**Estudio fisicoquímico y de la variación de las
propiedades organolépticas debidas a los distintos
componentes empleados en alimentos funcionales de
base láctea**

Mg. Marina Dello Staffolo

**Tesis presentada para el Grado de Doctor en Ingeniería.
Area Departamental Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería,
Universidad Nacional de La Plata**

Marzo 2008

CONICET

U N L P

C I D C A

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctora en Ingeniería fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Alicia Bevilaacqua y la co-dirección de la Dra. Miriam Martino.

Jurados:

Dra. Lía Gerchenson

Dra. Susana Zorrilla

Resumen

El presente trabajo de tesis pretende realizar un aporte a la industria en el desarrollo y estudio de productos alimenticios del segmento funcional, en particular los alimentos lácteos adicionados con fibra dietaria. Este tipo de alimentos tiene una enorme aceptación entre los consumidores que hoy no solo buscan una nutrición básica, sino que prefieren aquellos que mejoran su salud y por consiguiente su calidad de vida, en un mundo donde las exigencias para los individuos son cada vez mayores.

Se estudiaron dos productos lácteos tipo: postres y yogures. Debido a las diferencias existentes entre los mismos, se ordenó el trabajo en cuatro partes:

La Parte I es una introducción, compuesta de tres capítulos. En el Capítulo 1 se abordan los aspectos generales relacionados con las definiciones de alimentos funcionales y fibra dietaria y se ubica al lector en el mercado de lácteos mundial y local. En el Capítulo 2 se exponen las características de las fibras dietarias a utilizar para el desarrollo y estudio de los productos. En el Capítulo 3 se definen los objetivos generales y específicos de este trabajo de tesis.

La Parte II, que se ocupa de los postres con fibras, está dividida en siete capítulos. El Capítulo 1 es una somera introducción al tema para no abrumar al lector. Los capítulos subsiguientes también poseen introducción, pero en ellas, se expresan los conceptos mínimos y necesarios que hacen a los objetivos específicos de cada capítulo. El Capítulo 2 trata del estudio de los postres lácteos comerciales y de la selección de las mejores condiciones para preparar los mismos. También se presentan las metodologías instrumentales mecánicas a utilizar. En el Capítulo 3 se desarrollan, estudian y seleccionan, formulaciones base de postres regulares y de menor valor energético, para lograr una textura adecuada y similar a los postres comerciales, a los que luego, se adicionarán las fibras a estudiar. En el Capítulo 4 se investigan las propiedades mecánicas instrumentales, la estructura, la aceptabilidad sensorial de los postres regulares adicionados con las distintas fibras dietarias a estudiar. En el Capítulo 5 se desarrolla un modelo matemático-estadístico para predecir las características de textura y sinéresis de los postres de valor energético reducido adicionados con las

distintas fibras dietarias. En el Capítulo 6 se estudia la vida útil microbiológica de los postres regulares adicionados con las distintas fibras. En el Capítulo 7 se exponen las conclusiones que se desprenden a partir de los resultados obtenidos del análisis de los postres lácteos adicionados con fibras.

La Parte III que trata de los yogures con fibra dietaria, consta de cinco capítulos. El primero es la introducción donde se presenta al producto y se exponen los objetivos. El Capítulo 2 explica el modo de preparación de los yogures con fibras. En el Capítulo 3 se analiza la variación en el contenido de ácidos orgánicos y pH de los yogures con fibras durante el almacenamiento refrigerado. En el Capítulo 4 se estudia la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro en yogur adicionado con fibras por medio de una simulación in vitro del entorno gastroduodenal. En el Capítulo 5 se exponen las conclusiones a las cuales se llegan a partir de los datos obtenidos del análisis de los yogures adicionados con fibras.

La Parte IV comprende las conclusiones generales de este trabajo de tesis tomando en cuenta los resultados presentados en las Partes II y III.

Índice

	Pág.
Parte I- Introducción	1
Capítulo 1- Aspectos generales	2
1.1- Alimentos Funcionales	2
1.1.1- Efectos de los alimentos funcionales	3
1.2- Fibra dietaria	4
1.2.1- Definiciones de la fibra dietaria	4
1.2.2- Clasificaciones y composición química de la fibra dietaria	6
1.2.3- Propiedades fisicoquímicas	11
1.2.4- Efectos fisiológicos de varios tipos de fibras	13
1.2.5- Influencia de la fibra dietaria en la prevención de enfermedades y promoción de la salud	15
1.2.5.1- Constipación	15
1.2.5.2- Diverticulosis	16
1.2.5.3- Cáncer de colon	17
1.2.5.4- Cáncer de mamas	17
1.2.5.5- Nivel de colesterol en sangre	18
1.2.5.6- Enfermedades coronarias	19
1.2.5.7- Diabetes	20
1.2.5.8- Control de peso	21
1.2.6- Fibras y nutrición	21
1.2.7- Potenciales peligros de la fibra dietaria	22
1.2.8- Fibras en la niñez	23
1.3- Industria láctea	23
1.3.1- Situación mundial	23
1.3.2- Mercado local	25
Capítulo 2- Fibras dietarias utilizadas	29
2.1- Inulina	29
2.2- Fibras de caña de bambú, de manzana y de trigo	32
2.3- Psyllium	32
2.4- Quitosano	33

2.5- Carragenanos	35
2.6- Goma guar	38
2.7- Goma xantano	39
Capítulo 3- Objetivos	41
Parte II- Postres lácteos con fibras	44
Capítulo 1- Introducción	45
1.2- Propiedades reológicas	49
1.1.1- Deformación por cizalla simple	50
1.1.2- Clasificación de un material según cizalla simple	51
Capítulo 2- Selección de las condiciones de preparación de los postres	54
2.1- Introducción	54
2.2- Materiales y métodos	61
2.3- Resultados y discusión	66
2.4- Conclusión	73
Capítulo 3- Selección de las formulaciones de los postres	74
3.1- Introducción	74
3.2- Materiales y métodos	75
3.2.1- Formulaciones ensayadas	75
3.2.1.1- Postres regulares	75
3.2.1.2- Postres de menor valor energético	76
3.2.2- Preparación de las muestras	77
3.2.3- Ensayo de textura	78
3.2.4- Determinación del valor energético	78
3.2.5- Ensayo sensorial	79
3.3- Resultados y discusión	80
3.4- Conclusiones	86
Capítulo 4- Efecto del tipo de fibra sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de los postres regulares	87
4.1- Introducción	87
4.2- Materiales y métodos	89
4.2.1- Materiales	89
4.2.2- Caracterización de las fibras	90

4.2.3- Formulaciones empleadas	91
4.2.4- Medidas instrumentales de textura	92
4.2.4.1- Ensayo a grandes deformaciones	92
4.2.4.2- Ensayo a bajas deformaciones	92
4.2.5- Estudio microestructural	93
4.2.6- Ensayo de sinéresis	93
4.2.7- Ensayo de color superficial	93
4.2.8- Ensayo sensorial	94
4.2.9- Análisis estadístico de los datos obtenidos	94
4.3- Resultados y discusión	95
4.3.1- Caracterización de las fibras empleadas	95
4.3.2- Propiedades de fractura, color superficial y aceptabilidad sensorial en postres con y sin fibras.	97
4.3.3- Propiedades mecánicas a bajas deformaciones, micro estructura y sinéresis durante el almacenamiento refrigerado	103
4.4- Conclusiones	109
Capítulo 5- Efecto del tipo de fibra en la textura y sinéresis de los postres con de menor valor energético	110
5.1- Introducción	110
5.2- Materiales y métodos	111
5.2.1- Materiales	111
5.2.2- Preparación de las muestras	112
5.2.3- Ensayo de textura	112
5.2.5- Determinación de sinéresis	113
5.2.4- Diseño experimental	114
5.3- Resultados y discusión	115
5.3.1- Modelos matemáticos	115
5.3.2- Efecto del tipo de fibra y los contenidos de almidón y carragenina en las propiedades mecánicas y sinéresis	118
5.3.3- Comparación con las formulaciones sin fibra	121
5.4- Conclusiones	122
Capítulo 6- Estudio de la vida útil microbiológica de los postres regulares con fibras	123

6.1- Introducción	123
6.2- Materiales y métodos	125
6.2.1- Materiales	125
6.2.2- Caracterización microbiológica de las fibras	125
6.2.3- Determinación de vida útil	125
6.3- Resultados y discusión	130
6.4- Conclusiones	132
Capítulo 7- Conclusiones	133
 Parte III- Yogures con fibras	 135
Capítulo 1- Introducción	136
1.1- Rol probiótico de las bacterias lácticas	139
1.2- Yogures con fibra dietaria	142
Capítulo 2- Preparación de los yogures con fibras	144
2.1- Elaboración industrial del yogur	144
2.2- Materias primas empleadas para preparar el producto	145
2.3- Modo de preparación del yogur	146
2.4- Conservación de cepas	147
Capítulo 3- Seguimiento de la presencia de ácidos característicos relacionados con el flavour utilizando HPLC	148
3.1- Introducción	148
3.2- Materiales y métodos	149
3.2.1- Determinación de ácidos orgánicos	149
3.2.2- Medición de pH	150
3.2.3- Análisis Estadístico de los datos obtenidos	154
3.3- Resultados y discusión	154
3.3.1- Determinación de ácidos orgánicos	154
3.3.2- Medición de pH	161
3.4- Conclusiones	162
Capítulo 4- Estudio del efecto de la fibra dietaria sobre la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro	163
4.1- Introducción	163
4.2- Materiales y métodos	166

	Índice
4.2.1- Simulación química del tracto digestivo	166
4.2.2- Técnicas analíticas	167
4.2.2.1- Determinación de Glucosa	167
4.2.2.2- Determinación de Calcio	168
4.2.2.3- Determinación de Hierro	168
4.2.3- Análisis Estadístico	170
4.3- Resultados y discusión	170
4.4- Conclusiones	175
Capítulo 5- Conclusiones	176
 Parte IV- Conclusiones finales	 178
 Bibliografía	 184
Símbolos utilizados	203

Parte I Introducción

Capítulo 1- Aspectos Generales

El concepto tradicional que dice que para el mantenimiento de una salud óptima la dieta diaria debe proveer cantidades adecuadas de nutrientes esenciales se ha ampliado, por la evidencia, cada vez más fuerte, de que los alimentos contienen también, sustancias fisiológicamente activas que cumplen una función que contribuye a reducir la incidencia de ciertas enfermedades y por tanto, son necesarias para una vida saludable (Vasconcellos, J.A., 2001).

La preocupación de los consumidores por la relación entre alimentación y salud es una tendencia mundial creciente. En consecuencia, la industria, siguiendo esta demanda, está continuamente creando nuevos productos para satisfacer esos requerimientos. (Pupponen-Pimiä y col., 2002). Los alimentos funcionales son el ejemplo, y dentro de este grupo, los que contienen fibra dietaria son muy tenidos en cuenta. Se ha comprobado que la fibra dietaria puede mejorar mecanismos de defensa, prevenir o mejorar la calidad de vida de pacientes con determinadas enfermedades, retrasar algunos procesos de envejecimiento, etc., como se detallará más adelante (Mälkki, 2004).

1.1- Alimentos funcionales

Se considera que fue en Japón donde se desarrolló la idea de los “alimentos funcionales” durante la década del 80. Esto surgió por la necesidad de reducir el alto costo de los seguros de salud, que debían brindar cobertura a una población cada vez más longeva gracias a los avances en el cuidado y a una buena nutrición.

La normativa japonesa define los alimentos funcionales como: **alimentos procesados que contienen ingredientes que ayudan a funciones corporales específicas, además de ser nutritivos.** Deben ser:

- A. Alimentos manufacturados a partir de ingredientes naturales (no son una cápsula, polvo o tableta).
- B. Alimentos que deben consumirse como parte de la dieta diaria.

C. Alimentos que cumplen un papel específico en las funciones del ser humano, incluyendo:

- mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica
- prevención o recuperación del paciente de una enfermedad específica
- control de las condiciones físicas y mentales
- retardo en el proceso de envejecimiento

Como los beneficios para la salud que ofrecen los alimentos funcionales se determinan por los ingredientes usados en su formulación, la legislación alimentaria japonesa reconoce 11 tipos principales de ingredientes que favorecen la salud: 1) Fibra dietética; 2) Oligosacáridos; 3) Polioles; 4) Péptidos y proteínas; 5) Glúcidos; 6) Alcoholes; 7) Isoprenoides y vitaminas; 8) Colinas; 9) Bacterias Lácticas; 10) Minerales; 11) Ácidos grasos poliinsaturados. El concepto, se ha esparcido desde entonces, a través de todo el mundo (Vasconcellos, 2001).

El **Código Alimentario Argentino** modifica por resolución del 14 de marzo de 2007, el Artículo 1339, incluyendo a los alimentos adicionados con fibra dentro del grupo de alimentos que satisfacen necesidades alimentarias específicas de determinados grupos de personas sanas.

1.1.1- Efectos de los alimentos funcionales

Es importante remarcar que los efectos de los alimentos funcionales pueden ser divididos en efectos funcionales y efectos sobre la salud.

Los efectos funcionales, como la modulación metabólica, la atenuación del colesterol, el equilibrio de la flora intestinal, la modulación inmunológica, la acción antioxidante, la activación de la citocromo oxidasa, etc., son acciones metabólicas más fáciles de poner en evidencia, y hay diversos trabajos científicos.

Los efectos sobre la salud, relacionados con prevención y cura de enfermedades o reducción de riesgo de dolencias, requieren el estudio con pacientes, aunque, es cada vez más amplio el conocimiento científico que correlaciona las funciones de varios componentes alimenticios (nutrientes y no

nutrientes) con la prevención y el tratamiento de enfermedades específicas (Rinaldi, y Mingo Arechederra, 2001).

A pesar de las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, todavía existen áreas que pueden ser exploradas como:

- ⌘ Determinación de la naturaleza y del tipo de las interacciones entre los nutrientes y los componentes no nutritivos de los alimentos y el organismo humano, a fin de establecer su valor.

- ⌘ Estudio de las tecnologías relacionadas para el desarrollo de nuevos productos con beneficio y aceptabilidad por parte del consumidor.

- ⌘ Caracterización científica de la interrelación entre los componentes funcionales y las enfermedades; y del mecanismo de acción de esos componentes en los procesos patológicos (Vasconcellos, 2001).

1.2- Fibra Dietaria

La fibra dietaria consiste en una gran variedad de sustancias y ha sido consumida, no siempre definida como tal, por centurias. A partir de la década del 70 se le han reconocido beneficios para la salud.

Recientes estudios epidemiológicos han mostrado que una dieta rica en fibra, generalmente refleja un estilo de vida saludable (Kritshesky, 2000). Sin embargo, aumentar el consumo de fibra en la dieta a sido un gran desafío, sobre todo en algunas poblaciones occidentales, donde el consumo es escaso.

1.2.1- Definiciones de la fibra dietaria

El término fibra dietaria fue acuñado por Hipsley en 1953 y ha recibido numerosas revisiones (Tunland y Meyer, 2002). Quizá, la definición más acertada es aquella propuesta por la Asociación Americana de Químicos de los Cereales (AACC) en el año 2001. Para ellos, la fibra dietaria comprende las partes comestibles de las plantas o carbohidratos análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con completa o parcial fermentación en el intestino grueso. La fibra dietaria incluye polisacáridos,

oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas a las plantas y promueve efectos fisiológicos beneficiosos como: efecto laxante y/o atenuación del contenido de colesterol en sangre y/o atenuación del contenido de glucosa en sangre.

La componente fisiológica de las definiciones tiene sus bases en observaciones y trabajos realizados por Trowell (1972-1974), Burkitt y col. (1974) y Painter (1975) en poblaciones rurales africanas. Estos notaron que un grupo de enfermedades entre las que se incluían a las enfermedades coronarias, diabetes, cálculos renales, divertículos, apendicitis, hernia de hiato, hemorroides, varices, constipación crónica y cáncer de colon, eran comunes entre las poblaciones de países occidentales técnicamente avanzados, y poco comunes en poblaciones rurales africanas. Estos médicos advirtieron que el alto contenido de fibra en las dietas de sus pacientes africanos era la causa del bajo índice encontrado, de estas enfermedades, con respecto al que se observaba en países occidentales.

En el año 2002, el panel para definir fibra dietaria de la academia nacional de ciencia de Estados Unidos estableció como FIBRA DIETARIA a los carbohidratos no digeribles que son intrínsecos y están intactos en los vegetales, FIBRA FUNCIONAL a los carbohidratos no digeribles aislados los cuales tienen efectos fisiológicos beneficiosos en humanos y FIBRA TOTAL a la suma de FIBRA DIETARIA y FIBRA FUNCIONAL. Sin embargo, la AACC publicó en 2003 un artículo en el cual se pondera la idea que no se puede hacer la distinción entre fibra funcional y no funcional. Según ellos, los beneficios para la salud son una característica de todas las sustancias químicas que abarcan la fibra dietaria.

El **Código Alimentario Argentino** establece por resolución del 14 de marzo de 2007, en el Artículo 1385, la siguiente definición: se entiende por Fibra Total la Fibra Alimentaria más la Fibra Parcialmente Asimilable.

Fibra Alimentaria: Es cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano. Determinada por el método 985.29 de A.O.A.C. 15th. Ed., 1990 (Método enzimático-gravimétrico) y el método AOAC 991.43 (1992).

Fibra Parcialmente Asimilable: Es el material resistente a la digestión y a la absorción en el intestino delgado humano con fermentación completa o parcial en el intestino grueso.

1.2.2- Clasificaciones y composición química de la fibra dietaria

Varios sistemas de clasificación han sido utilizados para agrupar a las sustancias integrantes de la fibra dietaria basados en: su rol en el vegetal, en el tipo de polisacárido, en su solubilidad gastrointestinal simulada, en el sitio de digestión, en los productos de digestión y en sus acciones fisiológicas. Sin embargo, ninguna es enteramente satisfactoria, ya que los límites entre unas y otras se solapan. Las más ampliamente difundidas y utilizadas son: por su solubilidad acuosa en un buffer de pH definido y por su fermentabilidad en un sistema in vitro que simula el intestino grueso (Tunland y Meyer, 2002). La fibra soluble puede ser dividida en viscosa y no viscosa, las cuales son diferentes en sus efectos fisiológicos. Si bien esta subdivisión es muy utilizada en la literatura, no se encuentra bien definida (Mälkki, 2004).

La mayoría de las plantas contienen los dos tipos de fibra, solubles e insolubles. En general, la fibra insoluble es la que se encuentra en mayor proporción. Entre las fibras solubles encontramos gomas, mucílagos, algunas pectinas y algunas hemicelulosas. Los alimentos que contienen alto contenido en fibra soluble se pueden mencionar avena, cebada, legumbres y algunos vegetales tales como papa y batata. Los demás cereales, frutas y vegetales contienen pequeñas cantidades de fibra soluble. Las fibras insolubles incluyen lignina, celulosa, y algunos tipos de hemicelulosa y pectinas (Meister, 1996). Generalmente, las fibras fermentables son solubles en agua, mientras que las fibras parcial o pobremente fermentables son insolubles.

Las definiciones más recientes de fibra dietaria según Tunland y Meyer (2002), incluyen en general, las siguientes sustancias: polímeros que no son almidón (**PNA**), oligosacáridos no digeribles o resistentes (**OR**), lignina, sustancias asociadas con PNA (en vegetales), carbohidratos análogos y fibras de origen animal (Tabla I.1).

Todos los **PNA** son polisacáridos no digeribles (**PND**). Estos resisten a la digestión en el intestino delgado y son fermentados en el intestino grueso. Estos polisacáridos son típicamente largas cadenas de carbohidratos poliméricos que contienen más de 100.000 unidades monoméricas.

Tabla I.1- Constituyentes de la fibra dietaria

Constituyentes de la fibra	Grupos Principales	Composición química/fuentes
Polisacáridos-No-Almidón (PNA) y oligosacáridos no digeribles	Celulosa	Celulosa (vegetales, salvados de granos)
	Hemicelulosa	Arabinogalactanos, β -glucanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos, xiloglucanos, galactomananos, sustancias pécticas
	Polifruktosas Gomas y Muclagos	Inulina, oligofruktanos Extractos de semillas (galactomananos), exudados de árboles (goma acacia, karaya, tragacanto), polisacáridos de algas (alginatos, agar, carrageninas), psyllium
Carbohidratos análogos	Pectinas	Frutas, vegetales, legumbres, papa, remolacha
	Almidones resistentes y maltodextrinas	Maíz, porotos, papa
	De síntesis química	Polidextrosa, lactulosa, derivados de celulosa (MC, CMC, HPMC)
Lignina	De síntesis enzimática	fructooligosacáridos (FOS), goma xantan, transgalactooligosacáridos (TOS), levan, xilooligosacáridos (XOS), goma guar hidrolizada
	Lignina	Plantas leñosas
	Ceras, cutina, suberina	Vegetales
Sustancias asociadas con polisacáridos-no-almidón	Quitina, quitosano, colágeno, condroitina	Crustáceos, hongos y levaduras
Fibras de origen animal		

Los polisacáridos difieren en el número y tipo de monómeros unidos, el orden en la cadena, los tipos de unión entre varios monómeros, la presencia de puntos de ramificación en el esqueleto de la molécula y si tienen o no grupos ácidos (por ejemplo: ácido urónico en las pectinas). Ejemplos de los PNA son: la celulosa (Figura I.1) que es un polímero de glucosa sin ramificaciones con uniones β -glicosídicas, las hemicelulosas, también llamadas β -glucanos (Figura I.2), que

Fig. I.1- Estructura de la celulosa. Nótese los enlaces β -D-1,4-glicosídicos

Fig. I.2- Estructura de β -glucanos

contienen varios monosacáridos distintos de glucosa en su cadena principal (como arabino-galactanos o arabino-xilanos, Figura I.3) y otros en sus cadenas laterales (exhiben gran solubilidad que está asociada con un alto grado de ramificaciones;

Fig. I.3- Monosacáridos que constituyen las hemicelulosas (Schneeman, 1986)

Schneeman, 1986), las **pectinas** (Figura I.4) que están compuestas primariamente por ácido galacturónico, sin embargo puede tener otros carbohidratos unidos a él (la metilación parcial de los grupos carboxilos sobre el ácido galacturónico le confiere importantes propiedades), **gomas** y **mucílagos**.

Fig. I.4- Estructura básica de las pectinas

Los **oligosacáridos resistentes (OR)** también llamados oligosacáridos no digeribles (**OND**), tales como los fructanos, se caracterizan por un grado de polimerización (GP) relativamente bajo, comparados con los PNA. La definición estricta de un oligosacárido es una cadena de monómeros unidos con un GP de 3 a 10 (Englyst y Col. 1995). Los fructooligosacáridos (**FOS**), también llamados **Oligofructosas**, difieren de los fructopolisacáridos (**Inulina**) solamente en el largo de la cadena. Mientras los FOS tienen promedio de GP de 2 a 4, la inulina tiene un

GP promedio de 10. Ambos tienen una unidad terminal de glucosa unida a la fuctosa por unión α 1- β 2 (de Oliveira Haully y Moscatto, 2002). También integran este grupo los galactooligosacáridos (GOS, Figura 1.5) y los transgalactooligosacáridos (TOS o TGOS). Los GOS son producidos a partir de la lactosa por la acción transglicosilativa de la β -galactosidasa. Ellos consisten en una cadena de residuos galactosilo con uniones β -1,6 con una glucosa terminal unida por enlace α -1,4 (Southgate, 1976 y 1982). Otro tipo de GOS son los galactosil-sacarooligosacaridos que se aíslan naturalmente de la soja e incluyen: rafinosa, estaquiosa y verbascosa. Consisten en residuos de galactosa unidos a la glucosa de la sacarosa con enlaces α -1,6. Los TOS son el producto de la transgalactosilación enzimática de la lactosa. Los oligómeros son lineales y consisten en moléculas de lactosa con varias galactosas con uniones α -1,6 y α -1,4. Los OR se encuentran bien definidos en artículo 1385 del Código Alimentario Argentino desde marzo de 2007.

Fig. 1.5- Estructura de los Galactooligosacáridos

La lignina es un polímero de fenilpropano (no es un carbohidrato), que está covalentemente unido a la celulosa de la pared celular de los vegetales. La lignina tiene una composición heterogénea con una o dos unidades de varios fenilpropanos que están unidos cíclicamente.

Los carbohidratos análogos son compuestos semejantes a los encontrados en la naturaleza. Estas sustancias han demostrado tener propiedades fisiológicas semejantes a los naturales. Ellos pueden ser producidos durante el

procesamiento de los alimentos, por tratamiento químico y/o físico o por síntesis o aislamiento como una forma concentrada desde el vegetal nativo. Son ejemplos, los almidones y maltodextrinas resistentes (Tabla 1.1), compuestos de síntesis química como la polidextrosa y celulosas modificadas (Figura 1.6) y sustancias de

Fig. 1.6- Estructura de Celulosas Modificadas

síntesis enzimática como los FOS y goma xántica. Los FOS sintéticos son el producto de la hidrólisis enzimática (enzima fructofuranosidasa fúngica) de la inulina, o de la síntesis, o de la transfructosilación de la sacarosa. La oligofructosa sintética contiene $\alpha(2,1)$ cadenas de fructosa con o sin unidades de glucosa terminales. Las cadenas varían de 2 a 8 residuos de monosacáridos. También pertenecen a este grupo los TOS.

Las fibras de origen animal son aquellas aisladas de crustáceos (quitina y su derivado químico, el quitosano) y otras sustancias como colágeno y condroitina aisladas de otros organismos.

El almidón resistente está definido como la suma de almidón y productos de la degradación del almidón que no son hidrolizados por las enzimas presentes

en el intestino delgado de individuos sanos (Englyst y Cummings 1990). Una clasificación de estos almidones está basada en el origen de su resistencia a la digestión y ha sido propuesta por Englyst y Col. (1992).

Los almidones resistentes no son un grupo homogéneo y han sido agrupados en subcategorías RS1, 2, 3 y 4. **RS1** agrupa a los almidones cuya resistencia se debe a que el almidón ha sido atrapado físicamente, como ocurre en granos parcialmente molidos, semillas o legumbres. **RS2** incluye gránulos de almidón que han resistido fuertemente a la degradación por alfa-amilasa hasta que han gelatinizado. Esta forma se encuentra típicamente en papa cruda o mal cocinada, banana (particularmente cuando está verde) y almidón de maíz con alto porcentaje de amilosa. **RS3** agrupa a polímeros de almidón retrogradados que provienen de alimentos procesados o de las fuentes mencionadas anteriormente. **RS4** incluye almidones resistentes producidos comercialmente, químicamente modificados, que son degradados por amilasas en fracciones alcohol solubles, que se usan en muchos alimentos.

Las **sustancias asociadas a vegetales** que pueden ser clasificadas como fibra dietaria incluyen ceras y cutinas. Estos componentes se encuentran en forma de capas en la superficie de las paredes celulares. Poseen largas cadenas hidroxialifáticas de ácidos grasos y son hidrofóbicas. La suberina, que puede pertenecer a este grupo, no ha sido totalmente caracterizada, pero se especula que es una molécula altamente ramificada que contiene fenoles e hidroxiácidos polifuncionales y ácidos dicarboxílicos esterificado a la pared celular.

1.2.3- Propiedades fisicoquímicas

La fibra dietaria posee varias propiedades fisicoquímicas que son muy importantes porque determinan ciertas respuestas fisiológicas y sus aplicaciones en tecnología de alimentos.

La *solubilidad en agua* se ve incrementada por las siguientes características del esqueleto polimérico: mayor cantidad de ramificaciones (goma acacia), presencia de grupos ionizables (metoxilación de las pectinas), potencialidad de intercambiar posiciones de unión de los monómeros (en los β -glucanos hay

mezcla de uniones 1-4 y 1-3) y alteraciones en las formas moleculares (formas α o β) de los monómeros que conforman el polímero.

Las fibras modifican la *viscosidad* de soluciones acuosas. Generalmente, a mayor peso molecular o largo de las cadenas de las fibras, aumenta la viscosidad de la solución. Se sabe que los polímeros de cadenas largas, como las gomas guar y tragacanto, provocan soluciones muy viscosas. En cambio, polímeros de cadenas relativamente cortas y muy ramificadas tienen baja viscosidad en solución (goma arábica, inulina y oligosacáridos).

La *capacidad de formar geles* es un importante atributo de algunas fibras. La gelación representa la asociación de polímeros para formar una red. El gel retiene agua y otros compuestos que estén en solución para constituir una estructura tridimensional firme. Su formación depende del tipo de sustancia (gomas guar, arábica, karaya, tragacanto y carragenina), su concentración, temperatura, presencia de iones (calcio, potasio), pH y la presencia de otros modificadores reológicos en el caso de los sistemas alimenticios.

La *capacidad de retención de agua* es la cantidad de agua que un gel retiene en su estructura sin la aplicación de presión o cizalla. Las pectinas, mucílagos y algunas hemicelulosas poseen una gran capacidad de retención de agua. Esto ocasiona una alta viscosidad en el contenido del estómago e intestino delgado y está conectado con la disminución de la capacidad gástrica y aumento del tiempo de residencia en el intestino delgado.

La *capacidad de unir agua* es la cantidad de agua que un gel retiene en su estructura luego de la aplicación de una fuerza, como por ejemplo movimientos peristálticos o centrifugación. Esta propiedad tiene mayor importancia práctica ya que, en los procesos de manufactura de alimentos, se aplican presiones, como por ejemplo: extrusión mezclado, homogeneización, bombeo por tuberías, etc. Esta propiedad, es influenciada por el tipo de compuesto químico, el largo y el tamaño de las fibras y la porosidad del gel formado. También es afectada por las condiciones del medio como: pH, fuerza iónica, concentración de la fibra e interacción con otras sustancias capaces de unir agua (Tungland y Meyer, 2002).

La *absorción de moléculas orgánicas* se refiere a la absorción de ácidos biliares, colesterol y compuestos tóxicos. Estudios in vitro (Cho y col., 1997) han

demostrado que la lignina absorbe ácidos biliares. Pectinas y polisacáridos ácidos también parecen secuestrar ácidos biliares. La celulosa tiene, en contraste, poca habilidad de unión de ácidos biliares. La absorción de ácidos biliares se estudia *in vivo* midiendo el contenido de los ácidos biliares en la materia fecal y la excreción de esteroides. El incremento de la excreción de los ácidos biliares y esteroides, ha sido correlacionada a su vez, con la disminución de colesterol en plasma, por efecto de la fibra soluble viscosa, como psyllium y fibra de avena (Mätkki, 2004).

La capacidad de *intercambiar cationes* es debida a la unión de minerales y electrolitos a la matriz de fibra. Esto, puede provocar la reducción de la disponibilidad de minerales y la absorción de electrolitos en el tracto digestivo. El número de grupos carboxilo libres en los residuos de azúcar y el contenido de ácido urónico, ácido galacturónico no metilado y ácido fítico de los polisacáridos parecen estar relacionados con las propiedades de intercambio de cationes de las fibras. Esta propiedad está influenciada por: el pH, la fuerza iónica y la naturaleza química del ión (Thibault y col. 1992).

1.2.4- Efectos fisiológicos de varios tipos de fibras

El tracto gastrointestinal es el área de acción primaria de la fibra dietaria. El intestino delgado se divide en tres porciones, desde el estómago al intestino grueso: duodeno, yeyuno e íleon y presentan la misma estructura histológica. Tiene la función de degradar, absorber y movilizar el líquido que proviene del estómago (Geneser, 1992). La fibra que aumenta la viscosidad de soluciones acuosas, puede afectar los movimientos del intestino. En el duodeno, la motilidad es reducida por el aumento de la viscosidad del líquido intestinal, la cual puede contrarrestar las contracciones. Por otro lado, la motilidad es favorecida por la colecistoquinina. Su secreción es estimulada por el aumento de la viscosidad. El efecto neto es un mínimo retardo en la motilidad (Vahounny y Cassidy, 1985). Los ácidos grasos de cadena corta formados en el intestino grueso a partir de las fibras solubles (como se explica más adelante), estimulan las contracciones de la zona de unión entre el íleon y el colon, protegiendo al íleon del reflujo del colon ya

sea, influenciando directamente al músculo liso o a través del sistema neurohormonal que involucra la acción de péptidos regulatorios (Mälkki, 2004).

El intestino grueso se divide el ciego, colon, recto y conducto anal (Geneser, 1992). Tiene la función de conservar agua y electrolitos, y la posibilidad de digerir material residual que ha pasado del intestino delgado sin ser absorbido ni degradado. Además, provee una ruta de escape para residuos, material no digerido y toxinas. Es la región del tracto digestivo más fuertemente colonizada, con más de 10^{11} a 10^{12} bacterias anaeróbicas por cada gramo de contenido intestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). Estas bacterias producen enzimas que adicionalmente digieren proteínas y carbohidratos como las fibras, que han pasado sin digerir por el intestino delgado (Nordgaard y Mortensen 1995). La fibra insoluble actúa aumentando el peso seco y húmedo del contenido del colon y de las heces por su efecto de retener agua. La fibra soluble causa el mismo efecto, primero reteniendo agua y luego debido al aumento de la masa bacteriana que tiene, a su vez, un alto contenido de agua (Mälkki, 2004).

Muchas variables pueden influenciar el grado de fermentación de la fibra, y consecuentemente, la naturaleza y cantidad de los productos finales de la fermentación, que incluyen gases (metano, hidrógeno, dióxido de carbono), ácidos orgánicos de 2 a 5 carbonos como acético, butírico, propiónico, valérico, etc., también llamados ácidos grasos de cadena corta (SCFA, en inglés) y un incremento en la masa bacteriana. Esto último ha sido estudiado midiendo el contenido de ácido murámico en las heces, ya que solo se encuentra en las bacterias (Chen y col., 1998). El grado de fermentación de las fibras varía típicamente desde fermentación completa (varias fibras solubles) a fermentación mínima como en el caso de la celulosa (insoluble). Roland y col. (1995) observaron en un estudio con ratas, un aumento en la producción de SCFA con inulina en comparación con otras fibras utilizadas: salvado de trigo, vaina de legumbre, salvado de avena, semilla de cacao y fibra de zanahoria. Green y col. (1998) trabajaron con materia fecal humana y distintos tipos de fibras y observaron diferencias significativas en la producción de SCFA y gases según el tipo de fibra. Telung y col. (1987) notaron que la goma guar promovía una fermentación rica en propiónico, mientras que la goma arábica favorecía la producción de acético y

butírico. Botham y col. (1998) propusieron que el grado de fermentación y la concentración de los SCFA, variaban con la naturaleza química de la fibra. La celulosa que tiene uniones β -1,4 es escasamente fermentada, mientras que, el almidón con uniones α -1,4 y α -1,6, es mucho más susceptible. También observaron que films de amilosa limitaban la fermentación, debido a un acceso limitado de las enzimas, mientras que, la amilosa gelificada tenía un mejor acceso para las enzimas y era fermentada en mayor grado.

Las fibras que promueven la fermentación también aumentan la población bacteriana y este efecto se ha denominado como actividad prebiótica de las fibras (Reddy, 1999).

Los productos finales de la fermentación como los gases y los SCFA, y el aumento de la microbiota intestinal juegan un papel muy importante en los efectos fisiológicos de la fibra, tanto en el colon, como a nivel sistémico. En el intestino, los SCFA inhiben el crecimiento de patógenos y de células malignas, incrementa la absorción de minerales y favorece la producción de ciertas vitaminas. Los SCFA absorbidos por el sistema porta y captados por el hígado y los riñones pueden influenciar en el metabolismo provocando cambios en la glucemia, lipidemia, uremia y en el balance de nitrógeno (Mälkki, 2004).

1.2.5- Influencia de la fibra dietaria en la prevención de enfermedades y promoción de la salud

1.2.5.1-Constipación

El efecto beneficioso más ampliamente aceptado es el de aliviar la constipación. En conjunto con otras terapias, la fibra es también usada para tratar la constipación crónica en la niñez.

La fibra actúa absorbiendo agua mientras transita por el aparato digestivo, aumentando la masa de las heces. El uso de fibra es seguro siempre que el paciente aumente el consumo de líquidos. La fibra, especialmente la insoluble, actúa como una esponja, absorbiendo grandes cantidades de agua. Si la ingesta de líquidos es baja, la fibra puede aumentar la constipación e incluso producir una obstrucción del colon. Por esta razón se sugiere a la gente que desea aumentar su

ingesta de fibra que deben tomar al menos medio litro de agua adicional diariamente (Meister, 1996). Para que el tránsito intestinal sea el correcto es necesario un adecuado consumo de agua y un colon lubricado (adecuada producción de mucus). Bajo condiciones normales, el colon gradualmente se deshace del agua remanente y forma la masa fecal, la cual se mueve hacia el recto como el resultado de una onda de presión suave.

Si alguno de los dos factores no se presenta adecuadamente y en personas que ingieren fibra en baja proporción, se genera una masa fecal dura, seca y pequeña, la cual se pega a la pared seca del colon, requiriendo que se desarrolle una onda de alta presión para ser removida. Esto puede pasar durante años, hasta que el colon no pueda generar tanta fuerza y requiera ayuda para poder hacerlo, y los músculos abdominales comienzan a dar esa fuerza necesaria. Esto es lo que comúnmente se conoce como estreñimiento, lo cual origina una presión en las paredes abdominales, ayudando el desarrollo de hernias, várices (debido a la presión a lo largo de las venas de las piernas), hernia de hiato (debido a una presión ascendente que fuerza al estómago dentro del pecho), diverticulitis, diverticulosis y hemorroides (Meister, 1996).

Cuando el consumo de fibras es el adecuado, éstas, comportándose como millones de pequeñas partículas que atraen al agua, se mezclan con la masa fecal. Cada una de ellas absorbe líquido, dándole a las heces la forma y la humedad requerida para que puedan ser removidas fácilmente por el colon.

1.2.5.2- Diverticulosis

Los divertículos son pequeñas proyecciones con forma de dedo en la pared del colon. Se ha estimado que un tercio de los norteamericanos mayores de 45 años y dos tercios de todas las personas mayores a 85 años tienen divertículos en su colon. En la mayoría de los casos no presentan síntomas.

La diverticulosis no presenta serios problemas. En algunos individuos, sin embargo, los divertículos se inflaman provocando diverticulitis acompañado de fuertes dolores. Su tratamiento puede llegar a necesitar hospitalización, antibióticos y hasta intervención quirúrgica (Meister, 1996).

Los médicos les recomiendan a sus pacientes que aumenten el consumo de fibra, porque puede aliviar la constipación y otros síntomas padecidos por personas con diverticulosis. Algunas evidencias científicas indican que una dieta con alto contenido en fibra puede prevenir el desarrollo de la diverticulosis.

Los resultados de un largo estudio hecho en Estados Unidos sostienen la idea que la fibra tiene un efecto preventivo en contra de esta enfermedad. Este estudio, el cual involucró más de 40.000 personas de edad media a ancianos, demostró que aquellos con una alta ingesta diaria de fibra tenían menores riesgos de padecer diverticulosis sintomática (Meister, 1996).

1.2.5.3- Cáncer de colon

Se supone que altos consumos de fibra reducen el riesgo de contraer cáncer de colon, uno de los tipos de cáncer más comunes en sociedades occidentales. Desde 1970, un gran número de estudios se han estado llevando a cabo para descifrar el rol de la fibra dietética en el cáncer de colon, con resultados consistentes sugiriendo una reducción del riesgo con un aumento en el consumo (Leach, 2007).

Fibras prebióticas como inulina, almidones resistentes y ciertos oligosacáridos, actúan como sustratos selectivos de ciertas bacterias intestinales y disminuyen el pH intestinal (Green y col. 1998). El ácido butírico ha mostrado que aumenta la apoptosis en líneas celulares de tumor de colon (Hague y col. 1993; Scheppach y col. 1995; Scheppach, 1998). La apoptosis es el mecanismo por el cual células redundantes son removidas durante el desarrollo de un tejido, manteniéndose, de esta manera, un estricto control del tamaño del mismo. Es un mecanismo de defensa natural contra la carcinogénesis. Otros trabajos sugieren que un aumento en el número de bifidobacteria en el colon, tiene también, un impacto directo positivo (Goldin y Gorbach, 1980; Hill, 1988, Koo y Rao, 1991).

1.2.5.4- Cáncer de mamas

La mayoría de los estudios científicos en fibras y cáncer están orientados al cáncer de colon, pero existe también un gran interés en la posibilidad de que un alto consumo de fibras tenga influencia en el cáncer de mamas. Se ha sugerido

que altas ingestas podrían reducir el riesgo de cáncer de mamas por la reducción del nivel de hormonas femeninas, estrógeno, pero es simplemente una hipótesis, ya que la investigación se encuentra en los primeros pasos.

Se han llevado a cabo varios estudios con pacientes bajo control en diversas poblaciones alrededor de todo el mundo, concluyendo en una disminución del riesgo de cáncer de mamas asociada con un aumento de fibra dietética en la ingesta diaria. Se han sugerido numerosos posibles mecanismos de acción, todos incluyendo una reducción del nivel de estrógeno bioactivo en la sangre (Stoll, 1996).

Para conocer la relación entre la fibra dietética y el cáncer de mamas, De Stefani y col. (1997), realizaron un estudio involucrando 351 pacientes recientemente diagnosticadas con cáncer de mamas y otras 356 pacientes hospitalizadas. Les fueron proporcionadas unas dietas estrictamente controladas con largos cuestionarios, permitiendo así el cálculo de la energía total consumida por éstas. Los nutrientes residuales fueron analizados.

Después de tener a todas las pacientes bajo condiciones controladas (edad, vivienda, antecedentes familiares de cáncer y de enfermedades benignas de mamas, maternidad, energía total, carnes rojas, y menopausia), se determinó que las fibras dietéticas estaban asociadas con un fuerte descenso en el riesgo de cáncer de mamas. El resultado se observó en mujeres tanto pre como posmenopáusicas, y era similar para fibras solubles e insolubles.

1.2.5.5- Nivel de colesterol en sangre

Diversos estudios realizados demostraron que algunos tipos de fibras tenían como consecuencia una disminución en el nivel de colesterol. Las fibras solubles, tales como avena, pectinas, goma guar, Psyllium y legumbres (Ripsin y col., 1992; Cerda y col., 1988; Glore y col., 1994). Salvado de trigo y celulosa no reducen el nivel de colesterol.

La acción de la fibra en este problema es imperceptible, por lo que se requiere grandes dosis basadas en dietas diarias para obtener la respuesta deseada. Un plato ocasional de avena no será la solución, en cambio una ingesta

diaria regular de productos con avena o Psyllium producirá una disminución del nivel de colesterol del 2 ó 3 % (con considerable variación según la persona).

Pero este tipo de productos no debe ser visto como una opción de dieta reductora de colesterol, ya que su efecto no es lo suficientemente poderoso como para ser usado de ese modo. Sin embargo, pueden ser efectivamente utilizados como suplemento de una dieta convencional para el tratamiento del colesterol elevado. Investigaciones recientes señalan que un refuerzo en el consumo de las fibras apropiadas puede guiar a una disminución del colesterol en adición a la provocada por la dieta baja en grasas. Esta reducción no es un fenómeno temporal sino que éste persiste en pacientes que consumen suplementos dietarios. En tal sentido Anderson y col. (1988) advirtieron que Psyllium, funcionaba mejor en pacientes con un alto nivel de colesterol, con descensos de hasta el 25%.

La fibra actúa uniendo colesterol y bilis en el tubo digestivo, previniendo su absorción y su recirculación. En consecuencia, el colesterol que pasa al torrente sanguíneo es menor y su nivel en sangre disminuye. El hígado produce bilis a partir del colesterol. Si más bilis se pierde en el intestino por unión a la fibra, mayor será la cantidad de colesterol que utilice el hígado para reemplazarla, resultando nuevamente en un menor nivel de colesterol en sangre. Al mismo tiempo, la fermentación de las fibras solubles en el intestino produce ácidos grasos de cadena corta, los cuales bloquean la síntesis de colesterol.

1.2.5.6- Enfermedades coronarias

Numerosos estudios han sido realizados acerca de este tema. En general las conexiones entre el consumo de dietas altas en fibra y la disminución de riesgos de enfermedades coronarias son importantes. Sin embargo, están basadas en el funcionamiento de las fibras a través de distintas respuestas: obesidad, coagulación de la sangre, nivel de colesterol en sangre, nivel de insulina, o por efecto directo en el desarrollo de la aterosclerosis.

Marckmann P. y col. (1994), realizaron un estudio en Inglaterra. Suministraron a un conjunto de 21 individuos de edad media dos dietas diferentes: una baja en grasas y alta en fibras (28 % energía) y otra alta en grasas (39 %

energía). Después de dos semanas los resultados revelaron que la primer dieta tenía efectos reductores sobre el LDL (*low density lipoprotein*), sobre el HDL (*high density lipoprotein*), y sobre los triglicéridos de tránsito rápido por el sistema digestivo. Además se pudo comprobar que esta dieta disminuía la actividad coagulante y aumentaba la actividad del plasma fibrinolítico.

1.2.5.7- Diabetes

Durante los 80's se sospechó que el nivel de glucosa en sangre podría ser disminuido incluyendo fibras, especialmente solubles, en la dieta. La Asociación Americana de Diabetes (ADA), recomendaba el consumo de 40 g por día a personas con diabetes. Sin embargo, con el tiempo se hizo evidente que la ingesta de fibras en este tipo de pacientes debía ser aún mayor. Asimismo sólo unos pocos tipos de fibra viscosa soluble (como la goma guar) eran efectivos.

Cameron-Smith y col. (1997) realizaron un estudio en ratas, comparando el resultado obtenido en éstas, usando fibras solubles (goma guar) e insolubles (salvado de trigo). El experimento manifestó la efectividad de la goma guar sobre la fibra insoluble.

Al mismo tiempo se efectuaron otros estudios con goma guar (Gatenby y col., 1996) y con avena (Pick y col., 1996, Chandalia y col., 2000), esta vez con pacientes, todos ellos indicando una mejora en las respuestas glucémicas, insulinémicas y lipidémicas, como descensos del nivel de glucosa e insulina en el plasma.

Un estudio realizado por Ludwing (1999) durante 10 años y concluido en 1999 reveló que la ingesta de fibra dietética reduce la secreción de insulina retardando la velocidad de absorción de nutrientes después de cada comida. Esta experiencia se efectuó sobre 2909 pacientes tanto blancos como negros, de entre 18 y 30 años. Los pacientes fueron llevados a condiciones controladas (nivel de insulina, peso corporal, lípidos en sangre, etc.) y se adquirieron muestras a los 2, 5, 7 y 10 años. Los investigadores postularon que la fibra dietética podría prevenir hiperinsulinemia, reduciendo los niveles de insulina y previniendo la obesidad asociada con la resistencia a la insulina. Está confirmado que altos niveles de

insulina se hallan relacionados con el aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Por lo tanto, se pudo concluir que dietas con alto contenido calórico y bajas en fibras incrementan el riesgo cardiovascular en individuos con diabetes, ya que, promueven la obesidad.

1.2.5.8- Control de peso

Normalmente los alimentos ricos en fibra son de bajo contenido calórico y de bajo contenido en grasas también, los cuales producen una sensación de saciedad en el estómago, al menos provisoriamente. Por estas razones, cuando una persona se encuentra haciendo dieta para bajar de peso se le aconseja incluir en ésta alimentos de alto contenido en fibras (Meister, 1996).

Las fibras estimulan la secreción de ciertas hormonas, las cuales advierten al cerebro que ya hemos comido demasiado, brindándonos una sensación de saciedad (Mälkki, 2004). Ya se mencionó que la ingesta de fibra dietética reduce la secreción de insulina retardando la velocidad de absorción de nutrientes después de cada comida (Ludwing, 1999).

De todos modos, el control de peso es algo que concierne a nuestro estilo de vida. Existen diversas formas de bajar de peso, distintos tipos de dietas, generalmente cortas; pero el verdadero desafío es el de mantenernos estables por un largo tiempo, ya que cuando finaliza o se interrumpe una dieta generalmente se recupera el peso perdido. Esto se debe, generalmente, a que los alimentos de dieta resultan poco atractivos para los consumidores. Este problema podría ser superado, para el caso de las fibras, con una adecuada selección de las mismas; con el desarrollo de nuevos productos que las contengan e incrementando gradualmente el consumo diario.

1.2.6- Fibras y nutrición

Para la mayoría de las enfermedades y problemas antes mencionados, se ha demostrado que los efectos beneficiosos provienen de las dietas altas en fibra, más que de las fibras solas. Por esta razón es que es aconsejable aumentar el

consumo de fibra aumentando el consumo de cereales, legumbres, vegetales y frutas.

El valor recomendado de consumo de fibra es de 25 g por día por persona, consumiendo 2000 Kcal diarias, o 30 g con 2500 Kcal. En las dietas occidentales lograr ese objetivo implica un cambio sustancial en sus hábitos, ya que el consumo promedio es de 13 g por día (Green, 2000).

Los SCFA que resultan de la fermentación en el intestino grueso proveen una cierta cantidad de energía a partir de su metabolismo en el hígado. Por lo tanto la energía contenida en la fibra depende, desde el punto de vista científico, del grado de fermentación. Las fibras que no son fermentadas tienen un contenido calórico cercano a 0 Kcal/g, mientras que la energía suministrada por las fibras fermentables está en el rango de 1,5 a 2,5 Kcal/g (Livesey 1990; Smith y col. 1998).

El **Código Alimentario Argentino** en el Artículo 1385 además de definir la Fibra Total, establece lo siguiente: para el cálculo del Valor Nutricional de un alimento se considerará para la Fibra Alimentaria (polisacáridos no-almidón, lignina, almidón resistente, quitina, quitosano y no-carbohidratos) un valor calórico de 0 Kcal/g Para la Fibra Parcialmente Asimilable [gomas, psyllium, inulina, oligofructosa, polidextrosa, maltodextrinas resistentes, fructooligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), trans-galacto-oligosacáridos (TOS)] se considerará a la inulina y las oligofructosas con un valor calórico de 1.5 Kcal/g para cada una y a la polidextrosa con un valor calórico de 1 Kcal/g

1.2.7- Potenciales peligros de la fibra dietaria

El consumo de cantidades moderadas de fibra es generalmente seguro. Sin embargo, existe la posibilidad de que excesivas cantidades de fibra repercutan de un modo adverso en nuestra salud. Mucha gente ha advertido trastornos gastrointestinales, tales como gases, flatulencias y diarrea. Sin embargo, estos síntomas desaparecen a medida que el cuerpo se adapta a elevados consumos de fibra. Como ya fue mencionado, aquellos que quieran incrementar la cantidad de fibra en su dieta diaria deberán reforzar su consumo de agua para evitar

constipación y obstrucción intestinal. Existen casos poco usuales de reacciones alérgicas y obstrucciones de esófago en algunos individuos (Meister, 1996).

Como ya se mencionó, la capacidad de intercambiar cationes de algunas fibras, puede provocar la reducción de la disponibilidad de minerales y la absorción de electrolitos en el tracto digestivo.

1.2.8- Fibras en la niñez

Recientes informes científicos han sugerido modificar las dietas de los niños incrementando las cantidades de fibra (Williams, 1995). Estas son valiosas, ya que ayudan a prevenir la constipación, un problema muy común en la niñez (Dwyer, 1995). Asimismo lograría acostumbrar a los niños a ciertos hábitos que podrían reducir el riesgo de enfermedades crónicas en la adultez.

Es importante, sin embargo, ser muy cauteloso en las modificaciones de sus dietas. A diferencia de los adultos, los niños precisan crecer y desarrollarse. Sus necesidades esenciales de calorías y nutrientes para poder llevar un normal crecimiento deben estar por encima de la posibilidad de prevenir enfermedades varias décadas más tarde.

Diversos estudios se han realizado respecto a este tema (Williams, 1995). La recomendación de la ingesta de fibras fue desarrollada en base a la edad y peso corporal: 0,5 g de fibra dietética por Kg o para niños mayores de tres años, la edad más 5 g por día.

1.3- Industria láctea

1.3.1- Situación mundial

Cuando se analizan las industrias lácteas, se observa que el mercado mundial se encuentra especializado, tanto en las empresas como en los países. La clasificación que se utilizará para analizarlo es la siguiente:

- La leche fluida: es aquella que se procesa para consumo directo (leche fresca). Se clasifica principalmente en leche pasteurizada y leche esterilizada. La

leche esterilizada posee una vida útil de seis meses aproximadamente y no requiere refrigeración, por lo que se la puede almacenar a temperatura ambiente. La leche pasteurizada tiene una duración escasa de tan sólo cinco a siete días en refrigeración.

- Leche en polvo: La producción de leche en polvo se divide en dos grandes grupos, uno integrado por países desarrollados (EE.UU., Canadá y U.E.) con producciones subsidiadas; y otro integrado por países con bajos costos de producción como Australia, Nueva Zelanda, Argentina y Uruguay, que poseen condiciones agroclimáticas muy favorables para la producción y cuentan con la infraestructura necesaria. Dentro de la clasificación se encuentran las leches enteras y descremadas en polvo.

- Quesos: La oferta de quesos de alto valor es dominada por Europa, con reconocimiento mundial. Los países con bajos costos de producción de leche dominan el mercado mundial de quesos comerciales, sobre todo del tipo para fundir. Los quesos se clasifican de acuerdo al tiempo de maduración y al contenido de humedad, en blandos (46% al 55% de humedad), semiduros (36% al 46% de humedad) y duros (menos del 36% de humedad). Los quesos fundidos no se categorizan por su contenido de humedad.

- Otros productos lácteos: que agrupan a: yogures y similares, subproductos y derivados. Estos últimos incluyen la caseína, sueros y otros que participan cada vez más como materias primas de productos alimenticios y farmacéuticos.

La producción mundial de leche cruda alcanzó, en el 2004, un volumen de 515,84 millones de toneladas. El bloque europeo fue el primer productor con el 23% del total mundial de leche cruda, representado por 131 millones de toneladas. Argentina se ubicó en el onceavo lugar en el ámbito mundial, en la producción de leche cruda, con 9,2 millones de toneladas (2% del total, año 2004), y fue el segundo productor de América del Sur detrás de Brasil.

Cuando se analizó la producción de quesos sin distinguir por tipos, la UE se volvió a encontrar en primer lugar con 6,3 millones de toneladas y EE.UU. en segundo lugar con una producción cercana a los 4 millones de toneladas. Estos dos abarcaron el 77% de la producción y consumo mundial. Por su parte,

Argentina, con 345 mil toneladas, fue el sexto productor mundial (Industria Láctea, 2005).

1.3.2- Mercado local

En 2003 la industria láctea argentina, con sus 848 plantas industriales y 30.000 empleados, se ubicó en tercer lugar dentro de las industrias de alimentación del país y participó con el 12% del producto bruto del sector alimentario. Aportó el 5,4% del valor bruto de producción, el 2,1% del empleo, el 2,1% de las exportaciones y 0,1% de las importaciones a la industria nacional. Se caracterizó por presentar una estructura en la que coexistían por un lado, un gran número de pequeñas empresas, muchas de ellas artesanales y que operaban en el circuito informal de producción, con un reducido peso económico; y por el otro, algunas pocas grandes y medianas empresas multiplantas y multiproductos responsables de la mayor parte de la producción.

La Argentina exhibe una larga tradición en el consumo de productos lácteos y un nivel de ingesta por habitante (186,8 litros equivalentes de leche por año) comparable con el de países desarrollados (Industria Láctea, 2005).

Hasta comienzos de la década del '90 las leches fluidas absorbían aproximadamente el 20% de la leche producida, siendo la leche pasteurizada la de mayor participación dentro de éstas con el 93%, mientras que la leche esterilizada sólo representaba el 5%. El 2% restante correspondía a la leche chocolatada. En cuanto a los productos lácteos, los quesos siempre tuvieron una participación muy importante, absorbiendo para su elaboración el 38% de la leche cruda producida y el 53% de la leche destinada a productos lácteos (Schaller, 2001).

Entre los años 1991 y 1999, el sector lácteo protagonizó una de las expansiones más espectaculares dentro de la industria alimentaria argentina. La producción primaria creció a una tasa media anual de alrededor del 7%, llegando a aumentar en un lapso de 9 años un 74%. Este dinamismo de la producción primaria se verificó a partir de un crecimiento medio de las explotaciones y por una serie de mejoras técnicas de productos y procesos (mejoramiento genético, mejora en las instalaciones del tambo, incorporación de equipos de enfriado de la

leche en el tambo, el uso de suplementos alimentarios y lo intensificación de los recursos forrajeros).

También, en éste periodo, el sector industrial sufre un fuerte proceso de reestructuración caracterizado por la entrada de empresas multinacionales a la industria y una inversión del orden de los 1.900 millones de u\$s entre 1993 y 1998, que representó el 14% del total invertido en la industria argentina. Esto expande la capacidad de procesamiento (pasando de 4,5 millones de litros a 10-12 millones de litros) y la producción industrial crece un 12% anual. Al mismo tiempo, se introdujeron importantes innovaciones en los productos y en la infraestructura logística (Industria Láctea, 2005).

En este contexto, la industria láctea muestra, a partir de la conformación del MERCOSUR, una orientación exportadora más definida basada mayoritariamente en exportaciones de productos de alto consumo. Esto introdujo un cambio en los productos elaborados, estimulando la elaboración de otros productos lácteos, que aumentaron relativamente más que la leche dirigida al consumo en fresco. El 77,8% de la leche cruda fue destinada a la elaboración de productos, 16% a leche fluida y sólo el 6,2% al circuito informal (Tabla I.2).

La profunda recesión económica iniciada a mediados de 1998 en el país, pone fin al período expansivo del sector lácteo. La demanda interna comienza a contraerse al igual que las exportaciones, principalmente hacia Brasil, debido a la devaluación de su moneda. La oferta tardó en ajustarse a la demanda, lo que repercutió en los precios al productor. Esto, agravado por la situación crítica de los productores primarios e industriales dado el fuerte endeudamiento (debido a las inversiones realizadas años anteriores), provocó una oleada de cierre de tambos (alrededor de 4.000 tambos desde 1998), la diversificación de actividades en los establecimientos y la reducción del rodeo lechero (30% entre el 2000 y el 2002), lo que llevó a una caída en la producción de leche cruda del 23% en el año 2003 respecto al pico alcanzado en 1999.

En el año 2004, la producción primaria (leche cruda) fue de 9.169 millones de litros, lo que significó un aumento del 17% en sólo un año. Este incremento se explica, por el ingreso de animales jóvenes de reposición que se produjo a partir de la primavera del 2003 y continuó durante todo el 2004; por el mayor precio de

la leche, asociado a menores precios en los insumos alimenticios (maíz y balanceados) que permitió una mayor ingesta del rodeo recompuesto que se expresa en la producción individual (9,2% mayor respecto del año 2003); y por una mayor producción media por tambo, debido a la mayor eficiencia de los tambos que subsistieron a la crisis (Industria Láctea, 2005).

En la tabla I.2 se puede observar el destino de la leche cruda, cuántos litros de ésta se utilizan para obtener los diferentes productos y cómo fue la evolución de los mismos al comienzo de la expansión del sector, cuando éste alcanzó su máximo (año 1999) y en el año 2004 (Industria Láctea, 2005). La producción de leche en polvo descremada, manteca, leche condensada y quesos de pasta dura se vieron muy afectados por la crisis de 2001. En el caso de la manteca y la leche condensada puede haber habido un cambio en los hábitos de los consumidores que haya generado menor demanda y como consecuencia menor producción. Productos como quesos semiduros y de pasta blanda fueron poco influenciados por la crisis.

Tabla I.2- Leche cruda a productos lácteos (Industria Láctea, 2005)

Año	1991		1999		2004	
	Leche cruda (10 ⁶ L)	Producto elaborado (10 ⁶ L o 10 ³ t)	Leche cruda (10 ⁶ L)	Producto elaborado (10 ⁶ L o 10 ³ t)	Leche cruda (10 ⁶ L)	Producto elaborado (10 ⁶ L o 10 ³ t)
Leche pasteurizada	1.047	1.014	966	939	1.081	1.051
Leche esterilizada	61	60	632	614	442	429
Leche chocolatada	20	19	24	23	25	24
Leche en polvo entera	538	69	1.924	244	2.052	260
Leche en polvo descremada	287	23	579	46	443	35
Queso de pasta dura	530	40	828	60	718	52
Queso de pasta semidura	585	56	1.477	138	1.203	111
Queso de pasta blanda	992	143	1.851	248	1.436	207
Manteca	706	37	900	54	631	41
Dulce de leche	119	66	196	114	164	109
Leche condensada	21	10	22	12	10	5
Yogur	154	176	235	253	291	357
Postres lácteos y flanes	15	15	17	22	24	33

Es de destacar que la leche en polvo entera, los yogures y los postres lácteos y flanes no sufrieron la crisis ya que mostraron un crecimiento sostenido y muy importante en este período.

En el cuadro I.1 se puede observar la elaboración de leche y productos lácteos en el año 2006 (Schaller, 2006). Se pone de manifiesto un aumento en todos los rubros con respecto al año 2004. También se puede ver, siguiendo la misma tendencia del 2004, un incremento del porcentaje de leche salida del tambo o leche cruda que fue destinada a la elaboración de quesos, yogures, leche en polvo, dulce de leche, manteca y otros.

Cuadro I.1- Elaboración de Leche y productos Lácteos en Argentina en el año 2006 (Schaller, 2006).

Capítulo 2- Fibras dietarias utilizadas

Las fibras que se emplearon en los productos desarrollados fueron las siguientes:

- 1- Inulina
- 2- Fibra de caña de bambú
- 3- Fibra de trigo
- 4- Fibra de manzana
- 5- Psyllium
- 6- *Quitosano*
- 7- Carragenanos
- 8- Goma guar
- 9- Goma xantano

2.1- Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva de muchas plantas. Es un polímero lineal soluble. Está constituida por entre 2 y 60 unidades de fructosa unidas por enlaces β -2-1, con un GP de 10. Posee una molécula de glucosa en el extremo unida a la fructosa por enlaces α -1-2 (Figura I.7).

Fig. I.7- Molécula de inulina

Permite la subsistencia de las plantas durante el invierno en regiones frías o moderadamente frías, ya que, es hidrolizada en moléculas de menor GP. También

actúa en la osmoregulación. Está presente en una gran variedad de vegetales como: cebollas, espárrago achicoria, alcaucil, ajo, ajo puerro, trigo, cebada, centeno, banana, dalia y yacon, entro otros. Muchas plantas que contienen inulina forman parte de la dieta básica occidental desde hace mucho tiempo, siendo la cebolla la más consumida entre ellas. Según Van Loo y col. (1995) consumimos entre 2 y 12 g/día. La concentración de inulina en cada planta depende mucho de la especie y variedad, del tiempo transcurrido desde la cosecha hasta su utilización y del tiempo de almacenaje (de Oliveira Haully y Moscatto, 2002).

La inulina se obtiene a partir de la materia seca del vegetal. En la cebolla, dependiendo de los factores antes mencionados, puede llegar hasta un 50% de la materia seca del vegetal. Para la mayoría de las fuentes, las concentraciones de inulina y oligofructosas están entre 0,3 y 6% de peso fresco (Tabla I.3, Van Loo y col., 1995).

Tabla I.3- Fuentes de inulina y oligofructosas (% del peso fresco)

Vegetales	Parte comestible	Inulina	Oligofructosas
Achicoria	raíz	3-10	< 1
Ajo	bulbo	9-16	3-6
Ajo puerro	bulbo	3-10	2-5
Alcaucil	hojas centrales	3-10	< 1
Banana	fruta	0.3-0.7	0.3-0.7
Cebolla	bulbo	2-6	2-6
Centeno	cereal	0.5-1	0.5-1
Cebada	cereal	0.5-1.5	0.5-1.5
Dalia	flor, no se come	14-20	14-20
Trigo	cereal	1-4	1-4
Yacon	raíz	3-19	3-19

En cambio, para alcaucil, achicoria, dalia y yacon el contenido de inulina y oligofructosas puede llegar hasta 20% del peso fresco, siendo estos vegetales, importantes fuentes de inulina y oligofructosas (Tabla I.3).

La inulina extraída de las plantas después del secado, se presenta como un polvo blanco, amorfo, higroscópico, con olor y sabor neutros. Tiene una densidad de aproximadamente 1,35 g/ml y un peso molecular de 1600. Su solubilidad varía en función de la temperatura del agua: a 10°C es de 6% aproximadamente, mientras que a 90°C es de 35%. Posee una capacidad de unir agua de 2:1, es decir 2 moléculas de agua por cada molécula de inulina (Silva, 1996).

La funcionalidad de la inulina esta basada en su efecto sobre soluciones acuosas a varios niveles de sólidos. A medida que la concentración de inulina aumenta, la viscosidad aumenta gradualmente. Para formar gel, la inulina tiene que estar en una concentración en que se encuentre en partículas discretas. Así cuando el nivel de Inulina alcanza el 30% de sólidos en solución acuosa, comienza a gelificar. Cuando la concentración de inulina aumenta, el gel necesita menos tiempo para formarse, siendo prácticamente instantáneo a 40-45%. El gel de inulina es muy cremoso y se asemeja a la textura de la materia grasa. La disponibilidad de agua, es el factor que más afecta las características del gel. En cambio, el tamaño de la cadena de inulina (GP), la concentración de mono y disacáridos presentes (que suelen acompañar a la inulina), tamaño de las partículas de inulina, método de preparación del gel, temperatura, adición de otros hidrocoloides y cationes mono y bivalentes también pueden afectar al gel.

Debido a su GP, la inulina tiene la habilidad de formar microcristales cuando se mezcla con agua o leche. Estos microcristales no son percibidos en la boca pero se integran para formar una textura finamente cremosa que promueven una sensación semejante a la gordura. Por lo tanto, es usada con éxito en varios productos como sustituto de la materia grasa (de Oliveira Hauly y Moscatto, 2002).

Tiene una amplia aplicación en la industria alimenticia gracias a su gran versatilidad, no influye en el sabor o en la apariencia visual del producto. Inulina es muy resistente al calor, inodora e hipoalergénica. Reemplaza muy bien azúcares y materia grasa, es un agente texturizante y que aumenta el volumen. Tiene propiedades prebióticas.

2.2- Fibras de caña de bambú, de manzana y de trigo.

Estas fibras contienen en diferentes proporciones, celulosa, hemicelulosa y lignina que son las sustancias químicas de las paredes de las células de las plantas.

La estructura básica de la celulosa está constituida por dos moléculas de glucosa unidas con enlace β 1-4-glucopiranosil-glucopiranososa sin ramificaciones como ya habíamos mencionado. La celulosa sólida forma una estructura tridimensional polimórfica. Posee áreas cristalinas que se alternan con áreas amorfas (Figura 1.8). La proporción en que éstas se encuentran depende de la materia prima (origen vegetal, procesamiento, etc.). Las áreas amorfas son más fácilmente hidrolizables, debido a que tienen más grupos hidroxilos disponibles que las áreas cristalinas. Las características funcionales de estas fibras dependen de la relación entre componentes amorfos y cristalinos, y por tanto de la materia prima.

Fig. 1.8- Regiones amorfas alternadas con regiones cristalinas

2.3- Psyllium

Se obtiene a partir de la cáscara de la semilla de una planta del género *Plantago*, que crece principalmente en países que bordean el mediterráneo y en India. Cantidades limitadas también crecen en México y China. La variedad

farmacéutica más utilizada es *Plantago ovata* Forsk y es cultivada principalmente en India (Chan y Wypyszyk, 1988).

Su estructura química consiste en una mezcla de polisacáridos neutros y ácidos, los cuales contienen residuos de ácido galacturónico. Psyllium proveniente de diferentes especies de *Plantago* contienen en proporciones variables D-xilosa, D-arabinosa, D-ramnosa, D-galactosa, ácido D-galacturónico y 2-O-(ácido 2-D-galactopiranosilurónico)-L-ramnosa (Laidlaw y Percival, 1949 y 1950; Anderson y Fireman, 1953; Fisher y col., 2004).

El psyllium purificado es un material blanco y fibroso que se hidrata lentamente para formar una dispersión viscosa hasta concentraciones de 1,8%. A 2 % forma una masa gelatinosa. Si bien, la dispersión es clara, la solubilidad es incompleta. Las dispersiones son tixotrópicas. Se ven poco afectadas por la temperatura entre 20 y 50°C y con concentraciones de NaCl superiores a 0,15 M. La viscosidad no varía con el pH en un rango de 2-10 (Chan y Wypyszyk, 1988).

El psyllium ha sido usado como laxante natural, como profilaxis y tratamiento de desórdenes intestinales (Czuchajowska y col., 1992), para bajar los niveles de colesterol en pacientes hipercolesterolémicos (Bell y col., 1989) y para modificar el metabolismo microbiano del colon (Costa y col., 1989). Estudios en animales y humanos mostraron que la fracción que forma gel, constituye el 55-60% de la cáscara de la semilla y es responsable del efecto laxante y de la disminución del colesterol sanguíneo (Marlett y col., 2000 y 2002).

2.4- Quitosano

Existen en la naturaleza dos polisacáridos diferentes pero relacionados que proveen estructura e integridad a las plantas y animales como crustáceos e insectos. Las plantas producen celulosa para sus paredes celulares y los crustáceos producen quitina para sus caparazones. Las moléculas de quitina son largas cadenas formadas por unidades de N-acetil glucosamina (Figura 1.9). La celulosa y la quitina son los polisacáridos más abundantes de la tierra. A pesar de su abundancia en la naturaleza, la quitina no ha sido accesible al hombre y solo

recientemente ha comenzado a utilizarse para distintos usos. La quitina y la celulosa no son solubles en agua. Sin embargo, por desacetilación de la molécula

Fig. 1.9- Estructura química de la quitina

de quitina, se produce un derivado llamado quitosano (Figura 1.10). Se obtiene por eliminación de los grupos acetilo de los residuos de N-acetil glucosamina, dejando expuestos los grupos aminos, capaces de atraer cargas positivas en soluciones acuosas de bajo pH. De esta manera, el quitosano es soluble a bajo pH. Solamente estos grupos aminos activos confieren las propiedades físicas y químicas al polímero.

Fig. 1.10- Estructura química del quitosano

El quitosano se obtiene a partir de la quitina aislada de crustáceos como por ejemplo de *Pleoticus mülleri*, mediante una desacetilación heterogénea a 136°C con 50% p/p de NaOH. Primeramente, el material crudo se tritura y homogeneiza. Este producto luego, es lavado con agua a temperatura ambiente, para remover los materiales orgánicos. El residuo es tratado con NaOH 9% (p/p) a 65°C por 90 minutos para remover las proteínas con posterior lavado. Luego se extraen los minerales tratando con HCl 10% (v/v) a 20°C por 15 minutos. El residuo se lava a

temperatura ambiente y se seca al aire. Por último se realiza la desacetilación (Rodríguez y Albertengo, 2005). Comúnmente, el producto quitosano consiste en polímeros de alto peso molecular que producen soluciones ácidas viscosas, pero también, se ha encontrado, que fracciones de bajo peso molecular (oligómeros) poseen actividad biológica siendo fungicidas, bacteriostáticos, inmunoestimulantes y factores de crecimiento en plantas.

Como fibra dietaria, el quitosano tiene la capacidad de unir materia grasa, sales biliares, colesterol, metales pesados y otras impurezas. El polvo blanco obtenido por decoloración no es, sin embargo el producto más activo en cuanto a capacidad de unión. Propiedades como el grado de desacetilación, su estructura molecular y la capacidad de unión, dependen de los métodos de producción (Muzzarelli, 1996). El quitosano regular es un material amorfo, donde las moléculas están dispuestas al azar. Sin embargo, bajo condiciones específicas, las moléculas pueden formar una estructura cristalina, donde los grupos aminos están expuestos en la superficie del cristal. Esta regularidad en la estructura molecular incrementa la solubilidad del producto y la capacidad de unión. Tamaño de partículas de un diámetro de 20-30µm o menores, pueden ser obtenidas con un proceso que da quitosano microcristalino (MCCh, en inglés). Este producto incrementa la actividad de superficie y la capacidad de aumentar la densidad. Además, durante este proceso se eliminan todo el material insoluble y solutos de bajo peso molecular, como sales y otras sustancias, que el proceso tradicional no garantiza su ausencia. Por lo tanto el quitosano microcristalino constituye el producto más activo y más puro disponible (Muzzarelli, 1996).

2.5- Carragenanos

Los carragenanos son polisacáridos lineales que se extraen a partir de algas rojas (*Chondrus*, *Euchema*, *Gigartina*, *Furcellaria*) con una solución alcalina diluida. Normalmente el producto es la sal sódica de un carragenano.

El término carrageneno denota un grupo o familia de galactanos parecidos entre sí con grupos semiester sulfato unidos a las unidades de azúcar. Poseen un alto peso molecular (400-560 kDa) y son cadenas lineales de residuos de D-

galactopiranosilo unidos mediante enlaces (1,3)- α -D- y (1,4)- β -D-glicosídicos alternantes, en los cuales la mayoría de las unidades de galactosa tienen uno o dos grupos sulfato esterificados en el grupo hidroxilo de los átomos de carbono C-2 o C-6. Ello proporciona un contenido en sulfato del 15 al 40%. Las unidades a menudo contienen un anillo 3,6-anhidro.

Las estructuras principales de esta familia de compuestos pueden ser divididas en agentes gelificantes (kappa (κ) y iota (ι)), y en agentes espesantes (lambda (λ) y épsilon (ξ)). Las unidades de disacárido que se muestran en la figura I.11 representan el bloque de construcción predominante en cada tipo, pero no tienen porque ser unidades de repetición.

Fig. I.11- Estructuras de kappa, iota y lambda carragenanos

Los carragenanos, una vez extraídos, son mezclas de polisacáridos no homogéneos. Los carragenanos comerciales, contienen diferentes proporciones de los tres tipos principales: kappa, iota y lambda (Depypere y col., 2003).

Los carragenanos se disuelven en agua y forman soluciones de alta viscosidad. La viscosidad alcanzada es muy estable en un amplio intervalo de pH, puesto que los grupos semiester de sulfato están siempre ionizados, incluso en condiciones de fuerte acidez, lo que proporciona a las moléculas una carga neta negativa.

Algunos segmentos de las moléculas de carragenano kappa y iota existen en forma de hélices de cadenas paralelas. La habilidad de formar geles esta basada en la asociación de las hélices en dobles hélices. Debido a la presencia de aniones sulfato, kappa- carragenina necesita iones calcio y iota- carragenina de iones potasio para formar geles termoreversibles por enfriamiento de soluciones calientes los contienen. La gelificación puede producirse en soluciones acuosas a concentraciones tan bajas como 0,5% (Aguilera y Stanley, 1999). Cuando las soluciones de carragenano kappa se enfrían en presencia de iones potasio, se forma un gel rígido y frágil. Los iones calcio son menos eficaces para la gelificación. La presencia de iones potasio y calcio da lugar a la formación de geles de gran fuerza. Los geles formados con carragenano kappa son los más fuertes de todos. Estos geles sin embargo, tienden a la sinéresis conforme las zonas de unión se extienden a lo largo de la molécula (Fennema, O., 2000).

Los carragenanos de tipo iota son algo más solubles que los kappa, pero solo la sales sódicas son solubles en agua fría. Los carragenanos iota gelifican mejor con iones calcio. El gel resultante es blando y elástico, posee una buena estabilidad frente a la congelación/descongelación y no sufre sinéresis, presumiblemente porque los carragenanos iota son más hidrofílicos y forman menos zonas de unión que los kappa.

Durante el enfriamiento de los carragenanos kappa o iota, la gelificación se produce a causa de que las moléculas lineales son incapaces de formar dobles hélices continuas, debido a la presencia de irregularidades estructurales. Las porciones helicoidales lineales pueden asociarse para formar una red tridimensional que da lugar a geles estables y más bien firmes en presencia del catión apropiado (Figura 1.12). Todas las sales de los carragenanos de tipo lambda son solubles e incapaces de gelificar. Los geles de carragenano no requieren

refrigeración puesto que no funden a temperatura ambiente. Por otra parte, son estables frente a la congelación/descongelación.

Fig. I.12- Como se ordenan los carragenanos kappa y iota

Los carragenanos son muy utilizados debido a su capacidad de formar geles con leche y agua debido a su reactividad con las proteínas, particularmente con las de la leche. Los de tipo kappa forman complejos con las micelas de kappa-caseína de la leche, dando lugar a la formación de un gel débil, tixotrópico y fluido. El efecto espesante de los carragenanos kappa en la leche es 5-10 veces mayor de lo que lo es en agua. Normalmente, la grasa sirve para el propósito de mantener la textura suave, pero debido a la capacidad ligante del carragenano con la proteína y a su alta afinidad por el agua, pueden ser utilizados para reemplazar en parte esta función de las grasas de origen animal en productos magros (Fennema, 2000).

2.6- Goma guar

La goma guar produce la mayor viscosidad de todas las gomas naturales comerciales. Se obtiene moliendo el endospermo de semillas cuyo mayor

componente es un galactomanano. Los galactomananos consisten en una cadena principal de unidades β -D-manopiranosilo unidas por enlaces 1,4 con ramificaciones de una sola unidad de α -D-galactopiranosilo unidas en la posición O-6 (Figura I.13). El polisacárido específico de la goma guar es el guarano. En él, alrededor de la mitad de las unidades de β -D-manopiranosilo de la cadena principal poseen una ramificación lateral de α -D-galactopiranosilo. Puesto que el guarano tiene sus unidades galactosílicas dispuestas de manera bastante regular a lo largo de la cadena, existen pocas regiones de las cadenas que estén libres para formar zonas de unión. La goma guar proporciona capacidad espesante con un escaso coste a numerosos productos alimenticios (Fennema, 2000).

Fig. I.13- Segmento representativo de una molécula de galactomanano

2.7- Goma xantano

La goma xántica o xantano es un polisacárido producido por el microorganismo *Xanthomonas campestris*, bacteria que se encuentra comúnmente en las hojas de plantas de la familia de las coles. El xantano está formado por una cadena de modo de columna vertebral idéntica a la de la celulosa. En la molécula de xantano, cada dos unidades de β -D-glucopiranosilo de la cadena principal, se une en la posición O-3 la unidad de trisacárido β -D-manopiranosil-(1,4)- β -D-glucopiranosil-(1,2)-6-O-acetil- β -D-mano-piranosilo.

Alrededor de la mitad de las unidades β -D- manopiranosilo terminales tienen una molécula de ácido pirúvico unida como acetal 4,6-cíclico. Las cadenas laterales de trisacárido interaccionan por medio de fuerzas de unión secundarias con la cadena principal, lo que da lugar a que la molécula sea más bien rígida (Figura I.14).

Fig. I.14- Estructura de la unidad pentasacarídica de repetición del xantano. Nótese la unidad no reductora 4,6-o-piruvil-D-manopiranosilo en la cadena lateral de trisacárido

El xantano es muy utilizado en la industria alimentaria debido a las siguientes características de importancia: solubilidad en agua fría o caliente; alta viscosidad a bajas concentraciones; ausencia de cambios discernibles en la viscosidad de sus soluciones en el intervalo de temperatura 0-100°C, lo que lo hace único entre los hidrocoloides; solubilidad y estabilidad en sistemas ácidos; excelente compatibilidad con la sal; interacción con otras gomas; capacidad de estabilizar suspensiones y emulsiones; y buena estabilidad de las soluciones frente a la congelación/descongelación. Estas propiedades son debidas sin duda a su rigidez estructural y a la naturaleza extendida de sus moléculas, lo que a su vez es resultado de la cadena lineal de tipo celulósico estirada y mantenida rígida por las cadenas laterales aniónicas del trisacárido. El xantano es ideal para estabilizar suspensiones y emulsiones acuosas (Fennema, 2000).

Capítulo 3- Objetivos

La calidad de un producto terminado puede ser definida con un amplio criterio, teniendo en cuenta características químicas, físicas, microbiológicas, o la aceptación por parte del consumidor. Por lo tanto, la calidad tiene que ser evaluada por numerosos ensayos, que en conjunto deben tener las siguientes características:

- a) cumplir con las reglamentaciones vigentes en materia de salud;
- b) ser capaz de alcanzar su vida útil especificada sin deterioro;
- c) tener las características organolépticas tan altas como el productor pueda lograr.

El examen de estos puntos implica numerosos ensayos de laboratorio, pero no hay que perder de vista que, la calidad del producto final depende de la calidad de las materias primas y de las buenas prácticas de manufactura de la planta de producción (Tamine y Robinson, 1985).

Si los controles de higiene de la planta, de las materias primas y del proceso se cumplen satisfactoriamente, es interesante el estudio del producto final que debe tener en cuenta:

- d) análisis de la composición química
- e) ensayos de las características físicas
- f) ensayos microbiológicos
- g) ensayos sensoriales

Estos puntos serán tenidos en cuenta en el desarrollo de este trabajo de tesis, ya que, la llave para el éxito de los alimentos funcionales entre los consumidores, está en el desarrollo de productos con propiedades sensoriales atractivas que no comprometan sus propiedades fisicoquímicas que son la base de sus efectos fisiológicos favorables para el organismo. Durante este trabajo de investigación los objetivos generales fueron:

⊗ Analizar la incorporación de fibras dietarias a formulaciones lácteas para incrementar el número de productos del mercado que contengan fibra dietética y contribuir al objetivo de consumir entre 25-35 g por día de fibra que generen en nuestro organismo todos los efectos positivos antes vistos. Por tal motivo se adicionará fibra dietaria a postres lácteos y a yogures.

⊗ Generar productos que se acerquen lo más posible en lo que a propiedades organolépticas se refiere, a los ya existentes en el mercado que no contienen fibra. Es decir obtener un producto prácticamente con la misma textura, color, sabor y aroma que el que no la posee. De esta manera resultaría muy sencillo conseguir sustituirlo en nuestra dieta diaria.

Lo objetivos específicos fueron:

- Selección de las condiciones de preparación de los productos
- Selección de las formulaciones base de los productos a las cuales luego se adicionarían las fibras.
- Evaluación de las modificaciones de textura instrumental a bajas (medidas dinámicas) y a grandes deformaciones (propiedades de fractura) debido a la adición de fibras dietarias y su interacción con los demás componentes de los productos usando texturómetro
- Evaluación de las modificaciones de color superficial
- Cuantificación del exudado producido a partir del producto formulado.
- Seguimiento de la presencia de ácidos característicos relacionados con el sabor utilizando HPLC.
- Determinaciones analíticas asociadas a las variaciones químicas del producto debidas a la incorporación de fibras dietéticas, por ejemplo minerales como calcio y hierro.

- Estudio sensorial del producto a los fines de evaluar la aceptabilidad del nuevo producto por parte de los consumidores.
- Análisis de las modificaciones microestructurales del producto debidas al agregado de los componentes adicionados. Microscopía.
- Estudio microbiológico para evaluar la vida útil del producto.

Parte II- Postres lácteos con fibras

Capítulo 1- Introducción

Los postres lácteos comerciales contienen leche, sacarosa, saborizantes, colorantes, espesantes (almidones, goma guar, goma xántica, etc.), estabilizantes y/o agentes gelificantes como carrageninas, alginatos, etc. (Depypere y col. 2003). Si bien, este tipo de alimentos constituyen una pequeña fracción (menos del 1%) del total de los productos consumidos, permiten ser formulados con las características nutricionales y organolépticas deseadas. Además, son una fuente interesante de proteínas en la dieta de niños y ancianos (Nunes y col., 2006). En nuestro país se comercializan en dos formas: deshidratados o listos para consumir, teniendo los primeros bajo costo de producción y almacenamiento.

Los postres lácteos deshidratados son un excelente sistema para adicionar fibra dietaria, ya que son alimentos históricamente agradables al consumidor y son fácilmente preparados en el hogar. El uso de espesantes y gelificantes permite controlar sus propiedades organolépticas para lograr una buena aceptabilidad por parte de los consumidores.

Esta parte del trabajo de tesis tuvo los objetivos de seleccionar las mejores condiciones de preparación de los postres deshidratados comerciales, desarrollar y seleccionar formulaciones adecuadas y estudiar las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones desarrolladas adicionadas con fibras.

El almidón de maíz es uno de los componentes más utilizados por nuestra industria para fabricar postres lácteos. Es la sustancia de reserva predominante en las plantas, y proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Los almidones comerciales se obtienen de las semillas de cereales, particularmente de maíz, maíz céreo, maíz rico en amilosa, trigo, varios tipos de arroz, y de algunas raíces y tubérculos, particularmente papa, batata y tapioca (cassava). Tanto los almidones nativos como los modificados tienen un número enorme de posibles aplicaciones como: adhesivo, ligante, enturbiantes, formador de películas, estabilizante de espumas, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante (Fennema, 2000).

El almidón se diferencia de todos los demás carbohidratos en que se presenta como complejas partículas discretas (gránulos). Los gránulos de almidón

son relativamente densos e insolubles, y no se hidratan en agua fría. La capacidad de formar soluciones viscosas (capacidad espesante) es alcanzada solo cuando la suspensión de los gránulos es sometida a la acción del calor. Calentando una suspensión al 5% de gránulos de almidón no modificado hasta unos 80°C, con agitación, se produce una alta viscosidad. Una segunda propiedad única es que la mayoría de los gránulos de almidón están compuestos de una mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa y otro muy ramificado llamado amilopectina (Fennema, 2000).

La amilosa es una cadena lineal de unidades α -Glucopiranosas unidas por enlaces 1,4. El acoplamiento de la posición axial-ecuatorial de las unidades en las cadenas de amilosa da a las moléculas una forma de hélice o espiral con giro a la derecha. El interior de la hélice contiene solo átomos de hidrógeno, y es por tanto lipofílico, mientras que los grupos hidroxilo están situados en el exterior de la hélice. El contenido de amilosa en almidones de distintos orígenes, varía entre 13 y 38%.

La amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada (Figura II.1). El 4-5% del total de los enlaces son enlaces de ramificación. Consiste en una cadena que contiene el único extremo reductor, denominada cadena-C, la cual tiene numerosas ramas, llamadas cadenas-B, a las que se unen por su parte varias cadenas-A. Las cadenas-A son no ramificadas. Las cadenas-B se ramifican con cadenas-A o bien con otras cadenas-B. Las ramas de las moléculas de amilopectina toman la forma de racimo. La amilopectina está presente en todos los almidones, constituyendo entre el 62 y 87% de los almidones más utilizados por el hombre.

Fig. II.1- Representación esquemática de la molécula de amilopectina

Los gránulos de almidón no dañados son insolubles en agua fría, pero pueden embeber agua de manera reversible. Sin embargo, cuando se calientan en agua, sufren el proceso denominado **gelatinización**. La gelatinización es la disrupción del ordenamiento de las moléculas en los gránulos que se evidencia por el hinchamiento irreversible del gránulo, la pérdida de la birrefringencia y la pérdida de la cristalinidad. Los que primero gelatinizan son los gránulos más grandes. La gelatinización total se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura, dependiendo del origen del almidón. Por ejemplo, para el maíz común es de 65-76°C (Ross, 1992).

El proceso, visto en forma más detallada ocurre de la siguiente manera: cuando los gránulos son calentados en un exceso de agua se hinchan rápidamente y embeben suficiente líquido para aumentar varias veces su peso seco. Como resultado, la porción cristalina de los gránulos funde y las cadenas de amilosa salen hacia fuera del gránulo, intactas, a menos que sufran agitación vigorosa. Cuando el sistema se enfría, las cadenas de amilosa libres se ordenan en regiones microcristalinas rodeando a los gránulos hinchados formando un gel rígido, firme y viscoelástico. Este tipo de gel de almidón de maíz, se puede considerar como un gel compuesto, donde hay una matriz o red de las cadenas de amilosa libres rellena de los gránulos hinchados (Aguilera y Stanley, 1999).

El tiempo de calentamiento de los gránulos de almidón es un factor importante. Cuanto mayor es el tiempo hay un mayor hinchamiento de los gránulos, lixiviación adicional de amilosa y, eventualmente, si se aplican fuerzas de cizalla, disrupción total de gránulos. Se forma una pasta de almidón, con una fase continua de amilosa y/o amilopectina solubilizadas y una fase discontinua de restos de gránulos, sin alcanzarse la dispersión molecular completa.

En las condiciones normales de procesamiento de los alimentos hay calor, humedad y agitación. Los gránulos hinchados se rompen con facilidad, y son desintegrados por la agitación. Conforme se van hinchando, las moléculas de amilosa hidratadas difunden a través de la pasta hasta la fase externa (agua). Al enfriar, algunas moléculas se reasocian parcialmente para formar un precipitado o un gel. La firmeza del gel depende de la cantidad de zonas de asociación formadas, que a su vez está influenciada por la presencia de otros ingredientes

tales como grasas, proteínas, azúcares (que es el caso de los postres), ácidos, así como la cantidad de agua presente (Fennema, 2000).

Durante el almacenamiento de pastas de almidón gelatinizadas se produce la **retrogradación** del almidón. En este proceso las moléculas de amilosa y amilopectina se reasocian dependiendo de la afinidad de los grupos hidroxilo y de las fuerzas atractivas o enlaces de entre grupos hidroxilo sobre cadenas adyacentes (Pomeranz, 1985). La retrogradación ocasiona un incremento en la rigidez de la pasta e induce una separación de fases con la consiguiente aparición de exudado, denominado como fenómeno de **sinéresis** (Figura II.2). Estas modificaciones inciden sobre la textura, aceptabilidad y digestibilidad de los alimentos basados en almidón.

Figura II.2- Retrogradación y sinéresis de pastas de almidón

De acuerdo a varios autores, la cinética de retrogradación del almidón consiste en dos procesos bien diferenciados: una rápida gelación de la amilosa a través de la agregación de las cadenas helicoidales y una lenta recristalización de los segmentos de cadena cortos de la amilopectina y de los agregados de amilosa (Miles y col. 1985; Morris 1990). En la figura II.3 se muestran los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón con la recristalización de la amilosa y de la amilopectina.

La retrogradación es un proceso complejo que depende de varios factores tales como: tipo de almidón, concentración, tiempo de cocción, pH y presencia de

solutos como lípidos, polialcoholes, sales y azúcares. Asimismo, las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura de refrigeración) influyen sobre la velocidad del proceso de retrogradación (Miura y col., 1992).

Figura II.3- Retrogradación de pastas de almidón

Las características reológicas del producto final dependen en gran medida del tipo y calidad de los componentes que definen la estructura así como también, de los parámetros de proceso (MleKo, 1997).

1.1- Propiedades reológicas

La reología es la ciencia que estudia la relación que existe entre las fuerzas externas aplicadas, la deformación o flujo que sufre la materia y el tiempo. La intensidad de la deformación y del flujo depende de las propiedades fisicoquímicas del material.

El esfuerzo al que se somete externamente un material puede ser aplicado de diferentes formas: como una compresión (en dirección perpendicular a la superficie), o como un esfuerzo cortante o de cizalla (en dirección paralela a una cara). El esfuerzo (σ) representa una fuerza por unidad de área, por lo que tiene unidades de presión. Tanto la deformación (γ), como la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), son la expresión matemática de la respuesta de un material al esfuerzo aplicado sobre él. Una deformación tiene lugar siempre que ocurra un cambio en

la distancia entre dos puntos de un material. La magnitud de esa deformación se da por el desplazamiento relativo de éstos, por lo tanto la deformación es una magnitud adimensional.

1.1.1- Deformación por cizalla simple

Considérese el modelo constituido por dos placas paralelas a una distancia “y” y un material comprendido entre ellas. Si la placa superior es sometida a una fuerza F, que la obliga a desplazarse una distancia x, mientras que la placa inferior se mantiene en reposo, se genera una deformación en el material denominada “deformación por cizalla simple” (Figura II.4)

Fig. II.4- Deformación de un material bajo un esfuerzo de cizalla

Si no se produce deslizamiento en las superficies de las placas, la deformación por cizalla que sufre cada elemento del material se expresa como:

$$\gamma = \frac{dx}{dy} \quad \text{Ec. II.1}$$

donde dx representa el desplazamiento de la superficie del elemento con respecto a la superficie interior en la dirección x; dy es la altura del elemento.

Esta deformación es uniforme e independiente del tamaño del elemento, por lo que puede expresarse en función de la distancia entre placas L, y el desplazamiento de la placa superior, x.

$$\gamma = \frac{x}{L} \quad \text{Ec. II.2}$$

En el estudio reológico se suele someter el material a una cizalla continua aplicando una fuerza constante en la dirección x, por lo que adquiere una velocidad constante, V. La velocidad de un elemento material viene dada por la siguiente expresión:

$$V = \frac{dx}{dt} \quad \text{Ec. II.3}$$

y la velocidad de deformación o de cizalla, $\dot{\gamma}$, por consiguiente, se representa por:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{V}{L} \quad \text{Ec. II.4}$$

es decir, la velocidad de cizalla es constante a través del material.

1.1.2- Clasificación de un material según cizalla simple

Las respuestas características de los materiales son: deformación en el caso de sólidos y flujo para fluidos. La deformación se define como el cambio de forma y/o volumen que experimenta un cuerpo cuando se lo somete a una fuerza exterior. El flujo, por su parte, es una deformación continua en el tiempo.

Las teorías lineales de elasticidad e hidrodinámica distinguen entre sólidos y fluidos, mediante los conceptos de sólido perfectamente elástico y fluido puramente viscoso. En el sólido perfectamente elástico, la aplicación de un esfuerzo, (fuerza por unidad de área) produce una deformación proporcional a la misma (Ley de Hooke). Cuando ese esfuerzo es suprimido, el cuerpo recupera su estado inicial no deformado, en forma similar a lo que ocurre con un resorte estirado o comprimido. Si el cuerpo en consideración es un fluido de viscosidad constante, el esfuerzo es proporcional al cambio instantáneo de deformación con el tiempo o velocidad de deformación (Ley de Newton), independientemente de la deformación producida. En realidad, ambos conceptos no constituyen más que idealizaciones del comportamiento dinámico de materiales que se cumplen solo en casos límite. El comportamiento general de los materiales es intermedio entre los dos, de este modo surge el término viscoelasticidad que se usa para describir

situaciones comprendidas entre los límites clásicos de la respuesta elástica hookeana y el comportamiento viscoso newtoniano.

El comportamiento reológico de un material se estudia analizando las relaciones esfuerzo-deformación, esfuerzo-tiempo y deformación-tiempo. Estas relaciones se traducen a leyes matemáticas que relacionan un esfuerzo aplicado y una respuesta resultante en forma de deformación o velocidad de deformación. El estudio de los materiales ha originado una clasificación de los mismos con respecto a su comportamiento frente a un esfuerzo cortante que se refleja en una deformación por cizalla (Cuadro II.1). Cada material se caracteriza por las expresiones matemáticas que relacionen estas variables. La clasificación más usual comprende los siguientes grupos (Carreau y col., 1997):

Cuadro II.1- Clasificación de los materiales según cizalla simple

Además de la relación esfuerzo-deformación, el tipo de respuesta de un material depende de la escala de tiempo involucrada entre la aplicación del esfuerzo y la medida de sus efectos. Esta escala de tiempo se mide por el número de Deborah:

$$De = \frac{\text{tiempo de relajación del material}}{\text{tiempo de observación}} \quad \text{Ec. II.5}$$

Cuando $De \rightarrow 0$, los materiales tienden a un comportamiento puramente viscoso, mientras que cuando $De \rightarrow \infty$ se comportan como sólidos. Los materiales viscoelásticos presentan un $De \approx 1$ (Ferry, 1980).

Los postres lácteos, como la mayoría de los alimentos, son viscoelásticos.

Capítulo 2- Selección de las condiciones de trabajo

2.1- Introducción

Es necesario determinar en forma precisa las condiciones de preparación del producto para mantener constantes las características organolépticas del mismo y para lograr una alta calidad que tenga una buena aceptabilidad por parte de los consumidores.

Una de las cualidades de relevancia para el consumidor es la textura del producto. La textura de un alimento está definida como “todos los atributos reológicos y estructurales (geométricos y de superficie) que son percibidos por los receptores mecánicos, táctiles, visuales y auditivos cuando el alimento es ingerido” (Lawless y Heyman, 1998). Bajo esta definición, cada producto lácteo tiene una textura que determina el tipo de producto y la calidad del mismo. Por consiguiente, el elaborador debe comprender los factores que controlan la textura para hacer productos de alta calidad.

La textura de un alimento se investiga apropiadamente con un análisis de las propiedades sensoriales y mecánicas. Para el análisis de las propiedades mecánicas se utilizan medidas instrumentales y luego, se pueden establecer correlaciones entre las propiedades mecánicas y sensoriales. Para evaluar los aspectos mecánicos de la textura se utilizan métodos reológicos instrumentales que pueden ser clasificados en empíricos o fundamentales (Foegeding y col., 2003).

Los ensayos empíricos son relativamente simples ya que, típicamente miden una fuerza que se aplica a una muestra y la deflexión acompañante. Estos métodos tienen parámetros fijos de ensayo tales como: volumen y forma de la muestra y velocidad del ensayo. Los métodos fundamentales son más sofisticados porque explican y dependen de la geometría y volumen de la muestra y las condiciones de ensayo. Están relacionados con las teorías que explican las características moleculares del alimento. Si el comportamiento medido es el esperado, se pueden establecer mecanismos moleculares y sobre la base de un sistema modelo se pueden desarrollar procesos e ingredientes alternativos. Este

punto de vista es muy simplificado para un alimento lácteo, para el cual, es difícil tener en cuenta todos los elementos que intervienen en el establecimiento de la textura. Sin embargo, provee el marco científico para continuar investigando y desarrollando modelos más complejos (Foegeding y col., 2003).

Para determinar qué método reológico es apropiado para estudiar un alimento en particular se debe tener en cuenta ciertas características. En primer lugar el alimento debe ser en lo posible, homogéneo e isotrópico. Luego hay que establecer si el material es fluido, semisólido o sólido. Por último, clasificarlo como viscoso, viscoelástico o elástico. La figura II.5 muestra el rango de consistencia de producto y sus correspondientes métodos reológicos. En el caso de los postres lácteos, que son semisólidos, es conveniente realizar medidas oscilatorias dinámicas a bajas deformaciones y medidas de fractura a grandes deformaciones.

Fig. II.5- Métodos reológicos según la consistencia del alimento.

Las mediciones reológicas pueden ser categorizadas en tres regiones para los alimentos sólidos viscoelásticos (Figura II.6). La primera es la región lineal (A) donde la relación entre esfuerzo y deformación es directamente proporcional, y se

Fig. II.6- Regiones reológicas de los alimentos viscoelásticos

cumple la ley de Hooke. La siguiente región (B) es no lineal, donde la relación entre el esfuerzo y la deformación es más compleja. La última región (C) es la de fractura de la muestra. Las regiones A y C han sido bien caracterizadas debido a la facilidad para recolectar e interpretar los datos en estas zonas. Sin embargo, para describir la respuesta sensorial durante la masticación de los alimentos, la región B no debe ser ignorada y puede contribuir significativamente al análisis de textura (Foegeding y col., 2003).

Para determinar propiedades viscoelásticas en la región A, se utilizan ensayos oscilatorios dinámicos. Estos ensayos consisten en la aplicación sobre el alimento de una deformación (en un reómetro de velocidad controlada) o de un esfuerzo (en un reómetro de esfuerzo controlado) que varía armónicamente con el tiempo midiéndose la respuesta del mismo (Steffe, 1996). En primer lugar, se debe establecer hasta donde llega el rango de viscoelasticidad lineal y trabajar dentro de él. Una respuesta viscoelástica lineal se obtiene cuando el esfuerzo o deformación aplicado es lo suficientemente pequeño como para considerar que el material no ve afectado su estado de equilibrio (Kokini y col., 1995) y que las propiedades medidas son independientes de la deformación o esfuerzos aplicados. Para determinar este rango, se realiza un barrido de deformación o esfuerzo a una frecuencia de oscilación ω (en Hz o rad/s) constante (Figura II.7). Se considera lineal hasta la deformación o esfuerzo correspondiente a la caída del módulo complejo G^* (definido más adelante).

Fig. II.7- Barrido de deformación o esfuerzo a frecuencia (ω) constante. L: rango de viscoelasticidad lineal

Para estudiar las características estructurales del alimento, éste es sometido a una deformación o esfuerzo sinusoidal (dentro del rango lineal) a una

determinada frecuencia de oscilación ω y se mide la respuesta del mismo (Figura II.8). La muestra puede almacenar o disipar energía o ambas en forma de calor. Una sustancia puramente elástica almacenará toda la energía; mientras que un fluido viscoso ideal disipará y perderá la energía.

Fig. II.8- Parámetros del ensayo dinámico a una determinada frecuencia de oscilación. A la deformación impuesta hay una respuesta de esfuerzo

El ángulo de desfase (δ), también llamado ángulo mecánico de pérdida es relativo a la deformación. Teniendo en cuenta que se cumple la ley de Hooke, la razón entre las amplitudes de esfuerzo y deformación implicados en el ensayo (σ_0 ; γ_0), es el módulo complejo, (G^*):

$$G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad \text{Ec. II.6}$$

Este módulo junto con el ángulo de fase, forman los dos términos viscoelásticos de interés: el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''):

$$G' = G^* \cos(\delta) \quad \text{Ec. II.7}$$

$$G'' = G^* \sin(\delta) \quad \text{Ec. II.8}$$

El módulo de almacenamiento refleja el grado en el cual un material almacena energía, es el componente elástico. El módulo de pérdida describe el grado de disipación de energía, es el componente viscoso.

La relación entre la energía perdida y almacenada por ciclo es un importante parámetro conocido como tangente del ángulo de desfase (δ) o tangente de pérdida y describe el grado relativo de viscoelasticidad del alimento. Su relación con los módulos es:

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ec. II.9}$$

Hay otras funciones del material que dependen de la frecuencia y son: la viscosidad compleja (η^*), la viscosidad dinámica (η') y la componente fuera de fase de la viscosidad compleja (η''):

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \quad \text{Ec. II.10}$$

$$\eta' = \frac{G'}{\omega}, \quad \eta'' = \frac{G''}{\omega} \quad \text{Ec. II.11}$$

En los ensayos dinámicos, típicamente se mide G' y G'' para un rango de frecuencia ω de interés y se obtiene el espectro mecánico de la muestra o la huella dactilar del comportamiento a bajas deformaciones del material, como también se lo llama. En la figura II.9 se pueden observar los tres comportamientos típicos de que se pueden encontrar cuando se estudian las propiedades dinámicas de un material viscoelástico. La figura II.9.a muestra la respuesta típica de una solución diluida de polímeros en donde G'' es mayor que G' en todo el rango de frecuencias estudiadas y ambos módulos presentan una dependencia con la frecuencia, incrementándose cuando disminuye el tiempo de observación (mayor frecuencia). Esto significa que los movimientos moleculares ocurren dentro de la escala experimental de tiempo y que no existen interacciones con tiempos de vida más largos que el que dura la observación experimental. Si el material desarrolla

una mayor característica elástica a medida que la frecuencia aumenta, se tiene el ejemplo típico de una solución concentrada de polímeros, donde G'' y G' se cruzan para un determinado valor de frecuencia (Figura II.9.b). Un gel presenta características elásticas dominantes, ya que, G' es mayor que G'' para todo el rango de frecuencias estudiadas. Además, G' no depende de la frecuencia y G'' presenta un mínimo (Figura II.9.c). Este tipo de comportamiento refleja la existencia de una red tridimensional con zonas de unión que poseen tiempos de vida más largos que el período de observación (Giboreau y col., 1994).

Fig. II.9- Respuestas oscilatorias típicas: a) solución diluida, b) solución concentrada, c) material con comportamiento tipo gel.

Un gel es una red tridimensional continua de moléculas o partículas que engloba un gran volumen de una fase líquida continua, de forma muy similar a como lo hace una esponja. El gel está constituido por moléculas de polímero unidas por enlaces de hidrógeno, asociaciones hidrofóbicas (fuerzas de Van der Waals), fuerzas iónicas, "enredos al azar" o enlaces covalentes; y la fase líquida es una solución acuosa de solutos de bajo peso molecular y porciones de las cadenas de polímero (Fennema, 2000).

Los geles poseen características tanto de los sólidos como de los líquidos. La estructura de la red tridimensional ofrece una resistencia significativa a las fuerzas aplicadas sobre ella, comportándose en ciertos aspectos como un sólido elástico. Sin embargo, la fase continua líquida, en la que las moléculas son completamente móviles, hace que el gel sea menos rígido que un sólido ordinario, lo que hace que se comporte en ciertos aspectos como un líquido viscoso. La

consecuencia de todo ello es que un gel es un semisólido viscoelástico, lo que significa que la respuesta de un gel a las fuerzas que se aplican sobre él es en parte característica de un sólido elástico y en parte característica de un líquido viscoso (Fennema, 2000).

Volviendo a la figura II.6, que describe el comportamiento viscoelástico de los alimentos, las regiones reológicas anterior a la fractura y de fractura (regiones B y C), son evaluadas usando metodologías con grandes deformaciones, midiendo compresión, tensión o torsión.

Los ensayos de compresión son los más usados debido a que la preparación de la muestra es sencilla. La muestra se va comprimiendo y se busca el punto de fractura. Se mide la fuerza que va deformando el material obteniéndose una curva de esfuerzo con respecto a la deformación. El test de penetración es un tipo de ensayo de compresión. Es muy utilizado en la industria ya que es rápido, fácil de usar y se obtiene buena información. El sensor se va introduciendo en el alimento y va midiendo la distancia y fuerza de penetración. Los ensayos de tensión, estiran la muestra hasta la ruptura recolectando parámetros similares. En los ensayos de torsión, se rota la muestra hasta la fractura. Se mide el grado de rotación y el torque requerido para la fractura, que están relacionados con el esfuerzo y deformación de fractura (Foegeding y col., 2003).

La fractura de un material ocurre cuando las uniones de tipo cuaternarias entre los elementos que lo componen se rompen. Esto resulta en la ruptura de la estructura tridimensional del alimento (Dobraszczyk y Vincent, 1999). En este tipo de ensayo a grandes deformaciones se evalúan típicamente los siguientes parámetros mecánicos: módulo de deformabilidad; esfuerzo y deformación de fractura o una combinación de éstos. El primero tiene que ver con cuán difícil de deformar es el alimento; es decir, está relacionado con la firmeza del material y se calcula como la relación entre esfuerzo y deformación o la pendiente en la porción lineal de la curva esfuerzo-deformación. El esfuerzo de fractura es una medida de la fuerza de las uniones interatómicas de los elementos que componen el alimento. La deformación de fractura es máxima deformación que puede soportar el material sin alterar su estructura.

Debido a que los alimentos son materiales biológicos, pueden cambiar dramáticamente de forma y/o fluir bajo una presión y cuando son liberados de ésta pueden permanecer deformados sin retornar al estado original. Teniendo en cuenta esto, se corrigen los datos primarios de deformación y esfuerzo (Dobraszczyk y Vincent, 1999). La deformación ingenieril o de Cauchy $[L(t)/L_0]$, donde $L(t)$ es la distancia recorrida por el sensor y L_0 es la altura inicial de la muestra, es satisfactoria para bajas deformaciones. En estos ensayos donde se miden grandes deformaciones se utiliza la corrección de Hencky (ϵ), que se calcula como:

$$\epsilon = \ln \left| \frac{L(t)}{L_0} \right| \quad \text{Ec. II.12}$$

La variación en la altura del alimento produce también una variación en el área del mismo. Por lo tanto el esfuerzo se corrige como:

$$\sigma = \frac{F.L(t)}{A_0.L_0} \quad \text{Ec. II.13}$$

donde F es la fuerza que va registrando el equipo y A_0 es el área del sensor.

Estos ensayos son de gran valor para predecir fenómenos que ocurren cuando se aplican deformaciones grandes como es el caso de operaciones de procesamiento de alimentos (Kokini y col., 1995). Los datos instrumentales obtenidos, también son importantes para correlacionarlos con la textura sensorial.

2.2- Materiales y métodos

Se estudió la preparación y cocción de un postre comercial con el objeto de establecer las mejores condiciones de proceso. El producto utilizado contenía en su formulación almidón de maíz, azúcar, gelificante, esencia y colorantes permitidos. La composición química del postre sin cocinar, declarada por el fabricante era: proteínas, 1 g/Kg; glúcidos 960 g/Kg; lípidos 0 g/Kg, 9 g/kg de gelificante. Se prepararon muestras de acuerdo a las instrucciones del envase con leche reconstituida con agua destilada, a partir de leche en polvo (Nestlé, Argentina; Tabla II.1).

Tabla II.1- Composición de leche entera en polvo
Composición Aproximada Por 100 g de polvo

Energía	495 Kcal
Proteínas	26.4 g
Lactosa	38.6 g
Grasas (contenido mínimo)	26.0 g
Lecitina	0.2 g
Fibra Alimentaria	0 g
Minerales	5.8 g
Agua (contenido máximo)	3.0 g
Vitamina A	1900 UI
Vitamina D	300 UI
Vitamina B2	1.4 mg
Vitamina B12	1.8 µg
Fósforo	750 mg
Calcio	930 mg

La mezcla se agitó durante 30 min. para homogeneizar (Lethuaut y col., 2003). Se colocó dentro de un recipiente de acero inoxidable y se calentó en baño termostático (Haake, Alemania) hasta 90°C con agitación constante a 100 RPM (Eurostar Power-5 Agitator, Ika Labortechnik, Alemania) para su cocción. Se registró en papel, la historia térmica de la muestra con una termocupla de cobre-constantan.

Se estudió el proceso de gelatinización del almidón mediante observación microscópica con el objeto de determinar el tiempo de cocción que produzca la gelatinización óptima del almidón, punto en cual, los gránulos no están hinchados pero conservan su integridad. Con este fin, se tomaron muestras para observación con microscopio óptico (Leica DMLB, Suiza) a distintos tiempos de cocción: 10, 20, 30, 40, y 50 min. Se observaron las preparaciones con un aumento total de 400x. Las muestras se observaron también con luz polarizada para poder apreciar bien la cruz de malta de los gránulos de almidón. De cada muestra se tomaron fotos representativas con una cámara digital Leica DC 100 (Suiza) adosada al microscopio.

Para conocer como influyen los parámetros de preparación en la textura del producto se estudió G' , G'' , $\tan \delta$ y la fuerza de fractura de los postres para dos tiempos de cocción, dos tiempos de almacenamiento y dos temperaturas de almacenamiento.

Se utilizó un diseño experimental factorial completamente aleatorizado con tres factores y dos niveles (2^3). Este diseño es útil cuando diversos factores pueden afectar las características de interés y se puede estudiar a la vez como afectan estos factores variando los niveles de los otros. Para tres factores y dos niveles se tienen ocho (8) combinaciones o tratamientos posibles: $1=a_0b_0c_0$; $a=a_1b_1c_0$; $b=a_0b_1c_0$; $ab=a_1b_1c_0$; $c=a_0b_0c_1$; $ac=a_1b_0c_1$; $bc=a_0b_1c_1$; $abc=a_1b_1c_1$ (Wu y col. 2000). Se realizaron tres (3) repeticiones de cada combinación. Los factores estudiados y sus niveles fueron:

- A) Tiempo de almacenamiento: 2h 30 minutos (a_0) y 24h (a_1)
- B) Temperatura de almacenamiento a dos niveles: 2°C (b_0) y 4°C (b_1)
- C) Tiempo de cocción a dos niveles: 20 minutos (c_0) y 30 minutos (c_1)

Para determinar G' , G'' y $\tan \delta$ en la región de viscoelasticidad lineal se realizaron medidas reológicas utilizando un reómetro Haake RS600 (Alemania), de esfuerzo controlado (Figura II.10.a). Los postres luego de ser cocinados, se colocaron en moldes cilindricos de 6 mm de alto por 6 cm de diámetro (Figura II.10.b), se almacenaron en cámara de refrigeración y se desmoldaron en el momento de la medición. En primer lugar, se llevó a cabo un barrido de esfuerzo para determinar el rango de viscoelasticidad lineal desde 1 a 50 Pa a una frecuencia constante de 1 Hz y a 25°C. Se empleó un sensor plato-plato de superficie rugosa PP35 que previene el deslizamiento de la muestra, que impide una buena medición. La separación entre los platos fue de 6 mm. Luego se determinaron los valores de los módulos G' , G'' , y $\tan \delta$ realizándose barridos de frecuencia desde 0.01592 Hz hasta 15.92 Hz, a una temperatura de 25°C, con el mismo sensor.

Fig. II.10- a) Reómetro Haake RS600 b) molde vacío c) molde con postre empleado.

Para evaluar la región de fractura se realizó el test de penetración con el texturómetro Texture Analyser xT2i (Reino Unido) (Figura II.11). Se usaron recipientes de vidrio (75 mm de diámetro y 80 mm de alto, Figura II.11), que se llenaron con muestra hasta 40 mm de altura. Se utilizó un sensor P/0,5 R de 12.7 mm de diámetro fabricado en Delrin (ISO 9665, método BS para gelatina), el cual penetraba la muestra por el centro hasta 20 mm de espesor con fuerza y velocidad constantes (0,05 N y 1 mm/s). Se determinó la fuerza de fractura que se define como el primer punto de inflexión significativo que aparece en la curva que corresponde al momento en el cual el sensor penetra en el interior del gel durante la totalidad del desplazamiento fijado (Fisman y Salvador, 1999).

Fig. II.11- Texturómetro con sensor y recipiente empleado

Con el objeto de estudiar la posible relación entre la deshidratación de la mezcla durante la cocción y la textura, se estudió la humedad relativa % de la mezcla a distintos tiempos de cocción. Para ello se extrajeron alícuotas de 2 g aproximadamente y previa pesada, se llevaron a peso constante en una estufa a 100°C. Las muestras se retiraron luego de alrededor de 24 h, se pesaron y se calcularon las humedades relativas %. El análisis estadístico de las humedades obtenidas se llevó a cabo con un software estadístico (Systat Inc., Evenston, IL, USA, 5.0, 1992). Se utilizó el test de ANAVA para un factor, para encontrar diferencias significativas y el test de Tukey para comparación de medias.

El fenómeno de sinéresis que le ocurre a los geles de almidón cuando son almacenados en frío, debido a la retrogradación, es importante para la calidad del producto. Por tanto, se midió su producción a 24 h de almacenamiento en cámara a 2 y 4 °C de temperatura. Se utilizó el método de succión capilar por contacto de la muestra con un medio poroso adecuado (Ferrero, 1992). Se pesaron alícuotas de 5 g de pasta en dispositivos cilíndricos de plástico, de 0,025 m de diámetro y 0,015 m de alto. Cada muestra fue refrigerada en dicho dispositivo envuelta en parafilm con el objeto de evitar deshidrataciones durante el almacenamiento. Luego, fue desmoldada mediante remoción del parafilm sobre papel de filtro Whatman n° 40 de 0,125 m de diámetro, previamente secado en estufa a hasta peso constante (Figura II.12).

Fig. II.12- Medición de exudado.

Las muestras se dejaron en contacto durante 30 min, tiempo en el cual, el agua perdida por el postre fue absorbida por el papel de filtro.

Se midió el avance del anillo de humedad, tomado como índice de sinéresis. Los resultados se expresaron según:

$$\% \text{ de exudado} = \frac{D - D_0}{D_0} \times 100 \quad \text{Ec. II.14}$$

D = diámetro del halo formado por la muestra refrigerada en las condiciones descriptas.

D₀ = diámetro del dispositivo empleado

Los diámetros equivalentes de los halos se determinaron con software Global Lab para analizar imágenes. Se define como diámetro equivalente el de un círculo de igual superficie que la del halo formado. Los ensayos se realizaron por triplicado y se expresaron las medidas en mm.

El análisis estadístico de los % de exudado obtenidos se llevó a cabo con un software estadístico (Systat Inc., Evenston, IL, USA, 5.0, 1992). Se utilizó el test de ANAVA para encontrar diferencias significativas y el test de Tukey para comparación de medias.

2.3- Resultados y Discusión

La curva de calentamiento obtenida mostró que la temperatura se elevó desde temperatura ambiente hasta 85,87°C en 12min. y luego se mantuvo constante como se puede observar en la figura II.13. La gelatinización total del almidón de maíz usado en la formulación, se produce normalmente dentro de un intervalo más o menos amplio de temperatura, que va de 62 a 80°C, siendo los gránulos más grandes los que primero gelatinizan (Fennema, 2000). Teniendo en cuenta estos datos y la curva térmica obtenida, en estas condiciones, se produciría una adecuada gelatinización. Sin embargo, hay que considerar el tiempo de la cocción, ya que a tiempos largos no se obtiene un gel con la firmeza adecuada.

Fig. II.13- Curva térmica para cocción de postres comerciales

Analizando las micrografías de todos los tiempos de cocción (Figura. II.14), se observó que a los 10 minutos de cocción, los gránulos de almidón más grandes se habían hinchado considerablemente, pero los más pequeños, recién comenzaban a hidratarse y todavía presentaban birrefringencia. A los 20 minutos ya se había producido la gelatinización. La totalidad de los gránulos habían perdido la cruz de malta ya que no se observaba birrefringencia. A los 30 minutos, los gránulos parecían haber aumentado su tamaño, pero no estaban desintegrados. Un gel consistente con mínima retrogradación y estructura óptima

se forma cuando los gránulos no están destruidos (Fennema, 2000). A los 40 y 50 minutos los gránulos habían perdido su integridad totalmente.

Fig. II.14- Fotografías por microscopía óptica de: postre sin cocinar con luz polarizada (a), postre a los 10 minutos de cocción (b), postre a los 20 minutos de cocción (c), postre a los 30 minutos de cocción (d), postre a los 40 minutos de cocción (e), postre a los 50 minutos de cocción (f). La escala en la parte superior-derecha de cada foto indica 10 µm.

En consecuencia, 20 y 30 minutos eran los tiempos de cocción a utilizar más adecuados. Para definir entre uno de ellos, se estudiaron los parámetros de textura que producían en distintas condiciones de preparación con un diseño factorial completo.

De los ensayos realizados a bajas deformaciones en la figura II.15a se muestra un barrido de esfuerzo de los efectuados para obtener el rango de viscoelasticidad lineal de los postres comerciales. En la figura II.15b se puede ver la curva de esfuerzo (Pa) con respecto a la deformación con la ecuación lineal que la representa y su coeficiente de correlación. Se observa que la linealidad se mantiene hasta 20 Pa. Por lo tanto, los barridos de frecuencia para todas las condiciones del ensayo factorial fueron realizados a 10 Pa.

Fig. II.15– a) Modulo complejo (G^*) vs. esfuerzo (Pa) y b) esfuerzo (Pa) vs. deformación de postre comercial preparado con 20 minutos de cocción y almacenado 2,5 h a 4°C.

A partir de los barridos de frecuencia obtenidos, de los cuales uno se observa en la figura II.16, se pudo establecer que el postre comercial tuvo un comportamiento viscoelástico de tipo gel débil. G' fue superior a G'' y presentó escasa variación en el rango de frecuencia ensayado. G'' y $\tan \delta$ presentaron un mínimo. $\tan \delta$ varió entre 0,123 y 0,226 que corresponde según Steffe (1996) con polímeros amorfos como es el caso del almidón de maíz que poseen los postres que genera geles con zonas cristalinas y amorfas.

Figura II.16- Barrido de frecuencia de postre preparado mediante 20 minutos de cocción y almacenado 24h a 4°C. G' (○), G'' (●) y tan δ (▲)

Los resultados de G', G'', tan δ y fuerza de fractura para todas las combinaciones el diseño factorial empleado se muestran en la tabla II.2. Se puede observar un aumento de todos los parámetros con el tiempo de cocción, a excepción de tan δ.

Tabla II.2- G', G'', tan δ y fuerza de fractura de todos los tratamientos				
	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tan δ	Fuerza de fractura (N)
2,5 h a 0°C				
20 min	280,2 ± 12,7	41,0 ± 2,9	0,15 ± 0,01	0,58 ± 0,01
30 min	382,0 ± 19,7	52,0 ± 6,0	0,14 ± 0,01	0,68 ± 0,03
24 h a 0°C				
20 min	441,9 ± 10,5	57,1 ± 8,9	0,13 ± 0,01	0,73 ± 0,03
30 min	516,8 ± 20,3	64,1 ± 8,3	0,12 ± 0,01	0,92 ± 0,07
2,5 h a 4°C				
20 min	370,3 ± 13,5	48,7 ± 4,7	0,13 ± 0,003	0,45 ± 0,03
30 min	423,3 ± 18,1	55,2 ± 5,3	0,13 ± 0,001	0,66 ± 0,04
24 h a 4°C				
20 min	352,8 ± 23,9	49,5 ± 8,1	0,13 ± 0,001	0,47 ± 0,01
30 min	452,7 ± 12,0	58,9 ± 1,5	0,13 ± 0,003	0,62 ± 0,06

Los ANAVA para G', G'', tan δ y fuerza de fractura (Tablas II.3, II.4, II.5 y II.6) confirman esta observación. El valor crítico por encima del cual hay

significación (llamado F), fue 2,76 para los tratamientos en conjunto. Sin embargo, la F crítica para cada tratamiento en particular, con el mismo nivel de significación del 95% fue 4,60.

Tabla II.3- ANAVA para G' con todos los tratamientos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Bloques	2	1074,3	1074,3	
Tratamientos	7	A= 35641,0	A= 35641,0	A= 4,73
		B= 180,2	B= 180,2	B= 0,02
		AB= 30397,4	AB= 30397,4	AB= 4,04
		C= 40769,1	C= 40769,1	C= 5,42
		AC= 150,7	AC= 150,7	AC= 0,02
		BC= 212,6	BC= 212,6	BC= 0,03
		ABC= 2041,1	ABC= 2041,1	ABC= 0,27
		Total= 109392,1		
Error	14	105341,1	7524,4	
Total	23	215807,5		

Tabla II.4- ANAVA para G'' con todos los tratamientos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Bloques	2	196,4	196,4	
Tratamientos	7	A= 399,2	A= 399,2	A=8,79
		B= 1,2	B= 1,2	B= 0,03
		AB= 208,6	AB= 208,6	AB= 4,59
		C= 427,4	C= 427,4	C= 9,42
		AC= 0,6	AC= 0,6	AC= 0,01
		BC= 1,8	BC= 1,8	BC= 0,04
		ABC= 17,3	ABC= 17,3	ABC= 0,38
		Total= 1056,1		
Error	14	635,5	45,4	
Total	23	1888,0		

Tabla II.5- ANAVA de tan δ con todos los tratamientos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Bloques	2	0,0061		
Tratamientos	7	0,0529	0,0529	0,1511
Error	14	0,0429	0,0035	
Total	23	0,108		

Tabla II.6- ANAVA del fuerza de fractura con todos los tratamientos				
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Bloques	2	0,000712		
Tratamientos	7	A= 0,49413	A= 0,49413	A= 30,15
		B= 0,18992	B= 0,18992	B= 115,76
		AB= 0,06355	AB= 0,06355	AB= 38,77
		C= 0,15892	C= 0,15892	C= 96,96
		AC= 7,82.10 ⁻⁴	AC= 7,82.10 ⁻⁴	AC= 0,48
		BC= 1,36.10 ⁻³	BC= 1,36.10 ⁻³	BC= 0,83
		ABC= 8,47.10 ⁻³	ABC= 8,47.10 ⁻³	ABC= 5,17
		Total= 0,49609		
Error	14	0,02294	1,63916.10 ⁻³	
Total	23			

De esta manera, los tiempos de almacenamiento y de cocción modificaron significativamente la G' y G". En cambio, tan δ , que es la relación entre las anteriores que caracteriza la viscoelasticidad del sistema a bajas deformaciones, no se modificó significativamente para todos los factores e interacciones. Por otro lado, los tiempos de cocción y almacenamiento, las temperaturas ensayadas y sus interacciones, modificaron la fuerza de fractura, que caracteriza la viscoelasticidad del sistema a grandes deformaciones.

Observando la tabla II.7, que muestra la variación de la humedad relativa % durante el proceso de cocción, se ve claramente la deshidratación que se produce. Esto estaría relacionado con la variación de los parámetros reológicos conforme aumenta el tiempo de cocción, como se puede observar en la tabla II.2.

Tabla II.7. - Humedad de la mezcla durante el tratamiento térmico						
Tiempo	0 min.	10 min.	20 min.	30 min.	40 min.	50 min.
Humedad	73.05 ± 0.0	71.10 ± 0.7	70.31 ± 0.7	68.93 ± 1.5	68.10 ± 0.9	67.27 ± 1.5

Con estos resultados se fijaron las condiciones de preparación de los postres teniendo en cuenta un criterio determinado y estas condiciones fueron respetadas estrictamente a lo largo de todo el trabajo de tesis. El criterio a seguir se basó en un estudio anterior a este trabajo (Dello Staffolo y col., 2004) en el cual, se puso de manifiesto que los consumidores prefieren un gel firme. Por lo tanto, la decisión fue utilizar las condiciones de preparación de los postres que

produjeran los mayores parámetros de textura posible, sin dejar de descuidar otros aspectos como conservación de nutrientes y facilidad de trabajo.

Entonces, los valores más elevados de G' , G'' y fuerza de fractura se presentaron a los 30 minutos de cocción. Asimismo, se pudo observar que a 20 minutos de cocción se produjo la gelatinización del almidón y que a 30 minutos los gránulos aún, no se habían desintegrado. Sin embargo, a mayor tiempo de cocción mayor es la posibilidad de pérdida de nutrientes, sobre todo por la presencia de las proteínas de leche; por lo tanto se eligió 20 minutos de cocción.

A 24 h de almacenamiento se presentan los valores más elevados de G' , G'' y fuerza de fractura. Por lo tanto, se eligió 24 h de almacenamiento que además facilita la organización de los experimentos.

Para fijar la temperatura de almacenamiento hay que tener en cuenta, que en los productos alimenticios que contienen almidón en su formulación, es importante el fenómeno de sinéresis (expulsión de agua) que se produce tras el proceso de refrigeración. En general, si las zonas de unión entre las cadenas de polisacárido crecen todavía después de la formación del gel, la red se va haciendo más compacta, la estructura se contrae, y el resultado es la sinéresis. Este se identifica con la aparición de gotitas de líquido en la superficie del gel. Es de interés que el exudado sea lo menor posible.

En las condiciones descritas, el % de exudado a 4°C fue de 26 ± 6 % en promedio; en cambio a 2°C, el % de exudado fue de 27 ± 7 %. Con un nivel de confianza del 95% se pudo ver que no hubo diferencias significativas entre las dos temperaturas ensayadas. Las heladeras domésticas están estandarizadas en el rango de 4-8°C. Entonces, para estudiar los productos en las condiciones más cercanas al consumidor se utilizó 4°C.

2.4- Conclusión

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos obtenidos y los criterios de selección mencionados, las muestras fueron preparadas utilizando 20 minutos de cocción, 24 h de almacenamiento a 4°C de temperatura, para estandarizar las condiciones de ensayo y para poder comparar el efecto del agregado de fibras.

Capítulo 3- Selección de las formulaciones de los postres

3.1- Introducción

Para desarrollar formulaciones de postres lácteos hay que tener en cuenta que el contenido de proteínas de leche como investigaron Augustin y col., (1999); Tziboula y Horne, (1999); Ould Eleya y Turgeon, (2000); Hemar y col., (2002); Bertolini y col., (2005); Verbekena y col., (2006) y la concentración de sacarosa (Burns y Noble, 1985; Fiszman y Duran, 1989, 1992; Theumisen y Kroeze, 1995, Lethuaut y col., 2003) influyen la estructura y textura de los geles. Sin embargo, la presencia de agentes gelificantes y/o espesantes (también llamados gomas), condiciona en mayor medida la textura y las propiedades sensoriales del producto (Williams y Phillips, 2000; MleKo, 1997).

La elección de una goma específica para una aplicación particular depende de las propiedades reológicas esperadas, del pH del sistema, de las temperaturas de procesado, de las interacciones con otros ingredientes, y del costo de la cantidad necesaria para alcanzar las propiedades deseadas (Fennema, 2000). La carragenina, guar y xántica son gomas muy utilizadas en postres lácteos semisólidos comerciales (Schmidt y Smith, 1992; Tárrega y col., 2004). Las características de estas sustancias que definen la estructura del producto fueron definidas en la Parte I Cap. 2 de esta tesis.

Los alimentos con menor valor energético, generados por menor concentración de materia grasa y/o carbohidratos son una importante área en el desarrollo de nuevos productos que los consumidores aprecian en gran medida. La demanda de estos alimentos ha aumentado enormemente en las dos últimas décadas (Biström y Nordström, 2002). Productos que combinen calidad, seguridad y un balance adecuado de nutrientes con menor contenido de materia grasa, colesterol, sodio y azúcar, son ideales (IFT, 1989).

La reducción en el contenido de sacarosa está recomendada para pacientes diabéticos (Kurihara y Nirasawa, 1994), control de peso corporal (Kreitzman, 1985, Stacey y Goodrick, 2002) y para prevenir caries dentales (Silman y Coulston, 1991). Los productos para diabéticos se formulan con

edulcorantes reemplazando los azúcares y disminuyendo el valor energético, ya que el control de peso corporal también es importante para estos pacientes. Verdi y Hood (1993) describen al edulcorante ideal como una sustancia que produce sabor dulce sin gustos residuales ni gustos que no sean dulces, proporcionando las mismas propiedades funcionales de la sacarosa, siendo químicamente estables, con bajo valor energético. No deben ser tóxicas ni cariogénicas. Deben ser fácilmente solubles en agua y económicamente accesibles. Como la sacarosa cumple las funciones de generar masa/volumen y modificar la textura de los alimentos; cuando es reemplazada por otros endulzantes, se afectan las propiedades mecánicas y la percepción de textura (Bayarri y col., 2003 y 2005). Uno de los principales efectos negativos del cambio es el aumento en la sinéresis. Para compensar estos problemas se utilizan distintos hidrocoloides que restablecen la textura deseada y retienen agua evitando la sinéresis.

El objetivo de este capítulo fue establecer formulaciones base de postres lácteos regulares y con menor valor energético de una textura adecuada y similar a los postres deshidratados que se comercializan en nuestro país.

3.2- Materiales y Métodos

3.2.1- Formulaciones ensayadas.

3.2.1.1- Postres regulares

Se ensayaron cinco concentraciones de almidón de maíz (Molinos Río de La Plata, Argentina). Como aditivo gelificante se utilizó una mezcla comercial de capa, iota, y lambda carrageninas CC765 (Inmobal Nutrer, Argentina). Como espesantes se probaron goma guar y goma xántica (Saporiti, Argentina).

Para analizar solamente el agregado de fibras, se mantuvieron constantes en 109 g/Kg, las concentraciones de leche entera en polvo (Nestle, Argentina) y de sacarosa (grado A, Ledesma, Argentina). Se estudiaron las siguientes formulaciones para postres regulares:

- (AC1) 17 g/Kg de almidón de maíz 1.7 g/kg de carragenina
- (AC2) 25 g/Kg de almidón de maíz y 2.5 g/Kg de carragenina
- (AGG) 25 g/Kg de almidón de maíz y 2.5 g/Kg goma guar
- (AGX) 25 g/Kg de almidón de maíz y 2.5 g/Kg goma xantica
- (A25) 25,0 g/Kg de almidón de maíz sin goma
- (A42) 41,7 g/Kg de almidón de maíz sin goma
- (A57) 56,9 g/Kg de almidón de maíz sin goma
- (A79) 79,4 g/Kg de almidón de maíz sin goma
- (C2,5) 2,5 g/Kg de carragenina sin almidón
- (C5,2) 5,2 g/Kg de carragenina sin almidón
- (C7,7) 7,7 g/Kg de carragenina sin almidón

3.2.1.2-Postres de menor valor energético

Para idear una formulación con menor valor energético, mediante el reemplazo de sacarosa y disminución de la materia grasa. Se tuvo en cuenta que para preparar los postres en las condiciones seleccionadas en el capítulo 2, el edulcorante adecuado debía poder soportar un tratamiento térmico sin alterar sus propiedades. Se pensó entonces, en la sucralosa que cumple con estas condiciones y tiene un poder endulzante 500 veces superior a la sacarosa (Ribeiro y col., 2004). Se denomina sucralosa al compuesto químico 1,6-dicloro-1,6-dideoxi- β -D-fructofuranosil-4cloro-4deoxi- α -D-galactopiranosido (Figura II.17a) o triclorogalactosacarosa. Es el único edulcorante que se obtiene a partir de la sacarosa (Figura II.17b). El proceso sustituye selectivamente tres grupos hidroxilo por tres átomos de cloro produciendo una molécula muy dulce y estable.

Fig. II.17- Estructura química de la sucralosa a) y de la sacarosa b)

La molécula de sucralosa es muy hidrosoluble, al igual que el azúcar y poco soluble en lípidos. Fue aprobado por la FDA en Abril de 1998, para su uso en 15 categorías diferentes de comidas y bebidas.

Para disminuir el contenido de materia grasa, se consideró utilizar leche descremada en polvo con 0% de materia grasa (Svelty, Nestle, Argentina) que aportaban en igual proporción las proteínas de leche que tienen los postres comerciales. Su composición se muestra en la tabla II.8.

Tabla II.8- Composición de la leche descremada en polvo

Composición Aproximada	Por 100 g de polvo
Energía	360 Kcal
Proteínas	35 g
Carbohidratos	50 g
Principales Vitaminas y Minerales	
Sodio	480 mg
Vitamina A	360 µg
Vitamina D	2,3 µg
Vitamina B2	2,4 mg
Vitamina B12	1,5 µg
Fósforo	1 g
Calcio	1,25 g

3.2.2- Preparación de las muestras

Todas las formulaciones se prepararon de la siguiente manera: se pesaron los componentes secos en balanza analítica y se mezclaron. Se adicionó agua destilada hasta 1 kg de peso total y se realizó una homogeneización durante 30 minutos con un agitador magnético (Ika Labortechnick, Alemania).

Luego se utilizaron las condiciones de trabajo seleccionadas en el capítulo anterior. Se procedió al tratamiento térmico en baño termostatzado a 90°C (Haake, Alemania) durante 20 minutos con agitación constante a 100 r.p.m. (Eurostar Power-5 Agitator, Ika Labortechnick, Alemania). Alicuotas de los postres

fueron colocadas en caliente en distintos recipientes para cada ensayo. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C durante 24 h antes del análisis de textura.

3.2.3- Ensayo de textura.

Se realizaron ensayos de penetración con el texturómetro Texture Analyser-xT2i (Stable Micro Systems, Goldaming, UK) de la misma manera que en el capítulo anterior. Se determinaron fuerza y distancia de fractura e índice de firmeza del gel.

La fuerza de fractura como se menciona en el capítulo anterior, se define como el primer punto de inflexión significativo que aparece en la curva que corresponde al momento en el cual el sensor penetra en el interior del gel durante la totalidad del desplazamiento fijado (20 mm) para el mismo (Fisman y Salvador, 1999). La distancia de ruptura fue la observada en el momento de fractura del gel. El índice de firmeza del gel en N/mm, se calculó como la pendiente inicial de la curva. En aquellos casos en que las muestras no presentaron fractura, se observó la fuerza en N, a 20mm de desplazamiento (Fisman y col., 1999). Los valores medios $\pm$ desviación standard de los parámetros mencionados se obtuvieron al medir por duplicado cinco repeticiones de cada formulación.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo con un software estadístico (Systat Inc., Evenston, IL, USA, 5.0). Se utilizó el test de ANAVA para encontrar diferencias significativas y el test de Tukey para comparación de medias.

3.2.4- Determinación del valor energético

Se calculó el valor energético de las formulaciones teniendo en cuenta los siguientes factores de conversión (RES GMC 46/03, 2006 y C.A.A.): Carbohidratos (excepto polialcoholes), 4 Kcal/g; Proteínas, 4 Kcal/g; Grasa, 9 Kcal/g; Fibra Alimentaria Parcialmente Asimilable, 1,5 Kcal/g; Polialcoholes, 2,4 Kcal/g y Polidextrosas, 1 Kcal/g

3.2.5- Ensayo sensorial.

Se realizó un ensayo sensorial para estudiar si los consumidores detectaban diferencias en las formulaciones de postres regulares seleccionadas. Se llevó a cabo un test de triángulo con un panel no entrenado de consumidores habituales de este producto que fueron reclutados con una encuesta previa. El panel estaba constituido por 15 miembros (9 mujeres y 6 varones).

Las muestras fueron presentadas en vasos de plástico de 50 ml de capacidad, codificados con números de tres dígitos. El ensayo se efectuó por duplicado en el mismo lugar y a la misma hora del día. Cada evaluador tenía dos grupos de tres muestras y una ficha (Figura II.18) en la cual debía marcar el número de la muestra que consideraba distinta de cada grupo de tres. Se proporcionó agua de red para que los panelistas se enjuagaran la boca a voluntad.

Los resultados estadísticos fueron obtenidos a partir de una tabla que establece el número de respuestas correctas sobre el total de respuestas requeridas, para asegurar la diferencia a distintos niveles de significación (Ureña y col. 1999).

TEST DEL TRIANGULO

NOMBRE:

EVALUADOR N°:FECHA:/...../.....

Usted recibirá dos grupos de tres muestras. Dos de estas muestras son idénticas y la otra es diferente. Por favor, circule el número de la muestra diferente.

918481797

792874926

Fig. II.18- Ficha de evaluación del ensayo de triángulo

3.3- Resultados y Discusión

Los perfiles de textura obtenidos se pueden ver en la figura 1. Los patrones de las formulaciones que contenían goma guar (AGG) y goma xántica (AGX) no aparecen en la figura II.19 debido a que se superponían con la curva A25 de almidón sin goma.

Fig. II.19- Perfiles de fuerza vs desplazamiento representativos del postre comercial y de las diferentes formulaciones prueba para postres regulares. 2.5 g/kg carragenina (C2,5), — 5.2 g/kg carragenina (C5,2), — 7.7 g/kg carragenina (C7,7), — 25.0 g/kg almidón (A25), — 41.7 g/kg almidón (A42), — 56.9 g/kg almidón (A57), — 79.4 g/kg almidón (A79), — 17 g/kg almidón y 1.7 g/kg de carragenina (AC1), — 25 g/kg almidón y 2.5 g/kg de carragenuina (AC2), — postre comercial

Se pudo observar que no formaron gel y no presentaron un punto de fractura definido. Las fuerzas de resistencia a la penetración a 20 mm de desplazamiento fueron de $0,12 \pm 0,01$ N para AGX y $0,13 \pm 0,01$ N para AGG. Por

lo tanto, AGG y AGX no fueron elegidas para preparar los postres funcionales debido a su débil consistencia que no se asemeja a la de los postres comerciales.

Las formulaciones que solo contenían almidón (A25, A42, A57, A79), mostraron picos que aumentaban sus fuerzas y sus distancias de ruptura al aumentar la concentración de almidón (41,7 a 79,4 g/kg). La forma y características de estas curvas corresponden a un sistema macromolecular enredado (Krüger y col., 2003; Ross Murphy, 1995).

Sin embargo, las formulaciones de carragenina sin almidón (C2,5; C5,2 y C7,7), se comportaron como geles ya que, la fuerza fue aumentando mientras que la distancia se mantenía casi constante, conforme aumentaba la concentración de carragenina (2,5 – 7,7 g/kg). Los perfiles mecánicos de estas formulaciones de carragenina sola coinciden con las obtenidas por Lethuaut y col. (2002) para postres con mezclas de κ , ι y λ carrageninas. Estos autores trabajaron con los tres tipos de carrageninas a con una relación de concentraciones 1:1:1 entre ellas y atribuyeron el pico de fractura a la κ -carragenina.

Está ampliamente aceptado que κ -casein, K^+ y Ca^{2+} que están presentes en la leche, pueden interactuar con la κ -carragenina promoviendo la gelación (Augustin y col., 1999; Tziboula y Horne, 1999; Puvanenthiran y col., 2003). Sin embargo, de acuerdo con Tziboula y Horne (1999) las proteínas de la leche no influyen la gelación cuando se encuentran en concentraciones superiores a 0.2 g/kg Este valor está un orden de magnitud por encima de la concentración utilizada en este trabajo. Como consecuencia, los perfiles de textura de las formulaciones deberían ser atribuidos principalmente a la interacción entre almidón y carragenina.

De acuerdo con Whittle y Dickinson (1998) un gel se diferencia reológicamente de un sistema macromolecular en la extensión de su región lineal En un gel dicha región es típicamente corta. Esto se puede ver en la figura II.19 que muestra picos de fractura a distancias cortas con altas pendientes para las formulaciones de carragenina sola, mientras que, las formulaciones con almidón solo, presentaron picos de fractura a distancias superiores con pendientes bajas.

Las formulaciones que contenían almidón y carragenina mostraron un patrón tipo gel con pendientes altas a distancias cortas similares a las

preparaciones que solo contenían carragenina (Fig.II.19). Entonces, el almidón actuaría como relleno de la red de carragenina porque la fuerza de ruptura de la mezcla AC2 fue cerca de tres veces más alta que la fórmula que solo contenía 2,5 g/kg de carragenina, indicando una fuerte interacción (Tabla II.9).

Por otro lado, como también se puede observar en la tabla II.9, el índice de firmeza para la fórmula AC1 (116 ± 5 N) y para la AC2, (215 ± 2 N) fueron más altos que para la formulación A42 que tenía 41,7 g/Kg de almidón (27 ± 6 N) y para la A57 que contenía 56,9 g/Kg de almidón (50 ± 4 N). Este hecho refuerza el concepto de que el almidón es el relleno de la estructura. Este comportamiento está de acuerdo con los conceptos vertidos por van Vliet (1988) y Lai y col. (1999), quienes encontraron fuertes interacciones entre la red del gel y el relleno, que están caracterizadas por un aumento en la rigidez de geles compuestos comparados con geles que no tienen relleno. Por el contrario, cuando no hay interacción entre la red y otras partículas presentes en el sistema, disminuye la fuerza del gel.

Tabla II.9- Parámetros de textura para formulaciones de prueba de postres regulares			
Mezclas	Índice de Firmeza (mN/mm)	Fuerza de ruptura (N)	Distancia de ruptura (%)
AC1	116 ± 5	$0,60 \pm 0,04$	$4,3 \pm 0,1$
AC2	215 ± 2	$1,12 \pm 0.09$	$4,7 \pm 0,1$
AGX	9 ± 3	$0,12 \pm 0,01$	
AGG	9 ± 3	$0,13 \pm 0,01$	
C2,5	68 ± 4	$0,28 \pm 0,01$	$3,4 \pm 0,1$
C5,2	375 ± 5	$2,01 \pm 0,01$	$4,3 \pm 0,1$
C7,7	623 ± 4	$2,99 \pm 0,01$	$4,1 \pm 0,1$
A25	15 ± 5	$0,11 \pm 0.01$	$5,3 \pm 0,1$
A42	27 ± 6	$0,50 \pm 0,01$	$10,6 \pm 0,1$
A57	50 ± 4	$1,03 \pm 0,04$	$11,2 \pm 0,1$
A79	69 ± 6	$2,42 \pm 0,02$	$15,2 \pm 0,1$

Como se esperaba, la fórmula AC2 que contiene 25 g/kg de almidón y 2.5 g/kg de carragenina, tuvo parámetros más altos comparados con la mezcla AC1. AC1 mostró una fuerza de ruptura similar a la formulación que contenía 41.7 g/kg de almidón y AC2 semejante a la formulación que contenía 56.9 g/kg de almidón. Se sabe que las suspensiones de almidón necesitan al menos 50 g/kg de almidón para formar un gel (Ring, 1985). En las formulaciones AC1 y AC2 la concentración

de almidón está por debajo de este valor crítico. Por consiguiente, la red del gel estaría constituida por la carragenina y los gránulos de almidón hinchados reforzarían la red actuando como relleno.

Estos resultados indican que pequeñas cantidades de carragenina permiten reducir el contenido de almidón en las formulaciones de postres, obteniéndose una textura similar a la de geles de almidón con mucho menor contenido de éste y reduciendo el valor energético en un 7,8% para AC1 y en un 12,2% para AC2 (Tabla II.10). Además Iop y col., (1999) reportaron que la carragenina controla la tendencia a la pérdida de líquido a partir de los geles de almidón.

Tabla II.10- Valor energético en Kcal cada 100 g de las mezclas sin cocinar

Preparación	AC1	AC2	A42	A57	AC1 cal. red.	AC2 cal. red.	Comercial
Kcal	105	108	114	123	34	37	116

Los postres comerciales tuvieron una fuerza de ruptura intermedia ($0,74 \pm 0,02$ N) entre las fórmulas AC1 y AC2 (Fig. II.19 y Tabla II.9), pero pendientes menores (41 ± 1 mN/mm) a dichas fórmulas que puede atribuirse a las concentraciones de carragenina usadas en las formulaciones que otorgan mayores pendientes. Los Valores Energéticos de AC1 y AC2 fueron 9,4 y 6,9 % respectivamente menores que los postres comerciales (Tabla II.10). Por lo tanto, AC1 y AC2 serían seleccionadas para analizar el efecto de la adición de fibras.

Instrumentalmente, A1 y A2 eran diferentes. Sin embargo, para estudiar si las diferencias entre ambas fórmulas eran detectadas por los consumidores se realizó un ensayo sensorial discriminativo con un panel no entrenado de consumidores habituales de este producto. Los resultados del test del triángulo (29 respuestas correctas sobre un total de 30) indicaron ($p<0.05$) que las diferencias entre las formulaciones eran detectadas. En consecuencia, se eligieron AC1 y AC2 para suplementar con las fibras.

Para los postres reducidos en calorías se utilizaron las fórmulas AC1 y AC2, pero se reemplazó la sacarosa (109 g/kg) por 0,22 g/kg de sucralosa que semeja al poder endulzante generado por la sacarosa en la fórmula regular y la leche entera en polvo por descremada respetando la misma proporción de proteínas de leche, pero con menor contenido de materia grasa. Los Valores Energéticos de

AC1 y AC2 de calorías reducidas fueron 67,6 y 65,7 % respectivamente menores a los de AC1 y AC2 regulares y 70,6 y 68,1 % respectivamente menores a los postres comerciales (Tabla II.9).

Como se puede observar en la figura II.20, las fórmulas de menor valor energético conservan perfiles de gel, como era de esperar. Sin embargo, poseen

Fig. II.20. Perfiles de fuerza vs desplazamiento representativos de las formulaciones para postres regulares, postre comercial y postre de menor contenido calórico. — 17 g/kg almidón y 1.7 g/kg de carragenina (AC1), — 25 g/kg almidón y 2.5 g/kg de carragenuina (AC2), — postre comercial, — AC1 reducido en calorías, — AC2 reducido en calorías.

menores fuerzas de fractura que AC1 y AC2 regulares respectivamente y que el postre comercial. Este efecto se atribuyó tanto a la ausencia de sacarosa, que no solo es endulzante sino también aporta a la estructura (Lethuaut y col., 2003), como a la ausencia de materia grasa (Ünal y col., 2003). Según Ribeiro y col. (2004), la sacarosa forma uniones puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que la rodean lo que favorece la interacción entre las moléculas de carragenina y lleva a un aumento en el número y estabilidad de las zonas de unión

del polisacárido. Estas zonas, están formadas por uniones electrostáticas entre los cationes del medio y las dobles hélices cargadas negativamente de las moléculas de carragenina que causan agregación. La fuerza de estos agregados de dobles hélices, o zonas de unión, está relacionada directamente con la fuerza del gel, que por lo tanto, depende de la fuerza iónica y de la concentración de carragenina. Además, la sacarosa al provocar modificaciones en la estructura del agua que rodea a las proteínas promueve también, la formación de agregados de caseína por interacciones hidrofóbicas. La sucralosa forma muchas menos uniones puente de hidrógeno con las moléculas de agua que las rodean porque en su estructura tiene iones cloruro que reemplazan a los grupos hidroxilo libres presentes en la sacarosa. Por lo tanto, desestabiliza las zonas de unión de la carragenina y disminuye la contribución del polisacárido a la formación de la red que lleva a una menor fuerza del gel.

Las pendientes de las fórmulas con menor valor energético fueron menores ($AC1 = 86 \pm 3$ y $AC2 = 143 \pm 5$ mN/mm) que sus respectivas formulaciones regulares ($AC1 = 116 \pm 5$ y $AC2 = 215 \pm 2$ mN/mm), pero mayores que los postres comerciales (41 ± 1 mN/mm). Esto puede deberse a que las concentraciones de carragenina usadas en las formulaciones desarrolladas probablemente fueron mayores que las que utilizan los fabricantes de postres comerciales. Las distancias de fractura no mostraron diferencias significativas entre las formulaciones regulares y de menor valor energético, pero sí con los postres comerciales ($11,8 \pm 0,6$ mm).

La idea fue estudiar si la presencia de fibras aportaba fuerza a los geles regulares y reducidos en calorías (Capítulos 4 y 5).

3.4- Conclusiones

Los espesantes goma guar y goma xántica no proporcionaron una estructura adecuada en las formulaciones ensayadas debido a su baja consistencia. Los postres comerciales son geles, por lo tanto, se eligieron las formulaciones AC1 y AC2 para adicionar las fibras dietarias. Estas presentaron perfiles de textura con fuerzas de gel superiores e inferiores respectivamente a la

de las preparaciones comerciales. Por medio del ensayo sensorial se pudo observar que los consumidores detectaban la diferencia entre ambas formulaciones, por lo tanto sería de interés estudiar el agregado de fibras en ambas. Se ideó una fórmula reducida en calorías tomando como referencia AC1 y AC2 regulares en donde se reemplazó la leche entera en polvo por descremada y la sacarosa por sucralosa en concentración adecuada y se observó que eran geles de menores fuerzas de fractura que los respectivos regulares y que los comerciales con valores energéticos 67,6 y 65,7 % respectivamente menores a los de AC1 y AC2 regulares y 70,6 y 68,1 % respectivamente menores a los postres comerciales.

Capítulo 4- Efecto del tipo de fibra sobre las características fisicoquímicas y organolépticas de los postres regulares.

4.1- Introducción

Además de las propiedades reológicas, hay otras como las propiedades organolépticas que son muy importantes cuando se desarrolla un nuevo alimento. Dentro de estas últimas se encuentran el color superficial y el estudio sensorial del producto.

La percepción del color resulta del estímulo de las ondas electromagnéticas del espectro visible en la retina. Munsell caracterizó tres atributos para definir un color:

1. HUE: Que es el tinte o matiz, lo que nosotros definimos de un color (verde, azul, amarillo, etc.) Esta escala se base en los siguientes colores (rojo, amarillo, verde, azul, púrpura, amarillo-rojizo, verde-amarillento, púrpura-azulado, rojo-púrpura y azul-verdoso).

2. VALUE: El “ valor”, que es la proporción luminosa, claridad u oscuridad de un color. Esta escala cambia de blanco (0) a negro (10).

3. CHROMA: Que indica la “pureza” o “intensidad” de un color. Es una medida del apartamiento del color percibido con un gris con la misma luminosidad (gris neutro = 0).

Así, un color cualquiera puede ser ubicado en algún punto de una representación de tres dimensiones (hue, value y chroma) llamada sólido de color de Munsell. Además de estos atributos la percepción de color depende de: la iluminación (existen distintos tipos de iluminantes normalizados), de la capacidad del objeto para transformar la luz incidente que es función de la estructura y composición química del objeto y de la percepción humana (de los distintos tipos de receptores, en especial, de conos y bastones).

Con el fin de normalizar la medida del color, la Comission Internationale de l'Eclairage (CIE) reunida en París en 1931 definió un espacio físico de colores fundado en la teoría de la percepción tricromática. Este espacio se desarrolló basándose en la igualación de colores mediante mezcla de cantidades apropiadas

de tres estímulos fundamentales: rojo, verde y azul y se tuvieron en cuenta: fuentes estándar de iluminación, condiciones exactas de observación, unidades matemáticas apropiadas y curvas del observador patrón.

Paralelamente se desarrolló el sistema L , a , b de Hunter que es muy utilizado y tiene equivalencia con el sistema CIE. L corresponde a la luminosidad y a y b a la cromaticidad. Concretamente a define el componente rojo-verde; rojo para valores positivos y verde para los negativos. El parámetro b define el componente amarillo-azul; amarillo para los valores positivos y azul para los valores negativos. Los colores son más saturados cuanto más alejados se encuentran los puntos que los definen, del centro del gráfico. El sólido de Hunter se muestra en la figura II.21.

Fig. II.21- Sólido de color de Hunter

La evaluación sensorial, es un paso lógico y necesario antes de lanzar un producto al mercado. La percepción oral del alimento es compleja e involucra propiedades gustativas, olfatorias, visuales, táctiles y quineséticas (propiedades mecánicas: dureza, adhesividad), que son evaluadas en conjunto (Meilgaard y col., 1999). Esta percepción, asimismo, está dada por la composición y la estructura del producto.

Los ensayos sensoriales pueden ser divididos en dos categorías: afectivos y analíticos. Los primeros se llevan a cabo con consumidores, importan sus percepciones y preferencias y son muy utilizados para explorar la aceptabilidad

que el producto puede tener en el mercado (Foegeding y col, 2003). Los ensayos analíticos se realizan con personas entrenadas y sus respuestas son tratadas como datos instrumentales.

Dentro de los ensayos afectivos o de aceptabilidad se encuentran entre otros, los siguientes métodos: comparación de a pares, ordenamiento de preferencia, escala hedónica. En el primero se busca comparar un producto con otro, ya sea para el mejoramiento de un producto o buscando paridad con la competencia. Este método fuerza una elección de un producto sobre el otro sin indicar si fueron aceptables o no. En el ordenamiento de preferencia el objetivo es comparar la preferencia de más de dos muestras. También se utiliza cuando se quiere ordenar una serie de muestras según un mismo atributo. El método de escala hedónica permite saber cuál es el grado de aceptabilidad sensorial de un producto. La persona le asigna un puntaje dentro de la escala que se le presenta a un atributo en especial del alimento o a la preferencia global del mismo.

La adición de fibra dietaria puede modificar las características estructurales, reológicas y organolépticas del producto (Fernández-García y col., 1997, 1998; Dello Staffolo y col., 2004).

El objetivo de este capítulo es estudiar la influencia del tipo de fibra en las propiedades reológicas y organolépticas de las formulaciones de postres regulares seleccionadas y estudiar el comportamiento en almacenamiento refrigerado.

4.2-Materiales y Métodos

4.2.1- Materiales

Los postres fueron preparados con: leche entera en polvo (Nestle, Argentina); almidón de maíz (Molinos Río de La Plata, Argentina); sacarosa (grado A, Ledesma, Argentina) y una mezcla comercial de capa, iota, y lambda carrageninas CC765 (Inmobal Nutrer, Argentina) como aditivo gelificante.

Las fibras dietarias utilizadas fueron: bambú (Qualicel, CFF, Alemania), inulina (Frutafit-inulin, Imperial Sensus, Holanda), manzana (Vitacel, JRS, Alemania), *Psyllium plantago* (Metamucil, Procter & Gamble Co., Cincinnati, Ohio,

USA), trigo (Wheatcel, CFF, Alemania), y quitosano (Merck, USA). El quitosano ha sido reconocido como fibra dietaria a partir del año 2002 (Institute of Medicine of the National Academies, 2002).

4.2.2- Caracterización de las fibras

Debido a que los efectos fisicoquímicos y fisiológicos de las distintas fibras dietarias se basan en sus estructuras químicas y sus propiedades fisicoquímicas como se ha mencionado anteriormente, es importante conocer las características de las empleadas en el trabajo. Las fibras de bambú, manzana, trigo e inulina poseen especificaciones de los fabricantes tanto fisicoquímicas como microbiológicas que son presentadas en la tabla II.11.

Tabla II.11- Especificaciones de las distintas fibras

Tipo de Fibra		Inulina	Manzana	Trigo	Bambú
Apariencia		Polvo libre de puntos negros	Micropolvo	Polvo	Polvo
Color		Blanco	Marrón	Blanco	Blanco
Olor		Inodora	Manzana	Inodora	Inodora
Sabor		Neutro	Frutal	Neutro	Neutro
		Ligeram. Dulce			
Cont. de Fibra Soluble		> 90 % p/p	25 % p/p	< 2 % p/p	< 2 % p/p
Contenido de Fibra Insoluble		≤ 10 % p/p	75 % p/p	> 95 % p/p	> 95 % p/p
PH		Neutro	3.7	4.0 - 6.0	4.0 – 6.0
Retención de Agua		≤ 5 g H ₂ O/g de materia seca	5.1 g H ₂ O/g de materia seca	3.5 g H ₂ O/g de materia seca	3.5 g H ₂ O/g de materia seca
Tamaño de Partícula		< 85μ entre el 10 y 80 % de las partículas	< 30μ el 90 % de las partículas	< 32μ el 80 % de las partículas	< 32μ más del 80 % de las partículas
Metales Pesados		No Contiene	Pb = 0.28 ppm Cd < 0.01 ppm Hg < 0.02 ppm	Pb < 10 ppm	Pb < 10 ppm
Recuento total		Max. 10 ³ ufc/ g	Max. 10 ³ ufc/ g	< 50 ufc / g	< 50 ufc / g
Análisis Microbiológico	Hongos y levaduras	Max. 20 ufc/ g	Max. 20 ufc/ g	Negativo	Negativo
	Coliformes	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	<i>E. coli</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	<i>Salmonella sp.</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

El quitosano, que no figura en esta tabla, se presenta en escamas finas. El 60% de las mismas son de un tamaño $\leq 500 \mu\text{m}$. El Psyllium utilizado en este trabajo fue adquirido en una farmacia local. El rótulo declaraba la siguiente composición cada 100g de producto: polvo de cáscara de semilla de *Plantago ovata* 49,15 g, sacarosa 50,85 g. El 80% de las partículas tenían un tamaño $\leq 300 \mu\text{m}$.

También hay que tener en cuenta que la capacidad de unir cationes como calcio, hierro, magnesio, etc., que son de importancia nutricional, está relacionada con el contenido de fibra soluble e insoluble, celulosa, hemicelulosa, lignina, fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN).

Se determinaron fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN), celulosa, hemicelulosa y lignina en las fibras de bambú, manzana, Psyllium y trigo empleadas en este trabajo de tesis. Para determinar FDA y FDN fueron utilizados el método descrito por Robertson y Van Soest (1981) usando el equipo ANKOM^{200/220} Fibre Analyzer (ANKOM Technology, Fairport, USA).

Para medir FDA, las muestras fueron agitadas bajo presión disueltas en una solución de detergente ácido por 60 minutos, enjuagadas y secadas. Para determinar lignina las muestras fueron digeridas en ácido sulfúrico, luego del análisis de FDA. El contenido de celulosa fue calculado como FDA menos lignina.

Para determinar FDN las muestras fueron agitadas con una solución de detergente neutro y α -amilasa estable al calor, por 60 minutos, enjuagadas y secadas. El contenido de hemicelulosa fue calculado como FDN menos FDA. El análisis se realizó por duplicado. Los porcentajes p/p de FDA, FDN, lignina, celulosa y hemicelulosa fueron expresados como la media $\pm$ error estándar.

4.2.3- Formulaciones empleadas

Se ensayaron las fórmulas AC1 y AC2 que fueron seleccionadas en el capítulo anterior para estudiar la incorporación de fibra. Todas las fibras se presentaban como polvos, por lo tanto, fueron adicionadas a las preparaciones como componentes secos en la proporción de 11 g/Kg. Como control se utilizaron las fórmulas AC1 y AC2 sin fibras. Debido a que Psyllium se comercializa en una

preparación con 50,85 % p/p de sacarosa, se ajustaron los contenidos de sacarosa y Metamucil en el postre con Psyllium para conservar las mismas proporciones en todos los postres.

4.2.4- Medidas instrumentales de textura

4.2.4.1- Ensayo a grandes deformaciones

Se evaluaron las propiedades mecánicas de fractura de las distintas formulaciones usando texturómetro Texture Analyser-xT2i (Stable Micro Systems, UK) de la misma manera que en el capítulo anterior. Se determinaron: índice de firmeza, fuerza y distancia de fractura. Los resultados fueron expresados como los valores medios de los parámetros $\pm$ desvío estándar de tres repeticiones de la misma formulación.

4.2.4.2- Ensayo a bajas deformaciones

Una vez desarrollada la formulación de un alimento, también es importante estudiar cómo afecta la manipulación del consumidor en las características reológicas del mismo, para una mejor aceptación del producto en el mercado. Por lo tanto, se estudiaron durante 7 días de almacenamiento refrigerado, las propiedades mecánicas a bajas deformaciones que se pueden relacionar con la microestructura y composición química del alimento.

Se tomaron muestras a los 1, 3, 5 y 7 días. Se realizaron medidas oscilatorias dinámicas determinándose los valores de G' , G'' , η^* y $\tan \delta$ con el reómetro Haake RS600 de esfuerzo controlado en las mismas condiciones que las utilizadas en el capítulo 2. La viscoelasticidad lineal se mantuvo hasta 12 Pa. Los postres con y sin fibra dietaria se sometieron a un barrido de frecuencia desde 0.01592 Hz hasta 15.92 Hz, con un esfuerzo constante de 10 Pa a una temperatura de 25°C. Se compararon los valores de G' , G'' , η^* y $\tan \delta$ a 1Hz expresados como los valores medios $\pm$ desvío estándar de tres repeticiones de la misma formulación.

4.2.5- Estudio microestructural

Teniendo en cuenta que los postres tienen un alto contenido de humedad, se analizó la microestructura del producto con un Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM, Electroscan 2010, USA) utilizando un detector de electrones secundarios para trabajar en atmósfera gaseosa (GSED). Este tipo de equipo permite estudiar muestras con alto contenido de agua. Se tomaron fotomicrografías de las fibras, postres sin fibra (C2,5 y A57, ver Cap. 3) y postres con fibras.

4.2.6- Ensayo de sinéresis

Se estudió el exudado producido por los postres con y sin fibras durante almacenamiento refrigerado con la técnica empleada en el capítulo 2 con 1 h de contacto entre la muestra y el medio poroso. Se tomaron muestras a los 1, 3, 5 y 7 días. Los resultados fueron expresados como los valores medios $\pm$ desvío estándar de tres repeticiones de la misma formulación.

4.2.7- Ensayo de color Superficial

Se evaluaron las modificaciones de color superficial con la utilización de colorímetro triestímulo Chroma meter Minolta CR 300 (Japón). Se obtuvieron los parámetros primarios L^* , a^* b^* . Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el parámetro L^* y se calculó el valor del ángulo Hue (H°) que corresponde a la cromaticidad como:

$$H^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*) \text{ cuando } a^* \text{ y } b^* \text{ son positivos}$$

$$H^\circ = 180 - \tan^{-1} (b^*/a^*) \text{ cuando } a^* \text{ es negativo y } b^* \text{ es positivo}$$

Se colocaron las muestras en cápsulas de 5 cm de diámetro y 1 cm de alto. Entre la muestra y el cabezal del colorímetro se interpuso un vidrio transparente de 6 cm x 6 cm de 2 mm de espesor para la protección del equipo. Para la

calibración que se realizó antes de cada medición se utilizaron los platos de color blanco, azul y verde provistos por el fabricante. Todas las medidas se realizaron por duplicado de tres repeticiones de la misma formulación. Los resultados fueron expresados como los valores medios de los parámetros $\pm$ desvío estándar.

4.2.8- Ensayo Sensorial

Se realizó un ensayo sensorial para estudiar la aceptabilidad de los postres funcionales por parte de los consumidores. Se utilizó un panel sensorial no entrenado constituido por 40 adultos de ambos sexos (45% de varones y 55% de mujeres). Se llevó a cabo una encuesta previa, para incorporar al panel, consumidores habituales de este tipo de producto.

Los postres se evaluaron para los siguientes atributos: apariencia, sabor, textura y preferencia global, utilizando una escala hedónica sin estructurar de 10 cm de largo marcada solo al principio y al final para cada atributo y para cada postre (Stone y Sidel, 2004).

Se realizaron dos ensayos, uno con las formulaciones AC1 que contenían 17 g/kg^{-1} de almidón y $1,7 \text{ g/kg}$ de carragenina y cada una de las fibras y el otro ensayo, con las formulaciones AC2 (25 g/Kg de almidón y $2,5 \text{ g/Kg}$ de carragenina) y cada una de las fibras.

Las muestras fueron preparadas y presentadas en vasos de plástico de 50 ml de capacidad, codificados con números de tres dígitos elegidos al azar, luego de 24 h de almacenamiento a 4°C . Se proporcionó a cada miembro del panel la ficha de evaluación (Figura II.22) y agua de red para enjuagarse la boca entre la prueba de cada muestra. Debido a la gran cantidad de muestras para probar, se realizaron cuatro secciones de pruebas de 3, 3, 3 y 4 muestras cada una por persona, todas al mismo horario, durante la tarde entre las 14 y 16 h.

4.2.9- Análisis Estadístico de los datos obtenidos.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo con un software estadístico (Systat Inc., Evenston, IL, USA, 5.0 copyright 1992). Se utilizó

el test de ANAVA para un factor, para encontrar diferencias significativas en todos los parámetros estudiados para postres con y sin fibras dietarias y el test de Tukey para comparación de medias.

Ensayo de Aceptabilidad de postres

Usted recibirá tres muestras, ordenadas al azar, codificadas con números de tres dígitos. Deberá evaluarlos para los atributos indicados marcando una posición en cada escala.

Muestra n° 786

me disgusta mucho

me es indiferente

me gusta mucho

Apariencia

me disgusta mucho

me es indiferente

me gusta mucho

Sabor

me disgusta mucho

me es indiferente

me gusta mucho

Textura

me disgusta mucho

me es indiferente

me gusta mucho

Preferencia Global

Fig. II.22- Ficha reducida del ensayo de aceptabilidad sensorial.

4.3- Resultados y discusión

4.3.1- Caracterización de las fibras empleadas

Los porcentajes p/p de FDA, FDN, lignina, celulosa y hemicelulosa, expresados como la media ± error estándar, se observan en la tabla II.12.

Tabla II.12- Análisis de fibra de origen vegetal por el equipo ANKOM					
Fibra	Fibra Detergente Acida (%p/p)	Fibra Detergente Neutra (%p/p)	Lignina (%p/p)	Celulosa (%p/p)	Hemicelulosa (%p/p)
Bambú	19,3 ± 0,8	30,8 ± 0,4	2,0 ± 0,0	16,9 ± 0,1	11,5 ± 1,3
Manzana	34,9 ± 0,1	38,6 ± 0.0	8,4 ± 1,8	26,8 ± 0,6	3,7 ± 0,1
Psyllium	6,2 ± 0,4	31,9 ± 1,5	0,7 ± 0,1	6,3 ± 0,3	25,7 ± 1,1
Trigo	61,9 ± 3,11	73,3 ± 0,0	2,6 ± 0,6	59,8 ± 4,0	11,4 ± 3,1

Luccia y Kunkel (2002) realizaron un estudio similar para determinar estos parámetros en celulosa, metilcelulosa y psyllium de diferentes orígenes. Estos investigadores encontraron que Psyllium (Metamucil) tenía un contenido medio $\pm$ error estándar de $68,3 \pm 5,9\%$ p/p de fibra total, $32,5 \pm 2,1\%$ de fibra soluble $2,0 \pm 2,1\%$ de FDA, $37,1 \pm 1,8\%$ de FDN, $0,2 \pm 0,1$ de lignina, $1,8 \pm 2,0\%$ de celulosa, $35,2 \pm 0,2$ de hemicelulosa.

De este análisis se desprende que la fibra de manzana posee el mayor contenido de lignina, la fibra de trigo tiene el mayor contenido de celulosa, la fibra de Psyllium el mayor contenido de hemicelulosa y que entre las fibras de trigo y bambú no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de hemicelulosa.

En la figuras II.23 y II.24 se muestran fotomicrografías de las fibras de bambú, inulina, manzana, Psyllium, quitosano y trigo, tomadas con el microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM). Se pueden apreciar las distintas formas y tamaños de partícula, de los polvos de las fibras proporcionados por los proveedores.

Fig. II.23- Fotomicrografías electrónicas de barrido ambiental (ESEM) de la fibra de bambú (a) e inulina (b). La barra en la parte inferior izquierda de cada foto corresponde a 50 μm

Fig. II.24- Fotomicrografías electrónicas de barrido ambiental (ESEM) de las fibras de manzana (a), Psyllium (b), quitosano (c) y trigo (d). La barra en la parte inferior izquierda de cada foto corresponde a 50 μ m.

4.3.2- Propiedades de fractura, color superficial y aceptabilidad sensorial en postres con y sin fibras.

Cuando se adicionan las fibras, la forma de los patrones mecánicos de las fórmulas AC1 y AC2 se mantuvieron, a excepción de los postres con Psyllium que muestran un perfil diferente (Fig. II.25). El efecto del psyllium fue más marcado en la fórmula AC1, probablemente porque el menor contenido de almidón y carragenina exalta la presencia de esta fibra. Chan y Wypyszyk (1988) describieron que Psyllium forma una dispersión viscosa a concentraciones por

debajo de 10 g/Kg y una masa gelatinosa o gel a partir de 20 g/Kg De acuerdo con Aguilera y Stanley (1999) un tipo de sinergismo puede ocurrir debido al efecto de volumen excluido. Cada polímero aparece como si fuera más concentrado porque el otro polímero esta tomando solvente. Considerando esta idea de volumen excluido, la concentración efectiva de Psyllium en las mezclas podría aumentar, llegando o superando la concentración crítica para la formación del gel.

Fig. II.25 Perfiles mecánicos de formulaciones AC2 (a) y AC1 (b). — Postres sin fibra, — Psyllium, — manzana, — quitosano

El hecho de que la fuerza de ruptura de la mezclas AC1 y AC2 con Psyllium fueron más altas que sus respectivas AC1 y AC2 sin fibra (Tabla II.13), podría ser interpretado como que forman geles mixtos. De acuerdo con Aguilera y Stanley (1999) en presencia de una mezcla de polímeros gelificantes fuertes y débiles, se pueden formar distintos tipos de geles mixtos. Por ejemplo, efectos sinérgicos ocurren cuando la red del gel esta formada por el polímero gelificante fuerte y el otro polímero refuerza la matriz actuando como relleno o fase dispersa. Cuando la red del gel esta formada por un agente gelificante débil, el gel mixto tiene parámetros reológicos más bajos. En las formulaciones AC1 carragenina actuaría como el agente gelificante débil y Psyllium como el agente fuerte. El caso contrario se daría en las formulaciones AC2 con Psyllium.

Tabla II.13- Índice de Firmeza, fuerza de ruptura, distancia de ruptura de postres con y sin fibras (medias ± desviación standard)

Muestras	Índice de Firmeza (mN/mm)		Fuerza de ruptura (KPa)		Distancia de ruptura (mm)	
	AC1	AC2	AC1	AC2	AC1	AC2
Control	116 ^a ± 5	215 ^a ± 2	0,60 ^a ± 0,04	1,12 ^a ± 0,09	4,3 ^a ± 0,1	4,7 ^a ± 0,1
Bambú	118 ^{a,b} ± 10	213 ^{a,c} ± 15	0,65 ^a ± 0,04	1,32 ^b ± 0,07	4,5 ^a ± 0,2	5,5 ^b ± 0,2
Inulina	105 ^{a,b} ± 7	214 ^{a,c} ± 14	0,59 ^a ± 0,03	1,25 ^{a,b} ± 0,06	4,7 ^{a,c} ± 0,4	5,0 ^{a,b} ± 0,4
Manzana	195 ^c ± 18	262 ^b ± 16	0,83 ^b ± 0,04	1,22 ^{a,b} ± 0,04	3,8 ^b ± 0,3	4,6 ^a ± 0,3
Psyllium	107 ^a ± 8	190 ^c ± 14	1,12 ^d ± 0,03	1,52 ^c ± 0,09	7,9 ^d ± 0,6	14,7 ^c ± 1,0
Quitosano	70 ^d ± 4	130 ^d ± 6	0,43 ^c ± 0,03	0,62 ^d ± 0,01	5,2 ^c ± 0,4	4,8 ^a ± 0,2
Trigo	127 ^{a,b} ± 6	226 ^a ± 10	0,65 ^a ± 0,09	1,45 ^c ± 0,04	4,5 ^{a,c} ± 0,3	5,6 ^b ± 0,2

^a Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas p<0.05

La tabla II.13 también muestra que los parámetros estudiados fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) para AC2 con fibras que para las correspondientes a AC1 con fibras.

La firmeza del gel depende de la cantidad de zonas de asociación formadas entre los polisacáridos responsables de la estructura de los postres. Los postres con manzana o con quitosano fueron significativamente ($p<0,05$) más y menos firmes respectivamente que los demás para las formulaciones AC1 y AC2. Este comportamiento podría deberse a que la fibra de manzana tiene menor tamaño de

partícula y mayor contenido de lignina que las demás fibras (Tabla II.12). Esta molécula es ramificada y podría formar asociaciones con los demás componentes del gel haciéndolo más resistente a la deformación. El quitosano podría estar dificultando la formación de la red por su gran tamaño de partícula.

La fuerza de las uniones de la red, caracterizada por la fuerza de ruptura, fue más alta para los postres con Psyllium o con manzana ($p < 0,05$) y más baja para los postres con quitosano en las formulaciones AC1. Los demás postres mostraron valores intermedios y similares a las formulaciones sin fibra. En cambio, para las formulaciones AC2, la fuerza de ruptura fue significativamente más alta para los postres con Psyllium o con trigo y más baja para los postres con quitosano. Por lo tanto, como ya dijimos el Psyllium con su capacidad de formar geles a bajas concentraciones y su mayor contenido de hemicelulosa causó un aumento de la fuerza de ruptura de ambas formulaciones. La lignina de la fibra de manzana que es una molécula ramificada, fue más efectiva en las formulaciones de menor contenido de almidón y carragenina. En cambio, la celulosa, que es una molécula sin ramificaciones, pareció ser más adecuada para las formulaciones con mayor contenido de almidón y carragenina. Quitosano tuvo valores bajos para AC1 y AC2 porque interrumpe la formación del gel por su gran tamaño de partículas, como ya se mencionó. Inulina y bambú mantuvieron las características de AC1 y AC2.

Tabla II.14- Luminosidad (L^*) y cromaticidad (ángulo Hue, H°) de postres con y sin fibras (medias $\pm$ desviación standard) de las fórmulas AC1 y AC2

Muestras	L^*		H°	
	AC1	AC2	AC1	AC2
Control	97.2 ^a $\pm$ 0.1	97.2 ^a $\pm$ 0.2	86.8 ^a $\pm$ 0.4	86.7 ^a $\pm$ 0.5
Bambú	97.8 ^b $\pm$ 0.1	97.9 ^b $\pm$ 0.1	83.2 ^b $\pm$ 0.5	83.5 ^b $\pm$ 0.7
Inulina	96.1 ^c $\pm$ 0.1	95.9 ^c $\pm$ 0.1	89,3 ^c $\pm$ 0,3	89,1 ^c $\pm$ 0,2
Manzana	80.1 ^d $\pm$ 0.1	80.1 ^d $\pm$ 0.1	58.5 ^d $\pm$ 0.2	58.3 ^d $\pm$ 0.5
Psyllium	97.0 ^a $\pm$ 0.2	97.1 ^a $\pm$ 0.2	68.4 ^e $\pm$ 1.8	68.3 ^e $\pm$ 2.0
Quitosano	96.0 ^c $\pm$ 0.1	96.2 ^c $\pm$ 0.2	76.3 ^f $\pm$ 0.5	76.3 ^f $\pm$ 1.7
Trigo	97.2 ^a $\pm$ 0.2	97.1 ^a $\pm$ 0.2	70.0 ^e $\pm$ 0.8	71.5 ^e $\pm$ 1.8

^a Diferentes letras en comparación vertical indican diferencias significativas $p<0.05$

La tabla II.14 muestra la luminosidad (L^*) y la cromaticidad (H°) que es el ángulo Hue de postres con y sin fibra para las formulaciones AC1 y AC2. Todos los postres tenían una tonalidad entre blanca y amarilla excepto los de manzana que eran marrones. No se encontraron diferencias significativas en el color superficial de AC1 y AC2. La cromaticidad fue más afectada por el tipo de fibra que la luminosidad.

Si bien fueron detectadas las diferencias entre AC1 y AC2 con el ensayo del triángulo (Cap. 3), en el ensayo de aceptabilidad recibieron la misma puntuación (Figura. II.26a y b) para los atributos elegidos. Las diferencias significativas entre los postres con fibra y sus respectivos controles, solo pueden ser atribuidas a la presencia de la fibra, ya que los demás componentes se encuentran en la misma proporción. En general la fibra causa una disminución en la puntuación de todos los atributos.

De acuerdo al test de Tukey, la apariencia para AC1 con bambú, manzana, trigo o inulina, no fue significativamente distinta ($p < 0.05$) a su control, pero si lo fue para psyllium y quitosano (Fig. II.26a). La marcada contribución del sabor y la textura a la preferencia global es muy evidente. Los postres con fibras no difirieron significativamente para los otros parámetros, excepto para quitosano.

AC2 con quitosano no fue evaluado debido a las bajas puntuaciones obtenidas para AC1. Los puntajes obtenidos para AC2 con fibras fueron superiores a los obtenidos por AC1, y las diferencias con el control fueron menos marcadas (Fig. II.26a y b). Los postres con fibras de bambú, trigo e inulina no difirieron significativamente con el control, pero sí con los postres con manzana y psyllium para todos los atributos.

Los postres con psyllium y quitosano para la fórmula AC1 y los postres con manzana y psyllium para los postre con la fórmula AC2 mostraron diferencias con los demás, tanto en la apariencia como en la cromaticidad (H°) medida instrumentalmente. La apariencia sensorial evaluada por los consumidores no varió para las otras fibras, pero si se pusieron de manifiesto en las medidas instrumentales de color. La cromaticidad influyó más a la apariencia sensorial que la luminosidad. El psyllium modifica la textura instrumental de los postres, sin embargo recibió la misma puntuación para sabor, textura y preferencia global que

las otras fibras para la fórmula AC1. Control, bambú e inulina con la fórmula AC1 no mostraron diferencias significativas entre ellas tanto para los ensayos sensoriales como para los instrumentales de textura.

Fig. II.26. Puntajes de todos los atributos para los postres con y sin fibras de las fórmulas AC1 (a) y AC2 (b). Postres con inulina (—); bambú (·····), manzana (— · —); trigo (— — —); quitosano (— —) y Psyllium (— · · —) y sin fibra (—). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En síntesis, los postres con quitosano fueron descartados debido a las variaciones en las propiedades de fractura y los puntajes bajos obtenidos en el ensayo sensorial. Si bien psyllium modificó la estructura de AC1 y AC2, tuvo puntaje aceptable en el ensayo sensorial para la fórmula AC1. Manzana provocó un cambio de color, pero su aceptación no fue diferente a las otras fibras en la formulación AC1. Los postres con la fórmula AC2 y las fibras de bambú e inulina fueron las que menos alteraron tanto el comportamiento sensorial como la textura instrumental a grandes deformaciones y obtuvieron muy buenos puntajes de aceptabilidad.

4.3.3- Propiedades mecánicas a bajas deformaciones, micro estructura y sinéresis durante el almacenamiento refrigerado

Teniendo en cuenta las conclusiones de la sección anterior, para estudiar el almacenamiento refrigerado se utilizó la formulación AC2 con y sin fibras y se descartó al quitosano. Los postres con y sin fibra se comportaron como geles débiles durante los 7 días de almacenamiento refrigerado. Este comportamiento puede observarse en la figura II.27a y b que muestra G' y G'' con respecto a la frecuencia en Hz, de postres con y sin fibras de manzana, trigo y Psyllium a 1 y 7 días de almacenamiento. G' fue significativamente mayor que G'' y presentó escasa variación en el rango de frecuencias ensayado. G'' presentó un mínimo en los postres con y sin fibra a excepción de los postres con fibra de manzana a las 24 h de almacenamiento. La ausencia de mínimo, que da idea de un gel más fuerte en dichos postres, concuerda con su mayor firmeza detectada en el ensayo a grandes deformaciones (Tabla II.13). A los 7 días, todos los postres presentaron el mínimo en la curva de G'' .

Los postres con fibra presentaron valores significativamente ($p < 0,05$) mayores de G' , G'' y η^* que el postre sin fibra (Tabla II.15, Figura II.27 y Figura II.29). Estos resultados junto con los obtenidos en la sección anterior refuerzan la idea de que las fibras contribuirían a reforzar el sistema actuando también como relleno del gel. Es decir que, los postres con fibras serían un gel mixto formado por una matriz o red de carragenina que es un gelificante fuerte.

Fig. II.27- Barridos de frecuencia típicos de postres sin fibra (♦) y con fibras de manzana (▲), trigo (■) y Psyllium (●) para el primer (a) y séptimo día (b) de almacenamiento. Los símbolos llenos corresponden a G' y los símbolos vacíos corresponden a G'' .

Esto se puede observar en la fotomicrografía de barrido ambiental (Figura II.28a). A su vez, esta red estaría rellena por el almidón y las fibras de bambú, manzana, trigo, Psyllium o inulina (Figura II.28b y c). Este sería el caso que

cuando las interacciones entre el relleno y la matriz son fuertes aumenta la firmeza del gel relleno en comparación con el gel solo (van Vliet, 1988 y Lai y col. 1999).

Fig. II.28- Micrografías por ESEM de postres. (a) C2,5, (b) A57 y (c) postre con fibra de manzana. Barras = 10 μ m. FM= fibra de manzana, RC= red de carragenina, GAG = gránulos de almidón gelatinizado

Comparando los postres con fibra al primer día de almacenamiento, los de manzana presentaron valores mayores de G' (Tabla II.15). El resto de los postres con fibra no diferían significativamente entre ellos ($p < 0,05$). Las características mencionadas de la fibra de manzana valen también para G'. Todas las fibras fueron significativas para G".

Tabla II.15- G', G'', Tan δ a 1 Hz de postres lácteos regulares con fibras durante el almacenamiento refrigerado				
Tipo de Fibra	Tiempo (días)	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tan δ (-)
Bambú	1	1567 ± 18	274 ± 4	0,171 ± 0,009
	3	1750 ± 13	320 ± 25	0,182 ± 0,013
	5	2185 ± 39	390 ± 5	0,178 ± 0,001
	7	2494 ± 27	428 ± 47	0,169 ± 0,002
Inulina	1	1795 ± 51	318 ± 8	0,177 ± 0,001
	3	2092 ± 55	383 ± 22	0,183 ± 0,006
	5	2553 ± 51	476 ± 8	0,186 ± 0,000
	7	2677 ± 47	445 ± 6	0,169 ± 0,002
Manzana	1	2290 ± 18	483 ± 9	0,211 ± 0,002
	3	2569 ± 81	521 ± 2	0,203 ± 0,003
	5	2857 ± 56	593 ± 16	0,208 ± 0,002
	7	3263 ± 49	648 ± 11	0,201 ± 0,002
Psyllium	1	1543 ± 19	235 ± 3	0,152 ± 0,011
	3	1769 ± 34	295 ± 3	0,167 ± 0,001
	5	2201 ± 74	410 ± 12	0,186 ± 0,001
	7	2712 ± 69	436 ± 11	0,164 ± 0,002
Trigo	1	1547 ± 22	262 ± 4	0,169 ± 0,005
	3	1407 ± 4	261 ± 6	0,185 ± 0,005
	5	1638 ± 2	283 ± 7	0,173 ± 0,004
	7	1781 ± 10	290 ± 1	0,164 ± 0,002
Sin Fibra	1	631 ± 2	94 ± 0	0,149 ± 0,001
	3	696 ± 6	107 ± 3	0,153 ± 0,005
	5	800 ± 14	120 ± 1	0,150 ± 0,005
	7	787 ± 20	119 ± 4	0,151 ± 0,001

A los 7 días de almacenamiento el comportamiento de las fibras fue diferente ya que hubo más diferencias entre ellas. Los postres con fibra de trigo tuvieron los menores valores de G', seguidos en orden creciente por los postres con fibra de bambú. Los postres con Psyllium o inulina no fueron significativamente diferentes. Los postres con manzana presentaron los mayores valores. Los valores de G'' siguieron el mismo patrón que G', salvo que los postres

con bambú no fueron significativamente diferentes de los postres con Psyllium o inulina. Entre 1 y 7 días hubo magnitudes intermedias de todos los parámetros.

La $\tan \delta$ a 1 Hz para el postre sin fibra se mostró significativamente menor ($p < 0.05$) a todos los tiempos que los postres con fibra (Tabla II.15). Las fibras de trigo y bambú no causaron diferencias significativas ($p < 0.05$) de $\tan \delta$ en función del tiempo de almacenamiento.

En la figura II.29 se presenta la viscosidad compleja (η^*) a 1 y 7 días de almacenamiento para los postres con y sin fibra. Según Steffe (1996) la viscosidad compleja correlaciona bien con la percepción humana de la viscosidad. El análisis estadístico de este parámetro mostró al igual que lo observado para G' , G'' y $\tan \delta$, que los postres con fibra diferían significativamente de los sin fibra para día 1 y 7 aumentando η^* en función del tiempo de almacenamiento.

Fig. II.29- η^* de postres con y sin fibras para 1 y 7 días de almacenamiento.

En el primer día, los postres con fibra de Psyllium, trigo y bambú no diferían entre ellos y presentaron los menores valores y los postres de manzana los mayores, seguido por inulina. En el séptimo día, el comportamiento fue similar al

de G' al séptimo día. Manzana y trigo tuvieron valores extremos y Psyllium e inulina no diferían significativamente entre ellos. Es de destacar, que los postres con Psyllium fueron los que más aumentaron en función del tiempo y los postres con trigo los que presentaron menor variación. Esto podría explicarse ya que se sabe que Psyllium posee una gran capacidad de hidratación (Chan y Wypyszyk, 1988), como fue mencionado anteriormente.

Durante el tiempo transcurrido en almacenamiento a 4°C se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) de G', G'' y η^* de los postres con y sin fibras (Tabla II.15 y Figura II.28). Este comportamiento puede atribuirse al fenómeno de retrogradación del almidón que contiene la formulación. En la tabla II.16 se muestran los porcentajes de exudado de los postres con y sin fibras durante el almacenamiento. Se observó que conforme pasan los días aumentó el porcentaje de exudado.

Tabla II.16- Sinéresis (% exudado $\pm$ desviación estándar) de postres con y sin fibras (fórmula AC2) durante almacenamiento refrigerado

Postre	1 día	3 días	5 días	7 días
Sin Fibra	22,2 ^{a,a} $\pm$ 2,6	28,2 ^{a,β} $\pm$ 0,8	35,7 ^{a,γ} $\pm$ 0,8	41,3 ^{a,δ} $\pm$ 4,6
Bambú	26,9 ^{b,a} $\pm$ 1,9	39,8 ^{b,β} $\pm$ 2,8	40,2 ^{a,b,β} $\pm$ 7,8	42,3 ^{a,β} $\pm$ 1,2
Inulina	17,0 ^{c,a} $\pm$ 0,4	49,0 ^{b,β} $\pm$ 7,1	50,7 ^{b,β} $\pm$ 4,6	69,4 ^{b,γ} $\pm$ 7,0
Manzana	15,2 ^{c,a} $\pm$ 1,8	26,1 ^{a,β} $\pm$ 3,7	47,3 ^{b,γ} $\pm$ 5,1	53,0 ^{c,δ} $\pm$ 6,4
Psyllium	21,5 ^{a,b,a} $\pm$ 3,7	33,6 ^{a,b,β} $\pm$ 6,5	33,2 ^{a,β} $\pm$ 5,1	33,0 ^{a,β} $\pm$ 6,0
Trigo	31,3 ^{b,a} $\pm$ 7,2	48,8 ^{b,β} $\pm$ 6,9	50,8 ^{b,β} $\pm$ 4,4	47,3 ^{a,b,c,β} $\pm$ 8,3

^a Diferentes letras latinas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la columna
^a Diferentes letras griegas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en la fila

Al primer día de almacenamiento los postres con inulina y manzana no diferían significativamente entre ellos. Los postres con bambú, Psyllium o trigo tampoco. Esto puede atribuirse a que Psyllium tiene el mayor contenido de hemicelulosa, mientras que bambú y trigo no difieren en el contenido de ésta. Al séptimo día de almacenamiento los postres con inulina presentaron el mayor porcentaje de exudado y diferían con los postres de manzana. Los postres con bambú, Psyllium o trigo mantuvieron su comportamiento semejante.

Conclusiones

Por los resultados obtenidos en los ensayos instrumentales de textura y por las fotomicrografías, los postres con fibras son un gel mixto formado por una red de carragenina rellena por el almidón y las fibras. Las propiedades de fractura estudiadas fueron significativamente más altas ($p < 0.05$) para la formulación con mayor contenido de almidón-carragenina con fibras que concuerda con los resultados obtenidos en el capítulo 3. El efecto del Psyllium fue más marcado en la fórmula con menor contenido de almidón y carragenina.

Los postres con quitosano fueron descartados debido a las variaciones en las propiedades de fractura y los bajos puntajes obtenidos en el ensayo sensorial. Si bien Psyllium modificó la estructura de AC1 y AC2, tuvo puntaje aceptable en el ensayo sensorial para la fórmula AC1. Manzana provocó un cambio de color, pero con una adecuada adición de colorantes y saborizantes podría tener buena aceptación. Los postres con la fórmula AC2 y las fibras de bambú e inulina fueron las que menos alteraron tanto el comportamiento sensorial como la textura instrumental a grandes deformaciones y obtuvieron muy buenos puntajes de aceptabilidad.

El tipo de fibra influyó en los valores obtenidos de G' , G'' , $\tan \delta$ y η^* en los postres adicionados con fibra dietaria almacenados a 4°C durante 7 días. Asimismo, el tiempo también resultó un factor significativo, ya que aumentó los parámetros reológicos debido al fenómeno de retrogradación del almidón.

Capítulo 5- Efecto del tipo de fibra en la textura y sinéresis de los postres con de menor valor energético

5.1- Introducción

La optimización de las formulaciones de productos alimenticios puede lograrse mediante el uso de técnicas estadísticas y varios diseños experimentales disponibles. Se puede querer minimizar el número de experimentos a realizar con respecto a un análisis factorial completo, que puede ocurrir en el caso de que alguna combinación de factores esté restringida de alguna manera, por ejemplo cuando dos factores no pueden ser usados en sus niveles más altos simultáneamente. También, puede pasar que se tenga cierta información previa de la formulación del producto y que se quiera explorar una región experimental de interés en ciertos puntos que el diseño factorial completo no representa. Este es el caso del diseño compuesto de punto central que se construye a partir de la porción cúbica de un diseño 2^k (donde k es el número de factores), la cual es aumentada con puntos centrales y puntos axiales. Sin embargo, no hay que dejar de lado que estos diseños experimentales son adecuados para productos alimenticios que requieren más de un ingrediente, que las proporciones de los ingredientes en la mezcla y sus niveles sean dependientes entre ellos y que la suma de todos los componentes sea siempre uno o 100% (Hare, 1974).

Estos diseños, pertenecen a la estimación de superficies de respuesta, siguiendo una ecuación general modelo:

$$y = b_0 + b_1 * x_1 + \dots + b_k * x_k + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + \dots + b_{k-1,k} * x_{k-1} * x_k + b_{11} * x_1^2 + \dots + b_{kk} * x_k^2$$

que incluye, los efectos principales de los factores $x_1, \dots, x_k$; sus interacciones ($x_1 * x_2, x_1 * x_3, \dots, x_{k-1} * x_k$) y sus componentes cuadráticos ($x_1^2, \dots, x_k^2$). Es decir que se estudia como ajusta a este modelo los valores observados de las variables dependientes, siendo los factores las variables independientes

La medición de compresión uniaxial entre platos paralelos es una de las técnicas más usadas para determinar propiedades mecánicas a grandes

deformaciones en los geles. Estas medidas muestran una buena correlación con propiedades de textura sensorial (Breuil y Meullenet, 2001). Entre las propiedades mecánicas de los geles se sabe que el módulo de deformabilidad, elástico o de Young es la magnitud de la deformación elástica (que vuelve al estado inicial cuando se retira la fuerza aplicada). Es decir, está relacionado con la firmeza de la red. El esfuerzo de fractura tiene que ver con el esfuerzo que puede soportar la red antes de romperse y la deformación de fractura está relacionada con la elasticidad en el sentido de cuanto se puede deformar el gel para una misma carga aplicada (Sanderson y col., 1988). Además, los factores que afectan las propiedades de fractura de los geles incluyen el número de uniones de las cadenas por sección transversal y la fuerza de cada unión (van Vliet y col., 1991), así como también la tortuosidad de la red del gel.

En el Capítulo 3 se establecieron dos formulaciones de menor valor energético que presentaron una disminución en la fuerza de fractura que se atribuyó al reemplazo de la sacarosa por sucralosa y a la ausencia de materia grasa. Entonces, el objetivo de este capítulo fue analizar mediante un diseño experimental compuesto de punto central, cómo influyen los componentes de estos postres en la textura y sinéresis y estudiar si el agregado de fibra puede aportar mayor fuerza a las formulaciones de menor valor energético.

5.2- Materiales y métodos

5.2.1- Materiales

Los postres con menor contenido calórico fueron preparados con: leche descremada en polvo (Nestle, Argentina) reconstituida con agua destilada; almidón de maíz (Molinos Río de La Plata, Argentina); sucralosa (Merck, Argentina) y una mezcla comercial de capa, iota, y lambda carrageninas CC765 (Inmobal Nutrer, Argentina) como aditivo gelificante. Las fibras dietarias utilizadas fueron: manzana (Vitacel, JRS, Alemania), trigo (Wheatcel, CFF, Alemania), bambú (Qualicel, CFF, Alemania), Psyllium plantago (Metamucil, Procter &

Gamble Co., USA), inulina (Frutafit-inulin, Imperial Sensus, Holanda), cuyas características fueron descritas en la Parte II Capítulo 4.

5.2.2- Preparación de las muestras

Todas las combinaciones de los distintos componentes para llevar a cabo el diseño experimental que se detalla a continuación, se prepararon de la siguiente manera: se pesaron los componentes secos en balanza analítica y se mezclaron. Se adicionó agua destilada hasta 1kg de peso total y se realizó una homogeneización durante 30 minutos con un agitador magnético (Ika Labortechnik, Alemania).

Luego se utilizaron las condiciones de trabajo seleccionadas en el Capítulo 2: tratamiento térmico en baño termostatzado a 90°C (Haake, Alemania) durante 20 minutos con agitación constante a 100 r.p.m. (Eurostar Power-5 Agitator, Ika Labortechnik, Alemania) y almacenamiento en cámara a 4°C durante 24h. Alícuotas de los postres fueron colocadas en caliente en moldes de plástico de 30 mm de diámetro y 48mm de altura de fondo removible que se retiraron en el momento de las mediciones de sinéresis y textura. Los moldes fueron untados con silicona previamente, para facilitar la remoción de los mismos.

5.2.3- Ensayo de textura

En los ensayos realizados para estandarizar las condiciones de preparación de los postres presentados en el capítulo 2, se observó la posibilidad utilizar moldes para formar los geles que luego se podían remover con mínima pérdida de estructura para luego ser sometidos al ensayo oscilatorio. Por tal motivo, se llevaron a cabo ensayos de compresión uniaxial a muestras cilíndricas, para determinar perfiles mecánicos con una mínima alteración de la estructura de los geles.

Se utilizó el texturómetro Texture Analyser-xT2i (Stable Micro Systems, UK). Las muestras cilíndricas se comprimían hasta un 80% de deformación con un plato cilíndrico de acrílico de 30 mm de diámetro a una velocidad constante de

1mm/s y con una fuerza de 0,10 N. La superficie del sensor en contacto con la muestra, fue lubricada con silicona para evitar fricción, que puede causar variación en la sección transversal de la pieza (van Vliet, 1999). Debido al cambio de área de la muestra durante la compresión, se realizó la corrección para obtener la deformación verdadera, ε , (deformación de Hencky, van Vliet y Luyten, 1995), la cual se define como:

$$\varepsilon = \ln \left| \frac{L(t)}{L_0} \right| \quad \text{Ec. II.11}$$

Donde $L(t)$ es la distancia recorrida por el sensor y L_0 es la altura inicial de la muestra que corresponde al 100% de deformación, la cual es calibrada antes de comenzar los ensayos. También se corrigió el esfuerzo (Dobraszczyk y Vincent, 1999) según la expresión:

$$\sigma = \frac{F \cdot L(t)}{A_0 \cdot L_0} \quad \text{Ec. II.12}$$

Donde F es la fuerza que va registrando el equipo y A_0 es el área del sensor. Así se obtuvieron las curvas de esfuerzo con respecto a la deformación. Se evaluaron módulo de deformabilidad (E), esfuerzo y deformación de fractura. Las curvas esfuerzo-deformación pueden ser divididas en dos partes: pequeñas y grandes deformaciones (Chen y col., 2001). Hasta aproximadamente un 5% de deformación, la viscoelasticidad del sistema suele permanecer lineal. El módulo E (de deformabilidad o de Young) fue calculado como la pendiente de la curva de esfuerzo-deformación en la zona de viscoelasticidad lineal de cada muestra. El esfuerzo y la deformación de ruptura fueron obtenidas en la zona de grandes deformaciones cuando tiene lugar la fractura del gel que se evidencia como el punto máximo de la curva esfuerzo-deformación.

5.2.5- Determinación de sinéresis

Se midió a todas la muestras del diseño experimental la producción de exudado a 24 h de almacenamiento a 4°C. Se utilizó el método de succión capilar por contacto de la muestra con un medio poroso adecuado (Ferrero, 1992) que fue descrito en el Capítulo 2. Las muestras se dejaron en contacto durante 60 min,

tiempo en el cual, el agua perdida por el postre fue absorbida por el papel de filtro. Se midió el avance del anillo de humedad, tomado como índice de sinéresis. Los resultados se expresaron mm que corresponden a la distancia recorrida por el líquido desde el borde de la muestra cilíndrica.

5.2.4- Diseño experimental

Se utilizó un diseño compuesto de punto central con tres factores y dos niveles. Los factores fueron: concentración de fibra, concentración de almidón y concentración de carragenina. Para este arreglo ortogonal se uso un bloque y 17 condiciones (15 combinaciones y 2 repeticiones del punto central, Tabla II.17). Este diseño se realizó para cada una de las cinco fibras. La tabla II.18 muestra los rangos de concentraciones para fibra, almidón y carragenina que fueron usados para evaluar sus efectos en las propiedades mecánicas y sinéresis de los geles.

Tabla II.17- Combinaciones de los componentes para todas las condiciones del diseño

Condiciones	Almidón	Carragenina	Fibras
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15-16-17	0	0	0

Tabla II.18- Rangos de concentraciones de almidón (% p/v), carragenina (% p/v) y fibra (% p/v) usados en los geles

Nivel	Almidón	Carragenina	Fibra
-1,68 ^a	1,32	0,132	0,628
-1	2	0,2	0,9
0	3	3	1,3
+1	4	0,4	1,7
+1,68	4,68	0,468	1,972

^a ± 1,68=(2³)^{1/4} punto axial: donde 3 es el número de variables

Las respuestas medidas fueron las propiedades mecánicas (σ_f , ϵ_f , y E) obtenidas a partir de las curvas de esfuerzo-deformación y la sinéresis. Las superficies de respuesta fueron desarrolladas usando un modelo cuadrático para variables estadísticamente significativas. El análisis de varianza fue usado para detectar efectos significativos a $p < 0,1$. El software Statistica (Statsoft, v. 5.0) fue utilizado para analizar los resultados.

5.3- Resultados y Discusión

5.3.1- Modelos matemáticos

Las tablas II.19 a II.22 muestran los coeficientes de regresión de los modelos matemáticos usados para predecir las propiedades mecánicas y sinéresis. Los coeficientes de correlación obtenidos indican que los modelos fueron confiables para el esfuerzo de fractura y para el módulo elástico. Se graficaron las superficies de respuesta (Figuras II.30 y II.31) para observar los efectos de los factores y la magnitud de las propiedades mecánicas para todos los sistemas ensayados.

Tabla II. 19- Coeficientes de regresión para el modelo matemático que representa el Esfuerzo de Fractura en los postres con fibras con valor energético reducido

Fibra	Media	Coeficientes de Regresión									R ²
		Lineal			Interacciones			Cuadráticos			
		Al	Car	Fib	Al-Car	Al-Fib	Car-Fib	Al	Car	Fib	
Bambú	2117,80 ^a	61,52	200,09	811,91	-66,90	45,3	65,80	12,99	131,57	111,70	0,97
Inulina	2312,18	-45,63	27,12	766,01	13,19	-17,18	-55,57	-80,58	30,60	-43,93	0,94
Manzana	2339,70	-45,59	24,72	774,37	-144,64	-43,56	-278,61	30,92	217,68	-157,38	0,90
Psyllium	2670,20	225,93	370,17	933,89	76,84	-50,57	-10,07	-13,86	179,90	-48,76	0,94
Trigo	2227,88	2,01	142,95	890,89	-52,85	83,24	56,90	33,87	49,61	91,16	0,96

^a las celdas sombreadas indican coeficientes significativos

En todos los modelos obtenidos para las propiedades estudiadas se observó un fuerte efecto lineal del factor fibra. El esfuerzo de fractura tuvo

influencia no lineal de la carragenina en los postres con fibra de manzana, psyllium o bambú (Tabla II.19). En cambio, en los postres con inulina o trigo no hubo influencia no lineal de los factores, como se puede ver en los gráficos II.30a y b.

El modulo elástico y la deformación de fractura solo fueron afectados no linealmente por los factores carragenina y fibra respectivamente en los postres con manzana (Tablas II.20; II.21 y Figuras II.30b y II.31b). La producción de exudado en los postres con fibras de bambú, inulina o manzana, fue influenciada no linealmente por los factores estudiados (Tabla II.22).

Tabla II.20- Coeficientes de regresión para el modelo matemático que representa el Módulo Elástico en los postres con fibras con valor energético reducido

Fibra	Media	Coeficientes de Regresión									R ²
		Lineal			Interacciones			Cuadráticos			
		Al	Car	Fib	Al-Car	Al-Fib	Car-Fib	Al	Car	Fib	
Bambú	7755,99	282,29	301,75	1934,11	-28,41	153,93	318,08	-199,06	204,33	-161,36	0,94
Inulina	7269,66	-140,72	21,31	1730,88	-293,25	259,25	316,39	-61,64	112,75	-296,57	0,81
Manzana	8324,23	757,77	325,78	2523,25	70,19	121,23	-300,74	131,40	341,82	-150,35	0,96
Psyllium	7156,79	-232,13	182,22	2141,14	-482,03	-261,99	-342,16	-309,88	237,78	-364,38	0,71
Trigo	7584,07	15,86	7,28	2263,91	-610,89	32,21	159,23	79,94	-23,68	153,27	0,90

^a las celdas sombreadas indican coeficientes significativos

Tabla II.21- Coeficientes de regresión para el modelo matemático que representa la Deformación de Fractura en los postres con fibras con valor energético reducido

Fibra	Media	Coeficientes de Regresión									R ²
		Lineal			Interacciones			Cuadráticos			
		Al	Car	Fib	Al-Car	Al-Fib	Car-Fib	Al	Car	Fib	
Bambú	27,4	0,8	2,4	2,6	-0,6	-0,3	-0,4	0,2	0,8	0,5	0,92
Inulina	27,5	0,5	2,6	2,0	0,3	-1,2	-1,9	-0,7	1,0	0,3	0,86
Manzana	27,7	-2,0	0,5	2,1	1,16	-0,2	-1,5	0,1	0,5	-1,9	0,83
Psyllium	35,8	2,9	1,7	1,5	-1,0	-0,9	-1,3	0,1	0,8	-1,0	0,89
Trigo	29,7	0,5	2,0	2,5	-0,4	0,2	-0,3	-0,7	0,8	-0,1	0,95

^a las celdas sombreadas indican coeficientes significativos

Tabla II.22- Coeficientes de regresión para el modelo matemático que representa la producción de exudado en los postres con fibras con valor energético reducido

Fibra	Media	Coeficientes de Regresión									R²
		Lineal			Interacciones			Cuadráticos			
		Al	Car	Fib	Al-Car	Al-Fib	Car-Fib	Al	Car	Fib	
Bambú	17,5	0,02	-3,6	-1,2	0,8	-0,4	1,6	0,0	1,1	0,3	0,94
Inulina	17,6	-2,1	-4,0	-1,4	0,8	0,6	2,7	2,0	0,3	1,1	0,88
Manzana	27,7	-1,9	0,5	2,1	1,2	-0,2	-1,5	0,1	0,5	-1,9	0,83
Psyllium	35,8	2,9	1,7	1,5	-0,9	-0,9	-1,3	0,1	0,8	-1,0	0,89
Trigo	19,1	0,2	-3,7	-1,6	-0,8	-0,9	2,2	-0,2	0,1	0,8	0,97

^a las celdas sombreadas indican coeficientes significativos

Fig. II.30- Superficies de respuesta del esfuerzo de fractura en función de las concentraciones de almidón y carragenina en postres con inulina (a), manzana (b), Psyllium (c) y trigo (d). Las escalas de almidón y carragenina corresponden a los puntos del diseño.

Fig. II.31- Superficies de respuesta del módulo de deformabilidad E en función de las concentraciones de almidón y carragenina en postres con inulina (a), manzana (b), Psyllium (c) y trigo (d). Las escalas de almidón y carragenina corresponden a los puntos del diseño.

5.3.2- Efecto del tipo de fibra y los contenidos de almidón y carragenina en las propiedades mecánicas y sinéresis.

Si en el diseño experimental se dejan solo los puntos axiales se puede analizar solo el efecto lineal de los factores que es muy importante en este ensayo. La figura II.32 muestra las medias y los efectos lineales solos ($p < 0,1$) de cada componente para el esfuerzo y deformación de fractura, módulo elástico y sinéresis. El efecto lineal positivo de todas las fibras fue muy marcado, sobre todo para el esfuerzo de fractura y módulo de deformabilidad. Sin embargo, la producción de exudado no se vio tan afectada por el factor fibra.

Fig. II.32- Medias y efectos lineales significativos ($p < 0,1$) de (a) esfuerzo de fractura, (b) módulo E.

Analizando estos resultados para el esfuerzo de fractura que se muestran en la figura II.32a se ve que los postres con fibras de bambú o trigo se comportaron de manera semejante debido a que no hubo diferencias significativas en sus medias y fueron afectados por la carragenina en la misma proporción. Esto puede deberse a que el 90 % de ambas es fibra insoluble y tienen el mismo contenido de hemicelulosa (Tabla II.12). Los postres con inulina o fibra de manzana se comportaron de igual manera en el sentido que no fueron afectados por la carragenina ni por el almidón. Esto podría basarse en que ambas contienen de fibra soluble; inulina en un 90% y 25% para manzana. Sin embargo, hubo diferencias significativas en sus valores medios. Esto estaría indicando que la lignina cuyo mayor contenido se encuentra en la fibra de manzana y es una molécula muy ramificada aportaría mayor fuerza a la red del gel que la inulina.

Los postres con Psyllium se comportaron de forma completamente distinta ya que tuvieron la media más elevada de todas como también se puede observar en la superficie de respuesta (Figura II.30c), e influyeron en forma notable los contenidos de almidón, carragenina y fibra. A la concentración utilizada en este trabajo, el Psyllium produce una dispersión viscosa cuando se encuentra solo. Por lo tanto, por efecto del volumen excluido, estaría gelificado en el postre. Además, posee el mayor contenido de hemicelulosa de todas las fibras estudiadas.

En síntesis, se podría decir, que los componentes que aportan fuerza a la red del gel serían en orden creciente: hemicelulosa, lignina, celulosa y la inulina. Los dos primeros son polímeros con cadenas laterales ramificadas disponibles

para realizar uniones de todo tipo con las sustancias que las rodean y reforzar la red. En cambio celulosa e inulina no están ramificadas. Además, la hemicelulosa estaría causando la interacción con la carragenina ya que para los postres con bambú, trigo y Psyllium, el contenido de ésta fue significativo.

La viscoelasticidad de todos los postres estudiados, permaneció lineal hasta un 5% de deformación. La firmeza de los mismos, caracterizada por el módulo E de deformabilidad, no fue influenciada por el contenido de carragenina. Los postres con trigo o bambú se comportaron en forma semejante y no fueron afectados por el almidón (Figura II.32b). La influencia del almidón en los postres con fibra manzana pareció haber producido un gel más firme, lo que indicaría que la lignina podría estar interaccionando con el almidón. Los postres con inulina o Psyllium fueron afectados en la misma proporción por el contenido de fibra, provocando geles más frágiles, como también se pudo observar en la superficie de respuesta (Figura. II.30c). Esto estaría relacionado con el contenido de fibra soluble que es del 32 y 90% aproximadamente para Psyllium e inulina respectivamente. Si bien estos contenidos son muy diferentes, la gran proporción de hemicelulosa en el Psyllium que tiene una gran solubilidad, equipara a la inulina (Tabla II.11 y II.12).

Al analizar la figura II.33a se confirma que los postres con fibra de manzana al ser más firmes se deformaron menos y que el aumento del contenido de almidón contribuye a estas características. El contenido de carragenina influyó en la deformación de fractura a excepción de los postres con fibra de manzana.

Fig. II.33- Medias y efectos lineales significativos ($p < 0,1$) de (a) deformación de fractura, (b) sinéresis.

También se confirma que por el contrario, los postres con Psyllium al ser más frágiles se deformaron más al aplicar el mismo esfuerzo y que a mayor contenido de almidón mayor fue la deformación.

La carragenina fue el factor que más afectó la producción de exudado en todos los postres estudiados. La figura II.33b muestra que un aumento de su contenido disminuyó el exudado producido por la retrogradación del almidón. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Iop y col. en 1999 para postres con distintas combinaciones de endulzantes.

Si bien, el efecto lineal de la fibra solo fue significativo para trigo y manzana, en el modelo completo cuadrático (Tabla II.22), todas las fibras influyeron a excepción de la inulina que es un oligosacárido. Se podría entonces decir, que en general, los polisacáridos influyen en mayor medida disminuyendo la producción de exudado. En particular, la carragenina tendría el mayor efecto seguida en orden decreciente por hemicelulosa, lignina y celulosa. Esto se basa en que los postres con Psyllium presentaron el menor valor medio de exudado seguidos en orden creciente por los postres con manzana y por último los postres con bambú, trigo o inulina. Estos dos últimos no tuvieron diferencias significativas entre ellos en sus valores medios (Figura II.33b).

5.3.3- Comparación con las formulaciones sin fibra.

La figura II.34 muestra el efecto del agregado de fibra comparando los postres con y sin fibra. En el Cap. 3 se vio que el reemplazo de sacarosa por sucralosa y la ausencia de materia grasa provocaban una disminución en la fuerza y firmeza de la red del gel, efecto que también puede apreciarse en la figura II.34.

Todas las fibras adicionadas causan un aumento en la fuerza y firmeza de los geles de menor valor energético, como se puede apreciar en la figura II.34. Se puede decir entonces que, las fibras son apropiadas para darle a los geles de valor energético reducido una textura semejante a las de aquellos que poseen sacarosa y materia grasa. Además, los geles con Psyllium o manzana se pueden utilizar para obtener postres de menor valor energético con mayor fuerza de la red

o mayor firmeza respectivamente, ya que presentaron diferencias significativas con los postres sin fibra regulares.

Fig. II.34- Medias $\pm$ error estándar para esfuerzo de fractura (σ_f) y módulo de deformabilidad (E) de postres sin fibra regular, postres sin fibra de valor energético reducido y postres con fibras de valor energético reducido para el punto cero del diseño.

5.4- Conclusiones

Los modelos cuadráticos utilizados para describir las propiedades mecánicas de los postres con menor valor energético fueron confiables para estudiar la fuerza y firmeza de la red de los geles.

Se observó una fuerte influencia del factor fibra para todas las propiedades y todos los sistemas ensayados. Las diferencias entre los postres con las distintas fibras se pudieron explicar en relación a sus diferentes composiciones químicas. Se observó un fuerte efecto lineal de la carragenina en la sinéresis de los geles. A mayor contenido de ésta, se produjo menos exudado. Los postres con fibra de manzana o Psyllium se vieron influenciados por el contenido de almidón.

Las fibras estudiadas fueron apropiadas para semejar las propiedades mecánicas que la sacarosa y materia grasa imparten a los postres regulares.

Capítulo 6- Estudio de la vida útil microbiológica de los postres regulares con fibras

6.1- Introducción

La vida útil de un alimento es un período de tiempo que finaliza cuando el producto comienza a ser inaceptable desde el punto de vista sensorial, nutritivo o sanitario. El criterio correspondiente al final de la vida útil está determinado por requerimientos legales, por atributos de aceptabilidad del consumidor (color, sabor, aroma, etc.), por requerimientos de distribución en el mercado y por costos. Una definición universal de vida útil es virtualmente imposible de establecer debido a los complejos mecanismos de deterioro de un alimento y a la imposibilidad de generalizar el grado de aceptación de distintos consumidores, en consecuencia se define una vida útil para cada tipo de producto (Fu y Labuza, 1993).

Hay productos de vida útil larga y corta. Para los primeros el período de aptitud es superior a las tres semanas. Para los segundos el lapso de tiempo es de tres semanas o menos. Entre los productos de vida útil corta se encuentran: leche y crema pasteurizada, queso cottage, yogurt y postres lácteos. Los cambios que ocurren en estos productos frescos luego de su manufactura están asociados con la separación física de fases (sinéresis, cremado, etc.) y con el crecimiento de los microorganismos. Otros procesos como los cambios químicos, la acción de las enzimas nativas de la leche y los patógenos, no tienen un efecto significativo en su vida útil. La separación física de fases puede ser controlada en el caso de sinéresis por la adición como ya se vio, de aditivos que captan el agua perdida; y en el caso del cremado reduciendo el tamaño del glóbulo de grasa por homogeneización. Por consiguiente, el principal limitación en la vida útil de los productos lácteos frescos es el deterioro por bacterias, mohos y levaduras que crecen a la temperatura de refrigeración que usualmente es $\leq 8^{\circ}\text{C}$ (Muir y Banks, 2000).

Según Eddy (1960) los microorganismos psicrótrofos son aquellos capaces de crecer a 5°C o menos. Esta definición tiene mucha aceptación y uso entre los microbiólogos de alimentos. Sin embargo, los biólogos prefieren utilizar el término

psicrófilos que involucra los microorganismos cuyas temperaturas de crecimiento mínima, óptima y máxima son -15, 15 y 20°C respectivamente (Morita, 1974). También, hay que tener presente que existen microorganismos de deterioro que son mesófilos pero tienen la capacidad de crecer a bajas temperaturas y se los agrupa como psicrotolerantes (Gow y Mills, 1984; Helmke y Weyland, 2004).

Si bien, el consumidor reconstituye el polvo con leche y este se cocina a 86°C por 20 min.; el postre listo para consumir que se almacena refrigerado, posee una gran cantidad de glucosa o lactosa disponible como fuente de energía, actividad acuosa alta y pH neutro. Por lo tanto, el deterioro podría ser rápido.

Por consiguiente, la determinación de la calidad microbiológica de los postres lácteos típicamente involucra conteos en placa. Estos incluyen recuento de aerobios mesófilos totales, recuento de coliformes, recuento de mohos y levaduras y recuento de microorganismos psicrótrofos (Duncan y col., 2004).

Si bien, en el Código Alimentario Argentino se define a los postres lácteos deshidratados en el artículo 818 del Capítulo X de Alimentos Azucarados, no especifica los parámetros microbiológicos de calidad. Por lo tanto, el criterio a adoptar para determinar la vida útil fue el establecido en el artículo 818bis para polvos o mezclas para preparar postres para helar. Teniendo en cuenta esta norma, se establecieron los siguientes límites por encima de los cuales el postre dejaba de ser apto para consumir:

- 1- Recuento de bacterias mesófilas, PCA a 30°C por 72 h: mayor de $5 \cdot 10^4$ /g
- 2- Bacterias coliformes totales: más de 10/g
- 3- Bacterias coliformes fecales: más de 1/g
- 4- Hongos y levaduras: más de 50/g
- 5- Bacterias psicrótrofas: más de 10^3 /g

El objetivo de este capítulo fue por lo tanto, determinar la vida útil microbiológica teniendo en cuenta el criterio expuesto en el párrafo anterior.

6.2- Materiales y Métodos

6.2.1- Materiales

Se utilizaron para este estudio los postres regulares con y sin fibras debido a que la presencia de sacarosa puede acelerar el deterioro. Se empleó la fórmula AC2 con: 25 g/Kg de almidón de maíz, 2.5 g/Kg de carragenina, 109g/Kg de leche entera en polvo y de sacarosa. Las fibras dietarias utilizadas en una proporción de 11g/Kg fueron: bambú (Qualicel, CFF, Alemania), inulina (Frutafit-inulin, Imperial Sensus, Holanda), manzana (Vitacel, JRS, Alemania), Psyllium plantago (Metamucil, Procter & Gamble Co., USA), trigo (Wheatcel, CFF, Alemania).

Los postres fueron preparados de la misma manera que en el capítulo 4 y fueron colocados en caliente y en forma estéril, en recipientes estériles de 100 ml. de capacidad. Fueron refrigerados en cámara a 4°C durante 12 días.

6.2.2- Caracterización microbiológica de las fibras

Antes de comenzar a desarrollar el estudio microbiológico del producto, se verificaron las especificaciones microbiológicas de los proveedores de las fibras añadidas a la formulación. Se tomaron 10 g de cada fibra y se homogeneizaron por un minuto en agua peptonada al 0.1 % estéril y se estudió sin dilución previa, la presencia de mesófilos aerobios, mohos, levaduras y enterobacterias por el método de recuento en placa.

6.2.3- Determinación de vida útil

Para predecir la vida útil se siguió el crecimiento de los microorganismos de interés en los postres refrigerados a 4°C. Las muestras se tomaron a 1, 3, 7, 9, 11, 12 días de almacenamiento de recipientes preparados para cada día. En todos los casos se recolectaron 20 g de muestra de cada recipiente de 100 g de postre, en forma aséptica y se homogeneizaron por un minuto con 80 ml de Agua Peptonada al 0.1 % estéril. Se realizaron diluciones seriadas de las diferentes muestras en

Agua Peptonada 0.1 % y 1 ml de cada dilución fue sembrada por duplicado en las placas apropiadas. Para todos los recuentos se comenzó el ensayo con diluciones 1:100 para el primer día de almacenamiento, debido a que los postres son cocinados a 86°C por 20 min. y este tratamiento disminuye la carga inicial de microorganismos. Las diluciones fueron aumentando o no según transcurrían los días y teniendo en cuenta los microorganismos investigados y su límite permitido.

El agua peptonada contiene: Peptona de carne: 10 g/L, NaCl: 5 g/L, pH final: $7,2 \pm 0,2$ unidades. Es un medio enriquecido no selectivo recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar bacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a los que ha sido sometido el alimento.

Para estudiar mesófilos aerobios y psicrótrofos se utilizó el mismo medio de cultivo, el Agar para Recuento en Placa y se variaron las condiciones de incubación. Para los primeros las placas se incuban a 30°C por 72 h. Para los segundos las placas se incubaron a 4°C como mínimo 5 días. Para ambos grupos de microorganismos, las diluciones fueron aumentando hasta llegar a un máximo de 1:100000 para el día 13.

El Agar para recuento en placa contiene: Extracto de Levadura 2,5 g/L, Triptona: 5 g/L, D-(+)-Glucosa: 1 g/L, Agar 15 g/L, pH final: $7,0 \pm 0,2$ unidades. Este medio está recomendado para el recuento de bacterias aerobias en aguas, aguas residuales, productos lácteos y otros alimentos, así como medio general para determinar poblaciones microbianas. El alto contenido nutricional de sus componentes permite el desarrollo de la mayoría de las bacterias presentes en la muestra.

Para estudiar las bacterias coliformes totales se realizó recuento en placa de enterobacterias. Para esto se utilizó como medio cultivo el Agar Glucosa Bilis Rojo Violeta (Merck). Las placas fueron crecidas a 37°C por 24-48 h. Las diluciones fueron de 1:100 hasta el último día de almacenamiento.

El Agar Glucosa Bilis Rojo Violeta contiene: Peptona de carne: 7 g/L, Extracto de levadura: 3 g/L, NaCl: 5 g/L, D-(+)-glucosa: 10 g/L, Sales Biliares: 1,5 g/L, Rojo Neutro: 0,03 g/L, Cristal violeta: 0,002 g/L, Agar: 15 g/L, pH final: $7,4 \pm 0,2$ unidades. Se esteriliza a vapor fluente (Baño María) media hora. La peptona y el extracto de carne aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento

bacteriano, las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de la flora Gram positiva acompañante. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y el rojo neutro el indicador de pH. Todas las enterobacterias fermentan la glucosa, acidifican el medio y producen un viraje del indicador de pH al color rojo intenso. Debido a esto se observan como colonias rojo púrpura, de 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas generalmente, de una zona rojiza de bilis precipitada.

A las colonias rojas con borde fucsia desarrolladas en las placas con Agar Glucosa Bilis Rojo Violeta se les realizaron repiques en Caldo Brila con campanilla de Durham en el interior del tubo y se incubaron por 48 h a 37 °C respectivamente, para investigar si se trata de coliformes fecales. Se consideran positivos los tubos que presentan crecimiento y formación de gas (Andrés, 2001).

El Caldo Brila (Caldo Verde Brillante-Bilis-Lactosa) contiene: Peptona de carne: 10,0 g/L, Lactosa: 10,0 g/L, Bilis de buey deshidratada: 20,0 g/L, Verde Brillante: 0,0133 g/L, pH final: 7,2 ± 0,1 unidades. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Es un medio líquido donde la peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano. La bilis y el verde brillante son los agentes selectivos que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas a excepción de las coliformes. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable. Es una propiedad del grupo coliforme de fermentar la lactosa con producción de gas.

Los tubos positivos se repican en Caldo E.C. con campanilla de Durham y se incuban por 24 h a 44,5 °C para descartar o confirmar la presencia de *E coli*. Se consideran positivos los tubos que presentan crecimiento y formación de gas.

El Caldo E.C. contiene: Triptona: 20 g/L, Lactosa: 5 g/L, Sales biliares: 1,3 g/L, Fosfato Dipotásico: 4g/L, Fosfato monopotásico: 1,5 g/L, Cloruro Sódico: 5g/L, pH final: 6,9 ± 0,2 unidades. Se distribuye en tubos, se colocan sendas campanillas de Durham y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El contenido de lactosa de este medio, favorece el crecimiento de bacterias lactosa positivas, mientras que las sales biliares inhiben el crecimiento de gran parte de la flora acompañante.

En caso de obtener resultados positivos se debe proseguir con la investigación de *Escherichia coli*. Para ello se repican con ansa por agotamiento

en superficie, en placas de Petri con Agar EMB como medio de cultivo selectivo para *Escherichia coli*. Se incuban durante 24–48 h a 37 °C.

El Agar EMB contiene: Peptona: 10 g/L, Hidrógeno fosfato dipotásico: 2 g/L, Lactosa: 10 g/L, Eosina amarillenta: 0,4 g/L, Azul de metileno: 0,065 g/L, Agar: 13,5 g/L, pH final: 7 6,9 ± 0,1 unidades. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno. Estos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *E. coli* y *Citrobacter spp.* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con una periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

Se observa la aparición de colonias típicas de *E. coli*: verdes con brillo metálico. Luego sobre dichas colonias se realizan las siguientes pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato (IMViC), (AOAC, 1984):

A- Prueba del Indol:

Se inoculan tubos con caldo triptona o agua peptonada, a partir de cultivos puros y se incuban a 37 °C por 24-48 h. Se añade a cada tubo 0.2-0.3 ml de Reactivo de Kovacs o Erlich y luego de unos minutos se realiza la lectura.

Indol positivo (+): anillo rosado en la superficie

Indol negativo (-): no hay cambio de color

Reactivo de Kovacs: p- dimetilaminobenzaldehído: 5 g/L, alcohol amílico: 75 ml, HCl (conc.): 25 ml. El reactivo debe ser color amarillo.

B- Prueba del Rojo de Metilo:

Se inoculan tubos de caldo glucosa tamponada a partir de cultivos puros y se incuban a 35-37 °C por 24-48 h. Se añaden 5 gotas de la solución acuosa de Rojo de metilo al 0.04 % y se agita.

Rojo de Metilo (+): coloración roja, indica fermentación de la glucosa con acidificación del medio.

Rojo de Metilo (-): coloración amarilla

C- Prueba de Voges- Proskauer:

Se inoculan tubos con caldo glucosado tamponado a partir de cultivos puros y se incuban a 35- 37 °C por 24- 48 h. Se añaden 0,6 ml de solución de α - naftol al 6 % en etanol 60° y 0,2 ml de KOH, se agita y se deja reposar no menos de 10 min. Luego se observa.

Voges- Proskauer (+): disco rosado en superficie.

Voges- Proskauer (-): no se observa disco rosado en superficie

D- Prueba del Citrato:

Se inocula un tubo con Agar Citrato de Simmons usando un ansa recta. Se incuba a 35-37°C por 24-48 h

Citrato (+): viraje del medio al azul

Citrato (-): medio verde (color original)

El Agar Citrato de Simmons contiene: sulfato de magnesio: 0,2 g/L, fosfato monoamónico: 1 g/L, fosfato bipotásico: 1 g/L, Citrato sódico: 2 g/L, Cloruro sódico: 5 g/L, Azul de bromotimol: 0,08g/L, Agar: 15g/L, pH final: 6,9 $\pm$ 0,1 unidades. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para estudiar mohos y levaduras se utilizó Agar YGC (Levadura, Glucosa, Cloranfenicol) como medio de cultivo, en profundidad por la técnica de agar volcado. Las placas fueron incubadas a 20°C por 5 días (Giannuzzi, L., 1998). Las diluciones fueron de 1:100 hasta el último día de almacenamiento.

El Agar YGC (Merck) contiene: Extracto de levadura: 5g/L, Glucosa: 20 g/L, Cloranfenicol: 0,1 g/L, Agar: 14,9 g/L, pH final: 6,6 $\pm$ 0,2 unidades. Se autoclava a 121°C durante 15 minutos. Es un medio selectivo ya que se utiliza cloranfenicol para suprimir el crecimiento bacteriano.

Los recuentos fueron expresados como log UFC/g (UFC: Unidades Formadoras de Colonias). El análisis estadístico de los recuentos obtenidos se llevó a cabo con un software estadístico (Systat Inc., Evenston, IL, USA, 5.0

copyright 1992). Se utilizó el test de ANAVA para un factor, para encontrar diferencias significativas y el test de Tukey para comparación de medias.

6.3- Resultados y discusión

El estudio microbiológico previo de las fibras dio como resultado que las mismas se encontraban dentro de las especificaciones indicadas por los proveedores, que se muestran en la tabla II.12. Como consecuencia cuando las fibras fueran incorporadas en la formulación no tendrían porque alterarla microbiológicamente.

No se detectaron coliformes totales en todo el período de almacenamiento, como era de esperar, debido al tratamiento térmico que se realiza en la preparación de los postres. La figura II.35 muestra el crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C. Mediante análisis estadístico de los recuentos se pudo inferir que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los postres con y sin fibras.

Fig. II.35 – Desarrollo de mesófilos aerobios en postres sin fibras (♦) y con fibras de bambú (■), inulina (▲), manzana (▲), Psyllium (●) y trigo (■) durante refrigeración.

En cambio, hubo diferencias significativas en los postres con inulina y manzana con respecto a los demás para los recuentos de microorganismos

psicrótrofos, mohos y levaduras, como se puede observar el la figura II.36a y b. Estas diferencias podrían estar dadas porque dichas fibras declaraban la presencia de microorganismos en sus especificaciones, que el tratamiento térmico de cocción no alcanzó a erradicar. Por otro lado, estas fibras podrían estar favoreciendo el desarrollo de microorganismos.

Fig. II.36- Desarrollo de microorganismos psicrótrofos (a) y mohos y levaduras (b) en postres sin fibras (◆) y con fibras de bambú (■), inulina (▲), manzana (▲), Psyllium (●) y trigo (■) durante el almacenamiento refrigerado a 4°C.

Los tiempos de vida útil para los postres con y sin fibras almacenados a 4°C para los distintos microorganismos se muestran en la tabla II.23. Se tomó como vida útil el límite de 9 ± 1 días, según el criterio establecido al comienzo del capítulo y tomando en cuenta los mohos y levaduras, cuyos recuentos superaron el valor máximo aceptado antes que los demás. Los límites de confianza de la vida útil fueron calculados considerando el error experimental promedio en los recuentos microbianos, que fue de ± 0,4 log UFC/g.

Tabla II.23- Tiempos de vida útil en días para los postres con y sin fibras almacenados a 4°C para los distintos microorganismos

	Sin Fibra	Bambú	Inulina	Manzana	Psyllium	Trigo
Mesofilos	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1
Psicrótrofos	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	11 ± 1
Mohos y Levaduras	9 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	9 ± 1

6.4- Conclusiones

Si bien hubo diferencias significativas en los recuentos de psicrótrofos y mohos y levaduras entre los postres con y sin fibra, no se trasladaron a los tiempos de vida útil. Se estimó en 9 ± 1 días el tiempo de vida útil, por lo que puede decirse, que la fibra no altera microbiológicamente al producto.

Capítulo 7- Conclusiones

Por los resultados obtenidos en los ensayos instrumentales de textura a bajas y altas deformaciones se pudo inferir que tanto los postres base regulares como los de menor valor energético eran geles débiles mixtos. La estructura tridimensional estaba dada por la red que forman los polímeros κ y ι - carragenina que está rellena principalmente por almidón y por las proteínas y materia grasa de la leche.

Los postres base de menor valor energético mostraron menores fuerzas de fractura y firmeza que los postres base regulares. Este efecto se atribuyó al cambio de sacarosa por sucralosa y a la ausencia de sacarosa. La sacarosa forma uniones puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que la rodean lo que favorece la interacción entre las moléculas de carragenina y lleva a un aumento en el número y estabilidad de las zonas de unión del polisacárido que está relacionada directamente con la fuerza del gel. La sucralosa forma menos uniones puente de hidrógeno con las moléculas de agua y por tanto, desestabiliza las zonas de unión de la carragenina y lleva a una menor fuerza del gel.

La adición de las fibras a los postres de menor valor energético proporcionó un excelente efecto de relleno ya que alcanzaron los valores de esfuerzos de fractura y firmeza de los postres sin fibra regulares. En el caso de los postres con Psyllium o manzana los valores de esfuerzos de fractura y firmeza fueron superados respectivamente.

En cambio, en los postres regulares, si bien este efecto de relleno existía, fue detectado mejor por los ensayos a bajas deformaciones que en los de altas deformaciones. Esto pudo deberse a que por un lado los ensayos dinámicos proveen información fundamental acerca de la estructura, mientras que, el ensayo de penetración es más empírico. Por otro lado, en presencia de la sacarosa, que como ya se explicó, ayuda a reforzar el gel, el efecto de las fibras no fue tan marcado.

Los postres con quitosano fueron descartados debido a las variaciones en las propiedades de fractura y los bajos puntajes obtenidos en el ensayo sensorial.

El Psyllium que posee el mayor contenido de hemicelulosa de las fibras utilizadas y como consecuencia forma gel a bajas concentraciones, causó modificaciones en ambos tipos de formulaciones (regular y reducido en calorías). Provocó aumento de la fuerza y deformación de fractura, pero disminución en el módulo E y en el exudado de los postres reducidos en calorías. El efecto del Psyllium fue más marcado en la fórmula de postre regular con menor contenido de almidón y carragenina.

La fibra de manzana que tiene el mayor contenido de lignina de las fibras utilizadas, también provocó modificaciones en ambos tipos de formulaciones (regular y reducido en calorías). Aumentó la firmeza de la red del gel, G' , G'' y la η^* , estos tres últimos en los postres regulares. Solo aumentó la fuerza de fractura en los postres regulares con menor contenido de almidón y carragenina. Tuvo muy buen comportamiento en relación a la sinéresis del almidón ya que disminuyó significativamente la producción de exudado en ambas formulaciones regular y de valor energético reducido. Esto último pudo estar debido a que en su estructura química muy ramificada posee numerosos sitios en los cuales establecer puentes de hidrógeno con el agua. La fibra de manzana provocó un cambio de color, pero con una adecuada adición de colorantes y saborizantes podría tener buena aceptación.

La fibra de trigo que posee el mayor contenido de celulosa de las fibras analizadas, si bien causó modificaciones, estas no fueron tan marcadas como las provocadas por Psyllium o manzana. Tuvo los menores valores de G'' y η^* con respecto a las demás fibras, a los siete días de almacenamiento.

No hubo diferencias significativas en la vida útil de los postres con y sin fibras.

Los postres con las fórmulas de mayor contenido de almidón y carragenina y las fibras de bambú o inulina fueron las que menos alteraron tanto el comportamiento sensorial como la textura instrumental a grandes deformaciones y obtuvieron muy buenos puntajes de aceptabilidad. Además, la inulina disminuyó el porcentaje de exudado en esta formulación.

Parte III Yogures con fibras

Capítulo 1- Introducción

Aún hoy, no hay datos definitivos acerca del origen del yogur, sin embargo se cree que fue en el oriente medio, como forma de conservar la producción de leche estacional de los pueblos nómades. Por cerca de 4000 años en varias partes del mundo el hombre ha producido y consumido yogur. Sin profundizar en los orígenes históricos del yogur, se desea poner aquí en evidencia cuales son los parámetros que han determinado que en nuestros tiempos se consuma y se lo aprecie como alimento.

El yogur es una fuente de proteínas de alta calidad biológica, calcio, fósforo, magnesio, niacina y vitamina B12. Desde que los productores agregan leche en polvo descremada a sus formulaciones, este alimento contiene más calcio y proteínas que la leche (Decker, 2001), sin embargo, la característica nutricional principal del yogur se relaciona con la presencia de las bacterias lácticas específicas, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Estas bacterias lácticas desarrollan una función tecnológica en cuanto transforman, a través de la acidificación, la leche en yogur, y una función nutricional influyendo en modo favorable sobre el organismo (Bianchi Salvadori y col., 1994).

Lactobacillus bulgaricus es una bacteria láctica homofermentativa que se desarrolla bien en leche, entre 45 y 50 °C. Utiliza para su crecimiento riboflavina, aminoácidos y vitamina B12 y obtiene energía de la metabolización de la lactosa, acidificando fuertemente el medio. Puede formar hasta un 2,7 % de ácido láctico en la leche.

Streptococcus thermophilus se multiplica bien entre 37 y 40 °C, pero también se desarrolla a 50 °C. Es una especie homofermentativa termorresistente que sobrevive a un calentamiento a 65 °C durante 30 minutos. Es mucho menos acidificante que la especie precedente. Durante su crecimiento en leche, metaboliza la lactosa a ácido fórmico (algunas cepas producen ácido carbónico a partir de urea), ácido fólico, acetaldehído, acetoína, y diacetilo, mientras utiliza aminoácidos, vitaminas del grupo B, adenina, guanina, uracilo y xantina.

Ambos gérmes son Gram positivos, microaerófilos y soportan muy bien los medios ácidos (pH de 4 a 4,5). Las dos bacterias lácticas se encuentran en la naturaleza en asociación protosimbiótica (en la relación 40:60) y son empleadas bajo esta condición para la preparación del yogur. Cuando se cultivan conjuntamente, producen más ácido láctico que cuando crecen en forma aislada. El crecimiento del estreptococo, más rápido que el del lactobacilo, determina la liberación de anhídrido carbónico y formación de ácido fórmico, necesario para la formación de purina que estimula el crecimiento de los lactobacilos, los cuales a su vez liberan aminoácidos del sustrato, que son útiles para el desarrollo sucesivo de los estreptococos (Bianchi Salvadori y col., 1994).

De la recíproca estimulación en el crecimiento, se obtiene una fermentación más veloz de la lactosa hacia la formación de ácido láctico, que modifica la concentración hidrogeniónica y desestabiliza las micelas de caseína, las cuales precipitan en forma completa a pH 4.6, formando el característico gel láctico del yogur.

El proceso de preparación industrial prevé el tratamiento mediante calor de la leche para eliminar los microorganismos indeseados, para reducir el potencial de óxido-reducción y para preparar las proteínas en una forma que permita ser atacada por las proteasas de las bacterias lácticas. La incubación se lleva a cabo a 42 – 45°C por un tiempo de aproximadamente 7 a 8 horas, durante las cuales la población láctica se multiplica alcanzando valores superiores a 5.10⁸ UFC/g y la acidez alcanza niveles comprendidos entre 1,00 y 1,20 % (expresado como ácido láctico). Luego de la fermentación se procede a un enfriamiento hasta 4°C, temperatura que garantiza la conservación del yogur y la supervivencia de las bacterias lácticas por un mes (Bianchi Salvadori y col., 1994).

El aroma característico del yogur fue atribuido, al principio, exclusivamente al desarrollo de los estreptococos. Sin embargo se ha insistido en la importancia de los lactobacilos a este respecto. El acetaldehído sería uno de los principales componentes del aroma del yogur (Veisseyre, 1972).

Las bacterias lácticas del yogur, a través de su actividad metabólica, además de ácido láctico forman complejos vitamínicos del grupo B y elaboran una serie de compuestos como péptidos, aminoácidos, ácidos grasos libres,

acetaldehído, acetoína y ácido fórmico, que junto al ácido láctico confieren al yogur el característico aroma y gusto refrescante.

El ácido láctico que asimila el organismo prepara un ambiente intestinal favorable para el desarrollo de la microflora entérica y la actividad de las vitaminas B y C. También mejora la asimilación de elementos como el calcio que, presentándose en forma iónica, está disponible más fácilmente.

El ácido láctico, disociando los grupos de fosfato de calcio ligados a la caseína hace precipitar la proteína bajo la forma de un coágulo suave con una estructura “predigerida”, que puede ser fácilmente atacada por los jugos gástricos y, por lo tanto, volverse más digerible. Dado que la velocidad de tránsito del coágulo a través del tracto intestinal es baja, la absorción de las sustancias nutritivas, como por ejemplo los aminoácidos, se desarrolla de un modo mejor respecto a lo que ocurre cuando son asimilados directamente a partir de la leche (Bianchi Salvadori y col., 1994).

El coágulo a nivel del estómago es muy similar al de la leche materna, por la digestibilidad y biodisponibilidad de muchos de sus constituyentes nutritivos. La materia grasa se vuelve más digerible, sea por una homogeneización previa de la leche, como por la discreta lipólisis debida a las bacterias lácticas. Ambas bacterias lácticas producen polisacáridos extracelulares que otorgan al coágulo mayor viscosidad, y que en el organismo son activos hacia ciertos tumores y en la reducción de la hipertensión.

La acción equilibrante del yogur a nivel intestinal es un hecho muy importante a los fines nutricionales.

Se ha demostrado que *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* superan la barrera gástrica en el hombre adulto, niño y animales convencionales, pueden adherirse a las células epiteliales y dar lugar a mecanismos de defensa (como la estimulación de la producción de mucosidad) con el consiguiente mejoramiento de la salud intestinal y por lo tanto del individuo en general (Garvie y col., 1984; Bianchi Salvadori, 1986; Conway y col., 1987; Amores y col., 2004).

Las bacterias lácticas se encuentran naturalmente presentes en el tracto intestinal del hombre y los animales, en elevada concentración (10^6 – 10^8 /g)

formando parte de la microflora “indígena” del mismo. La microflora intestinal esta constituida por dos grupos de bacterias:

A- Anaerobias facultativas: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, etc.

B- Anaerobias estrictas: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*.

En particular, las especies de bacterias lácticas predominantes en este hábitat son:

Género *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*.

Género *Enterococcus*: *E. faecium*.

Sin embargo, falta establecer la composición completa de la microflora intestinal, debido al elevado número de cepas que la integran y a las diferencias de especie a especie. Por ejemplo en el tracto digestivo del ratón, se estima la presencia de 28 géneros distintos, con decenas de especies de cada uno, y con una serie de biotipos para cada especie (Reinheimer, 1994).

1.1. Rol Probiótico de las Bacterias Lácticas:

La inmensa reserva de bacterias lácticas y de otros géneros relacionados (*Bifidobacterium*), en el tracto intestinal, no puede sino ejercer un efecto notable sobre la salud del individuo huésped, conocido como rol probiótico. Según la definición aprobada recientemente (2002) por la National Yogur Association (NYA) y por el International Life Science Institute (ILSI) en USA se denomina probióticos a microorganismos vivos, los cuales al ser ingeridos en suficiente número, ejercen beneficios para la salud humana más allá de la nutrición básica.

Se debe tener en cuenta la diferencia con los prebióticos los cuales son sustancias químicas específicas que activan a las bacterias endógenas benéficas del cuerpo humano. Por ejemplo, los oligosacáridos actúan como prebióticos, es decir como sustancias que actúan específicamente sobre bacterias endógenas.

Combinándolos con la administración de probióticos (bacterias exógenas) se produce un efecto sinérgico sobre una gran variedad de procesos metabólicos (Tomomatsu, H., 1994).

En los comienzos del presente siglo, se dio a conocer, por primera vez, una sugestiva teoría tendiente a demostrar la existencia de una correlación entre la longevidad de los pueblos balcánicos y orientales, y el constante consumo de leches fermentadas. De acuerdo a esto, se sugirió que la implantación de ciertas bacterias lácticas en el intestino debe disminuir las reacciones patológicas en el organismo y prolongar, así, la expectativa de vida (Álvarez-Olmos, 2001).

El yogur fue siempre considerado un alimento con efectos benéficos sobre la salud del consumidor, pero sus propiedades resultan fuertemente exaltadas si la microflora es integrada con otras especies de bacterias intestinales. La preparación de productos con leche adicionada y/o parcialmente fermentada por bacterias intestinales lácticas y no lácticas (*Bifidobacterium*) constituye, sin duda, en el sector de los alimentos frescos de consumo rápido, el mayor fenómeno de la última década.

En la actualidad, los organismos probióticos más utilizados son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus* LC1, NCFCO 1748 y NCFM, *Lactobacillus jonsonii* LA1, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Streptococcus boulardii*. Todas las cepas de estas especies, utilizadas comercialmente son aislamientos intestinales, a excepción de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, cuyo hábitat típico no es intestinal (Pereira y col., 2002).

Los principales efectos que las bacterias lácticas vivas pueden ejercer sobre la salud del huésped, a partir de su presencia en el tracto intestinal son:

Protección frente a infecciones intestinales

La solución de casos de diarrea ligada al suministro de bacterias lácticas vivas (vehiculizadas, por ejemplo, en leches fermentadas), o la prevención de las mismas, se ha relacionado directamente con la capacidad de estas bacterias para resistir la colonización intestinal por bacterias entéricas patógenas (*Salmonella*, *E. coli*, etc). Esta acción se atribuye a uno, o más, de los siguientes mecanismos:

- competición por los sitios receptores de adhesión al epitelio intestinal.
- producción de sustancias antibacterianas (ácidos orgánicos y antibióticos)
- estimulación del sistema inmune. El efecto ha sido ligado a la acción de las células bacterianas vivas o ciertos compuestos de sus paredes celulares, que actuarían como antígenos, estimulando las células inmunocompetentes, lo cual lleva a un aumento del nivel de globulinas e inmunoglobulinas (Reinheimer, 1994).

Efecto hipocolesterolémico.

Estudios realizados con animales confirmaron algunas observaciones anteriores que señalaban una influencia directa de cierta microflora intestinal sobre el contenido de colesterol en la sangre (Renner, 1991; Greppi y col., 1992). La especulación es que éstas bacterias consumen colesterol (de la dieta y endógeno) en el intestino, reduciendo su absorción. En el hombre, hay resultados de estudios in vitro con bacterias lácticas que apoyan esta idea (Pereira y col, 2002). La actividad anticolesterolémica se atribuye principalmente al género *Lactobacillus*.

Propiedades anticancerígenas.

Existe suficiente evidencia de que cepas de lactobacilos, o los productos lácteos fermentados con éstas, inhiben líneas tumorales transplantadas en animales (ratas). Las propiedades antitumorales de estas bacterias específicas se suponen basadas en:

- Inactivación o inhibición de compuestos carcinogénicos en el tracto intestinal.
- Estimulación de la respuesta inmune.
- Reducción de la actividad de enzimas de bacterias intestinales que transforman sustancias pro-carcinogénicas en carcinogénicas.

Estas propiedades antitumorales serían útiles, ya sea para prevenir la iniciación del cáncer como para la supresión del cáncer iniciado (Reinheimer, 1994).

El principio inhibidor del tumor de Ehrlich y del sarcoma 180 ha sido identificado en la pared celular de *L. bulgaricus*, y está constituido por tres glicopéptidos, capaces de activar a los macrófagos (Bogdanov y col., 1978).

También en *S. thermophilus* ha sido reconocida esta actividad biológica, pero en grado inferior respecto del lactobacilo (Salminen y col., 1992).

1.2- Yogures con fibra dietaria

Los alimentos funcionales, como los yogures que contienen fibra dietaria, son altamente valorados por los consumidores. Labell (1990) recomienda una ingesta diaria de 25-30 g de fibra dietaria para adultos. Los yogures funcionales combinando los beneficios del yogur y de la fibra dietaria pueden ayudar a la prevención o recuperación de enfermedades muy preponderantes en la población como diabetes, sobrepeso, diverticulosis, constipación, hemorroides, cáncer de colon e hipercolesterolemia (Mälkki, 2004; Leach, 2007). Los ácidos orgánicos que resultan de la fermentación de la lactosa de la leche en la producción del yogur contribuyen en gran medida a estos efectos positivos en la salud ya descritos (Tomomatsu, 1994; Yaeshima, 1996).

La ingesta de fibra dietaria puede influenciar en diferentes formas la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal. En el caso de glucosa que es un macronutriente, un aumento en el contenido total de los alimentos ingeridos puede disminuir la respuesta glicémica (Nishimune y col., 1991; Trout y col., 1993). Sin embargo, hay evidencia consistente en que la fibra dietaria del tipo soluble reduce el contenido de glucosa en sangre y la fibra dietaria del tipo insoluble tiene escaso o ningún efecto en la glucemia postprandial (Wolever y col., 1995; Jenkins y col., 2000).

Para el caso de los micronutrientes, los carbohidratos no-digeribles han mostrado que impiden la absorción de minerales y elementos traza en el intestino delgado debido a la capacidad de unión o secuestro de átomos o moléculas que poseen. La fibra dietaria puede absorber micronutrientes como calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe) sobre su superficie, posiblemente reduciendo su disponibilidad in vitro o causando un balance mineral negativo in vivo (Boscher y col., 2003; Sangnark y col., 2003). Para estudiar estos efectos se utilizan modelos experimentales del tracto digestivo humano (Rodríguez y col., 2005).

Los objetivos de esta parte del trabajo de tesis fueron:

A- Estudiar si las fibras utilizadas modifican el contenido de ácidos orgánicos de los yogures y relacionarlo con el pH, durante el almacenamiento refrigerado.

B- Estudiar la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro en yogur adicionado con fibras por medio de una simulación in vitro del tracto gastrointestinal.

Capítulo 2- Preparación de yogures con fibras

2.1- Elaboración industrial del yogur

El proceso básico de manufactura del yogur ha permanecido inalterado a través de los siglos, sin embargo, la nueva tecnología incluye nuevos ingredientes como estabilizadores y mejoradores de textura, endulzantes, saborizantes y aromatizantes, y particularmente el desarrollo en bacterias lácticas.

El proceso más usado actualmente en la fabricación de yogur (Tamine y Robinson, 1985) consta de las siguientes etapas:

- Tratamiento preliminar de la leche en el cual se realiza la estandarización de la materia grasa de la leche, fortificación con sólidos de leche y adición de aditivos como por ejemplo azúcar, estabilizadores, etc.
- Precalentamiento de la leche a 50-60 °C.
- Homogeneización a 2000 psi. Previene la sinéresis durante la fermentación y el almacenamiento y, en general promueve la estabilidad.
- Tratamiento térmico de la leche que puede llevarse a cabo a 85 °C por 30 min, 90-95 °C por 5-10 min. a 120 °C por 3-5 s.
- Enfriamiento a temperatura de incubación que es para incubación corta a 42-45 °C y para incubación larga a 30 °C.
- Inoculación con el cultivo iniciador. En este punto, el proceso puede ir por dos caminos, según se quiera fabricar yogur batido o yogur set.

En el primer caso, la incubación se lleva a cabo en tanques, que luego de completado el tiempo requerido se enfría a 10 °C y por medio de una bomba se envía a un tanque de almacenamiento. El producto puede quedar así (yogur natural) o puede agregársele trozos de frutas (yogur con frutas), o saborizantes y colorantes (yogur saborizado). Por último es envasado y despachado.

En el caso del yogur set, primero se envasa la leche inoculada sin otro ingrediente (yogur natural) o se le agrega al envase trozos de frutas (yogur con

fruta) o saborizantes y colorantes (yogur saborizado) y luego se incuba, se enfría y se despacha.

La cantidad de tiempo requerido para la fermentación varía con el cultivo usado. Usualmente se monitorea el proceso mediante la medición del pH que finaliza cuando éste llega a 4,5 - 4,7. También se pueden realizar medidas de viscosidad para constatar que se ha alcanzado la textura deseada.

La principal diferencia entre yogur batido y yogur set es la textura (Foss, 2002). Luego del enfriamiento, el yogur set es firme, debido a la gelificación de la caseína en el sistema. Esta forma de fabricar el yogur es la tradicional. Debido a la firmeza del gel, frecuentemente no se usan estabilizadores, pero, también frecuentemente hay sinéresis o desprendimiento de suero cuando llega al consumidor, que además de no ser atractivo, puede ser mal interpretado como signo de deterioro. Sin embargo, el suero contiene proteínas y es nutritivo, y puede ser incorporado a la masa de yogur mezclándolo. Pueden usarse estabilizadores, pero en pequeños niveles (típicamente menos del 1%). Otra característica es que puede quedar con una textura arenosa una vez que es mezclado.

En contraste, el yogur batido es más suave y menos firme. Esto es debido a que luego de la fermentación en los tanques, el producto es bombeado hacia tanques de almacenamiento o envasado. La acción de la bomba rompe el gel proteico, lo cual resulta en un producto fluido si no se le agregan estabilizadores como almidones o gelatina. El almidón absorbe el agua y previene la separación de suero del yogur.

2.2- Materias primas empleadas para preparar el producto.

El yogur fue preparado con leche entera en polvo cuya información nutricional ya fue presentada. Se utilizó agua de red, y sacarosa (tipo A, Ledesma, Argentina). Las bacterias lácticas empleadas son *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (Cp2, CIDCA 321) y *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (Lbp, CIDCA 332) pertenecientes a la colección de cepas del CIDCA (Moreira, M. y col., 2000).

Las fibras que fueron agregadas al yogur antes de la fermentación fueron: Inulina (Frutafit-inulin, Imperial Sensus, Holanda), Fibra dietética de Caña de Bambú (Qualicel, CFF, Alemania), Fibra Dietética de Trigo (Wheatcel, CFF, Alemania) y Fibra Dietética de Manzana (Vitacel, JRS, Alemania). *Psyllium plantago* y quitosano se agregaron al yogur luego de finalizada la fermentación, ya que, en las pruebas previas se comprobó que interferían con la formación del coágulo y no otorgaban al producto una textura adecuada para ser comercializado. La primera debido a que forma una masa gelatinosa en solución acuosa y quitosano debido al tamaño de partícula que posee. Solamente se utilizaron estas dos fibras, para el estudio de biodisponibilidad de glucosa y minerales como modelos de comparación.

2.3- Modo de preparación del yogur

El yogur fue preparado en recipientes estériles individuales de vidrio de 250 ml con tapa a rosca. El método tipo set empleado, fue el siguiente (para 100 g):

Primer Día

- 1) Mezclado de los sólidos: 15 g de leche en polvo, 5 g de sacarosa, 1,3 g de fibra dietética (normas para productos lácteos fortificados, Fernández-García y McGregor, 1997).
- 2) Dilución de los sólidos en agua de red, llevando a 100 g
- 3) Pasteurización en estufa (Dhacel HD22) a 85 °C durante 30 minutos
- 4) Enfriamiento y almacenamiento en heladera a 4 °C

Segundo Día

- 1) Atemperado de las muestras a 42 – 43 °C en baño termostático (Heto Birkeröd).
- 2) Inoculación con 30 µl de *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* y 30µl de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*.
- 3) Incubación a 43 °C hasta una acidez de 85 °Dornic y pH 4.5 – 4.6 (aprox. 5 – 6 horas).
- 4) Conservación en cámara de refrigeración a 4 °C, por 8 h.

Tercer Día

1) Homogeneización del contenido de fibra durante 20 s en cada recipiente con mucho cuidado para minimizar la ruptura de estructura antes de las medidas.

Para la determinación de ácidos orgánicos durante almacenamiento refrigerado se mantuvieron los yogures en cámara por 21 días. Los ensayos de disponibilidad de nutrientes se realizaron al otro día de la preparación de los mismos.

2.4- Conservación de cepas

Para realizar los distintos ensayos se hicieron repiques en leche pasteurizada de los cultivos de los microorganismos almacenados a -85°C en las cámaras de refrigeración del instituto. En cada uno de los repiques se hizo el examen microscópico previa coloración de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación.

La coloración de Gram incluye el uso de los siguientes reactivos: Cristal Violeta: 10 g/L en agua destilada; Safranina (Solución madre): 25 g/L de etanol; Safranina (Solución de trabajo): Solución madre diluida 1:10; Lugol: 10 g I_2 + 20 g KI en 1L de agua destilada; Decolorante: etanol:acetona (4:1). Las soluciones fueron filtradas antes de utilizarlas.

Se realizó un extendido de la colonia aislada, fue fijado por calor, y se siguió el protocolo de tiempos de exposición que se detalla a continuación: Cristal Violeta: 120 s.; Lugol: 30 s.; lavado con agua; Lugol: 30 s.; lavado con agua; Decolorante: 10 s.; Lavar con agua; Safranina: 120 s. Observación al microscopio por inmersión a 1000x.

Capítulo 3- Seguimiento de la presencia de ácidos característicos relacionados con el flavour utilizando HPLC

3.1- Introducción

Los ácidos orgánicos son particularmente importantes en las características sensoriales del yogur; son significativos como preservadores del producto y son indicadores de actividad bacteriana (Bouzas y col., 1991; Marsili y col., 1981).

El ácido láctico se ha relacionado con la inhibición de ciertas bacterias patógenas (Rubin y col., 1982). El ácido orótico es factor de crecimiento para los lactobacilos (Susuki y col., 1986) y también posee efecto hipocolesterolémico (Robinson y col., 1983, 1984; Harden y col., 1984). Otros autores como Tomomatsu (1994) y Yaeshima (1996) aseguran que para reducir el colesterol sanguíneo, es importante la relación entre los ácidos acético y propiónico. El ácido acético es conocido como promotor de colesterol, mientras que el ácido propiónico ha sido encontrado como inhibidor de éste. La relación entre los ácidos acético y propiónico, resultado del crecimiento de las bacterias lácticas del yogur, parece ser favorable en la reducción del colesterol.

El método de separación de intercambio iónico por HPLC es el más utilizado para la determinación de ácidos orgánicos en productos lácteos (Marsili y col., 1981; Bevilacqua y col., 1989). Estos autores determinaron los ácidos orgánicos característicos del aroma en leche fresca, yogur, quesos de pasta dura y blanda. Las ventajas en el uso de HPLC son velocidad, análisis simultáneo de varios ácidos y facilidad en la preparación de la muestra. Sin embargo, los ácidos cítrico-orótico y úrico-fórmico coeluyen. Algunos autores (Fernández-García y col., 1994; Lombardi y col., 1994; Califano y col., 2000) resolvieron estas dificultades cuantificándolos utilizando sus diferentes características de absorbancias a 214 y 280nm.

El objetivo de este capítulo fue analizar el contenido de ácidos orgánicos y pH de yogures con distintos tipos de fibra dietaria durante el almacenamiento refrigerado.

3.2- Materiales y Métodos

3.2.1- Determinación de ácidos orgánicos

Se tomaron muestras a los 1, 7, 14 y 21 días de almacenamiento para estudiar la evolución de los ácidos acético, cítrico, fórmico, isobutírico, láctico, orótico, pirúvico, propiónico y úrico. Aproximadamente 7 g de yogur con o sin fibra, previamente homogeneizados, se diluyeron con 50 ml de H_2SO_4 0.009 N (solvente de corrida). La extracción de los ácidos se realizó agitando en un Shaker Rolco (Rolco S.R.L., Argentina) durante 1 h a temperatura ambiente (20°C). Luego de esta operación se centrifugó a 7000 g durante 5 min. a una temperatura de 20°C en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-25 (California, USA). El sobrenadante de cada muestra fue filtrado una vez por papel de filtro y dos veces más por membrana filtrante de 0.45 μm de diámetro de poro (Millipore Filters, SMN 11306, USA). El análisis de ácidos orgánicos se realizó por el método de cromatografía de alta performance (HPLC).

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta performance (Waters Associates, Mildford, USA) equipado con un auto muestreador Autosampler 717 plus, una bomba para solvente 600 A, un detector Waters 996 PAD y un horno para columna Waters. Las condiciones de operación fueron: fase móvil de H_2SO_4 0.009 N filtrada por membrana de 0.45 μm (Millipore Filters, SMN 11306, USA) y desgasificado por ultrafiltración. Se inyectó 10 μl de muestra. La velocidad de flujo en el circuito del cromatógrafo fue de 0.7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a una temperatura de 60°C. La separación se realizó mediante una columna de intercambio catiónico (300 x 7,8 mm) Aminex HPX 87 H (Bio Rad Laboratories, USA). Se obtuvieron cromatogramas a 214 y 280 nm. Se prepararon tres veces yogures con y sin fibra y se analizaron todas las muestras por duplicado.

Para la puesta a punto del método, se determinaron en primer lugar, los tiempos de retención con soluciones standard de cada ácido. Se usaron reactivos de calidad HPLC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y agua bidestilada. Luego se utilizó el método del estándar interno para verificar si los tiempos antes mencionados no variaban por la presencia de otros componentes en la muestra.

Según este método, se agregó al yogur una cantidad conocida de cada ácido y se realizaron las correspondientes corridas en el cromatógrafo.

La cuantificación de los distintos ácidos en los yogures se realizó con el método de estándar externo. Se prepararon seis soluciones estándar de cada uno de los ácidos a estudiar, cubriendo el rango de concentraciones que se estimaban que estarían presentes en las muestras. Con los cromatogramas se confeccionaron las curvas de calibración mediante regresión lineal, que se pueden observar en las figuras III.1, III.2 y III.3. Los coeficientes de correlación entre las áreas debajo de los picos de los ácidos y las concentraciones de los mismos, indicaron muy buenas respuestas lineales en un amplio rango de concentraciones de los ácidos.

Como se preveía según la bibliografía (Fernandez-Garcia y col., 1994, Lombardi y col, 1994; Califano y col, 2000) los ácidos cítrico-orótico y úrico-fórmico no se resolvieron completamente a 214 nm. Por tal motivo, se realizó el análisis de las muestras a 280 nm, donde cítrico y fórmico no absorben y las mezclas fueron resueltas utilizando las absorbancias a ambas longitudes de onda de manera aditiva.

La eficiencia del proceso de extracción fue evaluada por la determinación de la recuperación de los ácidos orgánicos. Una cantidad conocida de solución patrón de ácido orgánico fue agregada a 7 g de yogur y extraída como se explicó anteriormente. Se realizaron inyecciones por duplicado de un extracto de yogur y de un extracto de yogur más el estándar agregado. La cantidad de estándar agregado fue de aproximadamente el 50% de la cantidad de ácido presente en la muestra.

3.2.2- Medición de pH

Se tomó con un peachímetro Hach, modelo EC-30 (USA) con un electrodo de punción de punta de vidrio (Broadley James Corporation, USA). Las medidas se realizaron por triplicado antes de la inoculación de los fermentos, a 5, 7 y 9 h durante la fermentación y a 1, 7, 14 y 21 días de almacenamiento refrigerado. El pH es indicador del proceso fermentativo y de la producción de ácidos orgánicos.

Fig. III.1- Curvas de calibración para los ácidos acético (♦), cítrico (■) y fórmico (▲)

Fig. III.2- Curvas de calibración para los ácidos isobutírico (♦), láctico (■) y orótico (▲)

Fig. III.3- Curvas de calibración para los ácidos pirúvico (♦), propiónico (■) y único (▲)

3.2.3- Análisis Estadístico de los datos obtenidos

Promedios y desvíos estándar fueron calculados para el contenido de los distintos ácidos orgánicos y pH. Fueron expresados en cada caso como la media $\pm$ DS para n replicados. El test ANOVA para un factor fue usado para estudiar la influencia de las distintas fibras en los parámetros estudiados y el test de Fisher para comparar medias ($p < 0,05$).

3.3- Resultados y Discusión

3.3.1- Determinación de ácidos orgánicos

El ensayo para estimar la eficiencia en el proceso de extracción arrojó un $96 \pm 2\%$ de recuperación de los ácidos presentes en el yogur. Según el ensayo del estándar interno pudimos observar que no se detectaron los ácidos acético e isobutírico para las condiciones utilizadas en este estudio.

La producción de sustancias aromáticas por parte de los fermentos lácticos se asocia al metabolismo del ácido cítrico y del ácido pirúvico.

El ácido cítrico, aún siendo un componente menor de la leche fresca (0,2%) es metabolizado por las bacterias lácticas citrato fermentantes, produciendo CO_2 , diacetilo, acetoina, butilenglicol y ácido acético. El primer paso del metabolismo, es el transporte del mismo al interior de la célula por la citrato permeasa. Dentro de la misma, el ácido cítrico es convertido en ácido acético y en ácido oxalacético por la citratasa. Todas las especies de las bacterias lácticas pueden ingresar el ácido cítrico al interior de la célula, pero existen diferencias importantes en su actividad para catabolizarlo. Se cree que este ácido no es usado como fuente de energía, sino que esta vía metabólica funciona para impedir la acumulación de piruvato en las células hasta niveles que puedan resultar tóxicos para las mismas (Reinheimer, 1994).

Durante el almacenamiento refrigerado de los yogures, el contenido de ácido cítrico no varió significativamente, concordando con varios estudios anteriores (Ryssad y col, 1997; Fernández–García y col, 1998). Tampoco hubo

diferencias significativas ($p < 0,05$) entre yogures con y sin fibra. La concentración promedio fue de $2451 \pm 20 \mu\text{g/g}$ de yogur. Por lo tanto, esta falta de variación podría estar indicando una escasa metabolización del ácido que tendría que ver con la no detección del ácido acético.

En la figura III.4 se muestran los cromatogramas típicos a 214 (A) y a 280nm (B). Según Fernández-García y col. (1994), el pico (b) podría corresponder a fosfatos y compuestos no retenidos y el pico (d) podría ser glucosa remanente de la utilización de la sacarosa por los microorganismos. Se desconoce que sustancias podrían ser los picos (a) y (c).

Figura III.4- Cromatogramas obtenidos por HPLC a 214nm (A) y a 280nm (B) con el método de intercambio iónico de yogures adicionados con inulina a los 15 días de almacenamiento refrigerado. Ácidos orgánicos: (1) orótico, (2) cítrico, (3) pirúvico, (4) láctico, (5) úrico, (6) fórmico, (7) propiónico, (b) fosfatos y compuestos no retenidos, (d) glucosa, (a) y (c) desconocidos.

El ácido pirúvico es el metabolito común de las vías homo y heterofermentativas de las bacterias lácticas y es un compuesto intermedio clave

en el metabolismo de los azúcares. El piruvato puede ser utilizado en diversos caminos metabólicos, generando además de ácido láctico, otros ácidos como propiónico, acético, fórmico y butírico (Willett y col., 1994).

Durante el almacenamiento, la concentración de ácido pirúvico disminuyó para los yogures con fibra de trigo pero aumentó para los yogures sin fibra y con fibra de bambú e inulina. Los yogures con fibra de manzana no variaron su contenido de ácido durante todo el ensayo como se observa en la tabla III.1.

Tabla III.1- Contenido de ácido pirúvico en µg/g de yogur (media ± DS) con y sin fibra (control) durante almacenamiento a 4°C

días	1	7	14	21
control	145 ^{a,a} ± 1	181 ^{a,β} ± 2	171 ^{a,γ} ± 5	151 ^{a,δ} ± 3
bambú	132 ^{b,a} ± 0	135 ^{b,a} ± 4	117 ^{b,β} ± 4	145 ^{a,γ} ± 3
inulina	168 ^{c,a} ± 1	179 ^{a,β} ± 2	225 ^{c,γ} ± 1	185 ^{b,δ} ± 2
manzana	319 ^{d,a} ± 3	318 ^{c,a} ± 2	317 ^{d,a} ± 3	316 ^{c,a} ± 2
trigo	139 ^{e,a} ± 2	150 ^{d,β} ± 4	179 ^{a,γ} ± 4	117 ^{d,δ} ± 1

^a Letras latinas indican diferencias significativas (p<0,05, comparación vertical)

^α Letras griegas indican diferencias significativas (p<0,05, comparación horizontal)

Según Reinheimer (1994) la presencia de ácido oleico en la leche de vaca, inhibe la producción de ácido acético ya que, independientemente del pH extracelular, el ácido oleico cambia la permeabilidad de la membrana celular, la cual, regula el pH intracelular a un valor que causa una interferencia específica sobre las enzimas que producen ácido acético. Esto aporta otra explicación más a la falta de detección del mismo.

El ácido láctico es el principal producto de la glucólisis que realizan las bacterias lácticas durante su crecimiento. Aumenta mucho durante la fermentación y también puede hacerlo durante el almacenamiento como ocurrió en este ensayo (Tabla III.2), probablemente por actividad residual de los microorganismos del cultivo iniciador (Gueimonde M. Y col, 2003).

La adición de fibras causó un aumento significativo (p< 0,05) en la producción del ácido láctico, en comparación con el yogur sin fibra. Debido a que este ácido es el principal indicador de la actividad microbiana, se podría decir que todas las fibras utilizadas estimularon de alguna manera, el crecimiento bacteriano. Sin embargo, hubo diferencias significativas entre las distintas fibras. Los yogures con inulina presentaron los contenidos más altos mientras que, los

yogures con fibra de trigo presentaron los más bajos. Esto concuerda con los estudios realizados por diversos investigadores para estudiar la producción de ácidos de cadena corta por la microflora intestinal con dietas ricas en fibras. Roland y colaboradores (1995), realizaron un estudio en ratas y observaron una gran producción de estos ácidos con dietas ricas en inulina en comparación con otras fuentes de fibras: salvado de trigo, cáscara de legumbre, salvado de avena, semilla de cacao y fibra de zanahoria. Green y colaboradores (1998), trabajaron in vitro con heces humanas y distintos tipos de fibras y también encontraron diferencias significativas en los niveles de ácidos de cadena corta y gas producidos con las distintas fibras. Botham y colaboradores (1998) notaron que el grado de fermentación y la concentración de estos ácidos cambiaban según la estructura química y la naturaleza de las fibras empleadas. Propusieron que la celulosa que posee uniones β -1,4 que son menos accesibles a las enzimas bacterianas fue escasamente fermentada. Esto concuerda con el menor contenido de ácido láctico hallado en este estudio en los yogures con fibra de trigo, que posee el mayor contenido de celulosa de las fibras ensayadas.

Tabla III.2- Contenido de ácido láctico en $\mu\text{g/g}$ de yogur (media $\pm$ DS) con y sin fibra (control) durante almacenamiento a 4°C

días	1	7	14	21
control	9488 ^{a,a} $\pm$ 153	13693 ^{a,\beta} $\pm$ 285	13416 ^{a,\beta} $\pm$ 112	12382 ^{a,\gamma} $\pm$ 20
bambú	13111 ^{b,a} $\pm$ 80	15052 ^{b,\beta} $\pm$ 167	17471 ^{b,\gamma} $\pm$ 235	14901 ^{b,\delta} $\pm$ 30
inulina	15881 ^{c,a} $\pm$ 116	16072 ^{c,\alpha} $\pm$ 216	17246 ^{b,\beta} $\pm$ 242	17440 ^{c,\beta} $\pm$ 30
manzana	14435 ^{d,a} $\pm$ 405	14854 ^{d,\alpha} $\pm$ 124	16002 ^{c,\beta} $\pm$ 133	15662 ^{d,\gamma} $\pm$ 23
trigo	11603 ^{e,a} $\pm$ 352	13802 ^{a,\beta} $\pm$ 145	16326 ^{d,\gamma} $\pm$ 126	14613 ^{e,\delta} $\pm$ 98

^a Diferentes letras latinas indican diferencias significativas ($p < 0,05$, comparación vertical)
^{\alpha} Diferentes letras griegas indican diferencias significativas ($p < 0,05$, comparación horizontal)

La concentración de ácido fórmico, que concuerda con la hallada por Fernández-García y col. (1994), disminuyó significativamente durante el almacenamiento ($p < 0,05$) como se puede observar en la tabla III.3. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que el ácido fórmico es producido en las primeras etapas de la fermentación de la leche por *S. thermophilus* ya que este microorganismo desarrolla antes que *L. bulgaricus*, porque puede utilizar el ácido pirúvico a valores de pH neutros (Reinheimer, 1994). El ácido fórmico es un factor de crecimiento para *L. bulgaricus*, que lo necesita para la biosíntesis de bases

púricas (Bianchi Salvadori y col., 1994). Por lo tanto, el ácido fórmico va desapareciendo durante la formación del yogur y en el almacenamiento ya que las bacterias lácticas se mantienen viables por un mes, según estos mismos investigadores.

El agregado de fibras al yogur causó diferencias significativas con respecto al control. En el primer día de almacenamiento el yogur sin fibra presentó valores superiores a los yogures con fibras. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo durante el almacenamiento. A los 21 días, el mayor contenido de ácido se observó en los yogures con fibra de trigo y con inulina.

Tabla III.3- Contenido de ácidos fórmico en µg/g de yogur (media ± DS) con y sin fibra (control) durante almacenamiento a 4°C

días	1	7	14	21
control	644 ^{a,α} ± 5	661 ^{a,β} ± 5	592 ^{a,γ} ± 9	436 ^{a,δ} ± 4
bambú	559 ^{b,α} ± 7	523 ^{b,β} ± 5	530 ^{b,γ} ± 3	505 ^{b,δ} ± 5
inulina	622 ^{c,α} ± 7	578 ^{c,β} ± 5	596 ^{c,γ} ± 4	547 ^{c,δ} ± 5
manzana	538 ^{d,α} ± 4	492 ^{d,β} ± 5	374 ^{d,γ} ± 7	341 ^{d,δ} ± 6
trigo	602 ^{e,α} ± 4	607 ^{e,β} ± 2	589 ^{a,e,γ} ± 2	557 ^{b,γ} ± 5

^a Letras latinas indican diferencias significativas (p<0,05, comparación vertical)

^α Letras griegas indican diferencias significativas (p<0,05, comparación horizontal)

El contenido de ácido propiónico aumentó durante el almacenamiento, de acuerdo con Fernández-García y col. (1998), para yogures con y sin fibra (Tabla III.4), muy probablemente como consecuencia del metabolismo del ácido pirúvico. En el caso de los yogures con fibra de trigo, el aumento del propiónico con el tiempo de almacenamiento concuerda con una disminución del pirúvico (Tabla III.1), su precursor.

Tabla III.4- Contenido de ácido propiónico en µg/g de yogur (media ± DS) con y sin fibra (control) durante almacenamiento a 4°C

días	1	7	14	21
control	159 ^{a,α} ± 4	188 ^{a,β} ± 4	207 ^{a,γ} ± 2	226 ^{a,δ} ± 2
bambú	221 ^{b,α} ± 2	252 ^{b,β} ± 3	261 ^{a,γ} ± 3	276 ^{b,δ} ± 4
inulina	323 ^{c,α} ± 3	328 ^{c,α} ± 4	328 ^{c,α} ± 4	346 ^{c,β} ± 3
manzana	99 ^{d,α} ± 1	113 ^{d,β} ± 2	189 ^{d,γ} ± 3	206 ^{d,δ} ± 2
trigo	86 ^{e,α} ± 3	108 ^{e,β} ± 3	133 ^{e,γ} ± 3	146 ^{e,δ} ± 2

^a Letras latinas indican diferencias significativas (p<0,05, comparación vertical)

^α Letras griegas indican diferencias significativas (p<0,05, comparación horizontal)

Es de destacar, que en el caso de los yogures con inulina el gran contenido de ácido propiónico se mantuvo invariante hasta los 14 días, aumentando significativamente solo, en la última semana del ensayo (Tabla III.4). Los yogures con fibras de manzana y trigo presentaron valores del ácido inferiores a los yogures sin fibra durante el almacenamiento. Por el contrario, se observaron los mayores contenidos de ácido para los yogures con inulina que concuerda con los estudios de Botham y colaboradores (1998) ya mencionados.

El ácido orótico es precursor de ácidos nucleicos y por lo tanto un factor de crecimiento para las bacterias lácticas y es consumido activamente durante la fermentación y también en almacenamiento refrigerado (Fernández-García y col., 1998). Esto concuerda con la disminución observada para yogures con y sin fibra en el ensayo (Tabla III.5). Los yogures con fibra presentaron menores valores que los yogures sin fibra ($p < 0,05$) durante el almacenamiento. Esto indicaría un mayor desarrollo microbiano para los yogures con fibra que es consistente con el trabajo mencionado anteriormente.

Tabla III.5- Contenido de ácido orótico en $\mu\text{g/g}$ de yogur (media $\pm$ DS) con y sin fibra (control) a 1 y 21 días de almacenamiento a 4°C

días	1	7	14	21
control	111 ^{a,a} $\pm$ 3	103 ^{a,a,\beta} $\pm$ 5	98 ^{a,\beta} $\pm$ 1	92 ^{a,\gamma} $\pm$ 2
bambú	100 ^{b,a} $\pm$ 1	94 ^{b,\beta} $\pm$ 1	90 ^{b,\beta} $\pm$ 5	80 ^{b,\gamma} $\pm$ 3
inulina	100 ^{b,a} $\pm$ 2	90 ^{b,\beta} $\pm$ 3	86 ^{b,\beta} $\pm$ 2	81 ^{b,\gamma} $\pm$ 2
manzana	97 ^{c,a} $\pm$ 1	92 ^{b,\beta} $\pm$ 2	83 ^{c,\gamma} $\pm$ 0	76 ^{c,\delta} $\pm$ 1
trigo	97 ^{c,a} $\pm$ 2	93 ^{b,\beta} $\pm$ 2	85 ^{b,\gamma} $\pm$ 1	73 ^{d,\delta} $\pm$ 1

^a Letras latinas indican diferencias significativas ($p < 0,05$, comparación vertical)

^a Letras griegas indican diferencias significativas ($p < 0,05$, comparación horizontal)

El ácido úrico es un catabolito de las bases púricas de los ácidos nucleicos. En este estudio disminuyó durante el almacenamiento para yogures con y sin fibra (Tabla III.6). Esto concuerda con los datos obtenidos por Fernández-García y col en 1998 que midieron los contenidos de ácidos orgánicos en yogures sin y con fibra de avena y diferentes endulzantes. Al ser un catabolito, sería más lógico que fuera aumentando durante el almacenamiento, pero tal vez pueda ser consumido en algún camino metabólico secundario, de los muchos que poseen las bacterias lácticas. Los yogures con fibra tuvieron contenidos superiores a los yogures sin fibra en el primer y último día de almacenamiento. En cambio, a los 7 días no se

observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre yogures con y sin fibra. A los 14 días se invirtió el comportamiento ya que, se observaron mayores contenidos de ácido para los yogures sin fibra.

Tabla III.6- Contenido de ácido úrico en $\mu\text{g/g}$ de yogur (media $\pm$ DS) con y sin fibra (control) durante almacenamiento a 4°C

días	1	7	14	21
control	112 ^{a,α} $\pm$ 5	122 ^{a,β} $\pm$ 5	120 ^{a,β} $\pm$ 3	73 ^{a,γ} $\pm$ 3
bambú	130 ^{b,α} $\pm$ 4	121 ^{a,β} $\pm$ 2	116 ^{a,b,β} $\pm$ 4	106 ^{b,γ} $\pm$ 3
inulina	122 ^{c,α} $\pm$ 4	117 ^{a,α} $\pm$ 2	111 ^{b,β} $\pm$ 2	102 ^{c,γ} $\pm$ 3
manzana	126 ^{b,c,α} $\pm$ 5	117 ^{a,α} $\pm$ 4	107 ^{b,β} $\pm$ 4	10 ^{c,γ} $\pm$ 2
trigo	122 ^{c,α} $\pm$ 4	116 ^{a,β} $\pm$ 1	109 ^{b,γ} $\pm$ 7	98 ^{d,δ} $\pm$ 4

^a Letras latinas indican diferencias significativas ($p < 0,05$, comparación vertical)

^α Letras griegas indican diferencias significativas ($p < 0,05$, comparación horizontal)

En síntesis, la adición de las fibras estudiadas causó diferencias significativas con respecto al yogur sin fibra en el contenido de los ácidos durante el almacenamiento. La inulina aumentó los ácidos láctico, pirúvico, propiónico y úrico, pero disminuyó el orótico con respecto al yogur sin fibra. Este comportamiento estaría relacionado con el contenido de fibra soluble que posee la inulina utilizada, que además tiene un largo de cadena promedio $\geq$ a 9 monómeros. Además, la inulina como ya se mencionó, es considerada por diversos investigadores (Tomomatsu, 1994; Akalin y col., 2004) como estimulante del crecimiento de varios microorganismos, en consecuencia, aumentaría la actividad metabólica. La fibra de manzana se comportó igual a la inulina a excepción de los ácidos pirúvico y propiónico. La semejanza con la inulina está dada en que la fibra de manzana tiene un contenido de fibra soluble del 25%. La diferencia radica en que tiene un 75% de fibra insoluble y que posee componentes ácidos como un gran contenido de lignina. Esta no se hidrata bien a menos que sea tratada con peróxido hidrógeno alcalino como demostraron Sangnark y Noomhorm (2003).

Las fibras de bambú y trigo que comparten el mismo contenido de hemicelulosa, se comportaron aumentando el contenido de los ácidos láctico y úrico pero disminuyeron los ácidos orótico y pirúvico con respecto al yogur sin fibra (Tabla III.1 y III.2). Trigo y bambú se diferenciaron en el ácido propiónico, el

primero provocó los menores valores y la fibra de bambú contenidos mayores sin llegar a superar a la inulina. Esta diferencia, podría estar dada ya que trigo tiene el mayor contenido de celulosa de las fibras utilizadas.

3.3.2- Medición de pH

Antes de la inoculación el pH fue significativamente menor para la fibra de manzana debido a componentes ácidos que posee, pero no hubo diferencias significativas entre inulina y control. Las fibras causaron una aceleración en la acidificación que fue más marcada en el caso de inulina (Fig. III.5a). Las fibras pueden proporcionar nutrientes o factores estimulantes para el crecimiento de los microorganismos (Fernández-García y col., 1997).

Fig III.5- pH de yogures con y sin fibra durante la fermentación (a) y el almacenamiento refrigerado (b). Sin fibra (♦), bambú (■), inulina (▲), manzana (▲), trigo (■). Desviación estándar máxima = 0.021 unidades de pH

Este comportamiento se mantuvo hasta los 7 días de almacenamiento y puede relacionarse con el aumento significativo del ácido láctico para todos los yogures (Tabla III.2). A los 14 y 21 días no hubo diferencias significativas entre yogures con y sin fibra (Fig. III.5b), si bien el contenido de ácido láctico fue significativo. Esto podría deberse a la capacidad buffer que poseen las fibras que fue descrita por Fernández-García y col. en 1997.

3.4- Conclusiones

Los ácidos fórmico, úrico y orótico disminuyeron, y los ácidos láctico y propiónico aumentaron significativamente, durante el almacenamiento en yogures con y sin fibra. La adición de las fibras estudiadas causó diferencias significativas en el contenido de los ácidos orgánicos. Inulina y fibra de manzana aumentan los ácidos pirúvico, láctico y úrico, pero disminuyen el orótico con respecto al yogur sin fibra. El ácido pirúvico en el yogur con fibra de manzana no varió significativamente durante el almacenamiento. Las fibras de bambú y trigo se comportaron aumentando el contenido de los ácidos láctico y úrico pero disminuyeron los ácidos orótico y pirúvico con respecto al yogur sin fibra. Todas las fibras causan una aceleración en la acidificación, más marcada en el caso de inulina. Esto podría ser debido al efecto prebiótico de las fibras. Este comportamiento se mantiene hasta los 7 días de almacenamiento y puede relacionarse con el aumento significativo del ácido láctico para todos los yogures. A los 14 y 21 días no hay diferencias significativas en el pH entre yogures con y sin fibra.

Capítulo 4- Estudio del efecto de la fibra dietaria sobre la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro

4.1- Introducción

La ingesta de fibra puede influenciar en diferentes formas la disponibilidad de nutrientes en el tracto gastrointestinal. Se denomina biodisponibilidad a la cantidad de nutriente que está disponible para su absorción en la forma química que es fisiológicamente utilizable (Van Campen y col., 1999).

En el caso de glucosa, un aumento en el contenido total de fibra de los alimentos ingeridos puede disminuir la respuesta glicémica (Nishimune y col., 1991; Trout y col., 1993). Sin embargo, hay evidencia consistente en que la fibra dietaria del tipo soluble reduce el contenido de glucosa en sangre y la fibra dietaria del tipo insoluble tiene escaso o ningún efecto en la glucemia postprandial (Wolever y col., 1995; Jenkins y col., 2000). Se supone que este efecto estaría relacionado con el aumento de la viscosidad en el intestino delgado (Jenkins y col., 1978). Menor implicancia, con niveles bajos de glucosa en sangre parecen tener, los efectos sistémicos producidos por los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico, butírico) producidos en el colon por fermentación de la microbiota intestinal sobre la fibra dietaria soluble ingerida (Wolover y col., 1991; Todesco y col., 1991; Jenkins y col., 1995). A pesar de que parece más importante el rol que cumple el intestino delgado que el colon, se necesita mayor investigación en el tema.

Para el caso de los micronutrientes, los carbohidratos no-digeribles han mostrado que impiden la absorción de minerales y elementos traza en el intestino delgado debido a la capacidad de unión o secuestro de átomos o moléculas que poseen por la presencia de residuos de ácido galacturónico y ácido fítico. Algunos tipos de fibras pueden afectar de diferente manera la biodisponibilidad de nutrientes (Tungland y col., 2002). La adición de fibra dietaria a los alimentos ha sido asociada con un impacto negativo en la biodisponibilidad de minerales, particularmente en grupos de alto riesgo de la población (Claye y col., 1998; Boscher y col., 2001). La fibra dietaria puede absorber micronutrientes como calcio

(Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe) sobre su superficie, posiblemente reduciendo su disponibilidad in vitro o causando un balance mineral negativo in vivo (Boscher y col., 2003; Sangnark y Noomhorm, 2003).

Los productos de la digestión de los carbohidratos (macronutriente) se absorben en el yeyuno y pasan a la sangre del sistema porta en forma de monosacáridos, principalmente hexosas (galactosa, glucosa, fructosa, manosa, en orden de preferencia para el transporte) y pentosas (xilosa y arabinosa). La absorción de la mayoría de los monosacáridos se produce por dos mecanismos. Transporte activo en contra de un gradiente de concentración y difusión simple. La glucosa es transportada activamente a través de la membrana plasmática al interior de los enterocitos acoplada a la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ o por un sistema independiente de Na^+ . Como aumenta mucho su concentración intracelular, pasa a través de la membrana basolateral de la célula epitelial por difusión facilitada al líquido extracelular y de allí a los capilares cercanos (Mayes, 1992).

El ion calcio (Ca^{++}) regula importantes procesos fisiológicos (formación de huesos y dientes) y bioquímicos (excitabilidad muscular, coagulación sanguínea, procesos secretorios de proteínas y hormonas, integridad y transporte en la membrana plasmática, reacciones enzimáticas). Para asegurar estos procesos la concentración plasmática es mantenida dentro de límites muy estrechos por un sistema regulador formado por las hormonas paratiroidea y el calcitriol. Cuando los niveles de calcio son adecuados, hay escasa absorción en el tubo digestivo, del proveniente de los alimentos. Si los niveles bajan, se produce la hormona calcitriol o Vitamina D_3 , (regulada a su vez por la paratormona), que induce la formación de una proteína fijadora de calcio en el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales. El ion calcio atraviesa la membrana plasmática contra gradiente de concentración en el citoplasma celular, y pasa por la membrana basolateral de la célula por difusión facilitada. El calcitriol también induce la formación de una ATPasa dependiente de calcio en el borde en cepillo y una fosfatasa alcalina en el citoplasma de las células epiteliales (Guyton, 1992a).

El hierro se absorbe como Fe^{2+} en todas las porciones del intestino delgado por el siguiente mecanismo: el hígado secreta con la bilis, hacia el duodeno, cantidades moderadas de apotransferrina. Esta proteína se une al hierro libre y

también a la hemoglobina y mioglobina de la carne provenientes de la ingesta, que son las principales fuentes de este mineral. Esta combinación recibe el nombre de transferrina, que a su vez, se une a los receptores de la membrana de los enterocitos. A continuación mediante un proceso de endocitosis, la molécula de transferrina junto con el hierro, penetra en las células epiteliales y desde ellas pasa al torrente sanguíneo constituyendo la transferrina plasmática. La velocidad de absorción es muy baja y solo alcanza escasos mg diarios. Por ello, aunque los alimentos contengan enormes cantidades de hierro, se absorbe únicamente una pequeña proporción (Guyton, 1992b).

Existen distintas maneras de estudiar la disponibilidad de nutrientes. Hay estudios en humanos del balance de nutrientes (tienen en cuenta la ingesta y excreción de los mismos), pero son tediosos y susceptibles a grandes errores. Estudios en animales son costosos y tienen la limitación que no se sabe a ciencia cierta si los mecanismos de absorción en animales sean comparables con los de los humanos. En cambio, los estudios in vitro ofrecen una alternativa a los estudios en animales o humanos. Son relativamente simples, rápidos, permiten mejor control de los factores intervinientes, y proveen de información válida (Miller y col., 1981). Luccia y Kunkel (2002) concluyeron que los estudios in vitro son válidos en la investigación de la biodisponibilidad de nutrientes y demostraron la capacidad de unir calcio que tienen las fibras solubles e insolubles.

Se utilizan modelos experimentales que tratan de simular el tracto digestivo humano. El alimento se pone en contacto primero con HCl-pepsina, luego con pancreatina- NaHCO_3 y para estudios de disponibilidad de minerales se realiza además, una diálisis con una membrana semipermeable (Forbes y col., 1989). Un estudio que incluyó nueve laboratorios indicó que los ensayos con diálisis estaban en concordancia con estudios de absorción de hierro en humanos (Luten y col., 1996). Por lo tanto esto nos da idea de la validez de este tipo de estudios in vitro.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro en yogur adicionado con fibras de origen vegetal y animal por medio de una simulación in vitro del entorno gastroduodenal. Utilizar un alimento tenía como objetivo estudiar como afectaba la disponibilidad de glucosa (macronutriente),

calcio (macromineral) y hierro (micromineral) en un sistema más complejo y más cercano a la realidad del consumo humano.

4.2- Materiales y métodos

4.2.1- Simulación química del tracto digestivo

El modelo químico experimental tenía como fin reproducir en el laboratorio, las reacciones que tienen lugar en el estómago y duodeno del ser humano. En los experimentos para estudiar la disponibilidad de glucosa se utilizaron mezclas conteniendo 12,5 g de yogur, 0,3 g de cada fibra y 0,6 g de glucosa. Para calcular la cantidad de glucosa a utilizar se tuvieron en cuenta los carbohidratos disponibles de una dieta humana mixta (Jenkins, 1986) y una concentración de glucosa en el volumen final de digesto que proporcionara absorbancias medibles espectrofotométricamente.

Los ensayos para estudiar la disponibilidad de calcio (Ca) se realizaron sin adición de calcio exógeno debido que el yogur es una importante fuente de este mineral en la dieta humana (de la Fuente y col., 2003). Los experimentos para estudiar la disponibilidad de hierro (Fe^{2+}) fueron desarrollados con mezclas conteniendo 12,5 g de yogur, 0,3 g de cada fibra y 100 mg de sulfato de hierro II, de acuerdo a los requerimientos nutricionales sugeridos. La simulación digestiva fue llevada a cabo en los siguientes pasos:

a) Las mezclas correspondientes fueron homogeneizadas en 50 ml en HCl 0,1 M (Merck, USA) durante 60 minutos agitando a 30 r.p.m. y a 37°C con pH 1,0-2,0, para reproducir el ambiente gástrico.

b) Se procedió a aumentar el pH hasta 6,8-7,5 unidades, por adición de NaHCO_3 de 15 g/L (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.), e incrementar la velocidad de agitación simulando el pasaje del contenido estomacal al duodeno. La velocidad de la agitación fue aumentando desde 30 hasta 300 r.p.m. y la temperatura fue mantenida a 37°C para reproducir el ambiente duodenal.

c) Para estudiar la disponibilidad de glucosa y calcio, las simulaciones digestivas se dejaron descansar por 15 minutos. Durante este lapso de tiempo hubo separación en dos fases. Luego, se tomaron alícuotas de la fase superior del digesto para determinar la concentración de glucosa y calcio.

d) Para estudiar la disponibilidad de hierro las simulaciones se colocaron en un tubo de diálisis. Este era una membrana de celulosa de 43 mm de ancho y 27 mm de diámetro (D9527-100 FT). Los tubos de diálisis se sumergieron en 100 ml de agua destilada, manteniéndose a 37° C con agitación por fuera de la membrana. Esta membrana tenía el objetivo de simular la pared duodenal. A los 30 y 60 minutos se tomaron alícuotas de los mismos dializados y se determinó el contenido de hierro en cada uno de ellos.

e) Se realizaron ensayos con yogures sin fibra para medir el 100% de disponibilidad de glucosa, calcio y hierro.

4.2.2- Técnicas analíticas

4.2.2.1- Determinación de Glucosa

Para determinar concentración de glucosa fue usado un método enzimático. La glucosa reacciona con un reactivo formado por: glucosa oxidasa (GOD) 10 KU/L, peroxidasa (POD) 1 KU/L en presencia de 4-aminofenazona (4-AP) 0,5 mM y buffer fosfato 100 mM (pH 7,0) conteniendo hidroxibenzoato 12 mM (Wiener Lab Glicemia enzimatic AA Kit, Argentina).

Una cantidad del digesto (10 µL) fue mezclada con 1,0 ml de reactivo en tubo de ensayo. Los tubos fueron incubados por 5 minutos en un baño de agua (Haake, Alemania) a 37°C y el color desarrollado fue leído en espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys TM, Spectronic Instrument, USA) a 505 nm. El color de la reacción final era estable por 30 minutos. Se realizó una curva de calibración de glucosa que se muestra en la figura III.6.

Fig. III.6- Curva de calibración de glucosa

4.2.2.2- Determinación de Calcio

Para determinar la concentración de calcio se utilizó un método espectrofotométrico. El calcio reacciona con cresolftaleina complexona (Cpx) 3,7 mmol/L a pH 11. El buffer usado es una solución de aminometilpropanol (AMP) 0,2 mol/L en metanol 35% v/v. (Wiener Lab Ca-color Kit, Argentina).

El ensayo fue llevado a cabo directamente en tubos del espectrofotómetro: 50 μ L de Cpx fue mezclado con una varilla de plástico y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys TM, Spectronic Instrument, USA) a 570 nm (blanco interno). Luego fueron agregados 20 μ L de cada digesto, mezclados inmediatamente y leídos después de 10 minutos. Se realizó una curva de calibración de calcio que se muestra en la figura III.7.

4.2.2.3- Determinación de Hierro

Para la determinación de hierro se utilizó un método espectrofotométrico usando buffer de succinato (pH 3,7) en presencia de un reductor, el ácido mercaptoacético, y con una posterior reacción de color (complejo color magenta) con piridil bis-fenil trazina sulfonato (PBTS) que se lee a 560 nm (Wiener Lab Fe-color Kit, Argentina). Una alícuota de 500 μ L del dializado fue mezclada con 2 ml del reductor y se leyó su absorbancia. Luego se agregó una gota del reactivo

PBTS, se mezcló inmediatamente se dejó reposar 5 minutos para que desarrollara el color. Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys TM, Spectronic Instrument, USA) a 560 nm. El color de la reacción final era estable por 20 minutos. La curva de calibración de hierro realizada se muestra en la figura III.8.

Fig. III.7- Curva de calibración de calcio

Fig. III.8- Curva de calibración de hierro

Los contenidos de glucosa, calcio y hierro determinados de esta manera, representan la fracción biodisponible de estos nutrientes. No se utilizaron enzimas digestivas debido a su alto costo y a que se adicionaron glucosa y hierro exógenos a los yogures a estudiar, en la forma química en la cual son absorbidos, sin necesidad de obtenerlos por la digestión del alimento.

4.2.3- Análisis Estadístico

Los ensayos fueron realizados cinco veces para cada fibra usando yogur recién preparado. Fueron calculados promedios y desviaciones estándar para los contenidos de glucosa, calcio y hierro y se expresaron en cada caso como la media $\pm$ DS para n replicados. La influencia de las distintas fibras en el porcentaje de retención y disponibilidad fue analizada estadísticamente con el test ANAVA de un factor para encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$). Se utilizó el test de Tukey para comparación de medias.

4.3- Resultados y discusión

Se observaron diferentes comportamientos macroscópicos según el tipo de fibra utilizada durante las simulaciones para estudiar la disponibilidad de glucosa y calcio (Fig. III.9). De acuerdo a estudios anteriores (Rodríguez y col., 2005), el quitosano se disuelve en un medio ácido como el que se presenta en el estómago y emulsifica la materia grasa. Luego forma flóculos con el aumento del pH en el duodeno. Los flóculos formados atrapan el aceite (Rodríguez y col., 2005) y previenen su absorción a través de la pared intestinal. Luego, es excretado con las heces. Como se preveía, en nuestro caso los flóculos, atraparon también al yogur.

Las demás fibras utilizadas tuvieron comportamientos diferentes en la simulación como se puede apreciar en la figura III.8. El Psyllium formó una dispersión viscosa, porque se encontraba, en el volumen final de la simulación, a concentraciones por debajo de 10 g/Kg (Chan y Wypyszyk, 1988), separándose en una fase inferior viscosa. Bambú, inulina, manzana y trigo formaron junto con los restos de yogur, una fase más reducida y menos definida que las anteriores. Bambú y trigo son insolubles y manzana es parcialmente insoluble, ya que tiene un 75% de contenido de fibra insoluble. Si bien, inulina tiene un contenido de 90% de fibra soluble, según Silva (1996) su solubilidad varía en función de la temperatura del agua: a 10°C es de 6% aproximadamente, mientras que a 90°C es de 35%. El ensayo se realizó a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y como se pudo observar en la figura III.9 el yogur con inulina formaba una dispersión viscosa.

Fig. III.9- Comportamiento de las fibras en la simulación digestiva

Se produjo una reducción en la biodisponibilidad de la glucosa para algunas de las fibras empleadas, ya que, no se recuperó en la fase superior del digesto toda la glucosa que se había adicionado al sistema.

Estos resultados se pueden ver en la figura III.10. Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de reducción en la biodisponibilidad de la glucosa observados para las diferentes fibras usadas. En las condiciones gastrointestinales los flóculos formados por el quitosano atraparon glucosa, entonces, su reducción en la biodisponibilidad de la glucosa fue la más alta.

Fig. III.10- Reducción de disponibilidad de Glucosa

Psyllium aumentó la viscosidad del medio y su reducción de la biodisponibilidad de la glucosa fue de $15,3 \pm 1,8 \%$, trigo tuvo $9,5 \pm 2,1 \%$ de retención de glucosa e inulina $5,7 \pm 1,8 \%$. Por el contrario, manzana y bambú no redujeron la biodisponibilidad de glucosa en el sistema.

Se puede concluir que estos estudios in vitro apoyan el punto de vista que ciertos tipos de fibra reducen la absorción de glucosa. Este efecto de disminución de la absorción con las fibras podría alterar respuesta endocrina del intestino porque la fibra podría atrapar o acarrear nutrientes más allá del intestino delgado antes de su absorción, así como también, podría producir un achatamiento en la curva de glucosa sanguínea postprandial.

Los resultados de los estudios en la disponibilidad del calcio son mostrados en la figura III.11. El análisis estadístico confirmó que hubo diferencias significativas ($p<0,05$) en el comportamiento de las diferentes fibras que estuvo dado principalmente por la gran reducción en la biodisponibilidad de calcio en presencia de quitosano que forma flóculos como ya lo hemos descripto. Sin embargo, según el test de Tukey no hubo diferencias significativas ($p<0,05$) en la reducción del calcio entre las fibras insolubles (trigo y bambú) y las fibras parcial o totalmente solubles (inulina y *Psyllium plantago*).

Figura III.11- Reducción de la disponibilidad de Calcio

En el estudio de la biodisponibilidad de hierro, los digestos antes de la diálisis que se observan en la figura III.12 se comportaron de igual manera que en el estudio de glucosa y calcio. Solamente se observó que los yogures con fibra de manzana presentaron una coloración marrón más oscura que en el ensayo anterior. Esto pudo deberse a la presencia del sulfato ferroso. Los dializados de algunas de las simulaciones se muestran en la figura III.13 donde son notorios los flóculos formados por el quitosano.

Hubo diferencias significativas en los porcentajes de retención para yogures con y sin fibra a los 30 y 60 minutos de la misma simulación.

En la figura III.14 se pueden apreciar los porcentajes de retención de hierro para los distintos yogures con y sin fibras a los 30 y 60 minutos de cada simulación.

Figura III.12- Digestos con Hierro de la simulación antes de la diálisis. (1) Inulina, (2) Bambú, (3) *Psyllium plantago*, (4) Quitosano, (5) Trigo, (6) Manzana

Figura III.13- Etapa de diálisis de la simulación. (1) *Psyllium plantago*, (2) Trigo, (3) Quitosano, (4) Yogur sin fibra

Figura III.14- % de retención de hierro para los distintos yogures con fibras a los 30 y 60 minutos de la simulación

Si analizamos por fibra, vemos que los yogures con bambú o con trigo, ambas fibras insolubles, se comportaron aumentando la retención de hierro a los 60 minutos, si bien hubo diferencias significativas entre ellos en el contenido de

hierro y en los porcentajes. Tal vez, este sea un comportamiento que solo ocurra in vitro ya que luego de atravesar la mucosa intestinal el hierro es captado por los transportadores correspondientes, y no puede volver al lumen intestinal.

La inulina que es un oligosacárido con un GP de 10, retuvo un gran porcentaje del hierro a los 30 minutos. Sin embargo a los 60 minutos se liberó totalmente el hierro. Este retardo en la liberación del hierro puede favorecer su absorción por los enterocitos a medida que el alimento digerido avanza por el intestino delgado. Los yogures con fibra de manzana prácticamente no tuvieron retención ni a los 30 ni a los 60 minutos (75% insoluble y un 25% soluble).

Si bien hubo diferencias significativas en los contenidos y porcentajes de retención entre los yogures con *Psyllium* y quitosano, su comportamiento con respecto al tiempo fue similar: no hubo diferencias significativas en la retención de hierro entre 30 y 60 minutos. Sin embargo, si variaron los contenidos de hierro entre los 30 y 60 minutos, como ocurrió con las demás fibras.

4.4- Conclusiones

Con los resultados de estos estudios se pudo concluir que yogures fortificados con diferentes tipos de fibras como trigo, bambú, manzana, *Psyllium*, *plantago*, inulina (de origen vegetal) y quitosano (de origen animal) disminuyeron la biodisponibilidad de calcio por diferentes mecanismos relacionados con sus composiciones químicas. Las fibras de manzana y bambú fueron las únicas que no retuvieron glucosa. En el caso del quitosano, estos efectos fueron más marcados debido a la capacidad de formar flóculos que posee a pH alcalino como se presenta en el medio duodenal.

El comportamiento frente al hierro fue diferente ya que, inulina y manzana no retuvieron hierro a los 60 minutos de la simulación. Sin embargo, inulina si lo retuvo a los 30 minutos. Las demás fibras presentaron distintos porcentajes de retención. Con respecto al tiempo, las fibras de bambú y trigo mostraron el mismo perfil. Lo mismo ocurrió con las fibras de *Psyllium* y quitosano.

Entonces, este estudio demuestra que la adición fibra dietaria al yogur influencia la disponibilidad de nutrientes.

Capítulo 5- Conclusiones

Durante el almacenamiento refrigerado a 4°C, los ácidos fórmico, úrico y orótico disminuyeron, y los ácidos láctico y propiónico aumentaron significativamente, en yogures con y sin fibras. Esto concuerda con el crecimiento de las bacterias lácticas.

La adición de las fibras estudiadas causó diferencias significativas en el contenido de los ácidos orgánicos. Inulina y fibra de manzana aumentan los ácidos láctico y úrico, pero disminuyen el orótico con respecto al yogur sin fibra. El ácido pirúvico en el yogur con inulina aumentó, sin embargo en el yogur con fibra de manzana no varió significativamente durante el almacenamiento. Las fibras de bambú y trigo se comportaron aumentando el contenido de los ácidos láctico y úrico pero disminuyeron los ácidos orótico y pirúvico con respecto al yogur sin fibra. Esta igual manera de actuar puede ser debida a que ambas fibras tiene el mismo contenido de hemicelulosa pero difieren en que trigo tiene el mayor contenido de celulosa que se puso de manifiesto en el contenido de ácido propiónico. La celulosa es menos accesible a las enzimas bacterianas y sería escasamente fermentada.

Todas las fibras causan una aceleración en la acidificación, más marcada en el caso de inulina. Esto podría ser debido al efecto prebiótico de las fibras. Este comportamiento se mantiene hasta los 7 días de almacenamiento y puede relacionarse con el aumento significativo del ácido láctico para todos los yogures. A los 14 y 21 días no hay diferencias significativas en el pH entre yogures con y sin fibra.

Al estudiar la biodisponibilidad de glucosa, calcio y hierro, en yogures adicionados con fibras de origen vegetal y animal, por medio de una simulación in vitro del tracto digestivo humano, se pudo observar que la adición de fibra influenciaba la disponibilidad de nutrientes

Los yogures fortificados con diferentes tipos de fibras como trigo, bambú, manzana, *Psyllium plantago*, inulina (de origen vegetal) y quitosano (de origen animal) disminuyeron la disponibilidad de calcio por diferentes mecanismos relacionados con sus composiciones químicas. Las fibras de manzana y bambú

fueron las únicas que no retuvieron glucosa. En el caso del quitosano, estos efectos fueron más marcados debido a la capacidad de formar flóculos que posee a pH alcalino como se presenta en el medio duodenal.

El comportamiento frente al hierro fue diferente ya que, inulina y manzana no retuvieron hierro a los 60 minutos de la simulación. Sin embargo, inulina si lo retuvo a los 30 minutos. Las demás fibras presentaron distintos porcentajes de retención. Con respecto al tiempo, las fibras de bambú y trigo mostraron el mismo perfil. Lo mismo ocurrió con las fibras de Psyllium y quitosano.

Parte IV- Conclusiones finales

Conclusiones finales

Debido a la diferencia fundamental entre los dos tipos de alimentos a los cuales se adicionaron fibras, que radica en que uno es generado por actividad microbiana y el otro no, es necesario el análisis final por separado.

Postres lácteos

Los postres base regulares como los de menor valor energético fueron geles débiles mixtos. La estructura tridimensional estaba dada por la red que forman los polímeros κ y ι - carragenina que está rellena principalmente por almidón y por las proteínas y materia grasa de la leche.

Los postres base de menor valor energético mostraron menores fuerzas de fractura y firmeza que los postres base regulares. Este efecto se atribuyó al cambio de sacarosa por sucralosa y a la ausencia de sacarosa.

La adición de las fibras a los postres de menor valor energético proporcionó un excelente efecto de relleno ya que alcanzaron a los valores de esfuerzos de fractura y firmeza de los postres sin fibra regulares. En el caso de los postres con Psyllium o manzana los valores de esfuerzos de fractura y firmeza fueron superados respectivamente.

En cambio, en los postres regulares, si bien este efecto de relleno existía, fue detectado mejor por los ensayos a bajas deformaciones que en los de altas deformaciones. Por otro lado, en presencia de sacarosa, el efecto de las fibras no fue tan marcado.

Los postres con quitosano fueron descartados debido a las variaciones en las propiedades de fractura y los bajos puntajes obtenidos en el ensayo sensorial.

El Psyllium que posee el mayor contenido de hemicelulosa de las fibras utilizadas y como consecuencia forma gel a bajas concentraciones, causó modificaciones en ambos tipos de postres (regular y reducido en calorías). Provocó aumento de la fuerza y deformación de fractura, pero disminución en el módulo E y en el exudado de los postres reducidos en calorías.

La fibra de manzana que tiene el mayor contenido de lignina de las fibras utilizadas, también provocó modificaciones en ambos tipos de formulaciones (regular y reducido en calorías). Aumentó la firmeza de la red del gel, G' , G'' y la η^* , estos tres últimos en los postres regulares. Solo aumentó la fuerza de fractura en los postres regulares con menor contenido de almidón y carragenina. Tuvo muy buen comportamiento en relación a la sinéresis del almidón ya que disminuyó significativamente la producción de exudado en ambas formulaciones regular y de valor energético reducido. Esto último puede estar debido a que en su estructura química muy ramificada posee numerosos sitios en los cuales establecer puentes de hidrógeno con el agua. La fibra de manzana provocó un cambio de color, pero con una adecuada adición de colorantes y saborizantes podría tener buena aceptación.

La fibra de trigo que posee el mayor contenido de celulosa de las fibras analizadas, si bien causó modificaciones, estas no fueron tan marcadas como las provocadas por Psyllium o manzana. Tuvo los menores valores de G'' y η^* con respecto a las demás fibras, a los siete días de almacenamiento.

No hubo diferencias significativas en la vida útil de los postres con y sin fibras.

Los postres con las fórmulas de mayor contenido de almidón y carragenina y las fibras de bambú o inulina fueron las que menos alteraron tanto el comportamiento sensorial, la textura instrumental a grandes deformaciones, disminuyeron el porcentaje de exudado, y obtuvieron muy buenos puntajes de aceptabilidad.

Yogures con fibra

Durante el almacenamiento refrigerado a 4°C, los contenidos de los ácidos fórmico, úrico y orótico disminuyeron en los yogures con y sin fibras. En cambio, los ácidos láctico y propiónico aumentaron significativamente. Esto concuerda con el crecimiento de las bacterias lácticas.

La adición de las fibras estudiadas causó diferencias significativas en el contenido de los ácidos orgánicos. Inulina y fibra de manzana aumentaron los

ácidos láctico y úrico, pero disminuyen el orótico con respecto al yogur sin fibra. El ácido pirúvico en el yogur con inulina aumentó, sin embargo en el yogur con fibra de manzana no varió significativamente durante el almacenamiento. Las fibras de bambú y trigo se comportaron aumentando el contenido de los ácidos láctico y úrico pero disminuyeron los ácidos orótico y pirúvico con respecto al yogur sin fibra. Esta igual manera de actuar puede ser debida a que ambas fibras tiene el mismo contenido de hemicelulosa pero difieren en que trigo tiene el mayor contenido de celulosa que se puso de manifiesto en la presencia de ácido propiónico. La celulosa es menos accesible a las enzimas bacterianas, como consecuencia es escasamente fermentada.

Todas las fibras causan una aceleración en la acidificación, más marcada en el caso de inulina. Esto podría ser debido al efecto prebiótico de las fibras. Este comportamiento se mantiene hasta los 7 días de almacenamiento y puede relacionarse con el aumento significativo del ácido láctico para todos los yogures. A los 14 y 21 días no hay diferencias significativas en el pH entre yogures con y sin fibra.

Al estudiar la biodisponibilidad de glucosa, calcio y hierro, en yogures adicionados con fibras de origen vegetal y animal, por medio de una simulación in vitro del tracto digestivo humano, se pudo observar que la adición de fibra influenciaba la disponibilidad de nutrientes

Los yogures fortificados con las distintas fibras como trigo, bambú, manzana, *Psyllium plantago*, inulina y quitosano disminuyeron la disponibilidad de calcio. Las fibras de manzana y bambú fueron las únicas que no retuvieron glucosa. Inulina y manzana no retuvieron hierro a los 60 minutos de la simulación. Sin embargo, inulina si lo retuvo a los 30 minutos. Las demás fibras presentaron distintos porcentajes de retención de hierro. Con respecto al tiempo, las fibras de bambú y trigo mostraron el mismo perfil. Lo mismo ocurrió con las fibras de *Psyllium* y quitosano.

En consecuencia, si bien hay que estudiar en cada tipo de alimento que efectos provoca la adición de fibras de distinto origen y composición se puede llegar a las siguientes conclusiones generales con respecto a las mismas:

■ No se recomienda la adición de quitosano como fibra dietaria debido a que en los postres causó variaciones en las propiedades de fractura y bajos puntajes en el ensayo sensorial. En los yogures impidió la formación del coágulo y causó una marcada disminución en la biodisponibilidad de nutrientes. Tal vez, disminuyendo su tamaño de partícula y realizando tratamientos de desodorización pueda ser utilizado en el futuro próximo, sobre todo para aquellas personas que realizan regímenes alimentarios muy estrictos para disminuir el peso corporal o sobrellevar enfermedades crónicas como problemas circulatorios, cardíacos y diabetes.

■ No se recomienda el empleo de Psyllium en el yogur, ya que impidió la formación del gel láctico por la combinación de su tamaño de partícula y porque gelifica a bajas concentraciones. Sin embargo, disminuyendo su tamaño de partícula podría ser utilizado en los postres lácteos, ya que causó un aumento de la fuerza del gel que los consumidores valoran. Los postres con menor contenido de almidón y carragenina obtuvieron buenos puntajes en el ensayo sensorial.

■ Si bien, la fibra de manzana posee coloración marrón que causó disminución en la aceptabilidad sensorial podría ser usada en formulaciones más complejas de postres y yogures con la adición por ejemplo, de saborizantes y colorantes, ya que provocó cambios aceptables en ellos. En los postres, aumentó la firmeza de la red del gel y disminuyó significativamente la producción de exudado en ambas formulaciones regular y de valor energético reducido. En los yogures, aumentó el ácido láctico característico de los mismos y no disminuyó la biodisponibilidad de hierro. Esto último es muy importante, ya que, la anemia por deficiencia de hierro tiene una alta prevalencia en nuestra sociedad.

■ La fibra de trigo si bien, causó modificaciones en los parámetros estudiados en los postres, no disminuyó su aceptabilidad. En los yogures fue la fibra que menos aumentó los contenidos de los ácidos estudiados. Además, merizó la biodisponibilidad de los nutrientes estudiados.

■ Es altamente favorable el agregado de fibra dietética de inulina, trigo y bambú a postres lácteos, ya que si bien las mismas producen algunas variaciones sobre el comportamiento reológico, no ocasionan el rechazo de los consumidores,

quienes no detectan estos cambios en el producto logrado. Lo mismo ocurre para los yogures ya que su presencia, aumentó los contenidos de ácidos láctico y propiónico. El primero se lo puede asociar con el desarrollo de los fermentos del yogur que hoy son considerados como microorganismos prebióticos beneficiosos para la salud. Asimismo, el ácido propiónico posee efectos saludables por sí solo.

Bibliografía

- AACC Dietary Fiber Technical Committee (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46, 112-114.
- Aguilera, J.M. y Stanley, D.W. (1999). Food structuring. En: *Microstructural principles of food processing and engineering*, 2nd ed. (pág. 228-249). Maryland: Aspen Publishers.
- Alkalin, A.S.; Fenderya, S. y Akbulut, N. (2004). Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 613-621.
- Álvarez-Olmos, M.I. y Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditionally therapy. *Clinical infectology disease*, 32, 1567-1576.
- Amores, R., Calvo, A., Maestre, J.R. y Martínez-Hernández, D. (2004). Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, 17 (2), 131-139.
- Andrés, S.C. (2001). Estabilidad de manzanas refrigeradas en jugos de bajo pH. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.
- Anderson, E. y Fireman, M. (1953). The mucilage from psyllium seed, *Plantago psyllium*. *Journal Biological Chemistry*, 109, 437-445.
- Anderson, J. W., Zettwoch, N., Felman, T., Tietzen-Clark, J., Oeltgen, P. y Bishop, C.W. (1988). Cholesterol lowering effects of psyllium hydrophilic mucilloid for hypercholesterolemic men. *Archives of Internal Medicine*, 148, 292-297.
- Augustin, M.A., Puvanenthiran, A., McKinnon I.R. (1999). The effect of κ -carrageenan conformation on its interaction with casein micelles. *International Dairy Journal*, (9), 413-414.
- Bayarri, S., Durán, L., y Costell, E. (2003). Compression resistance, sweetener's diffusion and sweetness of hydrocolloids gels. *International Dairy Journal*, (13), 643-653.
- Bayarri, S., Durán, L., Izquierdo, L. y Costell, E. (2005). Effect of substitution of aspartame for sucrose on instrumental texture profile of hydrocolloids gelled systems. *European Food Research Technology*, 220, 25-30.

- Bell, L.P.; Hectorne, K.; Reynolds, H.; Balm, T.K.; Hunninghake, D.B. (1989). Cholesterol-lowering of psyllium hydrophilic mucilloid. *The Journal of the American Medical Association*, 261, 3419-3431.
- Bertolini, A.C., Creamer, L.K., Eppink, M. y Boland, M. (2005). Some Rheological Properties of Sodium Caseinate-Starch Gels. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 2248-2254.
- Bevilaqua, A.E., Califano, A.N. (1989). Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 56(4), 1076-1079.
- Bianchi Salvadori, B. (1986). Intestinal microflora: The role of yogurt in the equilibrium of the gut ecosystem. *International Journal of Immunotherapy*, Suppl. II, 9-18.
- Bianchi Salvadori, B. Casamaschella, P. y Cislighi, S. (1994). Las bacterias lácticas en el yoghurt y en la nutrición (pág. 288-302). En: Ciencia y tecnología de los productos lácteos. Diagrama, SA, Santa Fe, Argentina.
- Biström, M. y Nordström, K. (2002). Identification of key success factors of functional dairy foods product development. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 372-379.
- Bogdanov, I.G., y col. (1978). Antitumor action of glycopeptide from the wall of *L. Bulgaricus*. *Bulletin experimental biology medical*, 84, 1750-1753.
- Boscher, D., Van Caillie-Bertrand, M. y Deelstra, H. (2001). Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber on the availability of Calcium, Iron, and Zinc from infants formulas. *Nutrition*, 17, 614-618.
- Boscher, D., Van Caillie-Bertrand, M., Van Cauwenbergh, R. y Deelstra H. (2003). Availabilities of Calcium, Iron, and Zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition*, 19, 641-645.
- Botham, R.L.; Ryden, P., Robertson, J.A. y Ring, S.G. (1998). Structural features of polysaccharides and their influence on fermentation behavior (pág. 46-49). En: Functional properties, Editor: Guillon F. Nantes, Francia: INRA.
- Bouzas, J., Kantt, C.A., Bodyfelt, F., Torres, J.A. (1991). Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 56, 276-278.

- Breuil, P. y Meullenet, J.F. (2001). A comparison of three instrumental tests for predicting sensory texture profiles of cheese. *Journal of Texture Studies*, 32(1), 41-55.
- Burns, D.J.W. y Noble, A.C. (1985). Evaluation of the separate contributions of viscosity and sweetness of sucrose to perceived viscosity, sweetness and bitterness of vermouth. *Journal of Texture Studies*, 16, 365-381.
- Burkitt, D.P.; Walker, A.R.P.; Painter, N.S. (1974). Dietary fiber and disease. *The Journal of the American Medical Association*, 229, 1068-1074.
- Burkitt, D. P. y Trowell, H. (1975). Refined Carbohydrated Foods and Disease. New York, Academic Press .
- Califano, A.N.; Bevilacqua, A.E. (2000). Multivariate analysis of the organic acid content of Gouda type cheese during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 11-22.
- Cameron-Smith, D., Habito, R., Barnett, M., Collier, G.R. (1997). Dietary Guar Gum Improves Insulin Sensivity in Streptozotocin-induced Diabetic rats. *Journal of Nutrition*, 127 (2), 359-364.
- Carreau, P.J., de Kee, D.C.R.; Chhabra, R.P. (1997). Rheology of polymeric systems: principles and applications. Cincinnati, USA, Hanser Gardner Publications Inc.
- Cerda, J.J., Robbins, F.L., Burguin, C.W., Baungartner, T.G. y Rice, R.W. (1988). The Effects of grapefruit pectin on patients at risk for Coronary Heart Diseases without altering diet or lifestyle. *Clinical Cardiology*, 11, 589-594.
- Chai, E., Oakenfull, D.G., McBride, R.L. y Lane, A.G. (1991). Sensory perception and rheology of flavored gels. *Food Australia*, 43(6), 256-258, 261.
- Chan, J. K. C. & Wypyszyk, V. (1988). A forgotten natural dietary fiber: Psyllium Mucilloid. *Cereals Foods World*, 33 (11), 919-922.
- Chandalia, M., Garg, A., Lutjohann, D., Von Bergmann, K., Grundy, S.M. y Brinkley, L.J. (2000). Beneficial Effects of High Dietary Fiber Intake in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 342, 1392-1398.
- Cho, S.; DeVries, J. W. y Prosky, L. (1997). Dietary fiber analysis and applications. Maryland, USA, Editorial AOAC International.

- Claye, S.S., Idouraine, A. y Weber, C.W. (1998). In vitro mineral binding capacity of five fiber sources and their insoluble components for magnesium and calcium. *Food Chemistry*, 61, 333-338.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. y Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*, 70(1), 1-12.
- Costa , M.A.; Mehta, T. y Males, J.R. (1989). Effects of cellulose, psyllium husk and cholesterol level on fecal and microbial metabolism in monkeys. *Journal Nutrition*, 119, 986-995.
- Czuchajowska, Z.; Paszczynska, B. y Pomeranz, Y. (1992). Functional properties of psyllium in wheat-based products. *Cereal Chemistry*, 69, 516-520.
- Decker, K. J. (2001). The dominant culture: yogurt for the masses, Food Products Design, on line magazine, disponible en w.w.w. Weeks Publishing Co.
- de la Fuente, M.A.; Montes, F.; Guerrero, G. y Juárez, M. (2003). Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yogurts. *Food Chemistry*, 80, 573-578.
- Dello Staffolo, M., Bertola, N., Martino, M. y Bevilacqua, A. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 263-268.
- de Oliveira Hauly, M.C. y Moscatto, J.A. (2002). Inulin and oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológica, Londrina*, 23 (1) 10, 105-118.
- Depypere, F.; Verbeken, D.; Thas, O. y Dewettinck, K. (2003). Mixture design approach on the dynamic rheological and uniaxial compressio behaviour of milk desserts. *Food Hydrocolloids*, 17, 311-320.
- De Stefani, E, Correa, P., Ronco, A., Mendilaharsu, M., Guidobono, M., Deneo-Peigrini, H. (1997). Dietary Fiber and Risk of Breast Cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, 28 (1), 14-19.
- Dirección. de Ind. Alimentaria, SAGPyA, 2003 - Estadísticas de Productos Lácteos, en www.sagpya.
- Dobraszczyk, B.J. y Vincent, J.F.V. (1999). Capítulo 5: Measurement of Mechanical properties of food materials in relation to texture: the materials

- approach (pág. 99-151). En: Food texture measurements and perception. Maryland, USA, Aspen Publishers Inc.
- Duncan, S.E., Yaun, B.R. y Sumner, J. (2004). Capítulo 9: Microbiological methods for dairy products (pág. 249-268). En: Standard methods for examination of dairy products (17th edition). New York, USA, American Public Health Association.
- Dwyer, J. T. (1995). Dietary Fiber for Children: How much?. *Pediatrics*, 96, 1019-1022.
- Eddy, B.P. (1960). The use and meaning of the term "psychrophilic". *Journal of applied bacteriology*, 23, 189-190.
- Englyst, H.N. y Cummings, J.H. (1990). Nonstarch polysaccharides (dietary fiber) and resistant starch. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 270-225.
- Englyst, H.N.; Kingman, S.M.; Cummings, J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46(Suplemento 2), S33-S50.
- Englyst, H.N.; Quigley, M.E. y Hudson, G.J. (1995). Definition and measurement of dietary fiber. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49 (Supl. 3), S48-S62.
- Fennema, Owen R. (2000). Capítulo 4: Carbohydrates (James N. BeMiller y Ray L. Whistler). En: Food Chemistry, Third Edition. New York, Marcel Dekker. Inc.
- Fernandez-Garcia, E. y McGregor, J.U. (1994). Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77, 2934-2939.
- Fernández-García, E. y McGregor, J.U. (1997). Fortification of sweetened plain yogurt with insoluble dietary fiber. *Zeitschrift fuer Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung A.*, 204, 433-437.
- Fernández-García, E., McGregor, J.U., Traylor, S. (1998). The addition of oat fiber and natural alternative sweeteners in the manufacture of plain yogurt. *Journal of Dairy Science*, 81, 655-663.
- Ferry, J.D. (1980). Viscoelastic properties of polymers. New York, John Wiley and Sons.

- Fisher, M.H.; Nanxiong, Y.; Gray, G.R.; Ralph, J.; Anderson, L. y Marlett, J.A. (2004). The gel-forming polysaccharide of psyllium husk (*Plantago ovata* Forsk.). *Carbohydrate Research*, 339, 2009-2017.
- Fizman, S.M. y Duran, L. (1992). Effect of fruit pulp and sucrose on the compression response of different polysaccharides gel systems. *Carbohydrate Polymers*, 17, 11-17.
- Fizman, S. M. y Duran, L. (1989). Mechanical properties of kappa carrageenan-locust bean gum mixed gels with added sucrose. *Food Hydrocolloids*, 3(3), 209-216.
- Fizman, S.M., Lluch, M.A., Salvador, A. (1999). Effect of addition of gelatin on microstructure of acidic milk gels and yoghurt and on their rheological properties. *Int. Dairy J.*, 9, 895-901.
- Fizman, S., Salvador, A. (1999). Effect of gelatine on the texture of yogurt and of acid-heat-induced milk gels. *Zeitschrift fuer Lebensmittel- Untersuchung und-Forschung A.*, 208, 100-105.
- Foegeding E.A., Brown, J., Drake, M.A. y Daubert, C.R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, 585-591.
- Forbes, A.; Adams, C.; Arnaud, M.; Chichester, C.; Cook, J.; Harrinson, B.; Hurrell, R.; Khan, S.; Morris, E.; Tanner, J. y Whittaker, P., (1989). Comparison of in vitro, animal and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task force report on iron bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49, 225-238.
- Foss, J.W. (2002). How processing affects selections for yogurt, National Starch and Chemical Company. Bridgewater, New Jersey
- Fu, B. y Labuza, T.P. (1993). Shelf Life Prediction, Theory and Application. *Food Control*, 4 (3), 125-131.
- Garvie, E.I.; Cole, C.B.; Fuller, R. y Hewitt, D. (1984). The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat. *Journal Applied of Bacteriology*, 56, 237-245.

- Gatenby, S.J., Ellis, P.R., Morgan, L.M. y Judd, P.A. (1996). Effect of Partially Depolymerized Guar Gum on Acute Metabolic Variables in Patients with non-insulin-dependent Diabetes. *Diabetic Medicine*, 13 (4), 358-364.
- Giannuzzi, L. (1998). Shelf life of fresh filled pasta. Hazard analysis and critical control points of the manufacturing process and household practices. *Journal of Food Processing and Preservation*, 29, 449-461.
- Giboreau, A.; Cuvelier, G.; Launat, B. (1994). Rheological behaviour of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. *Journal of Textures Studies*, 25, 119-137.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.R. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal Nutrition*, 125(b), 1401-1412.
- Glore, S. R., Van Treeck, D., Knehans, A. W. y Guild, M. (1994) Soluble Fiber and Serum Lipids: a literature review. *Journal of the American Dietetic Association*, 94, 425-436.
- Goldin, B.R. y Gorbach, S.L. (1980). Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplements on 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride-induced intestinal cancer in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 64, 263-265.
- Gow, J.A. y Mills, F.H.J. (1984). Pragmatic criteria to distinguish psychrophiles and psychrotroph in ecological systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 213-215.
- Green, C.J. (2000). Fiber in enteral Nutrition. *South African Journal of Clinical Nutrition*, 13, 150-160.
- Green, C.J.; Van Hoeij, K.A. y Brindels, J.G. (1998). Short chain fatty acids (SCFA) and gas production of individuals fiber sources and a mix typical to a normal diet using an in vitro technique. *Journal of Pediatrics Gastroenterology Nutrition*, 26, 591-597.
- Greppi, G.F. (1992). Dietary effects of probiotics and different protein source on lipid metabolism in rabbits. *Cunicology Science*, 7, 51-58.
- Gueimonde, M.; Alonso, L.; Delgado, T.; Bada-Gancedo, J.C. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2003). Quality of plain yoghurt made from refrigerated and CO₂-treated milk. *Food research international*, 36, 43-48.

- Guyton, A.C. (1992a). Capítulo 79: Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En: Tratado de fisiología médica. México, Editorial Interamericana-McGraw-Hill.
- Guyton, A. C. (1992b). Capítulo 32: Eritrocitos, anemia y policitemia, 370-378. En: Tratado de fisiología médica. México, Editorial Interamericana-McGraw-Hill.
- Hague, A.; Manning, A.M.; Hanlon, K.A.; Hutschtscha, L.I.; Hart, D. y Paraskeva, C. (1993). Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in 53-independent pathway: implications for posible role of of dietary fiber in the prevention of large bowel cancer. *International Journal of Cancer*, 55, 498-505.
- Harden, K.K., Robinson, J.L. (1984). Hypocholesterolemia induced by orotic acid: dietary effects and species specificity. *The Journal of Nutrition*, 114, 411-421.
- Hare, L.B. (1974). Mixture designs applied to food formulations. *Food technology*, 29(3), 50-62.
- Helmke, E. y Weyland, H. (2004). Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria – occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cellular and Molecular Biology*, 50(5), 553-561.
- Hemar, Y., Hall, C.E., Munro, P.A. y Singh, H. (2002). Small and large deformation rheology and microstructure of carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal*, 12, 371-381.
- Hill, J.V. (1988). The effect of intestinal microflora upon preneoplastic events in the colon (MS thesis). Universidad de Toronto, Toronto, Ontario, Canada.
- Hipsley, E.H. (1953). Dietary “fiber” and pregnancy toxemia. *British Medical Journal*, 2, 420-422.
- IFT, (1989). Expert panel on food safety and nutrition. Low calorie foods. *Food Technology*, 43(4), 113-125.
- Industria Láctea (2005). En: Cuadernos de Actualización Técnica: Agroalimentos Argentinos II. Bs. As., Argentina, AACREA (Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola), pág. 97-110.
- Institute of Medicine of the National Academies (2002). Chapter 7: Dietary, functional and total fiber. En: Dietary reference intakes for energy,

- carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids (macronutrients) (pág. 1-57). Washington, DC, The National Academies Press.
- Iop, S.C.F.; Silva, R.S.F. y Beleia, A.P. (1999). Formulation and evaluation of dry dessert mix containing sweetener combinations using mixture response methodology. *Food Chemistry*, 66, 167-171.
- Jenkins, D.; Wolever, T.; Leeds, A.R.; Gasull, M.A.; Haisman, P.; Dilawari, J.; Goff, D.V.; Meta, G.L. y Albert, K. (1978). Dietary fibers, fibers analogues and glucose tolerance importance of viscosity. *British Medical Journal*, 1, 1392-1394.
- Jenkins, D.; Jenkins, M.; Wolever, T.; Taylor, R. y Ghafari, H. (1986). Slow release carbohydrate: Mechanism of action of viscous fibers. *Journal of Clinical Nutrition and Gastroenterology*, 1, 237-241.
- Jenkins, D.; Jenkins, A.L.; Wolever, T.; Vuksan, V.; Rao, A.V.; Thompson, L.U. y Josse, R.G. (1995). Dietary fiber, carbohydrate metabolism and diabetes (137-145). En: *Dietary fiber in Health and disease*. New York, Editorial Plenum Press.
- Jenkins D.; Kendall, C.; Axelsen, M.; Augustin, L. y Vuksan, V. (2000). Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology*, 11, 49-56.
- Jones, J. (2000). Dietary advice in North America: the good, the bad and the unheeded (pág. 30). Editores: Mc Cleary B. V. y Prosky L.,. *Proceedings of the 1st International Conference on Dietary Fiber*; Dublin Ireland; May. Oxford, U.K., Blackwell Science.
- Kokini, J.L.; Wang, C-F.; Huang, H. y Shrimanker, S. (1995). Constitutive models of foods. *Journal of Texture Studies*, 26, 421-455.
- Koo, M. y Rao, A.V. (1991). Long-term effect of Bifidobacteria and neosugar on precursor lesions of colonic cancer CF, mice. *Nutrition Cancer*, 16, 249-257.
- Kreitzman, S.N. (1985). Low calorie formulated foods for weight reduction and maintenance. *Cereals Food World*, 30, 845-847.

- Kritshesky, D. (2000). Dietary fiber in health and disease. En: Proceedings of the 1st International Conference on Dietary Fiber (pág. 38). Editores: McCleary, B.V., Prosky, L. Dublin, Irlanda, Blackwell Science.
- Krüger A.; Ferrero, C.; Zaritzky, N.E. (2003). Modelling corn starch swelling in batch systems: effect of sucrose and hydrocolloids. *Journal of Food Engineering*, 58, 125-133.
- Kurihara, Y. y Nirasawa, S. (1994). Sweet, antisweet and sweetness inducing substances. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 37-42.
- Labell, F. (1990). Designer food in cancer prevention. *Food Process*, 51, 23-32.
- Lai, V.M.-F.; Huang A.-L. y Lii, C.-Y. (1999). Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. *Foods Hydrocolloids*, 13, 409-418.
- Laidlaw, R.A. y Percival, E.G. (1949). Studies on seeds mucilages. Part III. Examination of polysaccharide extracted from the seeds of *Plantago ovata* Forsk. *Journal of the Chemical Society*, 1600-1610.
- Laidlaw, R.A. y Percival, E.G. (1950). Studies on seeds mucilages. Part III. Examination of polysaccharide extracted from the seeds of *Plantago ovata* Forsk by hot water. *Journal of the Chemistry Society*, 528-539.
- Launay, B. y Pasquet, E. (1982). Sucrose solutions with and without guar gum: rheological properties and relative sweetness intensity. *Progress in Food and Nutrition Science*, 6, 247-258.
- Lawless, H. T. y Heyman, H. (1998). Capítulo 11: Texture evaluation. En: Sensory evaluation of food. New York, Chapman & Hall.
- Leach, J.D. (2007). Evolutionary perspective on dietary intake of fibre and colorectal cancer. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, 140-142.
- Lethuaut L.; Brossard C.; Rousseau F.; Bousseau, B. y Genot, C. (2003). Sweetness-texture interactions in model dairy desserts: effect of sucrose concentration and the carrageenan type. *International Dairy Journal*, 13, 631-641.
- Livesey, G. (1990). Energy values of unavailable carbohydrate and diets: an inquiry and analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 617-637.

- Lombardi, A.M.; Bevilacqua, A. E. y Califano, A.N. (1994). Variation in organic acid content during ripening of Reggianito cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*, 51, 221-226.
- Luccia, B.H.D. y Kunkel, M.E. (2002). In vitro availability of calcium from sources of cellulose, methylcellulose, and psyllium. *Food Chemistry*, 77, 139-146.
- Ludwing, D.S. (1999). Dietary Fiber, Weight Gain, and Cardiovascular Disease Risk Factors in Young Adults. *Journal of the American Medical Association*, 282, 1539-1546.
- Luten, J.; Crews, H.; Flynn, A.; van Dael, P.; Kastenmayer, P.; Hurrell, L.; Deelstra, H.; Shen, L.; Fairweather-Tate, S.; Hickson, K.; Farre, R.; Schlemmer, U.; Frolich, W. (1996). Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. *Journal of Science Food and Agriculture*, 72, 415-424.
- Mälkki, Y. (2004). Trends in dietary fibre research and development. *Acta Alimentaria*, 33 (1), 39-62.
- Marckmann P., Sandstrom, B. y Jespersen, J. (1994) Low fat high-fiber diet favorably Affect Several Independent Risk markers of ischemic heart disease: observations on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis from a trial of middle-Aged danes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59 (4), 935-939.
- Markett, J.A. y Fisher, M.H. (2002). A Poorly Fermented Gel from Psyllium Seed Husk Increases Excreta Moisture and Bile Acid Excretion in Rats. *The Journal of Nutrition*, 132, 2638-2643.
- Marlett J.A.; Kajs, T. y Fisher, M.H. (2000). An unfermented gel component of psyllium seed husk promotes laxation as a lubricant in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 784-789.
- Marsili, R.T.; Ostapenko, H.; Simmons, R.E. y Green, D.E. (1981). High performance liquid chromatography determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science*, 46, 52-57.
- Marsili, R.T. (1981). Monitoring bacterial metabolites in cultured buttermilk by high performance liquid chromatography and headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography Science*, 19, 451-456.
- Mayes, P.A. (1992). Capítulo 56: Digestión y absorción (pág. 590-600). En: *Bioquímica de Harper*. Washington, USA, Editorial Prentice-Hall.

- Meilgaard, M.M.; Civille, G.V. y Carr, T. (1999). Descriptive analysis techniques. En: *Sensory evaluation techniques*, 3rd ed. (pág. 173-183) . Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Meister, M. S. (1996) Dietary Fiber. Reporte de *American Council on Science and Health*.
- Miles, M.J.; Morris, V.J. y Ring, S.G. (1985). The roles of amylose and amylopectinin the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135, 257-269.
- Miller D.; Schricker, B.; Rasmussen, R. y Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 2248-2256.
- Miura M.; Nishimura, A. y Katsuta, K. (1992). Influence of addition of polyols and food emulsifiers on retrogradation rate of starch. *Food Structure*, 11, 225-236.
- MleKo, S. (1997) Rheological properties of milk and whey protein desserts. *Milchwissenschaft*, 52, 262-266.
- Moreira, M.; Abraham, A. y De Antoni, G. (2000). Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science*, 83, 395–400.
- Morita, R.Y. (1974). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39(2), 144-167.
- Morris, V.J. (1990). Starch gelation and retrogradation. *Trends in food science and Technology*, 7, 2-6.
- Muir, D.D. y Banks, J.M. (2000). Capítulo 9: Milk and milk products (pág. 197-219). En: *The stability and shelf life of food*. Cambridge, UK, Woodhead Publishing.
- Muzzarelli, R.A.A. (1996). Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymers*, 29, 309-316.
- Nishimune, T.; Yakushiji, T.; Sumimoto, T.; Taguchi, S.; Konishi, Y.; Nakahara, S.; Ichikawa, T. y Kunita, N. (1991). Glycemic response and fiber content of some foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 414-419.
- Nordgaard, I. y Mortensen, P.B. (1995). Digestive processes in the human colon. *Nutrition*, 11, 37-45.

- Nunes, M.C., Raymundo, A. y Sousa, I. (2006). Gelled vegetable desserts containing pea protein, κ -carrageenan and starch. *European Food Research Technology*, 222, 622–628.
- Ould Eleya, M.M. y Turgeon, S.L. (2000). Rheology of κ -carrageenan and β -lactoglobulin mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 14, 29–40.
- Painter, N.S. y Burkitt, D.P. (1971). Diverticular disease of the colon: a deficiency disease in western civilization. *British Medical Journal*, 22, 2 (5759), 450–454.
- Pereira, D.I. y Gibson, R.G. (2002). Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9), 4689–4693.
- Pick, M.E.; Hawrysh, Z.J.; Gee, M.I.; Toth, E.; Garg, M.L. y Hardy, R.T. (1996). Oat Bran Concentrate Bread Products Improve Long-Term Control of Diabetes: a Pilot Study. *Journal of the American Dietetic Association*, 96 (12), 1254–1261.
- Pomeranz, Y. (1985). Carbohydrates: Starch (pág. 25-90). En: *Functional Properties of Food Components*. Orlando, Florida, Academic Press, Inc.
- Pupponen-Pimiä, R.; Aura, A.M.; Oksman-Caldentey, K.M.; Myllärinen, P.; Saarela, M.; Mattila Sandholm, T. y Poutanen K. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 3–11.
- Puvanenthiran, A.; Goddard, S.J.; Mckinnon, I.R. y Augustin, M.A. (2003). Milk-based gels with κ -carrageenan. *Journal of food Science*, 68(1), 137–141.
- Reddy, B.S. (1999). Possible mechanisms by which pro-and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *Journal Nutrition*, 129, 1478s–1428s.
- Reinheimer, J.A. (1994). Las bacterias lácticas (pág. 64–113). En: *Ciencia y tecnología de los productos lácteos*. Diagrama, SA, Santa Fe, Argentina.
- Renner, L.G. (1991). Cultured dairy products in human nutrition (pág. 2–24). En: *Bulletin of the International Dairy Federation* n° 255. Bruselas: IDF.
- RES GMC 46/03, 2006. Resolución del MERCOSUR del 31 de julio de 2006 sobre Rotulado Nutricional.
- Ribeiro, K.O.; Rodrigues, M.I.; Sabadini, E. y Cunha, R.L. (2004). Mechanical properties of acid sodium caseinate- κ -carrageenan gels: effect of co-solute addition. *Food Hydrocolloids*, 18, 71–79.

- Rinaldi, V. y Mingo Arechederra, T. (2001). Alimentos funcionales II: La industria Nacional, *Enfasis Alimentación* n° 4, 46-77.
- Ring, S.G. (1985). Some studies on starch gelation. *Starch*, 37, 80-83.
- Ripsin, C.M., Keenan, J.N. y Jacobs, D.R. (1992). Oat products and lipids lowering. A meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, 267, 3317-3325.
- Robinson, J.L. y Dombrowski, D.B. (1983). Effect of orotic acid ingestion on urinary and blood parameters in humans. *Nutrition Research*, 3, 407-415.
- Rodríguez, M. y Albertengo, L. (2005). Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. *Biosciencie Biotechnology Biochemistry*, 69, 2057-2062.
- Roland, N.; Nugon-baudon, L.; Andrieux, C. y Szylit, O. (1995). Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fiber in rats inoculated with a human whole faecal flora. *British Journal Nutrition*, 74, 239-249.
- Ross Murphy, S.B. (1995). Rheology of biopolymer solutions and gels. En: *New physico-chemical techniques for the characterization of complex food systems*, (pág. 139-176). New York, USA: Chapman & Hall.
- Ross, Y.H. (1992). Capítulo: Transitions and transformations in food systems. En: *handbook of food engineering* (pág. 145-197). New York, USA, Marcel Dekker Inc.
- Rubin, H.E., Nerad, T., Vaughan, F. (1982). Lactate acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. *Journal of Dairy science*, 65, 197-203.
- Salminen, S. y Deighton, M. (1992). Lactic acid bacteria in the gut in normal and disorderer states. *Digestive Diseases*, 10(4), 227-238.
- Sanderson, G.R.; Bell, V.L.; Clark, R.C. y Ortega, D. (1988). The texture of gellan gum gels (pág. 219-229). En: *Gums and stabilisers for thr food industry*. Oxford, UK, IRL Press.
- Sangnark, A. y Noomhorn, A. (2003). Effect of particle sizes on in vitro calcium and magnesium binding capacity of prepared dietary fibers. *Food Research International*, 36, 91-96.
- Schaller, A. (2001). Productos Lácteos. *Alimentos Argentinos*, 3, 26-32.

- Scheppach, W.; Bartram, H.P. y Richter, F. (1995). Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *European Journal Cancer*, 31A:7-8, 1077-1080.
- Scheppach, W. (1998). Butyrate and the epithelium of the large intestine (pág. 215). En: *Proceedings of the Profiber Conference: Functional Properties of Nondigestible Carbohydrates*. Editores: Guillon, F.; Amadó, R.; Amaral-Collaco, M.T.; Anderson, H.; Asp, N.G.; Bach Knudsen, K.E.; Champ, M.; Mathers, J.; Robertson, J.A.; Rowland, I. y van Loo, J. Lisboa, Portugal.
- Schmidt, K.A. y Smith, D.E. (1992). Rheological properties of gum and milk protein interactions. *Journal of Dairy Science*, 75, 36-42.
- Schneeman, B.O. (1986). Dietary Fiber: Physical and Chemical Properties, Methods of Analysis, and Physiological Effects. *Food Technology*, 2, 104-110.
- Schneeman, B.O. (1998). Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutrition Research*, 18, 625-632.
- Silman, K. y Coulston, A.M. (1991). Sugars in the diet. En: *Sugars and sweeteners* (pág. 17-35). Boca Raton, FL, USA: CRS Press.
- Sloan, A.E. (1999). The new market: foods for the not-so-healthy. *Food Technology*, 53(2), 54-60.
- Smith, T.; Brown, J.C. y Livesey, G. (1998). Energy balance and thermogenesis in rats consuming nonstach polysacharides of various fermentabilities. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 802-819.
- Southgate, D.A.T. (1976). *Determination of Food Carbohydrates*. London, Applied Science Publishers.
- Southgate, D.A.T. (1982). Definitions and terminology of dietary fiber. *Dietary Fiber in Health and Disease*. New York, USA, Plenum Press.
- Stacey, J.B. y Goodrick, G.K. (2002). A functional food product for the management of weight. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2), 163-178.
- Steffe, J.F. (1996). Capítulo 5: Viscoelasticity (pág. 295-349). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Michigan, East Lansing, Freeman Press.
- Stoll, B.A. (1996). Can Supplementary Dietary Fibre Suppress Breast Cancer Grow? *British Journal Cancer*, 73 (5), 557-559.

- Stone, H. y Sidel, J.L. (2004). Capítulo 7: Affective testing (pág. 227-252). En: *Sensory Evaluation Practices*. Florida, USA, Academic Press.
- Susuki, I.; Kato, S.; Kizada, T.; Yono, N. y Morichi, T. (1986). Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. Characteristics of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides and nucleic acid synthesis. *Journal of Dairy Science*, 69, 971-978.
- Tamine, A. y Robinson, R. (1985). Capítulo 9: The nutritional value of yoghurt (pág. 365-373). En: *Yogurt science and technology*. Oxford, UK., Pergamon Press.
- Tárrega, A.; Durán, L. y Costell, E. (2004). Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. *International Dairy Journal*, 14(4), 345-353.
- Tárrega, A., Durán, L. y Costell, E. (2005). Rheological characterization of semi-solid dairy desserts. Effect of temperature. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 133-139.
- Teggatz, J.A. y Morris, H.A. (1990). Changes in the rheology and microstructure of ropy yogurt during shearing. *Food Structure*, 9, 133-138.
- Telung, B.; Remesy, C. y Demigne, C. (1987). Specific effects of guar gum or gum arabic on adaptation of cecal digestion to high-fiber diets in the rat. *Journal of Nutrition*, 117, 1556-1561.
- Theumisen, M.J.M. y Kroeze, J.H.A. (1995). The effect of sweeteners on perceived viscosity. *Chemical Senses*, 20(4), 441-450.
- Thibault, J.F.; Lahaye, M. y Guillon, F. (1992). Physicochemical properties of food plant cell walls (21-56). En: *Dietary Fiber as a component of food: Nutritional Function in health and disease*. Editores: Schweizer, T.F y Edwards, C.A. Berlin, Alemania, Editorial Springer-Verlag.
- Todesco, T.; Rao, A.V.; Bosello O. y Jenkins, D. (1991). Propionato lowers blood glucose and alters lipid metabolism in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 860-865.
- Tomomatsu, H. (1994). Health effects of oligosaccharides. *Food Technology*, 48 (10), 61-65.
- Trout, D.; Behall, K. y Osilesi, O. (1993). Prediction of glycaemic index for starchy foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 58, 873-878.
- Trowell, H.C. (1972). Atherosclerosis, Ischemic heart disease and dietary fiber. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25, 926-932.

- Trowell, H.C. (1974). Definition of dietary fiber. *The Lancet*, 1, 503–505.
- Tungland, B. y Meyer, D. (2002). Nondigestible oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science Safety–Institute of Food Technologist*, 3, 73-91.
- Tziboula, A. y Horne, D.S. (1999). Influence of milk proteins on κ -carrageenan gelation. *International Dairy Journal*, 9, 359-364.
- Ünal, B.; Metin, S. y Işıklı, N.D. (2003). Use of response surface methodology to describe the combined effect of storage time, locust bean gum and dry matter of milk on the physical properties of low-fat set yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 909–916.
- van Vliet, T. (1988). Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction. *Colloid and Polymer Science*, 266(6), 518-524.
- van Vliet, T. y Luyten, H. (1995). Fracture mechanics of solids foods (pág. 157-176). En: New physicochemical techniques for the characterization of complex food systems. Glasgow, Scotland, Editorial Blackie.
- van Vliet, T. (1999). Capítulo 4: Rheological Classification of foods and instrumental techniques for their study (pág. 65-98). En: Food texture measurements and perception. Maryland, USA, Aspen Publishers Inc.
- Van Campen, D.R. y Glahn, R. (1999). Micronutrients bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Fields Crops Research*, 60, 93-113.
- Vasconcellos, J.A. (2001). Los Alimentos del futuro. *La alimentación Latinoamericana*, 231, 11-21
- Veisseyre, R. (1972). Lactología Técnica. Zaragoza, España, Editorial Acribia.
- Verbekena, D.; Baela, K.; Thasb, O. y Dewettincka, K. (2006). Interactions between κ -carrageenan, milk proteins and modified starch in sterilized dairy desserts. *International Dairy Journal*, 16(5), 482-488.
- Verdi, J.R. y Hood, L.L. (1993). Advantages of alternative sweeteners blends. *Food Technology*, 47(6), 1996-1998.
- Whittle, M. y Dickinson, E. (1998). Large deformation rheological behaviour of a model particle gel. *Journal Chemical Society, Faraday Transactions articles*, 94(16), 2453-2462.

- Willett, H.P.; Joklik, W.K.; Amos, D.B. y Wilfert, C.M. (1992). *Zinsser Microbiology*. London, UK, Appleton-Century-Crofts.
- Williams, C.L. (1995). Importance of dietary Fiber in Childhood. *Journal of the American Dietetic Association*, 95, 1140-1146.
- Williams, P.A. y Phillips, G.O. (2000). Capítulo: Introduction to food hydrocolloids (pág 1-19). En: *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, UK, Woodhead Publishing.
- Wolver, T.; Spadafora, P. y Eshuis, H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 681-687.
- Wolver, T. y Miller, J. (1995). Sugars and blood glucose control. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 212S-227S.
- Wu, C.F.J. y Hamada, M. (2000). *Experiments: Planning, Analysis, and Parameter Design Optimization*. Reino Unido, John Wiley & Sons, Inc.
- Yaeshima, T. (1996). Benefits of Bifidobacteria to human health. *Bulletin of the International Dairy Foundation*, 313, 36-42.

Símbolos utilizados

A área del cuerpo

a componente rojo-verde

A_0 área del sensor

b componente amarillo-azul

D diámetro del halo formado por la muestra refrigerada

D_0 diámetro del dispositivo empleado

De número de Deborah

dt diferencial de tiempo

dx desplazamiento de la superficie del elemento que se deforma con respecto a la superficie interior en la dirección x

dy altura del elemento que se deforma

Δx incremento de deformación

δ ángulo de desfase

ε deformación de Hencky

ε_f deformación de fractura

E módulo de deformabilidad

η viscosidad del sistema

η^* es la viscosidad compleja

η'' componente fuera de fase de la viscosidad compleja

η' la viscosidad dinámica

F fuerza aplicada al cuerpo

FDA Fibra Detergente Ácida

FDN Fibra Detergente Neutra

G módulo elástico de Hooke

G^* módulo complejo dinámico

G' módulo elástico dinámico

G'' módulo viscoso o de pérdida dinámico

γ deformación que sufre el cuerpo

γ' gradiente de velocidad o de deformación

γ_0 amplitud máxima de deformación

h altura aplicada al cuerpo

H° ángulo Hue que corresponde a la cromaticidad

Hz Hertz

Kcal kilocalorías

L distancia entre placas

L Luminosidad

$L(t)$ es la distancia recorrida por el sensor

L_0 es la altura inicial de la muestra

mN/mm miliNewtons por milímetro

μm micrómetros

N Newtons

n tamaño de la muestra

ω es la frecuencia como velocidad angular

Pa Pascales

σ esfuerzo de corte o tensión de cizalla sobre el cuerpo

σ_0 ó τ_0 máxima amplitud del esfuerzo

σ_f esfuerzo de fractura

$\tan \delta$ desfasaje entre la deformación aplicada y el esfuerzo de corte de respuesta

UFC/g unidades formadoras de colonias por gramo

UI Unidades Internacionales (se utiliza para vitaminas)

x desplazamiento de la placa superior