6443

Cali - Colombia

e-mail: info@proenzimas.com

www.proenzimas.com

FP 15 se usa en masas para pan, galletería u hojaldrados, con el fin de reducir el tiempo de mezclado y mejorar el grano y la textura de la pieza terminada.

Condiciones sugeridas iniciales para esta aplicación son:

- 1.-Dosisación : 4 – 10 gramos / 100 kilogramos de harina.
- 2.-Temperatura : 30° C a 50° C (O Temperatura de Mezcla Normal)
- 3.-pH : 4.3 a 5.0 (la enzima realiza actividad considerable a pH 3.5 a 9.0)

Siempre deben efectuarse ensayos para establecer dosis óptima, tiempos de mezcla, tiempos de reposo o reacción y el punto final.

Debe adicionarse muy bien la enzima con el agua de moje y mezclarse con el producto a tratar, para garantizar masas homogéneas y transformación eficiente.

Efecto de la Temperatura y el pH.

El rango de temperatura óptimo para la FP 15 es 45 ° C a 60 ° C a pH 5.0.

Temperaturas superiores a 65 ° C inactivan rápidamente la enzima.

La enzima trabaja en forma efectiva en niveles de pH de 3.0 a 10.0

El rango de pH óptimo de la FP 15 es 5.0 a 10.0 a 30 ° C.

pH inferior a 4.0 y superior a 11.0 producirán una inactivación más rápida de la enzima.

Empaque

La FP 15 está disponible en tambores de fibra y/o cajas de cartón corrugado por 10, 20 y 30 kilogramos de peso neto.

Otros empaques se encuentran disponibles a solicitud para diferentes cantidades de producto.

Almacenamiento

En recipientes cerrados bajo condiciones secas y frescas, la pérdida de actividad es normalmente inferior al 10% en un año.

La vida de almacenamiento del producto puede prolongarse refrigerándolo a 5 ° C.

La información técnica y sugerencias de uso contenidas en este documento se consideran fiables, pero no deben considerarse como garantías. Las especificaciones están sujetas a cambios basados en variaciones de la materia prima.

Anexo C. Reconocimiento premio nacional al mérito investigativo.



USC La Santiago
transforma tu mundo

USCEQ
Asociación de Estudiantes y Egresados del programa de
Química de la Universidad Santiago de Cali
CIC 882738800

*La Asociación Nacional de Estudiantes de Química (ANEQ) y la
Asociación de Estudiantes de Estudiantes de y Egresados del Programa
de Química de la Universidad Santiago de Cali (USCEQ)*

Resolución No. 04 del 27 de Abril de 2015

Conceden el primer puesto en modalidad de PONENCIA ORAL al estudiante:

Fernando Antonio Chaves Vallejos
C.C. 1.085.256.667

El suscrito Presidente de la Asociación Nacional de Estudiantes de Química, en uso de sus facultades legales y

CONSIDERANDO

- Que los estudiantes de Química son dignos de todo elogio y reconocimiento a su labor investigativa y se hacen merecedores de la distinción de la Asociación.
- Que **Fernando Antonio Chaves Vallejos**, autor del trabajo titulado: "Extracción y cuantificación de ácidos grasos omega-3 y omega-6 a partir de vísceras de trucha arcoiris (*Oncorhynchus Mykiss*) cultivada en el corregimiento del Ercano, Nariño", presentó su trabajo en el III CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA y XV ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA PURA Y APLICADA.

RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO: Conceder el "IV PREMIO NACIONAL AL MÉRITO INVESTIGATIVO" a **Fernando Antonio Chaves Vallejos**, por presentar un excelente trabajo de investigación.

ARTÍCULO SEGUNDO: La presente resolución fue entregada por el Presidente de la Asociación Nacional de Estudiantes de Química y la Secretaría del Comité Organizador del III CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA y el XV ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA PURA Y APLICADA, que se realizó del día 24 al 27 de marzo de 2015.

Carlos A. Morcillo
CARLOS ANDRÉS MÓRCILLO
Presidente ANEQ

Alejandra Pineda Quintero
ALEJANDRA PINEDA QUINTERO
Secretaría Comité Organizador CONLEQ 2015



ANAB

Calle 5a Carrera 67 Campus Ferrafina A.A. 4107 / Teléfono: PSE 5103000
web: www.usc.edu.co / fax: 890.303.787-1 / Santiago de Cali - Colombia

