

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS



**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE
EDULCORANTES, PRESERVADORES E
HIDROCOLOIDES:
INCIDENCIA SOBRE LA CALIDAD DE ALIMENTOS
DIETÉTICOS**

LIC. MARÍA FERNANDA GLIEMMO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CARMEN ADRIANA CAMPOS

2005



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS

**STUDY OF THE INTERACTIONS AMONG
SWEETENERS, PRESERVATIVES AND
HYDROCOLLOIDS:
ITS EFFECT ON THE QUALITY OF DIETETIC
FOODS**

LIC. MARÍA FERNANDA GLIEMMO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CARMEN ADRIANA CAMPOS

2005

*He aprendido a volar.
Desde entonces
no espero a que me empujen*

para moverme del sitio.

Friedrich Nietzsche

A Alejandro

A mis padres, a Marina y a Andrea

A la memoria de mis abuelos Haydeé, Anyulín, Delfina y Angel.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Fundación Antorchas por el apoyo financiero brindado para la realización de la tesis.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por facilitar el uso de sus instalaciones.

A la Dra. Carmen Adriana Campos quien dirigió este trabajo, por la dedicación, el estímulo, la ayuda y la comprensión que siempre me brindó.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson quien fue mi Directora de beca y Consejera de estudios, por el apoyo y el estímulo que siempre me brindó.

A la Dra. Amalia Calviño, a la Bioqca. Olga Tamasi y a Malena Pascual por su colaboración en la realización del estudio sensorial del trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Industrias, y en especial a los que participaron en los ensayos sensoriales, gracias por su buena voluntad y por brindarme parte de su tiempo.

A la Dra. Vanesa Martínez por su presencia en momentos difíciles y por el aguante!

A la Lic. Silvia Flores por su ayuda en las tareas finales de microbiología.

A mi familia, por su apoyo y comprensión.

A Alejandro por su cariño, su infinita paciencia y su alegría contagiosa, que me acompañaron en este camino.

Lic. María Fernanda Gliemmo

Resumen

El desarrollo de productos dietéticos de reducido tenor glucídico presenta una serie de problemas, aún no resueltos satisfactoriamente. La disminución del contenido de sacarosa obliga a añadir edulcorantes, debido al descenso del dulzor, y a incorporar hidrocoloides por la disminución de la viscosidad. Además, el incremento de la actividad de agua (a_w), producido por la eliminación de azúcares, hace necesaria la adición de preservadores. De esta manera, es posible asegurar la estabilidad microbiológica y las adecuadas propiedades sensoriales del alimento.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de las interacciones entre preservadores, edulcorantes e hidrocoloides, evaluando su efecto sobre la estabilidad química y la actividad biológica del preservador sorbato de potasio y del edulcorante aspartamo. Asimismo se analizó el desarrollo de pardeamiento no enzimático (PNE), las propiedades sensoriales y reológicas de sistemas acuosos que modelan alimentos ácidos de reducido tenor glucídico

Los sorbatos y el aspartamo se degradaron dependiendo del tiempo de almacenamiento y de la composición del sistema, promoviendo el desarrollo de PNE vía reacción de Maillard. La presencia de polioles incrementó la destrucción de los sorbatos, pero disminuyó el desarrollo de PNE.

El aumento de la concentración de sorbato de potasio ó el descenso de la a_w por el agregado de polioles, disminuyó la velocidad de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, levadura deteriorativa presente en alimentos ácidos. El empleo de xilitol, aspartamo y sorbato permitió obtener la menor velocidad de crecimiento y la mayor velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*.

La presencia conjunta de aspartamo, glucosa y xilitol incrementó la percepción del dulzor. En cuanto a la percepción de la acidez, ésta disminuyó debido al agregado de humectantes y de aspartamo. La adición de pectina de bajo metoxilo descendió el dulzor de los sistemas en mayor medida que la goma gellan.

El estudio de las propiedades reológicas permitió establecer la existencia de interacciones físico-químicas entre los edulcorantes y los hidrocoloides, las cuales estuvieron condicionadas por la presencia del agua. Además, se halló una relación entre las propiedades sensoriales y reológicas de los geles.

Los resultados obtenidos aportan información esencial para elegir correctamente los aditivos a utilizar en la formulación y procesamiento de alimentos, y asegurar su calidad microbiológica y sensorial.

Palabras clave: sorbato de potasio, aspartamo, polioles, hidrocoloides, *Zygosaccharomyces bailii*, propiedades sensoriales, productos dietéticos

Abstract

The development of dietetic food products with low sugar content have some non-solved problems. The sucrose content diminution involves, besides of sweeteners and hydrocolloids addition due to the depression of sweetness and viscosity, the addition of preservatives due to the increase of water activity (a_w). In this way, the microbiological stability and the right sensorial properties can be assured.

The goal of this work was the study of the interactions among sorbates, sweeteners and hydrocolloids, in order to evaluate interaction effects on: chemical stability and biological activity of sorbate and aspartame. Also, non-enzymatic browning development, sensorial and rheological properties were analyzed in model aqueous systems resembling acid food of low sugar content.

Potassium sorbate and aspartame were destroyed throughout storage depending on system composition. They promoted the development of nonenzymatic browning through Maillard reaction. Polyol addition increased sorbates destruction but decreased nonenzymatic browning.

The increase in sorbate content or the decrease in a_w through polyol addition decreased growth rate of *Zygosaccharomyces bailii*, a spoilage yeast found in acid foods. Thermal inactivation rate constants were the lowest when xylitol, aspartame and sorbate were present.

Sweet perception was increased by the jointly presence of aspartame, glucosa and xylitol. The perception of acid taste decreased by the addition of humectants and aspartame. Low methoxyl pectin presence diminished sweet perception in a larger extent than gellan gum did.

The study of rheological properties allowed to establish the existence of physicochemical interactions between sweeteners and hydrocolloids, which were conditioned by water presence. A relationship between sensory and rheological properties of gels was also determined.

Results obtained provide essential information for the right selection of the additives to be used in the formulation and processing in order to assure the microbiological and sensorial quality of foods.

Key words: potassium sorbate, aspartame, polyols, hydrocolloids, *Zygosaccharomyces bailii*, sensorial properties, dietetic product

ÍNDICE

I.1.5	Objetivos.....	32
I.2	Materiales	y
	Métodos	33
I.2.1	Formulación de los sistemas modelo.....	33
I.2.1.1	Reactivos.....	33
I.2.1.2	Composición de los sistemas modelo.....	33
I.2.1.3	Metodología.....	36
I.2.2	Determinación del grado de hidrólisis de la sacarosa.....	37
I.2.3	Determinación de ácido sórbico.....	38
I.2.3.1	Técnica empleada para la determinación de ácido sórbico.....	38
I.2.3.2	Metodología de la técnica de medición empleada.....	40
I.2.4	Determinación de aspartamo.....	43
I.2.4.1	Técnica empleada para la determinación de aspartamo.....	43
I.2.4.2	Metodología de la técnica de medición empleada.....	45
I.2.5	Determinación del desarrollo de pardeamiento no enzimático.....	46
I.2.5.1	Métodos instrumentales.....	47
I.2.5.2	Función de color empleada para la determinación del pardeamiento no enzimático.....	52
I.2.5.3	Metodología empleada para la determinación del pardeamiento no enzimático.....	53
I.2.6	Análisis estadístico.....	53
I.3	Resultados	y
	Discusión	55
I.3.1	Resultados generales de la estabilidad química de los sistemas.....	55
I.3.1.1	Determinación del pH y la actividad de agua durante el almacenamiento de los sistemas.....	55
I.3.1.2	Estabilidad del ácido sórbico.....	55
I.3.1.3	Estabilidad del aspartamo.....	55
I.3.1.4	Desarrollo de pardeamiento no enzimático.....	57
I.3.2	Estabilidad química de los sistemas azucarados.....	58
I.3.2.1	Hidrólisis de la sacarosa.....	58

1.3.2.2	Estabilidad del ácido sórbico.....	59
1.3.2.3	Estabilidad del aspartamo.....	61
1.3.2.4	Desarrollo de pardeamiento no enzimático.....	63
1.3.2.5	Conclusiones.....	65
1.3.3	Estabilidad química de los sistemas conteniendo polioles	66
1.3.3.1	Estabilidad del ácido sórbico.....	66
1.3.3.2	Desarrollo de pardeamiento no enzimático.....	68
1.3.3.3	Conclusiones.....	70
1.3.4	Estabilidad química de los sistemas conteniendo xilitol.....	70
1.3.4.1	Estabilidad del ácido sórbico.....	70
1.3.4.2	Estabilidad del aspartamo.....	72
1.3.4.3	Desarrollo de pardeamiento no enzimático.....	73
1.3.4.4	Conclusiones.....	74
CAPÍTULO II:	INTERACCIONES ENTRE EL ÁCIDO SÓRBICO Y EDULCORANTES: SU EFECTO	
	SOBRE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS	
	SISTEMAS.....	76
II.1		
	Introducción.....	77
II.1.1	Agentes causantes de alteraciones microbiológicas en alimentos de tenor	
	glucídico reducido.....	77
II.1.2	Métodos de preservación empleados en alimentos de tenor glucídico	
	reducido, con especial referencia al uso de tecnologías de barreras.....	79
II.1.3	Acción de los preservadores como factor de estrés microbiano.....	80
1.3.1	Generalidades.....	80
1.3.2	Factores que afectan la acción antimicrobiana de los	
	preservadores.....	82
II.1.4	Modelado matemático del comportamiento microbiano en alimentos.....	88
1.4.1	Clasificación de modelos microbianos.....	89
II.1.5	Objetivos.....	90
II.2	Materiales	y
	métodos.....	91

II.2.1	Formulación de los sistemas modelo.....	91
II.2.1.1	Reactivos.....	91
II.2.1.2	Composición de los sistemas modelo.....	91
II.2.2	Metodología para la obtención de curvas de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	93
II.2.2.1	Elaboración del inóculo.....	93
II.2.2.2	Elaboración de los sistemas.....	93
II.2.2.3	Toma de muestra.....	94
II.2.2.4	Análisis de datos.....	95
II.2.3	Metodología para la obtención de curvas de inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	96
II.2.3.1	Elaboración del inóculo.....	96
II.2.3.2	Elaboración de los sistemas.....	96
II.2.3.3	Toma de muestra.....	97
II.2.3.4	Análisis de datos.....	97
II.3	Resultados	y
	discusión	99
II.3.1	Estimación de la mínima concentración inhibitoria de sorbato de potasio frente al crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	99
II.3.1.1	Vinculación de la mínima concentración inhibitoria de sorbato de potasio con la estabilidad química del preservador.....	104
II.3.1.2	Conclusiones.....	105
II.3.2	Factores que afectan el crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	105
II.3.2.1	Efecto del sorbato de potasio sobre los parámetros de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	109
II.3.2.2	Efecto del descenso de la actividad de agua sobre los parámetros de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	111
II.3.2.3	Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre los parámetros de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> en presencia de sorbato de potasio.....	114
II.3.2.4	Efecto del aspartamo sobre los parámetros de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	119
II.3.2.5	Efecto del aspartamo sobre los parámetros de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> en presencia de sorbato de potasio.....	122

II.3.2.6	Efecto del descenso de la actividad de agua sobre los parámetros de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> en presencia de aspartamo....	127
II.3.2.7	Conclusiones.....	133
II.3.3	Factores que afectan la inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>.....	134
II.3.3.1	Efecto del sorbato de potasio sobre la inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	138
II.3.3.2	Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	139
II.3.3.3	Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> en presencia de sorbato de potasio.....	142
II.3.3.4	Efecto del aspartamo sobre la inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	145
II.3.3.5	Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la inactivación térmica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> en presencia de aspartamo.....	148
II.3.3.6	Conclusiones.....	151
II.3.4	Corolarios.....	153
CAPÍTULO III:	INTERACCIONES ENTRE EDULCORANTES E HIDROCOLOIDES EN SISTEMAS CONTENIENDO ÁCIDO SÓRBICO: SU EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE LOS SISTEMAS.....	154

III.1

Introducción.....	155
III.1.1 Atributos sensoriales.....	155
III.1.2 Percepción de los atributos sensoriales.....	158
III.1.3 Receptores gustativos.....	159
III.1.3.1 Teoría de la estructura responsable del gusto dulce.....	161
III.1.3.2 El gusto ácido.....	164
III.1.4 Influencia de la interacción entre sustancias sápidas sobre la percepción del gusto.....	165
III.1.5 Efecto de la matriz del sistema en la percepción del dulzor y de la acidez.....	168
III.1.6 Objetivos.....	171

III.2 Materiales	y
métodos	172
III.2.1 Formulación de los sistemas.....	172
III.2.1.1	
Reactivos.....	17
2	
III.2.1.2 Composición de los sistemas	173
III.2.2 Metodología para la elaboración de los sistemas.....	175
III.2.2.1 Sistemas libres de hidrocoloides.....	175
III.2.2.2 Sistemas conteniendo hidrocoloides.....	176
III.2.3 Evaluación de las propiedades sensoriales de los sistemas libres de hidrocoloides.....	178
III.2.3.1 Evaluadores.....	178
III.2.3.2 Metodología para la evaluación sensorial de los sistemas.....	180
III.2.3.3 Entrenamiento específico para el empleo del método de estimación de la magnitud.....	182
III.2.3.4 Análisis de datos.....	182
III.2.4 Evaluación del dulzor de los sistemas conteniendo hidrocoloides.....	183
III.2.4.1 Evaluadores.....	183
III.2.4.2 Metodología para la evaluación sensorial de los sistemas.....	183
III.2.4.3 Análisis de datos.....	185
III.3 Resultados	y
discusión	186
III.3.1 Efecto de la presencia de distintos humectantes y de aspartamo sobre las propiedades sensoriales de los sistemas libres de hidrocoloides.....	186
III.3.1.1 Intensidad del dulzor de los sistemas libres de hidrocoloides.....	186
III.3.1.2 Intensidad percibida total y sus propiedades componentes de dulzor y acidez de los sistemas libres de hidrocoloides.....	189
III.3.1.3 Conclusiones.....	197
III.3.2 Efecto de la presencia de dos hidrocoloides y distintos edulcorantes sobre el dulzor de formulaciones de bajo tenor glucídico.....	197
III.3.2.1 Conclusiones.....	200

**CAPÍTULO IV: INTERACCIONES ENTRE EDULCORANTES E HIDROCOLOIDES EN SISTEMAS
CONTENIENDO ÁCIDO SÓRBICO: SU EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES
REOLÓGICAS DE LOS SISTEMAS.....202**

IV.1

Introducción.....203

IV.1.1 La reología y sus aplicaciones en sistemas alimenticios.....203

IV.1.2 Comportamiento reológico de los sistemas alimenticios.....204

IV.1.3 Ensayos reológicos.....207

IV.1.3.1 Ensayos oscilatorios.....207

IV.1.4 Propiedades estructurales de geles.....215

IV.1.4.1 Pectinas. Pectina de bajo metoxilo.....217

IV.1.4.2 Goma gellan.....223

IV.1.5 Objetivos.....227

IV.2 Materiales y métodos.....229

IV.2.1 Formulación de los sistemas.....229

IV.2.1.1

Reactivos.....229

IV.2.1.2 Composición de los sistemas229

IV.2.2 Metodología para la elaboración de los sistemas.....230

**IV.2.3 Metodología para la obtención de los parámetros reológicos de los
sistemas231**

IV.2.4 Análisis de datos.....232

IV.3 Resultados y discusión.....233

IV.3.1 Barrido de esfuerzo, elección de la deformación de trabajo.....233

IV.3.2 Barrido de frecuencia de los sistemas.....234

**IV.3.3 Efecto de la naturaleza del edulcorante sobre las propiedades
viscoelásticas de los sistemas.....240**

IV.3.3.1 Sistemas conteniendo goma gellan.....240

IV.3.3.2	Sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo.....	243
IV.3.4	Efecto de la naturaleza del hidrocoloide sobre las propiedades viscoelásticas de los sistemas.....	246
IV.3.5	Vinculación entre las propiedades viscoelásticas y sensoriales de los sistemas.....	249
IV.3.6	Conclusiones.....	252
CONCLUSIONES GENERALES.....		255
BIBLIOGRAFÍA.....		264

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Algunas generalidades de los alimentos de tenor glucídico reducido

En las últimas décadas, la aparición de problemas de salud ligados al elevado consumo de azúcares ha originado en la población la necesidad de disponer de alimentos de reducido tenor en hidratos de carbono. Para satisfacer esta demanda, tanto la industria como la investigación han puesto sus esfuerzos en la búsqueda de edulcorantes no calóricos así como, en la formulación de productos de nulo o reducido tenor glucídico.

El desarrollo de los mencionados alimentos, presenta una serie de problemas que aún no han sido resueltos en forma satisfactoria. Por ejemplo, cuando se reemplaza total o parcialmente la sacarosa por un edulcorante artificial se debe agregar un espesante, para compensar la disminución en la viscosidad del producto. Para ello, es posible adicionar un hidrocoloide, el cual puede interactuar con el edulcorante y por ende, verse modificada tanto la percepción del sabor dulce del edulcorante como la viscosidad del alimento. Esta interacción entre el hidrocoloide y el edulcorante depende de la naturaleza química de ambos, del tipo de hidrocoloide, de su concentración y de la composición química y características sensoriales del producto (Meyer, 2002; Pastor y col., 1996; Phillips y Williams, 1995).

Por otra parte, la eliminación total o parcial de la sacarosa implica un aumento de la actividad de agua del producto, lo que podría conducir a una disminución de la estabilidad microbiológica. A fin de restablecer dicha estabilidad, es usual que se adicione un preservador como el ácido sórbico ó su sal de potasio, comúnmente denominadas sorbatos. La efectividad de un preservador depende, entre otros factores, de la disponibilidad del mismo para ejercer su acción y de su presencia en la concentración adecuada. Es de destacar que los sorbatos no siempre son estables y, por lo tanto, pueden degradarse durante el almacenamiento del producto conduciendo a concentraciones por debajo de las mínimas requeridas para asegurar la estabilidad microbiológica (Castro y col., 2002). Además, algunos hidrocoloides tales como las gomas, los carragenatos y el alginato de sodio pueden formar complejos con los preservadores reduciendo la disponibilidad de los mismos (Chan y col., 2000).

La estabilidad química del edulcorante también puede verse afectada por numerosos factores. En particular, se conoce que el éster metílico de la aspartilfenilalanina, comúnmente denominado aspartamo, es inestable y se hidroliza en función de la humedad, de la temperatura y del pH del producto. Ninguno de los productos de su hidrólisis es dulce, razón por la cual su

degradación produce la disminución del grado de dulzor del alimento. Además, dada su naturaleza peptídica puede reaccionar, vía reacción de Maillard, con otros componentes del alimento como azúcares, compuestos carbonílicos provenientes de aromatizantes o de la degradación oxidativa de los sorbatos, por ejemplo, alterando el color y el *flavor* del producto (Pattanaargson y col., 2001; Wang, y Schroeder, 2000; Hutchinson y col., 1999) y disminuyendo así la vida útil del mismo.

Los alimentos de tenor glucídico reducido, en particular aquellos que poseen elevada acidez, pueden deteriorarse debido al desarrollo de levaduras, las cuales resisten condiciones ambientales más extremas que las bacterias, por lo tanto, frecuentemente se las puede encontrar en productos de bajo pH y en presencia de niveles de preservadores que inhiban el crecimiento de las bacterias (Loureiro, 2000). *Zygosaccharomyces bailii* es una de las más importantes levaduras que causan el deterioro en alimentos ácidos. Está relacionada con el deterioro de mayonesa, tomate *ketchup*, encurtidos, mazapán, bebidas sin alcohol, vinos y muchos otros alimentos, entre los cuales se encuentran los productos de reducido tenor glucídico, tales como jugos, mermeladas y jaleas (Thomas y Davenport, 1985).

El hecho que *Zygosaccharomyces bailii* sea una levadura tolerante a la depresión de la actividad de agua y del pH, resistente a preservadores y tratamientos térmicos (Jenkins y col., 2000; Warth, 1977), hace que sea un microorganismo problemático y, por lo tanto, el estudio de las características de su crecimiento es de especial interés en la formulación de alimentos ácidos. Dicho estudio involucraría, entre otros aspectos, la optimización de las condiciones de almacenamiento y procesamiento de los alimentos. Dentro de estas últimas pueden considerarse la combinación de diferentes factores de estrés microbiano, como la depresión del pH y de la actividad de agua, la adición de algún preservador en un nivel apropiado, y la aplicación de un tratamiento térmico adecuado.

De acuerdo a lo expuesto, resulta de interés, en el área de la tecnología de alimentos el estudio de las interacciones entre edulcorantes, hidrocoloides y preservadores, así como de la influencia de dichas interacciones sobre las características sensoriales y sobre la estabilidad microbiológica de alimentos dietéticos de tenor glucídico reducido.

2. Edulcorantes de alta intensidad

En los últimos años ha crecido enormemente el interés, por parte de los consumidores, en alimentos reducidos en calorías. Existe un gran número de causas a las que se les puede

atribuir este incremento, entre las mismas se encuentran el creciente interés de la sociedad en el cuidado de la estética corporal, y la necesidad de introducir cambios en las dietas por razones de salud.

El área de productos de bajas calorías comprende a aquellos alimentos libres o con reducido contenido de grasas y/o azúcares. Dentro de estos grupos podemos encontrar alimentos, tales como, cereales para desayuno, confituras, productos horneados, bebidas líquidas o en polvo, aderezos para ensaladas, productos lácteos, jaleas y mermeladas.

En particular, la demanda por el consumo de alimentos dulces, reducidos en calorías, impulsó la investigación de nuevos edulcorantes no nutritivos ni tóxicos, frecuentemente denominados edulcorantes alternativos o edulcorantes de alta intensidad. Son productos no glucídicos, no calóricos, generalmente con fuerte sabor dulce. Sin embargo, la potencial toxicidad de los mismos limita las posibilidades de su empleo (Hutchinson y col., 1999; Stegink, 1987).

Para que los edulcorantes alternativos puedan insertarse en el mercado deben cumplir los siguientes requisitos (Crosby, 1976):

- a) ser seguros para el consumo humano, por ello se los somete a extensos, costosos y rigurosos programas de testeo;
- b) poseer destacadas características de *flavor*, es decir, que su gusto sea limpio y no deje sabor residual,
- c) proveer solubilidad apropiada y tener una estabilidad adecuada, es decir, ser lo suficientemente solubles para la mayoría de sus aplicaciones en alimentos, y ser estables en las condiciones ácidas y frente a los tratamientos térmicos que se aplican normalmente en dichos productos. La principal aplicación de los edulcorantes no nutritivos es el uso en bebidas carbonatadas, donde la solución puede tener un pH tan bajo como 2,8. Además, debe tenerse en cuenta que un alimento en particular puede estar expuesto a altas temperaturas de almacenamiento (50°C) o directamente a la luz del sol,
- d) ser, al menos, equivalentes a la sacarosa en relación costo-dulzor, ya que deberá competir con la misma.

A escala mundial, el aspartamo y la sacarina dominan el mercado de los edulcorantes alternativos. En la actualidad, el aspartamo es uno de los edulcorantes de alta intensidad más

populares y más extensamente consumidos. Entre los alimentos que se lo utiliza se encuentran productos de confitería, bebidas, jaleas, postres y tabletas (Meyer y Riha III, 2002; Hutchinson y col., 1999).

3. Hidrocoloides

La sustitución de la sacarosa por edulcorantes artificiales en la formulación de alimentos de bajo contenido calórico o de reducido tenor glucídico no se resuelve totalmente con lograr una intensidad de dulzor equivalente. Además de su valor nutritivo y de su sabor dulce, la sacarosa tiene otras propiedades funcionales, como la de disminuir la actividad de agua y la de incrementar la viscosidad o consistencia del producto, las cuales no se consiguen con los edulcorantes alternativos no nutritivos. La falta de cuerpo debida a la eliminación de parte del contenido de sacarosa se puede paliar con la adición de agentes espesantes, también denominados hidrocoloides, los cuales, además, contribuyen a la estabilidad física del producto final.

Dependiendo de su origen, los hidrocoloides pueden diferenciarse en (Linden y Liorent, 1999):

- hidrocoloides provenientes de plantas, los cuales son, principalmente carbohidratos (pectinas, galactomananos, almidones, derivados de celulosa, goma arábica, goma tragacanto);
- hidrocoloides de origen animal, los cuales son proteínas, esencialmente caseinatos y gelatina;
- hidrocoloides provenientes de algas (carragenanos, agar, alginatos);
- hidrocoloides provenientes de microorganismos (goma xántica, goma gellan, dextranos). En la naturaleza, estos hidrocoloides ejercen una acción protectora y ayudan a los microorganismos a conservar la humedad necesaria para la supervivencia.

La capacidad de espesar y/o gelificar que presentan los hidrocoloides, es decir, su aptitud para estructurar el ambiente que los rodea, es una característica que le confiere ciertas propiedades mecánicas al medio al cual se adicionan. Además, estos compuestos poseen otras propiedades funcionales tales como la de estabilizar suspensiones y emulsiones, la de retener agua, la de formar complejos con proteínas. Estas propiedades son indispensables en los procesos tecnológicos de formulación de diferentes productos.

En particular, las propiedades mecánicas que presentan los hidrocoloides dependen de la naturaleza de los mismos, y son la base del interés tecnológico de su empleo. Estas propiedades sólo se obtienen después de la completa solubilización de las moléculas del hidrocoloide, las cuales, una vez solubles, pueden reorganizarse de dos maneras diferentes, uniéndose a moléculas de agua o construyendo una matriz que involucra zonas de unión, causando un efecto espesante o gelificante, respectivamente. Algunos hidrocoloides sólo pueden actuar como espesantes (galactomananos, λ -carragenano, alginato de sodio, goma xántica), mientras que otros, dependiendo de su concentración pueden actuar como espesantes o gelificantes (pectinas, κ -carragenano, gelatina). Este comportamiento está relacionado con algunos parámetros como el peso molecular del hidrocoloide, el espacio entre las moléculas, la presencia de grupos funcionales en la misma, la temperatura del medio, y la interacción con otros ingredientes tales como otros hidrocoloides o cationes. Todos estos parámetros tienen diferentes efectos sobre cada tipo de hidrocoloide y pueden afectar fuertemente la textura del producto final (Linden y Liorent, 1999).

En los alimentos de reducido tenor glucídico tales como salsa, jaleas y mermeladas, comúnmente se emplean pectinas y gomas (May, 1992).

El poder gelificante de las pectinas ha sido ampliamente utilizado en productos alimenticios. Las mismas se encuentran en las plantas, especialmente en tejidos blandos tales como brotes, hojas y, sobre todo, en los frutos. Poseen un rol importante en la laminilla media de la pared celular, ayudando a la unión de las células, en asociación con la celulosa, hemicelulosa y glicoproteínas. Su estructura química comprende unidades de ácido galacturónico, muchas de las cuales están esterificadas con metanol. Puede reducirse su grado de metilación por medio de hidrólisis ácida, y obtener pectinas con distintas propiedades de gelificación, resistentes a altas temperaturas, tolerantes a bajo pH o a altos niveles de azúcares. Las pectinas que poseen menos del 50% de metilación se denominan de bajo metoxilo, y requieren el agregado de calcio para gelificar (Imeson, 1992).

La goma gellan, un polisacárido producido por la bacteria *Pseudomonas elodea*, posee propiedades gelificantes que le confieren un uso potencial en la industria alimentaria en reemplazo de otros agentes gelificantes. Está formada por una secuencia repetitiva de un tetrasacárido compuesto por glucosa, ácido glucurónico y ramnosa. Tiene la propiedad de producir geles en bajas concentraciones en presencia de iones monovalentes o divalentes, como el calcio (Robinson y col., 1991).

Se utiliza goma gellan en jaleas, mermeladas, confituras, productos lácteos, carnes procesadas, productos horneados, aderezos y salsas, cremas para untar y bebidas (Gibson, 1992).

4. Polioles

Además de la incorporación de edulcorantes artificiales y de hidrocoloides, otra manera de suplir la pérdida de dulzor y de viscosidad debido a la sustitución parcial de la sacarosa en los alimentos reducidos en su tenor glucídico es mediante la incorporación de polioles.

Los polioles son alcoholes polihídricos que, además de actuar como edulcorantes y agentes viscosantes, actúan como humectantes y depresores de la actividad de agua. Por otra parte, reducen el riesgo de contraer caries en los dientes y causan menor incremento de glucosa en sangre y de los niveles de insulina que la generada por los hidratos de carbono (Pszczola, 1999).

Entre los polioles más conocidos se encuentran el xilitol, el sorbitol y el manitol. El empleo de los mismos en los alimentos, en reemplazo de azúcares, reduce parcialmente las calorías, ya que, de acuerdo a O'Brien Nabors (2002), los polioles son menos calóricos que la sacarosa. Basándose en la evaluación de muchos estudios, la *Food and Drug Administration* (FDA) permite el uso de los siguientes valores energéticos: 2,4 kcal/g para xilitol, 2,6 para sorbitol y 1,6 para manitol, comparados con 4 kcal/g para sacarosa.

Con relación al dulzor relativo a la sacarosa, el sorbitol y el manitol son menos dulces, mientras que el xilitol es, aproximadamente, tan dulce como la sacarosa. Por ello, frecuentemente se los utiliza en combinación con edulcorantes no calóricos. Además se los puede encontrar naturalmente en una gran variedad de frutas y vegetales (Giese, 1993).

Están reconocidos como aditivos GRAS (*Generally Recognize as Safe*) por la FDA, sin embargo su uso está limitado por poseer efecto laxante (O'Brien Nabors, 2002).

Los polioles se utilizan especialmente en goma de mascar, caramelos duros, chocolates, postres congelados, mermeladas, compotas, jaleas y, en el área farmacéutica, en jarabes y rellenos de tabletas, debido a su efecto no cariogénico. Su ingesta en estado cristalino produce un efecto refrescante, el cual no se percibe en jaleas o en productos procesados. Son químicamente estables, soportan altas temperaturas y pueden combinarse

con otros aditivos alimentarios, tales como, azúcares, agentes gelificantes, proteínas y grasas vegetales (O'Brien Nabors, 2002).

5. Preservadores

Como es sabido, el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos no deseables en alimentos (bacterias, levaduras y mohos) es su principal causa de deterioro. Para preservar los alimentos y así lograr su estabilidad microbiológica, se aplican diferentes métodos de preservación tales como el tratamiento térmico, la deshidratación, la irradiación o la congelación, la depresión de la actividad acuosa, el agregado de preservadores.

En muchos alimentos existen sustancias naturales con actividad antimicrobiana. Por ejemplo, la mayoría de las frutas contienen diferentes ácidos orgánicos, como el ácido benzoico o el ácido cítrico. La relativa estabilidad de los yogures comparados con la leche se debe al ácido láctico producido durante su fermentación. Los ajos, cebollas y muchas especias contienen potentes agentes antimicrobianos o precursores que se transforman en ellos al triturarlos. No obstante, es frecuente la incorporación de agentes conservantes químicos a los alimentos con el fin de asegurar la estabilidad microbiológica de los mismos.

Los preservadores derivados de ácidos orgánicos débiles utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos y bebidas constituyen el ejemplo más común y clásico del uso de agentes conservantes químicos. Entre ellos, los más utilizados son los ácidos acético, láctico, benzoico y sórbico. Estas moléculas inhiben el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias; el ácido sórbico también es capaz de inhibir la germinación y el desarrollo de esporas bacterianas (Sofos, 1989; Blocher y Busta, 1985).

Basándose en numerosos estudios se ha establecido que el ácido sórbico y sus sales, comúnmente denominados sorbatos, inhiben el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias. Sin embargo, presentan mayor efectividad frente a levaduras y hongos (Liewen y Marth, 1985; Sofos y Busta, 1981).

En particular se reportó que el sorbato de potasio presenta menor toxicidad en mamíferos, imparte menor sabor residual y es más eficaz para inhibir el crecimiento de levaduras deteriorativas que el benzoato de sodio (Praphailong y Fleet, 1997; Dryden y Hills, 1959; Deuel y col., 1954). De acuerdo con las razones antes mencionadas, se utiliza más frecuentemente el sorbato de potasio.

La acción antimicrobiana de los sorbatos depende de numerosos factores, entre ellos se mencionan el género y especie de microorganismo, el grado de contaminación, la composición y pH del sustrato, la concentración de sorbato, la actividad de agua, la presencia de otros aditivos, la temperatura de almacenamiento, el material de empaque, el método físico de preservación del alimento (Liewen y Marth, 1985; Restaino y col., 1982; Sofos y Busta, 1981; Bandelin, 1958). Por ejemplo, la elevada concentración de sal o azúcar y la depresión del pH actúan sinérgicamente incrementando su acción antimicrobiana (Castro y col., 2002; Praphailong y Fleet, 1997; Bills y col., 1982).

6. Calidad de los alimentos de tenor glucídico reducido

Como se indicó en párrafos anteriores, para formular un alimento de reducido tenor glucídico debe reemplazarse parcialmente el azúcar del mismo por otro/s aditivo/s que posean propiedades semejantes a la sacarosa. La incorporación de un edulcorante alternativo suplantaría la pérdida de dulzor, mientras que la de un agente espesante, la pérdida de viscosidad. Además, el ascenso de la actividad de agua exige el uso de preservadores para asegurar la estabilidad microbiológica del alimento.

La elección de dichos reemplazantes debe llevarse a cabo, teniendo en cuenta, fundamentalmente, que la calidad del alimento que se desea formular debe ser igual o superior a la del alimento sin modificar. Para ello, es necesario elegir los aditivos que posean las propiedades deseadas, basándose en el estudio de su comportamiento en el alimento, es decir, analizar cómo afectan las diferentes características de los mismos sobre las estabildades química y microbiológica, y sobre las propiedades sensoriales y reológicas del alimento, siguiendo el objetivo principal de asegurar la calidad del mismo.

Probablemente, el cambio de la composición que se produce debido al reemplazo parcial de la sacarosa afecte las propiedades sensoriales del alimento, en particular el *flavor*.

Los edulcorantes poseen variaciones individuales de intensidad, velocidad de liberación y de desaparición del *flavor* y, sabor residual. El dulzor que poseen también está influenciado por la temperatura y la acidez del medio (Giese, 1992).

Los edulcorantes alternativos o de alta intensidad que se han desarrollado tienen propiedades químicas que pueden impactar en el dulzor característico de los mismos. King y

col., (2000) observaron la presencia de *flavors* frutales y notas metálicas en yogurt debido al agregado de 400 y 600 ppm de aspartamo. Por otra parte, el aspartamo no produce dulzor o amargor residuales, pero enmascara la acidez del yogurt (King y col., 2003).

Es de destacar que, los hidrocoloides pueden interactuar con los componentes del alimento, en especial con los edulcorantes, y modificar la percepción del sabor dulce y sus umbrales de detección. Varios autores informaron que la intensidad de dulzor percibida, en general, decrece con el aumento de la viscosidad del alimento. Pastor y col., (1994) observaron que el incremento de la viscosidad de soluciones acuosas endulzadas con sacarosa o aspartamo debido al agregado de goma guar o de goma xántica produjo un aumento del umbral de detección de ambos edulcorantes. Hill y col., (1995) reportaron que el dulzor de rellenos de pastel de limón endulzados con sacarosa disminuía con el incremento de la viscosidad debido al agregado de almidón de maíz. Bayarri y col., (2003) observaron el descenso del dulzor debido al incremento de la concentración de los hidrocoloides κ -carragenano y goma gellan.

La estructura química de los preservadores constituye otra característica a tener en cuenta en la formulación de los alimentos de reducido tenor glucídico debido a que puede promover el desarrollo de pardeamiento no enzimático, una alteración química indeseable que puede afectar la calidad de los alimentos de contenido de humedad alto o intermedio (Buera y col., 1986; Seow y Cheah, 1985b). Además, la concentración del preservador en el alimento puede llegar a no ser efectiva debido a la degradación del mismo, y, de esta manera se atentaría contra la estabilidad microbiológica del producto (Castro y col., 2002).

Es de destacar que el empleo de diferentes factores de estrés microbiano (actividad de agua, temperatura, pH, preservadores) para asegurar la estabilidad microbiológica de los alimentos, no sólo garantiza la elaboración de alimentos seguros, sino que también involucra aspectos de calidad de los mismos. Estos factores pueden influir sobre la estabilidad, las propiedades sensoriales, nutritivas, tecnológicas y económicas de un producto, y pueden tener efectos negativos o positivos sobre el aseguramiento de la calidad total deseada de un alimento (Leistner, 1995).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Aportar nuevos conocimientos al desarrollo de alimentos sanos y nutritivos.

Objetivos específicos:

- Estudiar la influencia de la presencia de edulcorantes usualmente adicionados a alimentos de bajas calorías sobre la estabilidad química de los sorbatos.
- Estudiar la influencia de la presencia del sorbato y de otros aditivos usualmente adicionados a alimentos de bajas calorías sobre la estabilidad química del aspartamo.
- Evaluar el efecto de la degradación del sorbato y del aspartamo, y de la presencia de otros aditivos, sobre el desarrollo del pardeamiento no enzimático de los sistemas.
- Evaluar el efecto de la presencia de sorbato de potasio y de diversos edulcorantes sobre el desarrollo y la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*.
- Evaluar el efecto de las interacciones estudiadas sobre la actividad biológica del ácido sórbico frente al desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*.
- Evaluar el efecto del reemplazo de la sacarosa y/o glucosa por otros edulcorantes sobre las propiedades sensoriales de los sistemas.
- Evaluar el efecto del agregado de hidrocoloides, en sistemas conteniendo edulcorantes, sobre la percepción del sabor dulce.
- Evaluar el efecto de la presencia de diversos edulcorantes e hidrocoloides sobre las propiedades reológicas de los sistemas.

CAPÍTULO I

**INTERACCIONES ENTRE EL ÁCIDO SÓRBICO Y
EDULCORANTES:**

**SU EFECTO SOBRE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE
LOS SISTEMAS**

I.1 Introducción

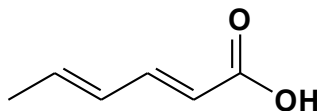
I.1.1 El ácido sórbico y su sal de potasio

I.1.1.1 Descripción y propiedades físicas y químicas

El ácido sórbico (2,4-hexadienoico) y sus sales, son usualmente denominados sorbatos. Constituyen los preservadores de mayor importancia comercial y se los emplea en numerosas áreas, entre las que se encuentran la alimentación humana y animal, las áreas farmacéutica y cosmética. Su utilidad como antimicrobianos depende de sus propiedades químicas, su reactividad, su solubilidad en agua y su estabilidad.

El ácido sórbico es un compuesto natural presente en el aceite de serba inmadura. Es un ácido monocarboxílico α - β insaturado de cadena lineal (Figura I.1), cuya forma comercial corresponde al isómero *trans-trans*. El grupo carboxilo es altamente reactivo, pudiendo formar varias sales y ésteres. Las sales de importancia comercial son el sorbato de calcio, de sodio y de potasio (Sofos, 1989).

Figura I.1. Estructura química del ácido sórbico.



En la Tabla I.1 se detallan las principales propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio, la sal más frecuentemente usada.

El ácido sórbico es arrastrable por vapor, propiedad que es de gran utilidad para su aislamiento e identificación (Lueck, 1976).

Como puede observarse en la Tabla I.2, el ácido sórbico es más soluble en lípidos que en agua, y a medida que se incrementa el pH de una solución acuosa, la solubilidad del preservador aumenta (Lueck, 1976). Este incremento en la solubilidad se debe a la conversión parcial del ácido en sales más solubles.

Tabla I.1. Propiedades físicas y químicas del ácido sórbico y del sorbato de potasio (Sofos, 1989).

Propiedad	Ácido sórbico	Sorbato de potasio
Masa molar (g/mol)	112,13	150,22
Punto de inflamación (°C)	126	—
Constante de ionización a 25°C	$1,73 \cdot 10^{-5}$	—
Densidad a 20°C (g/ml)	—	1,36
Rango de fusión (°C)	132 – 137	Descomposición por encima de 270°C
Calor de combustión a 25°C (Btu/lb)	11,927	—
Alcalinidad – acidez	—	1,1 ml de NaOH 0,1N a 0,8 ml de HCl 0,1N por cada 1,1g
Presión de vapor a 20°C (mm Hg)	< 0,001	—
Presión de vapor a 120°C (mm Hg)	10	—
Punto de ebullición a 760 mm Hg (°C)	descomposición	—
Punto de ebullición a 50 mm Hg (°C)	143	—

Conocer la solubilidad del ácido sórbico en diferentes solventes permite estimar la forma más adecuada de adicionar el preservador y optimizar la concentración que será retenida en el medio en función de la composición del sistema. Por ejemplo, se sabe que la presencia de macromoléculas como propilenglicol, alginatos, pectinas, etc., mejoran su solubilidad (Campos, 1995).

Las sales del ácido sórbico son solubles en agua, razón por la cual tienen gran aplicación en alimentos, en especial, el sorbato de potasio por ser la sal que presenta mayor solubilidad (Tabla I.3), además de mejores características sensoriales.

Tabla I.2. Solubilidad del ácido sórbico y del sorbato de potasio (% p/p) (Sofos, 1989).

Solvente	Ácido sórbico	Sorbato de potasio
Agua, 20°C (pH 3,1)	0,15	58,20
Agua, 20°C (pH 4,4)	0,22	—
Agua, 20°C (pH 5,9)	1,02	—
Aceite de maíz, 20°C	0,80	0,01
Aceite de soja, 20°C	0,52	—
Aceite de algodón, 20°C	1,00	0,01
Sacarosa, 10%	0,15	58,00
Sacarosa, 60%	0,08	28,00
Cloruro de sodio, 5%	0,11	47,00
Cloruro de sodio, 15%	0,04	12,00 – 15,00
Ácido acético glacial	11,50 – 12,30	—
Ácido cítrico, 50%	0,26	—
Ácido láctico, 85,5%	2,26	—
Etanol, 5%	0,16	57,40
Propilenglicol, 20°C	0,20	55,00
Glicerol, 20°C	0,31	0,20

Tabla I.3. Solubilidad de los sorbatos (Sofos, 1989).

Sorbatos	Solubilidad en agua a 20°C (% p/v)
Sorbato de potasio	58
Sorbato de sodio	28 - 32
Sorbato de calcio	1 - 2

1.1.1.2 Estabilidad química

La presencia de dobles enlaces conjugados es una característica que determina el comportamiento químico altamente reactivo del ácido sórbico y sus sales.

Pueden ocurrir distintas reacciones entre los sorbatos y otros componentes presentes en el alimento, las cuales pueden afectar la estabilidad microbiológica y sensorial del producto.

El ácido sórbico reacciona con amonio, alquilaminas, aminas aromáticas y bencilaminas a altas temperaturas (150 – 200°C). Por lo tanto, debería considerarse que en algunas situaciones, como por ejemplo la cocción del queso a las brasas, podrían formarse compuestos de adición entre el ácido sórbico y amina presentes en el producto (Khandelwal y Wedzicha, 1990).

En aditivos saborizantes y aromatizantes pueden encontrarse tioles o residuos de péptidos que contengan cisteína, los cuales pueden reaccionar con el ácido sórbico formando compuestos de adición. La presencia de surfactantes (lecitina y tween 80) y de seroalbúmina bovina actúan como catalizadores de dicha reacción (Wedzicha y Zeb, 1991, 1990).

En numerosos estudios realizados se encontró que, bajo ciertas condiciones, el ácido sórbico y el nitrito de sodio reaccionan conduciendo a la formación de compuestos con actividad genotóxica sobre las bacterias (Binstok y col., 1998; Namiki y col., 1983).

Degradación oxidativa del ácido sórbico

Los sorbatos son estables en estado puro y al abrigo de la humedad, pero, en solución acuosa presentan inestabilidad, degradándose mediante un mecanismo oxidativo (Campos y col., 1997; Gerschenson y col., 1986; Arya, 1980), el cual es su principal vía de degradación.

Se conoce que la degradación del sorbato en sistemas acuosos está acompañada de un concomitante incremento en las concentraciones de carbonilos. Arya y Thakur (1988) establecieron que el acetaldehído y la β -carboxiacroleína constituyen alrededor del 80% de los carbonilos totales encontrados en soluciones acuosas de ácido sórbico almacenadas. Además, los carbonilos formados pueden polimerizar rápidamente dando como resultado la formación de pigmentos pardos.

Pekkarinen (1969) propuso que la oxidación del ácido sórbico ocurre a través de un mecanismo en cadena, el cual se muestra en la Figura I.2. La estructura del diradical podría ser la que se muestra en la Figura I.3. Este peróxido es lábil y se transformaría en 4,5-cicloperóxido, el cual se descompondría a acetaldehído y β -carboxiacroleína, o bien polimerizaría.

Figura I.2. Mecanismo de oxidación del ácido sórbico (Pekkarinen, 1969).
S: ácido sórbico; $\text{SO}_2^{\cdot\cdot}$: diradical.

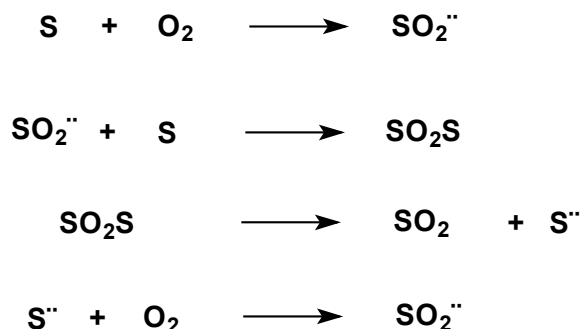
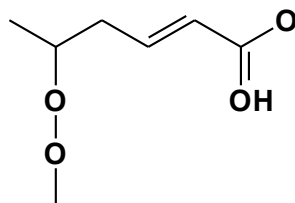


Figura I.3. Estructura química del di-radical intermediario del mecanismo de oxidación del ácido sórbico (Pekkarinen, 1969).

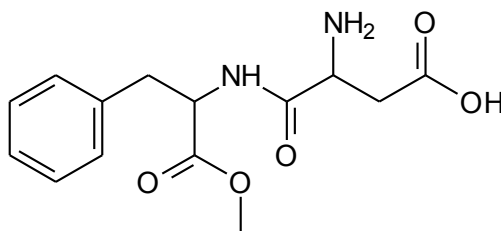


En presencia de aminoácidos, la β -carboxiacroleína se polimeriza rápidamente formando pigmentos pardos. Según Thakur y Arya (1991), cuando hay glicina presente, los aldehídos α - β insaturados se polimerizan más rápidamente que los aldehídos saturados y, en consecuencia, se obtiene una mayor proporción de acetaldehído que de β -carboxiacroleína. Debido al rápido decaimiento de los aldehídos insaturados, la concentración de carbonilos totales es significativamente menor cuando hay aminoácidos presentes (Arya, 1988).

I.1.2 El Aspartamo

I.1.2.1 Descripción y propiedades físicas y químicas

El metil ester de la α -L-aspartil-L-fenilalanina, conocido comúnmente como aspartamo es un dipéptido que está compuesto por los aminoácidos, metil-ester de la L-fenilalanina y ácido L-aspartico. La estructura del mismo se muestra en la Figura I.4.

Figura I.4. Estructura química del aspartamo.

El aspartamo es un polvo blanco, inodoro y cristalino. Posee un gusto dulce limpio como el azúcar y una potencia endulzante 200 veces la de la sacarosa (Homler 1984). Algunas de sus propiedades físicas se detallan en la Tabla I.4 (Crosby, 1976).

Tabla I.4. Propiedades físicas del aspartamo (Crosby, 1976).

^(a): De Jericó y col. (1998).

Peso molecular	294,3
Punto de fusión	Doble, aproximadamente 190 y 245°C.
Solubilidad a 25°C (mg/ml):	
Agua destilada	10,20
Metanol	8,68
Etanol (95%)	3,72
Cloroformo	0,26
Heptano	0,04
Rotación óptica (en agua)	(α)+4°
Umbral de reconocimiento	0,001-0,007%
pK ₁ ^(a)	2,4

La solubilidad del aspartamo en soluciones acuosas ácidas es apreciable, y está en el rango de 13 a 18 mg/ml. En la Tabla I.5 se encuentra la solubilidad del aspartamo a distintos valores de pH. En la misma se observa que, en general, la solubilidad disminuye con el aumento de pH en un rango de pH comprendido entre 3,72 y 7,00, siendo a pH 3,72, aproximadamente dos veces mayor que en condiciones neutras (Crosby, 1976).

Tabla I.5. Solubilidad del aspartamo en soluciones acuosas a varios niveles de pH (Crosby, 1976).

pH	Solubilidad (mg/ml) a 25°C
3,72	18,2
4,00	16,1
4,05	15,2
4,27	14,5
4,78	13,8
5,30	13,5
5,70	13,7
6,00	14,2
7,00	10,2

1.1.2.2 Estabilidad química

Debido a su condición de dipéptido, no se espera que el aspartamo sea idealmente estable en medio acuoso. Además, el hecho de poseer un grupo éster, lo hace propenso a la hidrólisis. Estas características son especialmente importantes en ciertos alimentos, tales como bebidas carbonatadas y no carbonatadas, las cuales son frecuentemente sometidas a largos períodos de almacenamiento antes de su consumo. Por otra parte, la degradación química del aspartamo afecta la percepción del dulzor del alimento ya que los productos de degradación no poseen gusto dulce, al contrario, exhiben un gusto residual (Meyer y Riha III, 2002).

En la Figura I.5 se observa el tiempo de vida media del aspartamo en función del pH en solución acuosa (Mazur, 1976). En el mismo puede advertirse que la estabilidad del aspartamo es fuertemente dependiente del pH, y que valores de pH entre 4 y 5 muestran ser los más adecuados para asegurar la estabilidad del edulcorante.

Las diferentes vías de degradación del aspartamo se esquematizan en la Figura I.6 (Hutchinson, 1999).

En medio neutro o alcalino, el par solitario de electrones sobre el grupo amino del aspártico puede atacar fácilmente el carbono carboxílico del metil éster de la fenilalanina (PM). De esta manera, el aspartamo sufriría una condensación intramolecular dando como resultado la formación de ácido 5-bencil-3,6-dioxo-2-piperazin acético (dicetopiperazina, DKP). Además, la unión éster puede hidrolizarse y formar α -aspartilfenilalanina (α -AP) con la liberación de

metanol. Ambos productos de degradación, DKP y α -AP, pueden interconvertirse, pero no pueden revertir hacia la formación de aspartamo. La α -AP puede seguir hidrolizándose formando ácido aspártico (Asp) y fenilalanina (Phe) (Pattanaargson y col., 2001; Hutchinson, 1999).

En condiciones ácidas, a valores de pH inferiores a 4,5, las reacciones de descomposición son más complejas. El grupo amino de la molécula de aspartamo probablemente esté protonado, por lo tanto, la reacción predominante será el ataque del par de electrones solitario sobre el oxígeno del grupo hidroxilo del aspártico, sobre el carbono carboxílico de la unión amida, dando lugar a la formación de PM y ácido aspártico. Además, el aspartamo puede sufrir reordenamientos estructurales y formarse β -aspartamo (β -APM). Este producto puede hidrolizarse y producir β -aspartilfenilalanina (β -AP), mientras que el PM también puede hidrolizarse y formar Phe (Pattanaargson y col., 2001; Hutchinson, 1999).

Las reacciones de formación de DKP y de β -APM son competitivas, motivo por el cual la degradación del aspartamo es una situación muy compleja. Además debe considerarse el factor pH ya que la velocidad de cada una de las reacciones depende de dicho factor, y esta dependencia no es igual para todas las reacciones (Mazur, 1976).

Figura I.5. Perfil de estabilidad del aspartamo en soluciones acuosas en función del pH (Mazur, 1976).

$t_{1/2}$: tiempo de vida media.

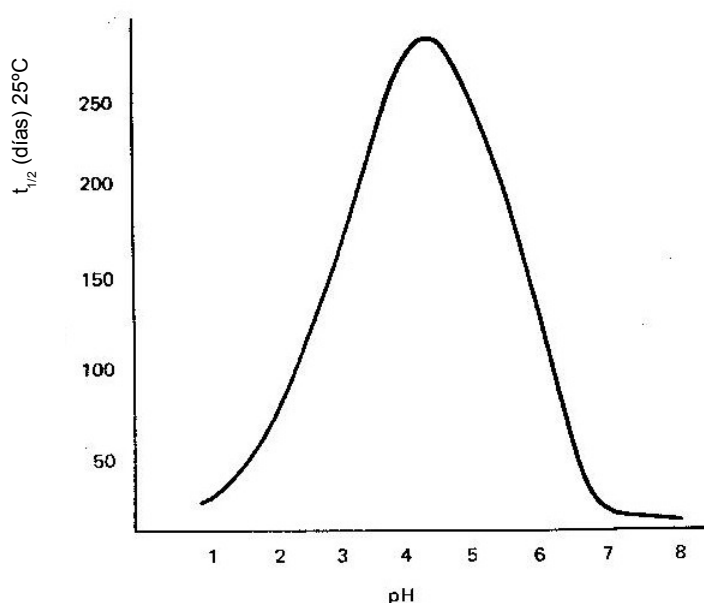
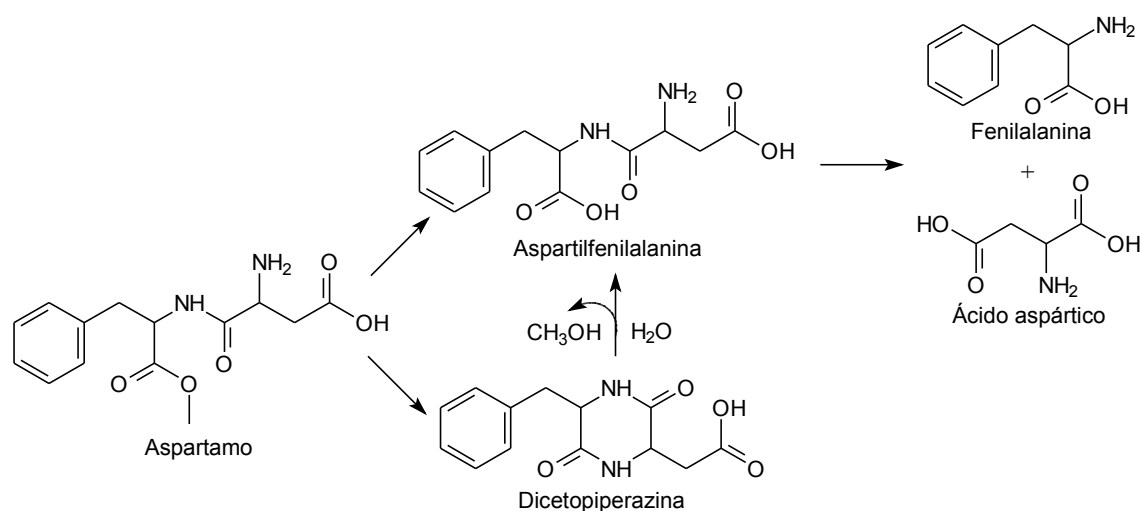


Figura I.6. Vías de degradación del aspartamo (Hutchinson, 1999).

La presencia de otros aditivos o ingredientes normalmente encontrados en los alimentos tiene poco efecto o ninguno sobre la estabilidad del edulcorante. Los datos reportados en bibliografía indican que el aspartamo posee un tiempo aproximado de vida media de 6 a 10 meses, a temperatura ambiente, en solución acuosa, y en el rango de pH normalmente encontrado en la mayoría de los alimentos y bebidas. El almacenamiento bajo refrigeración permitiría aumentar la vida media del edulcorante (Mazur, 1976).

Tateo y col. (1987) estudiaron la estabilidad del aspartamo en soluciones modelo y en bebidas tipo cola de bajas calorías. El aspartamo se degradó totalmente luego de 10 días de almacenamiento a 40 °C. Prudel y col. (1986), estudiaron la cinética de descomposición del hidrocloreto de aspartamo (APM.HCl) en soluciones acuosas y, observaron que los principales productos de descomposición fueron α -AP y DKP. Además, la concentración de este último decreció con el incremento del pH y, a pH 2,9, se formó menos α -AP y más DKP con el incremento de la temperatura. Adicionalmente, a 80 y 90°C la concentración de PM fue dos veces mayor que la obtenida a 25 y 40°C, cuando se descompuso el 50% del APM.HCl presente.

Es de destacar que, el aspartamo tiene mayor estabilidad a 40°C, en el rango de pH comprendido entre 4 y 5 y, con el aumento de pH, la misma decrece drásticamente. A 80°C la estabilidad de aspartamo tiene mayor decrecimiento en el rango de pH de 6 a 8. La estabilidad del aspartamo a 80°C es de particular interés ya que dicha temperatura es próxima a las condiciones de pasteurización. En base a ensayos de estabilidad del aspartamo en solución a

pH 3,5 y 7,0 se deduce que la degradación del edulcorante está catalizada ya sea por el medio ácido como por el básico (Hutchinson, 1999).

Bell y Labuza (1991 a) estudiaron, entre otros efectos, la variación de la actividad acuosa y de la temperatura sobre la estabilidad del aspartamo en sistemas modelo. Observaron que por cada 0,1 unidades que se incrementó la actividad acuosa en el rango de 0,3 a 0,7, la velocidad de degradación del aspartamo ascendió del 30 al 80%. A alta actividad de agua, la presencia de glucosa no tuvo efecto sobre la velocidad de destrucción del aspartamo. Las energías de inactivación de la degradación del aspartamo estuvieron en el rango de 20 a 25 kcal/mol, y disminuyeron con el incremento de la actividad de agua.

I.1.3 Los polioles

I.1.3.1 Descripción y propiedades físicas y químicas

Los polioles son alcoholes polihídricos producidos por la hidrogenación de los correspondientes azúcares reductores. Están reconocidos como aditivos GRAS (*Generally Recognize as Safe*) por la *Food and Drug Administration* (FDA) (O'Brien Nabors, 2002).

Los polioles son frecuentemente utilizados, solos o en combinación con edulcorantes de bajas calorías, reemplazando al azúcar debido a que poseen la capacidad de proveer cuerpo, mejorar la textura y la sensación en la boca.

Además de actuar como edulcorantes y agentes viscosantes, los polioles son capaces de funcionar como humectantes, depresores de la actividad de agua, de contribuir al mejoramiento de la salud de la cavidad oral ya que reducen o no promueven el riesgo de aparición de caries en los dientes. Además, causan menor incremento de la glucosa en sangre y de los niveles de insulina que los hidratos de carbono (Pszczola, 1999). Estas características amplían el uso de los polioles a alimentos confitados, y en especial, a alimentos para diabéticos.

Entre los polioles más conocidos y utilizados se mencionan el xilitol, el sorbitol y el manitol. El empleo de los mismos en los alimentos, en reemplazo de azúcares, reduce parcialmente las calorías ya que, de acuerdo a O'Brien Nabors (2002), los polioles son menos calóricos que la sacarosa. Basándose en la evaluación de muchos estudios, la FDA permite el uso de los siguientes valores energéticos: 2,4 kcal/g para xilitol, 2,6 para sorbitol y 1,6 para manitol, comparados con 4 kcal/g para sacarosa.

La absorción de los polioles en el intestino es lenta e incompleta y se realiza mediante difusión pasiva. Por consiguiente, la ingesta excesiva de los mismos (por ejemplo, más de 50g de sorbitol ó 20 g de manitol al día) posee un efecto laxante, característica que limita su uso (Giese, 1993). Si la absorción fuera completa, el metabolismo directo proporcionaría 4 kcal/g, pero la adsorción incompleta causa la metabolización indirecta de los polioles a través de una degradación fermentativa, producida por la flora intestinal, dando como resultado la obtención de menor energía (Arechederra, 2002).

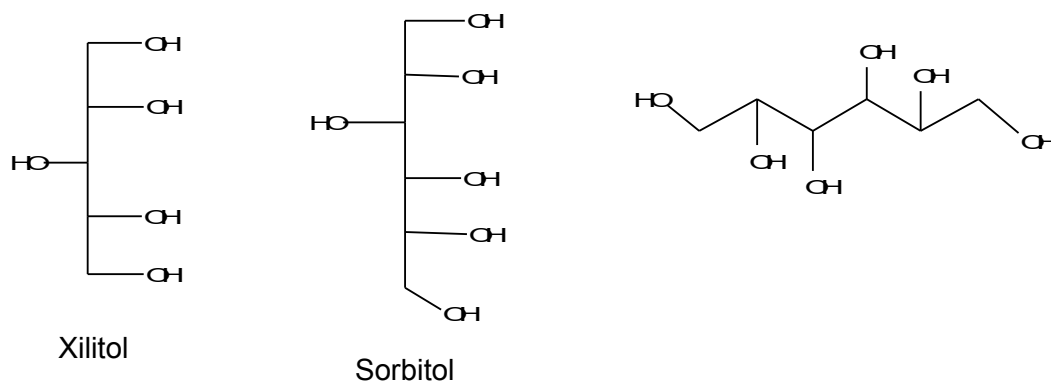
El xilitol es un poliol de cinco carbonos cuya estructura química se muestra en la Figura I.7. Posee una solubilidad similar a la de la sacarosa (O'Brien Nabors, 2002) y es relativamente higroscópico, aunque menos que el sorbitol (Pepper y Olinger, 1988). Es un producto intermediario del metabolismo normal de los hidratos de carbono en humanos y animales y, se encuentra naturalmente como constituyente de una gran variedad de frutas y vegetales tales como frambuesa, frutilla, ciruela amarilla, lechuga, coliflor y berenjena (Pepper y Olinger, 1988). Comercialmente se obtiene por hidrogenación catalítica de la D-xilosa extraída de la porción xilano-hemicelulosa del abedul (Deis, 1993).

El dulzor que posee el xilitol es equivalente al de la sacarosa. Además, en estado cristalino, provee un importante efecto refrescante debido a que tiene un calor de disolución endotérmico de 36,6 kcal/g, el cual incrementa la percepción del sabor a menta, pero es más notable en goma de mascar libre de azúcar, caramelos y vitaminas masticables. No se percibe en soluciones o en estado amorfo como jaleas o caramelos transparentes (O'Brien Nabors, 2002).

Estudios clínicos demostraron que el xilitol posee potenciales beneficios en el área de la salud. Su uso reduce substancialmente las caries y la placa bacteriana, promueve la reparación natural de los dientes por estimulación del flujo de saliva, ayudando en la limpieza y protección de la caída de los dientes e interfiere en la formación de nuevas caries (O'Brien Nabors, 2002; Pszczola, 1999; Pepper y Olinger, 1988). El xilitol no es fermentado por las bacterias de la boca, y posee efectos inhibitorios y tóxicos sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* (Pepper y Olinger, 1988). Además, inhibe el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, microorganismo responsable del 40% de los casos de infección de oídos, disminuyendo la posibilidad de contraer otitis aguda, una infección del oído medio que se manifiesta con mayor frecuencia en los niños (Pszczola, 1999).

El xilitol es utilizado principalmente en confituras como goma de mascar, caramelos, coberturas de chocolate, pastillas masticables, jaleas y mermeladas (O'Brien Nabors, 2002; Pepper y Olinger, 1988).

Figura I.7. Estructura química del xilitol, sorbitol y manitol.



El sorbitol es un poliol de seis carbonos (Figura I.7) cuyo punto de fusión es de 100°C. Es altamente higroscópico. En la naturaleza se encuentra extensamente distribuido en gran variedad de frutas (manzanas, peras, cerezas o ciruelas). Comercialmente, se produce a partir de la glucosa por hidrogenación a alta presión en presencia de níquel como catalizador o por reducción electrolítica (Giese, 1993).

El dulzor del sorbitol equivale al 60% del de la sacarosa. Este poliol produce una sensación suave en la boca proporcionando un gusto placentero y refrescante ya que posee un calor de disolución negativo, 40% menor al del xilitol (Deis, 1993). Su empleo favorece la estabilización de mezclas, por lo tanto, es importante en la producción de confituras, alimentos horneados y chocolates, productos que tienden a ponerse secos o duros. Se suele combinar con otros ingredientes, incluyendo azúcares, agentes gelificantes, proteínas y grasas vegetales. Se utiliza en goma de mascar, postres helados, rellenos y glaseados, jarabes para la tos, cápsulas de gelatina, pastas dentales y enjuagues bucales. Además, es el único que se emplea en bebidas, principalmente preparadas para diabéticos, ya que provee una fuente de energía que no requiere la estimulación de la liberación de insulina (O'Brien Nabors, 2002; Giese, 1992).

El manitol es un poliol de seis carbonos (Figura I.7), estereoisómero con el sorbitol. Es el principal constituyente del maná, un exudado del fresno; también se encuentra en

champiñones y algas marinas (Deis, 1993). Posee una solubilidad de 22% p/p en agua y un punto de fusión de 164°C. Se obtiene por la hidrogenación del azúcar invertido o de la fructosa (Giese, 1993).

El manitol ha sido ampliamente empleado en alimentos y productos farmacéuticos. Debido a que no es higroscópico, el manitol se utiliza frecuentemente en polvo, para prevenir que la goma de mascar se pegue en los equipos durante su elaboración y en el envoltorio. El elevado punto de fusión que posee permite su empleo en coberturas de chocolate para helados y productos confitados. Además, posee el mismo dulzor relativo con respecto a la sacarosa que el sorbitol, un sabor placentero y refrescante debido a su calor de disolución negativo, y tiene habilidad para enmascarar el sabor amargo de vitaminas y minerales, hierbas o ingredientes farmacéuticos activos (O'Brien Nabors, 2002; Deis, 1993).

1.1.3.2 Estabilidad química

Es importante destacar que los polioles son químicamente estables debido a que son capaces de soportar altas temperaturas. Además pueden combinarse con otros aditivos alimentarios, tales como, azúcares, agentes gelificantes, proteínas y grasas vegetales, sin sufrir alteraciones (O'Brien Nabors, 2002).

El xilitol, el sorbitol y el manitol no participan en reacciones de pardeamiento en alimentos. Esta propiedad puede ser ventajosa en cierto tipo de productos (O'Brien Nabors, 2002; Pszczola, 1999).

Carlevaro y col. (1998) relacionaron el efecto protector que poseen los polioles sobre el desarrollo de pardeamiento no enzimático a la hidratación fuertemente positiva, característica de estos polioles.

Las mencionadas propiedades hacen más interesante el uso de estos edulcorantes como reemplazantes de la sacarosa en alimentos, donde es indeseable el desarrollo de pardeamiento no enzimático.

I.1.4 Reacciones de deterioro que involucran el desarrollo de pigmentos pardos

I.1.4.1 Acerca de cómo las variaciones de color afectan la calidad de un alimento

El factor que más influye sobre la apariencia de un alimento es el color. La percepción de este atributo sensorial es el puntapié inicial en la evaluación de los alimentos por parte del consumidor, quien lo tiene en cuenta al seleccionar un producto. Otras consideraciones a tener en cuenta son las calidades microbiológica y nutricional, pero, a diferencia del color, su evaluación no es realizada por el consumidor.

La variación del color de un alimento podría considerarse como un índice de la calidad del mismo. Esta variación puede estar provocada por numerosas reacciones de deterioro, entre las que se encuentran aquéllas que involucran el desarrollo de pigmentos pardos, dando un aspecto desagradable al producto junto con la posible alteración de su calidad nutricional y microbiológica. La calidad nutricional puede afectarse si las reacciones de deterioro involucran azúcares, aminoácidos, proteínas y vitaminas, y dan como productos compuestos con menor valor nutricional. Por otro lado, las reacciones mencionadas pueden involucrar a los preservadores presentes en el alimento, por ejemplo, el ácido sórbico y/o el bisulfito de sodio disminuyendo su concentración efectiva y, por lo tanto alternando la calidad del producto.

Las principales reacciones de deterioro causantes de variaciones de color en alimentos pueden involucrar o no la acción de enzimas. El primer tipo de reacción se denomina pardeamiento enzimático y consiste en la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la enzima polifenoloxidasas. En el otro tipo, reacción de pardeamiento no enzimático, las enzimas no intervienen pero pueden participar en algún paso o generar algún intermediario reactivo. En este trabajo se hará mayor hincapié en las reacciones de pardeamiento no enzimático.

I.1.4.2 Pardeamiento no enzimático

Bajo esta denominación se incluye un conjunto de reacciones muy complejas que conducen a la formación de pigmentos pardos, así como a modificaciones, favorables o no, del flavor (Cheftel y Cheftel, 1976).

Esta serie de reacciones involucra como grupos reactivos, principalmente, a los carbonilos, los cuales provienen de compuestos que están presentes en el alimento, por

ejemplo los azúcares o el ácido ascórbico, o pueden ser potencialmente generados en el mismo, mediante la degradación del ácido sórbico, la hidrólisis de disacáridos, la oxidación de lípidos y la oxidación de alcoholes y polifenoles.

Dichas reacciones generan, a partir de los carbonilos, pigmentos pardos solubles en agua, los cuales se combinan y entrelazan con proteínas produciendo melanoidinas insolubles en agua (Knerr y col., 2001).

Las reacciones de pardeamiento no enzimático ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos y constituyen una de las principales causas de deterioro físico-químico de los mismos. Los principales efectos que pueden tener sobre el alimento son:

- cambios de color debido a la formación de pigmentos pardos y a la destrucción de pigmentos (Meschter, 1953);
- producción de sabores y aromas extraños (Pokorny, 1980);
- pérdida de valor nutritivo por el daño de, por ejemplo, aminoácidos esenciales como la L-lisina (Mauron, 1981) o vitaminas como el ácido ascórbico (Rojas, 1995; Clegg, 1964);
- liberación de dióxido de carbono (Cole, 1967);
- descenso del pH (Ellis, 1959);
- pérdida de solubilidad de proteínas con los consiguientes cambios en la textura y alteración en el poder de reconstrucción de alimentos deshidratados (Labuza y col., 1977);
- producción de metabolitos de potencial acción tóxica (Powrie y col., 1981).

Sin embargo, no siempre resulta perjudicial el desarrollo del pardeamiento no enzimático para los alimentos, sino que puede ser el responsable del color y aroma que los caracteriza, como es el caso de la cocción del pan y la carne y, la elaboración del dulce de leche y salsa de soja.

Reacciones involucradas en el pardeamiento no enzimático

El pardeamiento no enzimático en un alimento puede ocurrir por diferentes vías (BeMiller y Whistler, 1996; Song y col., 1966; Ellis, 1959). Las principales son:

- a) Caramelización
- b) Destrucción de ácido ascórbico
- c) Destrucción de ácido sórbico

d) Reacción de Maillard

La vía que predomine dependerá de factores intrínsecos del alimento, como la composición y el pH, así como de factores externos, como temperatura y tiempo de almacenamiento.

Caramelización

Involucra una serie de reacciones en cadena que parten de un equilibrio entre las formas anoméricas y acíclicas de los azúcares. A mayor concentración de la última forma, mayor posibilidad que ocurra la caramelización.

A partir de la forma acíclica se producen reacciones de enolización, de isomerización y de deshidratación, dando lugar a la formación de compuestos pardos. Las elevadas temperaturas como por ejemplo, las de cocción de alimentos, favorecen el desarrollo de estas reacciones (Braverman, 1967).

La fructosa es el azúcar que presenta mayor concentración de la forma acíclica formando un furano más inestable, y, por lo tanto, más reactivo. Sin embargo, la glucosa, si bien presenta baja reactividad al inicio, la misma se incrementa debido a la formación de intermediarios muy reactivos (Buera, 1986).

Destrucción de ácido ascórbico

El ácido ascórbico en bajas concentraciones inhibe el desarrollo de pardeamiento no enzimático y enzimático. Pero en concentraciones elevadas, como por ejemplo, las presentes en jugos cítricos, el ácido ascórbico sufre degradaciones oxidativas y no oxidativas.

Entre los principales factores que influyen sobre la degradación se encuentran, el oxígeno, que, si bien afecta a todas las reacciones de pardeamiento no enzimático, tiene un efecto más notorio en esta reacción; la presencia de trazas de metales, por ejemplo, el cobre; el ácido cítrico; enzimas como la ascórbico-oxidasa; los aminoácidos y algunos azúcares, como la fructosa y la glucosa (Rojas, 1995).

La degradación del ácido ascórbico se inicia con el equilibrio entre la forma cíclica y acíclica del ácido, asemejándose a una reacción de caramelización rápida. Se generan furfural

y 3-dioxi-pentulosa a partir de la isomerización, la descarboxilación y la deshidratación de la forma acíclica (Rojas, 1995).

Destrucción de ácido sórbico

En el caso de su empleo como preservador en un alimento, el ácido sórbico puede sufrir reacciones de autooxidación produciendo malonaldehído, compuesto intermediario muy reactivo en las reacciones de pardeamiento. Por lo tanto, el preservador ejerce un efecto acelerador de dichas reacciones. Algunos compuestos como el glicerol, aceleran la formación de compuestos pardos en presencia de ácido sórbico (Campos y col., 1997; Thakur y Arya, 1991), mientras que elementos como Co^{+2} inhiben la autooxidación (Seow y Cheah, 1985, a).

La degradación del ácido sórbico puede llegar a ser perjudicial para el alimento, no sólo desde el punto de vista sensorial, debido a la formación de pigmentos pardos, sino desde el punto de vista de la estabilidad microbiológica, ya que puede conducir a concentraciones no efectivas del preservador.

Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es una de las vías principales de pardeamiento de los alimentos. Involucra una serie de reacciones que se inician con el acoplamiento de un grupo carbonilo activo (proveniente de azúcares, ácidos, aldehídos, polifenoles, productos de oxidación de lípidos o de otros compuestos presentes en el alimento, como por ejemplo, ácido sórbico, etc.) con un grupo amino (proveniente de aminoácidos, proteínas o péptidos), seguidas de reacciones de enolización, de isomerización, fragmentaciones y deshidrataciones conocidas como reordenamiento de Amadori, que finalizan con la formación de pigmentos pardos. Este tipo de reacción de pardeamiento no enzimático es similar a la reacción de caramelización, ya que el grupo amino retiene la forma acíclica del azúcar dejando libre al grupo carbonilo. Por lo tanto, este grupo amino actúa como un acelerador de la reacción.

Esta serie de reacciones puede representarse en tres fases bien diferenciadas (Mauron, 1981; Hodge y Osman, 1967; Hodge, 1953):

- **Fase inicial.** Se produce la condensación de los grupos carbonilo y amino, formando las posteriores enolizaciones, las cuales se ven favorecidas en medio alcalino. Es una reacción reversible, que no da lugar al desarrollo de compuestos con absorción en el espectro visible ni en el UV cercano.

- Fase intermedia. La formación de hidroximetilfurfural y la fragmentación de azúcares dan inicio a esta fase de la reacción, la cual finaliza con la formación de compuestos dicarbonílicos, reductonas y pigmentos. En esta ocasión se forman compuestos incoloros o de color amarillo pálido y con absorción en el UV cercano.
- Fase final. En esta fase se desarrolla el color pardo oscuro. La misma involucra condensaciones aldólicas, polimerización y degradación de Strecker, en la cual, α -aminoácidos generan N-heterociclos, dióxido de carbono y aldehídos, todos ellos, compuestos muy importantes para el flavor. Se forman melanoidinas insolubles, desciende el pH debido a la neutralización de los grupos amino por la formación de grupos ácidos y, aumenta el poder reductor por la formación de reductonas.

Como se mencionó anteriormente, otros compuestos presentes en el alimento tales como compuestos carbonílicos provenientes de la oxidación de lípidos (Doyon y Smyrl, 1983; Suyama y Adachi, 1979), o los formados por la destrucción del ácido sórbico pueden ser sustratos de la reacción de Maillard. En este último caso, se ha reportado que los compuestos carbonílicos generados por la oxidación del ácido sórbico y la glicina poseen mayor potencial formador de pigmentos pardos que la combinación de glucosa y glicina (Buera, 1986).

En particular, un aditivo que puede estar presente en alimentos dulces, reducidos en calorías, es el edulcorante aspartamo. Al ser un metil éster de un dipéptido, el mismo aportaría el grupo amino necesario para el desarrollo de la reacción de Maillard. De esta manera, podría verse afectado su poder endulzante.

De acuerdo a Tateo y col. (1987), el aspartamo reacciona con compuestos carbonílicos presentes en ingredientes del flavor de bebidas tipo cola y también, probablemente, reaccione con compuesto carbonílicos producidos luego de la degradación del ácido sórbico.

Stamp y Labuza (1983) reportaron que la glucosa, en soluciones acuosas, reacciona con el aspartamo. Huang y col. (1987) aislaron cuatro bases de Schiff, productos de la reacción de mezclas equimolares de aspartamo y glucosa. En este estudio se concluyó que el aspartamo reaccionó con glucosa, en un estado temprano de la reacción, para formar un compuesto de Amadori. En un estado tardío, se produjeron los productos de degradación térmica del aspartamo mencionados anteriormente, los cuales reaccionaron luego con la glucosa y generaron los tres compuestos de Amadori correspondientes.

I.1.5 Objetivos

Basándose en lo expuesto, los objetivos del Capítulo I fueron:

- estudiar el efecto de distintos edulcorantes (aspartamo, sorbitol, xilitol y manitol, sacarosa y glucosa) sobre la estabilidad química del ácido sórbico;
- estudiar el efecto del ácido sórbico y de diversos edulcorantes (sorbitol, xilitol, manitol, glucosa y sacarosa) sobre la estabilidad química del aspartamo y,
- estudiar el efecto de las interacciones entre los distintos aditivos sobre el desarrollo de pardeamiento no enzimático,

en sistemas acuosos tendientes a modelar jugos, jaleas y mermeladas de reducido tenor glucídico.

I.2 Materiales y métodos

I.2.1 Formulación de los sistemas modelo

La formulación de los sistemas tuvo por objetivo el modelado de alimentos, tales como jugos, jaleas o mermeladas de reducido tenor glucídico. Para ello, se observó la composición de alimentos que estaban en venta en el mercado y se les midió el pH y la actividad de agua. Basándose en la información recopilada, se formularon sistemas modelo acuosos de pH 3,00. En los mismos, además, se consideró la reducción del nivel de azúcares, ya sea por la incorporación de un edulcorante artificial, como lo es el aspartamo, o por la incorporación de polioles, como lo son el sorbitol, el xilitol y el manitol.

I.2.1.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica, con excepción de los reactivos de la marca Gelfix, que fueron de grado alimenticio.

- Sorbato de potasio (Sigma)
- Ácido cítrico anhidro (Anedra)
- Sacarosa (Anedra)
- Glucosa (Anedra)
- Aspartamo (Gelfix)
- Sorbitol (Gelfix)
- Xilitol (Gelfix)
- Manitol (Anedra)

I.2.1.2 Composición de los sistemas modelo

Los sistemas formulados se dividen en los siguientes grupos:

- Sistemas azucarados

- Sistemas conteniendo polioles
- Sistemas conteniendo xilitol

a. Sistemas azucarados

Las composiciones de los sistemas azucarados se encuentran en la Tabla I.6.

Tabla I.6. Composición de los sistemas azucarados.

Composición (% p/p)					
Sistemas	Sorbato de potasio	Aspartamo	Sacarosa	Glucosa	Actividad acuosa
I.A	0,130	-	-	-	1,000
I.B	0,130	0,500	-	-	1,000
I.C	-	0,500	-	-	1,000
I.D	0,130	-	33,00	-	0,971
I.E	0,130	0,500	33,00	-	0,971
I.F	-	0,500	33,00	-	0,971
I.G	0,130	-	-	22,00	0,971
I.H	0,130	0,500	-	22,00	0,971
I.I	-	0,500	-	22,00	0,971

La actividad de agua medida en mermeladas y jaleas comerciales modificadas en su composición glucídica fue 0,971. Este valor corresponde a una concentración de glucosa del 22,00% p/p, y un nivel de sacarosa del 33,00% p/p.

Los sistemas de actividad de agua 1,000 sirvieron como controles del efecto del sorbato y/o del aspartamo en ausencia de humectantes.

El nivel de aspartamo corresponde al máximo establecido por el Código Alimentario Argentino para alimentos modificados en su composición glucídica (CAA, Art. 1371).

La concentración del preservador en todos los sistemas estudiados fue seleccionada considerando el máximo nivel admitido por el Código Alimentario Argentino para alimentos modificados en su composición glucídica (CAA, Art. 1376).

b. Sistemas conteniendo polioles

Las composiciones de los sistemas conteniendo polioles se encuentran en la Tabla I.7.

Tabla I.7. Composición de los sistemas conteniendo polioles.

Sistemas	Composición (% p/p)					
	Sorbato de potasio	Sorbitol	Xilitol	Manitol	Glucosa	Actividad acuosa
I.J	0,130	12,90	-	-	-	0,985
I.K	0,130	-	11,00	-	-	0,985
I.L	0,130	-	-	13,00	-	0,985
I.M	0,130	-	-	-	10,00	0,988
I.N	0,130	12,90	-	-	10,00	0,971
I.O	0,130	-	11,00	-	10,00	0,971
I.P	0,130	-	-	13,00	10,00	0,971

El Código Alimentario Argentino establece para “Alimentos modificados en su composición glucídica”, un máximo de 10% p/p de carbohidratos asimilables en el producto listo para consumir. Bajo dicha clasificación se incluyen mermeladas, compotas, jaleas, conservas de frutas, néctares, postres y otros productos similares (CAA, Art. 1371).

En cuanto al empleo sorbitol y xilitol, el Código Alimentario Argentino establece (CAA, Art. 1371), para el grupo de alimentos antes mencionados, que las cantidades a utilizar quedan a criterio de las buenas prácticas de manufactura. En cambio fija un máximo de 15% p/p en el caso de emplearse manitol.

Basándose en los requerimientos expuestos, se formularon sistemas de actividad de agua 0,971 conteniendo 10,00% p/p de glucosa y cantidad necesaria del correspondiente poliol para alcanzar dicho valor de actividad acuosa. Además se formularon sistemas controles de actividad acuosa 0,971, 0,985 ó 0,988.

Es importante destacar que Roa y Tapia (1991) establecieron que el error experimental en la determinación de actividad de agua cuando se utiliza el higrómetro empleado en el presente estudio es $\pm 0,005$ unidades de actividad de agua, como consecuencia,

consideraremos que no hay diferencias significativas entre los sistemas de actividad de agua 0,985 y 0,988.

c. Sistemas conteniendo xilitol

Las composiciones de los sistemas conteniendo xilitol se muestran en la Tabla I.8.

Para la formulación de estos sistemas se efectuaron las mismas consideraciones que las realizadas para los sistemas conteniendo polioles en lo que respecta a las concentraciones del preservador, de glucosa, de xilitol y de aspartamo empleadas.

Tabla I.8. Composición de los sistemas conteniendo xilitol.

Composición (% p/p)					
Sistemas	Sorbato de potasio	Aspartamo	Xilitol	Glucosa	Actividad acuosa
I.Q	0,130	0,500	11,00	-	0,985
I.R	-	0,500	11,00	-	0,985
I.S	0,130	0,500	-	10,00	0,988
I.T	-	0,500	-	10,00	0,988
I.U	0,130	0,500	11,00	10,00	0,971
I.V	-	0,500	11,00	10,00	0,971

I.2.1.3 Metodología

Se prepararon los diferentes sistemas de acuerdo a las composiciones detalladas. En todos los casos el pH fue ajustado a 3,00 debido al agregado de gotas de una solución de ácido cítrico 50,00% p/p.

Para la determinación del pH se empleó un electrodo de vidrio unido a un pHmetro Solution Analyzer 5800-05 (Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación del pH fue de 0,02 unidades de pH.

La actividad de agua fue medida a 25°C con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, WA, USA). Previo a la medición de la misma en los sistemas, se realizó una curva de calibración con soluciones salinas saturadas. El error en la determinación de la actividad fue de 0,005 unidades.

Para evitar la contaminación microbiana de los sistemas libres de sorbato de potasio, los mismos fueron esterilizados por filtración mediante el empleo de filtros de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro (Micron Separations Inc., USA)

Una vez preparados los sistemas, se dispensaron, por duplicado, alícuotas 15,0 ml de cada uno en frascos de vidrio oscuro y se almacenaron a 35 ± 1 °C en una cámara de convección forzada a temperatura constante. Los frascos se cerraron herméticamente para prevenir la evaporación. El espacio cabeza de aire se mantuvo constante en todos los frascos y el mismo fue el 75% del volumen total del frasco. El envasado de los sistemas libres de sorbato de potasio se realizó en forma aséptica.

Cada sistema fue retirado a intervalos de tiempo prefijados durante el almacenamiento. A dichos tiempos se midieron las concentraciones residuales de sorbato de potasio y de aspartamo, el desarrollo de pardeamiento no enzimático, el pH y la actividad de agua.

Con los datos obtenidos de las determinaciones de sorbato de potasio, de aspartamo y del desarrollo de pardeamiento no enzimático se realizaron curvas cinéticas, de las cuales se obtuvieron las constantes de velocidad.

Las mediciones de pH y de actividad de agua se realizaron para controlar dichos parámetros durante el almacenamiento.

1.2.2 Determinación del grado de hidrólisis de la sacarosa

Como es sabido, la sacarosa se hidroliza en solución ácida dando como resultado la mezcla equimolar de los dos monosacáridos que la componen, la D-glucosa y la D-fructosa. Por lo tanto, una de las formas de seguir la reacción de hidrólisis de la sacarosa es mediante mediciones de la actividad acuosa ya que el descenso de la misma, producido por la presencia de los azúcares reductores, es mayor que el producido por el agregado de sacarosa (Montes de Oca y col., 1991).

En el presente trabajo, la medición de la actividad de agua para evaluar la hidrólisis de la sacarosa se realizó en un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, WA, USA).

I.2.3 Determinación de ácido sórbico

La determinación cuantitativa del ácido sórbico requiere, en la mayoría de los casos, la extracción previa del preservador contenido en el alimento. Esto es debido a la baja concentración del mismo y a la posible presencia de sustancias que interfieren en su dosaje.

Se han aplicado diferentes técnicas para la extracción de ácido sórbico en alimentos, entre ellas se encuentran la destilación por arrastre con vapor, extracción con solventes, filtración, extracción por métodos combinados.

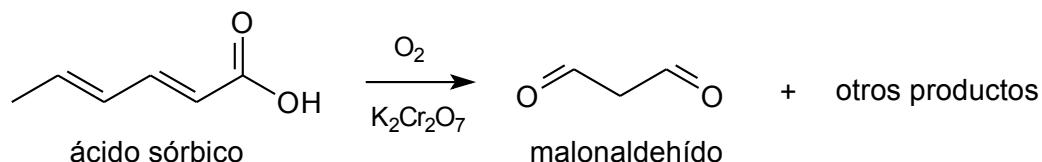
Con relación a los métodos analíticos que se aplican, la mayor parte de los mismos son inespecíficos y, por lo tanto, pueden estar afectados por los componentes del alimento y por los productos formados durante el almacenamiento de los mismos. Entre ellos pueden mencionarse las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, cromatográficas y microbiológicas.

I.2.3.1 Técnica empleada para la determinación de ácido sórbico

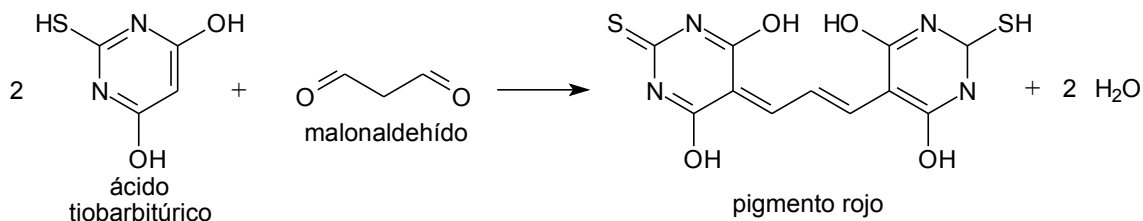
Para la cuantificación del contenido de ácido sórbico de los sistemas estudiados se utilizó el método de oxidación oficial propuesto por la AOAC (1990), el cual involucra dos etapas:

Primera etapa: consiste en la extracción del preservador mediante una destilación por arrastre con vapor, previa acidificación de la muestra a fin de desplazar el equilibrio del sorbato hacia la forma ácida, la cual es volátil y arrastrable con vapor.

Segunda etapa: consiste en la oxidación del preservador a malonaldehído por adición de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en medio ácido:



Luego, se hace reaccionar el malonaldehído con ácido tiobarbitúrico formándose un pigmento rojo que se cuantifica colorimétricamente a 532 nm:



Campos y col. (1991) establecieron la precisión de esta técnica mediante la determinación del coeficiente de variación, siendo el mismo, 3,4%.

a) Primera etapa

De los métodos de extracción mencionados, el arrastre con vapor es una técnica de uso sencillo, que no genera desechos contaminantes, ya que no requiere el empleo de solventes. Además, los sistemas de estudio, al ser de composición simple, no presentan sustancias interferentes.

La destilación por arrastre con vapor ha sido ampliamente usada para la separación de ácido sórbico previo a su determinación cuantitativa y, se basa en la volatilidad del preservador el cual es arrastrado por vapor. Para lograr una extracción eficiente, se debe trabajar en condiciones ácidas y con un alto contenido de sales. Entre los distintos ácidos y sales usados para tal fin, se encuentran el ácido tartárico (Werner y Jensen, 1981), los ácidos fosfórico y sulfúrico; sulfato de magnesio heptahidratado y sulfato de sodio (AOAC, 1990).

La destilación por arrastre con vapor se ha aplicado para la extracción de ácido sórbico de quesos (Werner y Jensen, 1981; Melnick y Luckman, 1954), productos de panadería, vino, frutas y vegetales (Di Sipio, 1992; Gerschenson y col., 1986), productos cárnicos (Binstok, 1998; Campos, 1995) entre otros.

b. Segunda etapa

La reacción colorimétrica involucrada en esta etapa es muy sensible y permite cuantificar bajos niveles de ácido sórbico, los cuales están en el orden de 1 mg/l en el destilado (Lueck, 1976). Este método se utilizó para el dosaje de sorbatos en frutas (Díaz de Tablante y col., 1993; García y col., 1993), quesos (Willamoswki, 1971), sistemas modelo acuosos (Gerschenson y col., 1987 y 1986).

El uso de la mencionada técnica colorimétrica para la cuantificación de ácido sórbico es conveniente desde el punto de vista práctico, ya que es un método rápido, simple y sencillo.

Sin embargo, algunos componentes, como ácidos grasos o compuestos volátiles, pueden generar color al ser tratados con el ácido tiobarbitúrico y, por lo tanto, interferir en la determinación. Esto puede determinarse mediante la adición de ácido tiobarbitúrico al destilado antes de realizar la oxidación con dicromato de potasio. En caso de haber sustancias interferentes, se debe hacer un tratamiento previo del destilado para eliminarlas (Pekkarinen, 1964).

Es importante destacar que la presencia de sacarosa, glucosa y lisina en soluciones acuosas de actividad de agua 0,94 y, la de sus productos de degradación generados durante el almacenamiento de dichas soluciones no interfieren en la determinación de ácido sórbico mediante el empleo de esta técnica (Gerschenson y col., 1986).

1.2.3.2 Metodología de la técnica de medición empleada

a) Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica. Los mismos fueron:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Anedra).
- H_2SO_4 (98% p/p, Anedra): soluciones 2 N y 0,3 N.
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck): se disuelven 1,470 g en agua destilada y se lleva a volumen final de 1000 ml.
- NaOH (97% p/p, Merck): solución 0,5 N.
- HCl (37% p/p, Mallinckrodt): solución 0,1 N.
- Sorbato de potasio (Sigma): solución estándar que se obtiene disolviendo 134 mg de sorbato de potasio en 1000 ml de agua destilada. En heladera, al abrigo de la luz, se conserva varios días.
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma): solución 0,500% que se obtiene disolviendo 250 mg de ácido tiobarbitúrico en 5,0 ml de solución de NaOH en un matraz de 50 ml. Se coloca el mismo en agua caliente y se agita hasta completa disolución del ácido; luego, se agregan 20 ml de agua destilada y se neutraliza con 3 ml de solución 0,1 N de HCl. Finalmente, se lleva a volumen final con agua destilada. La solución debe prepararse diariamente. En época invernal, una vez preparada, mantener a 20°C para evitar la precipitación del ácido.

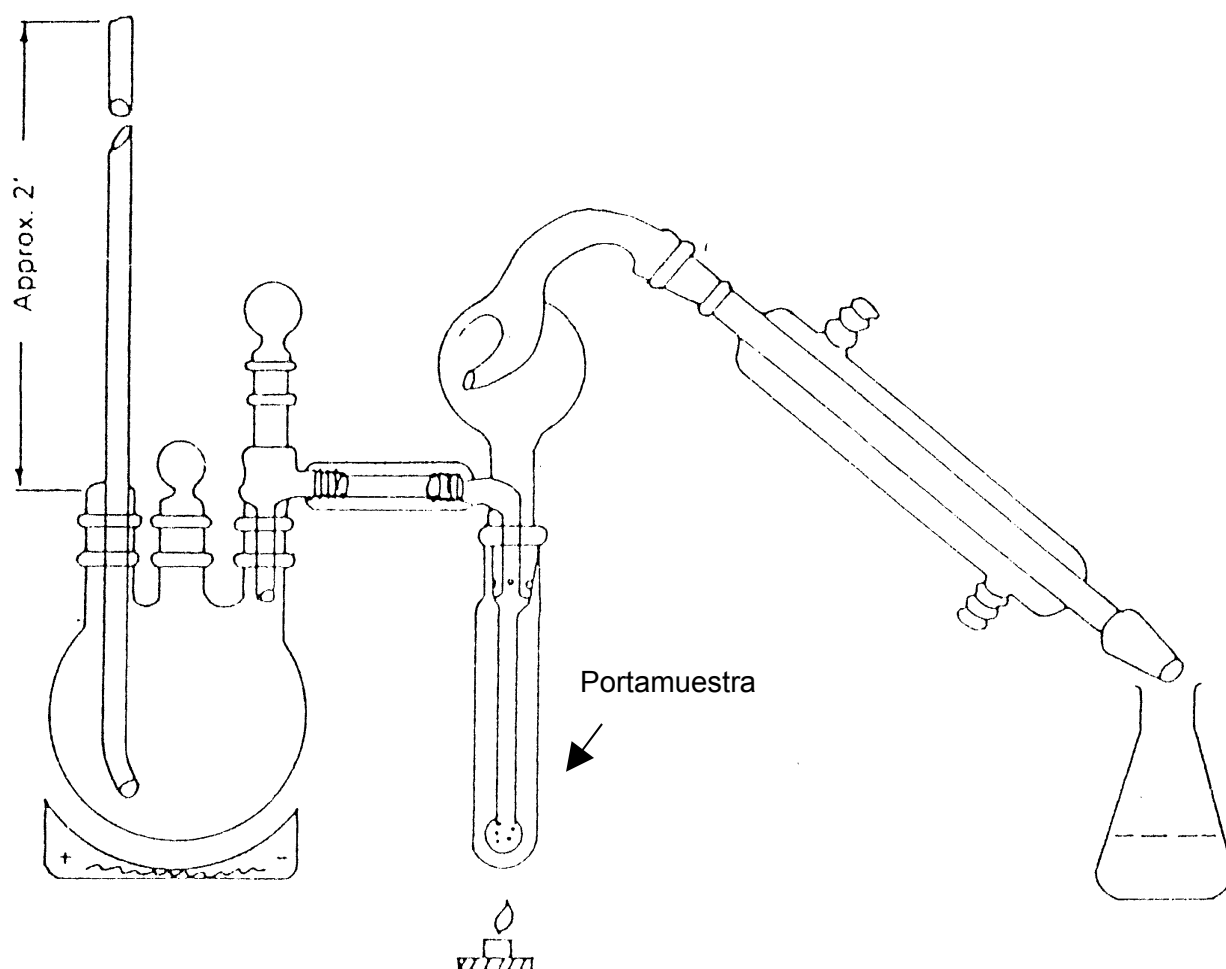
b. Primera etapa: Extracción del ácido sórbico

El equipo de extracción por arrastre con vapor utilizado se esquematiza en la Figura I.8.

Se colocan en el portamuestra entre 1,5 y 2,0 g de muestra y se adiciona al mismo 10 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 10 ml de solución 2 N de H_2SO_4 . El portamuestra se coloca en el equipo de extracción (Figura I.8) y se realiza la destilación por arrastre con vapor recogiéndose 200 ml de destilado, el cual se diluye con agua destilada hasta un volumen final de 500 ml. Luego, se reserva una alícuota para la cuantificación posterior.

Siguiendo las indicaciones mencionadas por la AOAC (sección 20.101) deben tenerse precauciones durante la operación de destilación, las cuales son, evitar que el volumen del líquido supere el 50% del volumen total del portamuestra y, evitar que la muestra se carbonice. Estos factores se controlan mediante la regulación de la entrada de gas del mechero ubicado bajo el portamuestra.

Figura I.8. Esquema del equipo de destilación utilizado para la extracción del ácido sórbico mediante destilación por arrastre con vapor (AOAC, 1990).



c. Segunda etapa: Oxidación y cuantificación espectrofotométrica

Se coloca en un tubo de ensayos una alícuota de 2,0 ml de destilado y se le adicionan 1,0 ml de solución 0,3 N de H_2SO_4 y 1,0 ml de solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Se calienta durante 5 minutos en un baño de agua en ebullición. Luego, se enfría inmediatamente en un baño de hielo y se le adiciona 2,0 ml de solución de ácido tiobarbitúrico. Se vuelve a calentar en el baño de agua por un período de 10 minutos, al cabo del cual se enfría y se mide la absorbancia del complejo rojo formado, a 532 nm, en un espectrofotómetro (Beckman, Fullerton, California, USA) contra un blanco de reactivos.

d. Curva de calibración

Se realiza una curva de calibración con patrones, los cuales se preparan tomando 0,5, 1,0, 2,0 y 3,0 ml de la solución estándar, respectivamente, y se los lleva a volumen final de 100 ml con agua destilada. Se miden alícuotas de 2,0 ml de cada solución patrón y se colocan en tubos de ensayos. Luego, se procede según se indicó en el párrafo anterior.

Una curva de calibración típica obtenida, es la siguiente:

Concentración de ácido sórbico ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia a 532 nm
0,25	0,011
0,50	0,055
1,00	0,220
2,00	0,440
3,00	0,650

En todas las curvas de calibración realizadas se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99.

En el caso de destilados con un nivel de preservador superior a la máxima concentración considerada en la curva de calibración, se emplea la misma metodología

descripta en el primer párrafo de esta sección, pero con la diferencia del empleo de 1,0 ml de destilado y 1,0 ml de agua, en lugar de 2,0 ml de destilado.

1.2.4 Determinación de aspartamo

Existen diferentes métodos analíticos para la determinación del contenido de aspartamo en alimentos, entre ellos se encuentran, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), las técnicas enzimáticas y espectrofotométricas.

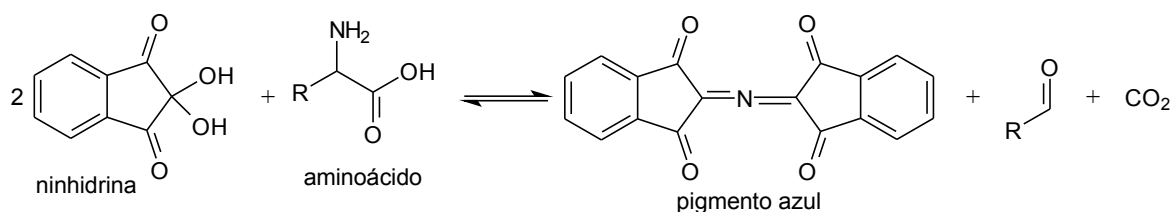
La técnica de HPLC es la más comúnmente usada para la determinación de aspartamo en alimentos (Pattanaargson y col., 2001; Wang y Schroeder, 2000; Huang y col., 1987). Si bien es una técnica de determinación directa, requiere, en algunos casos, un extenso pretratamiento de la muestra antes de la determinación cromatográfica. En sistemas complejos, el edulcorante debe extraerse del sistema, para lo cual se han empleado técnicas de extracción con solventes (Keller y col., 1991; Dever y col., 1986), centrifugación y filtración (Bell y Labuza, 1991b; Ho y col., 1987).

Los métodos espectrofotométricos han sido bastante estudiados y aplicados. Tienen la ventaja de simplificar la medición del aspartamo y, por lo tanto, son adecuados para análisis de rutina. Se basan en la reactividad del edulcorante frente a un reactivo, dando como resultado la formación de un producto coloreado, el cual puede medirse con un espectrofotómetro. Entre los reactivos colorimétricos empleados pueden mencionarse, dietilditiocarbamato, 4-dimetilaminobenzaldehído, *p*-benzoquinona y ninhidrina (Tunçel y Araman, 1989; Lau y col., 1988). Sin embargo, estos métodos están sujetos a interferencias, por ejemplo, 4-dimetilaminobenzaldehído no es aplicable a muestras que contienen leucina y, el método que utiliza *p*-benzoquinona tiene como interferentes algunos compuestos que absorben a 450 nm y que están presentes en bebidas no alcohólicas.

1.2.4.1 Técnica empleada para la determinación de aspartamo

El método empleado en este trabajo para la cuantificación de aspartamo de los sistemas estudiados fue el propuesto por Tunçel y Araman (1989), el cual se basa en la reactividad del edulcorante frente a ninhidrina a pH 3,5, regulado por un buffer de acético / acetato empleando la mezcla metil etil cetona / etanol (1:1) como solvente.

La ninhidrina reacciona, en general, con aminoácidos dando como resultado la formación de un pigmento azul, conocido como púrpura de Ruhemann's:



El compuesto coloreado obtenido se cuantifica colorimétricamente a 572 nm.

El método empleado es uno de los métodos más importantes desde el punto de vista técnico e histórico, y ha sido aplicado durante muchos años a la detección y cuantificación de aminoácidos en cantidades del orden de microgramos (Lehninger y col., 1993). La ninhidrina reacciona con los aminoácidos que tienen el grupo α -amino libre, por lo tanto, los mismos resultan ser interferentes en la determinación de aspartamo mediante este método. Sin embargo, la ninhidrina es el reactivo colorimétrico más sensible de los cuatro anteriormente mencionados. Diversos autores utilizaron con éxito esta técnica en la determinación de aspartamo en bebidas no alcohólicas (Lau y col., 1988) y, en alimentos dietéticos saborizados, como bebidas no carbonatadas, budines y jaleas (Tunçel y Araman, 1989).

Con el objeto de incrementar la selectividad de la determinación de aspartamo en soluciones acuosas, se emplea un solvente orgánico como medio de reacción, necesario para la extracción del aspartamo. Entre los solventes orgánicos empleados, se encuentran el carbonato de propileno (Lau y col., 1988) y la mezcla de iguales proporciones de etil metil cetona, etanol y agua destilada (Tunçel y Araman, 1989), en los cuales el aspartamo es moderadamente soluble a temperatura ambiente.

La extracción del aspartamo de soluciones acuosas se basa en la alta solubilidad de la forma no disociada del mismo en el solvente de extracción. Esto se logra mediante la regulación del pH de la solución acuosa. Lau y col., (1988) reportaron que el empleo de buffer acetato a pH 3,5 produce mayor porcentaje de extracción del edulcorante que el uso de buffer fosfato en el rango de pH comprendido entre 5,0 y 8,0.

1.2.4.2 Metodología de la técnica de medición empleada

a) Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica, con excepción del aspartamo que fue de grado alimenticio.

- Etil metil cetona (Anedra)
- Alcohol etílico Absoluto (Anedra)
- Aspartamo (Gelfix): solución estándar 0,1% p/v, la cual se obtiene disolviendo 50 mg de aspartamo en 50 ml de la mezcla etil metil cetona/etanol/agua destilada (1:1:1).
- Ninhidrina (Merck): se prepara una solución disolviendo 0,400 g en 100 ml de etanol.
- Buffer acetato (pH 3,5): se disuelven 11,67 g de acetato de sodio anhidro (Mallinckrodt) en 1000 ml de una solución de ácido acético (Anedra) 2,5 M.

b. Determinación del contenido de aspartamo en los sistemas

Se colocan 1,5 ml de muestra en un tubo de ensayos, se le adicionan 0,5 ml de agua destilada y 4 ml de mezcla etil metil cetona / etanol (1:1). Se agita y, se toman 0,15 ml que se colocan en un frasco de 25 ml. Luego, se adicionan 0,1 ml de buffer acetato y 2 ml de solución de ninhidrina. Los frascos se sumergen en un baño de agua a 100°C durante 15 minutos. Luego de enfriar en baño de agua con hielo, se lleva el volumen a 25 ml con la mezcla etil metil cetona / etanol / agua destilada (1:1:1) y se mide la absorbancia a 572 nm con un espectrofotómetro (Beckman, Fullerton, California, USA) contra un blanco de reactivos preparado de la misma manera que los sistemas.

c. Curva de calibración

Para realizar la curva de calibración se preparan patrones tomando alícuotas de 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 y 0,30 ml de la solución estándar de aspartamo y se las coloca en frascos de 25 ml. Luego se procede según se indicó en el párrafo anterior.

Una curva de calibración típica obtenida, es la siguiente:

Concentración de aspartamo ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia a 572 nm
4,0	0,21
6,0	0,32
8,0	0,41
10,0	0,52
12,0	0,64

En la mayoría de las curvas de calibración realizadas se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0,99.

En el caso de sistemas con un nivel de edulcorante superior a la máxima concentración considerada en la curva de calibración, se utiliza la misma metodología descrita, pero con la diferencia del empleo de 0,5 ml de muestra, 0,5 ml de agua y 2 ml de mezcla etil metil cetona / etanol (1:1).

I.2.5 Determinación del desarrollo de pardeamiento no enzimático

El pardeamiento no enzimático puede evaluarse a través de diferentes metodologías, las cuales involucran métodos subjetivos y métodos instrumentales que puedan correlacionarse con los primeros.

Si lo que se busca es el óptimo diseño de procesos, la medición instrumental es, de ambos métodos, el más objetivo, reproducible y sencillo, ya que proporciona información útil y cuantitativa para la evaluación de la calidad. Este método involucra la determinación espectrofotométrica del color como técnica de análisis cuantitativo de la apariencia.

Los métodos subjetivos consideran la evaluación sensorial desde el punto de vista del consumidor y complementan la información obtenida mediante el empleo de los métodos instrumentales. De esta manera, definen la selección de las condiciones de proceso, ya que determinan la aceptabilidad sensorial de un producto.

1.2.5.1 Métodos instrumentales

Dentro de los métodos instrumentales que se utilizan para la evaluación del pardeamiento no enzimático se encuentran la medición de la absorbancia a 420-450 nm y la medición del color.

a) Medición de la absorbancia a 420-450 nm

Se emplea en alimentos transparentes o en extractos de alimentos turbios o sólidos. Diferentes autores (Campos y col., 1997; Wedzicha y col., 1991; Thakur y Arya, 1991; Seow y Cheah, 1985 b) utilizan el rango 420-470 nm de longitud de onda para la medición del color marrón. Esto se debe a que este color no presenta un máximo característico, ya que no es un color puro, por lo tanto, no absorbe a una longitud de onda determinada.

Algunas de las desventajas que presenta este método pueden resumirse en:

- la pérdida de información debido a que muchos pigmentos no se detectan a la longitud de onda medida;
- la variación en la medición de absorbancia debido a la formación de insaturaciones y/o conjugaciones sin la formación de pigmentos o, la presencia de sustancias que afecten la curva de transmitancia (ej. el anión bisulfito) y la formación de compuestos fluorescentes.

Por los motivos comentados, no es aconsejable la medición de absorbancia como único método, sino que debería complementarse con la medición de otros parámetros, por ej. CO₂, pH, aminoácidos, etc.

b. Medición del color

Algunas consideraciones acerca del color de los objetos

La radiación electromagnética a la cual el ojo humano es sensible se encuentra comprendida en el rango de 380 a 770 nm. Un complejo mecanismo trivalente permite, al sistema visual, poder discriminar radiaciones de diferentes longitudes de onda estableciendo su color.

Las leyes de Grassman constituyen los principios fundamentales de la colorimetría. De acuerdo a la ley principal, cualquier color puede formarse por la suma de las proporciones de tres colores primarios, independientes entre sí, es decir, ninguno puede ser obtenido por la

combinación de los otros dos. Estos colores son: rojo, verde y azul. La suma de los mismos produce la sensación de luz blanca o cromática.

La absorción selectiva de una determinada radiación electromagnética de luz, usualmente blanca, es la responsable del color de los objetos sobre los cuales dicha luz incide. Además, existen otros factores que intervienen en la percepción del color, los cuales son: la distribución de la energía espectral del iluminante, es decir, la clase de luz que ilumina al objeto; las características espectrales del objeto con respecto a la absorción, reflexión y transmisión de la luz; las condiciones bajo las cuales el color es visto, tales como el ángulo de visión, el color del contorno, el nivel de iluminación y la sensibilidad del observador (Francis y Clydesdale, 1975).

Por otra parte, los objetos pueden encuadrarse dentro de tres grandes grupos:

- opacos, si no dejan pasar la radiación a través de ellos;
- transparentes, si no modifican mayormente la trayectoria de la radiación incidente y,
- translúcidos, si modifican la mayor parte del flujo incidente, transmitiéndolo o reflejándolo en distintas direcciones respecto a la dirección incidente.

Además, los atributos geométricos pueden establecer dos tipos de reflexión, la especular, cuando coinciden los ángulos de la luz incidente y la reflejada y, la difusa, cuando el rayo incidente se refleja en otras direcciones distintas de la especular. Diferentes combinaciones de los tipos de reflexión originan los fenómenos de la apariencia tales como el brillo y el lustre.

Fundamentos teóricos de la medición cuantitativa del color

Fundamentándose en lo expuesto anteriormente, es notable la dificultad de reemplazar la observación visual por una medida instrumental y cuantitativa.

La Comisión Internationale de l'Eclairage (CIE) estableció un sistema para la especificación del color. Debido a que el flujo radiante que recibe el observador depende de qué fracción de luz incidente sobre un objeto es transmitida o reflejada por el mismo en su dirección, para la especificación de un color, este sistema considera el factor de transmitancia o reflectancia espectral, la distribución energética de la luz incidente o iluminante y el análisis por el sistema visual de acuerdo con tres colores primarios virtuales elegidos, relacionados con el rojo, verde y azul. El factor de transmitancia o reflectancia espectral se obtiene mediante un espectrofotómetro. La distribución energética de diversos iluminantes es conocida, por ejemplo, el llamado iluminante C (CIE) tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (promedio de la distribución

de la luz del cielo del hemisferio norte en días nublados, con una temperatura correlacionada de 6800 K). El producto del factor de transmitancia o reflectancia espectral y la distribución energética de la luz da como resultado la intensidad de radiación que recibiría un observador a cada longitud de onda. Por otra parte, los colores primarios seleccionados por la CIE son imaginarios y se obtuvieron a partir de experiencias realizadas con los colores primarios reales y diversos observadores.

Basándose en lo anteriormente expuesto, el color se indica mediante tres variables (X, Y, Z) denominadas valores triestímulo. Las mismas se obtienen por integración del producto de la intensidad de la radiación que recibirá un observador a cada longitud de onda y la contribución de cada color primario (Lozano, 1978).

Los espectrofotómetros modernos realizan automáticamente este cálculo mediante un sistema de computación acoplado al instrumento. De esta manera, el color queda determinado en un espacio tridimensional de coordenadas X, Y, Z. Sin embargo, habitualmente el color se representa, en un plano, cuyas coordenadas son las llamadas coordenadas cromáticas x, y definidas como:

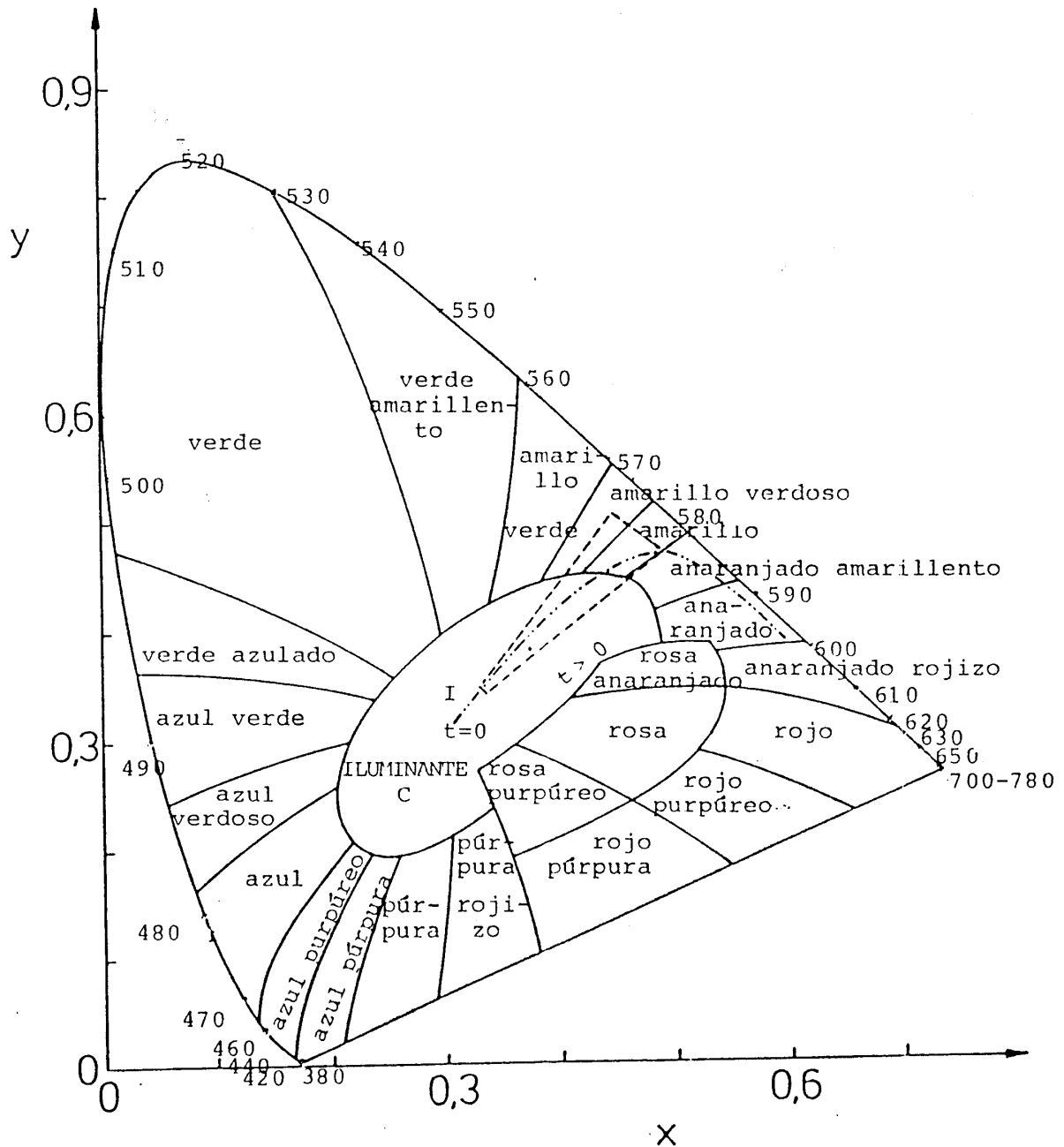
$$x = \frac{X}{X + Y + Z} \quad \text{Ecuación I.1}$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z} \quad \text{Ecuación I.2}$$

En la Figura I.9 se representa el diagrama de cromaticidades CIE. En el mismo, sólo se considera la cromaticidad del color en cuestión. Para completar la especificación del color es necesario agregar una tercera coordenada correspondiente a la luminosidad o claridad del color. El valor Y constituye esta propiedad ya que, por sus características de cálculo, representa la posibilidad de reflejar más o menos luz.

En el diagrama CIE se delimita el plano de coordenadas cromáticas por una curva, en forma de herradura, sobre la que se encuentran los colores espectrales puros, cerrada por una línea recta que une los extremos del espectro visible, conocida como línea de púrpuras (Lozano, 1978).

Figura I.9. Diagrama de cromaticidades CIE.



La distancia entre dos puntos del diagrama permitiría obtener la diferencia entre dos colores, pero este procedimiento no es aplicable debido a que el espacio CIE no es homogéneo, es decir, distancias iguales no suelen corresponderse con diferencias de color iguales en la percepción del ojo humano. Por lo tanto, para subsanar este inconveniente, se

desarrollaron transformaciones del espacio CIE, las mismas son CIELAB y CIELUV (Lozano, 1979). El sistema CIELUV es una transformación lineal del espacio CIE.

Dentro de estos espacios pueden definirse funciones indicativas de atributos del color, como la saturación y el tono (Hunt, 1977). El tono es el atributo que adjudica al color una cualidad que se define como rojo, verde, azul, etc. La saturación, una vez fijado el tono, describe al color por su similitud con un color espectral puro y, cuanto más parecido a éste, tanto más saturado es.

Existe una correlación entre las propiedades psicológicas, tono y saturación, con las propiedades psicofísicas. Al tono le corresponde la propiedad longitud de onda dominante. La misma se obtiene gráficamente uniendo las coordenadas cromáticas del color con las del iluminante, la prolongación de esta recta hasta su encuentro con la línea de colores espectrales determina la longitud de onda dominante en el punto de intersección.

La saturación se representa por la propiedad psicofísica pureza, la cual puede calcularse como:

$$p = \frac{x - x_w}{x_p - x_w} \quad \text{Ecuación I.3}$$

donde:

x: coordenada cromática del color;

x_w : coordenada cromática del iluminante, y

x_p : coordenada cromática del color espectral puro

El color ubicado sobre la línea de colores espectrales, tiene una pureza de 1, mientras que objetos transparentes poseen una pureza menor a 0,1.

Buera y col. (1986) establecieron la curva que describe el desplazamiento cromático correspondiente al pardeamiento de soluciones tratadas térmicamente (Figura I.9). A medida que se incrementa el pardeamiento, el color se va desplazando hacia la zona del rojo. Si se eliminan los puntos de pureza menor a 0,1 (soluciones transparentes) y mayor a 0,9 (soluciones demasiado oscuras) se determina que el color marrón, asociado a reacciones de pardeamiento no enzimático, tiene longitudes de onda dominantes comprendidas entre 573 y 580 nm. El trapecioide que de esta manera queda delimitado contiene la curva que describe el

fenómeno y, cualquier punto que caiga dentro del mismo, pertenecerá a una muestra de color pardo. Dicha curva puede expresarse en función de las coordenadas de cromaticidad de la siguiente manera:

$$y = 0,067 + 0,853x \quad \text{Ecuación I.4}$$

Su rango de validez está comprendido entre:

$$0,3221 < x < 0,4825 \quad \text{Ecuación I.5}$$

$$0,3418 < y < 0,4786 \quad \text{Ecuación I.6}$$

Por lo tanto, el desarrollo de pardeamiento no enzimático de una muestra puede seguirse mediante la evaluación del índice de pureza y, por consiguiente, de la saturación.

En la práctica, para la determinación del color en los alimentos se emplean colorímetros tipo Hunter y similares (Francis y Clydesdale, 1975). Los mismos cubren todo el espectro visible (380-770 nm) y utilizan sistemas de filtros que reproducen más o menos bien un sistema de visión triestímulo, otorgándole una sensibilidad parecida a la del ojo humano. Son menos sensibles que un espectrofotómetro, pero de más fácil uso y menos costosos.

1.2.5.2 Función de color empleada para la determinación del pardeamiento no enzimático

Para realizar el seguimiento del desarrollo de pardeamiento no enzimático en las muestras estudiadas, se emplea la función *Índice de Pardeamiento* (IP) propuesta por Buera y col. (1986), debido a que la misma presenta una relación lineal respecto al grado de pardeamiento. Dicha función está basada en la determinación de la pureza del color marrón (Ecuación I.3) y presenta la siguiente expresión:

$$IP = \frac{100x(x - 0.31)}{0.172} \quad \text{Ecuación I.7}$$

donde:

x: coordenada cromática definida por la Ecuación I.1,

0,31: coordenada cromática del iluminante C y,

0,172: diferencia entre la coordenada cromática del color puro espectral y la coordenada cromática del iluminante C.

El color marrón es el predominante en procesos de pardeamiento y es el indicador cromático de la degradación de productos alimenticios que poseen como compuesto mayoritario al azúcar (frutas, cereales, miel y derivados de los mismos).

1.2.5.3 Metodología empleada para la determinación del pardeamiento no enzimático

Se coloca una alícuota de 1 ml de muestra en un recipiente cilíndrico de acrílico, especialmente diseñado. La base del recipiente se apoya sobre una placa blanca. Luego, mediante el empleo de un colorímetro (Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón), se miden los valores triestímulo de la muestra utilizando el iluminante C, y un ángulo de observación estándar de 2°. En la Figura I.10 se muestra un esquema del colorímetro y del recipiente utilizado. A partir de los valores obtenidos se calcula la coordenada cromática x y y , mediante el empleo de la Ecuación I.7, se obtiene el IP.

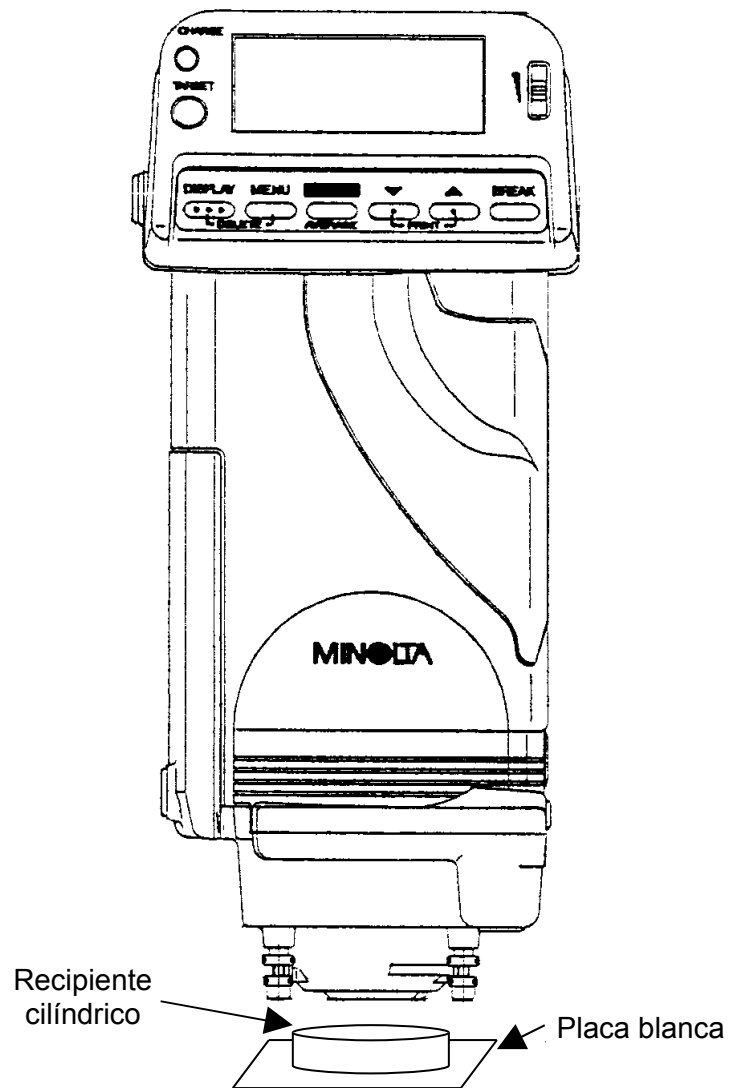
1.2.6 Análisis estadístico

Se estimaron, por regresión lineal de los datos, las constantes de velocidad de destrucción del ácido sórbico, del aspartamo y del pardeamiento no enzimático.

Para establecer las diferencias significativas entre las constantes de velocidad de cada uno de los sistemas se realizó un análisis de covarianza para la igualdad de pendientes (ANCOVA) y el test *a posteriori* de mínimas diferencias significativas (LSD) (Sokal y Rohlf, 1980). La significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$).

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus para Windows, versión 3,0, 1997, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA).

Figura I.10. Esquema del colorímetro y del recipiente utilizados en la medición de los parámetros triestímulo de las muestras.



1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Resultados generales de la estabilidad química de los sistemas

1.3.1.1 Determinación del pH y la actividad de agua durante el almacenamiento de los sistemas

En todos los sistemas no se observaron variaciones estadísticamente significativas del pH durante el almacenamiento.

Referente a las determinaciones de actividad acuosa, tampoco se observaron cambios en todos los sistemas, excepto en aquellos que contienen sacarosa en su formulación (sistemas I.D, I.E y I.F). En estos sistemas, luego de 3 semanas de almacenamiento, la actividad acuosa descendió desde un valor de 0,971 a 0,944, aproximadamente, dependiendo del sistema.

1.3.1.2 Estabilidad del ácido sórbico

En todos los sistemas estudiados, la degradación del ácido sórbico exhibió constantes de velocidad de reacción de primer orden. En la Figura I.11 se muestra un ejemplo de dicha cinética en los sistemas conteniendo aspartamo (sistema I.B), xilitol y glucosa (sistema I.O) y, aspartamo y glucosa (sistema I.S). Este comportamiento concuerda con la información previamente publicada (Campos y Gerschenson, 1996; Gerschenson y Campos, 1995; Thakur y col., 1994; Gerschenson y col., 1986; Seow y Cheah, 1985 a; Arya, 1980).

1.3.1.3 Estabilidad del aspartamo

En todos los sistemas estudiados, la degradación aspartamo exhibió constantes de velocidad de reacción de pseudo-primer orden. La cinética de los sistemas conteniendo sorbato de potasio (sistema I.B) y sorbato de potasio y glucosa (sistema I.S) se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura I.12. Este comportamiento concuerda con la información previamente publicada (Bell y Labuza, 1991 a, b; Tsoubeli y Labuza, 1991; Dever y col., 1986; Prudel y col., 1986). Debe remarcarse que la pérdida de aspartamo en los sistemas estudiados fue

aproximadamente del 10 al 30%, por lo tanto, es importante considerar que este hecho puede generar incertidumbre en el cálculo del orden de la reacción (Labuza y Riboh, 1982).

Figura I.11. Cinética de degradación del ácido sórbico (KS) en los sistemas conteniendo aspartamo (sistema I.B) (Panel a), xilitol y glucosa (sistema I.O) (Panel b) y aspartamo y glucosa (sistema I.S) (Panel c).

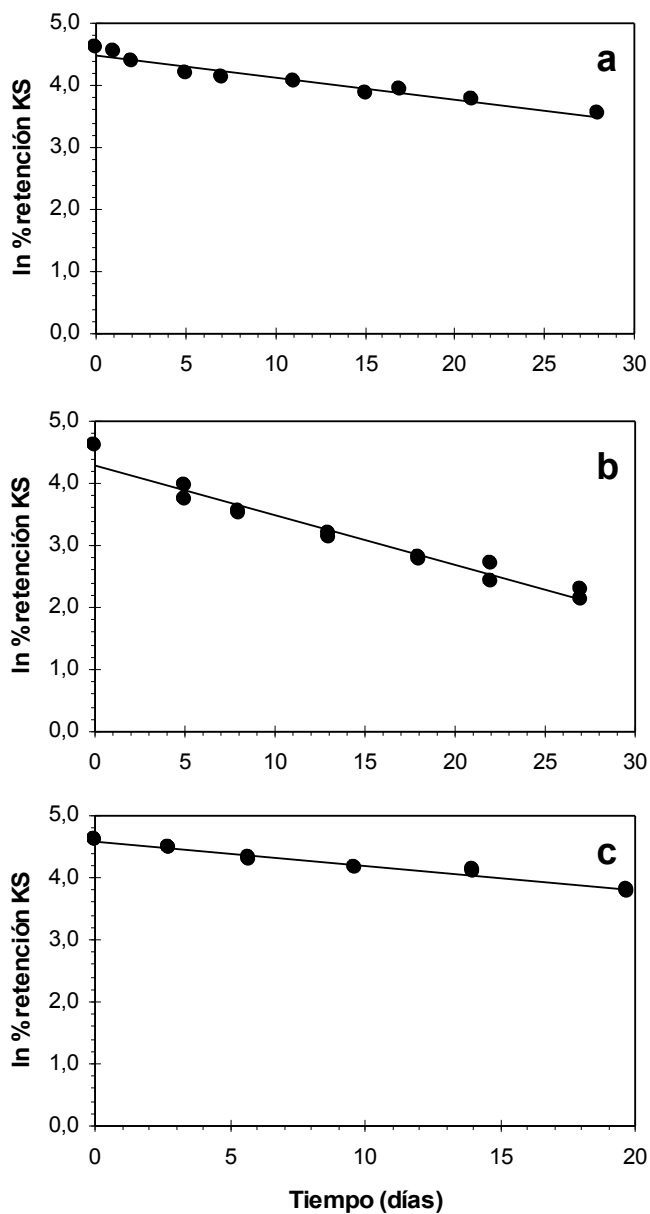
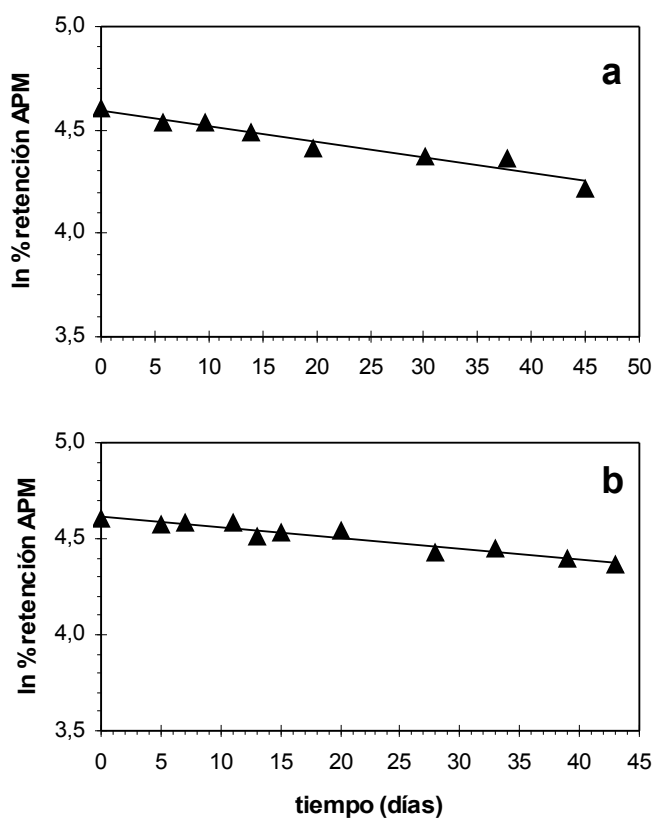


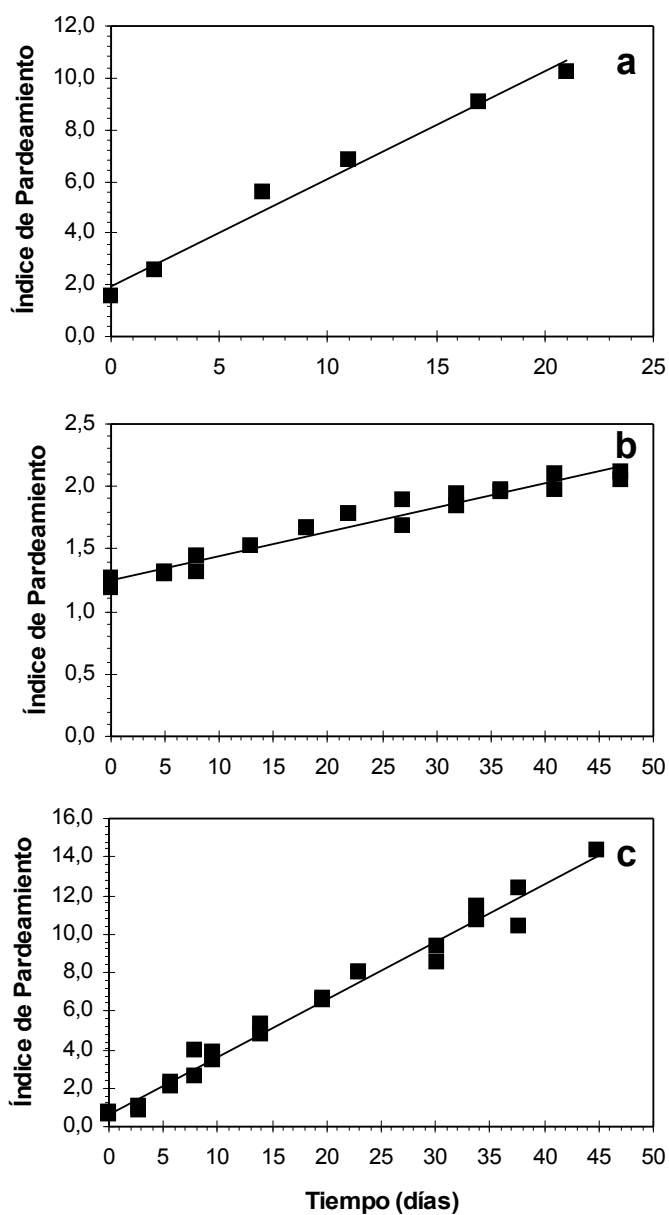
Figura I.12. Cinética de degradación del aspartamo (APM) en los sistemas conteniendo sorbato de potasio (sistema I.B) (Panel a) y sorbato de potasio y glucosa (sistema I.S) (Panel b).



1.3.1.4 Desarrollo de pardeamiento no enzimático

El desarrollo de pardeamiento no enzimático exhibió constantes de velocidad de reacción de orden cero. En la Figura I.13 se muestra un ejemplo de dicha cinética en los sistemas sorbato de potasio y aspartamo (sistema I.B), sorbato de potasio, xilitol y glucosa (sistema I.O) y sorbato de potasio, aspartamo y glucosa (sistema I.S). Este comportamiento concuerda con la información previamente publicada (Campos y Gerschenson, 1996; Gerschenson y Campos, 1995; Thakur y col., 1994; Gerschenson y col., 1986; Seow y Cheah, 1985 a, b; Stamp y Labuza, 1983).

Figura I.13. Cinética del desarrollo de pardeamiento no enzimático en los sistemas conteniendo sorbato de potasio y aspartamo (sistema I.B) (Panel a), sorbato de potasio, xilitol y glucosa (sistema I.O) (Panel b) y sorbato de potasio, aspartamo y glucosa (sistema I.S) (Panel c).



1.3.2 Estabilidad química de los sistemas azucarados

1.3.2.1 Hidrólisis de la sacarosa

Debido a que los productos de degradación del ácido sórbico y del aspartamo, y a que el desarrollo de pardeamiento no enzimático no producen una variación significativa de la

actividad de agua, el descenso de la misma que se produjo durante el almacenamiento de los sistemas que contienen sacarosa (Sistemas I.D, I.E y I.F) puede relacionarse con la hidrólisis del disacárido. De acuerdo a la composición del sistema, un valor de 0,943 corresponde al valor de actividad de agua que darían los azúcares reductores libres en solución, luego de ocurrir la hidrólisis completa de la sacarosa. Además, cabe destacar que la acidez del medio favorece el desarrollo de esta reacción.

Para ilustrar la hidrólisis de la sacarosa durante el almacenamiento de los sistemas, la Tabla I.9 muestra el porcentaje de hidrólisis para cada uno de dichos sistemas al cabo de 21 días de almacenamiento.

Tabla I.9. Porcentaje de hidrólisis de la sacarosa luego de 21 días de almacenamiento y la actividad de agua (a_w) resultante.

Sistema	% de hidrólisis	a_w luego de la hidrólisis
I.D (H ₂ O / KS / Sacarosa)	73	0,953
I.E (H ₂ O / KS / Sacarosa / Aspartamo)	51	0,958
I.F (H ₂ O / Sacarosa / Aspartamo)	82	0,949

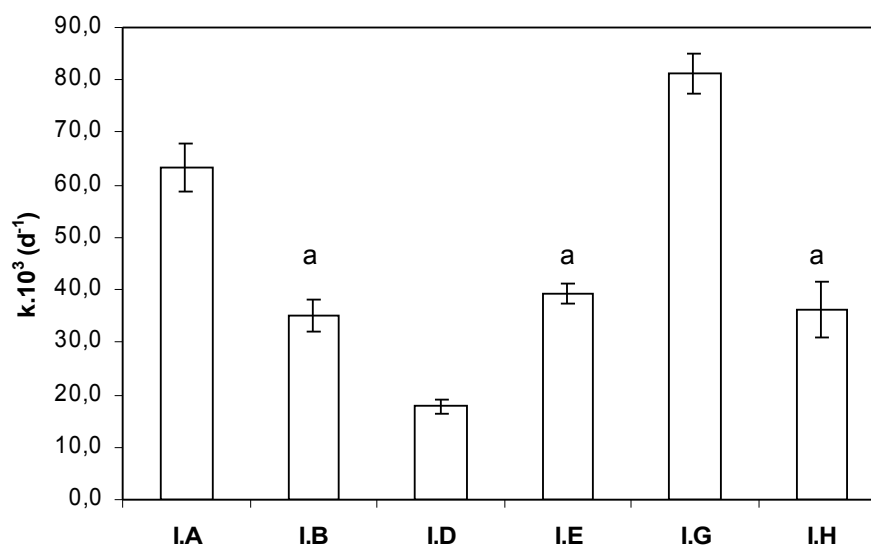
Los resultados destacan que la presencia conjunta de aspartamo y de sorbato de potasio (sistema I.E) acelera la hidrólisis de la sacarosa conduciendo a un descenso de la actividad acuosa de 0,971 a 0,949.

1.3.2.2 Estabilidad del ácido sórbico

En la Figura I.14 se muestran las constantes de velocidad de la degradación del ácido sórbico para los sistemas azucarados.

Figura I.14. Constantes de velocidad de destrucción del ácido sórbico (k) en los sistemas azucarados.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



a. Estabilidad del ácido sórbico en ausencia de aspartamo

El efecto de la depresión de la actividad de agua sobre la destrucción del ácido sórbico, dependió del humectante empleado. La misma se incrementó en presencia de glucosa (sistema I.A vs. I.G) y disminuyó en el sistema conteniendo sacarosa como humectante (sistema I.A vs. I.D).

Se reportaron diferentes tendencias acerca del efecto de la depresión de la actividad del agua sobre la destrucción de los sorbatos. Gerschenson y col. (1986) observaron un incremento en la velocidad de destrucción cuando la actividad de agua era deprimida a 0,94 por la adición de glucosa o de sacarosa a soluciones acuosas de pH 3,5. El mismo comportamiento se observó en sistemas de pulpa de frutas (Thakur y Arya, 1991). Por el contrario, Vidyasagar y Arya (1983) reportaron que la velocidad de degradación del preservador en jugo de naranja disminuye como consecuencia de la adición de diferentes niveles de sacarosa comprendidos entre 10 y 40%.

Como se informó anteriormente, la sacarosa se hidrolizó durante el almacenamiento y, por lo tanto, la aparición de fructosa y glucosa, con la concomitante modificación de la composición y de la actividad de agua a lo largo del ensayo podrían explicar porque los resultados obtenidos no siguieron una tendencia definida.

b. Estabilidad del ácido sórbico en presencia de aspartamo

Ya sea en ausencia de humectantes como en presencia de glucosa, la adición de aspartamo mostró un efecto protector sobre la degradación del ácido sórbico (sistemas I.A vs. I.B y I.G vs. I.H, respectivamente). Este efecto coincide con lo informado por Thakur y col. (1994), quienes hallaron que en presencia de azúcares, los aminoácidos lisina y glicina inhibían la degradación de ácido sórbico en solución acuosa. El mismo efecto fue observado en presencia de proteínas tales como albúmina bovina, caseinato de sodio y gluten de trigo. Esta tendencia fue atribuida a la formación de melanoidinas, las cuales, según han reportado, son antitoxigénicas en la peroxidación de lípidos y retardan el desarrollo de rancidez en alimentos (Lignert y Lundgren, 1980; Griffith y Johnson, 1957). Sin embargo, Gerschenson y col. (1986) observaron que la adición de lisina a sistemas modelo conteniendo glucosa o sacarosa, de actividad acuosa 0,94, pH 3,5 y almacenados a 20 ó 30 °C no mostraron efecto alguno sobre la degradación del preservador.

En presencia de sacarosa se observó que la adición de aspartamo produjo un ligero efecto acelerador de la destrucción del preservador (sistema I.D vs. I.E). Probablemente, en este caso, el agregado del aminoácido incrementó la destrucción del ácido sórbico y, también, produjo un descenso de la proporción de aldehídos insaturados debido a su rol en la formación de pigmentos pardos (Campos y col., 1997; Arya y Thakur, 1988; Arya, 1980).

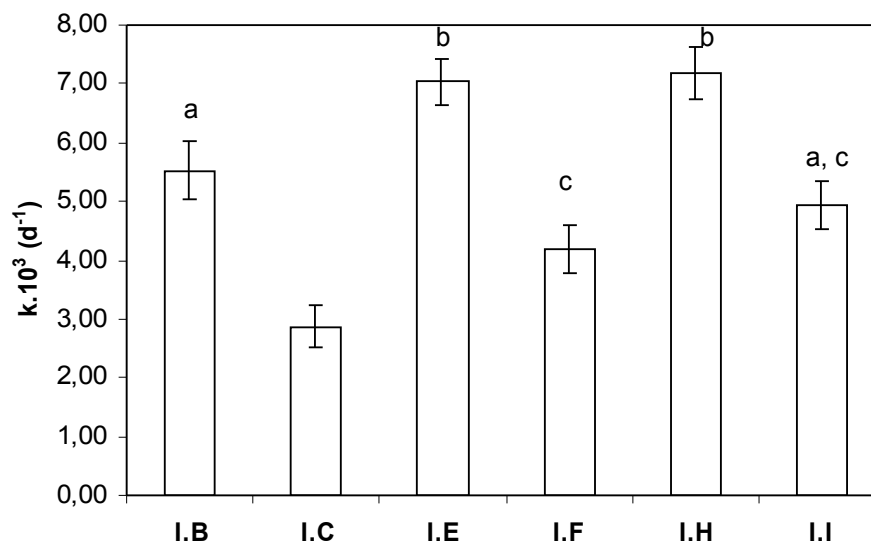
La depresión de la actividad de agua de 1,000 a 0,971 por adición de glucosa o sacarosa no produjo efecto sobre la estabilidad del preservador (sistemas I.B vs. I.E y I.B vs. I.H, respectivamente) ya que no hubo diferencias significativas entre las constantes de velocidad de dichos sistemas. Esta falta de influencia en la degradación sugiere que el aspartamo ejerce una acción protectora que enmascara la influencia del descenso de la actividad de agua y/o de la presencia de azúcar.

1.3.2.3 Estabilidad del aspartamo

En la Figura I.15 se muestran las constantes de velocidad de la degradación del aspartamo para los sistemas azucarados.

Figura I.15. Constantes de velocidad de destrucción del aspartamo (k) en los sistemas azucarados.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



En todos los sistemas estudiados, la adición de sorbato de potasio produjo un incremento de la degradación del aspartamo (sistemas I.C vs. I.B, I.F vs. I.E, I.I vs. I.H). Este comportamiento podría explicarse considerando que, bajo condiciones ácidas, la pérdida de aspartamo en función del tiempo puede expresarse como:

$$\frac{-d[\text{APM}]}{dt} = (k_1 + k_2 + k_3 + k_4) \cdot [\text{APM}] \quad \text{Ecuación I.8}$$

donde [APM] es la concentración de aspartamo, $(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)$ es la constante estimada, y corresponde a la suma de las constantes de velocidad observadas para la formación de dicetopiperazina (DKP), α -aspartilfenilalanina (α -AP), β -aspartamo y éster metílico de la fenilalanina (Pme), respectivamente (Bell y Labuza, 1991 a). La conversión de DKP a α -AP es una reacción de equilibrio, por lo tanto, el consumo de estos productos a través de su reacción con carbonilos producidos por la degradación del ácido sórbico, vía reacción de Maillard, podría incrementar la velocidad global de degradación de aspartamo.

Es de destacar que, la depresión de la actividad de agua de 1,000 a 0,971 por adición de sacarosa o de glucosa incrementó, en igual medida, la destrucción del aspartamo, independientemente de la presencia del preservador (sistema I.C vs. I.F; I.C vs. I.I; I.B vs. I.E; I.B vs. I.H). Bell y Labuza (1991 a) analizaron la influencia de la actividad de agua sobre la degradación de aspartamo y reportaron que un incremento en la misma de 0,3 a 0,7 dio como resultado un aumento del 30-80% de la velocidad de degradación, la cual, luego disminuyó con el incremento de la actividad acuosa.

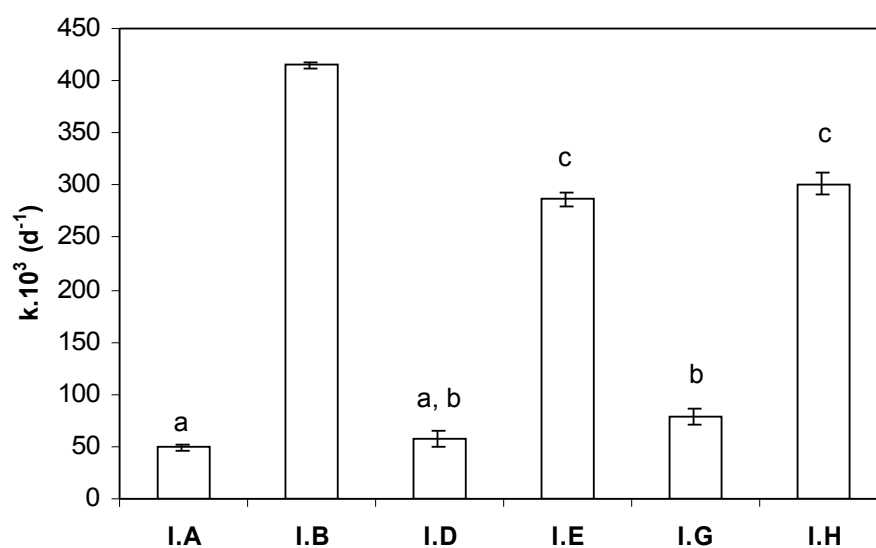
1.3.2.4 Desarrollo de pardeamiento no enzimático

En ausencia de sorbato de potasio, no se observó desarrollo de pardeamiento durante el almacenamiento (sistemas I.C, I.F y I.I). No obstante, Stamp y Labuza (1983) reportaron que una solución acuosa de aspartamo, glicerol y glucosa de actividad de agua 0,8 y pH 4,0, mostró una vida útil de 60 días a 45 °C debido al desarrollo de pardeamiento no enzimático. Probablemente, en las condiciones empleadas en el presente estudio, el tiempo necesario para la observación de pardeamiento, detectable colorimétricamente, sería mayor al utilizado, el cual estuvo entre los 40 y 46 días.

En la Figura I.16 se muestran las constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático para los sistemas azucarados.

Figura I.16. Constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático (k) en los sistemas azucarados.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



a) Desarrollo de pardeamiento no enzimático en ausencia de aspartamo

En ausencia de aspartamo, el desarrollo de pardeamiento no enzimático puede atribuirse a la polimerización de carbonilos presentes en azúcares o producidos por la degradación del ácido sórbico.

La depresión de la actividad acuosa produjo un ligero incremento en el desarrollo de pardeamiento no enzimático cuando se utilizó glucosa como humectante (sistema I.A vs. I.G), mientras que el empleo de sacarosa no ejerció efecto alguno (sistema I.A vs. I.D).

La mencionada tendencia está de acuerdo con la información previamente publicada acerca del efecto de una ligera depresión de la actividad acuosa en un sistema líquido (Eichner y Karel, 1972). Por otra parte, el diferente comportamiento de la sacarosa frente al de la glucosa, puede atribuirse a la hidrólisis que presentó la sacarosa a lo largo del almacenamiento, hecho que produjo un cambio gradual de la composición del sistema.

b. Desarrollo de pardeamiento no enzimático en presencia de aspartamo

La adición de aspartamo incrementó el desarrollo de pardeamiento no enzimático (sistemas I.A, I.D y I.G vs. I.B, I.E y I.H, respectivamente). Este comportamiento es el esperado, ya que el pardeamiento no enzimático vía reacción de Maillard es un importante camino de degradación de aspartamo en alimentos (Stamp y Labuza, 1983) y, la producción de compuestos carbonílicos a través de la degradación del sorbato hace posible el desarrollo de dicha reacción. Esta tendencia está de acuerdo con la información publicada previamente acerca del efecto de aminoácidos sobre el desarrollo de pardeamiento no enzimático de sistemas conteniendo sorbato de potasio (Gerschenson y Campos, 1995; Thakur y Arya, 1991; Buera y col., 1986; Seow y Cheah, 1985 a). Debe notarse que en ausencia de aspartamo, el sistema conteniendo sorbato sin la adición de humectantes (sistema I.A) y los sistemas conteniendo sacarosa o glucosa (sistemas I.D y I.G) produjeron menor formación de pigmentos pardos y no se observaron diferencias significativas entre sus constantes de velocidad. Estos resultados sugieren que la reacción de Maillard entre el aspartamo y los compuestos carbonílicos producidos por la autooxidación del ácido sórbico es la reacción que posee el más alto potencial de pardeamiento y es una de las que gobierna el desarrollo de dicha reacción. Thakur y Arya (1991) y, Campos y Gerschenson (1996), también reportaron el rol principal de

la interacción de los productos de degradación del ácido sórbico con aminoácidos en el desarrollo de pardeamiento.

1.3.2.5 Conclusiones

Se observó que existen interacciones entre el sorbato de potasio, el aspartamo y otros componentes de los sistemas. Como resultado de las mismas se desprende lo siguiente:

- a) Estabilidad del ácido sórbico: la adición de aspartamo en ausencia o en presencia de glucosa mejoró la estabilidad del preservador, pero incrementó su degradación cuando la sacarosa estuvo presente. Es importante tener en cuenta que dependiendo de la composición del sistema, en caso de ocurrir alto grado de degradación podría afectarse la estabilidad microbiológica del mismo.
- b) Estabilidad del aspartamo: la adición del preservador aumentó la degradación de aspartamo y esta tendencia se incrementó cuando la actividad de agua fue deprimida a 0,971 por el agregado de glucosa o sacarosa. Se debe tener en cuenta que la degradación del aspartamo puede disminuir su poder edulcorante.
- c) La interacción de azúcares reductores con el aspartamo no contribuyó significativamente al desarrollo de pardeamiento no enzimático en los sistemas.
- d) El aspartamo y los carbonilos formados durante la degradación del sorbato reaccionan a través del mecanismo de Maillard detectándose la formación de pigmentos pardos.

Basándose en estos resultados es importante considerar las interacciones entre aditivos y/o entre aditivos y otros ingredientes alimenticios en las formulaciones de alimentos de bajas calorías. En particular, en el caso de productos de bajas calorías donde el pardeamiento no enzimático pueda limitar su vida útil, no se recomienda el uso conjunto de sorbato de potasio y aspartamo. Esta recomendación se basa en observaciones realizadas en sistemas modelo acuosos con la expectativa de que ocurra el mismo comportamiento en un alimento.

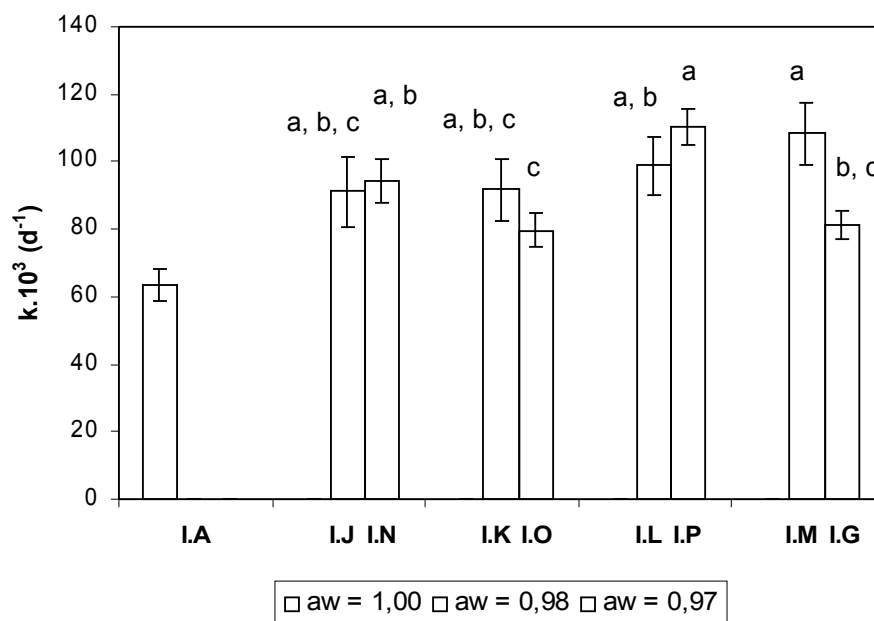
1.3.3 Estabilidad química de los sistemas conteniendo polioles

1.3.3.1 Estabilidad del ácido sórbico

En la Figura I.17 se muestran las constantes de velocidad de la degradación del ácido sórbico para los sistemas conteniendo polioles. Cabe destacar que en dicha figura también se incorporaron los sistemas azucarados I.A y I.G, mencionados en la sección I.3.2.2. Estos sistemas fueron necesarios para realizar comparaciones.

Figura I.17. Constantes de velocidad de destrucción del ácido sórbico (k) en función de la actividad de agua (a_w) en los sistemas conteniendo polioles.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



a) Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la estabilidad del ácido sórbico

La estabilidad del ácido sórbico disminuyó por el descenso de la actividad acuosa de 1,000 a 0,985 debido al agregado de polioles, ó de 1,000 a 0,988, por la adición de glucosa (sistemas I.A vs. I.J, I.K, I.L y I.M, respectivamente). Con relación al efecto producido por los polioles, sólo hay información reportada para el glicerol. Seow y Cheah (1985 a) observaron

que la adición de 48% de glicerol a sistemas conteniendo sorbato, incrementó la degradación del preservador y ellos atribuyeron esta tendencia al efecto catalítico o pro-oxidante del glicerol sobre la auto-oxidación del ácido sórbico. Campos y col. (1997); Gerschenson y col. (1987) y Arya (1980) observaron resultados similares.

Del mismo modo, la depresión de la actividad acuosa de 1,000 a 0,971 por el agregado de glucosa y de su combinación con polioles (sistema I.A vs. I.G, I.N, I.O y I.P, respectivamente), también produjo un incremento en la destrucción del preservador. Este efecto fue similar para las combinaciones glucosa / sorbitol (sistema I.N) y glucosa / manitol (sistema I.P), pero fue menor tanto en presencia de glucosa / xilitol (sistema I.O) como de 22,00% p/p de glucosa (sistema I.G), ya que ambos sistemas no presentaron diferencias significativas entre las constantes de destrucción. Como se informó en la sección I.3.2.2, esta tendencia también fue observada por Gerschenson y col. (1986) cuando la actividad de agua descendió a 0,94 por la adición de glucosa a soluciones de pH 3,5, y por Thakur y Arya (1991) en pulpa de frutas.

El agregado de la cantidad necesaria de glucosa para descender la actividad acuosa de 0,985 a 0,971 de los sistemas conteniendo polioles no produjo cambios estadísticamente significativos para ninguno de los polioles estudiados (sistemas I.J, I.K, I.L vs. I.N, I.O, I.P, respectivamente). Sin embargo, un incremento de la concentración de glucosa de 10,00 a 22,00% p/p (sistema I.M vs. I.G) produjo una disminución de la destrucción del preservador.

Existen diferentes tendencias reportadas en la literatura científica con relación al efecto de la depresión de la actividad de agua sobre la estabilidad del sorbato. Las mismas se citan a continuación:

- Disminución del agua disponible para asociarse con el ión hidrógeno del grupo carboxílico y formar un ión hidronio. Este proceso es esencial para la disociación de ácido sórbico. Por lo tanto, la depresión de la actividad de agua favorecería la presencia de la especie no disociada del preservador, la cual es más propensa a la destrucción y, entonces, probablemente, se incrementaría la degradación del ácido sórbico (Gerschenson y Campos, 1995).
- Incremento de la viscosidad del sistema. Este efecto podría aumentar la resistencia a la difusión, inhibiendo la movilidad de reacción y deprimiendo la destrucción de sorbato (Fennema, 1996).

- Efecto de solutos específicos, los cuales dependen del humectante utilizado (Gould, 1988).

Probablemente, el resultado de la depresión de la actividad acuosa sobre ciertos sistemas depende de un balance de estos efectos, los cuales están ligados a la composición del sistema y a las condiciones experimentales ensayadas.

b) Efecto del humectante sobre la estabilidad del ácido sórbico

En los sistemas de actividad acuosa 0,985 ó 0,988, la degradación de ácido sórbico fue independiente del humectante utilizado para deprimir la actividad acuosa (sistemas I.J, I.K, I.L y I.M). En cambio, cuando la actividad de agua de los sistemas fue de 0,971, la entidad del humectante tuvo influencia sobre la destrucción del preservador. En este caso, tanto la combinación glucosa / xilitol como la presencia de 22,00% p/p de glucosa mostraron menor degradación del ácido sórbico (sistemas I.O y I.G, respectivamente) que las combinaciones glucosa / sorbitol y glucosa / manitol, las cuales no presentaron diferencias significativas (sistemas I.N y I.P, respectivamente).

La tendencia mencionada puede atribuirse a algún efecto específico de los humectantes cuando se los usa juntos, y/o al balance de las diferentes tendencias con relación a la depresión de la actividad de agua sobre la destrucción del sorbato.

1.3.3.2 Desarrollo de pardeamiento no enzimático

En la Figura I.18 se muestran las constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático para los sistemas conteniendo polioles. Cabe destacar que en dicha figura también se incorporaron los sistemas azucarados I.A y I.G, ya mencionados en la sección I.3.2.4. Estos sistemas fueron necesarios para realizar comparaciones.

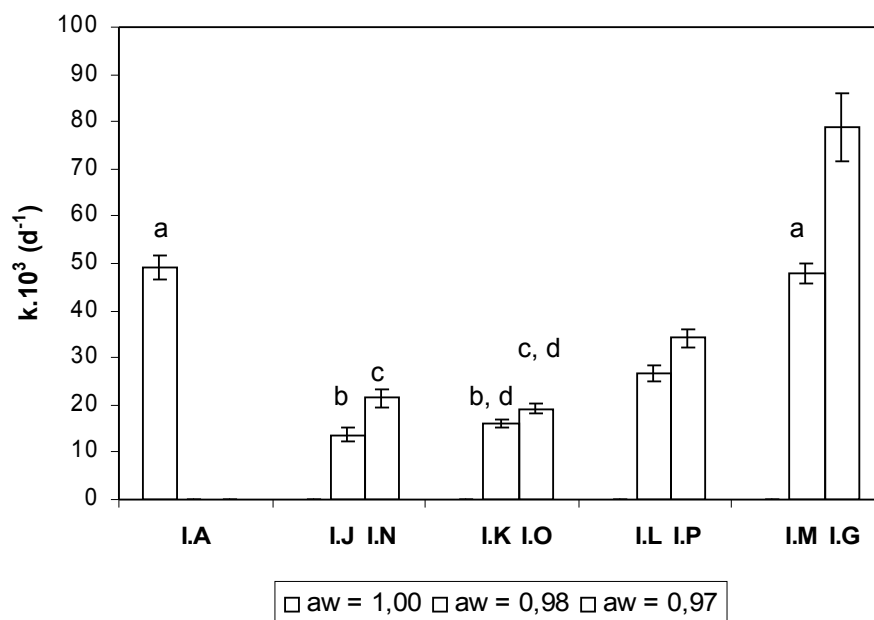
La adición de polioles disminuyó el desarrollo de pardeamiento no enzimático tanto en ausencia como en presencia de glucosa (sistema I.A vs. I.J, I.K, I.L, I.N, I.O y I.P) pero, en este último caso, la disminución del pardeamiento fue menor.

Debe destacarse que el incremento del pardeamiento no enzimático debido al agregado de glucosa sólo fue importante cuando la actividad acuosa alcanzada fue 0,971 (sistema I.A vs. I.G), ya que la velocidad de pardeamiento no fue significativamente diferente entre el sistema

de actividad de agua 1,000 y el sistema conteniendo glucosa, de actividad acuosa 0,988 (sistema I.A vs. I.M).

Figura I.18. Constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático (k) en función de la actividad de agua (a_w) en los sistemas conteniendo polioles.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



Es importante subrayar que la naturaleza del humectante tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo de pardeamiento, tanto a un valor de actividad de agua de 0,985 como de 0,971. El sorbitol y el xilitol fueron los humectantes que menor velocidad de pardeamiento presentaron.

En los sistemas conteniendo polioles, el desarrollo de pardeamiento puede atribuirse a la polimerización de carbonilos producidos por la degradación del ácido sórbico o presentes en la glucosa ya que, de acuerdo a O'Brien Nabors (2002), los polioles, en general, no participan en la reacción de Maillard debido a que carecen de grupos carbonilos necesarios para formar parte del desarrollo de pigmentos pardos. Rojas y Gerschenson (2001) observaron la contribución nula al pardeamiento del xilitol y del manitol en presencia de ácido ascórbico. Además, Arya y Thakur (1988) estudiaron los productos de degradación del ácido sórbico en solución acuosa y reportaron que la presencia de aminoácidos modificaba el perfil de compuestos carbonílicos, promoviendo un incremento en la cantidad de aldehídos insaturados, los cuales polimerizan a velocidades mucho más rápidas para formar pigmentos pardos que los

aldehídos saturados. Un efecto similar puede asignarse a los polioles, atribuyendo el descenso del pardeamiento que producen, a la disminución de la formación de aldehídos insaturados.

1.3.3.3 Conclusiones

Existe una marcada influencia de la presencia de polioles sobre la estabilidad del ácido sórbico y sobre el desarrollo de pigmentos pardos, la cual depende de la composición del sistema. Es importante destacar los siguientes hechos:

- a) En ausencia de glucosa, la degradación del preservador se incrementó por la adición de polioles.
- b) En presencia de glucosa, la adición de manitol o sorbitol no produjo efecto sobre la estabilidad del sorbato. Sin embargo, la adición de xilitol disminuyó la degradación del mismo.
- c) La adición de polioles disminuyó la velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático tanto en ausencia como en presencia de glucosa. El sorbitol y el xilitol mostraron el mayor efecto.

Estos resultados destacan la importancia de elegir adecuadamente los aditivos a emplear para minimizar la destrucción del preservador y el desarrollo de pardeamiento y, de esta manera, asegurar la estabilidad microbiológica y organoléptica del alimento.

1.3.4 Estabilidad química de los sistemas conteniendo xilitol

1.3.4.1 Estabilidad del ácido sórbico

En la Figura I.19 se muestran las constantes de velocidad de la degradación del ácido sórbico para los sistemas conteniendo xilitol. Cabe destacar que en dicha figura también se incorporaron los sistemas azucarados I.A y I.B y los sistemas conteniendo polioles I.K, I.O y I.M, estudiados en secciones I.3.2.2 y I.3.3.1, respectivamente. Estos sistemas fueron necesarios para realizar comparaciones.

El efecto de la presencia de xilitol sobre la estabilidad del sorbato de potasio dependió de la presencia de aspartamo y de la actividad de agua del sistema.

El agregado de xilitol para reducir la actividad de agua a 0,985, en ausencia de aspartamo, promovió la destrucción del preservador (sistema I.A vs. I.K), mientras que en presencia del edulcorante artificial, la adición de dicho poliol, disminuyó significativamente la destrucción del sorbato (sistema I.B vs. I.Q).

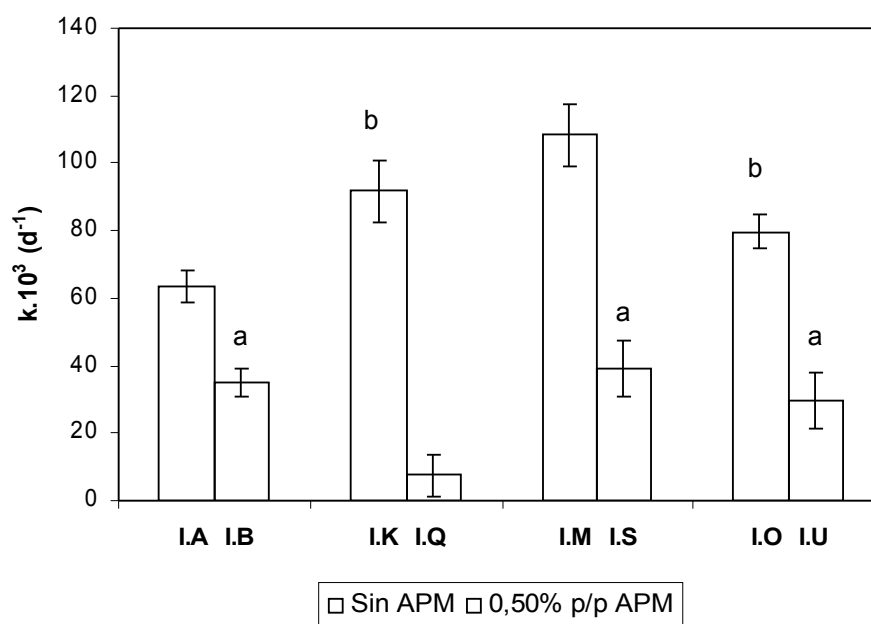
Cuando se adiciona xilitol al sistema conteniendo glucosa para descender la actividad de agua de 0,988 a 0,971, en ausencia de aspartamo, se protege la degradación del sorbato (sistema I.M vs. I.O). No obstante, en presencia de aspartamo no se observó efecto alguno (sistema I.S vs. I.U).

El agregado de aspartamo disminuyó significativamente la velocidad de degradación del ácido sórbico (sistemas I.A, I.K, I.M, I.O vs. I.B, I.Q, I.S, I.U, respectivamente). Esta tendencia también fue observada en los sistemas azucarados (sección I.3.2.2), excepto en aquellos conteniendo sacarosa.

Es importante destacar que en presencia de aspartamo, la velocidad de destrucción del sorbato fue independiente de la actividad acuosa (sistemas I.B, I.S y I.U), con excepción del sistema conteniendo xilitol (sistema I.Q), el cual exhibió la menor velocidad de degradación del sorbato.

Figura I.19. Constantes de velocidad de destrucción del ácido sórbico (k) en los sistemas conteniendo xilitol en función de la presencia de aspartamo (APM).

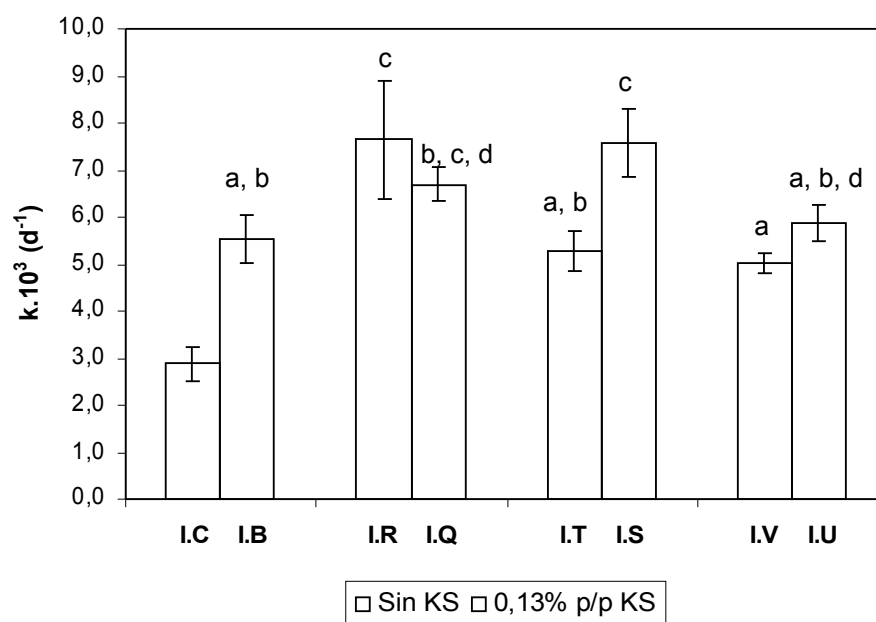
Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales reoresentan el error típico de las constantes.



1.3.4.2 Estabilidad del aspartamo

En la Figura I.20 se muestran las constantes de velocidad de la degradación del aspartamo para los sistemas conteniendo xilitol. Cabe destacar que en dicha figura también se incorporaron los sistemas azucarados I.C y I.B, mencionados en sección I.3.2.3. Estos sistemas fueron necesarios para realizar comparaciones.

Figura I.20. Constantes de velocidad de degradación de aspartamo (k) en función de la presencia de sorbato de potasio (KS) en los sistemas conteniendo xilitol. Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



En ausencia de ácido sórbico el descenso de la actividad acuosa, ya sea a 0,985 ó 0,988, por el agregado de xilitol o glucosa, respectivamente, ó a 0,971, por la adición conjunta de xilitol y glucosa, produjo un incremento de la velocidad de degradación del aspartamo (sistema I.C vs. I.R, I.T y I.V). Este efecto fue más importante cuando se utilizó solamente xilitol como depresor de la actividad acuosa (sistema I.R). En este último caso, la destrucción del aspartamo fue similar a la observada cuando, a dicho sistema se le adiciona sorbato de potasio (sistema I.R vs. I.Q)

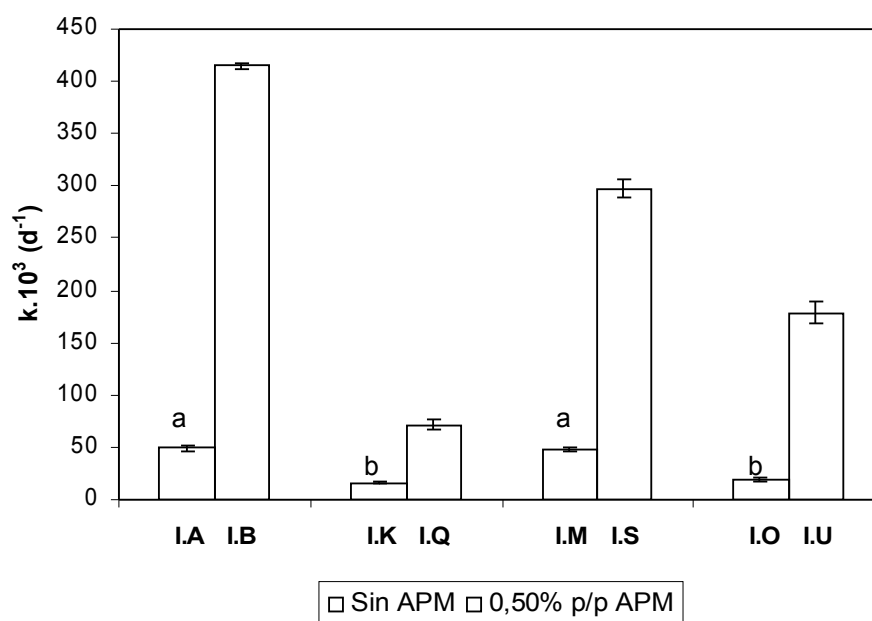
En presencia del preservador, sólo la adición de glucosa para reducir la actividad de agua a 0,988, aceleró la degradación del aspartamo (sistema I.B vs. I.S), en cambio, no se observaron diferencias debido al agregado de xilitol ó de la combinación glucosa / xilitol (sistema I.B vs. I.Q y I.U, respectivamente).

La presencia de xilitol tuvo diversos efectos sobre la degradación del aspartamo, dependiendo de la composición del sistema. En ausencia del preservador, la incorporación del poliol incrementó la destrucción de aspartamo (sistema I.C vs. I.R), mientras que en presencia de 0,130% p/p de sorbato de potasio, no se observó efecto (sistema I.B vs. I.Q). Cuando se adicionó xilitol en presencia de glucosa pero en ausencia de sorbato, no hubo efecto sobre la estabilidad química del aspartamo (sistema I.T vs. I.V), en cambio, en presencia del preservador se observó la disminución de la degradación del edulcorante artificial (sistema I.S vs. I.U).

1.3.4.3 Desarrollo de pardeamiento no enzimático

En la Figura I.21 se muestran las constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático para los sistemas conteniendo xilitol. Cabe destacar que en dicha figura también se incorporaron los sistemas azucarados I.A y I.B, y los sistemas conteniendo polioles I.K, I.O y I.M, mencionados en secciones I.3.2.4 y I.3.3.2, respectivamente. Estos sistemas fueron necesarios para realizar comparaciones.

Figura I.21. Constantes de velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático (k) en función de la presencia de aspartamo (APM) en los sistemas conteniendo xilitol. Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Las barras verticales representan el error típico de las constantes.



La adición de aspartamo aceleró la formación de pigmentos pardos (sistemas I.A, I.K, I.M, I.O vs. I.B, I.Q, I.S, I.U, respectivamente), siendo, el sistema sin humectantes (sistema I.B),

el que mostró la mayor velocidad de pardeamiento, seguido luego, por el sistema conteniendo 10,00% p/p de glucosa (sistema I.S). En ausencia de aspartamo, el desarrollo de pardeamiento no fue significativamente diferente entre el sistema sin humectantes y el sistema conteniendo glucosa (sistemas I.A y I.M).

Es de destacar que el efecto protector del xilitol sobre el desarrollo de pigmentos pardos, observado en ausencia de aspartamo (sección I.3.3.2), también se percibió en presencia de aspartamo, y fue independiente de la presencia de glucosa (sistema I.B vs. I.Q, I.S vs. I.U).

Como se mencionó en la sección I.3.2.4, en ausencia de aspartamo, la formación de pigmentos pardos se produce por la polimerización de compuestos carbonílicos provenientes de la oxidación del sorbato (Campos y col., 1997), mientras que en presencia de aspartamo, además de producirse estas reacciones, se origina un incremento de la velocidad de pardeamiento debido a la ocurrencia de la reacción de Maillard (Stamp y Labuza, 1983). Es de destacar que el potencial formador de pigmentos pardos de esta última reacción es mucho mayor que el de la polimerización de compuestos carbonílicos (Campos y col., 1997).

En cuanto al efecto protector del xilitol sobre el desarrollo de pardeamiento, podemos mencionar lo indicado en la sección I.3.3.2, es decir, el xilitol no contribuye al desarrollo de pigmentos pardos (Rojas y Gerschenson, 2001) y su presencia podría disminuir la formación de aldehídos insaturados y, por lo tanto, producir un descenso del pardeamiento.

1.3.4.4 Conclusiones

De los resultados sobre la estabilidad de los sistemas conteniendo xilitol, se concluye lo siguiente:

- a) Desde el punto de vista de reducir la degradación del sorbato de potasio, es conveniente el empleo de xilitol en un nivel necesario para alcanzar una actividad de agua de 0,985, en presencia de 0,500% p/p de aspartamo. De no ser posible, su combinación con 10,00% p/p de glucosa sin el agregado del edulcorante artificial.
- b) La degradación del aspartamo se minimiza cuando al xilitol se lo combina con glucosa en presencia de sorbato de potasio.
- c) Por otra parte, la presencia de xilitol disminuye significativamente el desarrollo de pigmentos pardos independientemente de la incorporación de glucosa y de aspartamo.

Basándose en lo expuesto, un sistema conteniendo aspartamo, de actividad de agua reducida a 0,985, debido a la incorporación de xilitol, permite disminuir la destrucción del preservador y el desarrollo de pardeamiento no enzimático. Además, es importante destacar que en este sistema no se afecta la destrucción de aspartamo debido al agregado de xilitol.

Estos resultados resaltan algunos de los beneficios del empleo del xilitol en la formulación de alimentos de reducido tenor glucídico. En el Capítulo II se verán otras ventajas del uso de dicho poliol.

CAPÍTULO II

**INTERACCIONES ENTRE EL ÁCIDO SÓRBICO Y
EDULCORANTES:**

**SU EFECTO SOBRE LA ESTABILIDAD
MICROBIOLÓGICA DE LOS SISTEMAS**

II.1 Introducción

II.1.1 Agentes causantes de alteraciones microbiológicas en alimentos de tenor glucídico reducido

La acción de los microorganismos es una de las principales causas de las alteraciones que se producen en jugos, jaleas o mermeladas de reducido tenor glucídico.

Aunque algunos jugos podrían llegar a constituir un buen medio de cultivo para ciertas bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, la mayor parte de las bacterias son incapaces de crecer a los niveles de pH que presentan los jugos y productos derivados de frutas, ya que se desarrollan mejor en un medio de pH neutro. Contrariamente, las levaduras y mohos pueden crecer y desarrollarse en estas condiciones. De ahí que la mayor parte de las alteraciones microbianas que tienen lugar en jugos, jaleas y mermeladas sean debidas a las levaduras en más del 90% y gran parte del resto a mohos (Garza, 1996; Hatcher y col., 1992).

En cuanto a la presencia de patógenos, es preciso decir que estos alimentos poseen bajo riesgo sanitario debido, fundamentalmente, a que el bajo valor de su pH limita el crecimiento de este tipo de microorganismos.

Muchas levaduras aisladas de estos alimentos son capaces de desarrollarse en condiciones anaerobias y son muy tolerantes a una elevada acidez, ya que pueden crecer a valores de pH de 2,0 y 1,5. Sus necesidades nutritivas son mínimas; muchas pueden sintetizar una gran variedad de sustancias esenciales para el crecimiento, incluyendo aminoácidos, carbohidratos y vitaminas, y requieren concentraciones muy bajas de nitrógeno para crecer.

Las alteraciones producidas por el crecimiento anaerobio de levaduras se caracterizan por la producción de dióxido de carbono y de alcohol etílico, originados por la fermentación de los azúcares. También originan turbidez, sedimentos, flóculos, películas y agregados. Si producen pectinesterasa, pueden destruir la turbidez natural debida a las pectinas. Son capaces de degradar los ácidos orgánicos, elevando el pH, y pueden formar acetaldehído, contribuyendo al "olor a fermentado" (Garza, 1996).

Las especies de levaduras que se pueden encontrar en estos productos dependen de la fruta de la cual provengan, entre ellas se encuentran las de *Zygosaccharomyces*, *Candida*,

Torulopsis, *Rhodotorula*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Saccharomycopsis*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Kloeckera apiculata* (Bhajejar y Kulkarni, 1991; Thomas y Davenport, 1985).

Las especies de levaduras más representativas aisladas de jugos de fruta industriales son *Kloeckera apiculata*, *Pichia etchelsii*, *Torulopsis candida*, *Candida gilliermondii* y *Zygosaccharomyces bailii* (Garza, 1996).

De las especies de levaduras causantes del deterioro de alimentos, *Zygosaccharomyces bailii* es una de las más importantes. Su tolerancia frente a los factores de estrés microbiano comúnmente empleados en la elaboración de alimentos, es decir, la adición de preservadores lipofílicos, la disminución del pH, el agregado de alto contenido de azúcares y la pasteurización, hace que la misma sea capaz de desarrollarse en alimentos como mayonesa, pickles, mazapán, concentrados de frutas, bebidas, vinos, jugos, jaleas y mermeladas, causando su deterioro e importantes pérdidas económicas. Es importante destacar que su resistencia es mayor que la de otras levaduras deteriorativas como *Saccharomyces cerevisiae* ya que, probablemente, esté mejor equipada para mantener la homeostasis durante el estrés aplicado. A estos factores se adiciona que *Zygosaccharomyces bailii* puede desarrollarse en equipamientos industriales como cabezas de llenado, válvulas, indicadores de presión y en salidas de filtros de esterilización, siendo, su eliminación, dificultosa ya que tolera algunos agentes de limpieza y esterilización industriales (Rodríguez y Pais, 2000; Cheng y col., 1999; Thomas y Davenport, 1985).

Basándose en las características que presenta *Zygosaccharomyces bailii*, expuestas en el párrafo anterior, es de suma importancia su estudio, en particular en alimentos como jugos, jaleas o mermeladas, ya que su elaboración comprende el empleo de azúcares, el descenso del pH, tratamientos térmicos y la adición de preservadores. Hallar las condiciones para minimizar el crecimiento y acelerar la muerte de este microorganismo constituye un aporte importante para optimizar la elaboración de dichos alimentos.

II.1.2 Métodos de preservación empleados en alimentos de tenor glucídico reducido, con especial referencia al uso de tecnologías de barreras

Uno de los mayores problemas con el que se enfrentan las industrias elaboradoras de derivados de frutas es el de mantener los productos libres de microorganismos productores de

fermentaciones, de enmohecimientos y de otros cambios perjudiciales que puedan alterar sus propiedades físicas y sensoriales. Para ello emplean diversos métodos de preservación, entre los que se encuentran, la adición de conservantes, el descenso del pH, la esterilización por filtración o térmica, la pasteurización, el empleo de atmósferas modificadas, la congelación, la radiación. Todos estos factores tienden a destruir o detener la actividad metabólica de los microorganismos.

De los métodos de preservación enumerados, la pasteurización y la adición de conservantes químicos, quizás sean los métodos más utilizados en la industria procesadora de frutas. Sin embargo, debido en parte a la demanda creciente de los consumidores por productos "naturales", es decir, sin aditivos ni conservantes químicos, y por una mayor calidad organoléptica, los esfuerzos de los fabricantes y los investigadores se dirigen hacia el desarrollo de nuevos métodos de conservación. Estos métodos incluyen la aplicación de tecnologías y permiten reducir las concentraciones de los preservadores (Brul y Klis, 2003; Beuchat, 1981 a, b; 1982). Estas tecnologías empíricas de preservación, están basadas en la combinación de alguno de los factores mencionados y, comúnmente se las denomina, tecnologías de barreras u obstáculos o tecnologías de factores combinados.

El empleo de las tecnologías de barreras permite mejorar las calidades organoléptica y nutricional de los alimentos, ya que evita la aplicación de un sólo factor de conservación en forma severa, reemplazándolo por varios factores de menor intensidad, pero, generalmente, diferentes entre sí. Además, permite satisfacer las demandas del consumidor actual, debido al desarrollo de productos con características similares a las del alimento fresco, con menor incorporación de aditivos y listos para preparar y servir.

Es importante destacar que las tecnologías de barreras interfieren en la homeostasis de los microorganismos situándolos en un ambiente adverso a fin de inhibir su crecimiento. La homeostasis es la tendencia de los microorganismos a estabilizar su ambiente interno en respuesta a los factores externos (Leistner, 1995). Los factores de preservación empleados en la formulación de un alimento modifican el ambiente interno de los microorganismos, los cuales utilizarían su propia energía para reestablecer el equilibrio dando como resultado la disminución o inhibición del crecimiento y, en el caso de no lograrlo, la muerte.

A lo largo de los años, se han identificado gran variedad de mecanismos de acción de los diversos factores de estrés utilizados en alimentos sobre los microorganismos, así como la respuesta homeostática de los mismos (Casas y col., 2004; Almagro y col., 2000; Loureiro, 2000; Reyns y col., 2000; Buchanan y col., 1993; Golden y Beuchat, 1992; Gould, 1985;

Beuchat, 1981 a, b, 1982; Warth, 1977; Rose, 1975). Estos aportes se obtuvieron gracias a los avances en el conocimiento de la fisiología y la ecología microbianas.

La correcta combinación de los diversos factores de preservación, ya sea para el desarrollo de nuevas tecnologías de barreras como para la optimización de las ya utilizadas, debe tener en cuenta el conocimiento de los diferentes mecanismos de acción que presentan cada uno de los factores sobre los microorganismos y la interacción entre los mismos. De esta manera se logrará la estabilidad microbiológica de los alimentos y, por lo tanto, una mayor calidad del producto final.

Entre los principales factores de estrés microbiano combinados, que se aplican comúnmente en alimentos de tenor glucídico reducido, se encuentran la reducción de la actividad de agua, el descenso del pH, la incorporación de preservadores y la aplicación de tratamientos térmicos (Battey y col., 2002; Leistner y Gorris, 1995).

Estos productos son, intrínsecamente, resistentes al crecimiento de agentes patógenos pero son susceptibles al deterioro debido al crecimiento de levaduras, especialmente, *Zygosaccharomyces bailii* (Jenkins y col., 2000; Warth, 1977). Este microorganismo posee una fuerte actividad fermentativa y es capaz de superar de las barreras antes mencionadas.

II.1.3 Acción de los preservadores como factor de estrés microbiano

II.1.3.1 Generalidades

Los preservadores ácido débiles, que son lipofílicos, inhiben varios procesos metabólicos en las levaduras, particularmente aquellos asociados con el desacoplamiento del sistema de transporte activo necesario en la obtención de energía para la célula. Las membranas de las levaduras adaptadas a preservadores se caracterizan por la alteración de su permeabilidad a aniones ácidos, los cuales le permiten mantener un pH intracelular no letal (Warth, 1977).

Entre los conservantes químicos autorizados por la legislación argentina en la elaboración de jugos, jaleas y mermeladas se encuentran el ácido benzoico y sus sales de sodio, calcio y potasio, y el ácido sórbico y sus sales de sodio, calcio y potasio (CAA, Art. 1376).

El ácido benzoico se usa especialmente como agente micostático. Muchas levaduras y mohos se inhiben a concentraciones de 0,05-0,1% del ácido no disociado, pero la mayor parte de las bacterias causantes de alteraciones son mucho más resistentes y, por lo tanto, no debe confiarse en este ácido para la conservación de alimentos capaces de permitir el crecimiento bacteriano (Chichester y Tanner, 1972).

El ácido sórbico y sus sales poseen un amplio espectro de actividad contra los microorganismos catalasa-positivos, que incluyen las levaduras, mohos y bacterias, y se los utiliza, por lo tanto, para inhibir los contaminantes aeróbicos en los alimentos fermentados o ácidos, ya que la eficacia máxima de estos conservantes tiene lugar a valores de pH ácidos, como los jugos, jaleas y mermeladas (Sofos, 1989; Park y Marth, 1972).

La tolerancia a los conservantes químicos por parte de los microorganismos varía entre géneros, especies e incluso, entre cepas. Muchas especies microbianas pueden adaptarse a concentraciones bajas de estos aditivos, por lo que se requieren niveles mucho mayores para inhibir su crecimiento.

Zygosaccharomyces bailii tiene aptitud para crecer en ambientes hostiles conteniendo altas concentraciones de preservadores, tales como ácido benzoico y ácido sórbico. Por ejemplo, la presencia de 600-750 mg/L de ácido de sórbico y niveles de pH tan bajos como 2,2, valores menores que el pKa de los preservadores, no afectan su crecimiento (Praphailong y Fleet, 1997; Thomas y Davenport, 1985; Warth, 1977).

En relación con la aplicación de un tratamiento térmico, la exposición de las células al calor puede no causarles la muerte, pero puede debilitarlas metabólicamente y estructuralmente (Makdesi y Beuchat, 1996).

La resistencia de las levaduras a la inactivación térmica puede estar influenciada por muchos factores, incluyendo las diferencias inherentes entre las especies (Beuchat, 1982), la composición del medio en el cual las levaduras crecieron previamente (Golden y Beuchat, 1992) y las condiciones del medio durante el tratamiento térmico (Beuchat, 1981 a, b; Corry, 1976 a).

El empleo de preservadores junto con el tratamiento térmico puede implicar un efecto letal sinérgico sobre las levaduras (Makdesi y Beuchat, 1996). El incremento de la acción de ciertos ácidos orgánicos sobre la inactivación térmica de levaduras es más acentuado cuando se desciende el pH del medio de calentamiento (Makdesi y Beuchat, 1996) y cuando la actividad acuosa se incrementa (Beuchat, 1982, 1981 a; Gibson, 1973).

Por otra parte, el acidificante, el tipo de soluto utilizado para reducir la actividad de agua así como la presencia de otros solutos en el alimento, también han demostrado influir tanto en la velocidad de crecimiento y de muerte de levaduras, como en la resistencia de las mismas frente a la presencia de sorbatos (Lenovich y col., 1988; Thomas y Davenport, 1985).

En general, la presencia de polioles y de azúcar incrementa la resistencia térmica de bacterias, levaduras y esporas fúngicas (Lenovich y col., 1988; Smith y col., 1983; Corry, 1976 a, b). Gibson (1973) reportó que el efecto protector de la reducción de la actividad acuosa por el empleo de altos niveles de azúcar sobre la inactivación térmica de las levaduras es el resultado de la deshidratación de las células junto con la reducción del tamaño de poro de la pared celular. Sin embargo, este comportamiento depende del soluto empleado como humectante y de la naturaleza del microorganismo (Almagro y col., 2000).

II.1.3.2 Factores que afectan la acción antimicrobiana de los preservadores

La acción antimicrobiana de los preservadores está influenciada por numerosos factores, entre los cuales se encuentran:

- factores ambientales, como las condiciones de almacenamiento;
- tipo de proceso de preservación utilizado, es decir, tratamiento térmico, refrigeración, irradiación;
- factores intrínsecos, como los componentes del alimento, la flora microbiana, la actividad de agua, el pH y la presencia de otros aditivos.

Todos estos factores pueden actuar en forma sinérgica, antagónica o aditiva con los preservadores y, es difícil estimar o predecir la contribución del preservador en la inhibición de los microorganismos debido a que, en los alimentos, estas interacciones son complejas.

A continuación se describirán los factores más importantes que afectan la acción antimicrobiana de los preservadores, con especial consideración al sorbato de potasio por ser el aditivo empleado en el presente estudio.

a) Influencia de los componentes del alimento

La solubilidad, la distribución y la partición de los preservadores en un alimento dependen de la composición del producto, por lo tanto, la acción antimicrobiana se verá afectada por estas propiedades.

En comparación con otros preservadores, los sorbatos poseen un coeficiente de partición lípidos / agua más favorable, razón por la cual son empleados en la elaboración de mayonesas, margarinas y aderezos (Sofos, 1989).

La presencia de ácidos en el alimento disminuye la solubilidad en agua de los sorbatos, pero mejora la capacidad antimicrobiana al aumentar la fracción de ácido no disociado. Además, la naturaleza del ácido tiene incidencia sobre el efecto antimicrobiano (Liewen y Marth, 1985). Por ejemplo, los ácidos cítrico y láctico incrementan la actividad antimicrobiana en mayor grado que los ácidos inorgánicos (Restaino y col., 1982; Smittle y Flowers, 1982).

b) Influencia de la microflora

En general, el tipo y la cantidad de microorganismos presentes en el alimento afectan la capacidad antimicrobiana de los sorbatos. La misma siempre se ve disminuida por altos niveles de contaminación.

Muchas levaduras pueden sobrevivir, adaptarse y crecer en presencia de los niveles máximos de preservadores ácido débiles permitidos en alimentos (Veiga y Madeira-Lopes, 2000; Cheng y col., 1999; Guerzoni y col., 1990; Warth, 1977). *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de sobrevivir en un medio de pH 4,5 conteniendo un nivel de 3 mM de sorbato de potasio (Cheng y col., 1999).

c) Influencia de la actividad de agua

En general, la acción inhibitoria de los antimicrobianos se incrementa si se deprime la actividad de agua del producto. Guerzoni y col. (1990) observaron el incremento significativo de la fase de latencia del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de 200 ppm de benzoato de sodio debido al descenso de la actividad acuosa de 0,995 a 0,890. La presencia de 25 ppm de ácido sórbico junto con el descenso de la actividad acuosa a 0,93 fueron necesarios para inhibir el crecimiento de la misma levadura (An-Erl King, 1993).

El empleo de solutos como NaCl y sacarosa, aumentan la acción antimicrobiana de los sorbatos, a pesar de reducir la solubilidad del ácido sórbico en agua y elevan el coeficiente de partición lípidos / agua. En algunos casos, la adición de NaCl o sacarosa reduce el efecto

antimicrobiano de este preservador. Por ejemplo, las células de *Salmonella typhimurium* en un sistema constituido por soja y almidón permanecen viables durante más tiempo a actividad de agua 0,79 que a 0,97 (Beuchat, 1981 a). El agregado de sacarosa a jugos de fruta conteniendo sorbato de potasio y benzoato de sodio retardó la acción inhibitoria de los mismos frente al crecimiento de levaduras (Beuchat, 1982).

d) Influencia del pH

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos débiles se incrementa cuando el pH del medio disminuye, y es proporcional a la concentración de la forma no disociada del ácido.

Los sorbatos presentan la ventaja de ser efectivos aún en el rango de pH comprendido entre 6,0 – 6,5, a diferencia de otros preservadores, como el propionato y el benzoato cuyo pH máximo para inhibir el crecimiento microbiano es 5,0 – 5,5 y 4,0 – 4,5, respectivamente (Sofos y Busta, 1981).

El sorbato de potasio es inefectivo a pH 7,0 ó mayor (Praphailong y col., 1997; Seward y col., 1982; Smoot y Pierson, 1981).

Battey y col. (2002) reportaron la existencia de interacciones entre el pH y el benzoato de sodio o el sorbato de potasio, concluyendo que la acidez que poseen las bebidas permitiría utilizar menor cantidad de preservador para inhibir el crecimiento de levaduras.

e) Influencia del grado de disociación

Como se mencionó en la sección II.1.3.1, la acción antimicrobiana de un ácido débil depende del grado de disociación del mismo, el cual es función del pH del sistema y está influenciado por la solubilidad en agua y la actividad acuosa. Por ejemplo, a pH 7,00 el porcentaje de ácido sórbico no disociado es 0,6%, mientras que a pH 3,00 es del 98% (Sofos y Busta, 1981). Por ende, para poder predecir la efectividad de un preservador de esta naturaleza en un alimento, se debe conocer el pH, la solubilidad y la constante de disociación en ese producto en particular.

La acción antimicrobiana se asocia a la forma no disociada del ácido y se considera que la forma aniónica es inefectiva (Guerzoni y col., 1990; Lueck, 1980). La primera es más lipofílica, atraviesa la membrana citoplasmática y se disocia en el citoplasma causando la acidificación del mismo y la acumulación intracelular de la forma aniónica del ácido, la cual no atraviesa la membrana celular (Loureiro, 2000; Cheng y col., 1999). Según Lambert y Stratford,

(1999), la inhibición del crecimiento microbiano es más dependiente del nivel del preservador dentro de la célula que de la concentración de la forma no disociada en sí.

La información acerca de los valores de la constante de disociación del ácido sórbico en presencia de distintos solutos es limitada, con excepción del caso de soluciones de glicerol – agua (Pethybridge y col., 1983). Sobre la base de los datos reportados, no se observa un gran cambio en el grado de disociación en el rango de actividad de agua entre 0,8 – 1,0.

Algunos estudios han concluido que la forma disociada del ácido tiene capacidad antimicrobiana, pero ésta es de 10 a 600 veces menor que la de la forma no disociada. Sin embargo, a pH 6,0 ó mayor, más del 50% de la acción inhibitoria se debe a la forma disociada (Eklund, 1983).

f) Influencia de los aditivos

Diferentes estudios indican que los distintos aditivos normalmente incorporados en los alimentos afectan la acción antimicrobiana de los preservadores.

El tipo de ácido agregado, no sólo ejerce su efecto por modificar el pH, sino que también hay una acción específica del anión (Juven, 1976). La inactivación de *Salmonella typhimurium* por acción del sorbato de potasio es mayor en presencia de ácido acético que de láctico (Park y col., 1970). El tipo de alimento también puede modificar el efecto del acidificante sobre el sorbato, por ejemplo, el ácido cítrico incrementa la acción antimicrobiana del sorbato en pavo y, en cambio, no ejerce ningún efecto en salchichas de pollo (Huhtanen y Feinberg, 1980).

En general, los ácidos cítrico y láctico potencian la capacidad antimicrobiana de los sorbatos en mayor medida que otros ácidos.

Para impedir la oxidación de lípidos y el desarrollo de rancidez se adicionan antioxidantes. Los más utilizados son butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, butil-hidroxiquinona, propilgalato. Se encontraron efectos sinérgicos entre estos aditivos y los sorbatos (Robach y Stateler, 1980).

Ciertos estudios indican que la interacción de los sorbatos con los fosfatos mejora la capacidad antimicrobiana de los primeros. Ivey y Robach (1978) reportaron que tanto el pirofosfato ácido de sodio como el hexametáfosfato de sodio mejoran la acción de los sorbatos en la inhibición de *Clostridium botulinum* en carne de cerdo enlatada.

Svorcova (1980) reportó que el ácido sórbico y el ascórbico en combinación resultan más efectivos que cada uno de ellos por separado en la preservación de jugos de frutas.

La resistencia frente al sorbato de potasio de *Zygosaccharomyces rouxii* es mayor en presencia de polietilenglicol que de glucosa (Lenovich y col., 1988).

En la literatura se citan numerosas patentes que proponen el uso de distintos aditivos en combinación con los sorbatos para lograr la estabilidad microbiológica de distintos productos.

g) Influencia del método de preservación empleado

Los preservadores lipofílicos pueden interactuar con el tratamiento térmico y afectar la latencia de las esporas, la velocidad y la extensión de la destrucción térmica y la recuperación de las esporas dañadas por acción del calor.

Los ácidos sórbico y benzoico tienen importante influencia sobre la respuesta frente al tratamiento térmico de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens* y *Saccharomyces rouxii*. Dicha influencia depende fuertemente del pH del medio (Veiga y Madeira-Lopes, 2000; Cheng y col., 1999; Makdesi y Beuchat, 1996; Guerzoni y col., 1990; Bills y col., 1982; Beuchat, 1981 b). Por ejemplo, luego de un tratamiento a 25°C en presencia de 9 mM de ácido sórbico, *Zygosaccharomyces bailii* incrementa su resistencia frente a un tratamiento a 52°C durante 10 minutos cuando el pH es cercano a la neutralidad, pero a pH 3,5, la termotolerancia se reduce significativamente (Cheng y col., 1999). La presencia de ácido benzoico incrementa la velocidad de inactivación térmica de *Pichia membranifaciens* en jugo de manzana (Veiga y Madeira-Lopes, 2000).

Bajos niveles de sorbatos (0,01%) podrían estimular la ruptura del estado de latencia de las esporas en el transcurso del tratamiento térmico. Este comportamiento se observó en ascosporas de *Byssochlamys nivea* en jugo de pomelo (Beuchat, 1976).

En general, el tratamiento térmico y los sorbatos actúan sinérgicamente en la inactivación por calor de hongos, levaduras y bacterias (Sofos, 1989).

En algunos estudios se ha sugerido que el uso combinado de bajas dosis de irradiación y la adición de sorbatos, permiten aumentar la vida útil de diversos alimentos ya que ambos factores de preservación actúan sinérgicamente en la inhibición de microorganismos (Sofos, 1989). Sin embargo, debido a que la irradiación y el tratamiento térmico afectan la estabilidad

del sorbato, más estudios son necesarios para conocer las ventajas y desventajas de la combinación de estos tratamientos.

h) Influencia de las condiciones de almacenamiento

Numerosos estudios han demostrado que los sorbatos inhiben a los microorganismos más efectivamente a bajas temperaturas de almacenamiento que a altas (Pederson y col., 1961). La combinación de sorbatos y nitrito posee una mayor capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano en salchichas a 7-9°C que a 20°C. Además, la inhibición de la toxina botulínica en homogenatos de cerdo es más pronunciada a 15°C que a 35°C (Roberts y col., 1982). Sin embargo, Golden y Beuchat (1992) reportaron que la presencia conjunta de sorbato de potasio y sacarosa incrementó la resistencia al congelamiento de *Zygosaccharomyces rouxii*.

Campos y col. (2000) observaron que los productos de degradación de sorbato de potasio almacenado a 70°C durante 7 días inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

La acción antimicrobiana de los sorbatos es también influenciada por el tipo de envase y la atmósfera gaseosa que rodea el producto. En general, tanto el envasado como el uso de atmósfera modificada (aumento del nivel de dióxido de carbono) mejoran el efecto inhibitor de los sorbatos. Varios estudios han demostrado que la combinación de dióxido de carbono y sorbatos es una efectiva inhibidora del desarrollo microbiano (Liewen y Marth, 1985).

Castro y col. (2002) observaron que el material del envase y la concentración de EDTA de sistemas que modelan aderezos para ensaladas influyen sobre la estabilidad de los sorbatos e informaron que el material de vidrio y una mínima concentración del agente complejante aseguran que el nivel de ácido sórbico se mantenga por encima de la mínima concentración inhibitoria del desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*, luego de 90 días de almacenamiento a 33°C.

II.1.4 Modelado matemático del comportamiento microbiano en alimentos

La microbiología predictiva une a la microbiología y la ingeniería de alimentos con la matemática y la estadística a fin de proveer descripciones y predicciones del comportamiento microbiano en sistemas alimenticios. Puede ser utilizada para modelar el crecimiento, la supervivencia y la muerte de los microorganismos en función de los principales factores de

conservación de alimentos. Especialmente cuando estos factores son utilizados de manera conjunta en las tecnologías de barreras o métodos combinados de preservación.

La aplicación de modelos matemáticos para describir el crecimiento de los microorganismos en alimentos ha tenido un notable desarrollo en los últimos años. Según McMeekin y col. (1993), los principales factores que han contribuido a incrementar el interés por los modelos predictivos en microbiología de alimentos han sido dos. El primero de ellos ha sido el marcado aumento de las intoxicaciones provocadas por alimentos durante los años 80, lo que llevó a un mayor conocimiento, por parte de la opinión pública, de los requerimientos para una alimentación sana y segura. El segundo ha sido la comprensión de que los métodos microbiológicos tradicionales y muchos métodos "rápidos", que se utilizaban para determinar la calidad y la seguridad de los alimentos, estaban limitados por las necesidades de tiempo para obtener resultados y tenían muy poco valor predictivo. Buchanan (1991) consideró otro factor para explicar el aumento de los modelos predictivos: el espectacular desarrollo y el fácil acceso al poder de cálculo de las computadoras.

En esencia, los modelos microbianos, se basan en expresiones matemáticas que describen el comportamiento de los microorganismos. Esto incluye expresiones que muestran los cambios en las poblaciones microbianas con el tiempo y cómo influyen las condiciones ambientales sobre ese cambio (Whiting y Buchanan, 1994).

Los modelos microbianos constituyen valiosas herramientas en la industria alimenticia ya que predicen el crecimiento o la supervivencia de los microorganismos. Los modelos pueden, de esta forma, aportar información muy útil para tomar decisiones acerca de la higiene y la vida útil de un producto, pudiéndose estimar los riesgos potenciales debidos al crecimiento de patógenos en un alimento tras un período de almacenamiento en determinadas condiciones, o establecer una fecha de vida útil para un producto mediante la estimación del tiempo necesario para alcanzar un nivel especificado de alteración del producto o de población microbiana. Además, también son útiles en otro tipo de situaciones relacionadas con la predicción del control de calidad, con el desarrollo de nuevos productos, con planes de trabajo y análisis de datos en laboratorios y con la educación.

II.1.4.1 Clasificación de modelos microbianos

Se han propuesto varias clasificaciones de los modelos. Principalmente se clasifican en modelos que describen el crecimiento y modelos que describen la inactivación microbiana.

Dentro de estas dos categorías se encuentran modelos que pueden ser primarios, secundarios o terciarios (McMeekin y col., 1993; Whiting y Buchanan, 1994).

En el nivel primario se incluyen los modelos que describen los cambios de la población microbiana con el tiempo en determinadas condiciones. Y pueden basarse en la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias por ml o por g de sistema, de la formación de toxina o niveles de sustrato / producto consumidos / generados. También puede cuantificarse mediante alguna medida indirecta de la respuesta microbiana, como puede ser los cambios en absorbancia o impedancia, entre otros. Una vez generada la curva de crecimiento o inactivación microbiana se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio en la respuesta durante el tiempo, manteniendo fijos los parámetros extrínsecos e intrínsecos que afectan el crecimiento o muerte del microorganismo.

Para modelar el crecimiento microbiano en función del tiempo se utilizan con frecuencia curvas sigmoides. Este tipo de funciones se eligen debido a que presentan cuatro fases, que comprenden una fase inicial de cambio lento, una fase de cambio acelerado, otra fase de cambio desacelerado y, finalmente, una fase estacionaria (Stannard y col., 1985; Gibson y col., 1987; Baranyi y col., 1992). De este modo, los modelos primarios permiten estimar parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento microbiano, como la fase de latencia, el tiempo de generación, la velocidad de crecimiento máximo y la densidad de población máxima de un microorganismo bajo determinadas condiciones (Skinner y Larkin, 1994) y, de curvas de inactivación, como la velocidad de muerte térmica, la zona de hombro y la zona de cola. Ejemplos de modelos primarios son la función de Gompertz, para crecimiento exponencial y, el modelo de Baranyi, para describir la inactivación térmica (Xiong y col. 1999).

Los modelos del nivel secundario describen la respuesta microbiana en términos de los parámetros de los modelos primarios y del efecto de los cambios en las condiciones ambientales, como pueden ser el pH, la temperatura o la actividad de agua. Ejemplos de modelos secundarios son el modelo de Arrhenius y el modelo de la raíz cuadrada (Belehrádek).

Los modelos terciarios son rutinas de software que convierten a los modelos primarios y secundarios en programas amistosos para los usuarios. Estos programas calculan o predicen las respuestas microbianas en condiciones ambientales que no fueron inicialmente evaluadas y permiten las comparaciones entre microorganismos y entre ambientes y, por lo tanto, permiten elegir a él o los microorganismos problemáticos o blanco de ataque en situaciones específicas de formulación y/o procesamiento de alimentos. Ejemplos de modelos terciarios son el *USDA Pathogen Modeling Program*, que se encuentra disponible gratuitamente y el *Food Micromodel*

Software desarrollado mediante un programa en colaboración entre industrias y centros de investigación del Reino Unido. Ambos programas describen, modelan y predicen el comportamiento de algunas bacterias patógenas de mayor importancia (Buchanan, 1991, 1993). El único microorganismo deteriorativo incluido en el *Food Micromodel Software* es *Zygosaccharomyces bailii*. Esto, probablemente se deba a las importantes pérdidas económicas que conlleva su crecimiento en los alimentos.

II.1.5 Objetivos

Basándose en lo expuesto, debe destacarse que existen factores de estrés que, de alguna manera, afectan el desarrollo de los microorganismos, pero que no todas las células se comportan de igual modo frente a ellos, por lo tanto, es aconsejable estudiar el efecto de cada factor por separado y en conjunto, sobre el desarrollo o supervivencia del/los microorganismo/s de interés.

Para ello, en el presente capítulo se evaluó la acción antimicrobiana del sorbato de potasio, la presencia de aspartamo y de distintos humectantes dulces (glucosa, sorbitol, xilitol y manitol), y el descenso de la actividad de agua que estos últimos producen, frente al crecimiento y la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*, en sistemas tendientes a modelar alimentos de reducido tenor glucídico, tales como jugos, jaleas o mermeladas.

II.2 Materiales y métodos

II.2.1 Formulación de los sistemas modelo

II.2.1.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica, con excepción de los reactivos de la marca Gelfix, que fueron de grado alimenticio. Los mismos se detallan a continuación:

- Sorbato de potasio (Sigma)
- Ácido cítrico anhidro (Anedra)
- Caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics)
- Agar Sabouraud (Biokar Diagnostics)
- Glucosa (Anedra)
- Aspartamo (Gelfix)
- Sorbitol (Gelfix)
- Xilitol (Gelfix)
- Manitol (Anedra)

II.2.1.2 Composición de los sistemas modelo

Los sistemas se formularon en caldo Sabouraud, y las composiciones de los mismos se encuentran en la Tabla II.1.

La elección de la composición de los sistemas fue explicada en detalle en la sección I.2.1. Cabe aclarar que los sistemas II.O y II.P se formularon con el objetivo de estudiar el efecto del descenso de la actividad de agua sobre la inactivación térmica de la levadura cuando se utilizan, específicamente xilitol o glucosa como humectantes.

Tabla II.1. Composición de los sistemas modelo.

Sistemas	Composición (% p/p)					Actividad acuosa
	Sorbitol	Xilitol	Manitol	Glucosa	Aspartamo	
II.A	-	-	-	-	-	1,000
II.B	12,90	-	-	-	-	0,985
II.C	-	11,00	-	-	-	0,985
II.D	-	-	13,00	-	-	0,985
II.E	-	-	-	10,00	-	0,988
II.F	12,90	-	-	10,00	-	0,971
II.G	-	11,00	-	10,00	-	0,971
II.H	-	-	13,00	10,00	-	0,971
II.I	-	-	-	22,00	-	0,971
II.J	-	-	-	-	0,500	1,000
II.K	-	11,00	-	-	0,500	0,985
II.L	-	-	-	10,00	0,500	0,988
II.M	-	11,00	-	10,00	0,500	0,971
II.N	-	-	-	22,00	0,500	0,971
II.O	-	19,58	-	-	-	0,971
II.P	-	-	-	48,21	-	0,900

En todos los casos el pH de los sistemas se ajustó a 3,00 por el agregado de gotas de una solución 50,00% p/p de ácido cítrico.

Para la determinación del pH se empleó un electrodo de vidrio unido a un pHmetro Solution Analyzer 5800-05 (Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. El error en la determinación del pH fue de 0,02 unidades de pH.

La actividad de agua se midió a 25°C con un higrómetro Aqualab-Decagon CX-1 (Decagon, Pullman, WA, USA). Previamente a la medición de la actividad de agua de los

sistemas, se realizó una curva de calibración con soluciones salinas saturadas. El error en la determinación de la actividad de agua fue de 0,005 unidades.

En los sistemas comprendidos entre II.A y II.N se determinó la capacidad de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*. Para ello se analizó cada uno de los sistemas sin el agregado de sorbato de potasio y, con la adición de diferentes concentraciones del mismo, las cuales fueron 0,005, 0,010, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030 y 0,035% p/p. Cabe aclarar que en todos los sistemas no se estudió la totalidad de las concentraciones del preservador ya que el mismo inhibió el crecimiento de la levadura a niveles inferiores al mayor nivel estudiado.

Con relación a la inactivación térmica de la levadura, la misma se estudió en todos los sistemas de la Tabla II.1. Para ello se adicionó a cada uno de los mismos, 0,025% p/p de sorbato de potasio. Este nivel de preservador se eligió teniendo en cuenta, según se verá más adelante en la sección II.3.1, la mínima concentración del mismo necesaria para inhibir el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los distintos sistemas. Además, se utilizaron sistemas control sin preservador con fines comparativos.

II.2.2 Metodología para la obtención de curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

II.2.2.1 Elaboración del inóculo

Se realizó un inóculo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 en caldo Sabouraud, y se almacenó a 25 ± 1 °C durante 24 h, tiempo que le permitió alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 1.10^8 UFC/ml de inóculo).

II.2.2.2 Elaboración de los sistemas

La metodología empleada para la elaboración de los sistemas dependió de su composición química. Se utilizó un procedimiento para los sistemas que no contenían aspartamo y otro para aquellos que sí lo contenían, ya que la inestabilidad térmica del edulcorante no permite su esterilización por calor.

Los sistemas que no contenían aspartamo se prepararon siguiendo las especificaciones establecidas en la sección II.2.1.2. Luego de su elaboración, se dispensaron, por duplicado, alícuotas de 14,25 ml de cada uno en frascos de vidrio oscuro y se esterilizaron en autoclave.

Datos preliminares mostraron que el pH y el contenido de sorbato de potasio no cambian significativamente por el autoclavado.

Para la fabricación de los sistemas conteniendo aspartamo en su formulación se siguieron las especificaciones establecidas en la sección II.2.1.2, pero sin el agregado de aspartamo. Luego, se dispensaron, por duplicado, alícuotas de cada uno en frascos de vidrio oscuro y se esterilizaron en autoclave. En forma simultánea, se elaboró una solución de aspartamo de pH 3,00, la cual se esterilizó por filtración mediante el empleo de filtros de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro (Micron Separations Inc., USA). Por último, en forma aséptica, se dispensó en cada uno de los frascos una alícuota de la solución de aspartamo estéril. En todos los casos el volumen final de sistema alcanzado fue de 14,25 ml.

Posteriormente a la fabricación de todos los sistemas, se adicionó asépticamente, 0,75 ml del caldo Sabouraud conteniendo el inóculo, obteniendo una población de $1 \cdot 10^7$ UFC/ml de sistema. El espacio cabeza de aire se mantuvo constante en todos los frascos y el mismo fue el 75% del volumen total del frasco. Los sistemas ya inoculados se incubaron a una temperatura constante de 25 ± 1 °C en una cámara de convección forzada.

II.2.2.3 Toma de muestra

El crecimiento de la levadura se midió por turbidimetría (Dalgaard y col., 1994). Para tal propósito, durante su incubación, cada sistema fue retirado a intervalos de tiempo prefijados. A dichos tiempos se tomaron alícuotas de 1 ml y se les midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Beckman, Fullerton, California, USA).

La relación entre la concentración microbiana y la proporción absorbancia / turbidez sólo es lineal en un rango limitado, correspondiente a un incremento aproximado de diez veces en el número de células (Mc Meekin y col., 1993). Para trabajar en la zona lineal, los sistemas que tuvieron una absorbancia superior a 0,3 fueron diluidos, según lo recomendado por Dalgaard y col. (1994). Dicha dilución se realizó con el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación de cada muestra (10 minutos, 3000 RPM a temperatura ambiente). Además, el sobrenadante se utilizó como blanco de las mediciones de absorbancia.

II.2.2.4 Análisis de datos

Se graficaron los datos obtenidos de las mediciones de absorbancia en función del tiempo de incubación, obteniéndose las curvas de crecimiento. A partir de las mismas se determinó, para cada sistema, la mínima concentración inhibitoria de sorbato de potasio que inhibió el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, considerándose inhibición al cambio de la turbidez inferior o igual a 0,1 unidades de absorbancia respecto al valor inicial, luego de, aproximadamente 200 horas de crecimiento.

Además, las curvas de crecimiento fueron modeladas aplicando la ecuación de Gompertz modificada (McMeekin y col., 1993):

$$y = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[1 + \frac{\mu}{A} (\lambda - t) \right] \right\} \quad \text{Ecuación II.1}$$

Esta ecuación expresa el cambio de turbidez (y) producido por el crecimiento de la levadura en función del tiempo (t). La turbidez es evaluada a través de mediciones de la absorbancia de la muestra a 540 nm. Los parámetros biológicos de crecimiento de la levadura son, la velocidad de crecimiento específica (μ), el tiempo de fase de latencia (λ) y el valor asintótico (A), el cual representa la turbidez cuando la población alcanza la fase estacionaria. Es de destacar que la velocidad de crecimiento específica evaluada no corresponde a la máxima velocidad de crecimiento, debido a que el método de densidad óptica es menos sensible que el método de recuento de células viables (McMeekin y col., 1993).

Para cada sistema se estimaron los parámetros de crecimiento mediante un análisis de regresión no lineal de los datos utilizando la ecuación de Gompertz modificada. Para establecer las diferencias significativas entre los parámetros obtenidos para todos los sistemas, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y, *a posteriori*, el test de mínimas diferencias significativas, LSD (*least significant difference*). Además se realizó un ANOVA de dos factores (humectante y nivel de sorbato de potasio, actividad de agua y nivel de sorbato de potasio, humectante y nivel de aspartamo, o actividad de agua y nivel de aspartamo) para establecer posibles interacciones (Sokal y Rohlf, 1969). En todos los casos, la significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$).

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus para Windows, versión 3,0, 1997, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA).

II.2.3 Metodología para la obtención de curvas de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*

II.2.3.1 Elaboración del inóculo

Se realizó un inóculo de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 en caldo Sabouraud, y se almacenó a 25 ± 1 °C durante 31 horas, tiempo que le permitió alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 1.10^7 UFC/ml de inóculo).

II.2.3.2 Elaboración de los sistemas

La elaboración de los sistemas en los cuales se estudió la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*, se realizó de acuerdo a dos metodologías, en función de la presencia o la ausencia de aspartamo.

Los sistemas que no contenían aspartamo se prepararon según las especificaciones realizadas en la sección II.2.1.2. Luego de su elaboración, se dispensaron, por triplicado, volúmenes de 99,00 ml de cada uno en erlenmeyers de 250 ml y se esterilizaron en autoclave.

Para la fabricación de los sistemas conteniendo aspartamo en su formulación se siguieron las especificaciones establecidas en la sección II.2.1.2, pero sin el agregado de aspartamo. Luego, se dispensaron, por triplicado, alícuotas de cada uno en erlenmeyers de 250 ml, y se esterilizaron en autoclave. En forma simultánea se elaboró una solución de aspartamo de pH 3,00, la cual se esterilizó por filtración mediante el empleo de filtros de acetato de celulosa de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (Micron Separations Inc., USA). Por último, en forma aséptica, se dispensó en cada uno de los erlenmeyers una alícuota de la solución de aspartamo estéril. En todos los casos el volumen final alcanzado fue de 99,00 ml de sistema.

Posteriormente a la fabricación de todos los sistemas, los erlenmeyers fueron templados a $50,0 \pm 0,5$ °C y se les adicionó en forma aséptica, 1,00 ml de caldo Sabouraud conteniendo el inóculo, obteniendo una población aproximada de 1.10^5 UFC/ml de sistema. Los

erlenmeyers se agitaron constantemente en un agitador orbital Shaker Pro (Vicking, Buenos Aires, Argentina) y se mantuvieron a una temperatura constante de $50,0 \pm 0,5$ °C durante todo el ensayo en una cámara de convección forzada.

II.2.3.3 Toma de muestra

Para determinar la inactivación térmica de la levadura, se tomaron alícuotas de cada sistema a intervalos de tiempo prefijados, durante un período máximo de 60 minutos para los sistemas sin preservador y, de 30 minutos, para el resto de los sistemas. Las alícuotas retiradas se utilizaron para la determinación de la población viable de *Zygosaccharomyces bailii* mediante plaqueo en superficie y en profundidad sobre agar Sabouraud. Las placas se incubaron a $25,0 \pm 0,5$ °C. Luego de 7-10 días de incubación, se contaron las colonias y se construyeron las curvas de inactivación térmica.

II.2.3.4 Análisis de datos

Lo datos obtenidos de recuento de viables en función del tiempo de incubación se modelaron mediante la aplicación de la ecuación de Baranyi (Xiong y col., 1999). La misma expresa la relación logarítmica entre N y N_0 (número de microorganismos presentes al tiempo t y cero, respectivamente) en función del tiempo (t):

$$\log \frac{N}{N_0} = \log \left[q_B + (1 - q_B) e^{-k(t - B(t))} \right] \quad \text{Ecuación II.2}$$

donde $q_B = (N_{min}/N)$; N_{min} es la mínima concentración de células remanente en la fase cola de la curva de inactivación térmica; k es la velocidad de muerte máxima relativa, mientras que $B(t)$, es la función del tiempo de latencia y se define como:

$$B(t) = \frac{r}{3} \left(\frac{1}{2} \ln \frac{(r+2)^2}{r^2 - rt + t^2} + \sqrt{3} \cdot \arctan \frac{2t - r}{r\sqrt{3}} + \sqrt{3} \cdot \arctan \frac{1}{\sqrt{3}} \right) \quad \text{Ecuación II.3}$$

donde el parámetro de latencia r , es el tiempo requerido para que la velocidad de muerte relativa alcance la mitad del valor de la velocidad de muerte máxima relativa k .

Para chequear la bondad del ajuste de la ecuación aplicada, se estimaron el coeficiente de correlación (R^2) y la raíz cuadrada de la media del error (RCME) entre los datos experimentales y los predichos por el modelo.

Se estimaron los parámetros de las curvas de supervivencia para cada uno de los sistemas a partir de un análisis de regresión no lineal de los datos mediante la aplicación del modelo. Para establecer las diferencias significativas entre los parámetros obtenidos para todos los sistemas, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y, *a posteriori*, el test de mínimas diferencias significativas, LSD (*least significant difference*). Además se realizó un ANOVA de dos factores (humectante y nivel de sorbato de potasio, actividad de agua y nivel de sorbato de potasio, humectante y nivel de aspartamo, o actividad de agua y nivel de aspartamo) para establecer posibles interacciones (Sokal y Rohlf, 1969). En todos los casos, la significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$).

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus para Windows, versión 3,0, 1997, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA).

II.3 Resultados y discusión

II.3.1 Estimación de la mínima concentración inhibitoria de sorbato de potasio frente al crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

En la Figuras II.1, II.2 y II.3 se muestran las curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* para los sistemas de actividad de agua 1,000 (sistemas II.A y II.J), 0,985 ó 0,988 (sistemas II.B, II.C, II.D, II.E, II.K y II.L) y 0,971 (sistemas II.F, II.G, II.H, II.I, II.M y II.N), respectivamente, ya sea en ausencia del preservador, como en presencia de los diferentes niveles del mismo indicados en la sección II.2.1.2.

Figura II.1. Curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas de actividad de agua 1,000, en ausencia de sorbato de potasio (KS) y en presencia de distintos niveles del mismo (% p/p).

Panel a: sistemas sin aspartamo (sistema II.A). Panel b: sistemas conteniendo aspartamo (sistema II.J).

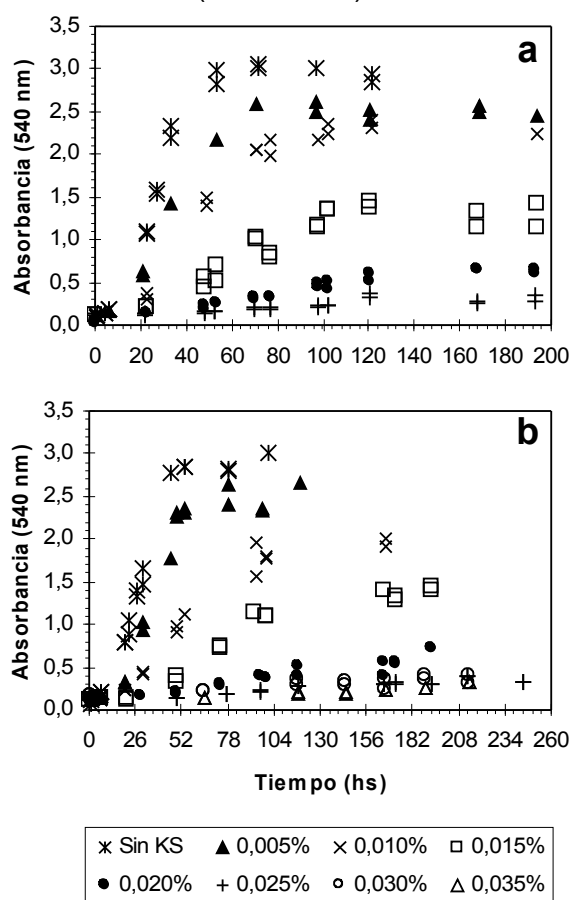


Figura II.2. Curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas de actividad de agua 0,985 y 0,988 en ausencia de sorbato de potasio (KS) y en presencia de distintos niveles del mismo (% p/p).

Panel a: sorbitol (sistema II.B). Panel b: xilitol (sistema II.C). Panel c: manitol (sistema II.D). Panel d: glucosa (sistema II.E). Panel e: xilitol / aspartamo (sistema II.K). Panel f: glucosa / aspartamo (sistema II.L).

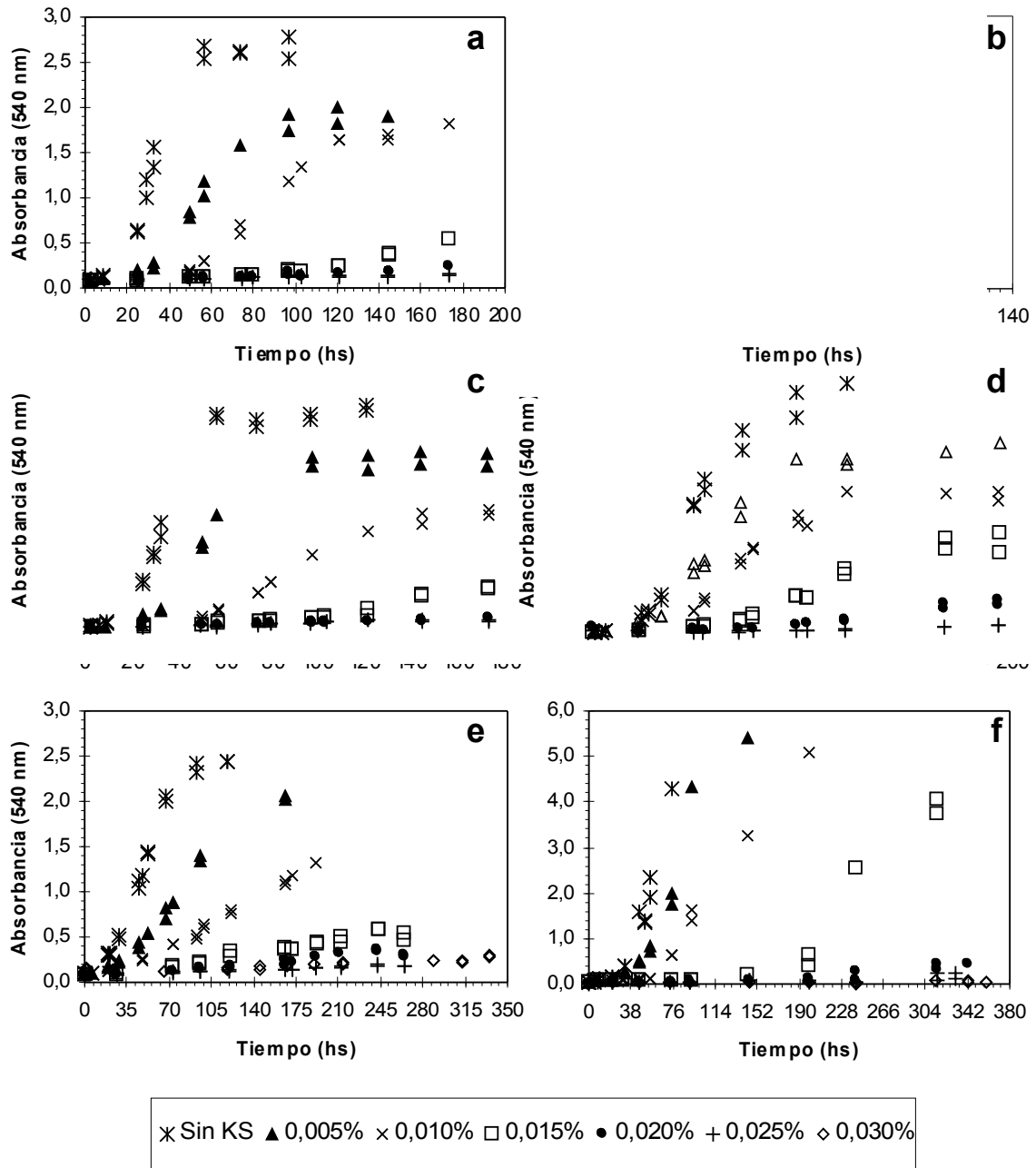
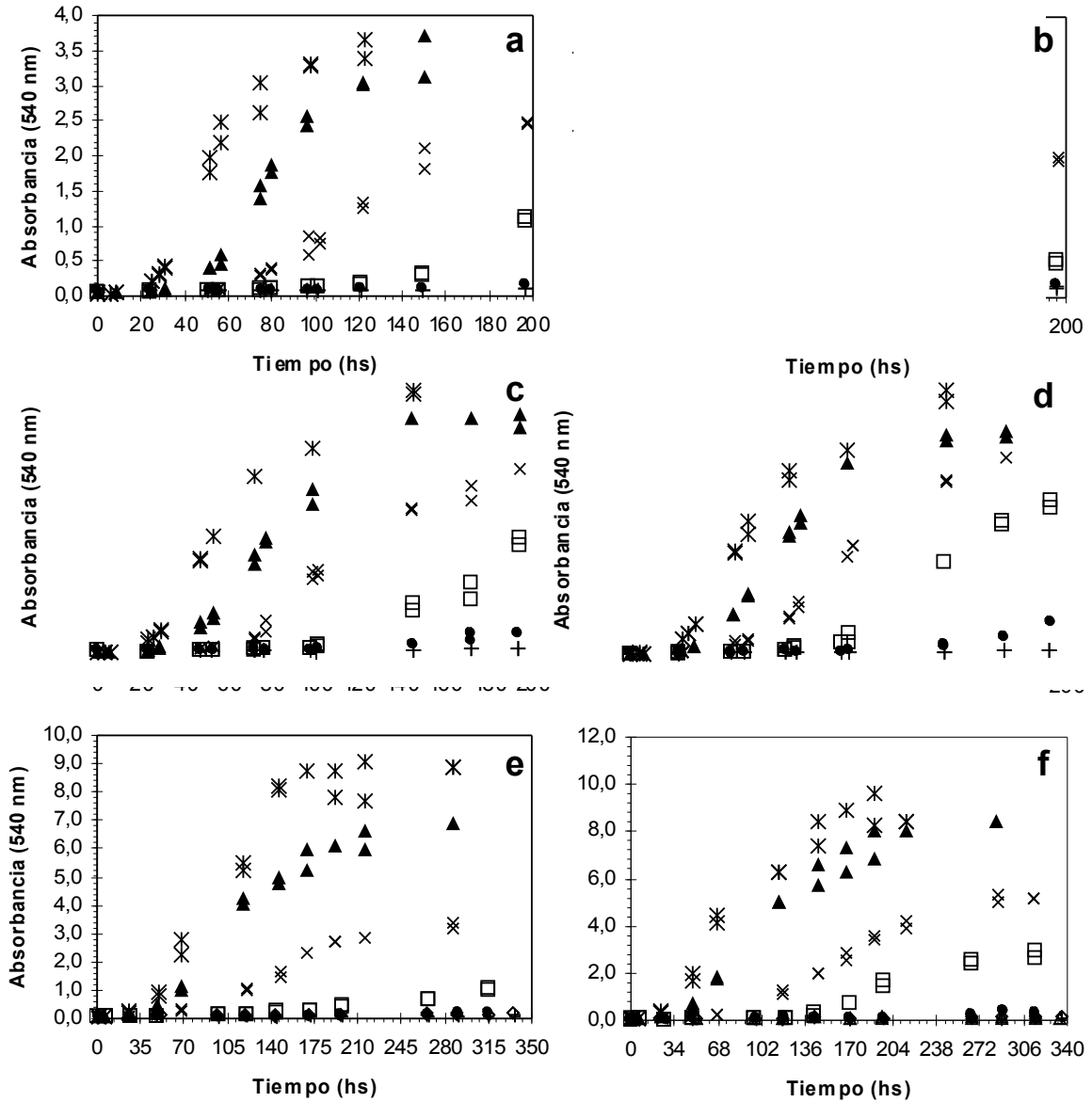


Figura II.3. Curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas de actividad de agua 0,971 en ausencia de sorbato de potasio (KS) y en presencia de distintos niveles del mismo (% p/p).

Panel a: sorbitol / glucosa (sistema II.F). Panel b: xilitol / glucosa (sistema II.G). Panel c: manitol / glucosa (sistema II.H). Panel d: glucosa (sistema II.I). Panel e: xilitol / glucosa / aspartamo (sistema II.M). Panel f: glucosa / aspartamo (sistema II.N).



✖ Sin KS ▲ 0,005% × 0,010% □ 0,015% ● 0,020% + 0,025% ◇ 0,030% △ 0,035%

En dichas figuras puede observarse que la levadura creció en los sistemas libres de preservador, alcanzando la fase estacionaria al cabo de 2 a 5 días de incubación, aproximadamente, dependiendo de la composición del sistema. Es de destacar que, independientemente de los factores de estrés aplicados, es decir, el descenso del pH y la actividad de agua, la levadura se desarrolló en todos los sistemas estudiados. Sin embargo, el empleo de aspartamo y de los distintos humectantes disminuyó, en general, el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*. Estos comportamientos se discuten con más detalle en la sección II.3.2.

En todos los sistemas, el crecimiento de la levadura se redujo gradualmente con el incremento de la concentración de sorbato de potasio, hasta inhibirse totalmente a concentraciones correspondientes a la mínima concentración inhibitoria.

La acción inhibitoria del sorbato de potasio sobre las levaduras se encuentra ampliamente reportada en bibliografía. Lambert y Stratford (1999) observaron inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, luego de 60 h de incubación a 30°C, debido a la adición de 0,01% p/p de sorbato de potasio a caldo acidificado a pH 4,0. Beuchat (1981 b) también indicó una significativa reducción de la población de la misma levadura en presencia de una concentración del preservador mayor o igual al 1% p/p. La presencia de 1 mM de ácido sórbico disminuyó significativamente la biomasa de la levadura *Pichia membranifaciens* (Veiga y Madeira-Lopes, 2000), mientras que 1,00 g/l del mismo preservador redujo el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxi* y *Debaryomyces hanseii* (Casas y col., 2004). Un nivel de 25 ppm de ácido sórbico en un medio de actividad de agua 0,94 y pH 4,0, fue necesario para inhibir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (An-Erl King, 1993).

La mínima concentración inhibitoria de sorbato de potasio fue 0,035% p/p para el sistema de actividad de agua 1,000 conteniendo aspartamo (Figura II.1, panel b, sistema II.J), y 0,025% p/p para el sistema carente de humectantes y de aspartamo (Figura II.1, panel a, sistema II.A), para los sistemas formulados con glucosa como humectante ya sea en ausencia como en presencia de aspartamo (Figura II.2, paneles d y f, sistemas II.E y II.L, respectivamente; Figura II.3, paneles d y f, sistemas II.I y II.N, respectivamente), para el sistema que contiene glucosa y manitol (Figura II.2, panel c, sistema II.D) y para el sistema de actividad de agua 0,985 conteniendo xilitol y aspartamo (Figura II.2, panel e, sistema II.K). Los resultados obtenidos muestran que la adición de 0,50% p/p de aspartamo aumenta el valor de la mínima concentración inhibitoria. Probablemente, el edulcorante sea metabolizado por la levadura y, por ende, el caldo Sabouraud conteniendo aspartamo sea un sustrato que

favorezca el desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*, elevando, entonces, el tenor de preservador necesario para inhibir su crecimiento.

El metabolismo del aspartamo en los microorganismos ya ha sido reportado en trabajos previos. Por ejemplo, en el caso de yogurt y de leche chocolatada, se ha registrado un aumento de la flora microbiana en forma concomitante con la degradación biológica del aspartamo (Keller y col., 1991 a, b).

Es de destacar que la depresión de la actividad de agua a 0,985 ó 0,971 debido al agregado de glucosa (Figura II.2, paneles d y f; Figura II.3, paneles c y f) o de la mezcla glucosa / manitol (Figura II.3, panel c), independientemente de la presencia de aspartamo, no afectó el valor de la mínima concentración inhibitoria. No obstante, en general, la depresión de la actividad acuosa disminuye la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento. Por ejemplo, a una actividad de agua de 0,97 y pH 4,0 es necesario un nivel de sorbato de potasio de 500 ppm para inhibir el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, pero si la actividad acuosa desciende a 0,95, se requieren sólo 100 ppm del preservador (Cerruti y col., 1990).

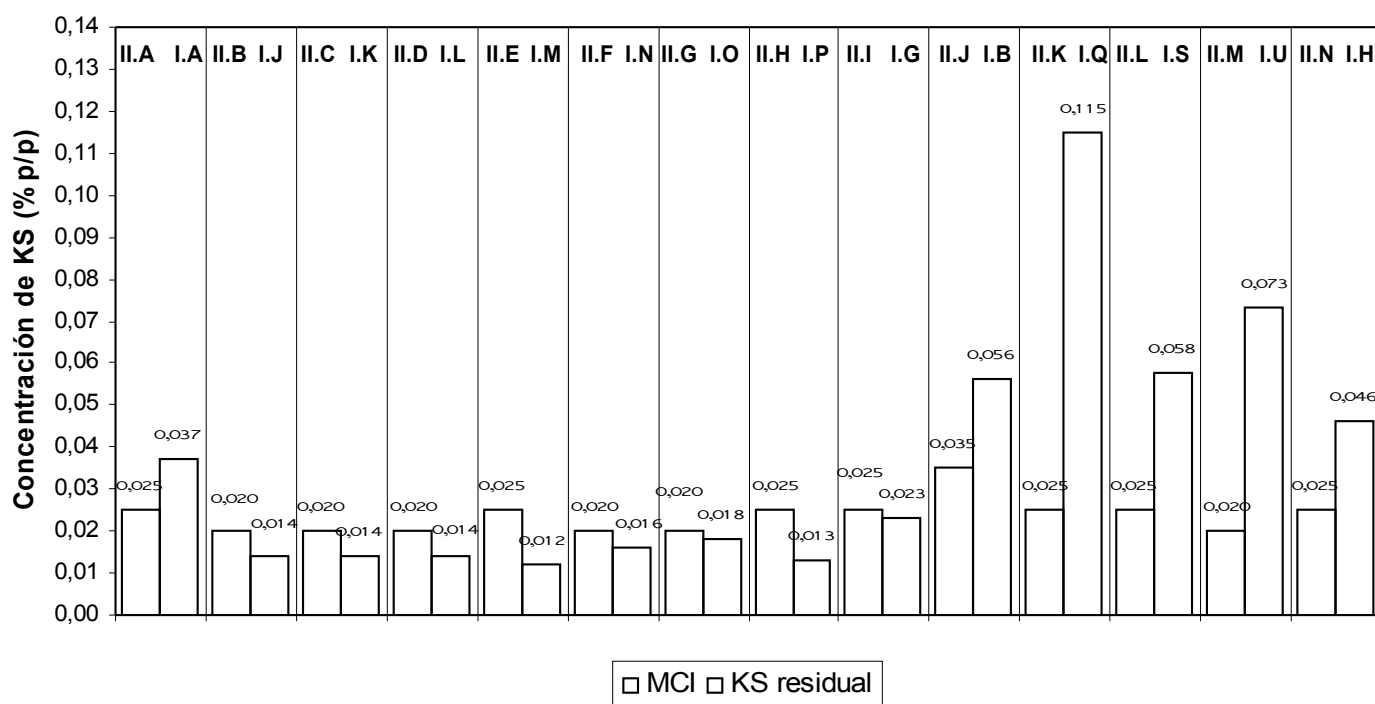
La mínima concentración inhibitoria del preservador disminuyó a 0,020% p/p en los sistemas de actividad acuosa 0,985 conteniendo polioles (Figura II.2, paneles a, b y c, sistemas II.B, II.C y II.D, respectivamente), cuando se emplean sorbitol y glucosa en forma conjunta (Figura II.3, panel a, sistema II.F), y en los sistemas que combinan xilitol con glucosa, tanto en ausencia como en presencia de aspartamo (Figura II.3, paneles b y e, sistemas II.G y II.M, respectivamente). Este comportamiento pone de manifiesto un ligero efecto inhibitorio que, en general, ejercieron los polioles sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*. Igual tendencia ha sido informada respecto a la inhibición de *Staphylococcus aureus* (Vaamonde y col., 1982).

Es importante destacar que similares valores de mínima concentración inhibitoria del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* fueron reportados en bibliografía. Praphailong y Fleet, (1997) encontraron que 250 mg/l de ácido sórbico fue el máximo nivel que permitió el crecimiento de la levadura en medio de cultivo a pH 3,0. Además, Castro y col. (2002) observaron que la mínima concentración inhibitoria del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas acuosos de pH 3,5, que modelan aderezos para ensaladas, fue 0,040% p/p.

II.3.1.1 Vinculación de la mínima concentración inhibitoria de sorbato de potasio con la estabilidad química del preservador

Para remarcar la importancia de la degradación del preservador sobre la estabilidad microbiológica de los sistemas estudiados, se calculó la concentración residual de sorbato de potasio luego de 21 días de almacenamiento, a partir de las constantes de velocidad de degradación del mismo, informadas en las secciones I.3.2.2, I.3.3.1 y I.3.4.1. Estos valores se muestran en la Figura II.4, donde se comparan con las mínimas concentraciones inhibitorias del preservador, para cada uno de los sistemas.

Figura II.4. Mínima concentración inhibitoria (MCI) y concentración residual de sorbato de potasio (KS) luego de 21 días de almacenamiento para los diferentes sistemas.



Los resultados indican que los niveles residuales del preservador fueron menores que la mínima concentración inhibitoria, con excepción del sistema libre de humectantes (sistema II.A) y de los sistemas conteniendo aspartamo (sistemas II.J, II.K, II.L, II.M y II.N) en los cuales la concentración residual del preservador fue mayor a la mínima concentración inhibitoria. Cabe destacar que este último comportamiento se obtiene merced al efecto protector del aspartamo sobre la degradación del sorbato de potasio (sección I.3.4.1).

Por lo tanto, la concentración inicial de sorbato empleada no aseguraría la estabilidad microbiológica, al cabo de un almacenamiento de 21 días, para los sistemas de actividad acuosa reducida que no contienen aspartamo. Esta tendencia concuerda con la informada por Tapia y col. (1995), quienes observaron que *Zygosaccharomyces bailii* pudo sobrevivir y crecer en frutas de alta humedad (actividad de agua 0,97-0,98), como mango y papaya, con pH ajustado a 3,50, conteniendo 1000 ppm de sorbato de potasio, a pesar de tener un 50% de retención del preservador.

II.3.1.2 Conclusiones

Los distintos humectantes utilizados influyeron sobre la acción antimicrobiana del sorbato de potasio. Con relación a esta influencia, es necesario remarcar los siguientes hechos:

- a) A medida que se aumentó la concentración de sorbato, el crecimiento de la levadura disminuyó gradualmente hasta llegar a inhibirlo totalmente a un nivel de 0,020, 0,025 ó 0,035% p/p dependiendo de la composición del sistema.
- b) Luego de 21 días de almacenamiento, la concentración residual de sorbato de potasio en sistemas de actividad de agua reducida, libres de aspartamo, fue menor que la mínima concentración inhibitoria del preservador. Este hecho sugiere que, de observarse en un alimento la misma tendencia que en los sistemas modelo estudiados, la adición de 0,130% p/p de sorbato de potasio, máximo nivel permitido por el Código Alimentario Argentino para alimentos modificados en su composición glucídica (CAA, art. 1376), no es suficiente para asegurar la efectividad del preservador a lo largo del período de almacenamiento estudiado.

II.3.2 Factores que afectan el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

Las curvas de crecimiento de la levadura fueron modeladas satisfactoriamente mediante la ecuación de Gompertz, según se probó a través de un ANOVA y por medio del coeficiente de correlación (R^2), el cual mostró valores comprendidos entre 0,98 y 0,99 para todos los sistemas. En el caso de los sistemas de actividad de agua 0,985 y 0,971, conteniendo xilitol, en ausencia de aspartamo (sistemas II.C y II.G), el modelado de las curvas obtenidas cuando el nivel del preservador fue 0,010% p/p no pudo realizarse mediante el empleo de la ecuación de

Gompertz, por lo tanto, para dichos sistemas, de los tres parámetros de crecimiento, sólo se pudo estimar la velocidad por regresión lineal de datos representativos de la fase exponencial.

Las Figuras II.5 a II.7 muestran los resultados experimentales y las curvas modeladas de todos los sistemas tanto en ausencia como en presencia de 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio.

En las siguientes secciones se analizará detalladamente el efecto de la presencia de sorbato de potasio, de la depresión de la actividad de agua debido al agregado de diferentes solutos, y de la adición de aspartamo, sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*.

Figura II.5. Datos experimentales y curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* modeladas (—) para los sistemas de actividad de agua 1,000, en ausencia y en presencia de 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio (KS).

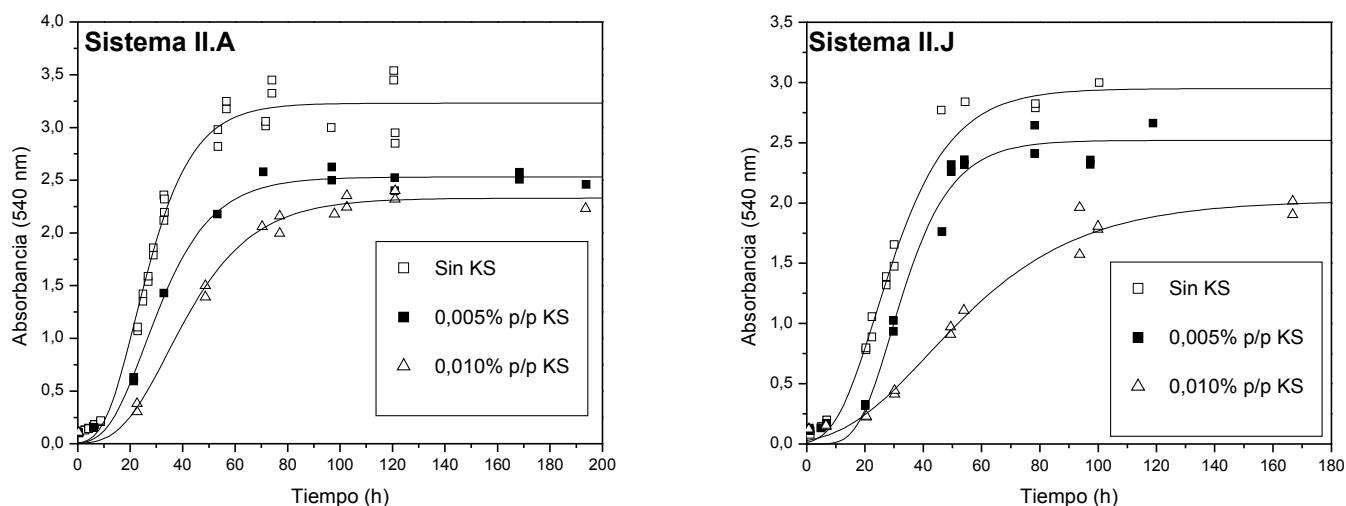


Figura II.6. Datos experimentales y curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* modeladas (—) para los sistemas de actividad de agua 0,985 / 0,988, en ausencia y en presencia de 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio (KS).

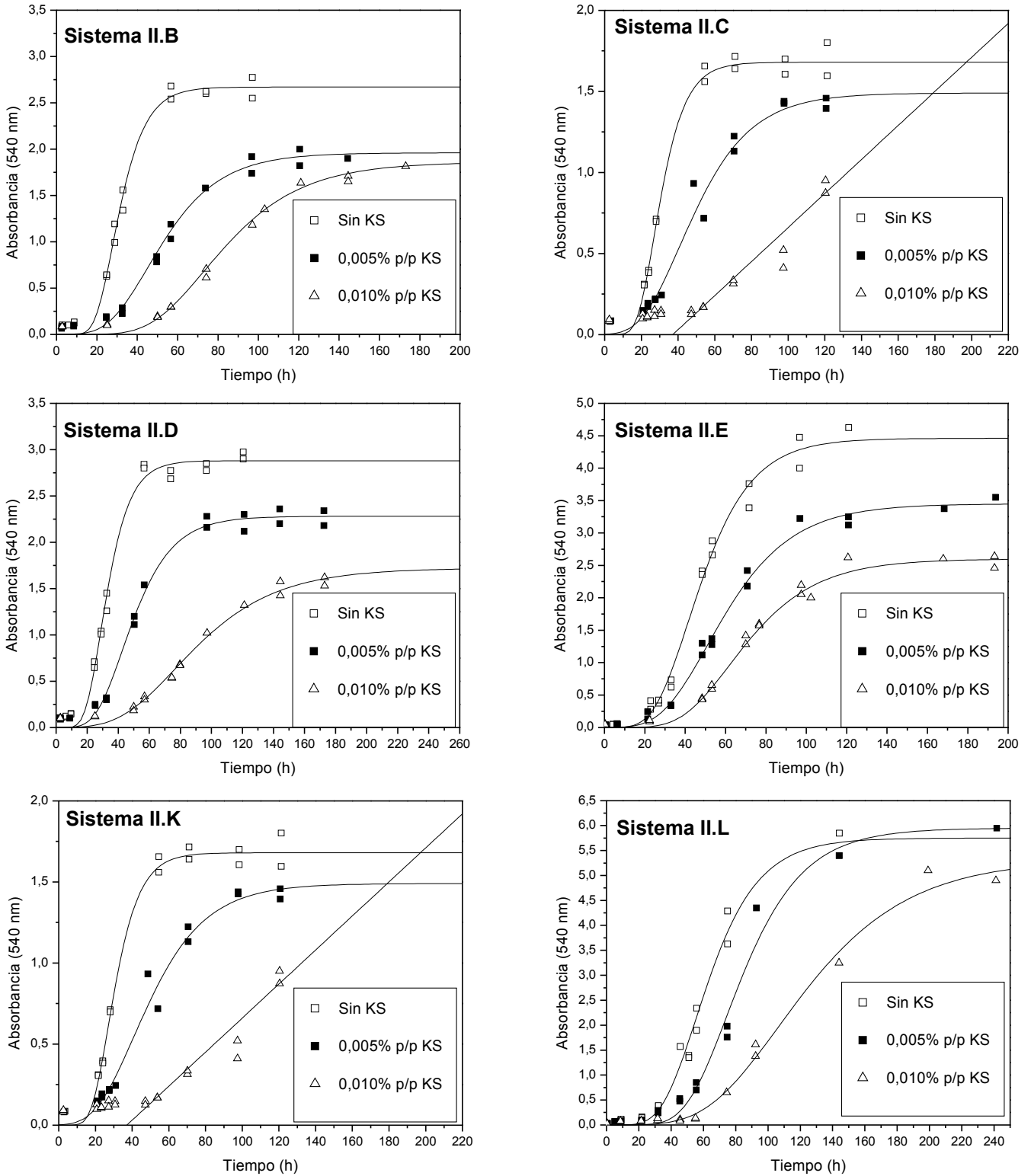
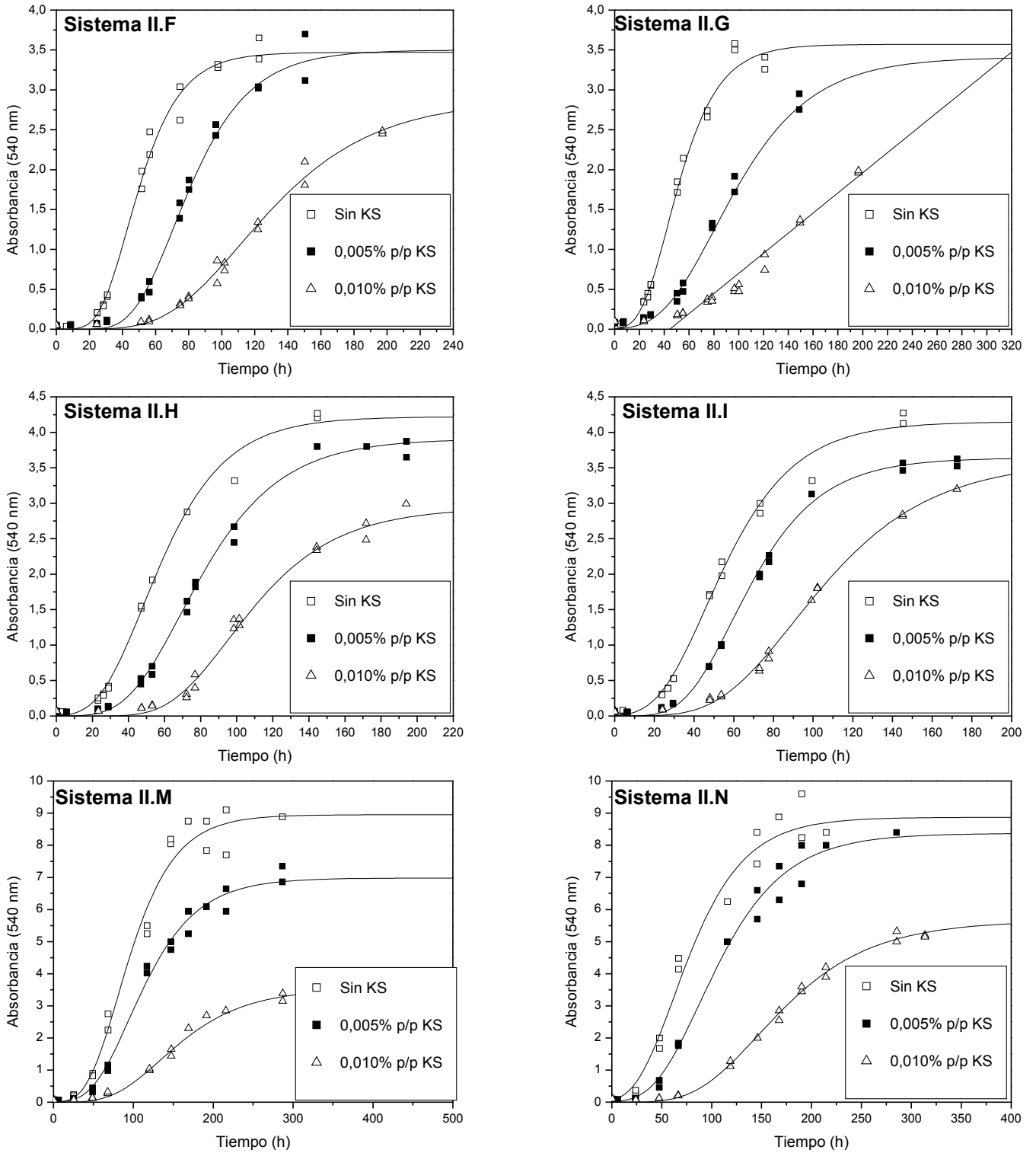


Figura II.7. Datos experimentales y curvas de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* modeladas (—) para los sistemas de actividad de agua 0,971, en ausencia y en presencia de 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio (KS).



II.3.2.1 Efecto del sorbato de potasio sobre los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

En la Figura II.8 se muestran los parámetros del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en función del contenido de sorbato de potasio. Como se mencionó anteriormente (sección II.3.1), en todos los sistemas, el incremento de la concentración de sorbato de potasio produjo un descenso de la velocidad de crecimiento de la levadura (Figura II.8, panel a). En el caso del xilitol, puede observarse una importante disminución de la velocidad de crecimiento (sistemas II.C, II.G y II.K) y la velocidad de crecimiento llegó a ser insignificante a una concentración de sorbato de potasio igual a 0,010% p/p para los sistemas libres de aspartamo (sistemas II.C y II.G). Esta tendencia sugiere que este humectante ejerció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*. Cabe destacar que en presencia de aspartamo, independientemente de la concentración de sorbato de potasio, se observa que el sistema conteniendo xilitol fue el que menor velocidad de crecimiento presentó (sistema II.K).

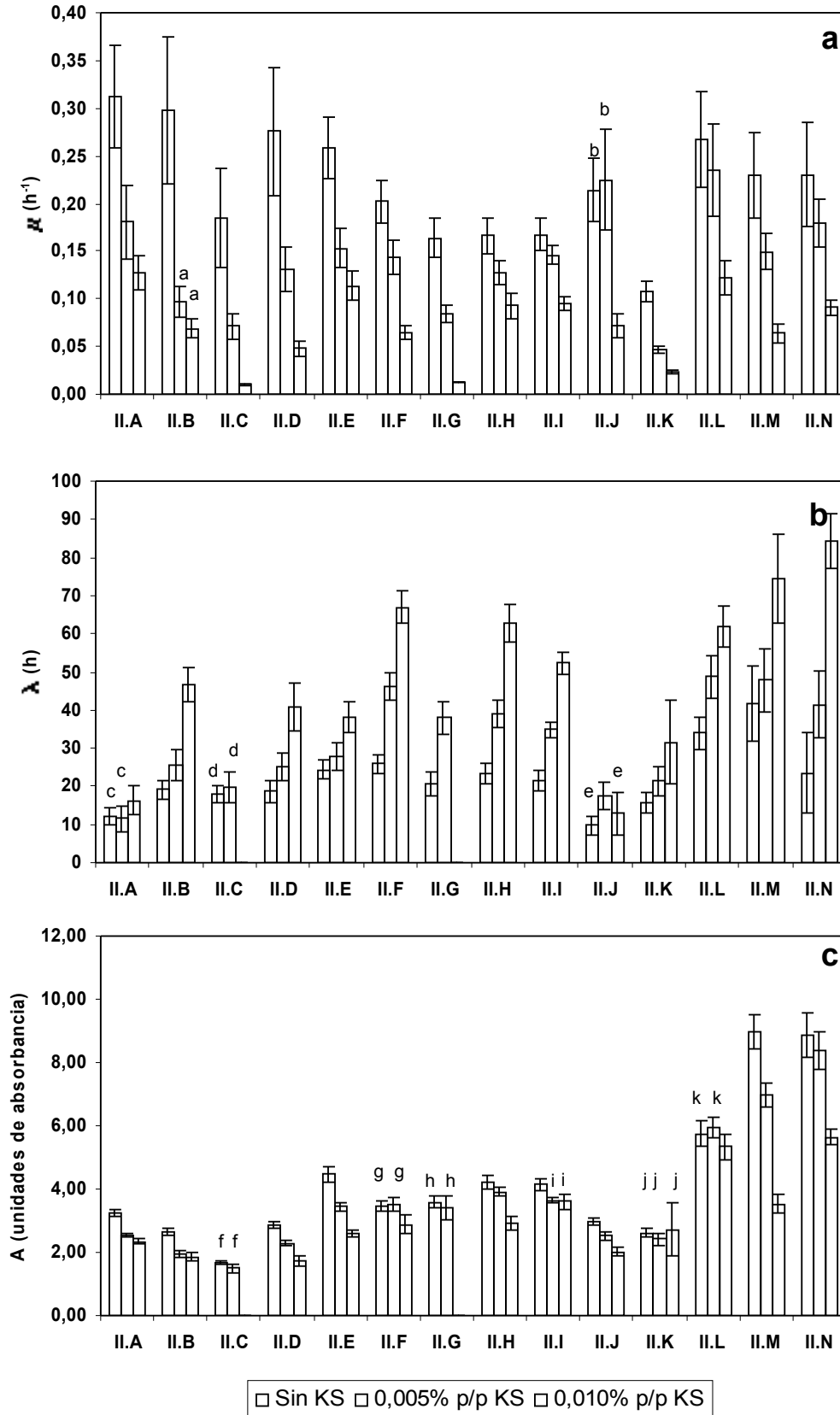
El efecto del sorbato de potasio sobre el crecimiento de levaduras se encuentra ampliamente reportado en bibliografía. Golden y Beuchat (1992) informaron que la velocidad de crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* se redujo substancialmente por la adición de 300 µg/ml de sorbato de potasio. Bills y col. (1982) observaron el mismo comportamiento de dicha levadura en presencia de 1% de sorbato de potasio. El empleo de ácido sórbico inhibió el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de pH 4,0 (Lambert y Stratford, 1999) y de *Candida albicans* a niveles de pH entre 4,0 y 7,6 (Eklund, 1983).

En general, la fase de latencia se incrementó con el nivel de sorbato de potasio, con algunas excepciones, según se puede observar en la Figura II.8, panel b. En el sistema libre de humectantes y de aspartamo (sistema II.A) y en el sistema que contiene xilitol (sistema II.C) no se observaron cambios significativos en la fase de latencia cuando se adicionó 0,005% p/p del preservador; además el sistema libre de humectantes conteniendo aspartamo (sistema II.J) tampoco presentó diferencias significativas en el parámetro debido a la adición de 0,010% p/p de sorbato de potasio. Lambert y Stratford (1999) observaron que concentraciones crecientes de un preservador ácido débil producían un incremento del tiempo de fase de latencia. Ellos sugirieron que el microorganismo debe bombear al exterior el exceso de protones con el fin de alcanzar el pH óptimo de crecimiento y poder entrar en la fase exponencial. Además, postularon que existe una relación directa entre el tiempo necesario para la remoción de los protones del interior de la célula con la extensión de la fase de latencia.

Figura II.8. Parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función del contenido de sorbato de potasio (KS).

Panel a: constantes de velocidad de crecimiento (μ). Panel b: duración de la fase de latencia (λ). Panel c: valor asintótico (A).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Debe destacarse que la estimación de la duración de la fase de latencia a través de turbidimetría se realiza con fines comparativos. Estos valores son más grandes que los estimados a partir del recuento de viables (Augustin y col., 1999) debido a que la turbidimetría no permite la detección de poblaciones menores que $10^6 - 10^7$ UFC/ml (Dalgaard y col., 1994).

En general, a medida que se incrementó la concentración de sorbato de potasio, el parámetro *A*, el cual representa la turbidez cuando la población alcanza la fase estacionaria, disminuyó (Figura II.8, panel c). Esta tendencia muestra el efecto inhibitorio que ejerce el preservador sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* modificando el nivel de la población de la fase estacionaria. En algunos casos, tales como en los sistemas conteniendo xilitol, sorbitol / glucosa, xilitol / glucosa o 10,00% p/p de glucosa y aspartamo (sistemas II.C, II.F, II.G y II.L, respectivamente) no se detectaron cambios significativos en el valor asintótico debido al agregado de 0,005% p/p de sorbato de potasio. Además, un incremento en el nivel del preservador de 0,005 a 0,010% p/p en el sistema que contiene 22,00% p/p de glucosa (sistema II.I) no modificó el valor asintótico. En presencia de xilitol y aspartamo (sistema II.K) el agregado de 0,005% ó de 0,010% p/p de sorbato de potasio no produjo cambios significativos del parámetro. Kubo y Lee (1998) sugirieron que estas tendencias pueden ser la expresión, a través de diferentes mecanismos, de la adaptación de las células de la levadura al estrés producido por la presencia del ácido débil.

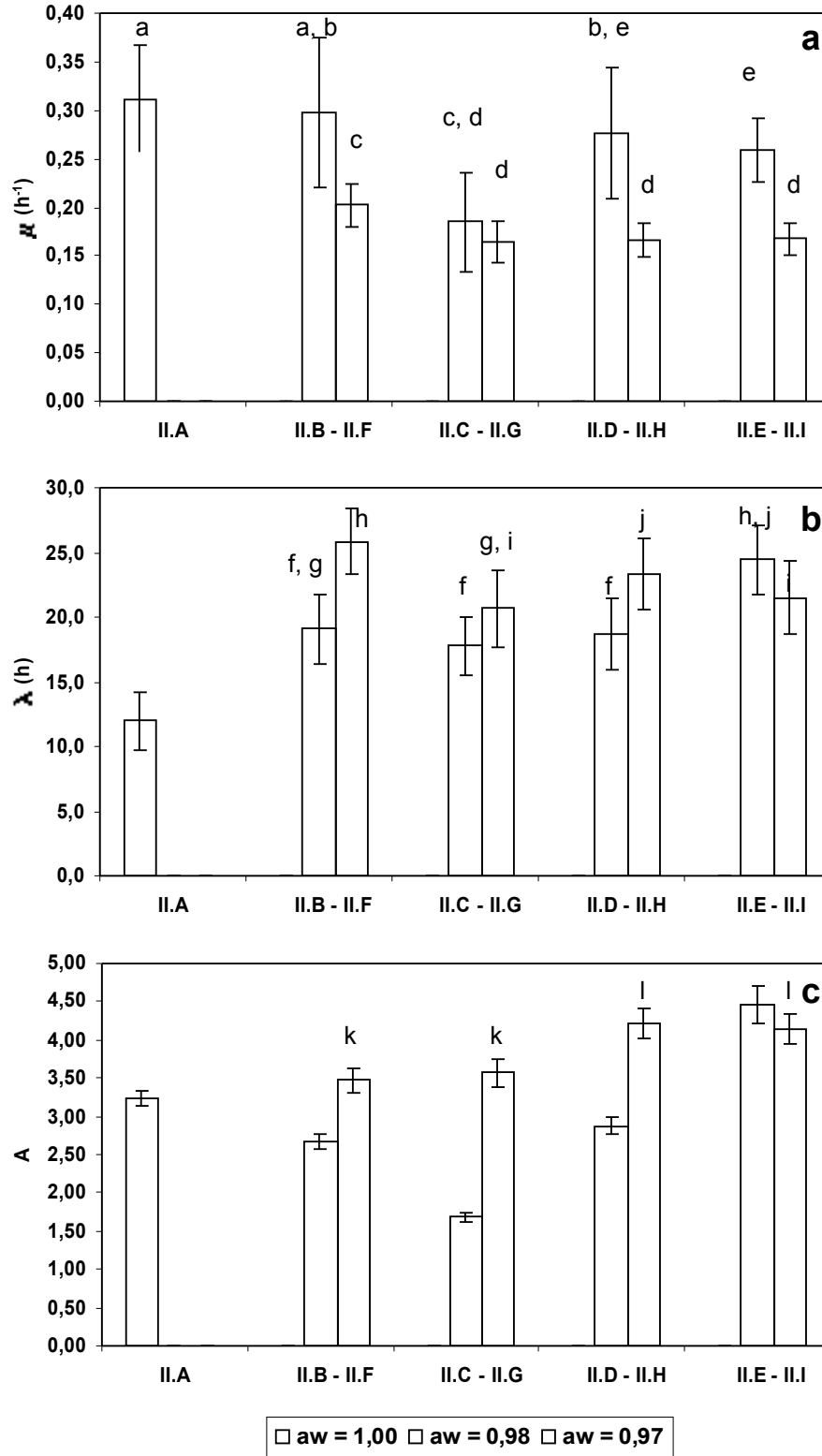
II.3.2.2 Efecto del descenso de la actividad de agua sobre los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

Los parámetros del crecimiento de la levadura en función de la actividad acuosa de los sistemas libres de preservador y de aspartamo se encuentran en la Figura II.9.

Como puede observarse en la Figura II.9, panel a, en todos los casos, la depresión de la actividad acuosa de 1,000 a 0,985, 0,988 ó 0,971 disminuyó significativamente la velocidad de crecimiento (sistemas II.A vs II.C, II.D, II.E, II.F, II.G, II.H y II.I) con excepción del sistema de actividad acuosa 0,985 que contiene sorbitol (sistema II.B), en el cual, la depresión de la actividad de agua no tuvo efecto sobre dicho parámetro. Este comportamiento coincide con lo hallado por Almagro y col. (2000), quienes reportaron que la adición de sorbitol para deprimir la actividad acuosa a 0,982 no produjo efecto sobre el crecimiento de *D. hansenii* y *S. cerevisiae*.

Figura II.9. Parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas libres de sorbato de potasio y de aspartamo en función de la actividad de agua (a_w).
 Panel a: constantes de velocidad de crecimiento (μ). Panel b: duración de la fase de latencia (λ). Panel c: valor asintótico (A).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



El descenso de la actividad acuosa de 0,985 ó 0,988 a 0,971 debido a la adición de glucosa, disminuyó la velocidad de crecimiento para todos los humectantes utilizados (sistemas II.B, II.D, II.E vs. II.F, II.H, II.I, respectivamente) con excepción del xilitol, en el cual, no se observó efecto de la depresión de la actividad de agua (sistema II.C vs II.G). Sin embargo, cuando la actividad de agua fue 0,971, no se detectaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento entre los sistemas conteniendo xilitol, manitol o glucosa (sistemas II.G, II.H, II.I, respectivamente). Este comportamiento sugiere que al deprimir actividad de agua a 0,971, el efecto de un soluto en particular sobre la velocidad de crecimiento está enmascarado por el efecto del descenso de la actividad acuosa.

La extensión de la fase de latencia se incrementó en todos los sistemas estudiados debido al descenso de la actividad de agua de 1,000 a 0,985, 0,988 ó 0,971 (Figura II.9, panel b, sistemas II.A vs. II.B, II.C, II.D, II.E, II.F, II.G, II.H, II.I). Cabe destacar que la duración de la fase de latencia fue independiente del poliol empleado para deprimir la actividad de agua a 0,985 (sistemas II.B, II.C y II.D), pero esta tendencia se modificó cuando la actividad de agua descendió a 0,971 por la adición de glucosa (sistemas II.F, II.G y II.H). A este valor de actividad acuosa, el uso combinado de glucosa y sorbitol promovió el mayor incremento en la fase de latencia (sistema II.F).

La turbidez alcanzada en la fase estacionaria se modificó por la depresión de la actividad de agua, como se muestra en la Figura II.9, panel c. El descenso de la actividad de agua de 1,000 a 0,985 por la adición de un poliol disminuyó el valor asintótico, siendo el xilitol el soluto que promovió el mayor descenso (sistema II.A vs. II.B, II.C, II.D). En contraste, la adición de glucosa para alcanzar una actividad acuosa de 0,988 (sistema II.A vs. II.E) ó 0,971 (sistema II.A vs. II.F, II.G, II.H, II.I, respectivamente) incrementó el valor asintótico de los sistemas. El comportamiento presentado por el monosacárido podría relacionarse con el uso del mismo como fuente de carbono, además, la misma conducta fue observada por Golden y Beuchat (1992) en el crecimiento de *Zygosaccharomyces rouxii* en medio de cultivo de actividad de agua 0,93 y pH 4,5.

En general, la presencia de polioles descendió la velocidad de crecimiento, extendió la fase de latencia y disminuyó el nivel de la población en la fase estacionaria. Debe distinguirse el particular efecto inhibitor que mostró el xilitol sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* ya que, de los distintos humectantes utilizados para deprimir la actividad de agua a 0,985, este soluto fue el que presentó los menores valores de la velocidad de crecimiento (Figura II.9,

panel a, sistema II.C) y del nivel de población de la fase estacionaria (Figura II.9, panel c, sistema II.C).

Debe remarcarse que la respuesta de las células al descenso de la actividad de agua debido al agregado de diferentes solutos incluye variaciones de la permeabilidad celular y la acumulación de polioles intracelulares, alterando la síntesis o la actividad enzimática (Lenovich y col., 1988). Sin embargo, cabe destacar que los polioles son solutos compatibles de las levaduras y que la inhibición que ejercen sobre la actividad enzimática decrece con la longitud de la cadena del polirol (Gould, 1985). Por otra parte, Vaamonde y col. (1986) reportaron que el descenso de la actividad acuosa no es el único factor que regula la respuesta biológica de *Staphylococcus aureus*, ya que la naturaleza del soluto juega un rol importante. Además, el uso de eritritol o xilitol inhibió el crecimiento a una actividad de agua comprendida en el rango de 0,92-0,94, elevando considerablemente la mínima actividad acuosa para el crecimiento aeróbico de *S. aureus*. Por otra parte, Katsuyama (2001) reportó que el xilitol es un efectivo inhibidor en preparaciones de uso externo para el tratamiento de dermatitis atópicas causadas por *S. aureus*.

II.3.2.3 Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailli* en presencia de sorbato de potasio

En la Figura II.10 se muestran los valores de velocidad de crecimiento de la levadura en función de la actividad de agua de los sistemas conteniendo 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio.

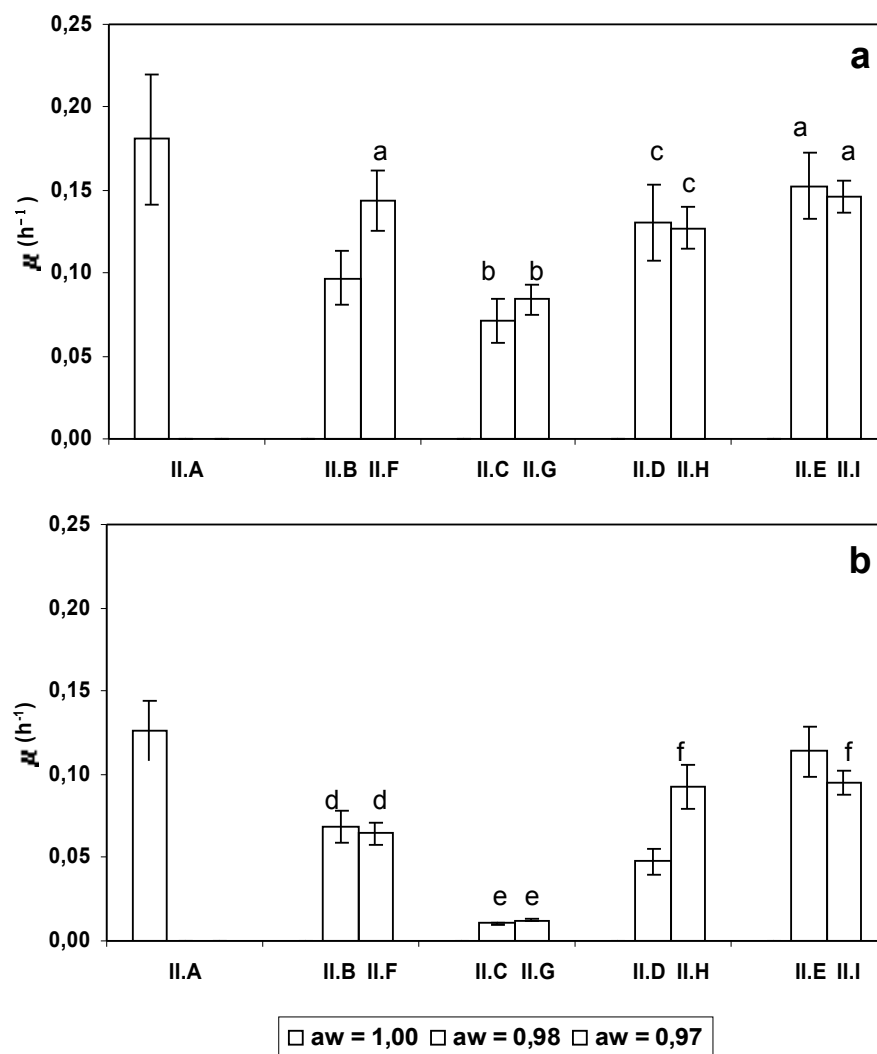
En presencia de 0,005 ó de 0,010% p/p de sorbato de potasio, la depresión de la actividad acuosa de 1,000 a 0,985 por la adición de polioles (sistema II.A vs. II.B, II.C y II.D) ó a 0,988, en el caso del agregado de glucosa (sistema II.A vs. II.E), promovió un descenso de la velocidad de crecimiento (Figura II.10, paneles a y b). Con relación a los polioles, el xilitol fue el que produjo la mayor disminución de la velocidad de crecimiento en sistemas conteniendo sorbato de potasio.

El descenso de la actividad de agua de 0,985 ó 0,988 a 0,971 debido a la adición de glucosa a los sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio y, xilitol, manitol o glucosa, no produjo efecto sobre la velocidad de crecimiento (Figura II.10, panel a, sistemas

II.C, II.D, II.E vs. II.G, II.H, II.I, respectivamente). Sin embargo, se observó un incremento en la velocidad de crecimiento en el sistema conteniendo sorbitol (sistema II.B vs. II.F).

Figura II.10. Constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función de la actividad acuosa (a_w) para los niveles de sorbato de potasio: 0,005 % p/p (panel a) y 0,010% p/p (panel b).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Cuando el contenido de sorbato de potasio fue 0,010% p/p (Figura II.10, panel b) se observaron diferentes tendencias con relación a la depresión de la actividad acuosa de 0,985 ó 0,988 a 0,971: en el sistema conteniendo sólo glucosa como humectante, la velocidad de crecimiento disminuyó (sistemas II.E vs. II.I); en presencia de manitol, la misma se incrementó (sistema II.D vs II.H); en los sistemas conteniendo sorbitol o xilitol, la velocidad de crecimiento no sufrió cambios (sistema II.B, II.C vs II.F, II.G, respectivamente). Es de destacar que la

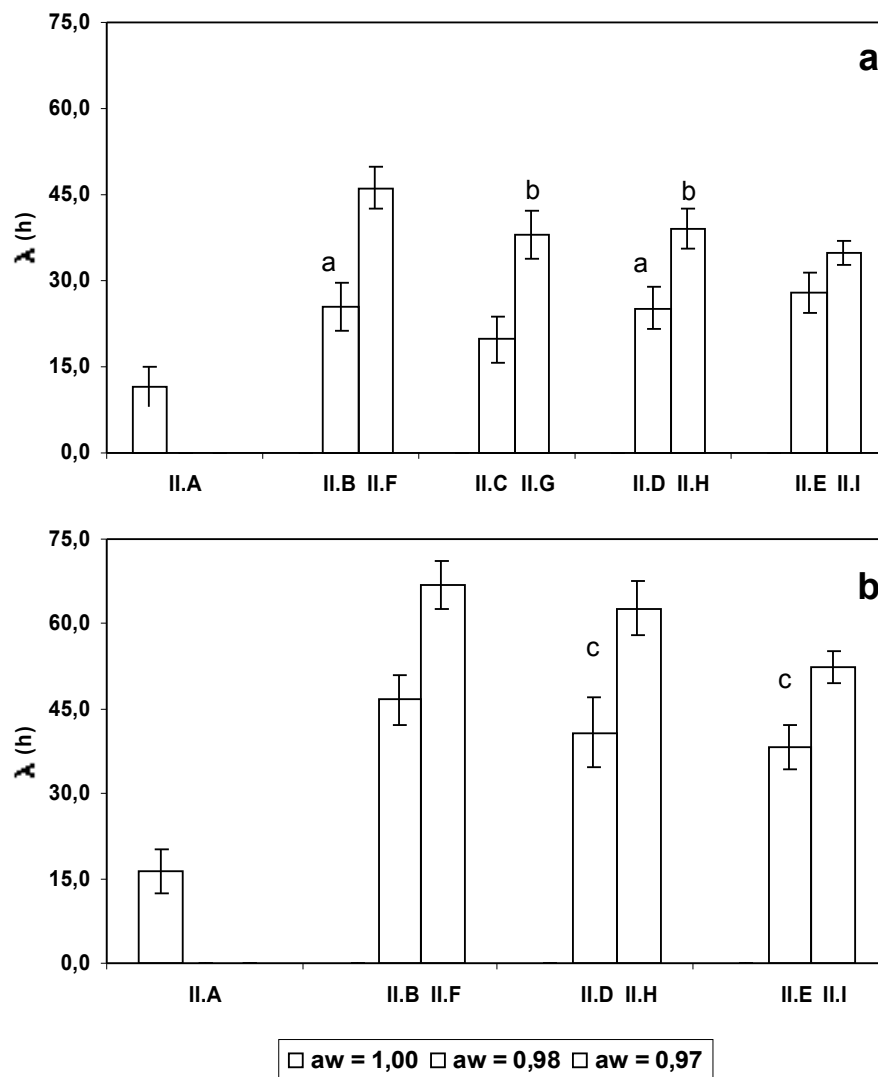
presencia de xilitol presentó la menor velocidad de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*. Las tendencias mencionadas remarcan que los efectos dependen fuertemente del nivel de actividad acuosa y del soluto adicionado.

En la Figura II.11 se muestra la duración de la fase de latencia del crecimiento de la levadura en función de la actividad de agua en los sistemas conteniendo 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio.

La extensión de la fase de latencia aumentó con el descenso de la actividad acuosa y este incremento fue independiente del contenido de sorbato de potasio (Figura II.11, paneles a y b) siendo el sistema conteniendo sorbitol y glucosa (sistema II.F) el que tuvo la mayor fase de latencia a ambos niveles de sorbato de potasio.

Figura II.11. Duración de la fase de latencia (λ) del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función de la actividad acuosa (a_w) para los niveles de sorbato de potasio: 0,005 % p/p (panel a) y 0,010% p/p (panel b).

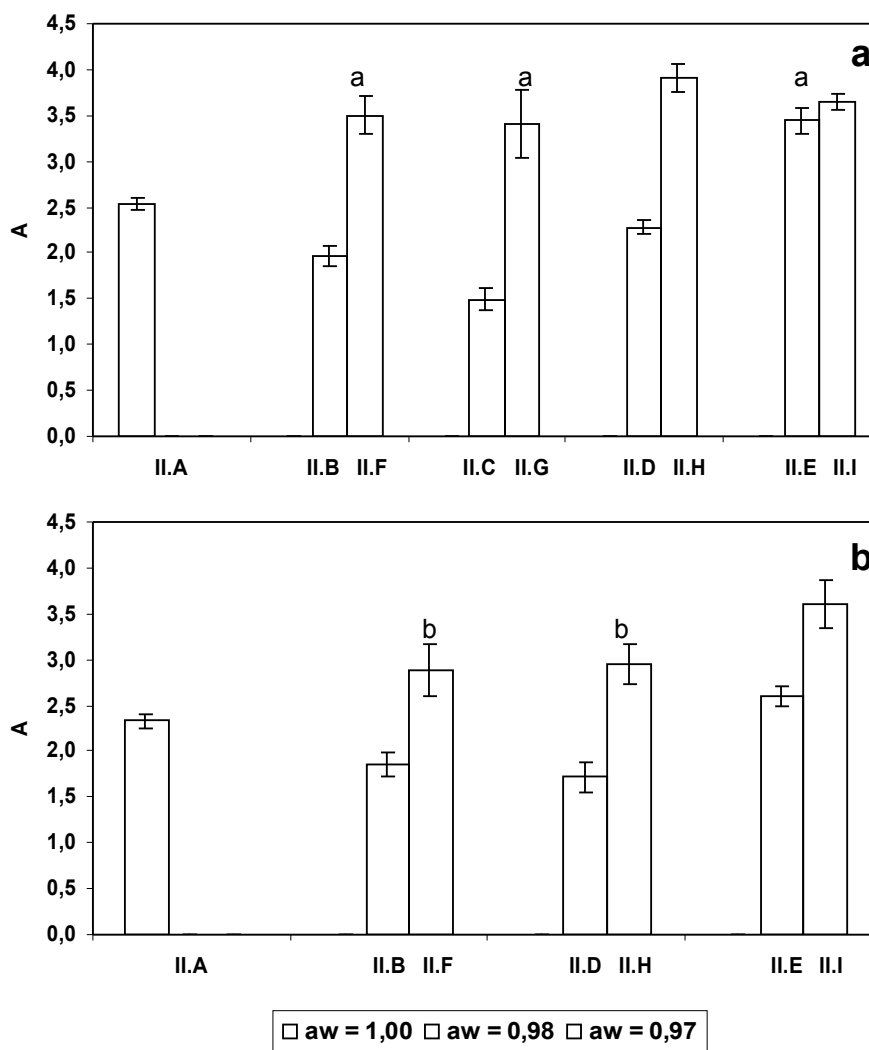
Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Los valores asintóticos del crecimiento de la levadura en función de la actividad de agua de los sistemas conteniendo 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio se muestran en la Figura II.12.

Figura II.12. Valor asintótico (A) del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función de la actividad acuosa (a_w) para los niveles de sorbato de potasio: 0,005 % p/p (panel a) y 0,010% p/p (panel b).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.

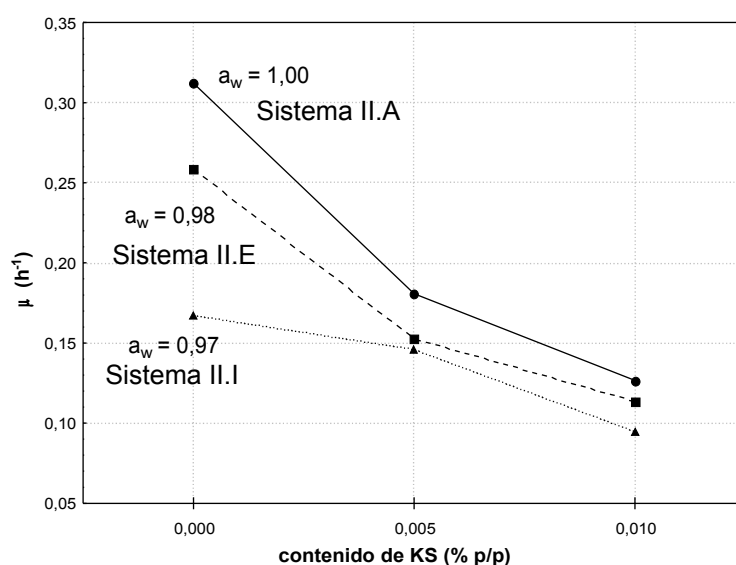


En dicha figura puede observarse que la adición de polioles para deprimir la actividad de agua de 1,000 a 0,985 en sistemas conteniendo 0,005 ó 0,010% p/p de sorbato de potasio produjo un descenso del valor asintótico de la curva de crecimiento (sistema II.A vs. II.B, II.C II.D). En contraste, se observó un incremento del mismo cuando se utilizó glucosa sola como humectante (sistema II.A vs. II.E, II.I) o en combinación con un poliol (sistema II.A vs. II.F, II.G,

II.H), independientemente del contenido de sorbato de potasio. El mismo comportamiento se reportó previamente en ausencia de preservador (ver sección II.3.2.2), por lo tanto, se deduce que el efecto del descenso de la actividad de agua sobre el valor asintótico es independiente de la presencia de sorbato de potasio.

Para evaluar el efecto combinado de la depresión de la actividad de agua y de la adición de sorbato de potasio o del efecto del soluto empleado como humectante sobre la velocidad de crecimiento de la levadura, se realizó un análisis ANOVA de dos factores ($p \leq 0,05$). Los resultados de este análisis muestran la existencia de una interacción entre la depresión de la actividad de agua debido al agregado de glucosa y la adición de sorbato de potasio (Figura II.13). Basándose en ello se observó que el uso combinado de glucosa y sorbato de potasio promovió un mayor descenso de la velocidad de crecimiento que cada factor por separado, es decir, la depresión de la actividad de agua por el agregado de glucosa y la adición de sorbato de potasio.

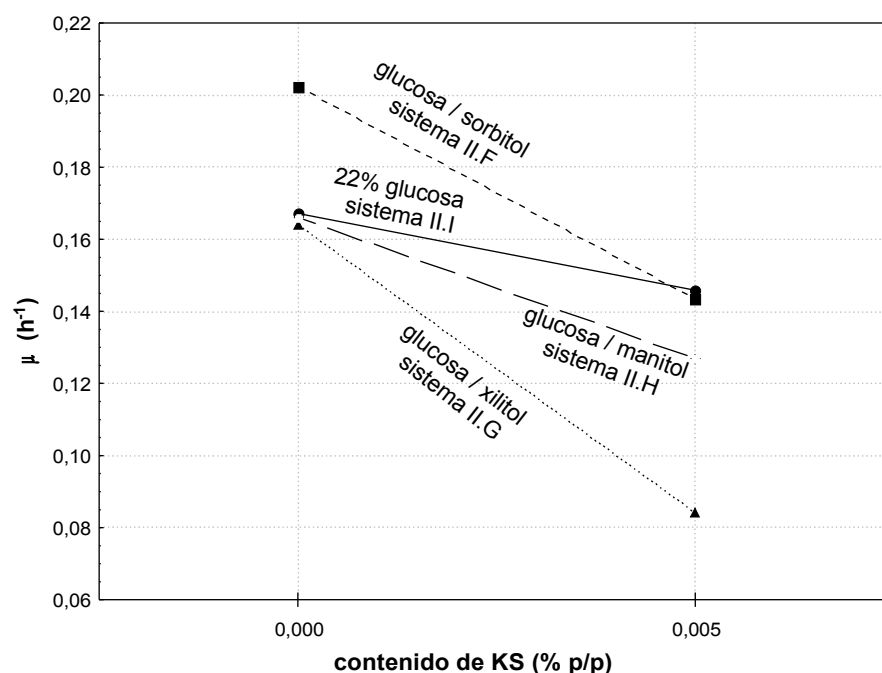
Figura II.13. Interacción entre la depresión de la actividad de agua (a_w) y el nivel de sorbato de potasio sobre las constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas conteniendo glucosa.



Cuando se analizaron las velocidades de crecimiento obtenidas en sistemas de actividad acuosa 0,971 se observó una interacción entre el soluto empleado y el sorbato de potasio (Figura II.14). Este efecto puede ser la expresión de la acción sinérgica del uso combinado de 22,00% p/p de glucosa o de glucosa / poliol y el sorbato de potasio sobre la velocidad de crecimiento. El mencionado sinergismo puede tener relevancia tecnológica ya que permitiría disminuir el nivel del preservador necesario para asegurar la estabilidad

microbiológica de los alimentos. Se ha reportado en bibliografía la estrategia basada en el uso combinado de sorbato de potasio con otros aditivos para incrementar la actividad biológica del mismo, por ejemplo, Kubo y Lee (1998) combinaron sorbato de potasio con poligodial, un potente fungicida de *Saccharomyces cerevisiae* y observaron que la actividad antimicrobiana del sorbato de potasio frente a dicha levadura se incrementaba 64 veces.

Figura II.14. Interacción entre el soluto empleado para deprimir la actividad de agua a 0,971 y el nivel de sorbato de potasio (KS) sobre las constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii*.



II.3.2.4 Efecto del aspartamo sobre los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*

El efecto de la presencia de aspartamo sobre los parámetros de crecimiento de la levadura sólo se estudió en los sistemas conteniendo xilitol y/o glucosa como humectantes. Justifica esta elección los resultados ventajosos obtenidos al emplearse este poliol frente al resto de los polioles con relación a la estabilidad química (sección I.3.3) y microbiológica (secciones II.3.2.1, II.3.2.2, II.3.2.3, II.3.3.2, II.3.3.3). Dichos resultados se refieren a que el xilitol redujo significativamente el desarrollo de pardeamiento no enzimático, protegió la degradación del aspartamo y del sorbato de potasio, produjo un efecto inhibitorio *per sé* del

desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii* y, aceleró la inactivación térmica de la misma, esto último se verá en las secciones II.3.3.2 y II.3.3.3.

En la Figura II.15 se muestran los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* de los sistemas libres de preservador, en función de la presencia de aspartamo.

Se obtuvieron diferentes comportamientos acerca del efecto del agregado de aspartamo sobre la velocidad de crecimiento de la levadura. En la Figura II.15, panel a, puede observarse que en ausencia de humectantes y en presencia de xilitol (actividad de agua 0,985), el agregado de 0,500% p/p de aspartamo produjo un descenso del parámetro de crecimiento (sistemas II.A, II.C vs. II.J, II.K, respectivamente), mientras que en presencia de 10,00% p/p de glucosa no se observaron diferencias significativas (sistema II.E vs. II.L). En cambio, en los sistemas de actividad de agua 0,971, el agregado del edulcorante incrementó la velocidad de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* (sistemas II.G, II.I vs. II.M, II.N, respectivamente). Es de destacar que el sistema conteniendo xilitol y aspartamo (sistema II.K) fue el que produjo la menor velocidad de crecimiento.

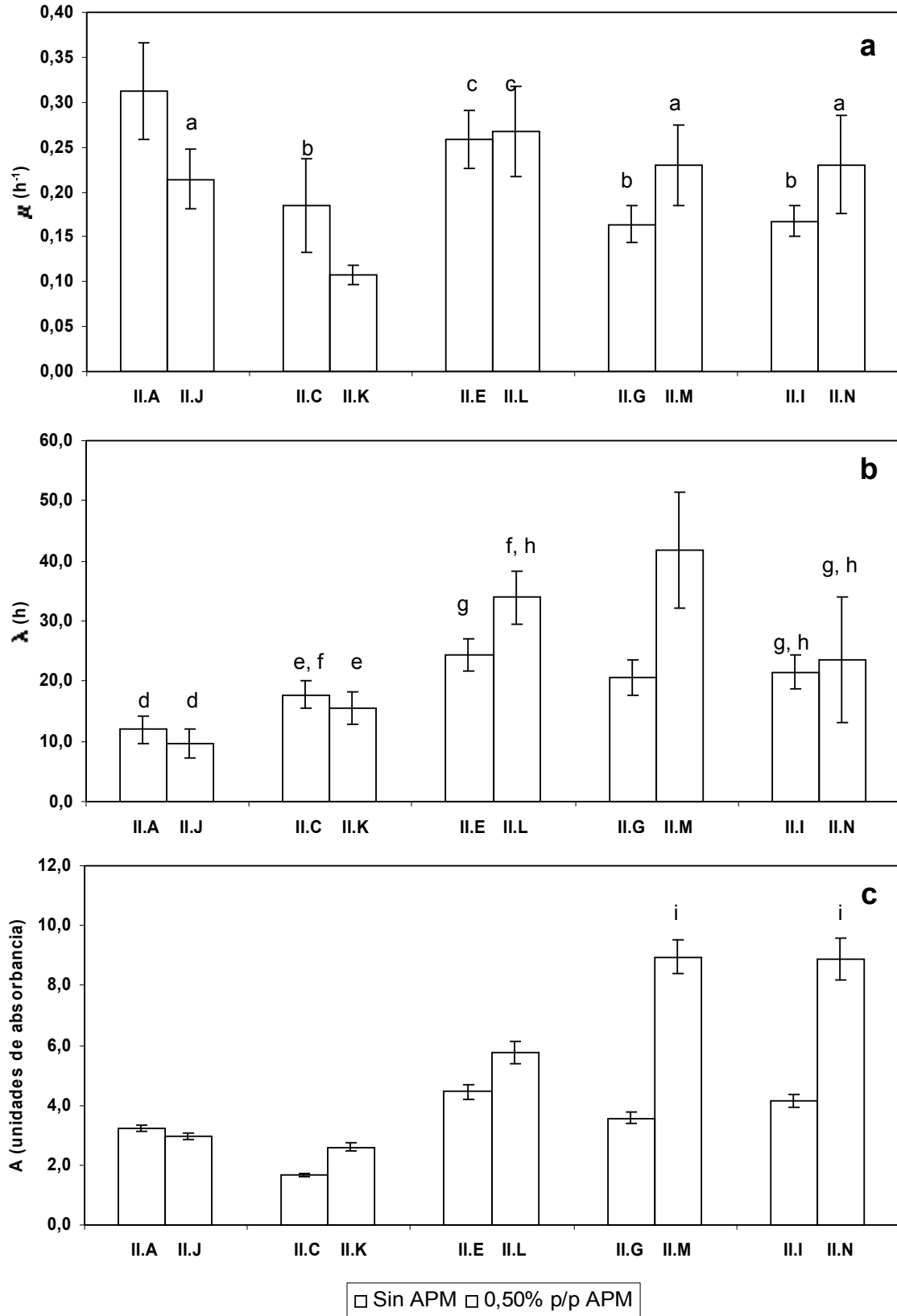
Keating y White (1990) observaron que el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termophilus* en yogurt natural y saborizado con diferentes edulcorantes, entre ellos aspartamo, dependía del tipo de edulcorante utilizado en la formulación, así como de su concentración.

En la Figura II.15, panel b, se muestra la duración de la fase de latencia de los sistemas en función de la presencia de aspartamo. En dicha figura se observa que la fase de latencia se incrementó debido al agregado del edulcorante en presencia de 10,00% p/p de glucosa y en el sistema conteniendo glucosa y xilitol (sistemas II.E, II.G vs. II.L, II.M, respectivamente), sin embargo, en el resto de los sistemas, el agregado de aspartamo, no produjo cambios significativos en dicho parámetro. Como se mencionó en la sección II.3.2.1, debe recordarse que la estimación de la fase de latencia a través de turbidimetría se realiza con fines comparativos debido a los límites de detección que presenta la técnica.

Figura II.15. Parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas libres de sorbato de potasio en función de la presencia de aspartamo (APM).

Panel a: constantes de velocidad de crecimiento (μ). Panel b: duración de la fase de latencia (λ). Panel c: valor asintótico (A).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



En general, el agregado de aspartamo promovió un incremento del parámetro A en todos los sistemas estudiados con excepción del sistema libre de humectantes, en el cual produjo un ligero descenso del mismo (Figura II.15, panel c, sistema II.A vs. II.J). Este comportamiento sugiere que el aspartamo, en los sistemas de actividad de agua reducida a 0,985 / 0,988, prolongaría la duración de la fase de crecimiento exponencial ya que, en esos casos, la velocidad de crecimiento disminuye o no se modifica (Figura II.15, panel a, sistema II.C, II.E vs. II.K, II.L, respectivamente), permitiendo así, que una mayor población de células alcance la fase estacionaria.

Keller y col. (1991 a), estudiaron la relación entre la degradación del aspartamo y el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y cultivos comerciales de yogurt. Dichos autores observaron que la velocidad de degradación del aspartamo se incrementaba con el ingreso de los microorganismos a la fase de crecimiento exponencial, decayendo en la fase estacionaria y, sugirieron que, al ser el aspartamo un edulcorante nutritivo, se esperaba que las células lo metabolizaran de manera similar a otros péptidos. También observaron el incremento de la población de *Lactobacillus bulgaricus*, un microorganismo ácido tolerante, debido al metabolismo del aspartamo. Keller y col. (1991 b) también hallaron una correlación entre el incremento de la velocidad de degradación de aspartamo en leche chocolatada con el aumento de la carga microbiana.

Basándose en lo comentado, es posible que el incremento de la población de la fase estacionaria esté relacionado con la metabolización del aspartamo por parte de la levadura.

En síntesis, el agregado de aspartamo a los sistemas estudiados mostró distintos efectos sobre el desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii* en función de la composición del sistema. Sin embargo, es de destacar que la adición de aspartamo, en general aumentó la población máxima alcanzada en la fase estacionaria.

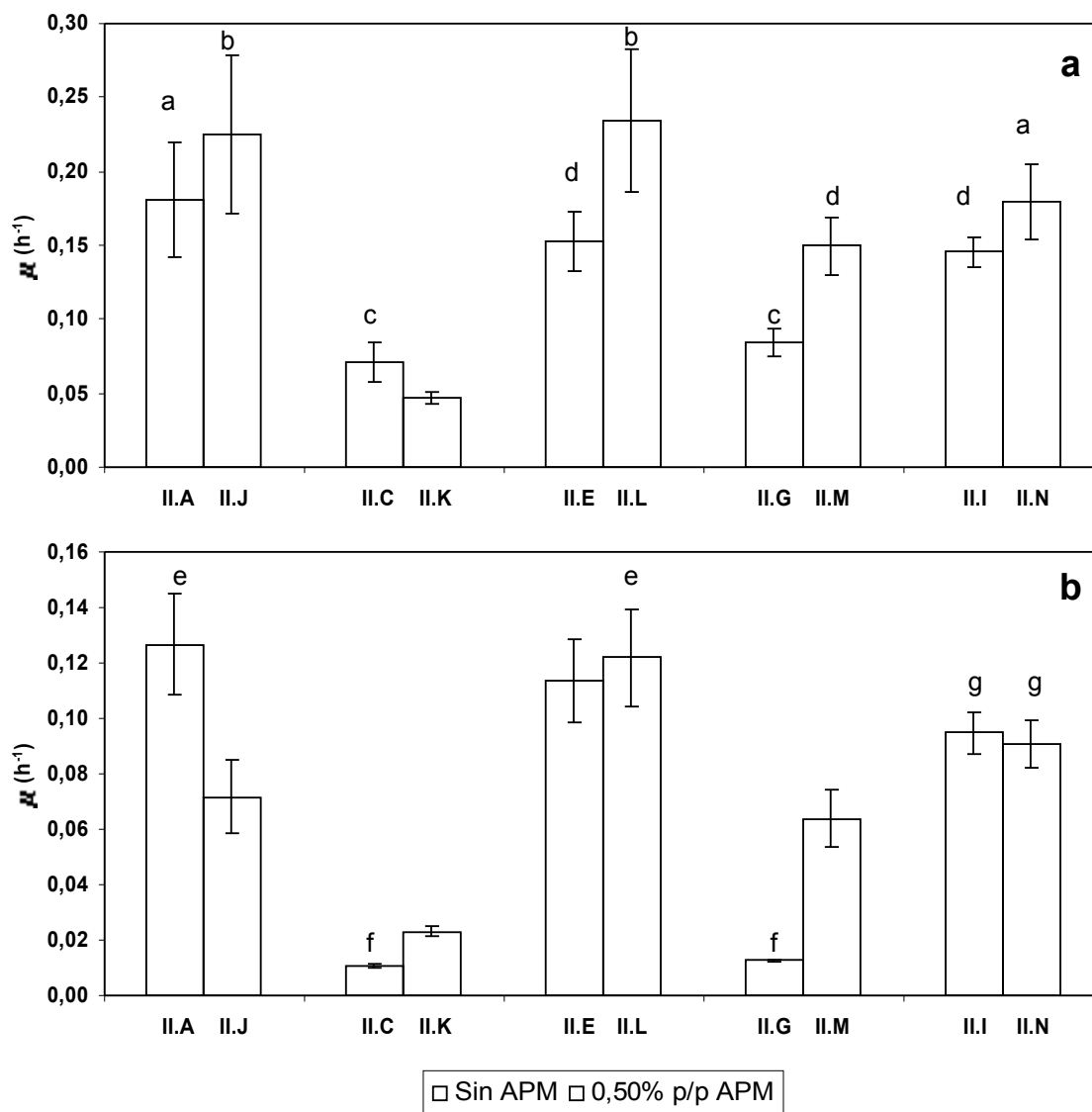
II.3.2.5 Efecto del aspartamo sobre los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en presencia de sorbato de potasio

Las velocidades de crecimiento de la levadura en los sistemas conteniendo 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio, en función de la presencia de aspartamo, se muestran en la Figura II.16.

Figura II.16. Constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función de la presencia de aspartamo (APM).

Panel a: sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.

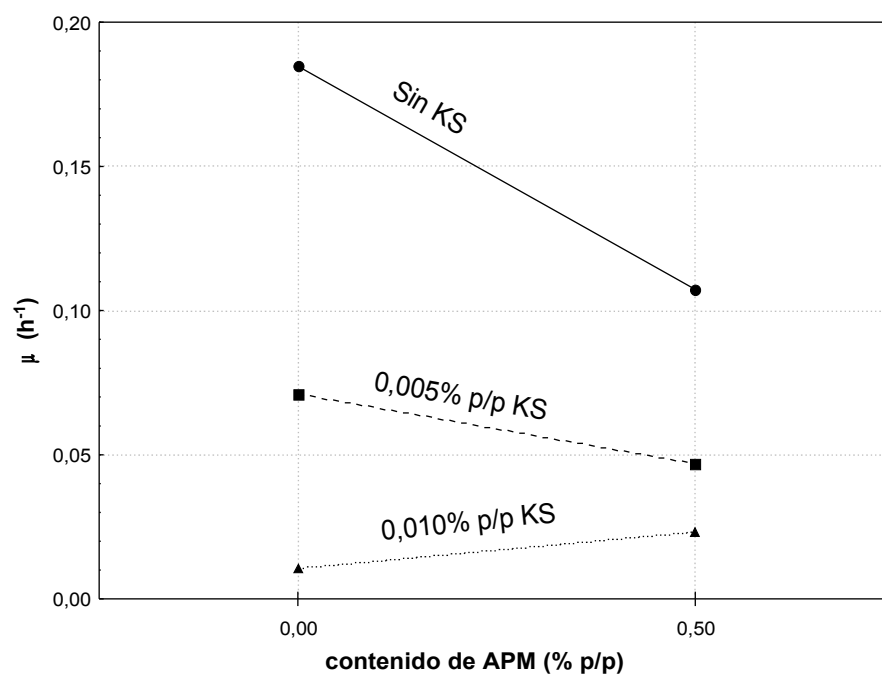


En presencia de 0,005% p/p del preservador, el agregado de aspartamo incrementó la velocidad de crecimiento de todos los sistemas (Figura II.16, panel a, sistemas II.A, II.E, II.G, II.I vs. II.J, II.L, II.M, II.N, respectivamente), con la excepción del sistema conteniendo xilitol, en el cual produjo un ligero descenso (sistema II.C vs. II.K). Cuando el nivel de sorbato de potasio ascendió a 0,010% p/p, la adición de aspartamo aumentó la velocidad de crecimiento en los sistemas conteniendo xilitol, 10,00% p/p de glucosa, y la combinación de ambos (Figura II.16,

panel b, sistemas II.C, II.E, II.G vs. II.K, II.L, II.M, respectivamente), no la modificó en el sistema conteniendo 22,00% p/p de glucosa (sistema II.I vs. II.N) y la disminuyó en el sistema libre de humectantes (sistema II.A vs. II.J).

La realización de un ANOVA de dos factores, nivel de aspartamo y concentración de sorbato de potasio, ($p \leq 0,05$) permitió establecer la existencia de una interacción entre el aspartamo y el preservador en presencia de xilitol (Figura II.17). Basándose en ello se observó un afecto antagónico entre 0,010% p/p de sorbato de potasio y 0,500% p/p de aspartamo.

Figura II.17. Interacción entre el aspartamo (APM) y el sorbato de potasio (KS) sobre las constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas de actividad de agua 0,985 conteniendo xilitol.

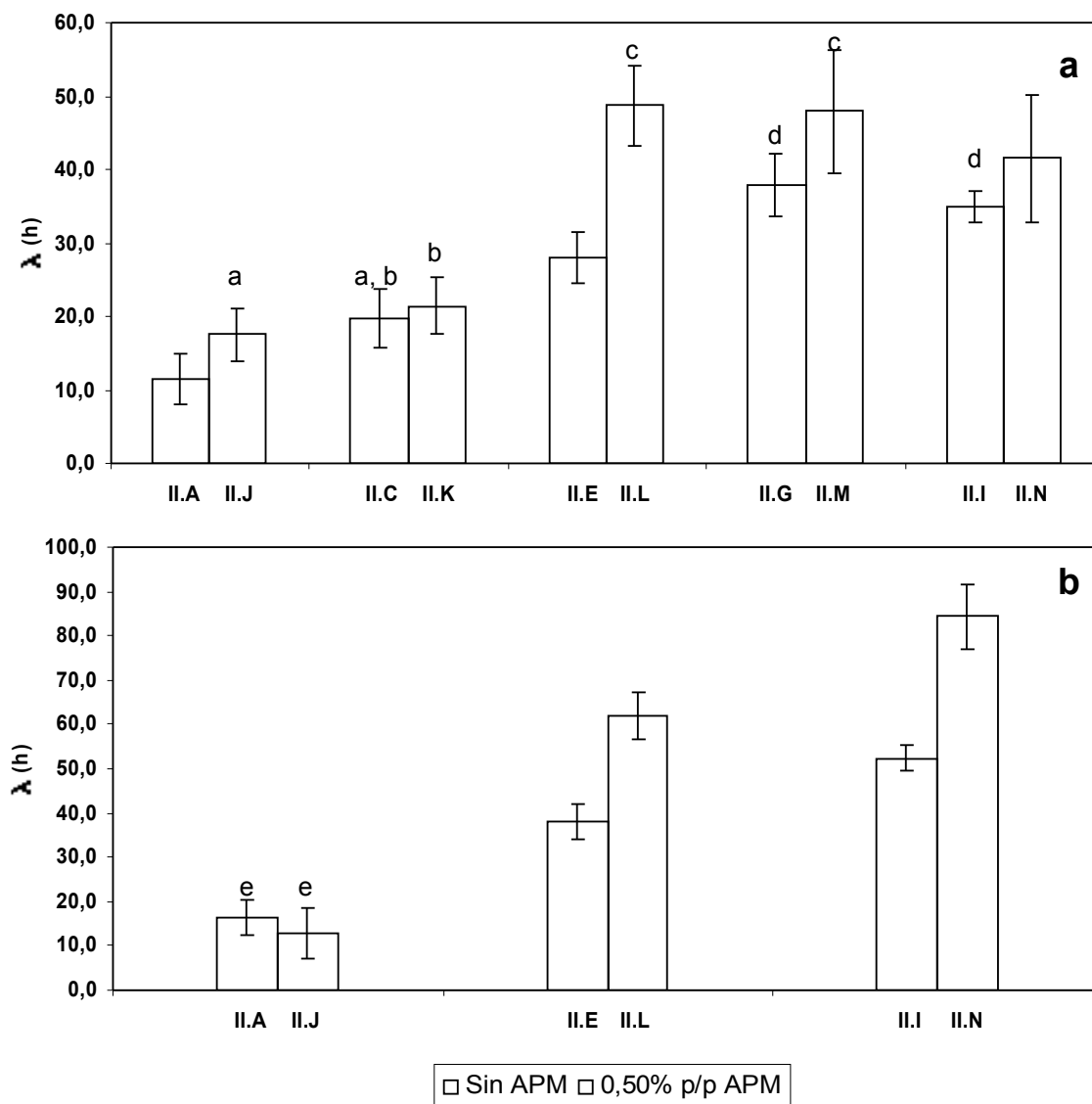


En general se observó el incremento de la extensión de la fase de latencia del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* debido al agregado de aspartamo en todos los sistemas estudiados, independientemente del nivel de sorbato de potasio (Figura II.18, paneles a y b). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en presencia de xilitol y 0,005% p/p del preservador (Figura II.18, panel a, sistema II.C vs. II.K), y en el sistema libre de humectantes conteniendo 0,010% p/p del sorbato de potasio (Figura II.18, panel b, sistema II.A vs. II.J).

Figura II.18. Duración de la fase de latencia (λ) del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función de la presencia de aspartamo (APM).

Panel a: sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



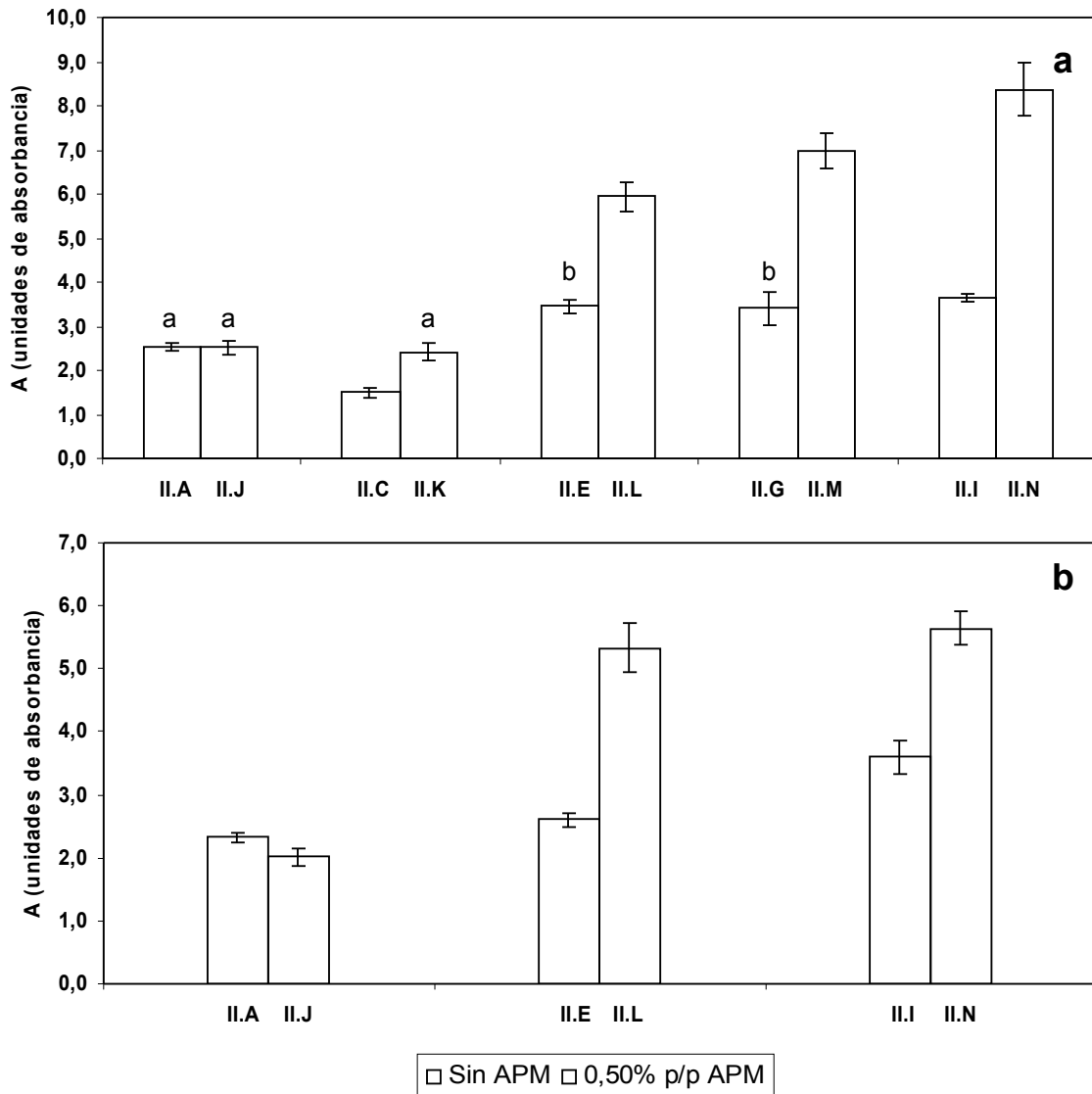
En la Figura II.19 se observan los valores asintóticos del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en función de la presencia de aspartamo para los sistemas conteniendo 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio. Independientemente del contenido del preservador, la adición de aspartamo incrementó el valor asintótico en todos los sistemas estudiados con excepción del sistema libre de humectantes (sistema II.A vs. II.J), en el cual no hubo diferencias significativas en presencia de 0,005% p/p de sorbato de potasio (Figura II.19,

panel a), y disminuyó cuando la concentración se incrementó a 0,010% p/p (Figura II.19, panel b).

Figura II.19. Valor asintótico (A) del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas en función de la presencia de aspartamo (APM).

Panel a: sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Cabe destacar que en las figuras que representan la duración de la fase de latencia y el valor asintótico del crecimiento de la levadura en los sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio (Figura II.18, panel b, y Figura II.19, panel b, respectivamente) no se muestran aquellos sistemas formulados con xilitol (sistemas II.C y II.G), ya que, como se

explicó en la sección II.3.2, en ausencia de aspartamo, de los tres parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, sólo pudieron calcularse las velocidades.

No hay estudios previos acerca del efecto conjunto del aspartamo y preservadores ácido débiles sobre el desarrollo de microorganismos.

De los ensayos realizados se concluye que la adición de 0,500% p/p de aspartamo a los sistemas modelo, en general, promovió el incremento de la extensión de la fase de latencia, de la velocidad de la fase exponencial, y de la población máxima alcanzada en la fase estacionaria. Es de destacar que es necesario realizar estudios adicionales que permitan explicar el efecto del aspartamo sobre la fase de latencia.

II.3.2.6 Efecto del descenso de la actividad de agua sobre los parámetros de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en presencia de aspartamo

En la Figura II.20 se muestran las velocidades de crecimiento de la levadura en los sistemas conteniendo aspartamo, en función de la actividad de agua, en ausencia y en presencia de 0,005 y 0,010% p/p de sorbato de potasio.

El descenso de la actividad de agua de 1,000 a 0,985, producido por el agregado de xilitol, disminuyó la velocidad de crecimiento de la levadura independientemente de la presencia de sorbato de potasio (Figura II.20, paneles a, b y c, sistema II. J vs. II.K). Cuando se utilizó glucosa para deprimir la actividad de agua a 0,988 (sistema II.J vs. II.L) se incrementó la velocidad de crecimiento en los sistemas libres del preservador (Figura II.20, panel a) y en presencia de 0,010% p/p del mismo (Figura II.20, panel c), mientras que no hubo diferencias significativas cuando el nivel de sorbato de potasio fue 0,005% p/p (Figura II.20, panel b).

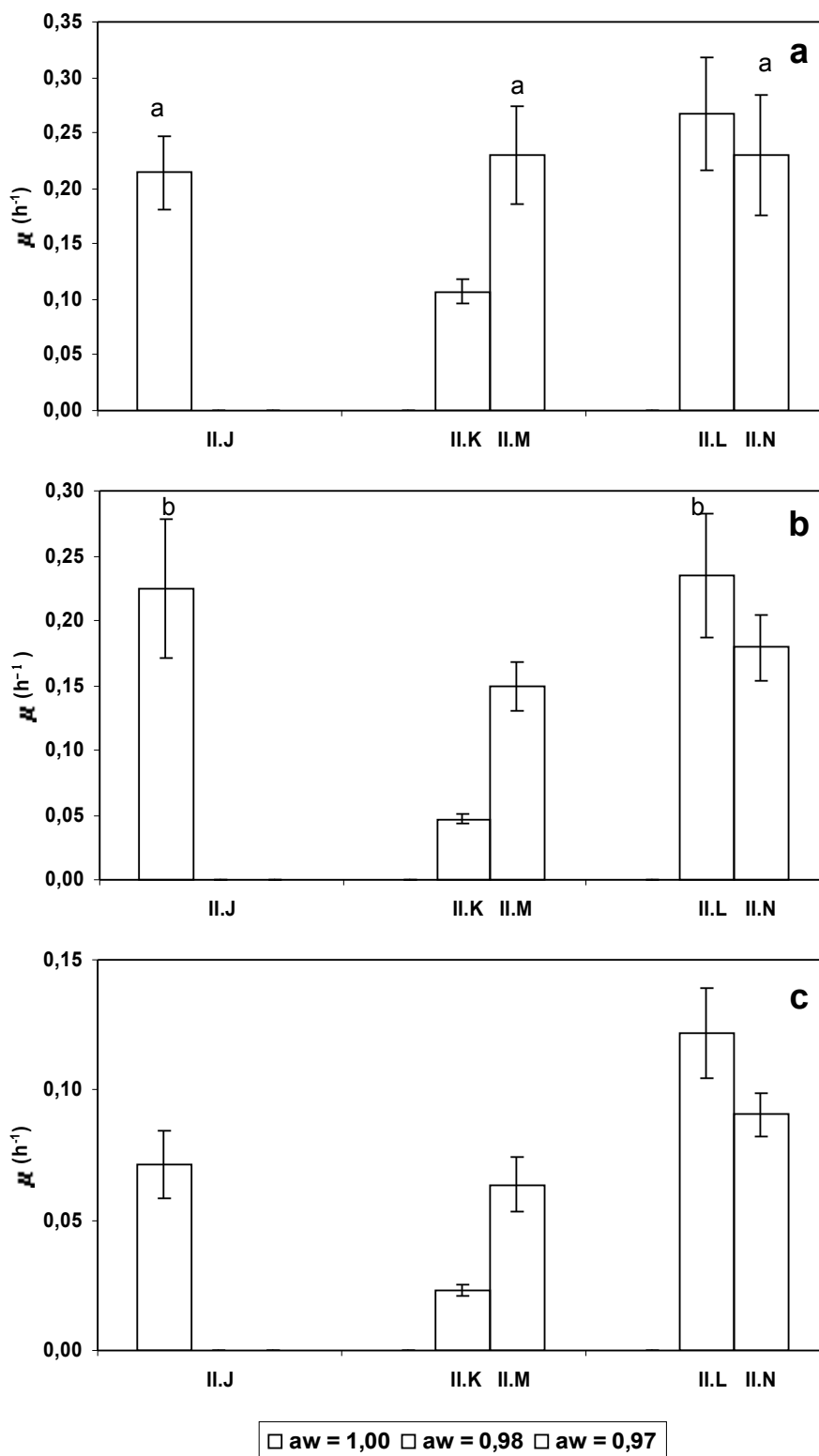
Cuando se adiciona glucosa a los sistemas conteniendo xilitol o glucosa para producir un descenso de la actividad de agua de 0,985 / 0,988 a 0,971, se observó que en presencia de xilitol la velocidad de crecimiento aumentó (sistema II.L vs. II.M), mientras que en presencia de glucosa disminuyó (sistema II.I vs. II.N). Este comportamiento fue independiente de agregado de sorbato de potasio, e insinúa la existencia de una interacción entre el xilitol y la glucosa, la cual se comprobó mediante un ANOVA de dos factores ($p \leq 0,05$), los cuales fueron, el descenso de la actividad de agua y el nivel de sorbato de potasio (Figura II.21). En dicha figura

se observa que el agregado de glucosa antagoniza el efecto inhibitor del crecimiento que produce el xilitol.

Figura II.20. Constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas conteniendo aspartamo en función de la actividad de agua (a_w).

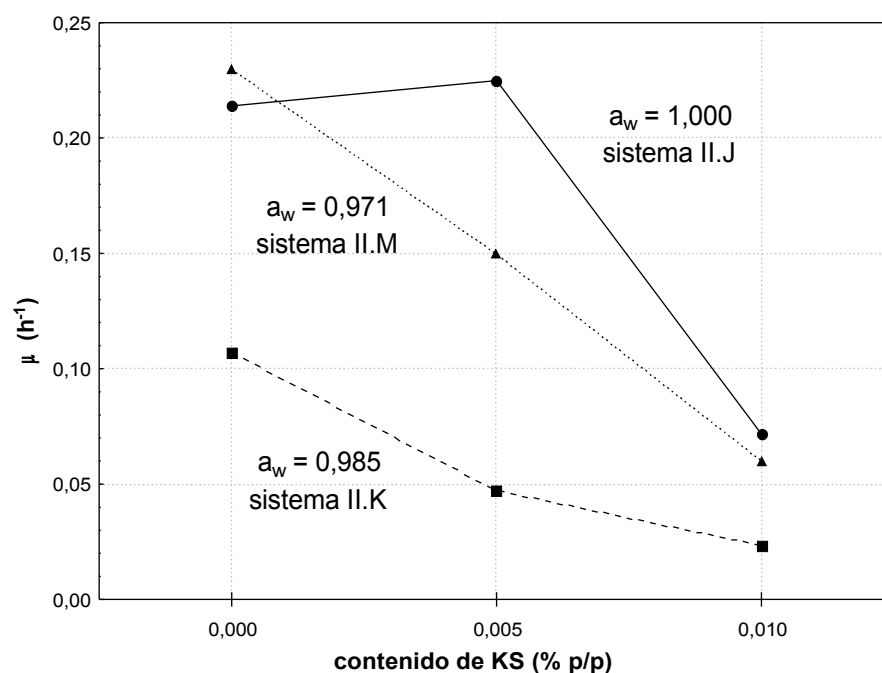
Panel a: sistemas libres de sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio. Panel c: sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



En ausencia de sorbato de potasio, el descenso de la actividad de agua de 1,000 a 0,971 no produjo diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de la levadura (Figura II.20, panel a, sistema II.J vs. II.M, II.N). En los sistemas conteniendo 0,005% p/p del preservador, el mismo descenso de la actividad de agua disminuyó la velocidad de crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* (Figura II.20, panel b, sistema II.J vs. II.M, II.N), mientras que en presencia de 0,010% p/p de sorbato de potasio el agregado conjunto de xilitol y glucosa produjo ligero un descenso de la velocidad de crecimiento (Figura II.20, panel c, sistema II.J vs. II.M), y la adición de 22,00% p/p de glucosa la incrementó (Figura II.20, panel c, sistema II.J vs. II.N).

Figura II.21. Interacción entre xilitol y glucosa en presencia de aspartamo sobre las constantes de velocidad de crecimiento (μ) de *Zygosaccharomyces bailii*. a_w : actividad de agua.



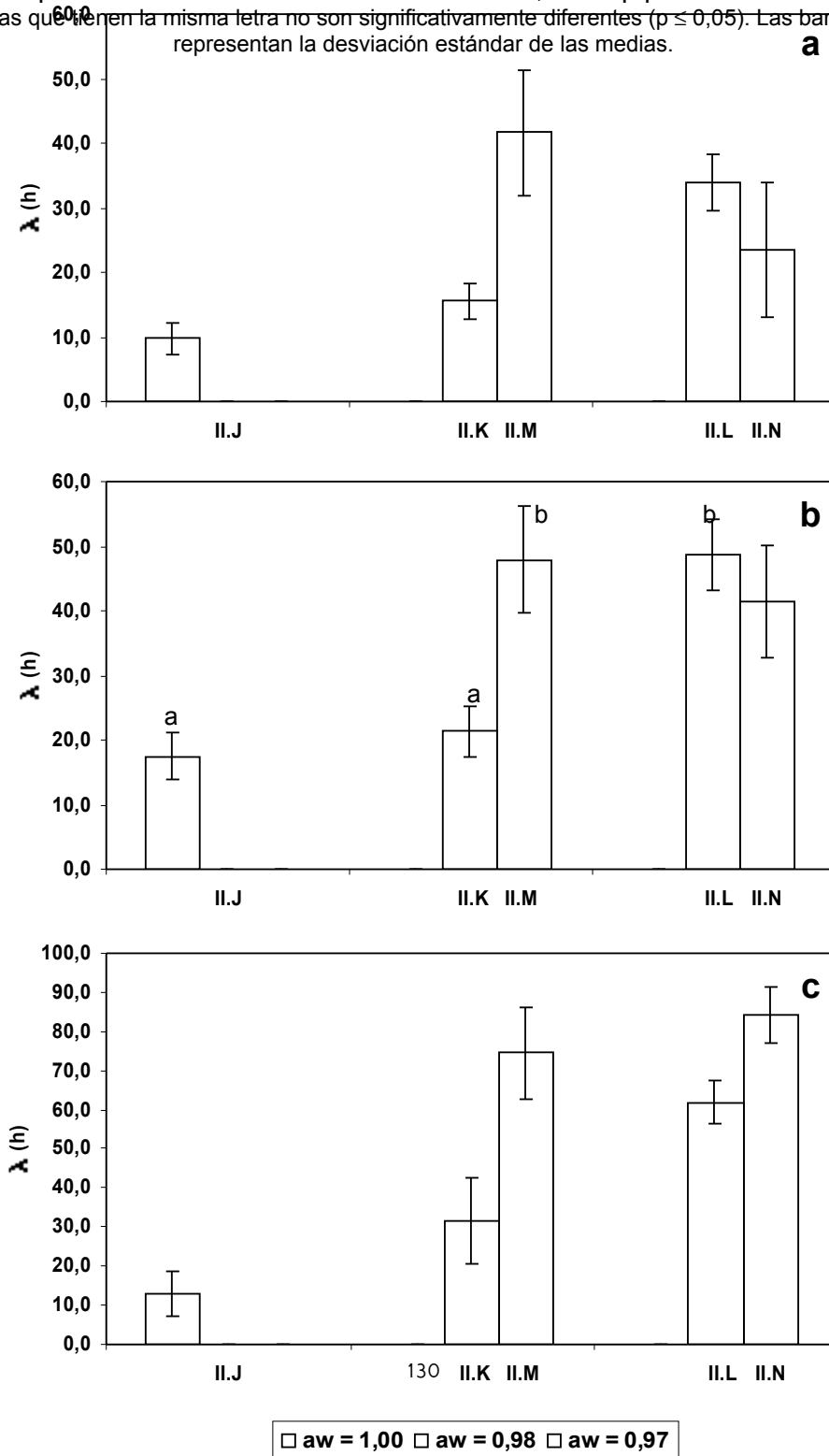
La extensión de la fase de latencia del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas conteniendo aspartamo en función de la actividad de agua se muestra en la Figura II.22.

En todos los sistemas se observó el incremento de la extensión de la fase de latencia debido al descenso de la actividad de agua de 1,000 a 0,985 / 0,988 ó a 0,971 ya sea en ausencia como en presencia de sorbato de potasio (sistema II.J vs. II.K, II.L, II.M, II.N, respectivamente), con la excepción del sistema conteniendo 0,005% p/p del preservador, en el cual, el agregado de xilitol para deprimir la actividad acuosa a 0,985 no mostró diferencias significativas (Figura II.22, panel b, sistema II.J vs. II.K).

Figura II.22. Duración de la fase de latencia (λ) del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas conteniendo aspartamo en función de la actividad de agua (a_w).

Panel a: sistemas libres de sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio. Panel c: sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



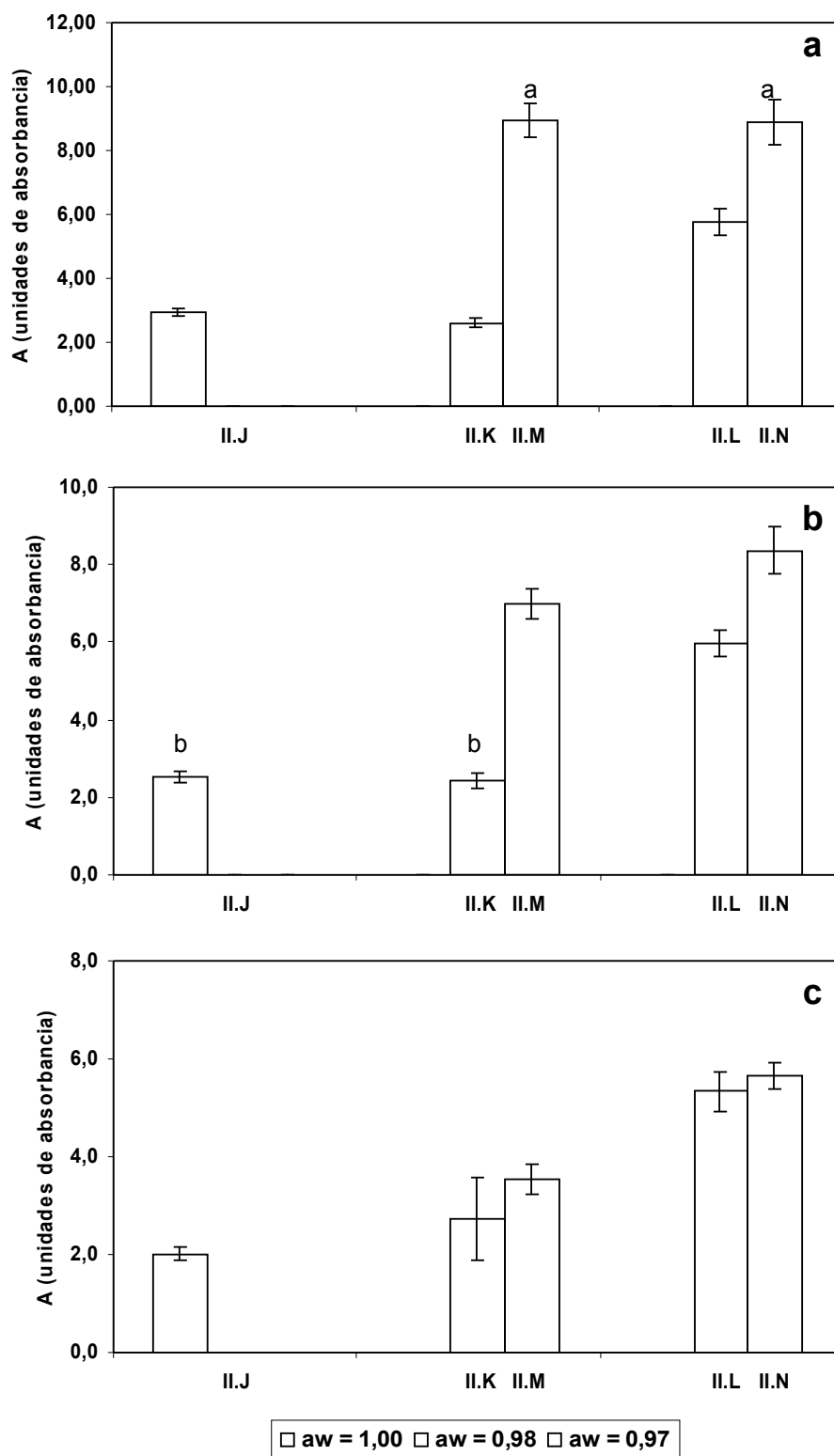
El descenso de la actividad de agua de 0,985 / 0,988 a 0,971 debido a la adición de glucosa, incrementó la duración de la fase de latencia en los sistemas conteniendo xilitol, independientemente del contenido de sorbato de potasio (Figura II.22, paneles a, b y c, sistema II.K vs. II.M), y en el sistema conteniendo glucosa y 0,010% p/p del preservador (Figura II.22, panel c, sistema II.L vs. II.N). En el resto de los sistemas que contienen glucosa, la depresión de la actividad de agua de 0,988 a 0,971 disminuyó la duración de la fase de latencia (Figura II.22, paneles a y b, sistema II.L vs. II.N).

En la Figura II.23 se muestran los valores asintóticos del crecimiento de la levadura en función de la actividad de agua en los sistemas conteniendo aspartamo, en ausencia o en presencia de diferentes niveles del mismo.

En general se observó el aumento del valor asintótico debido al descenso de la actividad de agua ya sea de 1,000 a 0,985 / 0,988 ó a 0,971 (sistema II.J vs. II.K, II.L, II.M, II.N), como de 0,985 / 0,988 a 0,971 (sistema II.K, II.L vs. II.M, II.N, respectivamente) independientemente del contenido de sorbato de potasio. Sin embargo, hubo una excepción, ya que el agregado de xilitol al sistema libre de humectantes (sistema II.J vs. II.K) produjo un ligero descenso del valor asintótico en ausencia de sorbato de potasio (Figura II.23, panel a) y, no mostró un efecto significativo en presencia de 0,005% p/p del preservador (Figura II.23, panel b).

No se encontraron antecedentes bibliográficos relacionados con el efecto del descenso de la actividad de agua sobre el crecimiento de microorganismos en presencia de aspartamo.

Figura II.23. Valor asintótico del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas conteniendo aspartamo en función de la actividad de agua (a_w).
 Panel a: sistemas libres de sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,005% p/p de sorbato de potasio. Panel c: sistemas conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio.
 Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



II.3.2.7 Conclusiones

La depresión de la actividad de agua, el humectante utilizado, la presencia de sorbato de potasio, el agregado de aspartamo y la interacción entre los factores mencionados influenciaron sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*. Con relación a esta influencia, es necesario remarcar los siguientes hechos:

- a) A medida que se incrementó la concentración de sorbato de potasio, la velocidad de crecimiento de la levadura y la máxima población de la fase estacionaria disminuyeron gradualmente, mientras que la fase de latencia aumentó.
- b) La velocidad de crecimiento disminuyó debido al descenso de la actividad de agua por el agregado de polioles en ausencia de sorbato de potasio. En particular, el xilitol fue el soluto que promovió el mayor descenso de la velocidad de crecimiento y del nivel de la población de la fase estacionaria.
- c) En presencia del preservador, el descenso de la actividad de agua produjo diferentes efectos sobre la velocidad de crecimiento dependiendo del nivel de actividad acuosa, del soluto adicionado y de la concentración del preservador. Debe indicarse que la depresión de la actividad de agua a 0,985 / 0,988 por la adición de un poliol o de glucosa, disminuyó la velocidad de crecimiento a todos los niveles de sorbato de potasio ensayados.
- d) La fase de latencia, en general, se incrementó con el descenso de la actividad de agua, independientemente de la presencia y del nivel de sorbato de potasio así como de la presencia de aspartamo.
- e) Los polioles, ya sea en ausencia como en presencia de sorbato de potasio, produjeron un descenso del valor asintótico de la curva de crecimiento. Por el contrario, el uso de glucosa sola o en combinación con un poliol, incrementó el valor asintótico independientemente del contenido de sorbato de potasio.
- f) Se observó sinergismo entre los humectantes (glucosa y polioles) y sorbato de potasio con relación a la inhibición del crecimiento. Este comportamiento permitiría disminuir la cantidad del preservador empleado, sin atentar contra la estabilidad microbiológica del producto.

- g) La presencia de aspartamo produjo diferentes efectos sobre la velocidad y la duración de la fase de latencia del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, los cuales dependieron del nivel de actividad de agua, del humectante y de la concentración del preservador. Es de destacar que en el sistema que contiene xilitol y aspartamo se registró la menor velocidad de crecimiento de la levadura.
- h) El agregado de aspartamo, ya sea en ausencia como en presencia de sorbato de potasio, incrementa el valor asintótico de los sistemas de actividad de agua reducida.
- i) El descenso de la actividad de agua a 0,985 en presencia de aspartamo, debido al agregado de xilitol, disminuyó la velocidad de crecimiento e incrementó la duración de la fase de latencia, independientemente de la presencia y del nivel de sorbato de potasio.
- j) El valor asintótico, en general, se incrementó con el descenso de la actividad de agua en presencia de aspartamo.
- k) La adición de 0,500% p/p de aspartamo al sistema conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio y 11,00% p/p de xilitol produjo un efecto antagónico con relación a la inhibición del crecimiento de la levadura.

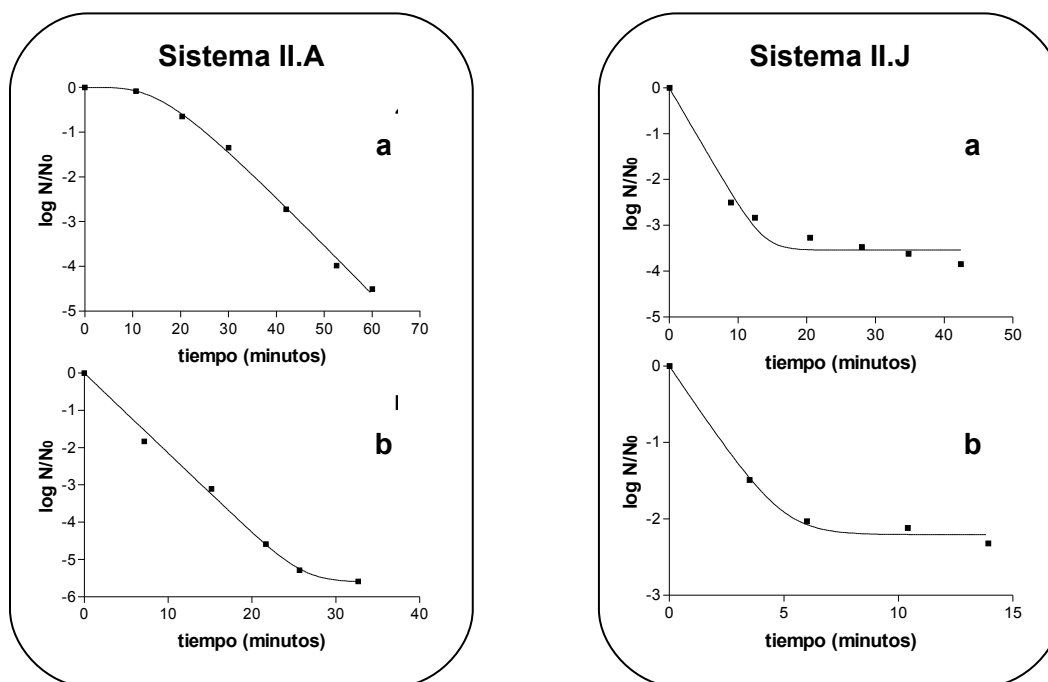
II.3.3 Factores que afectan la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*

Las curvas de inactivación térmica fueron modeladas satisfactoriamente con el modelo de Baranyi ya que los resultados mostraron valores de R^2 en el rango de 0,97-0,99 y valores de RCME entre 0,1 y 0,3.

Las Figuras II.24 a II.27, muestran los datos experimentales y la curva ajustada al modelo de Baranyi para un replicado de cada uno de los sistemas estudiados tanto en ausencia como en presencia de sorbato de potasio. El modelado de las curvas del resto de los replicados analizados mostró un patrón similar al mostrado en dichas figuras.

De los tres parámetros del modelo de Baranyi, la velocidad de muerte relativa (k) fue el único parámetro que pudo ser estimado en todos los sistemas estudiados y fue el que presentó menor error. Este comportamiento es coincidente con el reportado por Xiong y col. (1999).

Figura II.24. Datos experimentales (■) y curvas de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* modeladas (—) para los sistemas de actividad de agua 1,000.
Panel a: sistema sin sorbato de potasio. Panel b: sistema conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio.



En los sistemas estudiados, las curvas obtenidas no exhibieron hombro con excepción del sistema libre de humectantes y de sorbato de potasio (Figura II.24, panel a, sistema II.A). Además, este sistema no presentó cola. Este hecho fue diferente para el resto de los sistemas, los cuales, sí mostraron la existencia de una cola, sugiriendo la presencia de una población resistente al calor, probablemente debido a la formación de un pequeño número de ascosporas, las cuales son más resistentes que las células vegetativas. El mismo comportamiento fue reportado por Corry (1976 a) para levaduras osmofílicas sometidas a tratamiento térmico en soluciones de azúcares y polioles.

Figura II.25. Datos experimentales (■) y curvas de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* modeladas (—) para los sistemas de actividad de agua 0,985/0,988.

Panel a: sistema sin sorbato de potasio. Panel b: sistema conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio.

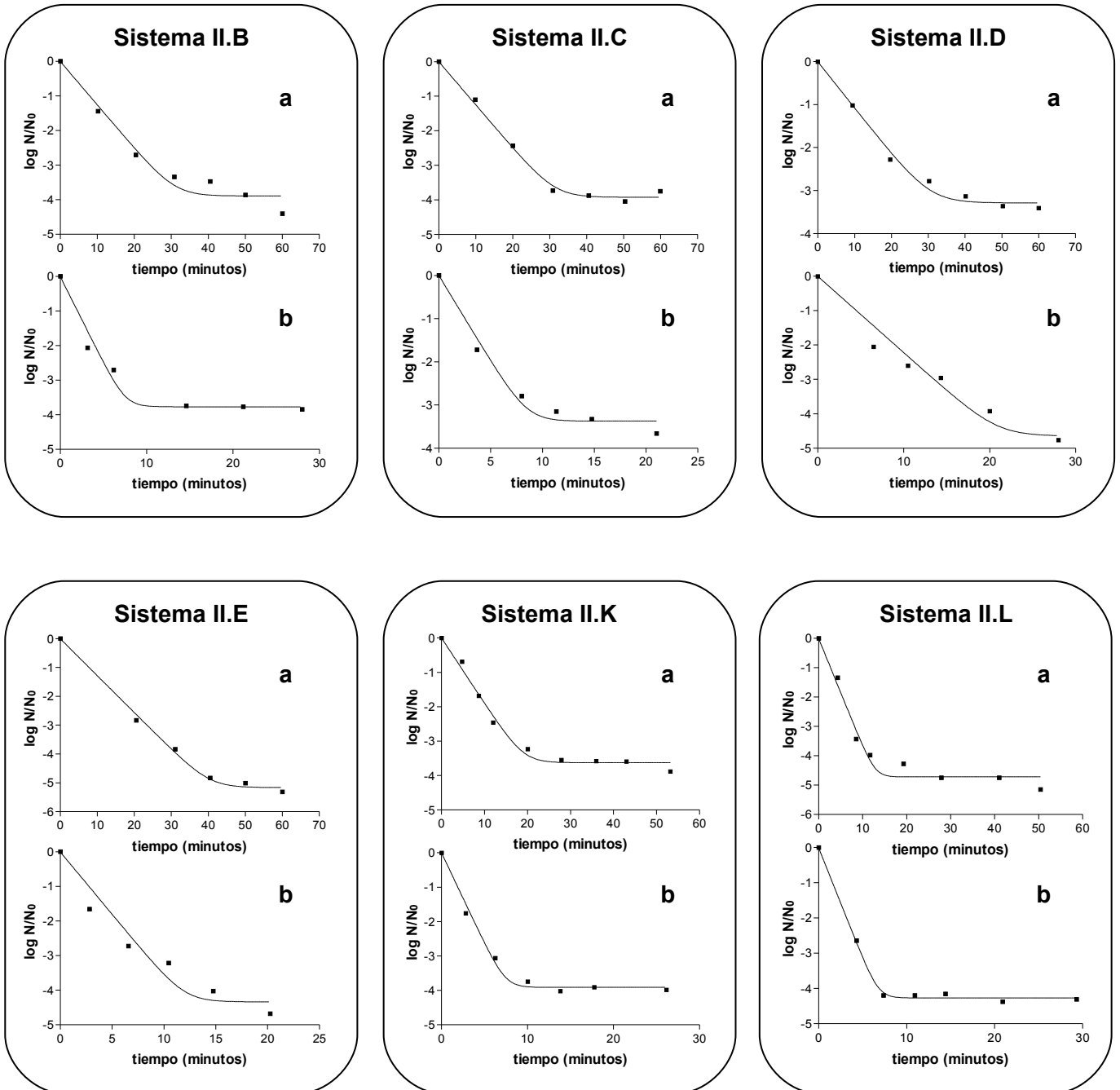


Figura II.26. Datos experimentales (■) y curvas de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* modeladas (—) para los sistemas de actividad de agua 0,971. Panel a: sistema sin sorbato de potasio. Panel b: sistema conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio.

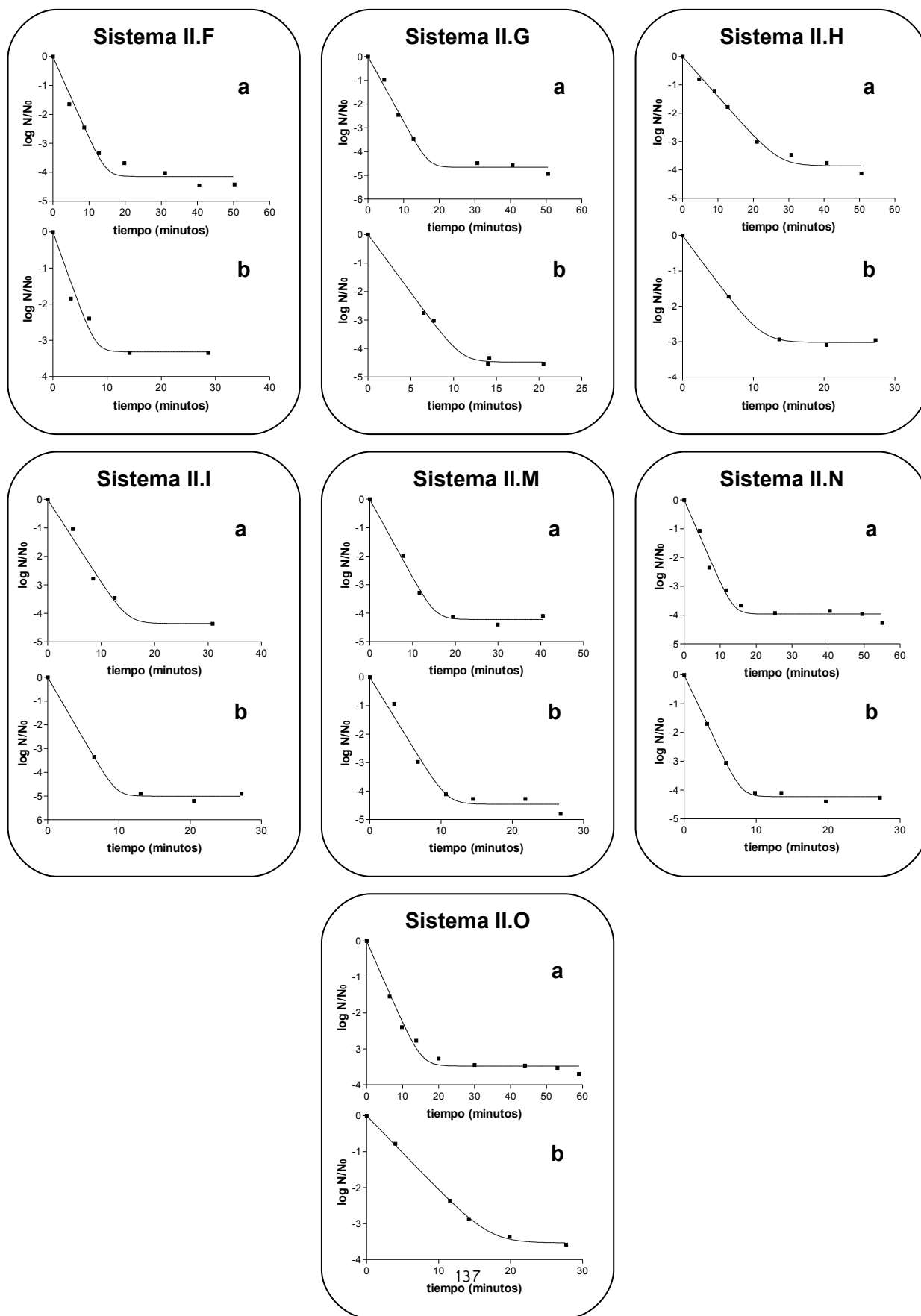
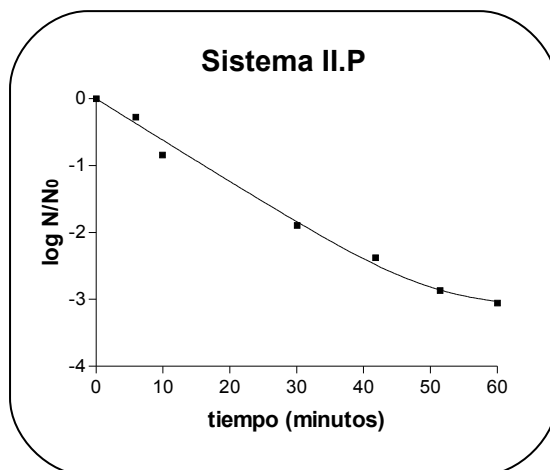


Figura II.27. Datos experimentales (■) y curva de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* modelada (—) para el sistema de actividad de agua 0,900 en ausencia de sorbato de potasio.



II.3.3.1 Efecto del sorbato de potasio sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*

En la Figura II.28 se muestran las constantes de velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* de los sistemas en función de la presencia de sorbato de potasio.

En dicha figura puede observarse que el agregado de 0,025% p/p de sorbato de potasio incrementó significativamente la velocidad de inactivación térmica para todos los sistemas estudiados con excepción del sistema de actividad de agua 0,971, que contiene xilitol como humectante (sistema II.O), en el cual el agregado del preservador no produjo efecto sobre la inactivación térmica de la levadura.

Cabe destacar que en el sistema conteniendo glucosa, de actividad de agua 0,900 (sistema II.P), la inactivación de la levadura tuvo lugar luego de 5 minutos de iniciado el tratamiento térmico, ya que el recuento de viables de *Zygosaccharomyces bailii* se redujo de $1 \cdot 10^4$ UFC/ml a 1 UFC/ml. Este comportamiento no permitió estimar la velocidad de inactivación térmica de la levadura, sin embargo, pone en evidencia el incremento en la velocidad de muerte promovido por el agregado de sorbato de potasio.

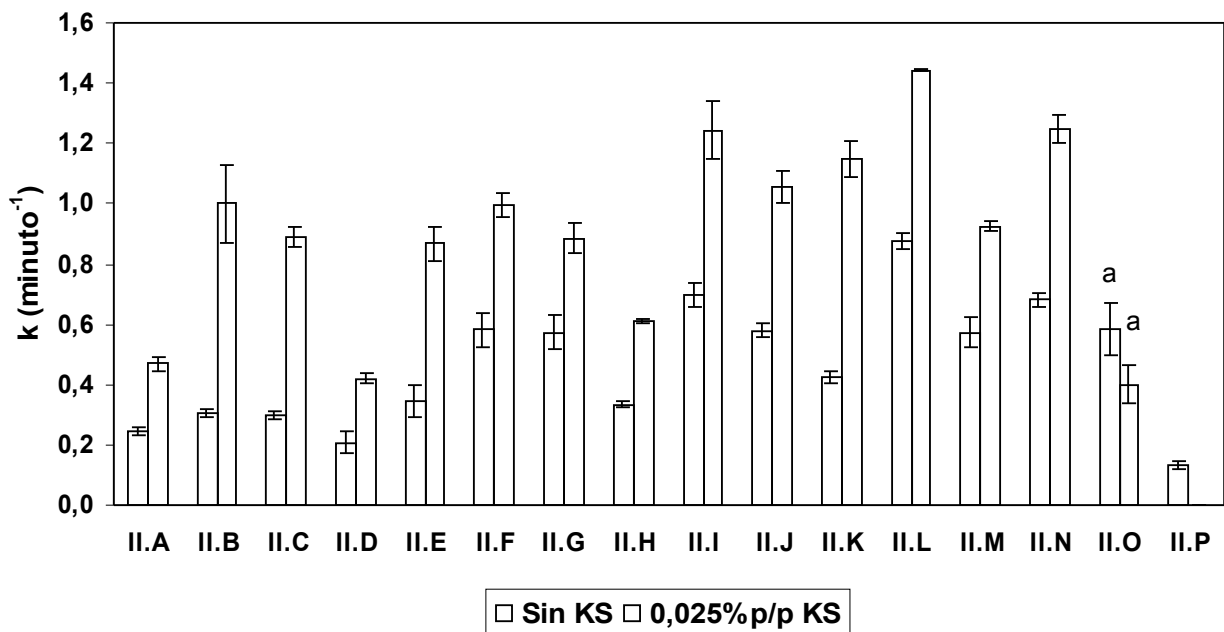
El efecto acelerador de la inactivación térmica que posee el sorbato de potasio fue reportado previamente por Beuchat (1982), quien encontró que una concentración de 0,010%

p/p del preservador incrementó la velocidad de inactivación de levaduras en jugos. El efecto fue más pronunciado a valores de pH menores a 5,5, lo que indica que la acción se debe a la forma no disociada del ácido. Además, la adición de 0,060-0,120% p/p de sorbato de potasio a un jugo fresco de manzana, a rodajas de durazno y a ensalada de frutas actuó sinérgicamente con el calor para prolongar la vida útil de los alimentos; asimismo, bajos niveles del preservador, tales como 0,005% p/p pudieron disminuir significativamente los valores D de levaduras (Golden y Beuchat, 1992; Beuchat, 1982).

De acuerdo a lo informado por Tsuchido y Shibasaki (1980), la acción sinérgica entre el sorbato de potasio y el tratamiento térmico se debería a que, probablemente, el preservador disminuye la habilidad de los microorganismos para recuperarse de la injuria ocasionada por el tratamiento térmico.

Figura II.28. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo en función de la presencia de sorbato de potasio (KS).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



II.3.3.2 Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*

En la Figura II.29, se muestran los valores de las constantes de velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en función de la actividad de agua (a_w) de los sistemas libres de sorbato de potasio.

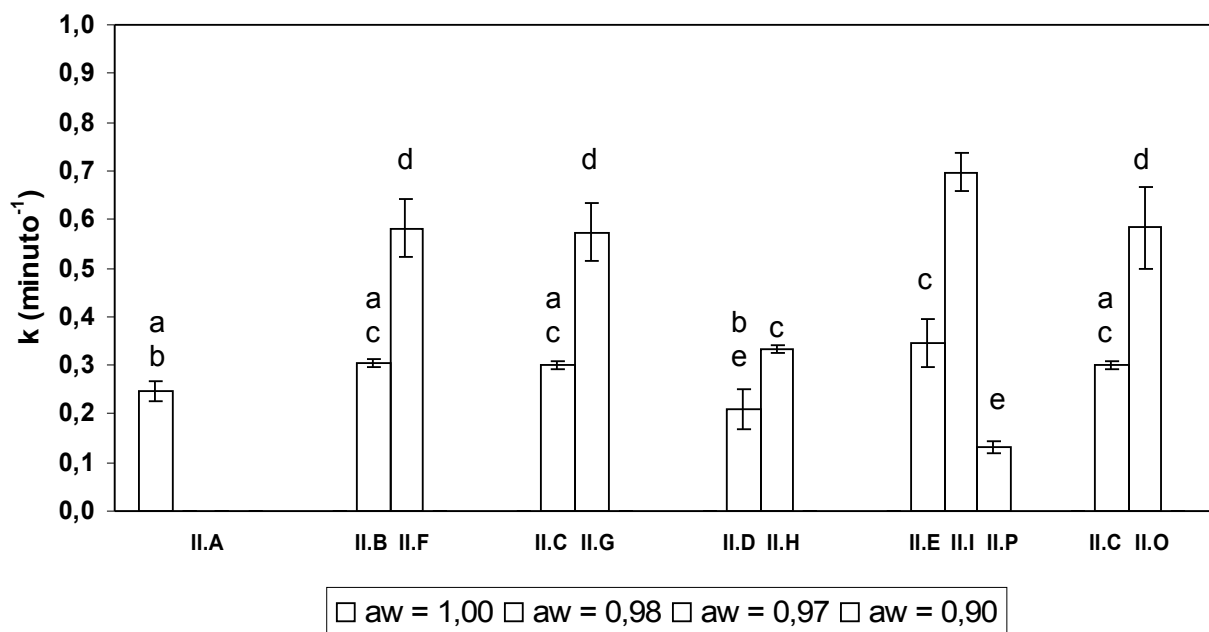
En dicha figura puede observarse que la depresión de la actividad de agua de 1,000 a 0,985/0,988 no produjo un efecto significativo sobre la velocidad de inactivación térmica cuando se utilizó un poliol como humectante (sistema II.A vs. II.B, II.C, II.D). Pero cuando se adicionó un 10,00% p/p de glucosa, se observó un ligero incremento de la velocidad de inactivación térmica (sistema II.A vs. II.E), la cual continuó en ascenso al agregar mayor cantidad de glucosa para alcanzar una actividad de agua de 0,971 (sistema II.E vs. II.I). También, la depresión de la actividad de agua de 0,985 a 0,971 por la adición de glucosa a sistemas conteniendo un poliol incrementó la velocidad de inactivación térmica (sistemas II.B, II.C, II.D vs. II.F, II.G, II.H, respectivamente). Esta tendencia podría estar relacionada con el efecto del descenso de la actividad de agua o con el empleo de glucosa como humectante. Para intentar dilucidar la mencionada tendencia, se analizó un sistema conteniendo uno de los polioles con la actividad acuosa deprimida a 0,971, eligiéndose para tal fin al xilitol por ser el poliol de mayor interés en el presente estudio, según se explicó en la sección II.3.2.4. En este caso, también se observó un incremento en la velocidad de inactivación térmica siendo el descenso de la actividad de agua de 0,985 a 0,971, debido a la adición de xilitol, el causante de tal efecto (sistema II.C vs. II.O). En conclusión, se observa que el descenso de la actividad de agua promueve un incremento de la velocidad de inactivación térmica de la levadura y, la magnitud de este efecto, estaría relacionada con la naturaleza del soluto empleado.

Cabe aclarar que el orden del incremento de la velocidad de inactivación térmica en sistemas de actividad de agua 0,971 fue: glucosa / manitol (sistema II.H) < xilitol (sistema II.O) = glucosa / xilitol (sistema II.G) = glucosa / sorbitol (sistema II.F) < 22,00% p/p de glucosa (sistema II.I).

En síntesis, los resultados obtenidos mostraron que el efecto deprimir la actividad de agua a 0,985 / 0,988 sobre la inactivación térmica dependió del soluto utilizado. En contraste, un descenso a 0,971 disminuyó la resistencia térmica de la levadura, siendo la glucosa el soluto que ejerció el mayor descenso.

Figura II.29. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas libres de sorbato de potasio, en función de la actividad de agua (a_w).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de los medios.



Pese a lo observado en este trabajo, el efecto de la depresión de la actividad de agua sobre la inactivación térmica que comúnmente se reporta en bibliografía es el incremento de la resistencia térmica de los microorganismos. Corry (1976 a, b) observaron un incremento de la resistencia térmica de *Zygosaccharomyces rouxii* y de *Zygosaccharomyces pombe* en soluciones de azúcares y polioles conteniendo buffer fosfato 0,1 M, pH 6,5 y una actividad de agua de 0,95. Por otra parte, Golden y Beuchat (1992) informaron que el uso de glucosa o sacarosa para deprimir la actividad de agua a 0,93 en un caldo ácido de pH 4,5, incrementó la resistencia de células de *Zygosaccharomyces rouxii*. La presencia de glicerol también aumentó la resistencia frente al calor de la misma levadura (Fernández y col., 1996). La velocidad de destrucción de diferentes microorganismos, entre ellos *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces cerevisiae*, por acción del calor, disminuyó con el descenso de la actividad de agua debido a la adición de glucosa y glicerol (Reichart y Mohácsi-Farkas, 1994).

Para explicar dicho comportamiento, se postula que el incremento de la resistencia térmica exhibido por las células a valores de actividad de agua reducida se relaciona con la deshidratación que tiene lugar en la célula y con el concomitante incremento de la estabilidad de las proteínas de la célula en estado seco (Smith y col., 1983; Gibson, 1973). No obstante, debe remarcar que la sensibilidad al calor cuando se reduce la actividad de agua puede depender del tipo de microorganismo, del soluto empleado y de su concentración. Como ejemplo se menciona que el efecto del calor sobre la velocidad de inactivación a 49°C de *Penicillium puberulum* no estuvo influenciado por un nivel de sacarosa comprendido en el rango de 0 a 60% p/p. Además, no se observaron cambios en los valores de D_{55} de *Zygosaccharomyces rouxii* y *Torulopsis globosa* cuando la actividad de agua descendió de 0,995 a 0,980 por la adición de sacarosa, pero el agregado de suficiente cantidad de este azúcar para alcanzar una actividad de agua de 0,900 promovió un incremento del valor de D_{55} (Gibson, 1973).

Como se mencionó previamente, en los sistemas estudiados, el descenso de la actividad de agua no produjo cambios o incrementó la velocidad de inactivación térmica, dependiendo del valor de la actividad de agua alcanzada y del soluto utilizado. Cuando se utilizó glucosa como humectante se observó un incremento en la velocidad de inactivación térmica con el descenso de la actividad de agua de 0,988 a 0,971. Para verificar si un descenso más drástico de la actividad de agua, empleando este humectante, pudiese ejercer el efecto protector comúnmente reportado en bibliografía, se estudió la inactivación térmica de la levadura en un sistema conteniendo glucosa en un nivel tal que su actividad de agua fuera 0,900 (sistema II.P). En este caso, se observó que el descenso de la actividad acuosa de 0,971 a 0,900 promovió una disminución significativa de la velocidad de inactivación térmica (Figura II.29, sistema II.I vs. II.P) sugiriendo que una drástica depresión de la actividad de agua ejerce el efecto protector reportado en bibliografía.

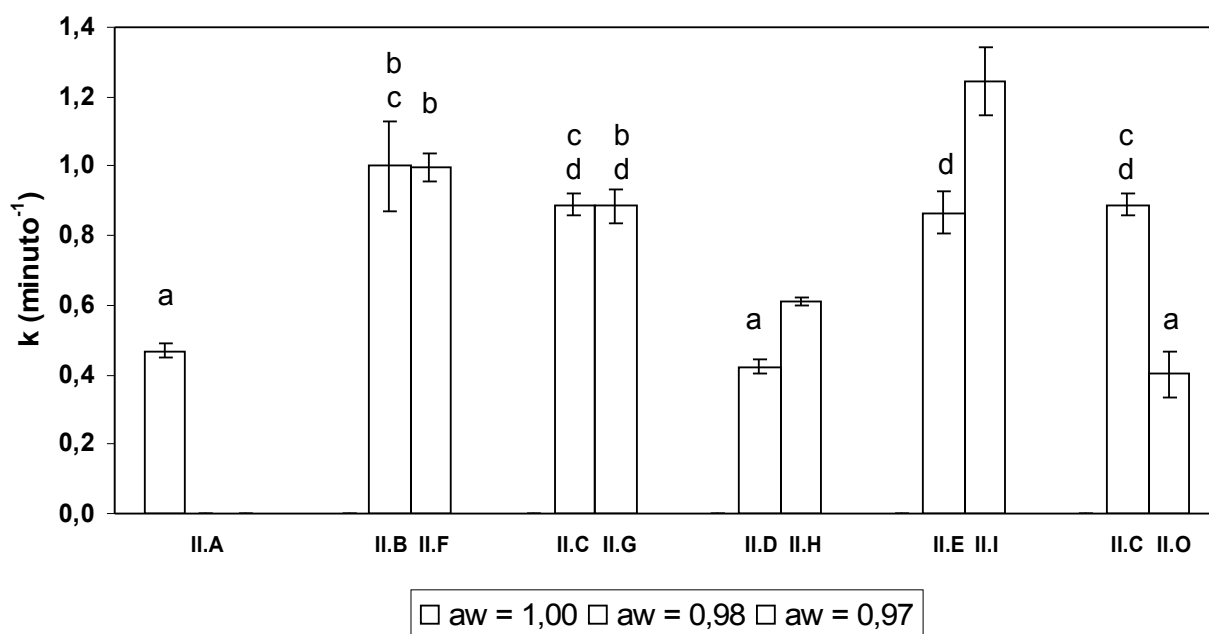
Basándose en lo comentado, puede concluirse que el efecto del descenso de la actividad de agua sobre la inactivación de *Zygosaccharomyces bailii* depende de su magnitud y, sería necesario realizar un mayor estudio al abarcado en el presente trabajo para elucidarlo.

II.3.3.3 Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en presencia de sorbato de potasio

En la Figura II.30 se muestran los valores de las constantes de velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en función de la actividad de agua, en los sistemas conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio en ausencia de aspartamo.

Figura II.30. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio en función de la actividad de agua (a_w).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de los medios.



Como se observa en dicha figura, la depresión de la actividad de agua de 1,000 a 0,985 / 0,988 indujo un incremento de la velocidad de inactivación térmica para los sistemas conteniendo sorbitol, xilitol o glucosa como humectantes (sistema II.A vs. II.B, II.C, II.E). Sin embargo, el uso de manitol no produjo cambios en dicho parámetro (sistema II.A vs. II.D).

El descenso de la actividad de agua de 0,985 / 0,988 a 0,971 produjo diferentes comportamientos. La incorporación de glucosa no produjo un incremento significativo en la

velocidad de inactivación térmica cuando se utilizaron sorbitol o xilitol como humectantes (sistemas II.B, II.C vs. II.F, II.G, respectivamente), sin embargo, en el caso de los sistemas conteniendo manitol o glucosa, promovió un significativo incremento de la velocidad de inactivación térmica (sistemas II.D, II.E vs. II.H, II.I, respectivamente). Finalmente, el uso adicional de xilitol para obtener una actividad de agua de 0,971 produjo un descenso de la velocidad de inactivación térmica (sistema II.C vs. II.O). Esta última tendencia es coincidente con el incremento de la resistencia térmica comúnmente reportada en bibliografía en medios de actividad de agua reducida (Corry, 1976 a, b).

Cuando la actividad de agua descendió a 0,900 debido al agregado de glucosa, si bien no pudo estimarse la velocidad de inactivación térmica (sección II.3.3.1), queda demostrado que la adición de glucosa disminuyó notoriamente la resistencia térmica de *Zygosaccharomyces bailii* con referencia a los sistemas conteniendo dicho humectante, de actividad de agua 0,988 (sistema II.E) y 0,971 (sistema II.I). Esta tendencia es opuesta a la observada en ausencia de sorbato de potasio y sugeriría la existencia de una interacción entre la depresión de la actividad de agua por la adición de glucosa y el preservador.

Con el objetivo de evaluar la interacción entre el efecto del descenso de la actividad de agua, la naturaleza del soluto y la presencia de sorbato de potasio sobre la velocidad de inactivación térmica, se realizó un ANOVA, obteniéndose como resultado la existencia de una interacción significativa ($p \leq 0,05$) entre todas las variables analizadas. Asimismo se observó la acción sinérgica sobre la velocidad de inactivación térmica debido al uso combinado de sorbato de potasio y suficiente cantidad de sorbitol, xilitol o glucosa para alcanzar una actividad de agua de 0,985 / 0,988 (Figura II.31, panel a, b y c). Esta tendencia es coincidente con la reportada por Beuchat (1981 a), quien observó que la acción inhibitoria del sorbato de potasio contra la resistencia térmica de *Penicillium puberulum* se incrementó por el aumento de la concentración de sacarosa.

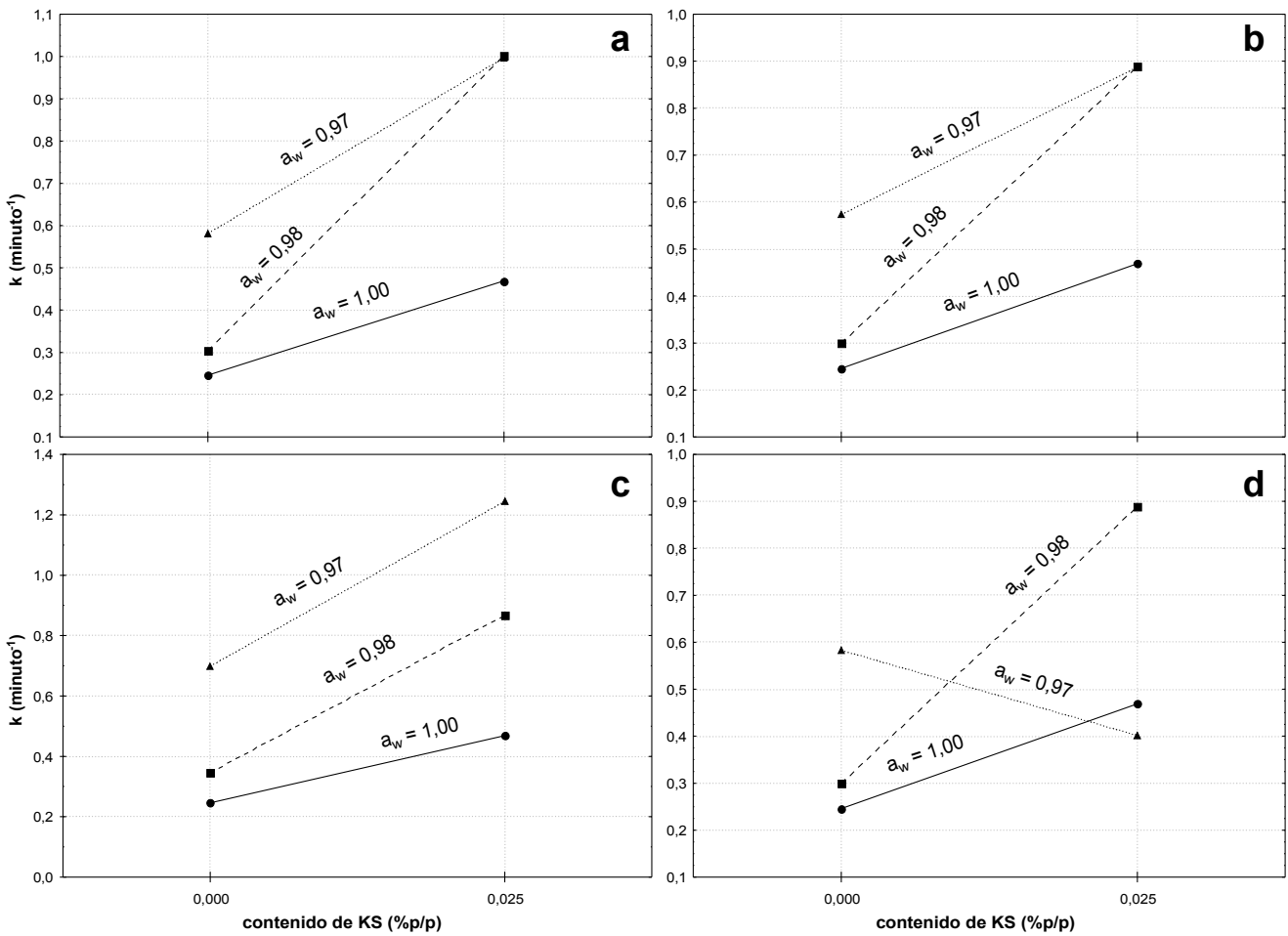
El análisis estadístico mencionado en el párrafo anterior, también permitió observar un efecto antagónico sobre la velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*, entre el sorbato de potasio y un nivel de xilitol tal que la actividad de agua tome un valor de 0,971 (Figura II.31, panel d).

Debe remarcarse que desde el punto de vista de minimizar la adición de solutos y, al mismo tiempo, mejorar la inactivación térmica, resulta más conveniente la reducción de la actividad de agua a 0,985 / 0,988 mediante el uso de sorbitol, xilitol o glucosa, en presencia de

sorbato de potasio, debido a la acción sinérgica que presentaron sobre la velocidad de inactivación térmica. Este comportamiento permitiría disminuir la severidad de los tratamientos térmicos sin causar efecto perjudicial sobre la esterilidad del sistema.

Figura II.31. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo en función de la depresión de la actividad de agua (a_w) y del contenido de sorbato de potasio (KS).

Panel a: sistemas conteniendo sorbitol y/o glucosa. Panel b: sistemas conteniendo xilitol y/o glucosa. Panel c: sistemas conteniendo glucosa. Panel d: sistemas conteniendo xilitol.

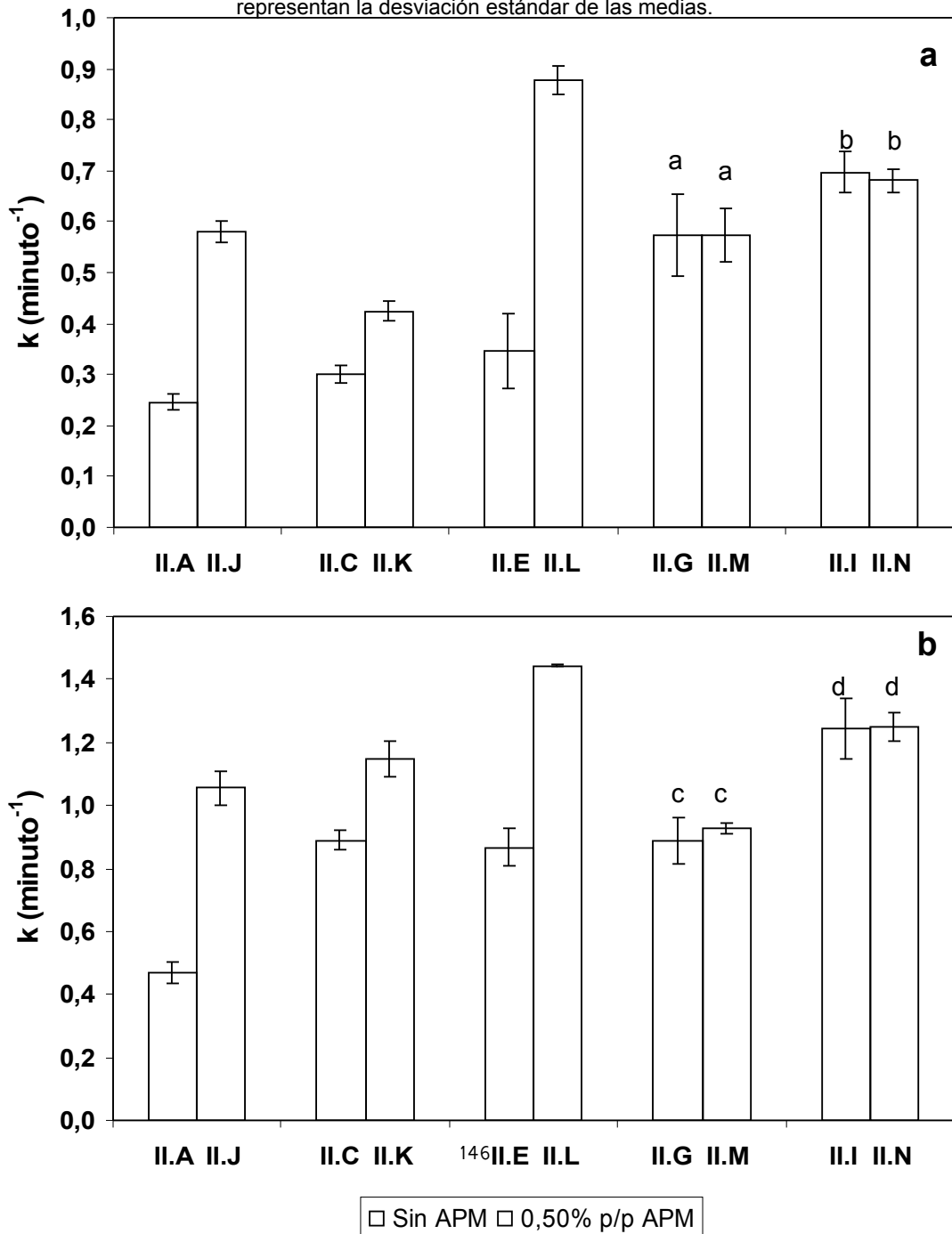


II.3.3.4 Efecto del aspartamo sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*

En la Figura II.32, paneles a y b, se muestran las constantes de velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* de los sistemas, en ausencia de preservador y en presencia de 0,025% p/p del mismo, respectivamente, en función de la presencia de aspartamo.

Figura II.32. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo en función de la presencia de aspartamo (APM). Panel a: sistemas sin sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio.

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Independientemente de la presencia de sorbato de potasio, el agregado de 0,500% p/p de aspartamo, incrementó la velocidad de inactivación térmica de la levadura en todos los sistemas estudiados, con excepción de los aquellos de actividad de agua 0,971 (sistema II.G, II.I vs II.M, II.N, respectivamente), en los cuales no se observaron diferencias significativas. Probablemente, este comportamiento se deba a que la depresión de la actividad de agua a 0,971 ya ejerce un efecto acelerante sobre la inactivación térmica (sistema II.A vs. II.G y II.I), el cual enmascararía el efecto del agregado de aspartamo.

El efecto acelerador del aspartamo sobre la inactivación térmica de la levadura probablemente se podría vincular con el hecho de que a pH 3,00 este edulcorante presentaría carga predominantemente positiva (Tabla I.4, $pK_a = 2,40$) e interaccionaría electrostáticamente con componentes de la membrana celular. De esta manera, podría verse comprometida la integridad estructural de la membrana, haciéndola susceptible a la acción del tratamiento térmico, y, por ende, su funcionalidad.

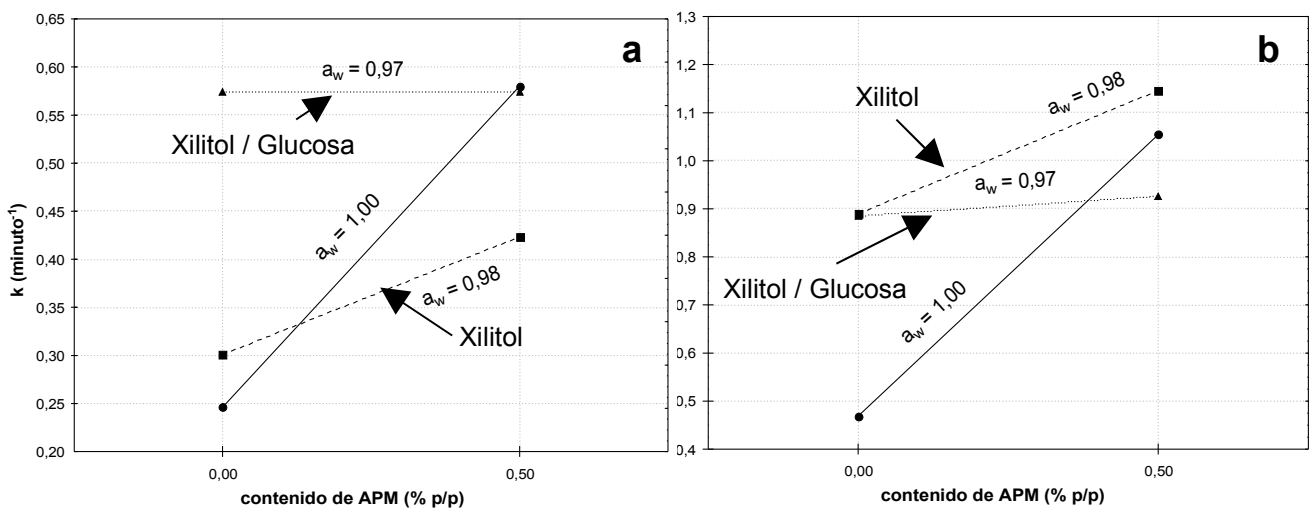
La realización de un ANOVA ($p \leq 0,05$) permitió establecer la existencia de interacciones entre los humectantes y el aspartamo. Por ejemplo, se observó un antagonismo entre el xilitol y el aspartamo, en ausencia de sorbato de potasio, ya que el agregado del humectante al sistema conteniendo aspartamo produjo un descenso significativo de la velocidad de inactivación térmica (Figura II.33, panel a, sistema II.J vs. II.K). Este comportamiento no se observó al adicionarse 0,025% p/p de sorbato de potasio (Figura II.33, panel b).

En la Figura II.33 también puede observarse que en sistemas de actividad de agua 0,971, el agregado de aspartamo no afectó la velocidad de inactivación térmica, independientemente de la presencia del preservador, ejemplificándose los sistemas conteniendo glucosa y xilitol (sistemas II.G y II.M).

No hay estudios realizados acerca del efecto del aspartamo sobre la inactivación térmica de microorganismos y, es de destacar que el incremento de la inactivación térmica promovido por la presencia de 0,500% p/p de aspartamo, en sistemas de actividad de agua 0,988, permitiría reducir la severidad del tratamiento térmico aplicado.

Figura II.33. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo conteniendo xilitol y/o glucosa en función del descenso de la actividad de agua (a_w) y de la presencia de aspartamo (APM).

Panel a: sistemas sin sorbato de potasio. Panel b: sistemas conteniendo 0,025% p/p de sorbato de potasio.



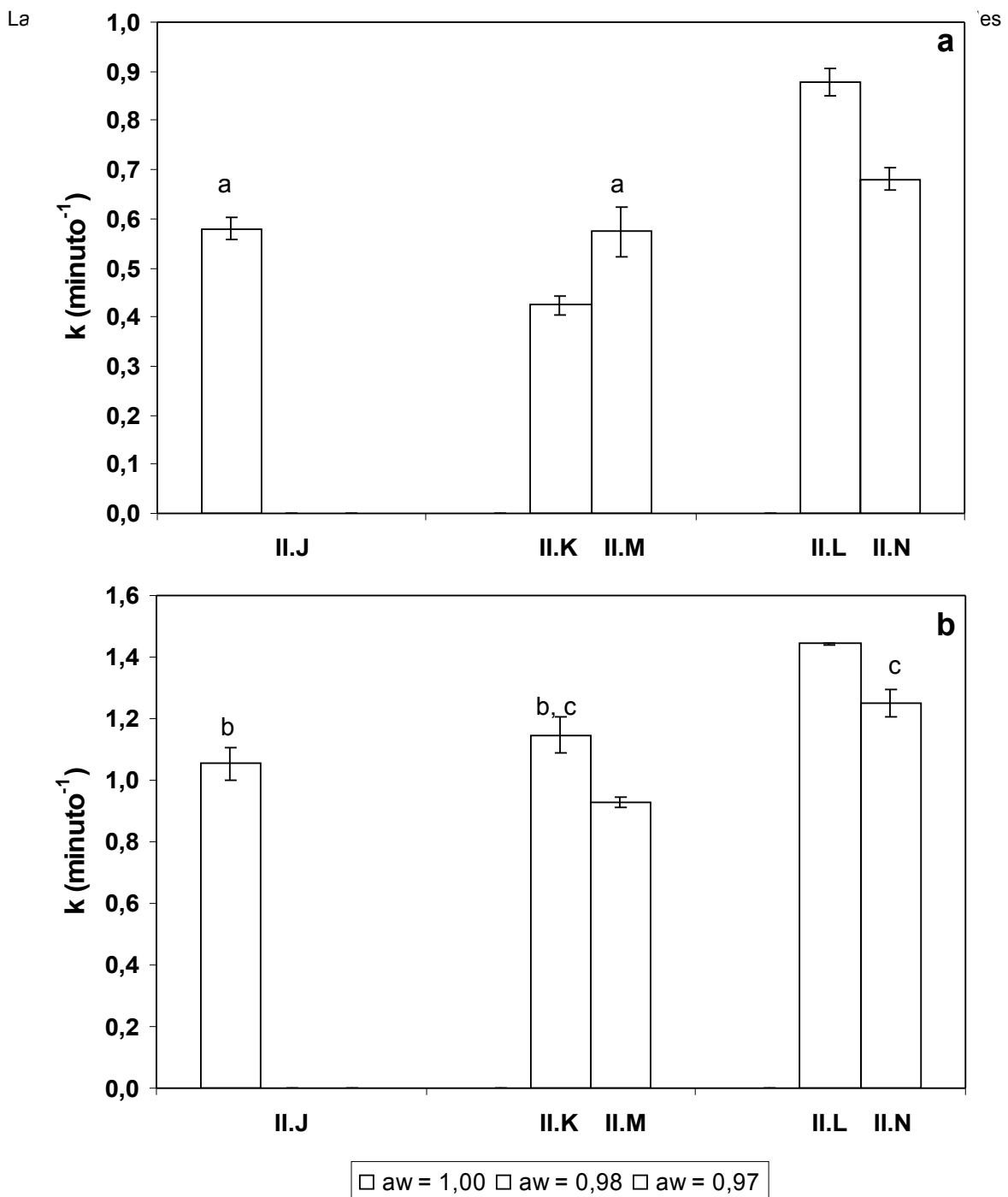
II.3.3.5 Efecto del descenso de la actividad acuosa sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en presencia de aspartamo

En la Figura II.34 se exponen las constantes de velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en función de la actividad de agua de los sistemas conteniendo aspartamo, ya sea en ausencia (panel a) como en presencia de sorbato de potasio (panel b).

El efecto del descenso de la actividad de agua de los sistemas conteniendo aspartamo presentó diferentes comportamientos dependiendo del soluto utilizado.

Independientemente del contenido de sorbato de potasio (Figura II.34, paneles a y b), el agregado de glucosa para deprimir la actividad de agua de 1,000 a 0,988, aceleró la velocidad de inactivación térmica (sistema II.J vs. II.L), mientras que para provocar el descenso de 0,988 a 0,971, la disminuyó (sistema II.L vs. II.N). Sin embargo, al deprimir la actividad de agua de 1,000 a 0,971 por la adición de dicho humectante, se incrementó la velocidad de inactivación térmica (sistema II.J vs. II.N). Haciendo un paralelismo con lo observado en los sistemas conteniendo glucosa, en ausencia de aspartamo, el cual se resume en la Figura II.35, se deduce que la presencia de este último invirtió la tendencia cuando la actividad de agua descendió de 0,988 a 0,971, independientemente de la presencia de sorbato de potasio.

Figura II.34. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo conteniendo aspartamo en función de la actividad de agua (a_w). Panel a: sistemas en ausencia de sorbato de potasio, panel b: sistemas conteniendo 0,025% p/



Cuando se empleó xilitol como humectante, el efecto del descenso de la actividad de agua sobre la velocidad de inactivación térmica mostró diferentes tendencias en función del contenido de sorbato de potasio. En ausencia del preservador la disminución de la actividad acuosa de 1,000 a 0,985 incrementó la resistencia térmica de la levadura (Figura II.34, panel a, sistema II.J vs. II.K), mientras que un descenso de 0,985 a 0,971, debido al agregado de glucosa, la disminuyó (Figura II.34, panel a, sistema II.K vs. II.M), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las actividades de agua 1,000 y 0,971 (Figura II.34, panel a, sistema II.J vs. II.M). En presencia de 0,025% p/p de sorbato de potasio, el descenso de la actividad de agua de 1,000 a 0,985 por la adición de un poliol, no afectó la velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* (Figura II.34, panel b, sistema II.J vs. II.K), mientras que la disminución de 0,985 a 0,971 debido al agregado de glucosa, aumentó la resistencia térmica de la levadura (Figura II.34, panel a, sistema II.K vs. II.M). Este comportamiento insinúa la existencia de una interacción entre el sorbato de potasio y los humectantes, en presencia de aspartamo. La realización de un ANOVA ($p \leq 0,05$) confirmó dicha hipótesis. En base a ello se observó que el sorbato de potasio y la mezcla de humectantes xilitol / glucosa actúan de manera antagónica sobre la velocidad de inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* (Figura II.36).

Comparando con los sistemas sin aspartamo, en contraste con lo observado con glucosa, cuando se emplea xilitol como humectante, no se puede deducir un efecto definido de la presencia de aspartamo sobre el descenso de la actividad de agua.

Es de destacar que, para aumentar la sensibilidad de la levadura frente al tratamiento térmico en presencia de 0,025% p/p de sorbato de potasio y 0,500% p/p de aspartamo, conviene emplear glucosa o xilitol como humectantes a fin de deprimir la actividad de agua a

0,985 / 0,988. En el caso de sistemas que no contienen sorbato de potasio, convendría emplear glucosa como humectante en lugar de xilitol ya que el empleo del polirol promueve el incremento de la resistencia térmica de la levadura.

Figura II.35. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo conteniendo glucosa en función de la actividad de agua (a_w) y del contenido de sorbato de potasio (KS).

Panel a: sistemas sin aspartamo. Panel b: sistemas conteniendo 0,500% p/p de aspartamo.

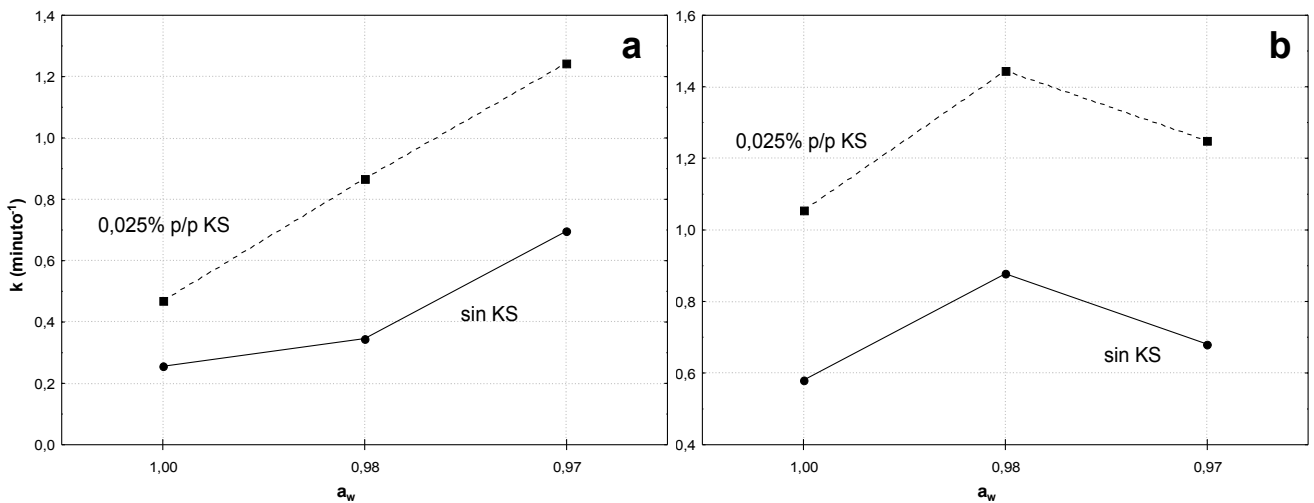
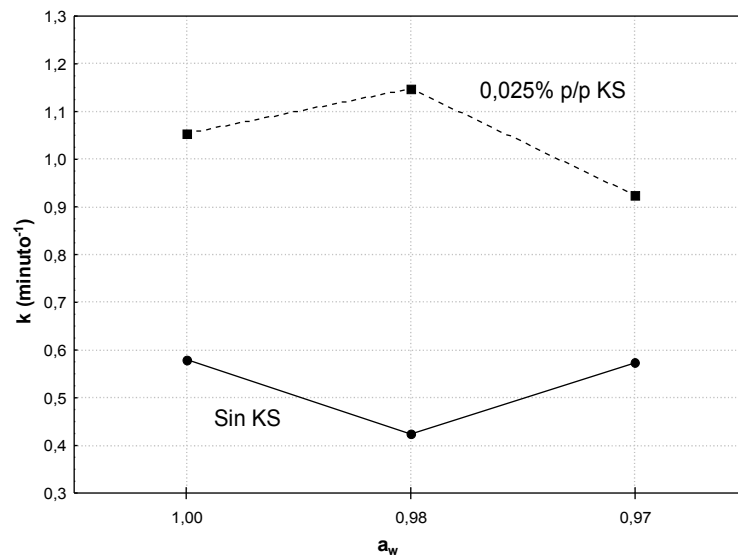


Figura II.36. Constantes de velocidad de inactivación térmica (k) de *Zygosaccharomyces bailii* en los sistemas modelo conteniendo xilitol y/o glucosa en función de la actividad de agua (a_w) y de la presencia de sorbato de potasio (KS), en sistemas conteniendo aspartamo.



II.3.3.6 Conclusiones

La depresión de la actividad acuosa, el humectante empleado, el sorbato de potasio, el aspartamo y la interacción entre dichos factores, influyeron sobre la supervivencia de *Zygosaccharomyces bailii* durante el tratamiento térmico. Acerca de esta influencia, es necesario remarcar los siguientes hechos:

- a) La presencia de 0,025% p/p de sorbato de potasio, en general, incrementó significativamente la velocidad de inactivación térmica en los sistemas estudiados, por lo tanto, es recomendable su empleo para asegurar la estabilidad microbiológica de los mismos, o bien, para disminuir la severidad del tratamiento térmico.
- b) El descenso de la actividad de agua a 0,985 por la adición de un poliol, en ausencia de sorbato de potasio y de aspartamo, no produjo efecto sobre la inactivación térmica, mientras que el uso de 10,00% p/p de glucosa la incrementó.
- c) El descenso de la actividad de agua a 0,971, independientemente de la presencia del preservador, incrementó la velocidad de inactivación térmica de la levadura.
- d) En presencia de sorbato de potasio, el descenso de la actividad de agua, generalmente indujo un incremento en la velocidad de inactivación térmica.
- e) Un drástico descenso de la actividad de agua a 0,900 debido a la adición de glucosa, en ausencia de sorbato de potasio, aumentó significativamente la resistencia térmica de la levadura, en cambio, en presencia del preservador produjo el efecto contrario.
- f) El uso combinado de sorbato de potasio y de la depresión de la actividad de agua por la adición de un poliol o de glucosa produjo un efecto sinérgico sobre la velocidad de inactivación de *Zygosaccharomyces bailii* en ausencia de aspartamo.
- g) Se observaron diversos efectos antagónicos sobre la velocidad de inactivación térmica debido al uso conjunto de: i) sorbato de potasio y 19,58% p/p de xilitol (actividad de agua 0,971); ii) 11,00% p/p de xilitol y aspartamo en ausencia de sorbato de potasio (actividad de agua 0,985) y, iii) sorbato de potasio y la mezcla xilitol / glucosa en presencia de aspartamo (actividad de agua 0,971).
- h) El agregado de aspartamo sólo produjo efectos beneficiosos desde el punto de vista de la disminución de la resistencia térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas de actividad de agua reducida a 0,985 / 0,988, y no produjo cambios en los sistemas de actividad acuosa 0,971.

De acuerdo a las conclusiones anteriores y, teniendo en cuenta que el orden creciente de velocidades de inactivación térmica en sistemas de actividad de agua 0,985 / 0,988 en presencia de sorbato de potasio, el cual fue: manitol (sistema II.D) < glucosa (sistema II.E) = sorbitol (sistema II.B) = xilitol (sistema II.C) < xilitol/aspartamo (sistema II.K) < glucosa/aspartamo (sistema II.L), el sistema que provee un medio más favorable para la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* sería el sistema conteniendo xilitol, aspartamo y sorbato de potasio. Con esta elección se minimizaría el agregado de aditivos.

II.3.4 Corolarios

- a) Un nivel de sorbato de potasio comprendido entre 0,020 y 0,035% p/p, dependiendo de la composición del sistema, fue necesario para la inhibición del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*.
- b) Es importante tener en cuenta la vida útil del sistema a formular debido a que la concentración residual de sorbato de potasio durante el almacenamiento de los sistemas, podría llegar a ser inferior que la mínima concentración inhibitoria del preservador.
- c) El xilitol produjo *per se* un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, ya sea en ausencia como en presencia de aspartamo. Este hecho sugiere que su inclusión como humectante en la formulación de alimentos reducidos en tenor glucídico, tales como jugos y mermeladas, contribuiría a la estabilidad microbiológica del producto permitiendo el empleo de menor contenido de sorbato de potasio.
- d) Desde el punto de vista de optimizar la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*, sería recomendable el empleo de sorbato de potasio como preservador, aspartamo como edulcorante y xilitol en cantidad suficiente para deprimir la actividad de agua a 0,985.

CAPÍTULO III

**INTERACCIONES ENTRE EDULCORANTES E
HIDROCOLOIDES EN SISTEMAS CONTENIENDO
ÁCIDO SÓRBICO:**

**SU EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES
SENSORIALES DE LOS SISTEMAS**

III.1 Introducción

III.1.1 Atributos sensoriales

El proceso de percepción del hombre es complejo y está afectado por diversos factores que actúan simultáneamente, los cuales están relacionados con la composición y la estructura del alimento, con las expectativas y condiciones individuales del hombre y con el ambiente donde tiene lugar el proceso. Debido a estos factores, en el proceso total de la percepción no son fácilmente separables las señales, su integración y su interpretación.

El nivel de agrado que produce un alimento es un proceso subjetivo, sin embargo, puede hacerse también un análisis sensorial analítico, usando introspección y aplicando metodologías reconocidas en condiciones controladas.

Los atributos de un alimento tienden a percibirse en el siguiente orden:

- apariencia,
- olor, aroma,
- viscosidad, consistencia y textura,
- *flavor* (gusto, aroma, pungencia)

De todos modos, en el proceso de la percepción, la mayoría de los atributos se superponen. El sujeto recibe un conjunto de impresiones sensoriales simultáneas y, sin algún tipo de entrenamiento, no podrá realizar una evaluación de cada uno de los atributos en forma independiente (Meilgaard y col., 1987).

Apariencia

La apariencia, es muchas veces, el único atributo en el cual se basa la decisión de comprar o de consumir un producto. Algunas de las características de la apariencia incluyen color, tamaño y forma, textura de la superficie y claridad.

Olor, aroma

El olor de un producto es detectado cuando sus componentes volátiles entran en la cavidad nasal y son percibidos por el sistema olfatorio. Se habla de olor cuando los volátiles se huelen a través de la nariz (voluntariamente o de otra forma). El aroma es el olor de un producto alimenticio que se percibe por vía retronasal al degustarlo.

Viscosidad, consistencia y textura

Este grupo de atributos son los percibidos por sensores bucales distintos a los que perciben el gusto o las sensaciones químicas. La viscosidad se relaciona con los líquidos homogéneos Newtonianos, la consistencia, con los líquidos no Newtonianos o heterogéneos y semisólidos y, la textura, con los sólidos o semisólidos.

La textura está relacionada con el conjunto de propiedades físicas percibidas a través de los ojos, los dedos o en la boca durante la masticación. Durante este proceso, las propiedades físicas de los alimentos cambian. En la primera mordida, un bocado de un alimento se rompe; las siguientes mordidas los rompen aún más en pequeñas piezas hasta que el alimento es tragado. Durante este proceso cambian la forma y el tamaño de los alimentos y se perciben sus características superficiales (Izutsu y Wani, 1985).

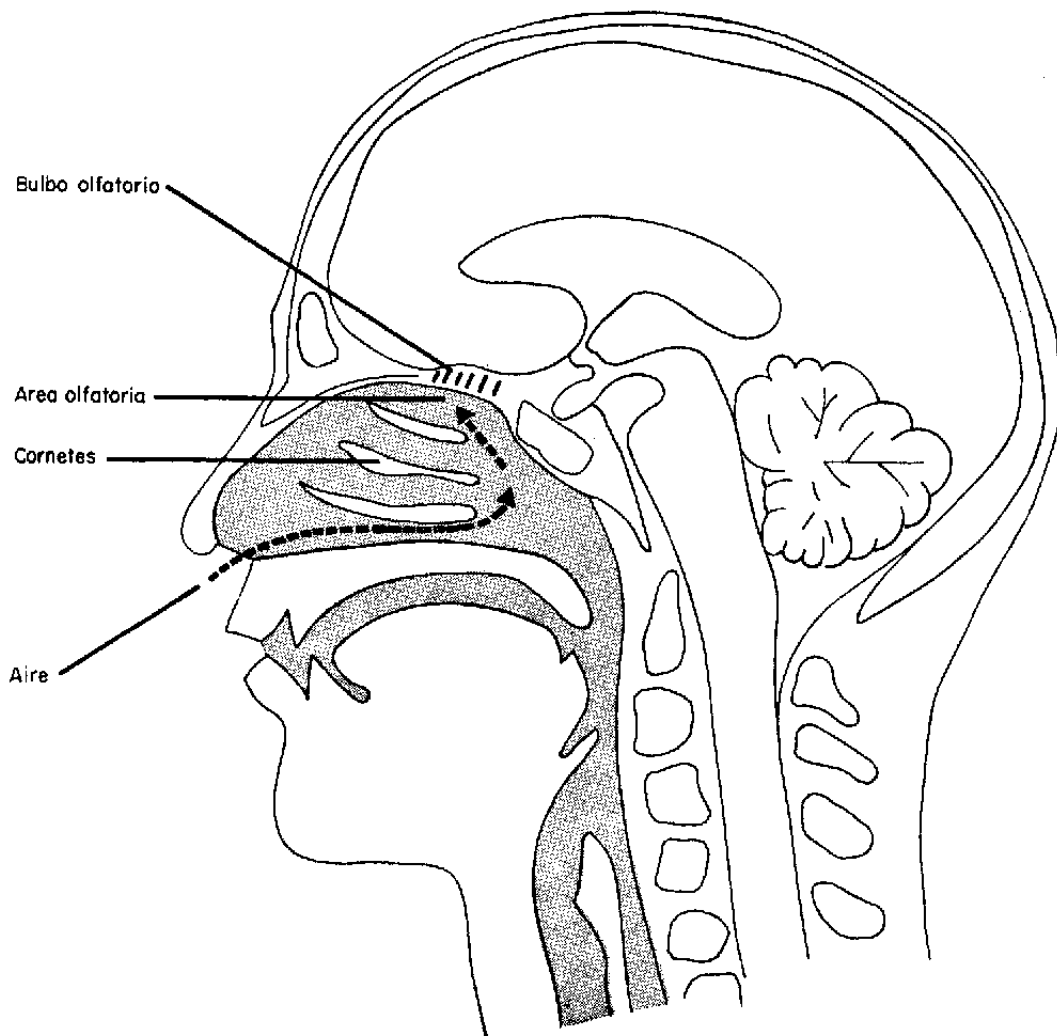
Flavor

Es un atributo de alimentos, bebidas y condimentos que se percibe a través de los sentidos químicos, es decir, por el olfato y el gusto, que participan en el momento de consumir un alimento. El *flavor* es una combinación compleja de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales, percibidas durante la degustación.

Las papilas gustativas localizadas en la lengua y en la parte posterior de la cavidad oral permiten a los humanos sentir las sensaciones gustativas, cuyas propiedades son cualidad, intensidad, temporalidad y diseño espacial. La cualidad se utiliza para categorizar las sensaciones que producen los compuestos sápidos, es decir, dulzor, acidez, salado, amargor y umami; la intensidad es una medida de la magnitud de la sensación producida por dichos compuestos en un determinado tiempo; la temporalidad está relacionada con la duración de la intensidad y, el diseño espacial se refiere a la localización de las sensaciones del gusto en la lengua y en la cavidad oral (Keast y Breslin, 2002).

Las sustancias volátiles que se liberan de un alimento al masticarlo, producen, por vía retronasal, sensaciones olfatorias que se perciben a través de las células del epitelio olfatorio de la cavidad nasal (Figura III.1). Las sensaciones químicas o trigeminales son percibidas por el sentido químico común cuando se estimulan terminaciones nerviosas libres de la mucosa bucal, nasal y faringe (astringencia, frescura, calor, sabor metálico, pungencia). Existen sensaciones indirectas o no químicas, como la luz, la temperatura, el sonido, el tacto y la quinestesia, que influyen en la percepción de los gustos y olores (Lindsay, 1993).

Figura III.1. Área olfatoria (Guirao, 1980).



III.1.2 Percepción de los atributos sensoriales

La percepción se realiza a través de los sistemas sensoriales. Se denomina sistema sensorial a la organización funcional mediante la cual un organismo procesa información del medio ambiente externo e interno y, está constituido básicamente por los órganos receptores y el sistema nervioso central (Calviño, 1995; Guirao, 1980).

En cada sistema sensorial se dan diferentes procesos básicos destinados a asegurar la recepción óptima de la información. Cada sistema opera como un transductor, es decir, un dispositivo que cambia un tipo de energía en otro manteniendo el mismo mensaje. Las estructuras accesorias protegen los órganos receptores y facilitan el enfoque y la localización del estímulo. Los sistemas sensoriales son la piel, el sistema visual, el sistema muscular, el sistema auditivo y los sistemas químicos del olfato y del gusto (Meilgaard y col., 1987).

a) La piel

Es una superficie receptora que responde a una gran variedad de estímulos y origina una enorme gama de sensaciones, entre las que se encuentran la presión, la vibración, la temperatura y el dolor, algunas de las cuales están relacionadas entre sí.

b) El sistema muscular

Los movimientos musculares constituyen la base de la conducta. Los métodos psicofísicos permiten determinar las relaciones de estímulo-respuesta entre la fuerza ejercida por el sistema muscular y la correlación subjetiva de la sensación de peso y de esfuerzo muscular. Junto con otros receptores, los músculos captan la consistencia, el peso y la resistencia de los materiales.

c) El sistema visual

El sistema visual analiza y transforma la energía luminosa iniciando, así, el proceso de la percepción visual. Los atributos de la sensación visual son el color, la luminosidad y la saturación, los cuales se correlacionan con la longitud de onda, la luminancia y la pureza colorimétrica, respectivamente. El sistema visual se relaciona con otros sistemas, como el olfatorio, el gustativo y el táctil.

d) El sistema auditivo

Percibe vibraciones acústicas a través del aire, las cuales tienen dos dimensiones, la amplitud sonora, que es función de la presión del sonido y se mide en decibeles y, la frecuencia, que se mide en Hertz.

e) Los sistemas químicos

El olfato y el gusto se complementan en la percepción del gusto. Ambos sentidos defienden y controlan al organismo, particularmente en relación con la ingestión de sustancias nocivas.

Las sustancias que actúan como estímulo en la producción del gusto y del olfato cumplen requisitos similares de estructura química, concentración, solubilidad (o volatilidad), temperatura, humedad y tiempo de presentación.

La capacidad de oler y gustar es ilimitada. Los olores y sabores se renuevan con los cambios ambientales y, en cualquier momento podemos oler y gustar sustancias nuevas. La sensibilidad química parece estar más orientada a diferenciar cualidades que a discriminar cambios cuantitativos.

La mayor parte de las sustancias olorosas y sápidas dan origen a sensaciones poco persistentes: los receptores se adaptan rápidamente con el tiempo y la concentración de los compuestos químicos. Por ser el olfato un sentido sintético, cuando se mezclan los olores, se fusionan. En cambio, para el gusto, que es un sentido analítico, pueden analizarse los atributos componentes de las mezclas.

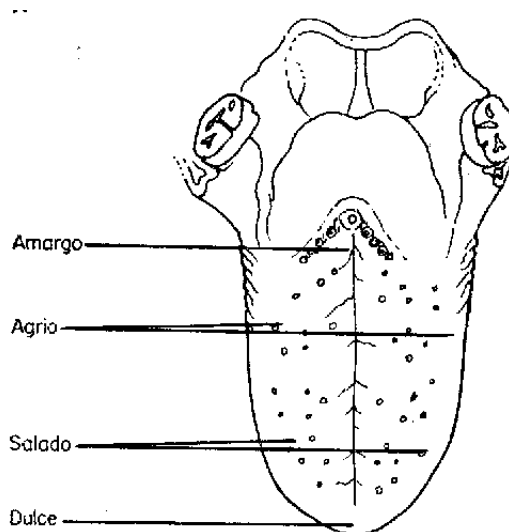
III.1.3 Receptores gustativos

Los receptores gustativos se distribuyen en la lengua y sus papilas (Figura III.2); también se encuentran en el paladar, la faringe, las amígdalas, la epiglotis y, a veces en la mucosa de los labios y mejillas, debajo de la lengua y en el suelo de la boca. El área más investigada es la superficie de la lengua, la punta, los costados y su parte dorsal (Calviño, 1995; Guirao, 1980).

Aunque toda sustancia que se lleva a la boca provoca una respuesta sensorial, esto no quiere decir que sea un estímulo gustativo, ya que para ello, la sustancia debe reunir

varios requisitos. Entre los más estudiados se encuentran la solubilidad, la concentración, la temperatura, la capacidad de ionización y la estructura química (Guirao, 1980). El primer paso en el mecanismo de la percepción del gusto es la solvatación del estímulo. La saliva es un factor esencial para el mecanismo del gusto. Las sustancias sápidas deben ponerse en contacto con la misma, disolverse y, así, aproximarse al sitio receptor (Hutteau y Mathlouthi, 1998). Los estímulos son perturbados, mezclados, dispersados y se unen a los sitios receptores desencadenando el proceso de transducción durante la masticación (Guirao, 1980).

Figura III.2. Distribución de los receptores gustativos en la lengua (Guirao, 1980).



La solvatación de las sustancias sápidas implica su interacción con el agua y los solutos, la cual gobierna el acceso de las mismas a los receptores, su orientación y su actividad en el micro-ambiente receptor (Hutteau y Mathlouthi, 1998; Birch, 1994). Dicha interacción puede ser una dificultad para el análisis de los efectos de las sustancias, ya que, en algunos casos, como ocurre con los agrios, la saliva actúa como solución tampón, reduciendo su efecto. Además, debe tenerse en cuenta que una misma sustancia puede cambiar de cualidad cuando cambia de concentración, por ejemplo, la sacarina es dulce en bajas concentraciones, y presenta notas amargas y metálicas al aumentar la concentración (Lugaz y col., 2005; Guirao, 1980).

Situaciones como la creciente demanda de los consumidores por el empleo de edulcorantes alternativos en lugar del azúcar, o la tendencia mundial a la reducción del contenido de sodio en las dietas, ha incrementado, no sólo el estudio de las sustancias

responsables del gusto, sino de sus mecanismos de acción, mediante el examen estructural de las sustancias y los sitios receptores.

III.1.3.1 Teoría de la estructura responsable del gusto dulce

Antes de desarrollarse las teorías modernas sobre la estructura causante del gusto dulce, se la relacionaba con los grupos hidroxilo debido a la estructura química de la molécula de azúcar. Sin embargo, existían compuestos, no relacionados con dichas estructuras, que poseían gusto dulce.

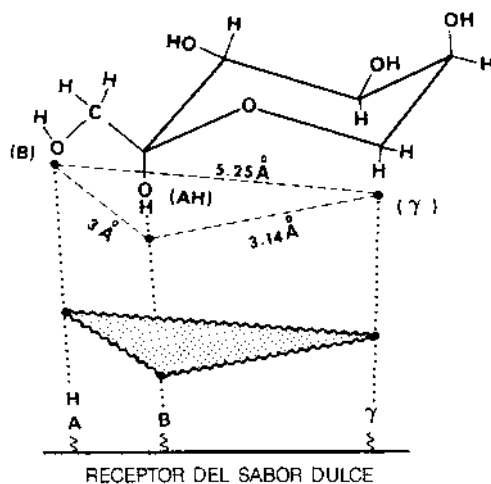
Se cree que para que una molécula sea percibida como dulce la misma debe poseer las siguientes características (Hutteau y Mathlouthi, 1998; Lindsay, 1993; Mathlouthi y Seuvre, 1988):

- la combinación de un hidrógeno covalente y un orbital electronegativo distanciados a unos 3 Å entre sí, comúnmente denominada relación AH / B;
- estereoquímica adecuada de los componentes AH / B de tal modo que permita la alineación con el receptor, y
- la existencia de regiones hidrofóbicas de las moléculas dulces, denominadas γ , con estereoquímica apropiada tal que sea atraída por similares regiones hidrofóbicas en el receptor gustativo. Esta característica sería de suma importancia en sustancias intensamente dulces.

El átomo electronegativo debe tener capacidad para formar puente hidrógeno, ya que se considera que la interacción entre los grupos activos de la molécula y los receptores del gusto dulce ocurre mediante puente hidrógeno. Por lo tanto, son importantes los átomos de oxígeno, nitrógeno y cloro. Las zonas γ pueden ser grupos metileno, metilo o fenilo.

De esta manera, una molécula intensamente dulce se ubicaría de tal modo sobre el receptor dando lugar a un contacto triangular cuyos vértices corresponderían a las unidades activas AH, B y γ (Figura III.3).

Figura III.3. Esquema del contacto de una molécula de la β -D-fructopiranososa y el sitio receptor del gusto dulce (Lindsay, 1993).



La existencia del sitio γ en aldohexosas (α y β -D-manopiranososa, β -D-glucopiranososa y β -D-galactopiranososa) fue discutida por Howard y Grigera (1996) postulando la posible participación de un sitio, denominado XH, que explicaría las diferencias sensoriales de las mismas, en particular, el gusto amargo de la β -D-manopiranososa. El mencionado sitio correspondería a un grupo donante de protones, localizado a igual distancia de los sitios AH y B, de baja afinidad (probablemente un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo de un monosacárido), cuya acción no juega un rol destacado en la percepción del dulzor.

La naturaleza de los solutos y su interacción con el agua es crucial en la determinación del número de moléculas sápidas que estarán libres para unirse a los receptores, así como de la profundidad máxima del epitelio lingual al que las mismas puedan acceder, es decir, del número de receptores disponibles. Esta teoría puede utilizarse para explicar la variación en la máxima intensidad de dulzor que presentan los diferentes edulcorantes (Parke y Birch, 1999).

La interacción entre las moléculas de agua con las moléculas dulces produce la hidratación de los solutos. Existen diferencias en la hidratación entre edulcorantes intensos y no intensos. El tamaño, la forma y la estereoquímica de los solutos afectan su ubicación dentro de la estructura del agua y, por lo tanto, puede afectarse el transporte y la orientación en el sitio receptor (Parke y Birch, 1999; Vallejo y col., 1996; Birch y Shamil, 1988;

Mathlouthi y Seuvre, 1988). En el caso de azúcares, la hidratación es elevada debido a la presencia de múltiples grupos hidroxilo, dependiendo de las disposiciones axial o ecuatorial de la molécula, siendo el centro anomérico el más hidrofóbico y, por lo tanto, el menos hidratado. El agua polariza moléculas estructuralmente similares de manera semejante, orientándolas de forma parecida en el sitio receptor (Birch y col., 1996; Birch y Shamil, 1988).

El rol de la movilidad de las moléculas de agua alrededor de las de edulcorante parece ser un factor esencial en el incremento del dulzor. La alta movilidad del agua alrededor de las moléculas de D-fructosa explicaría el dulzor relativamente más alto que posee con respecto a otros azúcares, ya que produce la ruptura del equilibrio isoentrópico entre la saliva y la sangre a ambos lados de la membrana receptora, provocando una transferencia de Na^+ / K^+ más activa y, por lo tanto, un gusto dulce más intenso (Mathlouthi y Seuvre, 1988).

Existen numerosos estudios acerca de la capacidad de hidratación de diferentes solutos mediante la aplicación de modelos de simulación. Astley y col. (1996) pudieron diferenciar la distribución de las moléculas de agua alrededor de los átomos de hidrógeno de α -D-manopiranososa y β -D-manopiranososa y, la correlacionaron con las diferencias en los gustos dulce y amargo de las mismas a pesar de poseer estructuras similares. El xilitol en solución acuosa se encuentra fuertemente hidratado, adoptando una conformación lineal simple y, desde el punto de vista de la dinámica de hidratación, se lo clasificaría como positivamente hidratado (Carlevaro y col., 1998). Además, según Yurquina y col. (1995), estaría asociado a un promedio de diez moléculas de agua. El manitol, en solución acuosa, se encontraría ligado vía enlace puente hidrógeno a trece moléculas de agua (Vallejo y col., 1996) y adoptaría una configuración plana tipo zig-zag, mientras que la configuración del sorbitol sería curva (Grigera, 1988).

El análisis de las propiedades físico químicas de los solutos en solución acuosa y su relación con las propiedades sensoriales ha sido objeto de numerosos estudios (Hutteau y Mathlouthi, 1998; Hutteau y col., 1998; Birch y col., 1996; Birch, 1994; Birch y Shamil, 1988; Mathlouthi y Seuvre, 1988). Con relación a las propiedades analizadas, se determinó que el volumen específico aparente de una molécula sávida es un factor determinante para el análisis de la percepción del gusto dulce, ya que permite comparar moléculas de diferente peso molecular en términos de su compatibilidad hidrostática con la estructura del agua, considerándose como una medida del volumen efectivo de los solutos dulces en la vecindad

del sitio receptor. El volumen específico óptimo para el gusto dulce se encuentra en el rango 0,51-0,71 cm³ g⁻¹; los azúcares se sitúan en el centro de dicho rango explicando, así, su gusto dulce puro (0,60 y 0,62 cm³ g⁻¹) (Birch y col., 1996; Birch, 1994).

Otro factor a tener en cuenta en el análisis de la percepción del gusto dulce es que la saliva, además de agua, contiene sales y proteínas. Las sales pueden modificar el tipo de hidratación de los edulcorantes y, así, la organización de las moléculas de agua en soluciones acuosas de edulcorantes, influyendo en el acceso del estímulo al sitio receptor y, en la percepción del gusto dulce (Hutteau y Mathlouthi, 1998; Mathlouthi y col., 1996; Morel y col., 1988).

Los edulcorantes intensos o artificiales son más lipofílicos que las moléculas de azúcar. Esa propiedad, probablemente les provea un modo de unión más fuerte al sitio receptor pero altere las propiedades de la solución haciendo que el gusto dulce se contamine con otras notas, principalmente amargas (Parke y Birch, 1999; Hutteau y Mathlouthi, 1998; Birch, 1994). El volumen específico de los edulcorantes intensos es amplio, el mismo está comprendido entre 0,53-0,74 cm³ g⁻¹ explicando el dejo amargo que poseen (Birch y col., 1996).

En particular, se encuentra reportado para la sacarina de sodio, que la superficie iónica de las proteínas de la membrana celular del gusto puede causar la localización de dicho edulcorante en el ambiente del sitio receptor, produciendo un estímulo muy diferente al producido por los azúcares. Este hecho remarca la importancia del pKa del edulcorante, de la actividad de agua y del pH del micro-ambiente que rodea al sitio receptor en la percepción del gusto dulce, ya que cambios en dichos parámetros podrían ser responsables de los gustos amargo y metálico, frecuentemente mencionados para soluciones de sacarina. Las sustancias que presentan este comportamiento se denominan multisapofóricas. La D-glucono-1,5-lactona es un ejemplo (Birch y col., 1996).

Las interacciones soluto – solvente junto con el conocimiento de la estructura de los solutos parecen ayudar a explicar las diferencias en el gusto dulce de los mismos.

III.1.3.2 El gusto ácido

La percepción de los compuestos ácidos se produce por acción de iones. Los que desempeñarían el papel más importante en la producción del gusto ácido son los cationes resultantes de la disociación de los ácidos, es decir, los protones, ya que diferentes ácidos

inorgánicos, en igualdad de concentraciones, tienen el mismo gusto. En cambio, los ácidos orgánicos poco concentrados, como el ácido acético, el tartárico y el cítrico, tienen gustos diferenciados, alejándose del ácido y acercándose al astringente. Las estructuras moleculares complejas de los ácidos orgánicos y el gusto que provocan, es probablemente, el resultado de una mezcla del anión y del protón (Guirao, 1980).

Se estima que los receptores implicados en la percepción del gusto ácido son receptores del tipo AH / B. Sin embargo, no hay información suficiente para determinar si los protones, los aniones inorgánicos u orgánicos, o las especies moleculares no disociadas influyen en la respuesta ácida. Otras características moleculares de una sustancia además de la acidez, parecen tener importancia primaria en la sensación ácida, por ejemplo, el peso, el tamaño y la polaridad global (Lindsay, 1993).

Información reciente (Lugaz y col., 2005) permite comprobar que la acidez disminuye al aumentar el pH, pero que esto no es suficiente para explicar la intensidad de las soluciones ácidas, ya que depende tanto de los protones como de las moléculas no disociadas. Para los ácidos orgánicos, la acidez bucal disminuye al aumentar el número de grupos carboxilo.

III.1.4 Influencia de la interacción entre sustancias sápidas sobre la percepción del gusto

En la evaluación de las interacciones entre diferentes componentes sápidos, deben distinguirse dos tipos de mezclas, las homogéneas y las heterogéneas. En el primer tipo de mezcla, todos los componentes dan una similar cualidad de gusto y, cuando es degustada, conduce a la formación de una percepción homogénea. En cambio, cuando se mezclan sustancias con gustos diferentes aparece la percepción heterogénea, en la cual, varios atributos del gusto pueden ser identificados y separarse la intensidad total del gusto en las cualidades de sus componentes (Schifferstein, 1995).

Deben distinguirse dos tipos de mezclas, la mezcla previamente preparada o la mezcla que se realiza en la lengua debido a la presentación sucesiva de las sustancias componentes durante el proceso de masticación de un alimento (Guirao, 1980). Cuando se mezclan sustancias sápidas, puede incrementarse, suprimirse o neutralizarse la percepción, enmascararse o desenmascararse un gusto no percibido inicialmente. La interacción entre las sustancias puede darse en tres niveles: interacciones químicas en solución, que pueden

afectar directamente la percepción; interacciones secundarias entre uno de los componentes de la mezcla y los receptores del gusto o el mecanismo de transducción del otro componente y, efectos cognitivos de diferentes cualidades del gusto percibidas juntas en la cavidad oral (Keast y Breslin, 2002; Hutteau y col., 1998).

Es muy común en la literatura psicofísica evaluar interacciones en mezclas de edulcorantes (Schiffman y col., 2003; Hutteau y col., 1998; Schiffman y col., 1995; Frank y col., 1989) y buscar combinaciones óptimas de potencia del dulzor (Calviño y col., 2000).

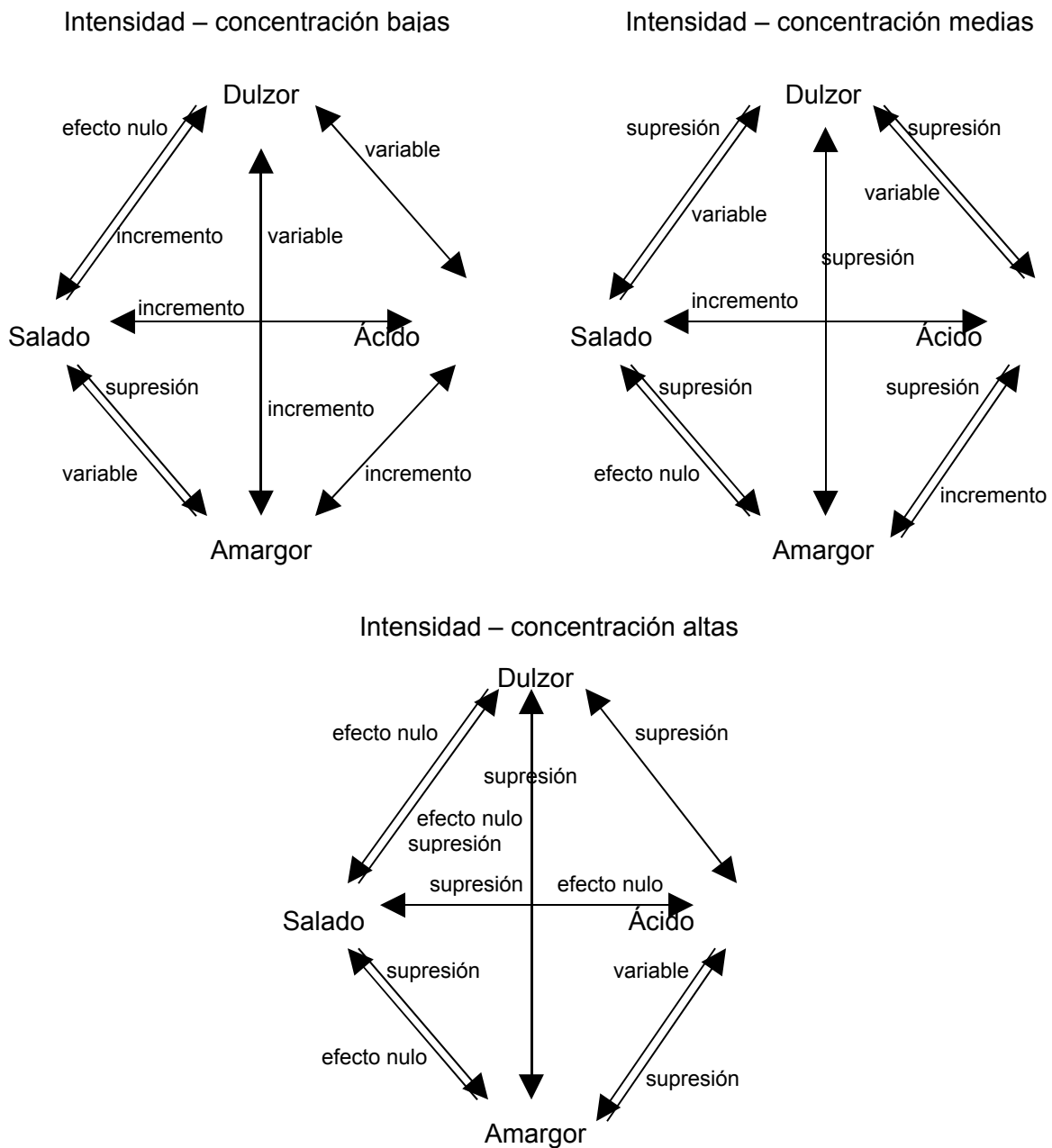
Las mezclas de edulcorantes intensos tienden, en general, a incrementar la intensidad del dulzor. Van Tornout y col. (1985) observaron que el dulzor de mezclas binarias de fructosa con los edulcorantes aspartamo, acesulfame K o sacarina, respectivamente, representaba la adición de los dulzores de cada uno de los aditivos por separado. Mezclas de aspartamo y acesulfame K presentan sinergismo en un amplio rango de concentraciones, mientras que aspartamo y sacarina sólo lo hacen a bajas concentraciones (Keast y Breslin, 2002). También se observó sinergismo en mezclas de sacarosa o maltitol con ciclamato de sodio, y de maltitol con acesulfame K, mientras que se observó un efecto aditivo entre sacarosa y alitame o acesulfame K. Sin embargo, la combinación de aspartamo con sacarosa o con maltitol produce un efecto supresor del dulzor (Hutteau y col., 1998).

Usualmente, la intensidad de dulzor de mezclas de edulcorantes depende de varias variables, tales como el tipo de edulcorante, su concentración, el pH, la temperatura y la presencia de otros componentes con gusto (King y col., 2000; Montijano y col., 1998;). Hutteau y col. (1998), postularon que ocurre sinergismo cuando se mezclan componentes con tipos de hidratación similares, fenómeno que estaría acompañado por el incremento en la movilidad de las moléculas de agua en la proximidad del edulcorante. De manera inversa, la aditividad o la supresión del dulzor ocurrirán cuando los constituyentes de la mezcla poseen diferente naturaleza de hidratación y, por lo tanto, provocarían la reducción de la movilidad de las moléculas de agua alrededor del edulcorante.

En general, cuando se mezclan dos sustancias sápidas diferentes, el efecto de las interacciones entre las mismas depende de la relación intensidad / concentración del estímulo. En la Figura III.4 se muestra un esquema general de las interacciones de mezclas binarias (Keast y Breslin, 2002). Por ejemplo, se observa que a relaciones medias y altas intensidad / concentración, el gusto dulce reduce al amargo. Burns y Noble (1985)

observaron un descenso del amargor de vermouth con el incremento del nivel de sacarosa. Rogé y col. (2005), determinaron la existencia de interacciones entre sacarosa y cafeína en solución acuosa. Sin embargo, el gusto dulce casi no tiene efecto sobre el gusto salado. A bajas relaciones intensidad / concentración, se observa un efecto variable de la mezcla binaria de compuestos dulces con otras cualidades, mientras que cuando las relaciones intensidad / concentración son medias o altas, generalmente el dulzor es suprimido por los otros gustos básicos, en particular, el dulzor y la acidez son mutuamente suprimidos a altas intensidades.

Figura III.4. Esquema de las interacciones de mezclas binarias (Keast y Breslin, 2002).



En algunos casos, el gusto de una sustancia se modifica mucho por acción de otra degustada inmediatamente antes. Por ejemplo, después de ingerir alcauciles, el agua tiene gusto dulce; cuando se presenta en forma sucesiva un gusto dulce después de uno amargo, el dulce se acentúa (Guirao, 1980).

Basándose en las características expuestas se concluye que los compuestos del gusto interactúan haciéndolo de una manera, aparentemente, muy compleja, dificultando la interpretación del comportamiento sensorial de mezclas.

III.1.5 Efecto de la matriz del sistema en la percepción del dulzor y de la acidez

En la mayoría de los alimentos los estímulos gustativos son influenciados por la estructura de los mismos. La generación del *flavor* y su percepción son procesos complejos en los cuales diferentes fenómenos psico-químicos y fisiológicos pueden estar involucrados.

Se señaló que la percepción de los distintos atributos del gusto, como dulzor, acidez, amargor, salinidad, básicamente depende de la naturaleza del estímulo, su concentración en los sitios receptores y las características fisiológicas particulares de los receptores.

El proceso de percepción también está gobernado por interacciones químicas y/o físicas entre los componentes del gusto y las características de la matriz del alimento. Por lo tanto, es importante resaltar que las propiedades texturales de los alimentos sólidos y la viscosidad de los alimentos líquidos influyen en la percepción de los estímulos (Izutsu y Wani, 1985).

Tanto los consumidores como los fabricantes de alimentos saben que cuanto más duro es un alimento sólido o más viscoso un alimento líquido, menos *flavor* se percibe durante la masticación. Este comportamiento puede atribuirse al retraso o a la inhibición parcial del transporte de los compuestos responsables del dulzor dentro de la matriz del alimento y desde la misma hacia los receptores del gusto en la boca. Una parte de este proceso puede estar gobernada por la velocidad de difusión del estímulo dentro del alimento y otra parte, por la liberación de los compuestos dulces desde la matriz hacia la saliva de la boca (Bayarri y col., 2003).

Kokini y col. (1982) mostraron que el incremento de la viscosidad de soluciones de sacarosa produjo un descenso de las constantes de difusión de la misma y, por lo tanto, un descenso de la intensidad del gusto dulce.

En general, un incremento de la viscosidad de soluciones debido al agregado de diferentes hidrocoloides conduce a un descenso del dulzor (Pastor y col., 1994), aunque algunos autores reportaron efectos opuestos (Pastor y col., 1996). Estos autores también observaron que el efecto del tipo y de la concentración del espesante sobre el dulzor depende, también, del tipo y concentración del edulcorante usado. En particular, se efectuaron estudios para determinar si la presencia de diferentes hidrocoloides afecta el dulzor del aspartamo y observaron que algunos hidrocoloides no afectaban su dulzor, mientras que otros lo incrementaban o lo disminuían (Crosby, 1976; Cloninger y Baldwin, 1974).

Acerca de la dualidad de conclusiones de los efectos de la viscosidad sobre la percepción de la intensidad del gusto en general, Izutsu y Wani (1985) sugieren que existen muchos problemas experimentales involucrados en los estudios de interacciones textura-gusto, entre los cuales pueden citarse:

- cambios accidentales de la viscosidad de la solución por adición de sustancias con gusto;
- cambios accidentales del volumen de las muestras, los cuales producen cambios en la viscosidad de la solución;
- mediciones de viscosidad a temperaturas lejanas a la de la boca (37 °C);
- presencia de *flavors* indeseables originados por las gomas;
- diferencias en las técnicas sensoriales utilizadas y,
- presencia de interacciones físico-químicas entre las gomas y los estímulos del gusto.

Wafwoyo y col. (1999) observaron, mediante el empleo de microscopía electrónica de barrido, la existencia de interacciones entre el aspartamo y diferentes hidrocoloides, entre los cuales pueden citarse pectina, goma xántica y carboximetilcelulosa. Esta interacción entre el aspartamo y los hidrocoloides permite mejorar la solubilidad del edulcorante en la matriz del sistema, en un grado que depende de la naturaleza del hidrocoloide empleado.

En lo que respecta a los alimentos sólidos o geles, la influencia de la textura sobre la percepción del dulzor, está menos estudiada que en el caso de alimentos líquidos. Las grandes diferencias en la composición, la estructura y el comportamiento reológico entre la diversidad de matrices de los alimentos y las variaciones, ya conocidas, de los procesos de masticación entre los individuos, dificultan la interpretación de las diferencias percibidas en el dulzor (Wilson y Brown, 1997).

Solutos de bajo peso molecular pueden difundir fuera de la red de un gel de hidrocoloides conteniendo, aproximadamente un 99% de agua. Bayarri y col. (2001) compararon las constantes de difusión de sacarosa y aspartamo en geles de goma gellan y de κ -carragenano, con similares resistencias a la compresión, y encontraron que ambos edulcorantes tuvieron mayor difusión en geles blandos que en duros de κ -carragenano. Además, Bayarri y col. (2003) observaron que un incremento en la concentración del hidrocoloide produjo un descenso del dulzor del aspartamo y de la sacarosa. Dicho efecto resultó independiente del tipo de hidrocoloide (goma gellan o κ -carragenano). Este último comportamiento también fue observado por otros autores en sistemas gelificados, ya sean alimentos o sistemas modelo (Wilson y Brown, 1997).

Desde el punto de vista reológico, es generalmente aceptado que, en un gel formado por un hidrocoloide en particular, el grado de supresión del gusto dependa de la dureza, sin embargo, cuando se comparan sistemas gelificados con distintos hidrocoloides, esta dependencia no es tan clara. Costell y col. (2000) observaron que existen diferencias en la percepción del dulzor entre diferentes geles de hidrocoloides (goma gellan o κ -carragenano) con durezas similares. Algunos autores han concluido que la respuesta sensorial también depende de la naturaleza del agente gelificante o de algunas características estructurales como la deformación en el punto de fractura (Chai y col., 1991). Otras características del gel, como la elasticidad, la cohesividad o el punto de fusión, también pueden jugar un rol importante en la percepción del gusto dulce (Bayarri y col., 2003).

Es importante tener en cuenta la influencia simultánea de la concentración del edulcorante y del hidrocoloide sobre la percepción del dulzor. Moritaka y Naito (2002), al analizar jaleas de diferente dureza, observaron que variaciones en las concentraciones de edulcorantes provocan mayores diferencias en la percepción del dulzor en el caso de jaleas blandas. Además, este efecto puede depender del tipo de edulcorante empleado (Mälkki y col., 1993).

III.1.6 Objetivos

Sobre la base de los comentarios anteriormente expuestos el presente capítulo tuvo por objetivos evaluar:

- el efecto del aspartamo, de la glucosa, del xilitol y del las mezclas de los mismos sobre las propiedades sensoriales de sistemas acuosos y,
- la influencia de goma gellan y de pectina de bajo metoxilo sobre el dulzor de sistemas conteniendo glucosa, xilitol, aspartamo, tendientes a modelar mermeladas o jaleas de reducido tenor glucídico.

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Formulación de los sistemas

Los resultados obtenidos en los Capítulos I y II acerca de las estabilidades químicas y microbiológicas de los sistemas permitieron realizar una selección de los mismos a fin de analizar las propiedades sensoriales sólo para algunos sistemas de interés (secciones I.3.2.5, I.3.3.3, I.3.4.4 y II.3.2.7 y II.3.3.6).

Como resultado de dicha selección, se eligieron los aditivos glucosa, xilitol, aspartamo y sorbato de potasio, y se formularon sistemas conteniendo los mismos en forma separada o en diferentes combinaciones. Un ensayo preliminar permitió establecer que un nivel de 0,500% p/p de aspartamo producía una intensidad de dulzor muy elevada y, por lo tanto, además de ensayar dicha concentración, también se estudiaron las propiedades sensoriales en sistemas conteniendo una concentración diez veces menor de aspartamo, es decir, 0,050% p/p.

Además, teniendo en cuenta que la formulación de los sistemas tuvo por objetivo el modelado de alimentos de tenor glucídico reducido, tales como jaleas o mermeladas, a dichos sistemas, se les adicionaron, por separado, dos agentes gelificantes, los cuales fueron goma gellan y pectina de bajo metoxilo. Con esto último se intentó suplir la pérdida de textura debida a la reducción parcial de la glucosa y aproximarse a la consistencia de mermeladas o jaleas comerciales.

III.2.1.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica, con excepción de los reactivos de la marca Gelfix y Degussa, que fueron de grado alimenticio. Los mismos se detallan a continuación:

- Sorbato de potasio (Sigma)
- Ácido cítrico anhidro (Anedra)
- Glucosa (Anedra)
- Aspartamo (Gelfix)

- Xilitol (Gelfix)
- Cloruro de calcio dihidratado (Anedra)
- Goma gellan (desacetilada) (Kelcogel)
- Pectina de bajo metoxilo (17-20% de amidación, 26-31% de esterificación) (Degussa)

III.2.1.2 Composición de los sistemas

Los sistemas formulados se dividen dos grupos:

- sistemas libres de hidrocoloides, y
- sistemas conteniendo hidrocoloides.

a. Sistemas libres de hidrocoloides

La composición de los diferentes sistemas se encuentra en la Tabla III.1. Todos los sistemas contienen 0,130% p/p de sorbato de potasio.

Para la formulación de los sistemas se tuvieron en cuenta las consideraciones realizadas en la sección I.2.1.2 en lo que respecta a las concentraciones del preservador, de glucosa, de xilitol y de aspartamo empleadas.

El sistema libre de humectantes y de edulcorantes (sistema III.A) sirvió como control de acidez y del efecto del agregado de los distintos edulcorantes sobre las propiedades sensoriales de los sistemas.

b. Sistemas conteniendo hidrocoloides

La composición de los diferentes sistemas se encuentra en la Tabla III.2. Todos los sistemas contienen 0,130% p/p de sorbato de potasio y 0,075% p/p de cloruro de calcio dihidratado. La presencia de cloruro de calcio fue necesaria para lograr la gelificación de los sistemas y, el nivel empleado, permitió obtener geles con consistencia parecida a una jalea o mermelada comercial.

Tabla III.1. Composición de los sistemas modelo acuosos libres de hidrocoloides (% p/p).

Sistemas	Composición (% p/p)		
	Aspartamo	Xilitol	Glucosa
III.A	-	-	-
III.B	0,050	-	-
III.C	0,500	-	-
III.D	-	11,00	-
III.E	0,050	11,00	-
III.F	0,500	11,00	-
III.G	-	-	10,00
III.H	0,050	-	10,00
III.I	0,500	-	10,00
III.J	-	11,00	10,00
III.K	0,050	11,00	10,00
III.L	0,500	11,00	10,00

La formulación de los sistemas se realizó teniendo en cuenta las especificaciones realizadas en la sección I.2.1.2 con relación a las concentraciones del preservador, de glucosa, de xilitol y de aspartamo utilizadas.

La pectina de bajo metoxilo es uno de los gelificantes que comúnmente se emplea en jaleas, mermeladas y jugos. Por otra parte, se empleó goma gellan como hidrocoloide alternativo. El contenido de ambos espesantes se estableció teniendo en cuenta los niveles empleados en productos comerciales.

Tabla III.2. Composición de los sistemas modelo acuosos conteniendo hidrocoloides (% p/p).

Composición (% p/p)					
Sistemas	Glucosa	Xilitol	Aspartamo	Goma gellan	Pectina de bajo metoxilo
III.M	10,00	-	-	-	-
III.N	10,00	-	-	0,150	-
III.Ñ	10,00	-	-	-	1,000
III.O	22,00	-	-	-	-
III.P	22,00	-	-	0,150	-
III.Q	22,00	-	-	-	1,000
III.R	10,00	11,00	-	-	-
III.S	10,00	11,00	-	0,150	-
III.T	10,00	11,00	-	-	1,000
III.U	10,00	11,00	0,050	-	-
III.V	10,00	11,00	0,050	0,150	-
III.W	10,00	11,00	0,050	-	1,000
III.X	10,00	11,00	0,500	-	-
III.Y	10,00	11,00	0,500	0,150	-
III.Z	10,00	11,00	0,500	-	1,000

III.2.2 Metodología para la elaboración de los sistemas

III.2.2.1 Sistemas libres de hidrocoloides

Los sistemas libres de hidrocoloides (sistemas III.A a III.L, III.M, III.O, III.R, III.U y III.X) se prepararon de acuerdo a las composiciones detalladas en la Tablas III.1 y III.2, respectivamente. En todos los casos el pH fue ajustado a 3,00 por el agregado de gotas de una solución de ácido cítrico 50,00% p/p. Una vez preparados los sistemas, se dispensaron alícuotas de 5 ml de cada uno en medidas posológicas descartables de 15 ml.

III.2.2.2 Sistemas conteniendo hidrocoloideos

La metodología de la fabricación de los sistemas conteniendo hidrocoloideos dependió del tipo de hidrocoloide empleado y de la presencia de aspartamo.

a) Sistemas conteniendo goma gellan en ausencia de aspartamo:

Cada uno de los sistemas que contiene goma gellan en ausencia de aspartamo (sistemas III.N, III.P y III.S) se preparó según la siguiente metodología:

Se partió de una solución acuosa mantenida en agitación, conteniendo sorbato de potasio. Sobre la misma, se dispersó una mezcla compuesta por la goma gellan y parte del contenido total de glucosa del sistema. Una vez disuelto el hidrocoloide, se colocó el resto de la glucosa y el xilitol, en el caso de los sistemas que lo contienen. Luego, se calentó durante un período de 10 minutos hasta llegar a una temperatura de 90°C. En ese instante se adicionó cloruro de calcio y se ajustó el pH a 3,00 mediante el agregado de gotas de una solución de ácido cítrico 50,00% p/p. Por último se detuvo la agitación y se dispensaron alícuotas de 5 ml de cada sistema en medidas posológicas descartables de 15 ml, las cuales se enfriaron a 25°C para favorecer la gelificación.

b. Sistemas conteniendo goma gellan y aspartamo:

Cada uno de los sistemas que contiene goma gellan y aspartamo (sistemas III.V y III.Y) se preparó según la siguiente metodología:

Se llevó a cabo un procedimiento similar al realizado en la elaboración de los sistemas conteniendo goma gellan en ausencia de aspartamo hasta que el sistema alcanzó los 90°C. Luego se dejó enfriar hasta, aproximadamente, 50°C y, se adicionó el aspartamo disuelto en una solución de pH ajustado mediante el agregado de gotas de una solución de ácido cítrico 50,00% p/p. Posteriormente se adicionó al sistema cloruro de calcio y se ajustó el pH a 3,00 mediante el agregado de ácido cítrico 50,00% p/p. Por último se detuvo la agitación y se colocaron alícuotas de 5 ml de cada sistema en medidas posológicas descartables de 15 ml, las cuales se enfriaron a 25°C para dar lugar a la gelificación.

c. Sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo en ausencia de aspartamo:

Cada uno de los sistemas que contiene pectina de bajo metoxilo en ausencia de aspartamo (sistemas III.Ñ, III.Q y III.T) se preparó según la siguiente metodología:

Se partió de una solución acuosa en agitación, conteniendo sorbato de potasio. Luego, se calentó hasta 80°C, temperatura a la cual se dispersó una mezcla compuesta por la pectina y parte del contenido total de glucosa del sistema. Una vez disuelto el hidrocoloide, se colocó el resto de la glucosa y el xilitol, en el caso de los sistemas que lo contienen. Luego, se calentó hasta llegar a ebullición y se mantuvo en esas condiciones durante un período de 2 minutos. A continuación, se dejó enfriar hasta, aproximadamente, 80°C, se adicionó cloruro de calcio y se ajustó el pH a 3,00 mediante el agregado de gotas de una solución de ácido cítrico 50,00% p/p. Por último se detuvo la agitación y se colocaron alícuotas de 5 ml de cada sistema en medidas posológicas descartables de 15 ml, las cuales se enfriaron a 25°C para obtener la gelificación.

d. Sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo y aspartamo:

Cada uno de los sistemas que contiene pectina de bajo metoxilo y aspartamo (sistemas III.W y III.Z) se preparó según la siguiente metodología:

Se llevó a cabo un procedimiento similar al realizado en los sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo en ausencia de aspartamo hasta que el sistema alcanzó la ebullición. Luego, se dejó enfriar hasta, aproximadamente, 50°C, y se adicionó el aspartamo disuelto en una solución de pH ajustado a 3,00 mediante el agregado de gotas de una solución de ácido cítrico 50,00% p/p. Posteriormente se adicionó cloruro de calcio al sistema y se ajustó el pH a 3,00 mediante el agregado de ácido cítrico 50,00% p/p. Por último se detuvo la agitación y se colocaron alícuotas de 5 ml de cada sistema en medidas posológicas descartables de 15 ml, las cuales se enfriaron a 25°C para obtener la gelificación.

En todos los sistemas analizados las determinaciones de pH y de actividad de agua se realizaron según se indicó en la sección I.2.1.3

III.2.3 Evaluación de las propiedades sensoriales de los sistemas libres de hidrocoloides

III.2.3.1 Evaluadores

En el análisis sensorial de las muestras participaron estudiantes y personas pertenecientes al grupo de investigación. Sólo cuatro integrantes habían tenido experiencia previa en experimentos psicofísicos de gusto.

Para el análisis sensorial de los sistemas se utilizó el método de estimación de la magnitud. Al aplicar esta técnica de cuantificación psicofísica, los evaluadores asignan valores numéricos, que deben ajustarse a un principio de proporción, a la magnitud estimada de una propiedad sensorial. Esta técnica fue ampliamente utilizada por diversos autores para la determinación de propiedades sensoriales (Hill y col., 1995; Wiet y Beyts, 1992; Moskowitz,

1981; Christensen, 1980; Arabie y Moskowitz, 1971; Moskowitz y Arabie, 1970). Es una herramienta útil y altamente exigente para la evaluación de intensidades de gusto ya que provee abundante información empírica sobre modificaciones del gusto de mezclas y es un mecanismo de cuantificación que permite generar cuestionamientos, experimentos e ideas nuevas (Moskowitz, 1981).
 Entrenamiento en estimación de la magnitud: consiste en asignar números equivalentes a la magnitud

a) dedos

Para el empleo del método de estimación de la magnitud, previo a la evaluación gustativa de las muestras, se instruyó a los evaluadores en el uso del mismo. Se planteó un ejercicio consistente en la estimación de áreas de 18 figuras geométricas, que incluyen seis círculos, seis triángulos equiláteros y seis cuadrados, con tamaños variables entre 2 y 200 cm², siguiendo el procedimiento indicado en la Figura III.5. Se muestra un modelo de planilla de instrucción en la que se asigna un valor a cada una de las figuras.

b) áreas

siguiendo el procedimiento indicado en la Figura III.5. Se muestra un modelo de planilla de instrucción en la que se asigna un valor a cada una de las figuras.

c) Asigne números de acuerdo al área percibida, independientemente de la forma de la figura geométrica

Código	Estimación	Código	Estimación	Código	Estimación

Figura III.5. Modelo de planilla para la instrucción en el método de estimación de la magnitud.

III.2.3.2 Metodología para la evaluación sensorial de los sistemas

Participaron dos grupos diferentes de 20 evaluadores cada uno. El primer grupo, compuesto por 13 mujeres y 7 varones, recibieron la instrucción de evaluar sólo el dulzor de los sistemas. El otro grupo, compuesto por 15 mujeres y 5 varones, recibieron la instrucción de evaluar la intensidad percibida total y desglosar la misma en las propiedades componentes de dulzor y de acidez para cada uno de los sistemas.

Se dispensaron, a los evaluadores, alícuotas de 5 ml de cada sistema en medidas posológicas descartables de 15 ml, a 25°C.

Los evaluadores sorbieron, el volumen total de muestra manteniéndolo 3 segundos en la cavidad oral, lo eliminaron y se enjuagaron con abundante agua destilada, a 25°C. Los intervalos entre las muestras oscilaron entre 20 y 30 segundos, dependiendo del evaluador. Los evaluadores realizaron cada estimación por duplicado, en dos sesiones separadas. Todos los estímulos se presentaron una vez por sesión, en orden balanceado.

Para hacer las determinaciones, los evaluadores emplearon el método de estimación de la magnitud sin módulo fijo de referencia. Recibieron como primer sistema una solución de sacarosa al 25% p/v (solución de referencia) y le asignaron libremente un valor a la intensidad percibida. Para evaluar los sistemas siguientes, los evaluadores asignaron un valor teniendo en cuenta la magnitud elegida para la solución de referencia. Sin embargo, en la práctica como resulta dificultoso para los evaluadores referirse sistemáticamente al primer sistema, por lo tanto, se aconsejó evaluar cada uno comparándolo con el inmediato anterior, de acuerdo a lo mencionado por la Norma Iram 20018.

En la Figura III.6 se muestra un modelo de planilla donde los evaluadores asignaron la magnitud estimada de la propiedad sensorial a cada sistema codificado.

III.2.3.3 Entrenamiento específico para el empleo del método de estimación de la magnitud

Ya sea para el ejercicio con las áreas de las figuras, como para el análisis de las propiedades sensoriales de los sistemas, los evaluadores eligieron su propia escala para estimar las magnitudes. Como todos los evaluadores cuantificaron todas las muestras, esto permitió aplicar un método de nivelación que anule las dispersiones individuales por el uso de las diferentes escalas (dispersión ficticia de los datos). Para ello se empleó el método de nivelación total descrito en la norma Iram 20018, que permite, además, establecer la concordancia de cada evaluador respecto del panel, al instruirlo en el uso del método de estimación de la magnitud. Se calcularon las funciones de potencia individuales que correlacionan las áreas estimadas por cada evaluador con las áreas de las figuras. Además, se calculó la función general para el panel. Con ambos datos, se calculó el porcentaje de correspondencia de cada evaluador con el panel. Cuanto más se acerca a 100% este valor, mayor consistencia muestra el evaluador con el resto del grupo.

Esta ejercitación en el manejo del método de estimación de la magnitud fue adecuada para la comprensión de los fundamentos de este método de cuantificación directa de los atributos sensoriales.

III.2.3.4 Análisis de datos

Para establecer las diferencias significativas entre las estimaciones obtenidas para todos los sistemas, se realizó un análisis de varianza de tres factores para conocer el efecto del nivel de aspartamo y del tipo de humectante, considerados factores fijos y de los evaluadores, factor aleatorio, sobre la respuesta (Sokal y Rohlf, 1969). La significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$). En todos los casos en que se obtuvo efecto significativo se aplicó el test de comparación múltiple *a posteriori* de mínimas diferencias significativas, LSD (*least significant difference*) para identificar cuáles sistemas difirieron significativamente entre sí.

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statistix (Statistix para Windows, versión 7.0, 2000, Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA).

III.2.4 Evaluación del dulzor de los sistemas conteniendo hidrocoloides

III.2.4.1 Evaluadores

El grupo de evaluadores del dulzor de los sistemas estaba compuesto por 10 personas, 7 mujeres y 3 varones.

Al igual que se indicó en la sección III.2.3.1, todos los evaluadores fueron estudiantes y personas pertenecientes al grupo de investigación, previamente entrenados en el método de la estimación de la magnitud.

III.2.4.2 Metodología para la evaluación sensorial de los sistemas

Se dispensaron, a los evaluadores, alícuotas de 5 ml de cada sistema en medidas posológicas descartables de 15 ml, a 25°C.

Para la evaluación de los sistemas líquidos (sistemas III.M, III.O, III.R, III.U y III.X), los panelistas siguieron la metodología detallada en la sección III.2.3.2.

En cuanto a la evaluación de los geles (sistemas III.N, III.Ñ, III.P, III.Q, III.S, III.T, III.V, III.W, III.Y, III.Z), los evaluadores retiraron con una cuchara la totalidad del gel del recipiente, la desmenuzaron durante 3 segundos en la cavidad oral, la eliminaron y procedieron según se especificó para los sistemas líquidos (sección III.2.3.2). Las estimaciones se realizaron por triplicado en tres sesiones separadas. Todos los estímulos se presentaron una vez por sesión, en orden balanceado.

Para hacer las determinaciones, los evaluadores emplearon el método de estimación de la magnitud sin módulo fijo de referencia. Los sistemas líquidos (sistemas III.M, III.O, III.R, III.U y III.X) sirvieron como referencia y fueron asignados en forma balanceada entre los evaluadores quienes recibieron uno de los sistemas en orden aleatorio y le asignaron libremente un valor a la intensidad percibida. Para evaluar los sistemas siguientes, los evaluadores asignaron un valor teniendo en cuenta la magnitud elegida para la solución de referencia. Sin embargo, en la práctica fue dificultoso para los evaluadores referirse sistemáticamente al primer sistema, por lo tanto se aconsejó evaluar cada uno comparándolo con el inmediato anterior (Iram 20018).

Todas las determinaciones se realizaron en una habitación confortable, despejada, de fácil acceso, con paredes blancas, libre de ruidos y olores. En la Figura III.7 se muestran los elementos utilizados por cada sujeto al realizar las determinaciones, la bandeja conteniendo las muestras a evaluar, la jarra con agua para el enjuague bucal, el recipiente de descarte y la planilla para realizar las anotaciones.

Figura III.7. Sitio donde cada sujeto realizó las determinaciones.



En la Figura III.8 se observa en detalle una de las disposiciones de los sistemas a evaluar codificados.

Figura III.8. Una de las disposiciones de los sistemas a evaluar.

III.2.4.3 Análisis de datos

El análisis de los datos fue similar al detallado en la sección III.2.3.4, con excepción del estudio de las diferencias significativas entre las estimaciones obtenidas de todos los sistemas, en el cual se realizó un análisis de varianza de tres factores para conocer el efecto del tipo de edulcorante, el tipo de gel, considerados factores fijos y de los evaluadores, factor aleatorio, sobre la respuesta (Sokal y Rohlf, 1969). La significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$). En todos los casos en que se obtuvo efecto significativo se aplicó el test de comparación múltiple *a posteriori* de mínimas diferencias significativas, LSD (*least significant difference*) para identificar cuáles sistemas difirieron significativamente entre sí.

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statistix (Statistix para Windows, versión 7.0, 2000, Analytical Software, Tallahassee, Florida, USA).

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Efecto de la presencia de distintos humectantes y de aspartamo sobre las propiedades sensoriales de los sistemas libres de hidrocoloides

III.3.1.1 Intensidad del dulzor de los sistemas libres de hidrocoloides

En la Figura III.9 se muestran las intensidades medias de dulzor de los sistemas en función del contenido de aspartamo (panel a), y en función del tipo de humectante (panel b).

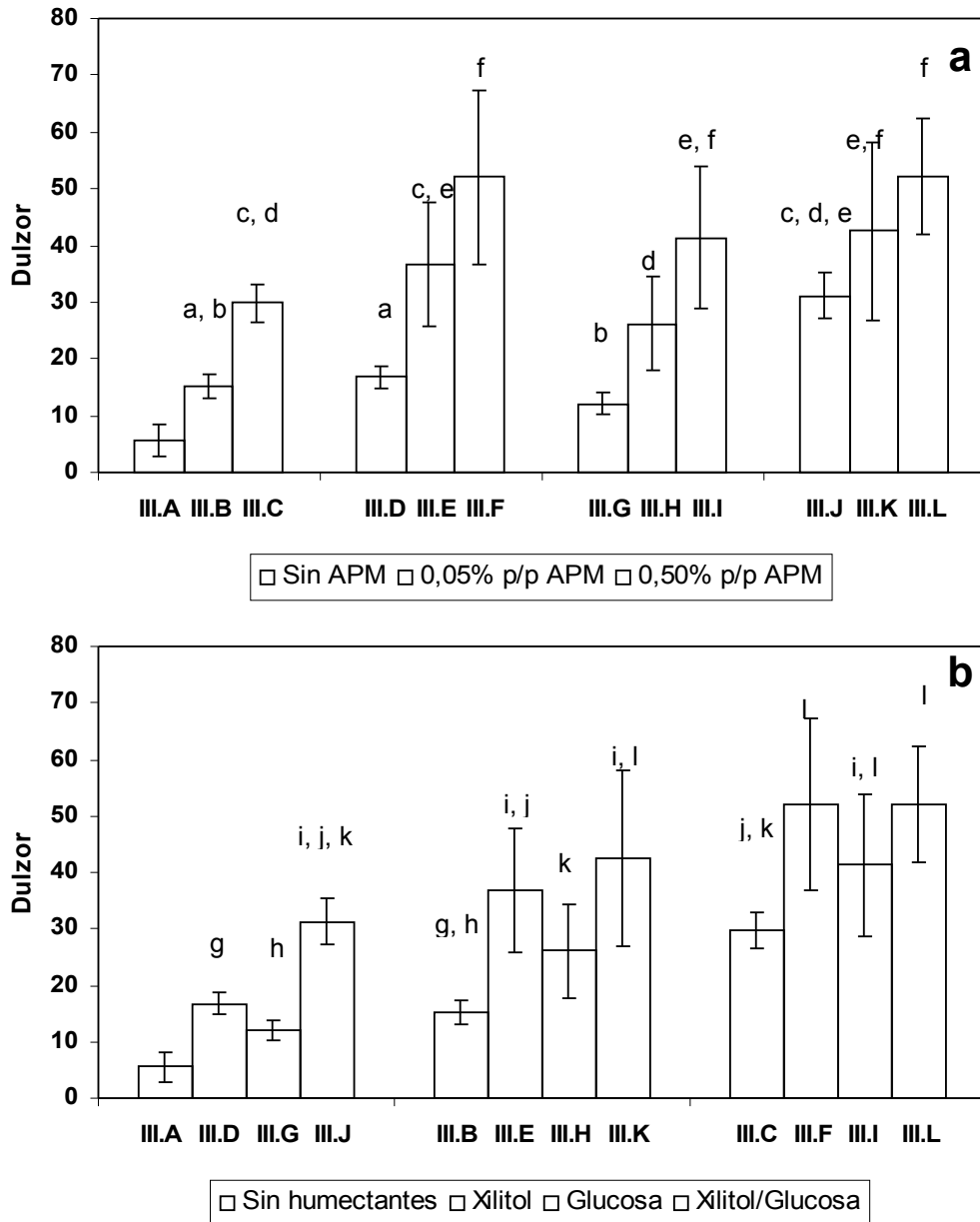
El agregado de 0,050% ó 0,500% p/p de aspartamo produjo un incremento en la estimación del dulzor de todos los sistemas estudiados, con excepción del sistema conteniendo glucosa y xilitol, en el cual la adición de 0,050% p/p del edulcorante, y su incremento a 0,500% p/p, no produjo efecto en la intensidad del estímulo (Figura III.9, panel a, sistemas III.A, III.D, III.G, III.J vs. III.B, III.E, III.H, III.K vs. III.C, III.F, III.I, III.L, respectivamente). Además, cabe destacar que, ya sea en ausencia como en presencia de los diferentes niveles de aspartamo, los sistemas libres de humectantes (sistemas III.A, III.B y III.C) tuvieron menor dulzor que el resto de los sistemas.

Wiet y Beyts (1992), mediante el empleo del método de estimación de la magnitud, observaron que el incremento del dulzor fue proporcional a la concentración de aspartamo. King y col. (2000) reportaron el aumento de la intensidad del dulzor con el nivel de aspartamo en yogurt. El dulzor de una bebida no carbonatada de sabor naranja se incrementó por el agregado de aspartamo (Cloninger y Baldwin, 1974). La elevada intensidad del dulzor que produce el aspartamo se correlaciona con su carácter hidrofóbico, el cual es mayor que el de azúcares y polioles (Hutteau y col., 1998; Hutteau y Mathlouthi, 1998).

En la Figura III.9, panel b, se observa que, tanto en ausencia como en presencia de 0,050% p/p de aspartamo, la intensidad de dulzor de los sistemas siguió el orden creciente: sistemas sin humectantes (sistemas III.A, III.B) < glucosa (sistemas III.G, III.H) < xilitol (sistemas III.D, III.E) < xilitol / glucosa (sistemas III.J, III.K). En cambio, cuando el nivel de aspartamo fue del 0,500% p/p, la intensidad del dulzor fue independiente de la naturaleza del

humectante (sistemas III.F, III.I, III.L), siendo el sistema libre de humectantes el que presentó menor dulzor (sistema III.C). Este comportamiento indicaría que un nivel de aspartamo del 0,500% p/p incrementa de tal manera el dulzor de los sistemas que enmascara el aporte realizado por los humectantes a dicho estímulo.

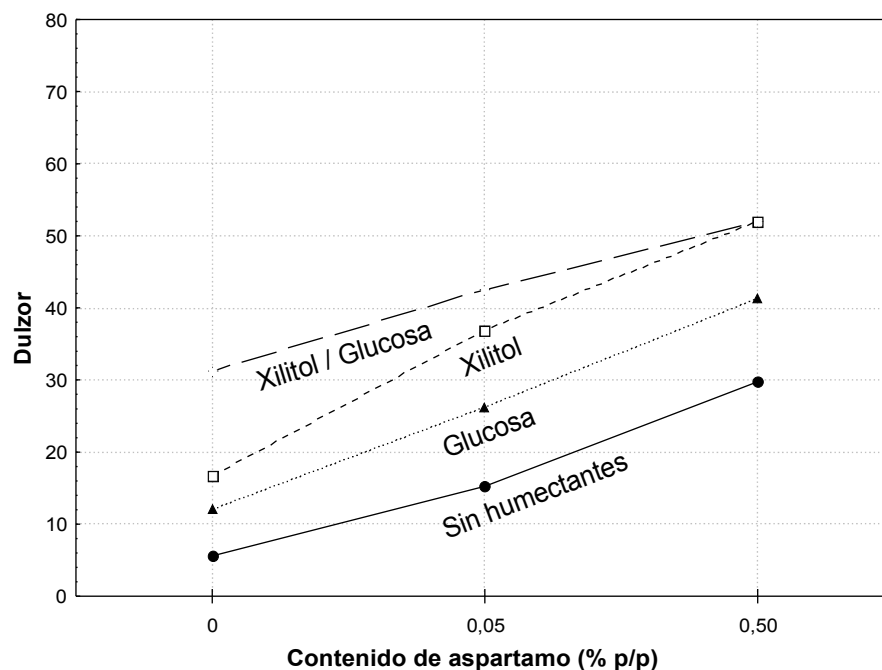
Figura III.9. Medias del dulzor percibido de los sistemas modelo acuosos en función del contenido de aspartamo (APM) (panel a) y del tipo de humectante (panel b). Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Un análisis de varianza mostró la existencia de interacción entre los humectantes utilizados y los niveles de aspartamo ($p \leq 0,05$). Basándose en ello se observó un mecanismo aditivo en la intensidad del dulzor ya que la misma se incrementa con el número de edulcorantes en el sistema (Figura III.10). Es importante destacar que el agregado de 0,050% p/p de aspartamo al sistema conteniendo xilitol produjo un efecto sinérgico sobre la intensidad del dulzor, el cual desaparece debido a la adición de glucosa a dicho sistema. Schiffman y col. (2000) reportaron la existencia de sinergismo en el dulzor de mezclas binarias o ternarias de edulcorantes. Además, observaron que la presencia de edulcorantes que aportan cuerpo al sistema, como fructosa o glucosa, tienden a reducir el sinergismo.

Se halla extensamente reportado en bibliografía el efecto sinérgico o aditivo que produce el aspartamo sobre la intensidad del dulzor cuando se combina con otros edulcorantes, entre los que se hallan sacarosa, glucosa, fructosa, sorbitol y sacarina (Schiffman y col. 2000; Van Tornout y col., 1985; Homler, 1984; Crosby, 1976). En cuanto al xilitol, Pepper y Olinger (1988) reportan la existencia de sinergismo entre este y otros polioles, por ejemplo, sorbitol. La presencia de una pequeña cantidad de azúcar en una bebida no carbonatada de sabor naranja actuó de manera sinérgica sobre el dulzor del aspartamo (Cloninger y Baldwin, 1974).

Figura III.10. Interacción entre los humectantes y la concentración de aspartamo sobre la intensidad media de dulzor de los sistemas acuosos.



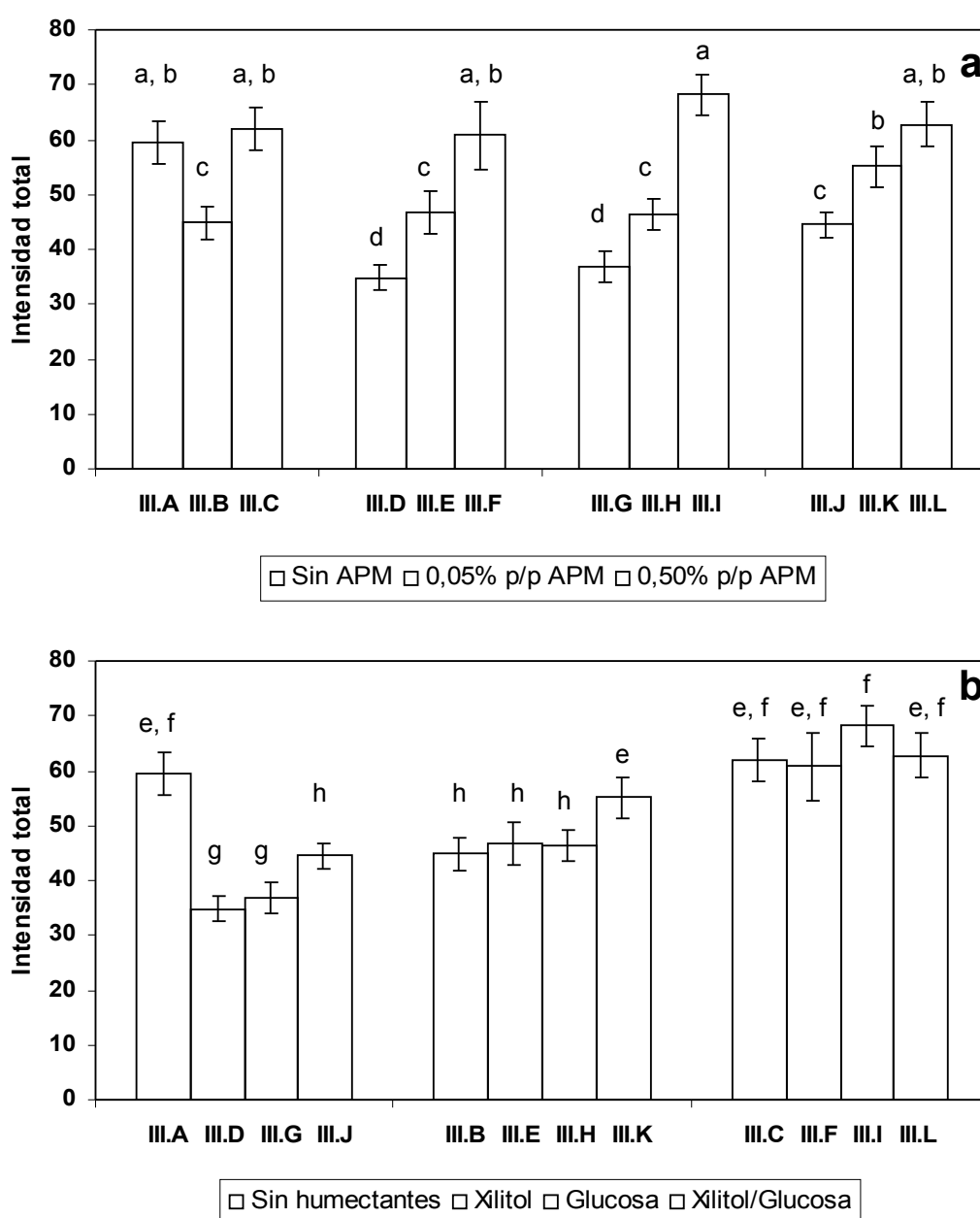
III.3.1.2 Intensidad percibida total y sus propiedades componentes de dulzor y acidez de los sistemas libres de hidrocoloides

a. Intensidad percibida total

Las intensidades medias totales de los sistemas en función del nivel de aspartamo y del tipo de humectante se muestran en la Figura III.11.

Figura III.11. Medias de la intensidad total de los sistemas modelo acuosos en función del contenido de aspartamo (APM) (panel a) y del humectante (panel b).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



El agregado de 0,050% p/p de aspartamo y su incremento a 0,500% p/p produjo un aumento de la intensidad total en los sistemas conteniendo xilitol o glucosa (Figura III.11, panel a, sistemas III.D, III.G vs. III.E, III.H vs. III.F, III.I, respectivamente). Por otra parte, la incorporación de 0,050% p/p de aspartamo al sistema conteniendo la combinación xilitol / glucosa también incrementó la intensidad total (sistema III.J vs. III.K), pero no hubo diferencias significativas cuando el nivel de aspartamo ascendió a 0,500% p/p (sistema III.K vs. III.L).

En ausencia de humectantes, una concentración de 0,050% p/p de aspartamo produjo un descenso significativo de la intensidad total (sistema III.A vs. III.B). Es de destacar que en ausencia de aspartamo, la mayor contribución a la intensidad total es la acidez aportada por los ácidos cítrico y sórbico presentes en el sistema. El descenso de la intensidad total producido por el agregado de 0,050% p/p de aspartamo probablemente esté relacionado con el hecho de que el aspartamo disminuye la acidez del sistema, tal como se analizará más adelante (sección III.3.1.2 c) y que, de acuerdo con Birch (1994), en sistemas modelo compuestos por azúcares y ácido cítrico, la acidez es la que produce la mayor contribución a la intensidad total; sería posible encontrar el mismo comportamiento para las soluciones de aspartamo y ácido cítrico.

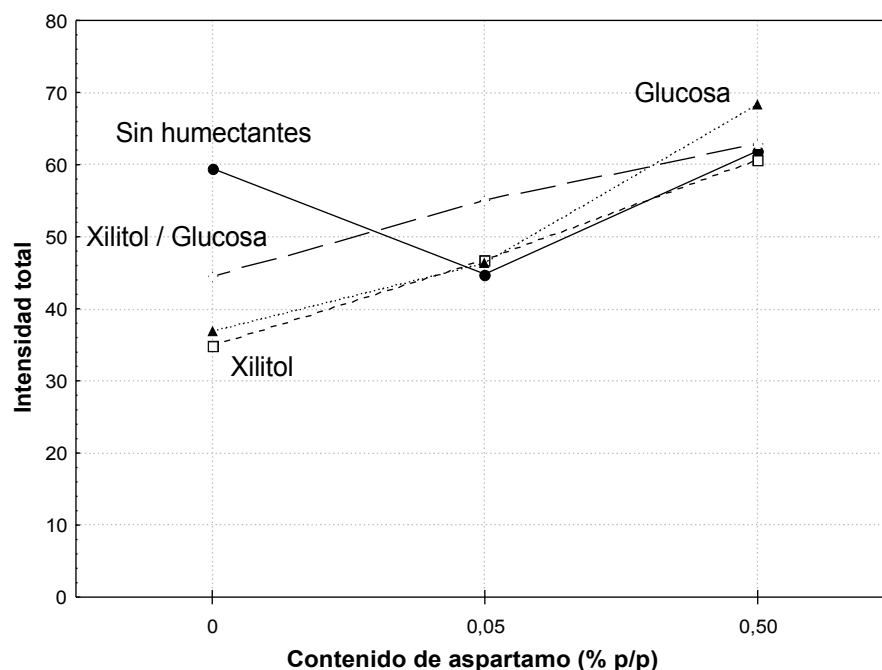
El agregado de 0,500% p/p de aspartamo no modificó la percepción de la intensidad total (sistema III.A vs. III.C).

En la Figura III.11, panel b, se observa que en ausencia de aspartamo, la intensidad total del sistema sin humectantes fue mayor que las intensidades totales de los sistemas conteniendo xilitol, glucosa o la mezcla de ambos (sistema III.A vs. III.D, III.G, III.J, respectivamente) y no mostró diferencias significativas con las intensidades observadas en todos los sistemas que contienen 0,500% p/p de aspartamo (sistema III.A vs. III.C, III.F, III.I, III.L). Además, es de destacar que en estos sistemas la percepción de la intensidad total fue independiente tanto de la presencia de humectantes, como de la naturaleza de los mismos.

Por otra parte, en presencia de 0,050% p/p de aspartamo, no hubo diferencias significativas entre las intensidades totales del sistema sin humectantes (sistema III.B), y de los que contienen xilitol o glucosa (sistemas III.E y III.H), mientras que la presencia conjunta de xilitol y glucosa presentó el mayor estímulo (sistema III.K).

Un análisis de varianza mostró la interacción entre los humectantes y el nivel de aspartamo ($p \leq 0,05$), la cual se muestra en la Figura III.12. Mientras que en ausencia de humectantes la adición de 0,050% p/p de aspartamo produjo un descenso significativo de la intensidad total, en presencia de los mismos se incrementó.

Figura III.12. Interacción entre los humectantes y la concentración de aspartamo sobre la intensidad percibida total de los sistemas acuosos.



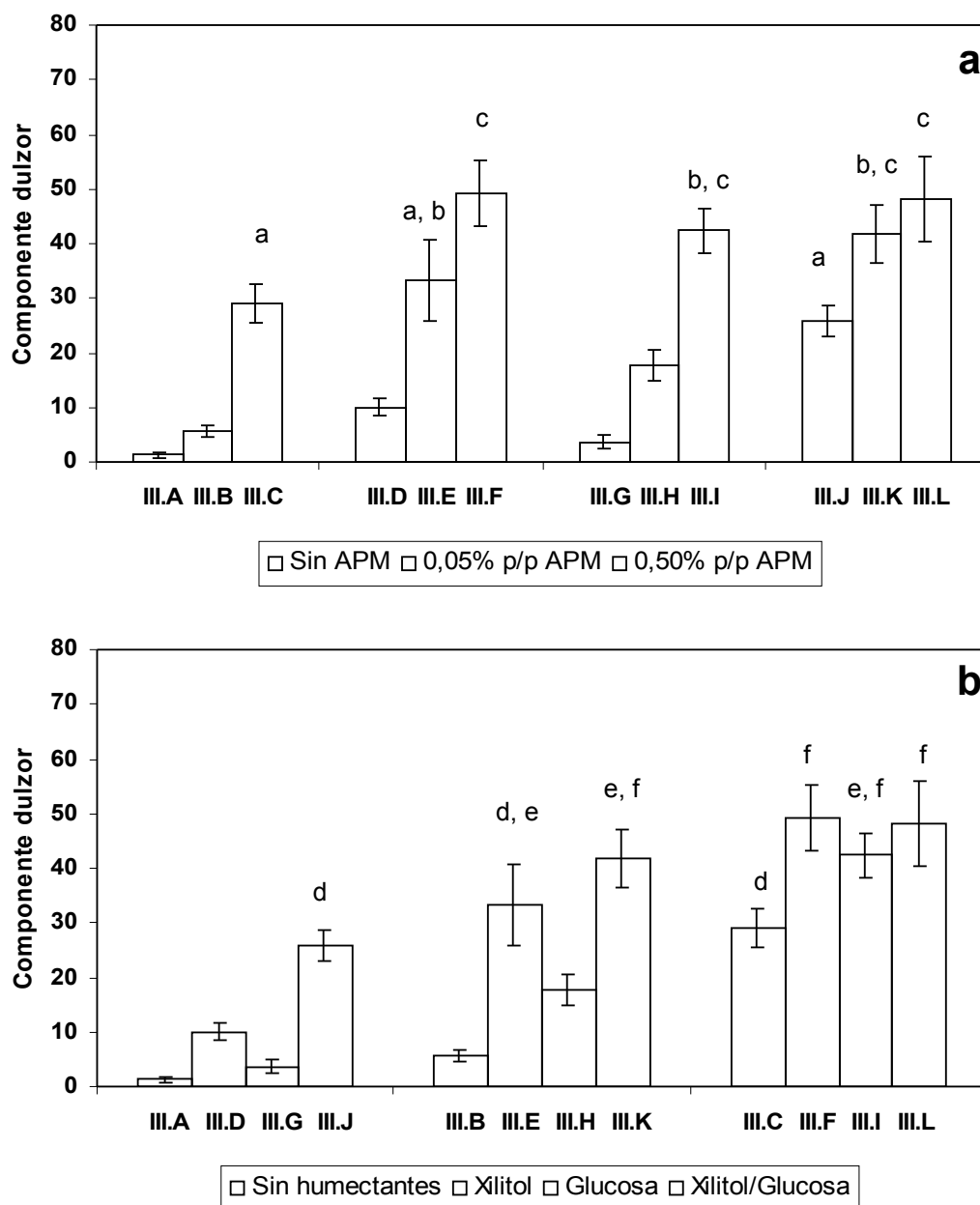
b. Dulzor

En la Figura III.13 se muestran las medias del componente dulzor de la intensidad total de los sistemas, en función del contenido de aspartamo y del tipo de humectante.

De acuerdo a lo observado en la Figura III.13, panel a, el agregado de 0,050 ó 0,500% p/p de aspartamo produjo un incremento del dulzor de todos los sistemas estudiados, con excepción del sistema conteniendo glucosa y xilitol, en el cual el aumento de la concentración de aspartamo de 0,050 a 0,500% p/p no produjo efecto en la intensidad del estímulo (sistemas III.A, III.D, III.G, III.J vs. III.B, III.E, III.H, III.K vs. III.C, III.F, III.I, III.L, respectivamente). Este último comportamiento muestra que la mezcla de glucosa, xilitol y 0,050% p/p de aspartamo no permitió que los evaluadores puedan diferenciar su dulzor en comparación con el de un sistema de similar composición pero conteniendo un nivel de aspartamo diez veces más elevado. Parke y Birch (1999) realizaron un estudio de las propiedades físicas de soluciones conteniendo edulcorantes y observaron que la forma, el tamaño y la estereoquímica de los mismos afectan su ubicación dentro de la estructura del agua y por lo tanto, podrían influir en el transporte y la orientación en el sitio receptor, además sugirieron que las diferencias en la hidratación se relacionan con la hidrofobicidad de las moléculas, siendo los edulcorantes artificiales mucho más hidrofóbicos que los edulcorantes que aportan cuerpo al sistema.

Además, dichos autores indican que deben considerarse las afinidades de las interacciones edulcorante-edulcorante, edulcorante-receptor, edulcorante-solvente, solvente-solvente y solvente-receptor, ya que son las que priman en la determinación del mecanismo de percepción del gusto.

Figura III.13. Medias del componente dulzor de la intensidad total de los sistemas modelo acuosos en función del contenido de aspartamo (APM) (panel a) y del humectante (panel b). Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



En la Figura III.13, panel b, se observa que, independientemente de la presencia de aspartamo, el agregado de humectantes incrementó el dulzor de los sistemas (sistema III.A vs. III.D, III.G, III.J, sistema III.B vs. III.E, III.H, III.K, sistema III.C vs. III.F, III.I, III.L). Además, el dulzor de los sistemas conteniendo xilitol fue mayor que el de aquellos formulados con glucosa con independencia de la inclusión o no de 0,050% p/p de aspartamo (sistemas III.D, III.E vs. III.G, III.H, respectivamente). En cambio, en presencia de 0,500% p/p de aspartamo no se observaron diferencias significativas entre los sistemas conteniendo humectantes (sistemas III.F, III.I, III.L). Como ya se mencionó previamente (sección III.3.1.1), la adición de 0,500% p/p de aspartamo ocasionaría la saturación de los receptores impidiendo detectar las diferencias en el dulzor de los distintos humectantes. La mayor capacidad endulzante del xilitol con respecto a la glucosa ya ha sido informada por Hyvönen y col. (1978) quienes hallaron que, tanto en ausencia como en presencia de ácidos, el dulzor relativo de la glucosa fue significativamente menor que el del xilitol, a 6, 23 y 50°C.

Es importante destacar que el agregado de glucosa al sistema conteniendo xilitol y 0,050% p/p de aspartamo no afectó la percepción del dulzor (sistema III.E vs. III.K), indicando que el xilitol posee un efecto significativo sobre el dulzor. Este comportamiento coincide con el observado en la sección III.3.1.1 al evaluar únicamente el dulzor.

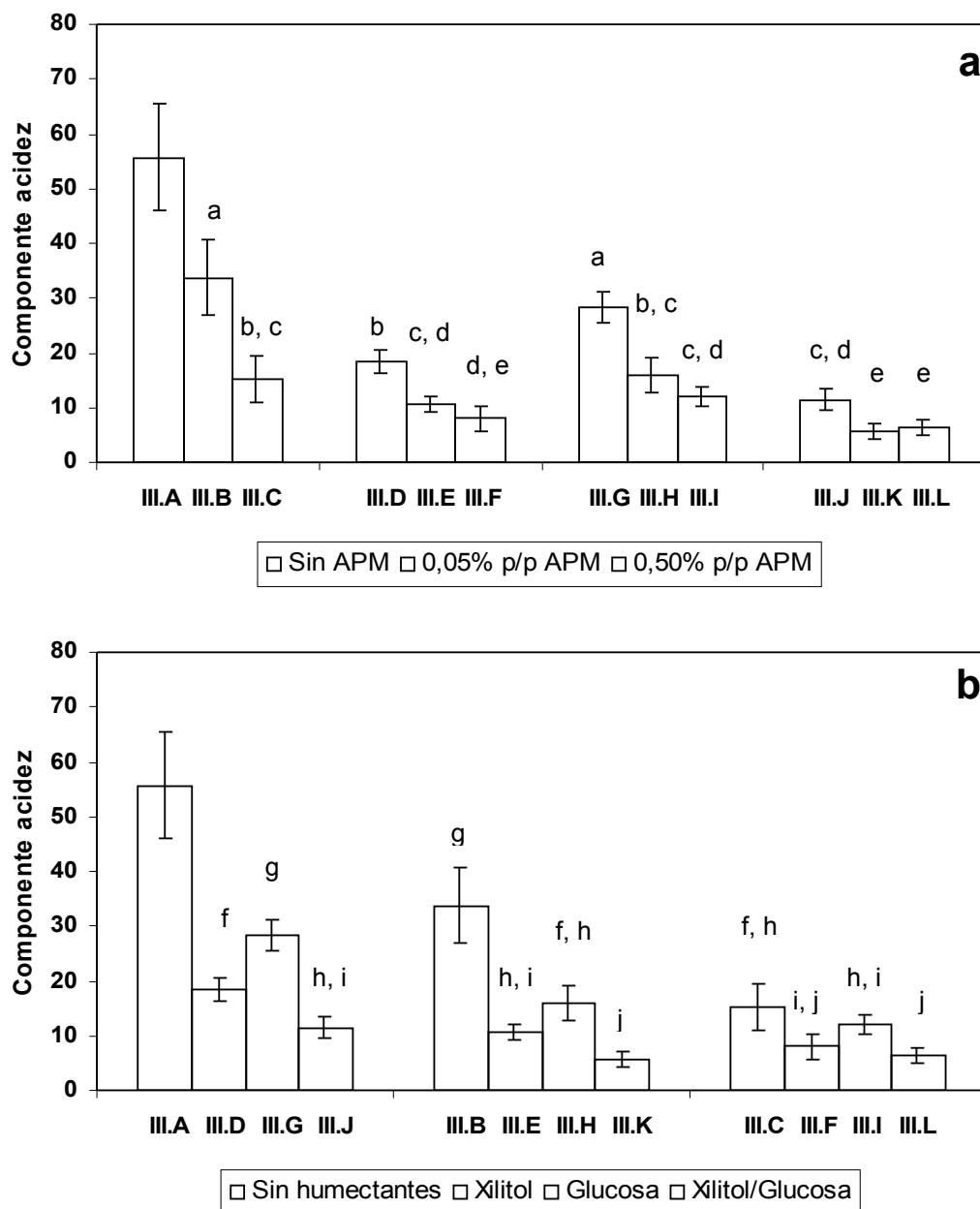
c. Acidez

En la Figura III.14 se muestran las medias de la propiedad componente acidez de la intensidad total de los sistemas en función del contenido de aspartamo, y del tipo de humectante.

El agregado de 0,050% ó de 0,500% p/p de aspartamo produjo un descenso significativo de la acidez de todos los sistemas estudiados (Figura III.14, panel a, sistemas III.A, III.D, III.G, III.J vs. III.B, III.E, III.H, III.K, respectivamente, y sistemas III.A, III.D, III.G, III.J vs. III.C, III.F, III.I, III.L, respectivamente). Es de destacar que el aumento del nivel de aspartamo de 0,050 a 0,500% p/p no produjo efecto sobre la acidez en los sistemas conteniendo humectantes (sistemas III.B, III.E, III.H, III.K vs. III.C, III.F, III.I, III.L, respectivamente). Estos resultados indican que la presencia de aspartamo reduce significativamente la acidez, sin embargo, al incrementar 10 veces su concentración en combinación con humectantes desaparece dicho efecto.

Los resultados obtenidos están en concordancia con lo informado por King y col. (2000) quienes observaron un descenso significativo de la acidez de yogurt debido al incremento de la concentración de aspartamo de 200 a 400 ppm, mientras que un posterior ascenso a 600 ppm no mostró diferencias. La acidez de una bebida no carbonatada de sabor naranja disminuyó debido a la adición de aspartamo (Cloninger y Baldwin, 1974). En general, cuando se mezclan dos sustancias sápidas diferentes, el efecto de las interacciones entre las mismas depende de la relación intensidad / concentración del estímulo (Keast y Breslin, 2002).

Figura III.14. Medias del componente acidez de la intensidad total de los sistemas modelo acuosos en función del contenido de aspartamo (APM) (panel a) y del humectante (panel b). Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Debido a que el aspartamo por sí solo no aporta acidez significativa al sistema (Wiet y Beyts, 1992), el comportamiento observado sugiere que la presencia de humectantes en combinación con el mayor nivel de aspartamo estudiado estaría enmascarando la acidez de los sistemas, y por lo tanto, impidiendo, a los evaluadores su estimación.

En cuanto al efecto del agregado de humectantes sobre la acidez de los sistemas, la Figura III.14, panel b, muestra que en ausencia de aspartamo, la acidez de los sistemas siguió el siguiente orden creciente, inverso al observado en la evaluación del dulzor: xilitol / glucosa (sistema III.J) < xilitol (sistema III.D) < glucosa (sistema III.G) < sistema sin humectantes (sistema III.A). Este orden fue similar en presencia de 0,050% p/p de aspartamo, con excepción de los sistemas conteniendo xilitol (sistema III.E) o glucosa (sistema III.H), los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí. En cambio, cuando el nivel de aspartamo fue del 0,500% p/p, la acidez no mostró un comportamiento específico con relación a los humectantes.

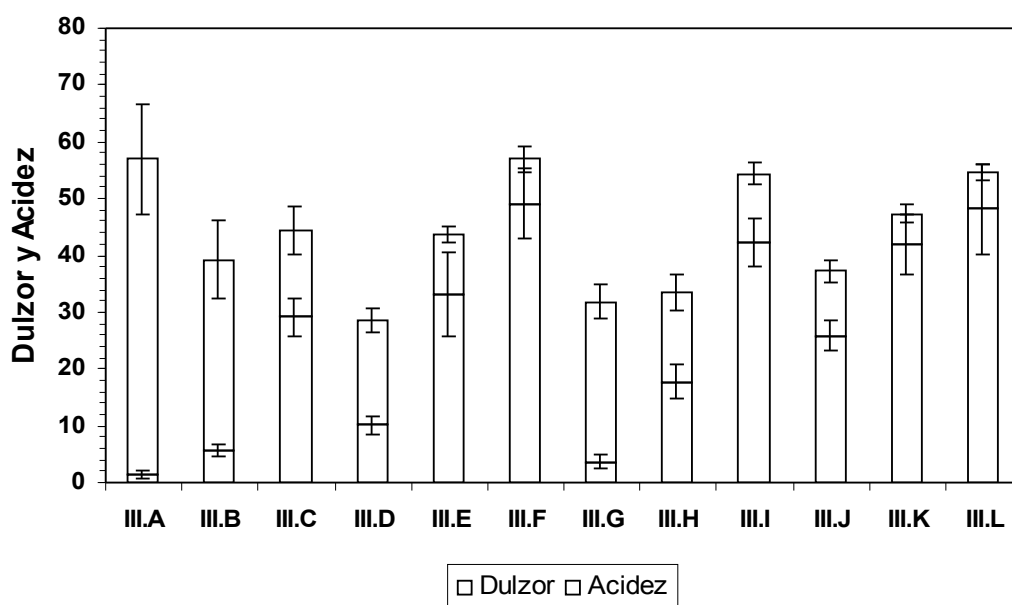
Basándose en los resultados obtenidos se deduce que la presencia de edulcorantes reduce la percepción de la acidez. Diversos autores observaron que la sacarosa no sólo suprime la acidez del ácido cítrico sino que el dulzor también disminuye debido a la presencia del mismo. Además, el grado de disminución de la acidez depende de las concentraciones de sacarosa y de ácido cítrico (Pelletier y col., 2004; Schifferstein y Frijters, 1991, 1990). McBride y Finlay (1990), estudiaron mezclas de diferentes concentraciones de sacarosa, fructosa y ácido cítrico y observaron que el dulzor y la acidez de las mismas eran susceptibles a una supresión mutua. Hyvönen y col. (1978) reportaron que el agregado de diferentes ácidos promovió el descenso del dulzor relativo de la fructosa, de la glucosa y del xilitol. Matysiak y Noble (1991) observaron que la acidez producida por ácido cítrico se reducía en presencia de edulcorantes, entre ellos, aspartamo. Pelletier y col. (2004) observaron que la acidez producida por el ácido cítrico descendía debido al incremento del nivel de aspartamo, y que la magnitud de la supresión dependía del nivel del edulcorante.

d. Aporte del dulzor y de la acidez a la intensidad total

Con la finalidad de ilustrar simultáneamente las relaciones de los componentes dulzor y acidez de cada uno de los sistemas se realizó la Figura III.15. En la misma se observa que, en general, el dulzor aumentó, mientras que la acidez disminuyó debido al incremento de la concentración de aspartamo. El componente acidez fue mayor que el dulzor en el sistema libre de humectantes (sistema III.A), en el sistema conteniendo 0,050% p/p de aspartamo (sistema III.B) y en los sistemas conteniendo xilitol o glucosa como humectantes (sistema III.D y III.G, respectivamente). Este comportamiento se relaciona con el hecho de que la característica

psicofísica dominante en sistemas modelo compuestos por azúcares y ácido cítrico es la acidez puesto que la misma produce la mayor contribución a la intensidad total (Birch, 1994). Es importante destacar que la proporción dulzor / acidez fue mayor cuando se utilizó xilitol como humectante que glucosa.

Figura III.15. Medias de los componentes acidez y dulzor de la intensidad total de los sistemas modelo acuosos.



Al comparar los resultados mencionados con los indicados en la sección III.3.1.2 a, se puede confirmar que la intensidad percibida total fue la resultante de la intensidad del componente subjetivamente más fuerte solo, ya sea el dulzor o la acidez, según cual fuere más intenso. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por McBride y Finlay (1990).

Debe tenerse en cuenta que la práctica de la partición de la experiencia sensorial da la oportunidad de reportar otras sensaciones además del dulzor; permite incrementar el conocimiento de los efectos supresores de diferentes aditivos sobre la intensidad de la acidez, así como, de las reglas de combinación que dan origen a la intensidad total de mezclas heterogéneas. Ello justifica que, si bien la tendencia observada en la estimación del componente dulzor coincide con la obtenida cuando los evaluadores estimaron sólo el dulzor de los sistemas (sección III.3.1.1), en este último caso, las magnitudes evaluadas fueron mayores.

III.3.1.3 Conclusiones

El análisis sensorial de los sistemas acuosos permitió obtener los siguientes resultados:

- a) En general, la presencia de aspartamo, xilitol, glucosa o la mezcla de los mismos incrementó el dulzor y disminuyó la acidez de los sistemas.
- b) La glucosa fue menos dulce que el xilitol en ausencia o en presencia de 0,050% p/p de aspartamo.
- c) El agregado de 0,050% p/p de aspartamo al sistema conteniendo xilitol produjo un efecto sinérgico sobre la intensidad del dulzor. Basándose en ello, el uso de más de un edulcorante permitiría disminuir la cantidad total de los mismos para asegurar un nivel de dulzor específico.
- d) Un nivel de aspartamo del 0,500% p/p no permitió diferenciar el dulzor de sistemas conteniendo xilitol, glucosa o la mezcla de ambos.

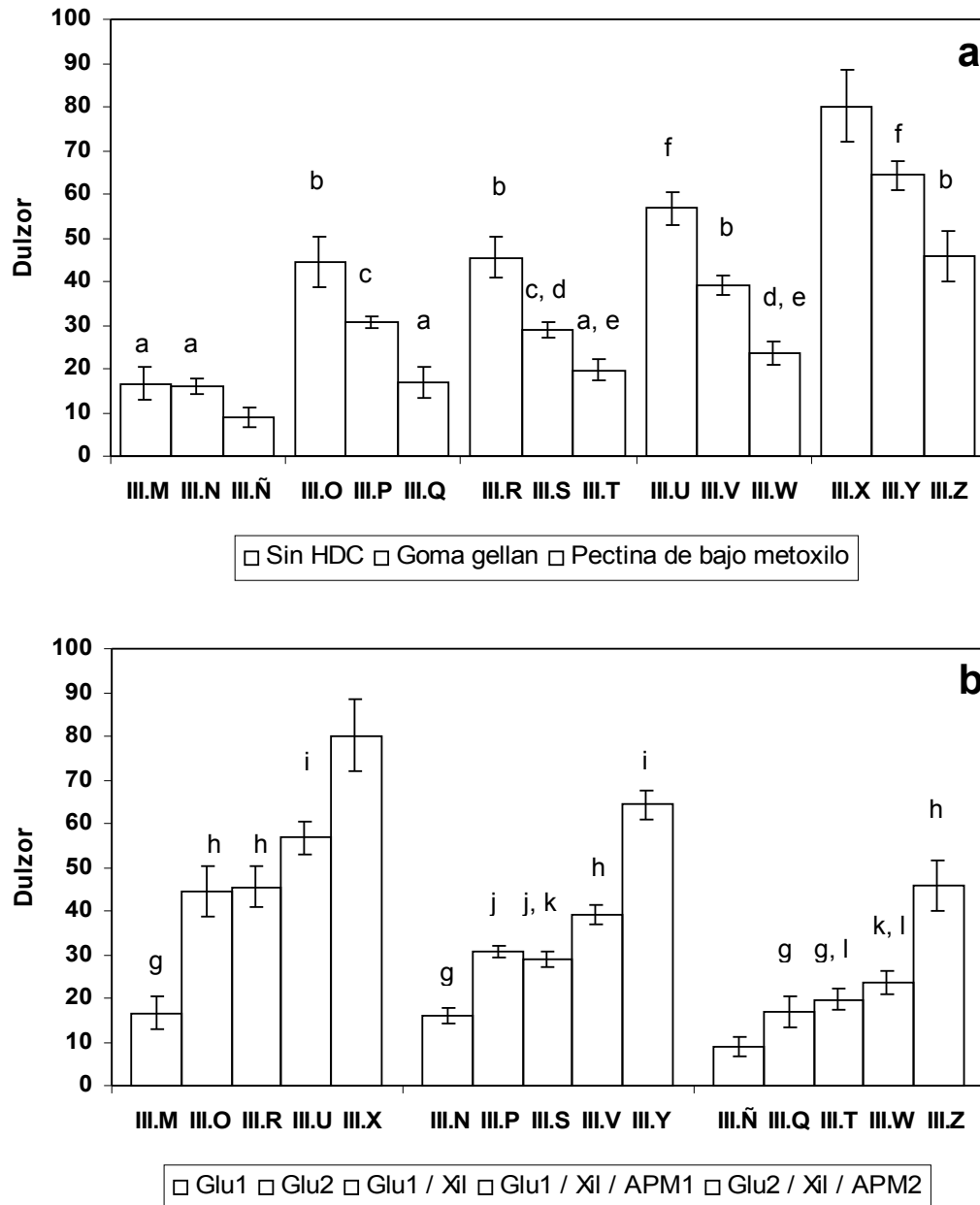
Los estudios realizados permitieron caracterizar las propiedades sensoriales de los distintos edulcorantes utilizados en los sistemas acuosos demostrando que las mismas dependen de la naturaleza de los edulcorantes individuales, de su concentración y de las interacciones con el agua y con otros edulcorantes presentes en el sistema.

III.3.2 Efecto de la presencia de dos hidrocoloides y distintos edulcorantes sobre el dulzor de formulaciones de bajo tenor glucídico

En la Figura III.16 se muestran las intensidades medias de dulzor de los sistemas en función del contenido de hidrocoloides y del tipo de humectante.

Se observó un descenso significativo del dulzor de todos los sistemas estudiados ya sea por el agregado tanto de goma gellan (Figura III.16, panel a, sistemas III.O, III.R, III.U, III.X vs. III.P, III.S, III.V, III.Y, respectivamente) como de pectina, (sistemas III.M, III.O, III.R, III.U, III.X vs. III.Ñ, III.Q, III.T, III.W, III.Z, respectivamente) a excepción del sistema conteniendo 10,00% p/p de glucosa, en el cual el agregado de goma gellan no modificó la percepción del gusto dulce (sistema III.M vs. III.N). Este comportamiento indicaría que el incremento de la viscosidad de los sistemas debido al agregado de hidrocoloides dificulta el contacto del estímulo con los receptores sensoriales.

Figura III.16. Medias del dulzor de los sistemas modelo en función del contenido de hidrocoloides (HDC) (panel a) y del humectante (panel b).
 Glu1: glucosa 10,00% p/p; Glu2: glucosa 22,00% p/p; Xil: xilitol; APM1: aspartamo 0,050% p/p; APM2: aspartamo 0,500% p/p.
 Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Se encuentra ampliamente reportado en bibliografía la influencia del agregado de hidrocoloides sobre la percepción del gusto dulce. En general, la adición de espesantes a soluciones modelo acuosas produce un descenso de la intensidad del dulzor (Bayarri y col. 2003; Pastor y col. 1996, 1994; Hill y col. 1995; Crosby, 1976; Cloninger y Baldwin, 1974).

Según muestra la Figura III.16, panel b, ya sea en ausencia como en presencia de los hidrocoloides, la intensidad de dulzor de los sistemas siguió el orden creciente: glucosa 10,00% p/p (sistemas III.M, III.N, III.Ñ) < glucosa 22,00% p/p (sistemas III.O, III.P, III.Q) = xilitol/glucosa (sistemas III.R, III.S, III.T) < xilitol/glucosa/aspartamo 0,050% p/p (sistemas III.U, III.V) < xilitol/glucosa/aspartamo 0,500% p/p (sistemas III.X, III.Y, III.Z). Cabe destacar que en este ordenamiento hubo una excepción ya que, en presencia de pectina, la adición de 0,050% p/p de aspartamo a un sistema conteniendo la mezcla xilitol / glucosa no produjo cambios en la percepción del dulzor (sistema III.T vs. III.W).

Es importante señalar que todos los sistemas que contienen goma gellan fueron significativamente más dulces que aquellos formulados con pectina (Figura III.16, panel b, sistemas III.N, III.P, III.S, III.V, III.Y vs. III.Ñ, III.Q, III.T, III.W, III.Z, respectivamente). Los resultados obtenidos indican que la naturaleza del hidrocoloide juega un rol importante en la intensidad del gusto dulce. Bayarri y col. (2003) observaron que el dulzor aportado por la sacarosa o por el aspartamo fue mayor en geles formulados con goma gellan que con κ -carragenano.

Este comportamiento, probablemente, se relaciona con el hecho de que durante la masticación, los geles de goma gellan se desintegran relativamente rápido en la boca y, aunque el gel no funde a la temperatura corporal, la liberación de agua durante la masticación da una sensación de fusión en la boca. La liberación de agua probablemente contribuya a la buena capacidad de liberación del *flavor* que posee la goma gellan (Durán y col., 1994; Gibson, 1992) y así también facilite la percepción del dulzor. La mencionada característica permitiría utilizar menos ingredientes que aporten *flavor* o menor contenido de azúcares en la elaboración de alimentos, por ejemplo, postres gelificados con goma gellan.

Se observa en la Figura III.16, panel b, que la intensidad de dulzor se incrementó debido al agregado de mayor cantidad de glucosa o de xilitol sólo o en combinación con aspartamo, al sistema conteniendo 10,00% p/p de glucosa, ya sea en ausencia (sistema III.M vs. III.O, III.R, III.U, III.X, respectivamente) como en presencia de los hidrocoloides (sistema III.N vs. III.P, III.S, III.V, III.Y, sistema III.N vs. III.Q, III.T, III.W, III.Z, respectivamente).

Independientemente de la presencia de hidrocoloides, no se observaron diferencias significativas cuando en el sistema conteniendo 22,00% p/p de glucosa se reemplazó parcialmente el humectante debido al agregado de xilitol (Figura III.16, panel b, sistema III.O, III.P, III.Q vs. III.R, III.S, III.T, respectivamente). Sin embargo, la adición de aspartamo a este

último sistema incrementó el dulzor, con excepción de los sistemas conteniendo pectina, en los cuales el agregado de 0,050% p/p de aspartamo no lo modificó (sistemas III.R, III.S, IIIT vs. II.U, III.V, III.W vs. III.X, III.Y, III.Z, respectivamente). Bayarri y col. (2003) observaron que la constante de difusión del aspartamo en geles de goma gellan aumentaba debido al incremento del nivel del edulcorante, reflejándose en el aumento de la intensidad del dulzor percibida.

Los resultados obtenidos indican que el dulzor percibido, además de depender de la naturaleza del hidrocoloide, también depende del edulcorante empleado.

En el proceso de la liberación del dulzor desde el alimento hacia los receptores gustativos de la cavidad oral, es importante considerar la difusión del edulcorante a través de la matriz del alimento y la llegada del mismo al sitio receptor (Bayarri y col. 2001). Este proceso dependerá de las interacciones físicas y/o químicas entre el hidrocoloide, la matriz del alimento, los componentes del gusto, la saliva y los receptores gustativos. Bayarri y col. (2003) correlacionaron el incremento de la difusión de edulcorantes en geles con el aumento de la percepción del gusto dulce. Asimismo, observaron que a mayor dureza de un gel, menor es la percepción del *flavor* durante la masticación. Sin embargo, Costell y col. (2000) reportan la existencia de diferencias en la percepción del dulzor entre diferentes geles de hidrocoloideos con durezas similares.

Wafwoyo y col. (1999), en el estudio de la interacción entre el aspartamo y distintos hidrocoloideos, observaron que soluciones de hidrocoloideos de baja viscosidad mejoraban la solubilidad del aspartamo, y sugirieron que esto se debía a la asociación de porciones hidrofóbicas de la molécula de aspartamo con porciones hidrofóbicas de la cadena del hidrocoloide o con el interior de una porción helicoidal del mismo.

Por lo tanto, es factible que la estructura propia de los edulcorantes, de los hidrocoloideos y del gel que forman, y la interacción entre los mismos, modifiquen la percepción del dulzor de los sistemas.

III.3.2.1 Conclusiones

De los resultados obtenidos en la estimación de la intensidad del dulzor de los sistemas conteniendo hidrocoloideos se concluye que:

- a) La presencia del hidrocoloide produjo un descenso de la percepción del dulzor de los sistemas.

- b) La pectina de bajo metoxilo fue el hidrocoloide que mayor disminución del dulzor produjo.
- c) El reemplazo parcial de glucosa por xilitol no modificó la intensidad del dulzor de los sistemas ya sea en ausencia como en presencia de los hidrocoloides. El posterior agregado de aspartamo a estos sistemas incrementó la intensidad del dulzor en presencia de goma gellan, mientras que cuando se utilizó pectina sólo se observó un aumento del dulzor al agregarse el mayor nivel de aspartamo.

Basándose en estos resultados se deduce que la naturaleza del hidrocoloide y de los edulcorantes empleados juega un rol importante en la percepción de la intensidad del gusto dulce. Por lo tanto, la realización de un estudio más exhaustivo debería considerar la estructura propia de los edulcorantes, de los hidrocoloides y del gel que forman, la interacción entre los mismos, así como sus interacciones con la saliva y con los sitios receptores sensoriales, con la finalidad de elucidar el mecanismo de la percepción del dulzor de los sistemas y poder explicar los resultados observados.

CAPÍTULO IV

**INTERACCIONES ENTRE EDULCORANTES E
HIDROCOLOIDES EN SISTEMAS CONTENIENDO
ÁCIDO SÓRBICO:**

**SU EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES
REOLÓGICAS DE LOS SISTEMAS**

IV.1 Introducción

IV.1.1 La reología y sus aplicaciones en sistemas alimenticios

La palabra reología proviene del griego $\rho\epsilon\iota\nu$, fluir, por lo tanto, se define como la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia (Macosko, 1994).

La reología de los alimentos se definió como "el estudio de la deformación y el flujo de las materias primas sin procesar, los productos intermedios o semielaborados, y los productos finales de la industria de alimentos" (White, 1970).

Existen numerosas razones por las cuales es elemental el conocimiento adecuado de las propiedades reológicas de los alimentos. A continuación se detallan algunas aplicaciones (Garza, 1996):

- Diseño de procesos y equipos en ingeniería: el conocimiento de las propiedades de comportamiento de flujo y de deformación de los alimentos es imprescindible en el diseño y dimensionado de equipos tales como cintas transportadoras, tuberías, tanques de almacenamiento, pulverizadores o bombas para el manejo de alimentos. Además, la viscosidad se utiliza para la estimación y el cálculo de los fenómenos de transporte de cantidad de movimiento, calor y energía.
- Evaluación sensorial: los datos reológicos pueden ser muy interesantes para modificar el proceso de elaboración o la formulación de un producto final, de forma que los parámetros de textura del alimento se encuentren dentro del rango considerado deseable por los consumidores (González-Tomás y col., 2004; Pastor y col., 1996; Keating y White, 1990; Burns y Noble, 1985; Itzutsu y Wani, 1985).
- Conocimiento de la estructura del alimento: los estudios reológicos pueden aportarnos información que facilite una mejor comprensión de la estructura o de la distribución de los componentes moleculares de los alimentos, especialmente de los componentes macromoleculares, así como, mediante el empleo de ecuaciones reológicas fundamentales, predecir los cambios estructurales que se produzcan

durante los procesos de acondicionamiento y de elaboración a los que son sometidos (Rood y col., 2000; Duran y col., 1994).

- Control de calidad: las medidas de la viscosidad en continuo son cada vez más importantes en muchas industrias con el objeto de controlar el buen funcionamiento del proceso productivo, así como la calidad de las materias primas, productos intermedios y finales.

IV.1.2 Comportamiento reológico de los sistemas alimenticios

Las características texturales de los alimentos están relacionadas con el comportamiento reológico de los mismos. La textura es uno de los factores principales de calidad de un alimento junto con la apariencia, el *flavor* y el aporte nutricional (Meilgaard y col., 1987).

La textura se define como todos los atributos mecánicos, geométricos y de superficie de un producto, perceptibles mediante receptores mecánicos, táctiles, visuales y auditivos. La misma se manifiesta cuando el alimento sufre una deformación (Rosenthal, 1999). Si bien la textura es percibida, es una experiencia humana que surge de la interacción con el alimento.

Los atributos mecánicos de la textura indican el comportamiento del alimento ante la deformación o el esfuerzo. Ellos son dureza, firmeza, adhesividad, cohesividad, gomosidad, elasticidad, resistencia y viscosidad. Los atributos geométricos están relacionados con la forma o la orientación de las partículas del alimento, entre los que se encuentran la porosidad, la cristalinidad, la escamosidad y la granulosidad. Los atributos de superficie son los indicadores de las características del alimento y están relacionados con la percepción del fenómeno de tensión superficial. Ejemplo de ellos serían la humedad, la oleosidad y la sequedad (Meilgaard y col., 1987).

No sólo los alimentos sólidos tienen textura, sino también los semisólidos, líquidos y semilíquidos. Por lo general, cuando se trata de alimentos semisólidos, en vez de textura se habla de consistencia y en los líquidos, se hace referencia a la viscosidad.

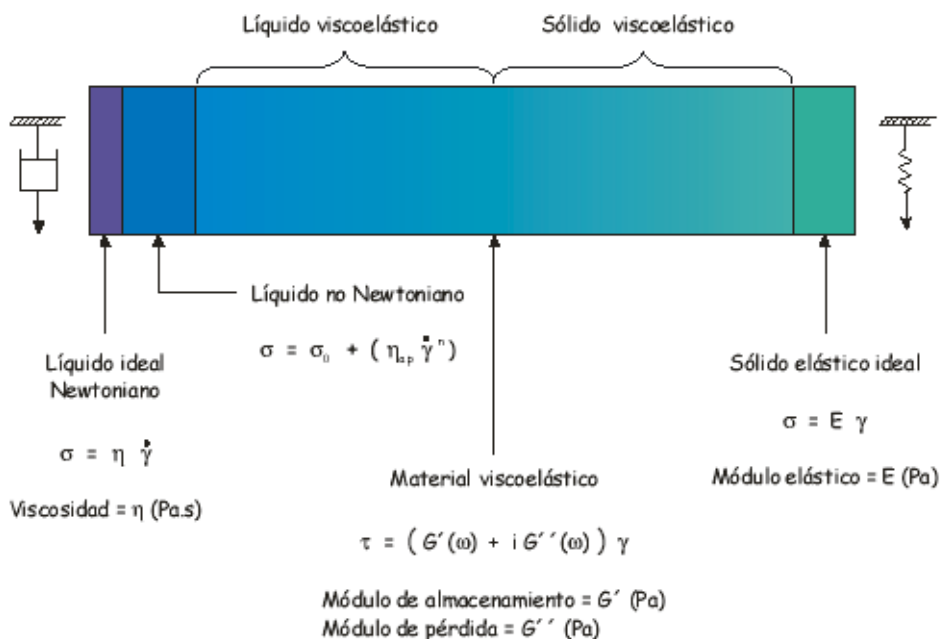
Los alimentos son materiales complejos cuyas características y propiedades, especialmente las mecánicas, dependen de su estructura, es decir, del arreglo espacial de

los elementos estructurales a escala microscópica, determinado por la composición química y las fuerzas físicas de interacción entre los mismos, existiendo una relación directa entre estructura y textura (Stanley y Tung, 1975).

Existen numerosos estudios reológicos efectuados en alimentos que muestran la gran diversidad de comportamientos mecánicos que presentan los mismos, directamente ligados a la amplia variación en sus estructuras (Dierckx y Huyghebaert, 2002; Arvisenet y Cayot, 2001; Wientjes y col., 2001, 2000; Rodd y col., 2000; Hill y col., 1995; Durán y col., 1994). Además, es sabido que las propiedades reológicas de los alimentos pueden estar afectadas por la variedad de sustancias sápidas que contienen, causando cambios en la percepción oral de la viscosidad y en la textura de los alimentos (Itzutsu y Wani, 1985). Por lo tanto, es importante realizar un análisis crítico del comportamiento mecánico de los alimentos a fin de correlacionar las determinaciones reológicas con las propiedades, no sólo estructurales, sino también sensoriales de los mismos.

En la Figura IV.1 se muestra un esquema del comportamiento mecánico de sistemas alimenticios (Martinez, 2005).

Figura IV.1. Espectro del comportamiento mecánico de sistemas alimenticios (Martinez, 2005).



Se denomina sólido elástico ideal a aquel material que tiene forma propia y se deforma bajo la aplicación de fuerzas externas, llegando a un nuevo estado de equilibrio. Para ello, el sólido almacena toda la energía que le es entregada para deformarlo. Cuando las fuerzas externas son removidas, el material recupera su forma original. Al hacerlo, libera toda la energía que fuera, previamente, almacenada.

Los líquidos, son aquellos materiales que no tienen forma propia ya que adoptan la forma del recipiente que los contiene y fluyen irreversiblemente bajo la acción de fuerzas externas (esfuerzo). Esto significa que toda la energía aplicada con el esfuerzo se disipa en el flujo.

Los líquidos se dividen en dos grupos: líquidos ideales Newtonianos y líquidos no Newtonianos. Los primeros son aquellos cuya viscosidad es independiente del esfuerzo o de la velocidad de corte aplicada, obedeciendo entonces su comportamiento reológico a la ley de Newton. Los segundos son aquellos cuya viscosidad depende del esfuerzo o de la velocidad de corte aplicada, obedeciendo, en general, su comportamiento, a la ley de la Potencia. A su vez, los líquidos no newtonianos tendrán un comportamiento dependiente del tiempo (fluidos reopécticos y tixotrópicos), o independiente del mismo (plásticos de Bingham, fluidos dilatantes y pseudoplásticos) (Schramm, 1994; Steffe, 1996), pudiendo, o no, presentar umbral de fluencia.

La mayoría de los alimentos presentan propiedades intermedias entre las de un sólido elástico y las de un líquido viscoso, es decir, se deforman debido a la aplicación de un esfuerzo, pero al retirar la fuerza aplicada, parte de la deformación sufrida por el material desaparece instantáneamente (energía elástica, componente elástica), mientras que otra parte lo hace con el tiempo o, en algunos materiales, no desaparece. Este comportamiento reológico de los materiales como respuesta al esfuerzo aplicado, es generalmente denominado viscoelasticidad (Schramm, 1994). Debido a este comportamiento, la deformación de un material viscoelástico como respuesta a un esfuerzo aplicado, no es totalmente instantánea, y parte de la misma ocurre en un tiempo finito y medible.

La diversidad de comportamientos de los materiales reales y su complejidad hacen que se recurra a modelos mecánicos para explicar su respuesta reológica. Los modelos permiten definir el comportamiento con ecuaciones matemáticas, combinando dos elementos: un elemento viscoso que se representa mediante un amortiguador en el que el pistón se mueve holgadamente dentro de un líquido newtoniano y cuyo comportamiento

queda definido por la viscosidad, y un elemento elástico que se representa mediante un resorte y cuyo comportamiento es descrito por una constante elástica según la ley de Hooke (Costell y col., 1997). De los modelos se desprenden un gran número de parámetros, los cuales podrán ser relacionados con la estructura del material (Moritaka y col., 2003; Nickerson y col., 2003; Grassi y col., 1996).

IV.1.3 Ensayos reológicos

En función de la dirección de la fuerza que se aplica sobre el producto, existen dos tipos de ensayos reológicos: uniaxiales (compresión, tracción o tensión) y tangenciales o de cizallamiento. Con estos ensayos pueden medirse el módulo de elasticidad normal o tangencial, dependiendo del tipo de fuerza aplicada.. Además hay ensayos reológicos que resultan ser una combinación de los primeros: flexión, torsión, punción, compresión con desplazamiento lateral, en los que el esfuerzo aplicado incluye los tensores en las tres dimensiones.

Los métodos o ensayos reológicos fundamentalmente estudian la evolución de tres variables, esfuerzo, deformación (o velocidad de corte, en el caso de líquidos) y tiempo, en condiciones experimentales en las cuales debe cumplirse una respuesta viscoelástica lineal. Por lo tanto, los ensayos pueden estudiar las relaciones esfuerzo / deformación (o velocidad de corte), esfuerzo / tiempo a deformación o velocidad de corte constante (ensayo de relajación del esfuerzo) y velocidad de corte / tiempo (ensayo de fluencia) (Costell y col., 1997). Trabajando en estas condiciones y, considerando que el esfuerzo aplicado es uniaxial o tangencial, es posible entonces aplicar los modelos mecánicos lineales que se ajustan por ecuaciones matemáticas características.

IV.1.3.1 Ensayos oscilatorios

Con un reómetro dinámico pueden realizarse dos tipos de ensayos: ensayos cuasiestáticos y ensayos oscilatorios, ya sea en la componente tangencial o en la componente normal, según las características del reómetro utilizado.

Los ensayos cuasiestáticos permiten predecir separadamente las características elásticas, viscoelásticas y de flujo viscoso (Jackman y Stanley, 1992), mientras que los ensayos oscilatorios otorgan datos de viscosidad y de elasticidad, relacionados, también, con el tiempo de respuesta (Schramm, 1994). Estos ensayos son usualmente utilizados para

determinar las propiedades del material en la región viscoelástica lineal, permitiendo caracterizar la microestructura sin interrupción de la misma durante el proceso (Khan y col., 1997). Trabajar en condiciones de viscoelasticidad lineal implica que los parámetros obtenidos en el ensayo sólo dependen de la naturaleza del material. En cambio, cuando los ensayos se realizan en condiciones no lineales, los parámetros obtenidos no sólo dependen de la naturaleza del material, sino también de la historia de deformación de la muestra (Peleg y Normand, 1983; Pollak y Peleg, 1980; Calzada y Peleg, 1978).

Dentro de los ensayos oscilatorios ó dinámicos se incluyen:

- el barrido de amplitud del estímulo (esfuerzo o deformación) a frecuencia constante, el cual se utiliza para determinar el intervalo de viscoelasticidad lineal;
- el barrido de frecuencia a amplitud del estímulo constante, comprendida en el intervalo de viscoelasticidad lineal, el cual permite la obtención del espectro mecánico o de frecuencias, que caracteriza la estructura del material.

Cuando se utiliza un reómetro dinámico de movimiento tangencial, la muestra se somete a un esfuerzo o a una deformación de cizalla que varía en forma armónica sinusoidal (Schramm, 1994). Por lo tanto existen dos posibilidades:

- imponer un esfuerzo y medir la deformación con la que responde el material, o
- imponer una deformación y medir el esfuerzo con el que responde la muestra.

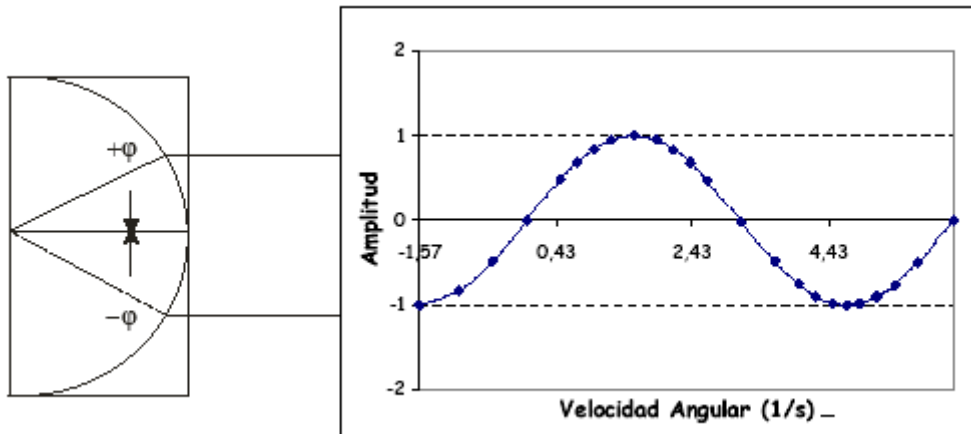
Si se aplica sobre la muestra una deformación sinusoidal (γ) en condiciones de viscoelasticidad lineal, se obtiene:

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t) \quad \text{Ecuación IV.1}$$

donde t es el tiempo, ω es la frecuencia de oscilación y γ_0 es la amplitud de la deformación sinusoidal aplicada.

Al realizar un ensayo oscilatorio con un reómetro dinámico, el rotor (plato, cono u otro), se mueve alternativamente con un pequeño ángulo de deflexión (ϕ) hacia la izquierda y hacia la derecha, con una dependencia sinusoidal con el tiempo (Figura IV.2).

Figura IV.2. Ensayo dinámico. Aplicación de una deformación o un esfuerzo sobre el sistema (Schramm, 1994).



Respuesta de los diferentes tipos de materiales durante los ensayos dinámicos

a) Sólido elástico:

Ante un esfuerzo aplicado, un sólido elástico responde a la Ley de Hooke y es representado mecánicamente a través de un resorte. Por lo tanto, en el caso de aplicar una deformación sinusoidal, expresada por la Ecuación IV.1, durante el ensayo dinámico y, según la Ley de Hooke, se obtiene la ecuación que describirá la onda del esfuerzo (τ) con la que responde el material a la deformación aplicada:

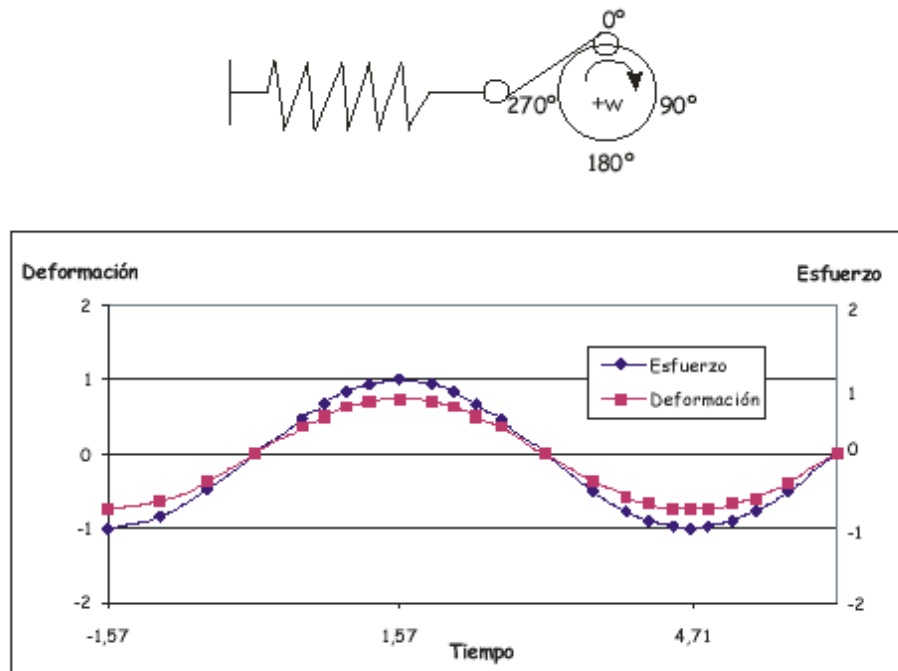
$$\tau = \gamma \cdot G \quad \text{Ecuación IV.2}$$

donde G es el módulo de elástico en el sentido tangencial. Entonces, reemplazando γ (Ecuación IV.1) en la Ecuación IV.2, se obtiene:

$$\tau = G[\gamma_0 \cdot \text{sen } \omega \cdot t] \quad \text{Ecuación IV.3}$$

Consecuentemente se observa que para un sólido elástico la deformación y el esfuerzo están en fase (Figura IV.3), es decir, el ángulo de desfase entre ambas ondas (δ) es nulo.

Figura IV.3. Ensayo dinámico. Respuesta del esfuerzo ante una deformación aplicada a un sólido elástico (Schramm, 1994).



b) Líquido viscoso ideal:

Ante un esfuerzo aplicado, un líquido viscoso ideal responde a la Ley de Newton y es representado mecánicamente mediante un amortiguador. Según la Ley de Newton:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} = \eta \frac{d\gamma}{dt} \tag{Ecuación IV.4}$$

donde η es la viscosidad newtoniana del líquido contenido en el amortiguador.

Derivando la deformación (Ecuación IV.1) respecto del tiempo se obtiene:

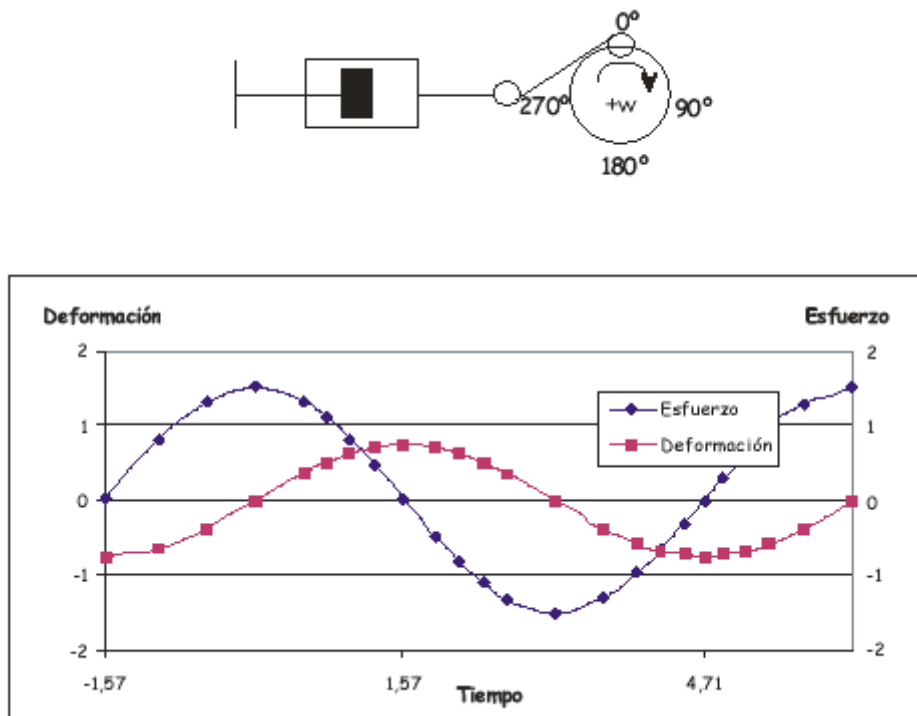
$$\frac{d\gamma}{dt} = \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) \tag{Ecuación IV.5}$$

y reemplazando en la Ecuación IV.4, resulta:

$$\tau = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \cos(\omega \cdot t) = \eta \cdot \omega \cdot \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \delta) \tag{Ecuación IV.6}$$

donde δ es igual a 90° , por ser éste el valor del ángulo de desfase entre la onda del estímulo aplicado y la onda con la que responde un líquido ideal a la deformación sinusoidal aplicada (Figura IV.4).

Figura IV.4. Ensayo dinámico. Respuesta del esfuerzo ante una deformación aplicada a un líquido Newtoniano (Schramm, 1994).



c) Materiales viscoelásticos

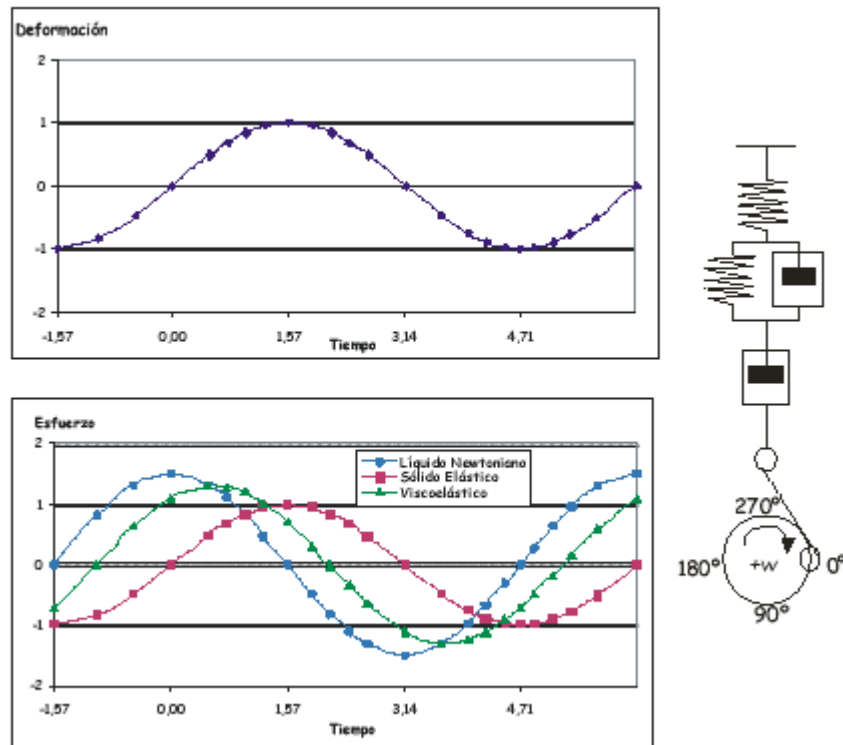
Los materiales viscoelásticos poseen propiedades que son intermedias entre las de un sólido elástico y las de un líquido viscoso, ambos ideales, por lo que el ángulo de desfase (δ) toma valores entre 0° y 90° (Figura IV. 5). Por lo tanto, se consideran las siguientes ecuaciones:

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t) \quad \text{Ecuación IV.7}$$

$$\tau = \tau_0 \cdot \text{cos}(\omega \cdot t) \quad \text{Ecuación IV.8}$$

donde ω (1/s ó rad/s) = $2 \cdot \pi \cdot f$, y f = frecuencia (Hz, ciclos/s)

Figura IV.5. Ensayo dinámico. Respuesta de un material viscoelástico ante la aplicación de una deformación sinusoidal (Schramm, 1994).



En el caso de los materiales viscoelásticos, es común utilizar el parámetro denominado módulo complejo (G^*), el cual se define como:

$$G^* = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad \text{Ecuación IV.9}$$

Esta relación (G^*) entre la amplitud del esfuerzo (τ_0) con el que la muestra responde a la deformación aplicada y la amplitud de dicha deformación (γ_0), representa la resistencia total del material a la deformación.

Los materiales viscoelásticos tienen su módulo complejo y su ángulo de desfase (δ) dependientes de la frecuencia. Por ello, para caracterizarlos, se requiere conocer cómo varían el módulo complejo y el ángulo de desfase de la onda con la frecuencia, es decir, realizar un barrido de frecuencia.

El módulo complejo también puede descomponerse en una componente real y en otra imaginaria, según (Schramm, 1994):

$$G^* = G' + i.G'' \quad \text{Ecuación IV.10}$$

donde:

$$G' = G^* \cdot \cos \delta = \tau_0/\gamma_0 \cdot \cos \delta = \text{módulo elástico ó de almacenamiento.}$$

$$G'' = G^* \cdot \sin \delta = \tau_0/\gamma_0 \cdot \sin \delta = \text{módulo viscoso ó de pérdida.}$$

El módulo elástico (componente en fase, G') está asociado con el almacenamiento y la recuperación de energía durante la aplicación periódica de la deformación y, por lo tanto, representa la componente elástica del material. Por el contrario, el módulo de pérdida (componente desfasada, G'') está asociado a la disipación de energía y, por lo tanto, representa la componente fluida del sistema ya que la disipación de energía está asociada al flujo.

En la mayoría de los casos, para alimentos sólidos y semisólidos, G'' es mucho menor que G' . Por consiguiente, G^* es aproximadamente igual a G' (Doublier y col., 1992).

La relación entre la componente viscosa y la componente elástica del material viscoelástico, G''/G' , es el valor de la tangente del ángulo de desfasaje entre las ondas ($G''/G' = \tan \delta$). Cuando en el material viscoelástico que está siendo evaluado, su componente viscosa es relativamente importante frente a su componente elástica, el valor de $\tan \delta$ tiende a 1 y, por lo tanto, la mayor parte de la energía utilizada para deformar el material se disipa en el flujo y el resto se almacena en la componente elástica del material.

Por el contrario, cuando el valor de $\tan \delta$ tiende a cero, significa que la componente elástica del material es relativamente más importante que la viscosa y, por lo tanto, el material viscoelástico evaluado tiene un comportamiento similar al de un sólido y, por lo tanto, las deformaciones serían esencialmente elásticas o recuperables (Rao, 1992).

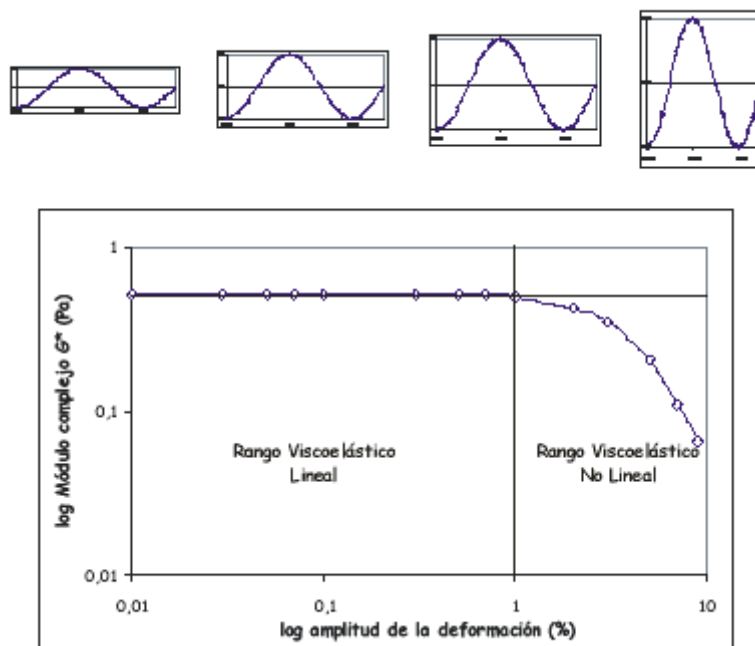
Si una sustancia es puramente viscosa, entonces: $\delta = 90^\circ$, $G' = 0$ y $G'' = G^*$.

Si una sustancia es puramente elástica, entonces: $\delta = 0^\circ$, $G'' = 0$ y $G' = G^*$.

Las ecuaciones descriptas son aplicables en el intervalo de viscoelasticidad lineal. Por lo tanto, antes de realizar cualquier ensayo dinámico para caracterizar un material, debe determinarse dicho intervalo. Si se llevara a cabo el ensayo oscilatorio fuera de dicho rango, no se dispondría de ecuaciones diferenciales lineales y la resolución sería compleja. Trabajar fuera del rango de viscoelasticidad lineal significa que la muestra se deformaría de tal forma que las uniones moleculares temporarias o los agregados se destruirían y la mayor parte de la energía adquirida se perdería irreversiblemente. En otras palabras, no se estaría evaluando la estructura (ensayo *at rest*), sino el comportamiento del material frente a las grandes deformaciones.

El límite entre el comportamiento lineal y no lineal del material se determina barriendo el módulo complejo (G^*) o bien el módulo elástico (G') en función de la amplitud de la deformación ó del esfuerzo sinusoidal aplicado, a frecuencia constante. Cuando el valor de G^* o de G' deja de ser constante, la muestra se encuentra en la zona no lineal (Figura IV.6). En realidad, dichos valores son constantes (independientes del estímulo aplicado) en la zona lineal porque esta última está determinada por la relación lineal entre la amplitud del esfuerzo aplicado al material y la deformación con la que este responde al estímulo.

Figura IV.6. Ensayo dinámico. Barrido de Amplitud de la deformación (Schramm, 1994).



La representación gráfica de ambos módulos (G' y G'') en función de la frecuencia de oscilación (barrido de frecuencia) determina el espectro mecánico dinámico del material. Este gráfico es muy útil ya que representa el comportamiento de la microestructura, es una “huella digital” del mismo. Ello significa que la respuesta obtenida sólo depende de la naturaleza del material y no de su historia de deformación. Por ello, para que esto se cumpla, debe realizarse el barrido de frecuencia en condiciones de viscoelasticidad lineal.

Los ensayos dinámicos son ampliamente utilizados en la caracterización reológica de distintos alimentos, debido a varias ventajas, entre las cuales se pueden mencionar (Schramm, 1994; Rao, 1992):

- Son ensayos relativamente rápidos, con mínimos cambios químicos y físicos.
- Brindan información muy precisa sobre fenómenos estructurales (sensibilidad elevada a la transición vítrea, al entrecruzamiento de polímeros, a la separación de fases, etc.) trabajando en el rango de viscoelasticidad lineal.
- Son no destructivos y sus resultados pueden compararse con valores teóricos.
- Son especialmente apropiados para caracterizar mecánicamente materiales viscoelásticos.
- Las propiedades mecánicas pueden determinarse a varias frecuencias y temperaturas en un tiempo relativamente corto.
- Algunos estudios muestran correlación significativa entre los ensayos sensoriales y los dinámicos.
- Los resultados permiten realizar suposiciones estructurales.

IV.1.4 Propiedades estructurales de geles

La terminología ‘gel’ define un conjunto de sustancias que exhiben propiedades semejantes a las de un sólido aún estando constituido por una gran cantidad de solvente (Doublier y col., 1992).

En función del proceso de gelificación, los geles se clasifican en geles químicos, debido a que los polímeros que los constituyen interaccionan entre sí a través de entrecruzamientos químicos mediados por reacciones covalentes, y en geles físicos o redes, por poseer entrecruzamientos físicos a través de interacciones polímero – polímero del tipo

puente de hidrógeno o fuerzas electroestáticas (Doublier y col., 1992). Debido a que la mayoría de los geles alimenticios pertenecen a la segunda categoría, a continuación, solo se hará hincapié en este tipo de geles. Los polímeros responsables del entrecruzamiento en sistemas alimenticios son polisacáridos y proteínas, y el solvente, agua, que puede o no contener solutos diversos.

Cabe destacar que el tiempo de vida de los entrecruzamientos depende de la naturaleza de las zonas de unión. Los polímeros entrecruzados mediante enlaces covalentes, poseen estructuras permanentes, independientemente de la cantidad de solvente. En cambio, en los geles físicos, la estabilidad de los entrecruzamientos depende de la conformación de las cadenas poliméricas y/o de los agregados, es decir, de la extensión de asociaciones entre segmentos de cadenas ordenados que aportan organización estructural (Biliaderis, 1994). Si bien, el entrecruzamiento que presentan los geles físicos no es permanente, estos materiales presentan comportamiento sólido ya que la escala de tiempo de observación es más corta que el tiempo de vida del entrecruzamiento (Doublier y col., 1992).

El proceso de gelificación de los geles físicos involucra la formación de una red tridimensional que se extiende a través de todo el sistema (componente elástica) atrapando el medio disperso (líquido, componente viscosa) dentro de la misma. En la red, las macromoléculas están asociadas a través de regiones denominadas, zonas de unión, las cuales, en conjunto, conforman los entrecruzamientos. En función del comportamiento macroscópico de los geles, el proceso de entrecruzamiento da lugar a la formación de geles 'verdaderos' o de geles 'débiles'. Los geles 'verdaderos' se auto-soportan originando una red tridimensional, mientras que los geles 'débiles' presentan una menor componente elástica. En estos últimos, el solvente está bastante libre para moverse rápidamente a través de los intersticios de la red, de manera que si se aplican esfuerzos, no necesariamente altos, a estos geles, los mismos fluyen y, aunque pueden formar una tenue red, la misma es fácilmente disgregable con mínimas deformaciones aplicadas (Rodríguez-Hernández y col., 2003; Doublier y col., 1992).

La red tridimensional puede formarse por gelificación de polímeros desordenados, como es el caso de pectinas, goma gellan, gelatina, almidón, o por interacciones específicas entre partículas más densas y menos flexibles, por ejemplo, proteínas globulares térmicamente desnaturalizadas, agregados proteicos de acción enzimática o química (Clark y Ross-Murphy, 1987). En el primer caso, la gelificación es inducida por el descenso de la

temperatura (gelatina, almidón) y por cambios en la composición del solvente debido al agregado de iones específicos (pectina de bajo metoxilo, goma gellan), dando como resultado geles homogéneos. En el segundo caso, la transición es inducida por el incremento de la temperatura o por medios enzimáticos, formándose geles particulados.

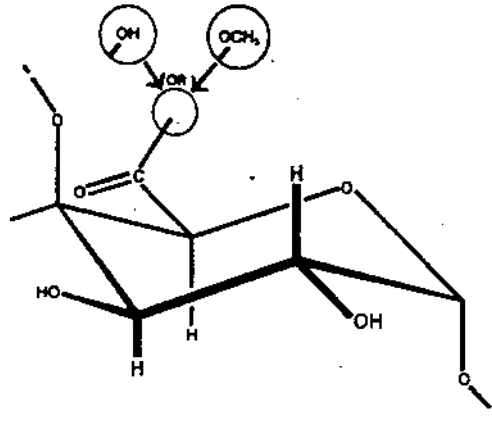
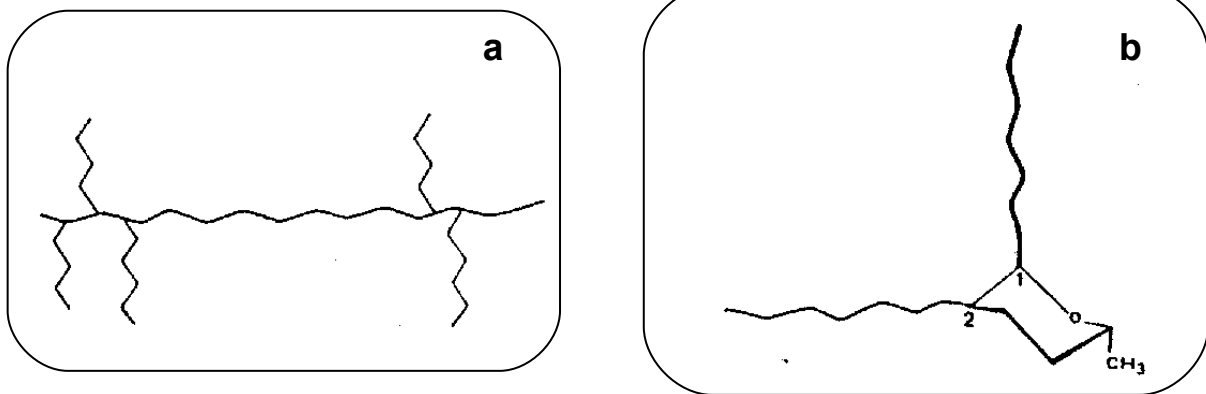
Los factores que afectan las asociaciones entre las cadenas de los polímeros son la regularidad estructural de las cadenas, la naturaleza y extensión de las sustituciones, la calidad del solvente y la presencia de co-solutos específicos. La densidad y el tiempo de vida de las zonas de unión gobernarán las propiedades mecánicas de la red y su respuesta a la aplicación de esfuerzos o deformaciones (Biliaderis, 1994).

A continuación se describirán las propiedades estructurales de los geles formados por los hidrocoloides utilizados en el presente estudio, es decir, pectina de bajo metoxilo y goma gellan.

IV.1.4.1 Pectinas. Pectina de bajo metoxilo

Las pectinas son polisacáridos que se obtienen de plantas comestibles, usualmente frutas cítricas o manzanas. Todas las plantas superiores contienen sustancias pécticas, las cuales, en combinación con la celulosa, son responsables de las propiedades estructurales de frutas y vegetales (May, 1992).

La estructura química de las pectinas depende de la fuente de donde se las extraiga, de su localización y del método de extracción. Su estructura consiste, fundamentalmente, en unidades de ácido α -D-galacturónico polimerizado a través de enlaces α -1,4 (Figura IV.7). Esto constituye la cadena de homogalacturonano de la pectina, la cual estará esterificada en mayor o menor grado por metanol en el C-6 (carboxílico). La cadena principal, ocasionalmente, está interrumpida por moléculas de β -L-ramnosa que se alternan con las de ácido galacturónico. Dichas interrupciones usualmente se denominan *kinks*. Este ramnogalacturonano está ramificado con cadenas constituidas por arabinosa, galactosa y xilosa, formando las llamadas *hairy regions* (Figura IV.8). Las uniones de estas últimas son más o menos lábiles.

Figura IV.7. Unidad de ácido galacturónico de una molécula de pectina (May, 1992).**Figura IV.8.** Esquema de una cadena de pectina con cadenas laterales (panel a) y con una unidad de ramnosa inserta (panel b).

Las pectinas directamente extraídas de las plantas poseen un alto grado de esterificación, el cual indica que el porcentaje de unidades de ácido galacturónico esterificado con metanol es superior al 50% y, por lo tanto, se las denomina pectinas de alto metoxilo. Estas pectinas son ideales para mantener los sólidos en suspensión en jaleas y mermeladas, jugos de fruta, productos lácteos fermentados (May, 1992).

Sin embargo, para ampliar el rango de aplicaciones de las pectinas, se reduce el grado de esterificación mediante hidrólisis ácida o básica, obteniéndose las pectinas de bajo metoxilo. En el caso de emplearse amonio en la hidrólisis, algunos de los grupos éster se convierten en amidas (-CONH₂) dando lugar a pectinas amidadas.

El grado de esterificación influye sobre las propiedades de las pectinas, especialmente sobre la solubilidad y las características de gelificación. En las pectinas de alto metoxilo, el grado de esterificación controla la velocidad de gelificación, mientras que en las de bajo metoxilo, controla la reactividad con el ión calcio, siendo las pectinas amidadas más tolerantes a las variaciones en el nivel de calcio (May, 1992).

Algunas características principales de las pectinas de bajo metoxilo se describen a continuación debido a que fue uno de los hidrocoloides estudiados en el presente trabajo.

Solubilidad

La distribución de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de la molécula de pectina determina su solubilidad. La presencia de cadenas laterales (unidades de arabinosa, galactosa y xilosa) previene la asociación facilitando la hidratación de las pectinas. Cuanto mayor es el grado de esterificación, mayor es la solubilidad de la pectina en agua fría. Para asegurar una completa dispersión y evitar la formación de grumos, es posible dispersar la pectina en un jarabe, por ejemplo de alta fructosa, ya que presenta baja solubilidad en soluciones azucaradas concentradas (May, 1992).

Estabilidad en solución acuosa

La máxima estabilidad de la pectina se encuentra alrededor de pH 4. La presencia de azúcares en solución ejerce un efecto protector, mientras que el aumento de la temperatura acelera la degradación de la pectina.

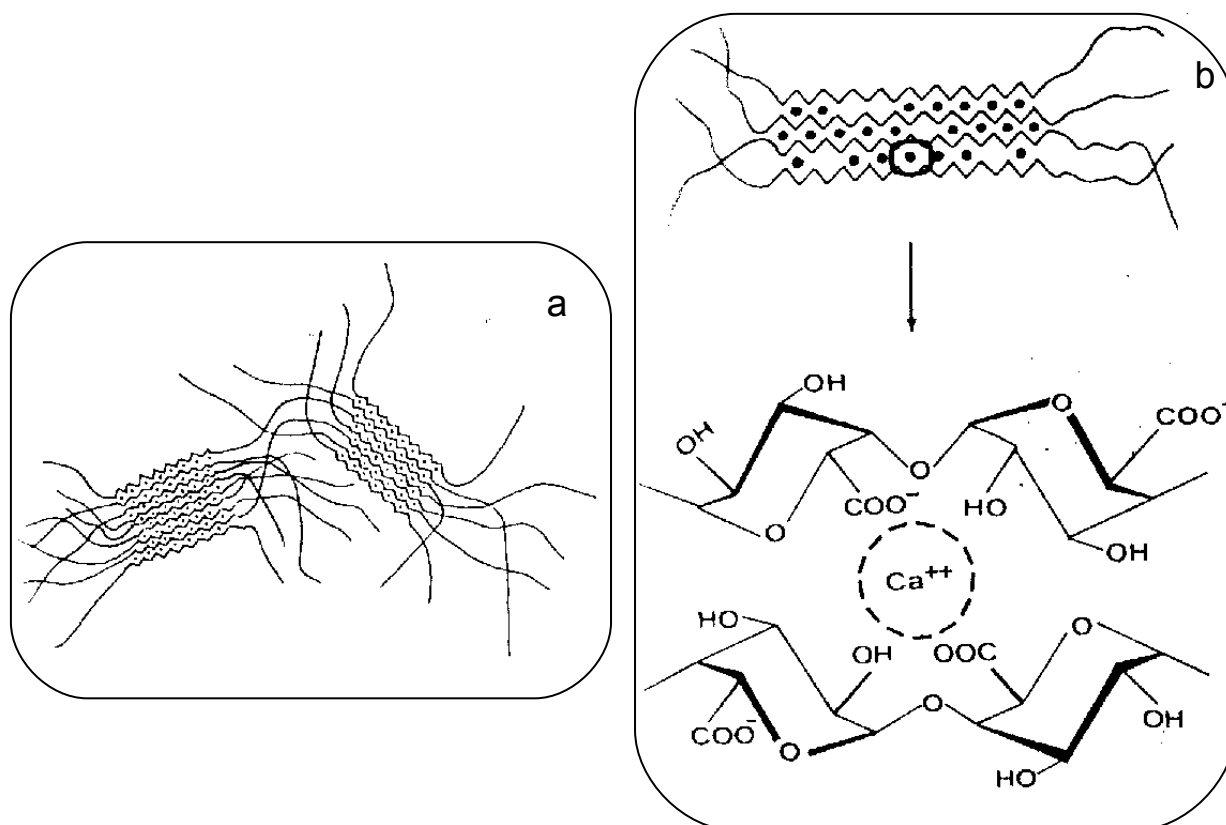
El rango de pH óptimo está comprendido entre 2,5 y 5,5. A pH muy ácidos y a elevadas temperaturas se hidrolizan los enlaces glicosídicos. A pH alcalino, la pectina disminuye su grado de esterificación rápidamente, pudiéndose degradar a temperatura ambiente. La degradación puede ocasionar pérdidas de la capacidad viscosante y del poder gelificante.

Mecanismo de gelificación. Propiedades de los geles de pectina de bajo metoxilo

Las pectinas de bajo metoxilo, independientemente del grado de amidación, forman geles en presencia de iones calcio u otros iones divalentes. Se cree que la gelificación ocurre a través de un mecanismo denominado 'caja de huevo' (*egg box*) (Figura IV.9), en el

cual, los iones calcio favorecen la formación de zonas de agregación. Las mismas consisten en la asociación de segmentos homogéneos constituidos por ácido galacturónico no esterificado (más de diez monómeros seguidos) dando lugar a una conformación similar a un 'bucle'. Los iones calcio estabilizan las asociaciones, no sólo por interacción electrostática con los grupos carboxilo de los ácidos glucurónicos no esterificados, sino también porque los oxígenos hidroxílicos (O-2) de las dos cadenas apuestas y las moléculas de agua (solvente) actúan como agentes quelantes, coordinando los iones. De esta manera, los cationes llenan los espacios formados entre las dos cadenas de conformación tipo 'bucle', dando como resultado una estructura semejante a una 'caja de huevo' (Axelos y Thibault, 1991).

Figura IV.9. Esquema de la red molecular de un gel de pectina de bajo metoxilo, modelo 'caja de huevo' (panel a), y detalle de la coordinación del calcio en la misma (panel b).



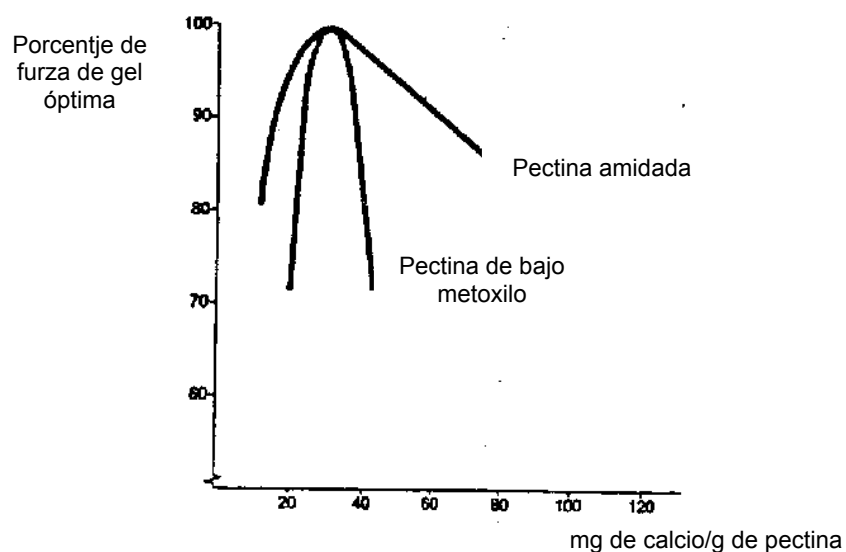
La cantidad de zonas de unión se reduce por la aparición de las unidades de ramnosa entre los monómeros de ácido galacturónico (ramnogalacturonano) y por la cantidad de segmentos no esterificados. Por lo tanto, los geles serán más rígidos cuanto

menor sea el grado de esterificación y cuanto mayor sea la velocidad de reacción de los iones calcio.

Los factores más importantes que gobiernan el proceso de gelificación de la pectina de bajo metoxilo son: el contenido de calcio, el nivel de secuestrante de calcio, el pH, la concentración de sólidos solubles y la inherente reactividad de la pectina. Estos factores afectan, no sólo la fuerza del gel, sino también la temperatura de gelificación. Cada composición particular presenta una temperatura de gelificación específica.

La reactividad de la pectina de bajo metoxilo frente al calcio depende principalmente del grado de esterificación, del grado de amidación y del grado de uniformidad de las moléculas de pectina. En la Figura IV.10 se observa un ejemplo de la dependencia de la fuerza de un gel con 1% de pectina de bajo metoxilo comercial en función del contenido de calcio. No se observa gelificación por debajo de un cierto contenido de calcio. A partir de ese valor, la fuerza del gel se incrementa con el aumento de la concentración del ión divalente, alcanzando un valor máximo, luego del cual declina. A lo largo de ese rango de concentraciones, la temperatura de gelificación se incrementa desde un valor próximo al ambiental hasta ser cercana al punto de ebullición cuando la fuerza del gel es máxima. Para obtener geles elásticos, no quebradizos y sin sinéresis, es esencial trabajar con concentraciones inferiores al máximo de la curva. Una concentración de calcio en exceso, puede ocasionar la precipitación de la pectina y, por lo tanto, la destrucción de toda la red (Farré y col., 2002).

Figura IV.10. Efecto del nivel de calcio sobre la fuerza de gel de pectina de bajo metoxilo (May, 1992).



Es importante destacar que el grado de amidación de las pectinas amidadas tiene poca influencia sobre la fuerza del gel formado (Figura IV.10). La amidación aumenta la capacidad gelificante de las pectinas de bajo metoxilo. Las pectinas amidadas necesitan menos calcio para gelificar y son menos proclives a precipitar en presencia de altas concentraciones de calcio (Axelos y Thibault, 1991).

La presencia de secuestrantes de calcio juega un rol importante en la gelificación ya que, su ausencia podría llegar a impedir la formación del gel, mientras que el incremento de su concentración ocasionaría que el sistema gelificara rápidamente a bajas temperaturas. Por lo tanto, en el proceso de gelificación, no es importante el contenido total de calcio sino la cantidad de calcio disponible para la pectina. Algunos secuestrantes de calcio pueden ser los ácidos de las frutas, los azúcares y los polioles. Es importante destacar que para la elaboración de una mermelada conteniendo moderada cantidad de azúcares a pH 3, no es necesaria la incorporación de secuestrantes para favorecer la gelificación, ya que los mismos son provistos por la fruta (May, 1992).

La pectina es un ácido con un valor de pKa, aproximadamente, 3,5. El incremento de la relación de grupos ácido disociados / no disociados, generalmente hace que la molécula de pectina sea más hidrofílica, por lo tanto, la tendencia a gelificar disminuirá con el incremento del pH.

El descenso de la actividad de agua debido al agregado de azúcares, favorece la gelificación, de manera tal que se necesite menor contenido de calcio y menor reactividad de la pectina, sin embargo, en presencia de sorbitol, disminuye la estabilidad del gel (Fu y Rao, 1999). Este comportamiento se debe a que en presencia de azúcares, el solvente disponible para la pectina es menor, por lo tanto la misma tiende a gelificar. Grosso y Rao (1998) observaron que el efecto de los diferentes tipos de azúcares está relacionado con las características estructurales de los mismos, es decir, con el acceso de los azúcares al interior de las cadenas de pectina y su asociación con segmentos de pectina de similar polaridad.

El conocer las propiedades básicas de la pectina de bajo metoxilo hace que el empleo de las mismas sea muy versátil.

Aplicaciones

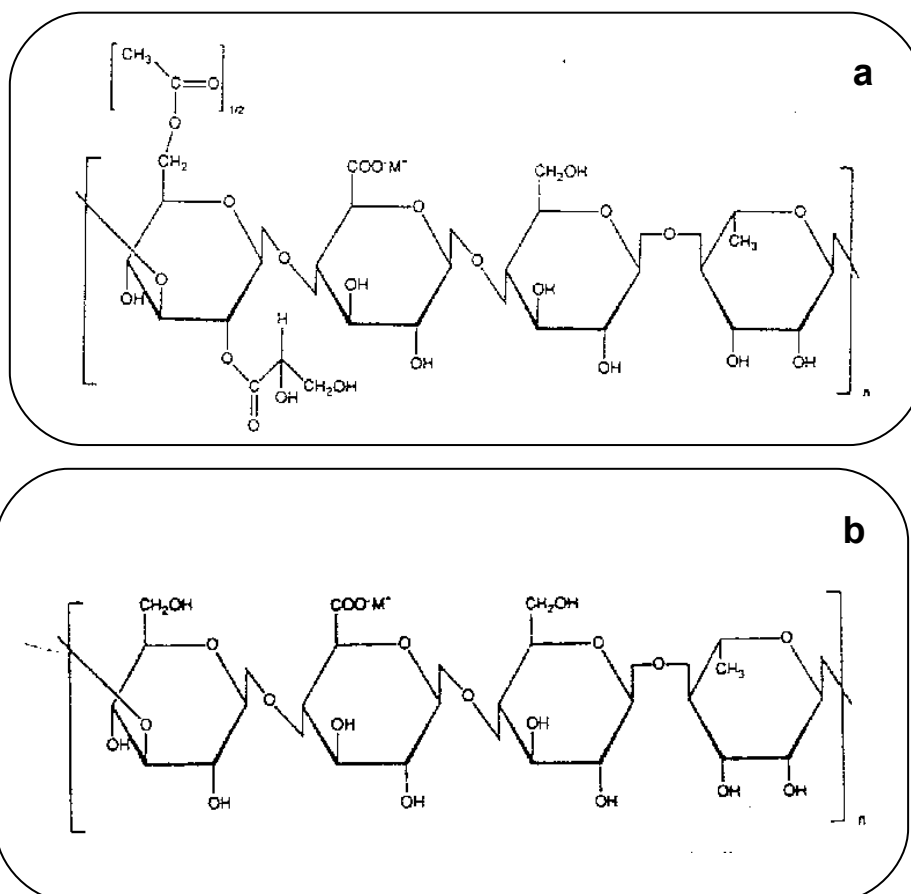
La pectina de bajo metoxilo se emplea generalmente para impartir textura de gel a alimentos, principalmente frutales. Es importante destacar que forma geles termorreversibles, por lo tanto puede emplearse en procesos tales como horneado, pasteurización o esterilización, congelación, utilización de microondas. Se utiliza en la elaboración de postres lácteos y yogures, aprovechando la presencia de calcio en la leche, mermeladas, jaleas, salsas, rellenos frutales; jaleas y mermeladas de reducido contenido de azúcares junto con polioles; glaseados (May, 1992).

IV.1.4.2 Goma gellan

La goma gellan es un polisacárido extracelular producido por la fermentación aeróbica de la bacteria *Pseudomonas elodea*. Tiene la capacidad de producir geles a bajas concentraciones, cuando se enfrían las soluciones calientes conteniendo la goma.

La estructura molecular de la goma gellan es una cadena lineal aniónica compuesta por unidades repetitivas de un tetrámero constituido por 1,3- β -D-glucosa, ácido 1,4- β -D-glucurónico, 1,4- β -D-glucosa y 1,4- β -D-ramnosa (Figura IV.11, panel a). El polímero directamente secretado por el microorganismo contiene 1,5 sustituyentes por unidad de tetrasacárido, los cuales son un éster L-glicérico unido al O-2 de la β -D-glucosa, y un éster acético sobre el O-6 del mismo residuo de glucosa. Estos sustituyentes influyen sobre las características del gel, ya que obstaculizan la asociación entre cadenas. La hidrólisis de la goma gellan produce la eliminación de dichos sustituyentes formando un producto bien definido, goma gellan desacetilada (Figura IV.11, panel b), el cual puede formar geles termorreversibles, duros y quebradizos aún a bajas concentraciones (Durán y col., 1994; Gibson, 1992). El control de la esterificación permite desarrollar productos nuevos o modular las propiedades de los existentes (Dentini y col., 1999).

Figura IV.11. Estructura molecular de una unidad de goma gellan sustituida (panel a) y sin sustituir (panel b). (Gibson, 1992).



Solubilidad

La presencia de iones divalentes en el polisacárido inhibe la hidratación, por lo tanto es necesaria la dispersión del mismo en agua caliente con alta velocidad de agitación. Los iones monovalentes también dificultan la hidratación, pero a niveles mucho más elevados que los divalentes.

Estabilidad en solución acuosa

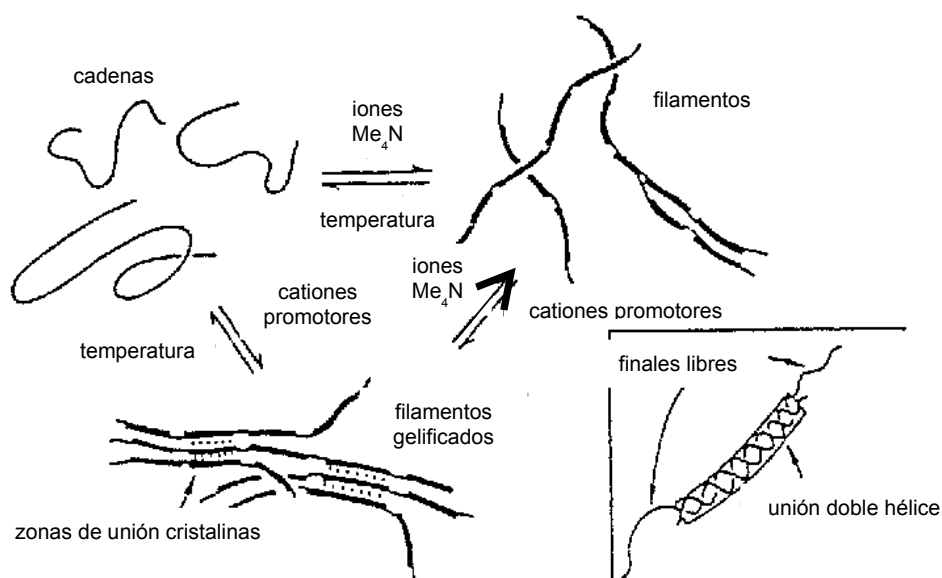
La goma gellan puede sufrir degradación por hidrólisis a altas temperaturas, especialmente en condiciones ácidas, reduciéndose la fuerza del gel. Sin embargo, una solución de goma gellan a pH 3,5 puede mantenerse a 80°C por una hora con mínimo deterioro de la calidad final del gel (Gibson, 1992). Esta característica es importante tenerla en cuenta para la elaboración de productos frutales (Durán y col., 1994).

Mecanismo de gelificación. Propiedades de los geles de goma gellan

El mecanismo de gelificación no está muy bien definido, pero algunos autores sugieren que la gelificación ocurre inicialmente por la formación de dobles hélices seguida por la asociación de las mismas. Las moléculas de goma gellan, en solución acuosa a alta temperatura, se encuentran en forma de espiral, desordenadas. Al enfriar la solución, adquieren una conformación de doble hélice a una cierta temperatura. La transición no necesariamente conduce a una gelificación macroscópica, es necesaria la presencia de cationes específicos como potasio, calcio o cesio, y de suficiente cantidad de polímero, para que las dobles hélices formen densos agregados tipo 'vara' dando como resultado un gel macroscópico (Ikeda y col., 2004; Milas y Rinaudo, 1996; Gibson, 1992; Chandrasekaran y col., 1988).

Gunning y Morris (1990) sugirieron un modelo denominada 'fibroso' en el cual, en ausencia de iones promotores de la gelificación, el calentamiento seguido por el enfriamiento favorecen la generación de fibras debido a la formación de dobles hélices entre los extremos de moléculas vecinas (Figura IV.12), las cuales, en presencia de cationes, se asociarán dando lugar a la formación de un gel. En base a este modelo, la elasticidad que presentan los geles de goma gellan se originaría por el estiramiento y el encogimiento de las hebras fibrosas (Ikeda y col., 2004).

Figura IV.12. Modelo de gelificación de goma gellan (Gibson, 1992).



Un estudio por difracción con rayos X (Upstill y col., 1986) indicó que la estructura molecular de un gel de goma gellan, formado en presencia de iones potasio, está estabilizada por enlaces puente hidrógeno entre las cadenas del polisacárido. Un ión potasio

se asocia con el grupo carboxilato de cada unidad de tetrasacárido y está coordinado por seis ligandos de las dos cadenas de la doble hélice, los cuales incluyen dos átomos de oxígeno del carboxilato, un grupo hidroxilo en una cadena, dos grupos hidroxilo en la otra cadena y una molécula de agua cristalina. Este arreglo estructural es responsable de la alta estabilidad de la doble hélice de goma gellan y persistiría cuando el polímero está deshidratado. Al disolverlo en agua por agitación a altas revoluciones por minuto, sería necesario un calentamiento subsiguiente hasta 85-90°C para separar las macromoléculas asociadas por los iones monovalentes, permitiendo así que luego, durante el posterior enfriamiento, sea el ión calcio el que se acomode entre las estructuras macromoleculares, conduciendo a la gelificación (Jampen y col., 2000).

La gelificación depende de la fuerza iónica y de la naturaleza del catión, siendo los cationes divalentes, como el calcio, más efectivos que los monovalentes, como potasio y cesio, para formar geles (Ikeda y col., 2004; Rodríguez-Hernández y col., 2003). En ausencia de calcio se forma un gel muy débil, mientras que a bajas concentraciones del mismo, se incrementa la dureza del gel alcanzando un máximo y luego decae con el aumento de la concentración del catión. La firmeza muestra un incremento y decrecimiento simétrico con el aumento de la concentración de calcio. Por otra parte, el aumento de la concentración del catión produce geles más quebradizos, menos elásticos y con menos fuerza, lo cual puede ser debido a la formación de fuerzas repulsivas en las zonas de unión a medida que el calcio va llenando los sitios aniónicos del polímero o, a la formación de un número de núcleos desproporcionado a altas temperaturas, dando como resultado una red débil durante el enfriamiento (Nickerson y col., 2003; Gibson, 1992).

Nickerson y col. (2003) sugirieron que hay tres iones calcio involucrados en cada zona de unión de dos cadenas adyacentes de doble hélice de hebras de goma gellan por sección de doble hélice.

Los geles formados a temperatura ambiente por adición de iones monovalentes o divalentes tienden a ser inestables y exhibir sinéresis. Se obtiene mejor calidad de geles si se los prepara por enfriamiento de una solución caliente de goma gellan.

La temperatura de gelificación depende de la naturaleza y de la concentración de los cationes y, en menor medida, de la concentración de la goma. Se observa un incremento de la temperatura debido al aumento de la concentración del catión.

La fuerza, la dureza, la rigidez, la adhesividad y el comportamiento elástico del gel de goma gellan se incrementan con la concentración del hidrocoloide (Rodríguez-Hernández y col., 2003; Durán y col., 1994). Por otra parte, la textura del mismo se mantiene constante en el rango de pH de los alimentos (Gibson,1992).

El descenso de la actividad de agua debido al agregado de concentraciones mayores al 40% de sacarosa tiene un marcado efecto sobre la textura de los geles de goma gellan, ya que los mismos resultan ser menos firmes y quebradizos, y más elásticos. En cambio, altas concentraciones de pequeñas moléculas de azúcar interfieren menos que la sacarosa en la gelificación de goma gellan, pero incrementan la fuerza del gel (Bayarri y col., 2003; Gibson,1992).

Aplicaciones

La goma gellan posee potencial aplicación en alimentos debido a que es compatible con los ingredientes alimenticios y, además, es fácil incorporarla en los procesos existentes. En general se la emplea en la elaboración de aspics, postres gelificados, jugos de bajas calorías, jaleas, mermeladas, rellenos de confitería, postres lácteos, rellenos frutales de tartas, malvaviscos, glaseados (Durán y col., 1994; Gibson,1992).

Es una ventaja el empleo de goma gellan en los alimentos debido a sus estabilidades térmica y frente a ácidos. Además, gracias a su eficiencia como agente gelificante, se la emplea en menor concentración que otros hidrocoloides (Gibson,1992).

IV.1.5 Objetivos

En el presente capítulo se analizó la influencia de la presencia de glucosa y de su combinación con xilitol y aspartamo, así como de la naturaleza de los hidrocoloides gellan y pectina de bajo metoxilo, sobre las propiedades reológicas de los geles formados.

Los resultados obtenidos en el Capítulo III acerca de las propiedades sensoriales de los sistemas conteniendo hidrocoloides indicaron, entre otros factores, que la estructura de los geles que forman en presencia de distintos edulcorantes juega un rol importante en la percepción del gusto dulce (sección III.3.2). Por lo tanto, la información obtenida también aportará datos para hallar una posible correlación entre las propiedades sensoriales y reológicas de los geles estudiados.

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Formulación de los sistemas

IV.2.1.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica, con excepción de los reactivos de la marca Gelfix, Degussa y Kelcogel, que fueron de grado alimenticio. Los mismos se detallan a continuación:

- Sorbato de potasio (Sigma)
- Ácido cítrico anhidro (Anedra)
- Glucosa (Anedra)
- Aspartamo (Gelfix)
- Xilitol (Gelfix)
- Cloruro de calcio dihidratado (Anedra)
- Goma gellan (desacetilada) (Kelcogel)
- Pectina de bajo metoxilo (17-20% de amidación, 26-31% de esterificación) (Degussa)

IV.2.1.2 Composición de los sistemas

La composición de los diferentes sistemas se muestra en la Tabla IV.1. Cabe destacar que los mismos coinciden con los estudiados en el Capítulo III, sección III.2.1.2.b, por lo tanto, con fines prácticos se mantuvo su nomenclatura. Las especificaciones de su composición se encuentran detalladas en dicha sección.

Tabla IV.1. Composición de los sistemas modelo (% p/p).

Composición (% p/p)					
Sistemas	Glucosa	Xilitol	Aspartamo	Goma gellan	Pectina de bajo metoxilo
III.N	10,00	-	-	0,150	-
III.Ñ	10,00	-	-	-	1,000
III.P	22,00	-	-	0,150	-
III.Q	22,00	-	-	-	1,000
III.S	10,00	11,00	-	0,150	-
III.T	10,00	11,00	-	-	1,000
III.V	10,00	11,00	0,050	0,150	-
III.W	10,00	11,00	0,050	-	1,000
III.Y	10,00	11,00	0,500	0,150	-
III.Z	10,00	11,00	0,500	-	1,000

IV.2.2 Metodología para la elaboración de los sistemas

Para la fabricación de los sistemas se utilizó la metodología explicada en la sección III.2.2.2, con excepción del proceso de dosificación de los mismos. Anteriormente a realizar dicho proceso, se aplicó vacío a los sistemas a fin de eliminar las burbujas que pudieran haberse generado durante la agitación. A continuación, se dispensaron 10,00 g de cada sistema en placas de Petri de 63 mm de diámetro y se colocaron sobre una bandeja nivelada, a 25°C, para lograr la gelificación. Luego, se ubicaron las placas en desecadores con humedad controlada mediante el empleo de una solución saturada de sulfato de potasio (actividad de agua 0,97). Los desecadores fueron colocados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en una cámara de convección forzada a temperatura constante.

IV.2.3 Metodología para la obtención de los parámetros reológicos de los sistemas

La medición de las propiedades viscoelásticas se realizaron a 37°C, luego de 24 h y no más de 48 h de la elaboración de los sistemas. Para ello se utilizó un reómetro de esfuerzo tangencial controlado (Paar Physica MCR 300, Antón Paar GMBH, Germany) (Figura IV.13). Se trabajó con geometría de cono y plato de 24,94 mm de diámetro y un ángulo de 2° (sensor CP25-2).

La cantidad de sistema dosificado en cada placa aseguró contar con un espesor de muestra al menos diez veces menor al diámetro del sistema sensor utilizado.

Figura IV.13. Reómetro Dinámico Paar Physica CR 300 (Antón Paar GMBH, Germany).



La plataforma (fija) donde se apoya la muestra a medir posee un controlador de temperatura por sistema Peltier (TEK 150P-CF), conectado a un baño termostático (Viscotherm VT2, Physica, Germany).

Cada muestra se colocó sobre la platina, apoyándose, a continuación, el cono sobre la misma según se fijaba desde el software del equipo. Durante el proceso de medición, cada muestra debió alcanzar un estado de verdadero o pseudo equilibrio. Por lo tanto, para evitar su deshidratación durante la medición, se la aisló y se la mantuvo en una atmósfera húmeda mediante el uso de un anillo de acrílico provisto de una tapa metálica perforada para permitir la permanencia del sensor.

La zona o intervalo de viscoelasticidad lineal (LVR) de cada muestra, equilibrada a 37°C, fue primero determinada realizando un barrido del esfuerzo oscilatorio (τ) desde 0 hasta 30 Pa, a frecuencia constante de 0,1 Hz (0,63 rad/s de frecuencia angular, ω).

Se eligió una deformación constante del 0,5%, comprendida en el LVR, para obtener los espectros de frecuencia de los distintos replicados, con el objeto de caracterizar la estructura de los sistemas estudiados. Se determinó entonces, la evolución simultánea del módulo de almacenamiento (G'), del módulo de pérdida (G'') y de la tangente del ángulo de desfasaje de la onda oscilatoria ($\tan \delta = G''/G'$) en función del barrido de frecuencias desde 0,01 hasta 20 Hz (0,063 – 125,6 rad/s ó s^{-1} de ω).

Los barridos de frecuencia para cada muestra se realizaron al menos por cuadruplicado.

IV.2.4 Análisis de datos

Para cada uno de los barridos de frecuencia obtenidos se calculó el promedio de cada parámetro reológico (G' , G'' , $\tan \delta$). Además se promediaron los parámetros de las réplicas de cada uno de los sistemas.

Para establecer las diferencias significativas entre los promedios obtenidos de todos los sistemas, se realizó un análisis de varianza (Sokal y Rohlf, 1969). La significatividad estadística fue evaluada a un nivel del 5% ($\alpha=0,05$). En todos los casos en que se obtuvo efecto significativo se aplicó el test *a posteriori* de mínimas diferencias significativas, LSD (*least significant difference*) para identificar cuáles sistemas difirieron significativamente entre sí.

El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus para Windows, versión 3,0, 1997, Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA).

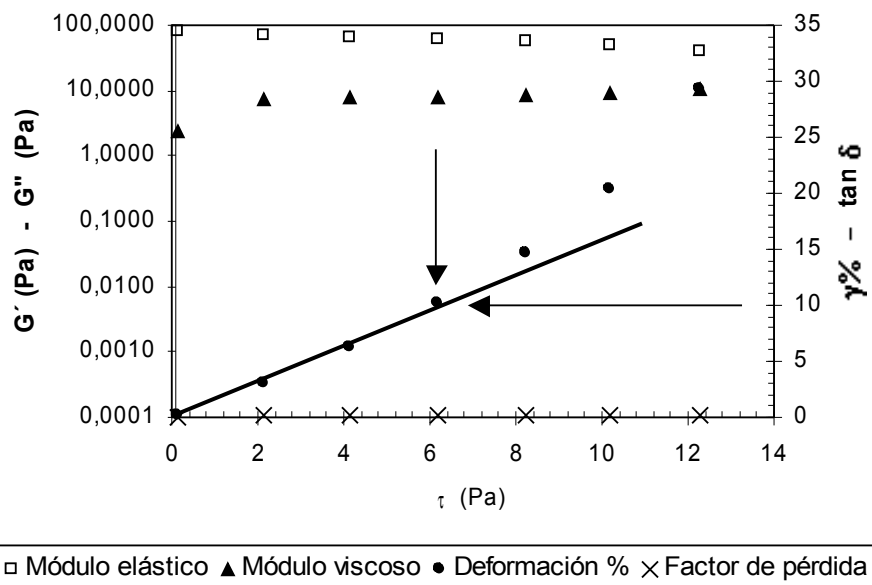
IV.3 Resultados y discusión

IV.3.1 Barrido de esfuerzo, elección de la deformación de trabajo

Se realizó un barrido de amplitud con control del esfuerzo tangencial dinámico para determinar el intervalo de viscoelasticidad lineal (LVR). A modo de ejemplo, en la Figura IV.14 se muestra el barrido de esfuerzo del sistema de 10,00% p/p de glucosa y 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (sistema III.Ñ). Se observó una relación lineal entre el esfuerzo aplicado (τ) y la deformación o *strain* (γ) con el que la muestra respondió, hasta un esfuerzo de 6 Pa. Para este valor, la deformación límite (γ_c) fue del 10% respecto a la posición de reposo.

La deformación de cizalla elegida para la realización de los barridos de frecuencia fue del 0,5%, la cual se encontró dentro del rango de viscoelasticidad lineal.

Figura IV.14. Barrido de amplitud del sistema conteniendo 10,00% p/p de glucosa y 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (sistema III.Ñ).



IV.3.2 Barrido de frecuencia de los sistemas

En las Figuras IV.15 a IV.19 se muestra el barrido de frecuencia para cada uno de los sistemas estudiados. En las mismas se encuentran los parámetros reológicos, los cuales son, el módulo elástico o de almacenamiento (G'), el módulo viscoso o de pérdida (G'') y la tangente del ángulo de desfasaje, llamado también factor de pérdida, ($\tan \delta = G''/G'$). Dichos parámetros fueron utilizados para definir y comparar el comportamiento viscoelástico de los sistemas.

El rango de frecuencias ensayado estuvo comprendido entre 0,01 y 20 Hz, con el objeto de barrer al menos tres ciclos logarítmicos de frecuencia para llegar a caracterizar la estructura de los geles (Grassi y col., 1996).

En todos los sistemas estudiados, el módulo elástico estuvo al menos un ciclo logarítmico por encima del módulo viscoso en el intervalo de frecuencias analizado, siendo, el comportamiento de ambos, independiente de la frecuencia. Este comportamiento es el que comúnmente se observa en geles de polisacáridos “verdaderos” (Ikeda y col., 2004; Bayarri y col., 2003; Rodríguez-Hernández y col., 2003; Rodd y col. 2000; Grosso y Rao, 1998; Grassi y col., 1996; Lapasin y Pricl, 1995; Doublier y col., 1992). La gran diferencia que se obtiene en este tipo de geles entre los valores de ambos módulos hace que sea escaso el aporte bibliográfico de las variaciones del módulo viscoso en función de diversos parámetros de estudio, entre ellos, el contenido y la concentración de azúcares, de calcio, el efecto del pH, etc.

El valor del módulo elástico, el cual representa el aporte del componente elástico de la estructura, es proporcional al número de interacciones polímero – polímero, las que incluyen uniones covalentes (geles químicos) o bien, uniones del tipo puente de hidrógeno, interacciones dipolo – dipolo, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas (geles físicos) (Lapasin y Pricl, 1995; Schramm, 1994; Doublier y col., 1992). Cuanto mayor es el valor del módulo elástico, mayor es el número de entrecruzamientos o de interacción polímero – polímero que constituye la red tridimensional (*network*) del material en estudio. En cambio, el módulo viscoso se relaciona con la viscosidad de la fase fluida soportada y/o también con el grado de compartimentalización de la misma dentro de la red del gel. El factor de pérdida expresa la relación entre ambos módulos, siendo directamente proporcional al módulo viscoso e inversamente proporcional al elástico, como ya fuera señalado (sección IV.1.3.1).

Figura IV.15. Barrido de frecuencia para los sistemas conteniendo 10,00% p/p de glucosa y 0,150% p/p de goma gellan (panel a) ó 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (panel b).

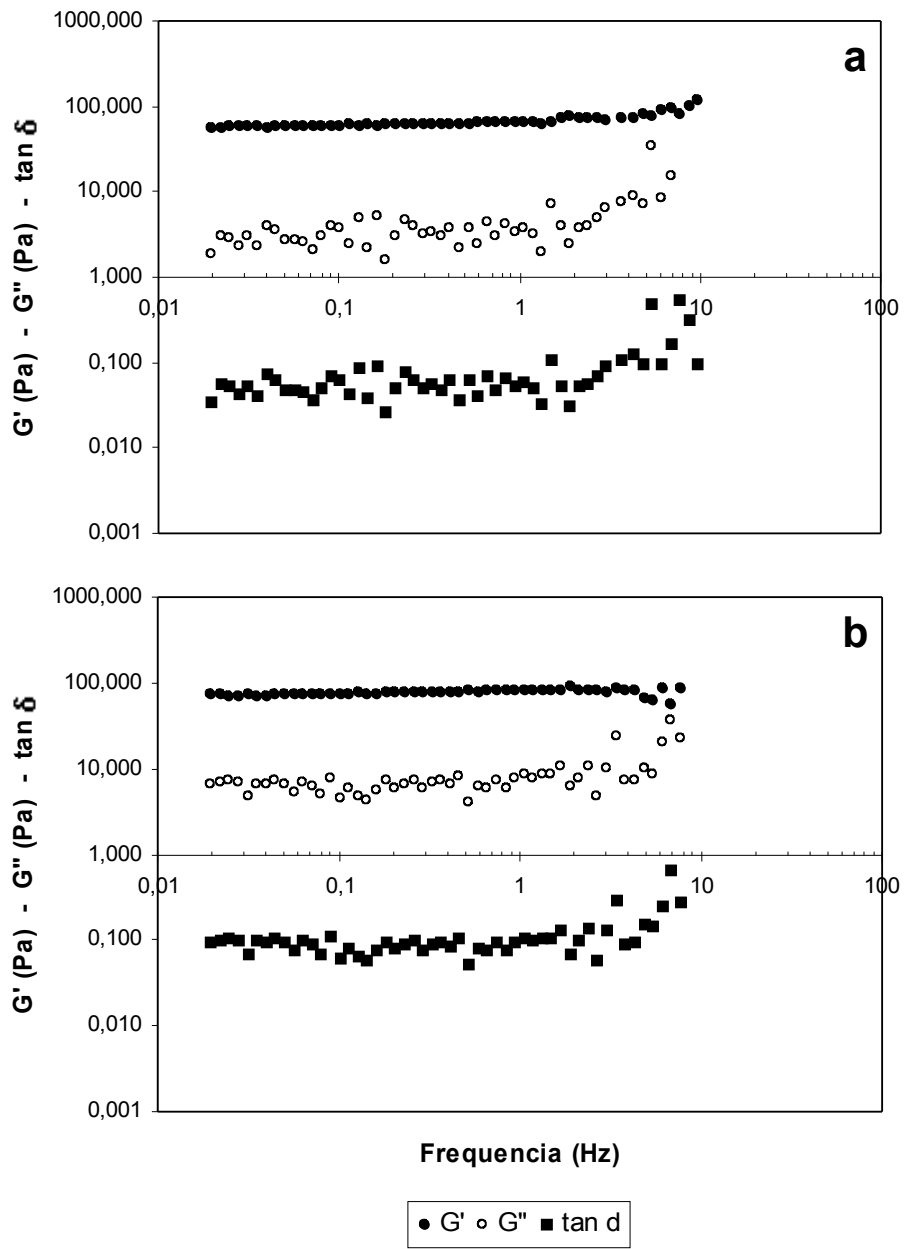


Figura IV.16. Barrido de frecuencia para los sistemas conteniendo 22,00% p/p de glucosa y 0,150% p/p de goma gellan (panel a) ó 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (panel b).

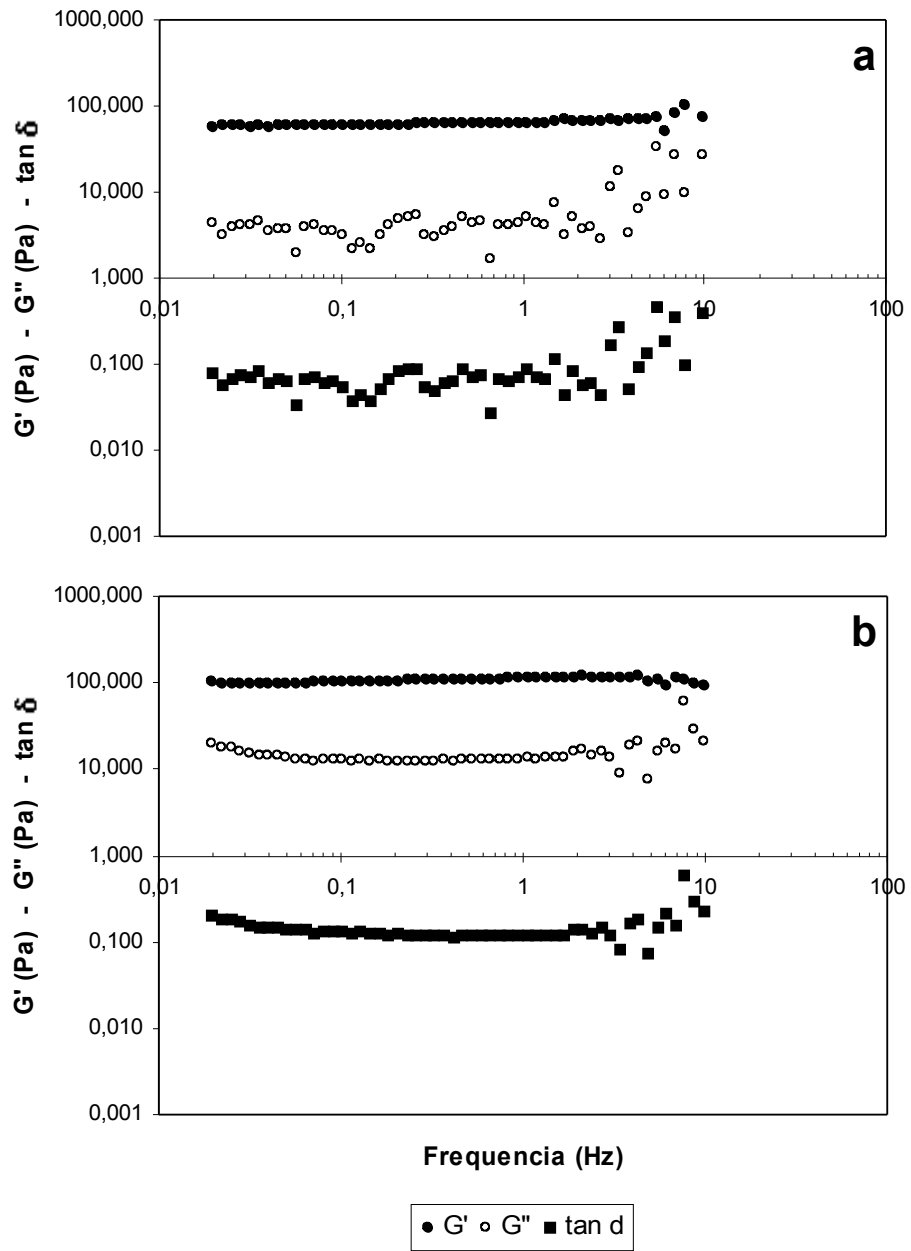


Figura IV.17. Barrido de frecuencia para los sistemas conteniendo 10,00% p/p de glucosa, 11,00% p/p de xilitol y 0,150% p/p de goma gellan (panel a) ó 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (panel b).

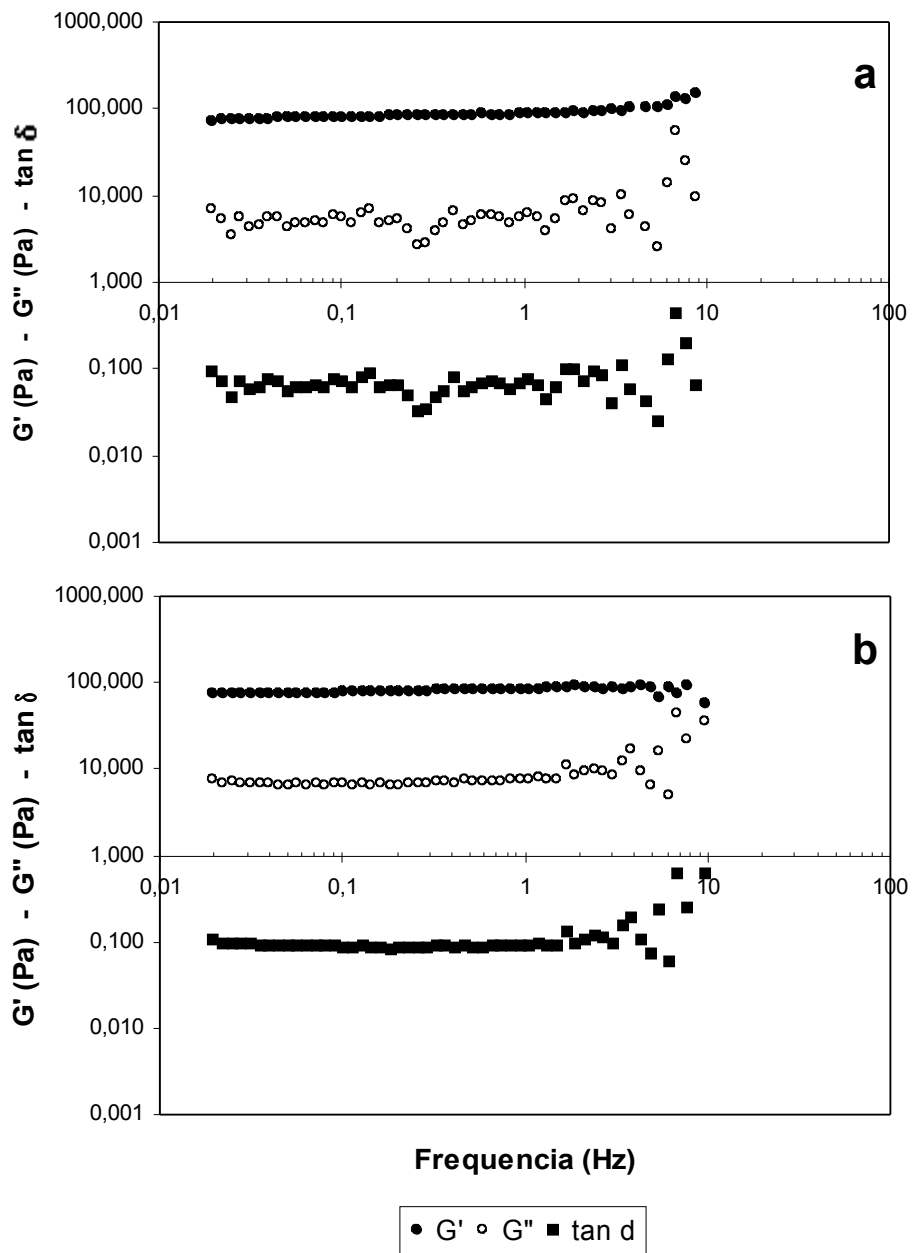


Figura IV.18. Barrido de frecuencia para los sistemas conteniendo 10,00% p/p de glucosa, 11,00% p/p de xilitol, 0,050% p/p de aspartamo y 0,150% p/p de goma gellan (panel a) ó 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (panel b).

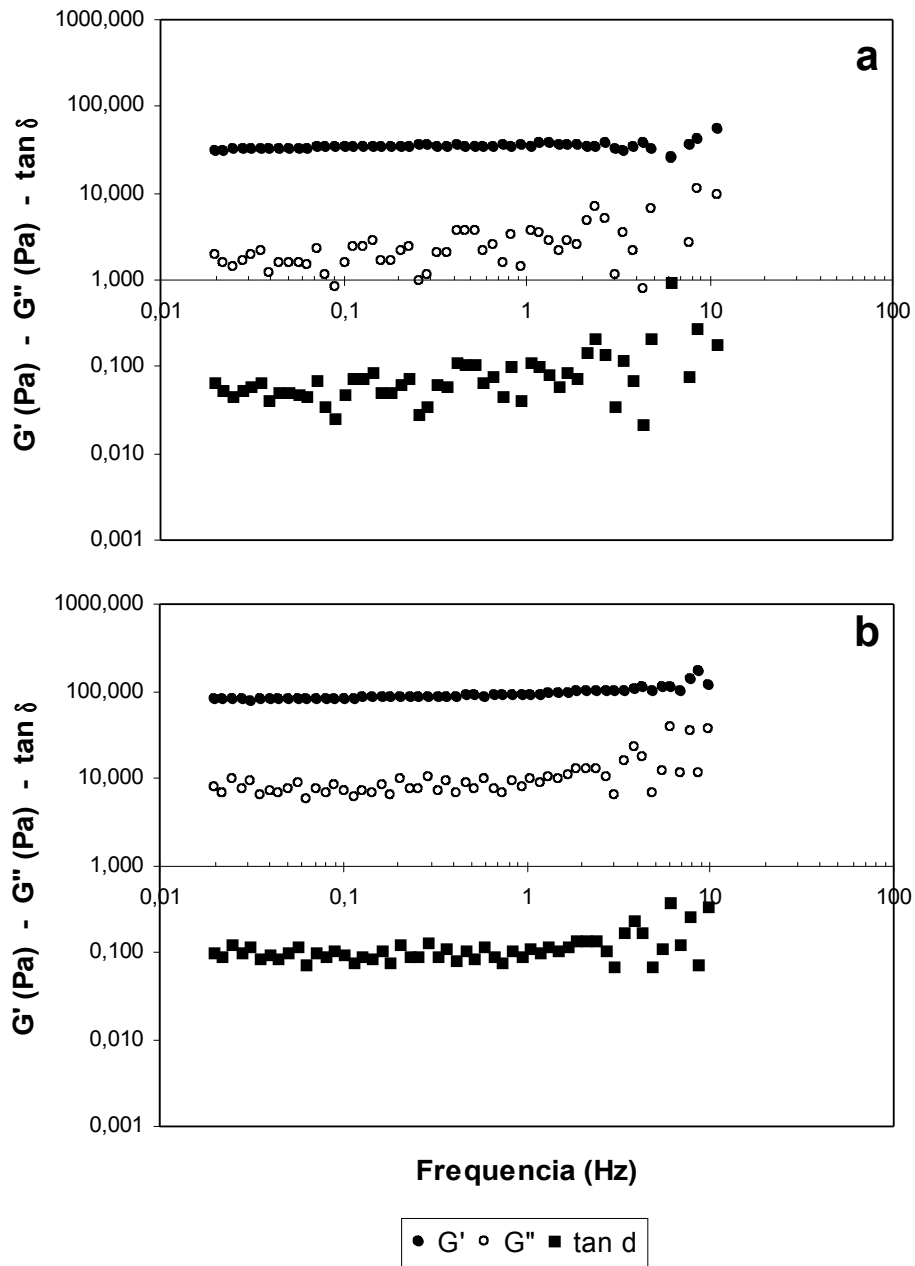
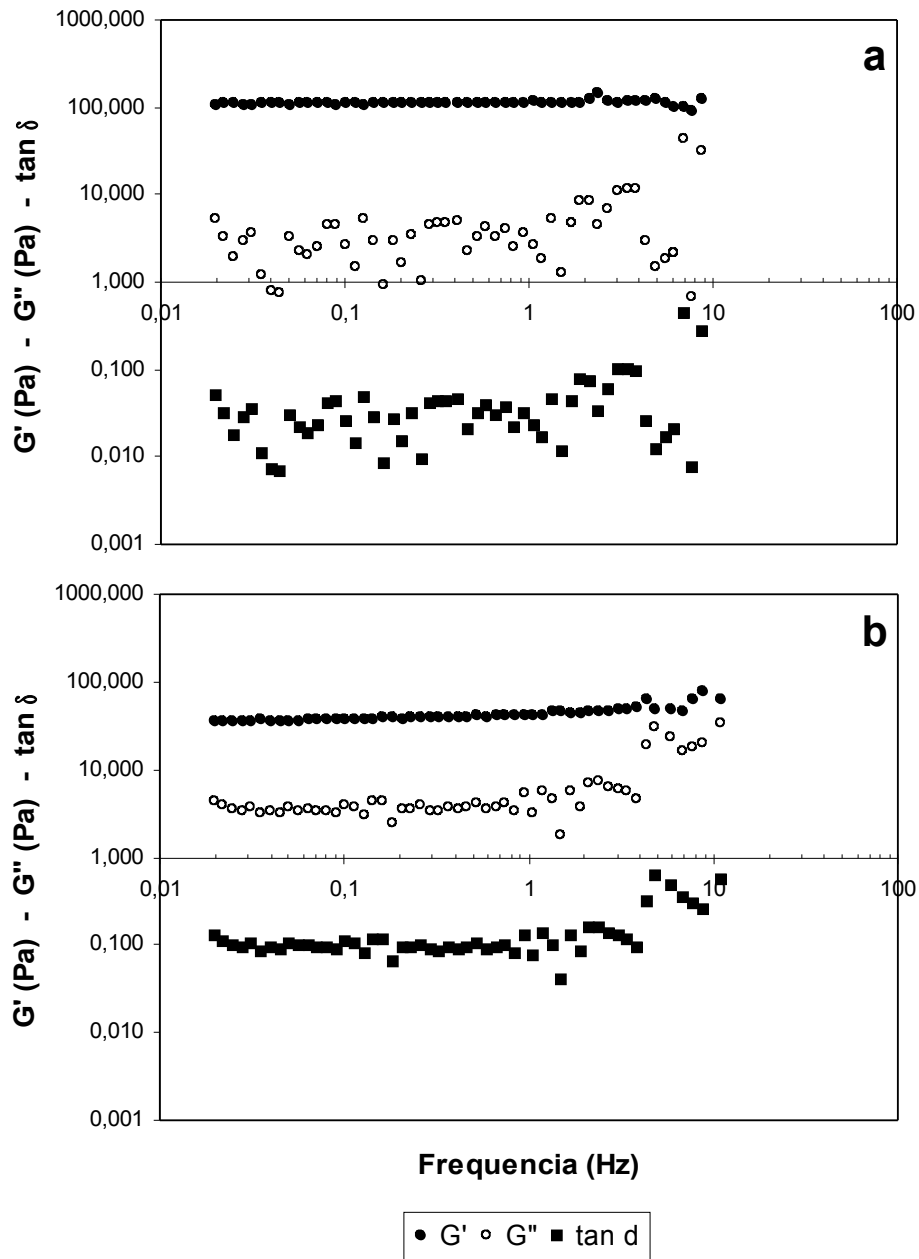


Figura IV.19. Barrido de frecuencia para los sistemas conteniendo 10,00% p/p de glucosa, 11,00% p/p de xilitol, 0,500% p/p de aspartamo y 0,150% p/p de goma gellan (panel a) ó 1,000% p/p de pectina de bajo metoxilo (panel b).



IV.3.3 Efecto de la naturaleza del edulcorante sobre las propiedades viscoelásticas de los sistemas

IV.3.3.1 Sistemas conteniendo goma gellan

Debido a que en los barridos de frecuencia se observó que los parámetros reológicos (G' , G'' y $\tan \delta$) fueron independientes de la frecuencia, lo que se informa es el promedio de los valores correspondientes que fueron obtenidos en cada barrido, tal como se indicó en la sección IV.2.4. En la Figura IV.20 se muestran los valores promedio de los parámetros reológicos de los sistemas conteniendo goma gellan en función del tipo de edulcorante. Se observa que todos estos sistemas tienen un grado de solidez muy marcado ya que los mismos presentaron un valor de $\tan \delta$ muy próximo a cero (0,030 – 0,080).

El modelo fibroso de gelificación de la goma gellan (Ikeda y col., 2004) predice que el módulo elástico está determinado por el grado de entrecruzamiento de las hebras fibrosas de gellan más que por contribuciones entrópicas de las cadenas de hebras desordenadas.

El agregado de mayor cantidad de glucosa al sistema conteniendo 10,00% p/p del monosacárido no produjo diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros reológicos estudiados (sistema III.N vs. III.P). La glucosa tiene hidratación positiva en su relación con el agua y se acomoda bien en la estructura tetraédrica de dicho solvente debido a su anillo piranósico (Sugget, 1975; Taylor y Rowlinson, 1955). Por lo tanto, el aumento de la concentración de glucosa en el medio acuoso disminuiría aún más la movilidad del agua. Sin embargo, este comportamiento no llegó a afectar los parámetros reológicos del sistema conteniendo goma gellan.

El agregado de 11,00% p/p de xilitol al sistema conteniendo 10,00% p/p de glucosa incrementó los módulos elástico y viscoso proporcionalmente, de manera tal que el valor del factor de pérdida permaneció constante (sistema III.N vs. III.S).

Basándose en estos resultados, se observa que la presencia de xilitol afecta el entorno acuoso de las moléculas de goma gellan con suficiente cantidad como para promover la interacción de las mismas e incrementando, simultáneamente, la compartimentalización de la fase fluida, debido a que produce el aumento de ambos módulos (G'' acompañando a G'). Bayarri y col. (2003) observaron que la presencia de azúcares origina zonas de unión y estabiliza la estructura de la red, atribuyéndolo a los enlaces puente hidrógeno entre el polímero y los grupos hidroxilo del azúcar y/o al cambio estructural del agua ocasionado por los

solutos. Además destacaron que un exceso de los mismos inmoviliza el agua libre necesaria para formar las zonas de unión. En realidad, la mayor o menor inmovilización del solvente (agua en este caso) o, más precisamente, el cambio que un soluto introduce en la estructura y dinámica del agua en la solución, depende, principalmente, del grado de hidratación (positivo o negativo) de dicho soluto (Samoilov, 1965) y, en segunda instancia, de cuán bien encaje la conformación más estable que adopta la molécula en la estructura tetraédrica del agua (Galema y col., 1994). Carlevaro y col. (1998) determinaron, mediante estudios de dinámica molecular, que el xilitol tiene un factor de hidratación positivo ($R > 1$; Samoilov, 1965) para todos los oxígenos hidroxílicos de su molécula. Por lo tanto, el xilitol es claramente hidrofílico, influyendo, este efecto sobre el medio acuoso inmediato circundante. Este hecho y, sabiendo, además, que el xilitol adopta en agua una conformación lineal (*single straight*) (Carlevaro y col., 1998), se propone que el mismo sería una molécula hidratada apropiada para interactuar a través de puentes de hidrógeno con los hidroxilos de las unidades de dos macromoléculas de gellan próximas, constituyéndose puentes de xilitol intercatenarios. Estos puentes tendrían una vida media suficiente como para que el barrido de frecuencia entre 0,01 y 10 Hz, detecte una red más entrecruzada, a través de un aumento del valor de G' . Carlevaro y col. (1998) determinaron que la presencia de xilitol no altera significativamente la red tridimensional de puentes de hidrógeno del agua. Esto significa que el poliol puede actuar como donante o aceptor de puentes de hidrógeno respecto al agua con la misma habilidad. En consecuencia, las macromoléculas de gellan formarían con facilidad semejante puentes de hidrógeno con el agua o con el xilitol, lo que conduciría, en este último caso, a un entrecruzamiento.

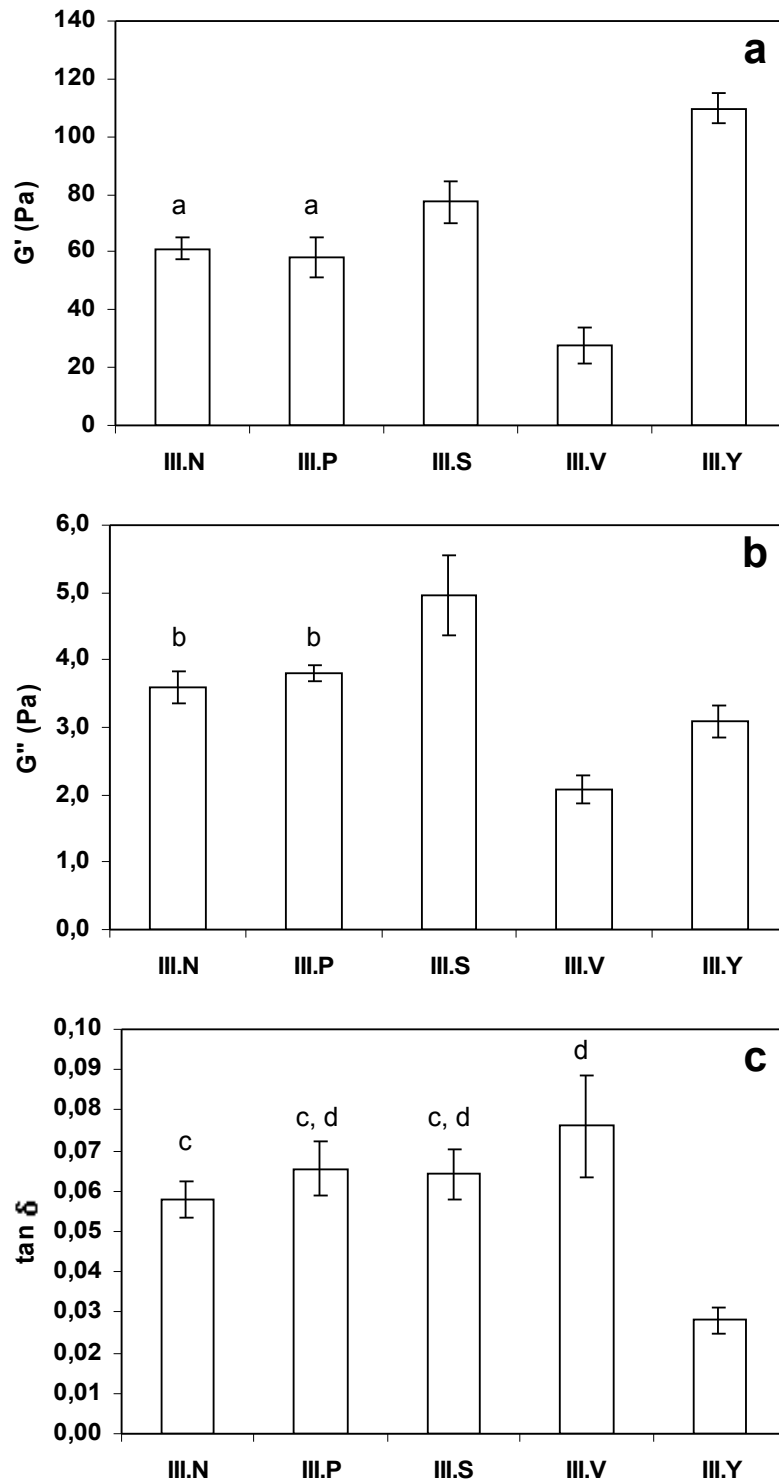
La presencia de aspartamo tuvo un efecto significativo sobre los parámetros reológicos de los sistemas. El agregado de 0,050% p/p del mismo al sistema conteniendo glucosa y xilitol disminuyó significativamente los módulos elástico y viscoso, pero no produjo cambios significativos en el factor de pérdida (sistema III.S vs. III.V). Sin embargo, la adición de 0,500% p/p de aspartamo al mismo sistema incrementó considerablemente el módulo elástico, pero disminuyó significativamente el módulo viscoso, dando como resultado un descenso muy importante del factor de pérdida ($\sim 0,020$) (sistema III.S vs. III.Y).

Se observa que el aspartamo afectó significativamente el comportamiento reológico de los sistemas conteniendo glucosa y xilitol en forma contrapuesta, dependiendo de su concentración. Así, el edulcorante mostró un efecto plastificante al menor nivel ensayado (0,050% p/p), es decir, una disminución del grado de interacción entre las cadenas del polímero, puesto en evidencia por el menor valor de módulo elástico obtenido. Sin embargo,

cuando se utiliza una concentración mayor de aspartamo (0,500% p/p), se incrementa el número de entrecruzamientos polímero – polímero (máximo valor de módulo elástico obtenido).

Figura IV.20. Parámetros reológicos de los sistemas conteniendo goma gellan en función del tipo de edulcorante. Panel a: módulo elástico (G'); Panel b: módulo viscoso (G''); Panel c: factor de pérdida ($\tan \delta$).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Bayarri y col. (2003) reportaron el descenso de ambos módulos debido al incremento del nivel de aspartamo en geles conteniendo 0,3% p/p de goma gellan sin observar diferencias significativas en el factor de pérdida.

El comportamiento en agua que presentaría el aspartamo sería hidrofóbico según proponen Hutteau y col. (1998). En la estructura del mismo (Figura I.4) se observa que presenta dos zonas, una iónica y otra claramente hidrofóbica (métil éster aromático). Sin embargo, a pesar de presentar una zona ionizada, su solubilidad en agua es baja (Tabla I.4), lo que es un signo de su comportamiento hidrofóbico. Esto último estaría indicando su poca habilidad para formar puentes de hidrógeno con el agua circundante. Basándose en ello, cuando la concentración de aspartamo fue de 0,050% p/p, el número de moléculas de este edulcorante sólo alcanzaría para alterar la dinámica del agua en la que se encuentran disueltas. Probablemente, las moléculas de aspartamo preferirán estar cerca de zonas menos hidrofílicas que el agua, es decir, cerca de las macromoléculas de goma gellan. Cuando están presentes pocas moléculas de aspartamo interaccionando con las macromoléculas de gellan, las primeras producirían un efecto plastificante en combinación con el agua que se encuentra hidratando al polímero, disminuyendo la interacción polímero – polímero o polímero – xilitol – polímero (descenso del módulo elástico). Si, en cambio, la concentración de aspartamo es diez veces mayor (0,500% p/p), el número de moléculas interaccionantes con las macromoléculas llega a ser suficientemente alto como para, además, desplazar del entorno a las moléculas de agua. Esto desencadenaría un aumento considerable del grado de interacción polímero – polímero (aspartamo mediante), puesto en evidencia por el aumento considerable del módulo elástico. El incremento de la rigidez o dureza de la red tridimensional gelificada, responsable del comportamiento elástico del sistema, no fue acompañada por el aumento proporcional del módulo viscoso ($\tan \delta \sim 0,020$). Esto significaría que la viscosidad de la fase fluida soportada por la red tridimensional no aumentó proporcionalmente. La goma gellan no alcanzó a incrementar la viscosidad de la fase fluida en estas condiciones.

IV.3.3.2 Sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo

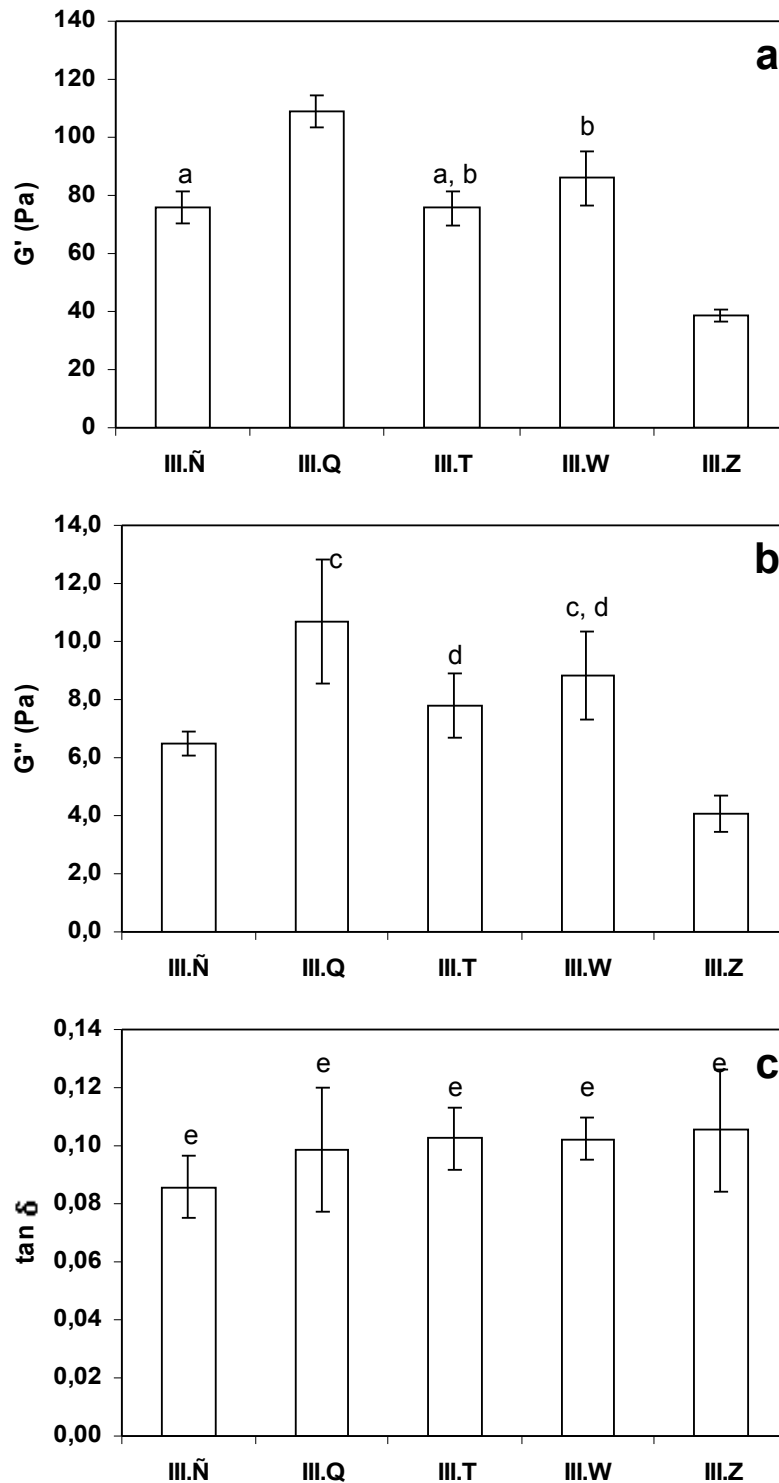
Los parámetros reológicos de los sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo se muestran en la Figura IV.21.

En presencia de 10,00% p/p de glucosa, la incorporación de mayor cantidad de la misma incrementó los módulos elástico y viscoso sin provocar diferencias significativas en el factor de pérdida (sistema III.Ñ vs. III.Q). En cambio, el agregado de 11,00% p/p de xilitol a

dicho sistema, no afectó el módulo elástico, incrementó ligeramente el módulo viscoso pero no modificó el factor de pérdida (sistema III.Ñ vs. III.T).

Figura IV.21. Parámetros reológicos de los sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo en función del tipo de edulcorante. Panel a: módulo elástico (G'); Panel b: módulo viscoso (G''); Panel c: factor de pérdida ($\tan \delta$).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Cuando se reemplazó parcialmente la glucosa por xilitol se observó el descenso de los módulos elástico y viscoso sin producir diferencias significativas en el factor de pérdida (sistema III.Q vs. III.T).

El aumento de la concentración de glucosa en el medio acuoso disminuye la movilidad del agua en su entorno, lo cual provocaría un aumento de la interacción polímero – polímero (incremento del módulo elástico), sin alterar el grado de compartimentalización de la fase fluida ($\tan \delta$ constante).

El resultado obtenido al reemplazar parcialmente la glucosa por xilitol (sistema III.Q vs. III.T) sería coherente con el hecho de que el xilitol (cadena lineal), a pesar de tener hidratación positiva, provoca una menor inmovilización del agua en su entorno que la glucosa (estructura piranósica) (Galema y col., 1994). Carlevaro y col. (1998) establecieron que la presencia de xilitol no altera significativamente la red tridimensional de puentes de hidrógeno en el agua estructurada alrededor del soluto. El efecto señalado del xilitol sobre la estructura del agua circundante es responsable de que, al ser agregado al sistema conteniendo 10,00% p/p de glucosa, no se observen modificaciones significativas de los parámetros reológicos.

Grosso y Rao (1998) reportaron el incremento del módulo elástico debido al aumento del contenido de glucosa en geles formulados con 1% p/p de pectina de bajo metoxilo y 0,10% p/p de calcio, sin embargo, en presencia de sorbitol observaron un marcado descenso de dicho parámetro. Ellos atribuyeron estos comportamientos a la competencia entre la pectina y los edulcorantes por el calcio. Por ejemplo, la estructura de cadena abierta que posee el sorbitol es favorable para complejar al ión y disminuir el grado de entrecruzamiento entre las moléculas de pectina, en cambio, la conformación de los grupos hidroxilo de la glucosa (piranosa), no lo es tanto. Fu y Rao (1999) reportaron que la sacarosa tenía mayores entalpías de disociación de las zonas de unión que el sorbitol en geles de pectina de bajo metoxilo, reflejando que el azúcar, probablemente, promueva la formación de enlaces puente hidrógeno entre los polímeros al inmovilizar el agua libre, lo que conduciría a una mayor estabilidad de las zonas de unión inter-macromoleculares que el sorbitol.

El agregado de 0,050% p/p de aspartamo al sistema conteniendo glucosa y xilitol no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros reológicos estudiados (sistema III.T vs. III.W). En cambio, la adición de 0,500% p/p de aspartamo a dicho sistema produjo un descenso en el valor de los módulos elástico y viscoso de manera proporcional tal que no hubo diferencias significativas en el valor del factor de pérdida (sistema III.T vs. III.Z). Este último

comportamiento también se observó al incrementar el nivel de aspartamo de 0,050 a 0,500% p/p en presencia de glucosa y xilitol (sistema III.W vs. III.Z). Comparando con lo que se observó en el caso de goma gellan, en presencia de pectina fue necesario el agregado de aspartamo en una concentración diez veces mayor (0,500% p/p) para tener el efecto plastificante sobre la red tridimensional (descenso del módulo elástico). Es decir, sería necesario un mayor grado de perturbación de la estructura del agua (aumento de su movilidad) alrededor de las macromoléculas de pectina para lograr plastificar la red. La movilización de mayor cantidad de moléculas de agua permitiría una mayor hidratación de macromoléculas de pectina, llevando a una menor interacción polímero – polímero (efecto plastificante).

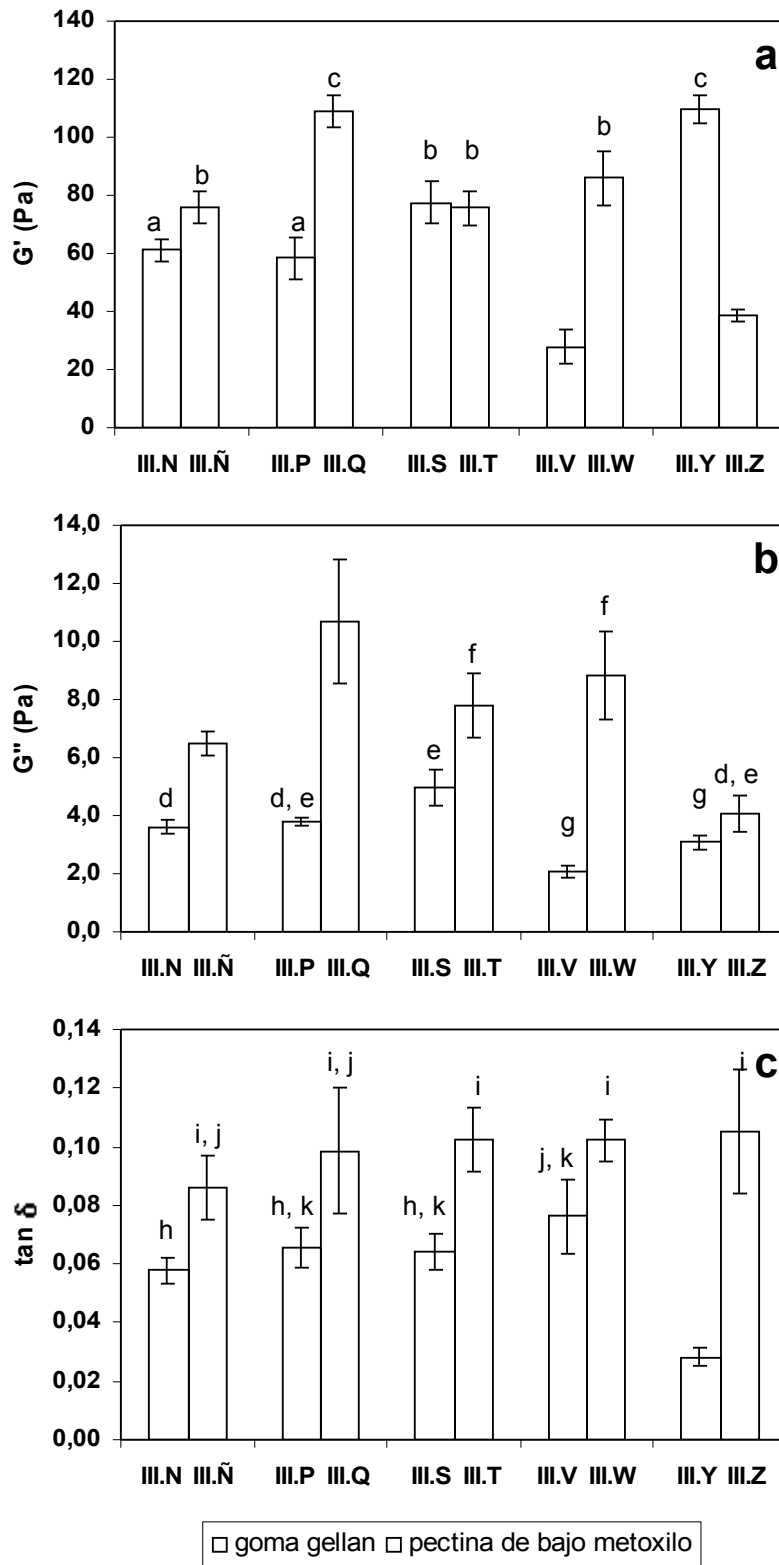
En un estudio de interacciones entre el aspartamo y diferentes hidrocoloides, entre ellos pectina, Wafwoyo y col. (1999) sugirieron que la asociación de la porción hidrofóbica de la molécula de aspartamo con porciones hidrofóbicas de las cadenas de hidrocoloides, mejora la estabilidad del aspartamo en dichos sistemas. Podría, entonces, también considerarse la posible existencia de un cierto grado de interacción entre el aspartamo y las macromoléculas de pectina en la plastificación del sistema.

IV.3.4 Efecto de la naturaleza del hidrocoloide sobre las propiedades viscoelásticas de los sistemas

En la Figura IV.22 se muestran los parámetros reológicos de los sistemas en función del hidrocoloide.

El empleo de pectina de bajo metoxilo produjo mayores valores de los módulos elástico y viscoso y del factor de pérdida que el de goma gellan en los sistemas conteniendo 10,00% p/p ó 22,00% p/p de glucosa (sistemas III.N, III.P vs. III.Ñ, III.Q, respectivamente) ó la combinación de glucosa y xilitol con 0,050% p/p de aspartamo (sistema III.V vs. III.W). En cambio, en presencia de glucosa y xilitol, no hubo diferencias significativas entre el módulo elástico de geles conteniendo goma gellan frente a los de pectina de bajo metoxilo. Sin embargo, el sistema conteniendo pectina mostró mayores valores del módulo viscoso y del factor de pérdida (sistema III.S vs. III.T).

Figura IV.22. Parámetros reológicos de los sistemas en función del tipo de hidrocoloide. Panel a: módulo elástico (G'); Panel b: módulo viscoso (G''); Panel c: factor de pérdida ($\tan \delta$). Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



En sistemas formulados con glucosa, xilitol y 0,500% p/p de aspartamo se observó que de ambos hidrocoloides utilizados, la pectina de bajo metoxilo presentó menor valor del módulo elástico y mayor valor del módulo viscoso, dando como resultado un mayor factor de pérdida (sistemas III.Y vs. III.Z).

En general, se observa que los geles formulados con pectina presentan un mayor grado de interacción polímero – polímero que aquellos elaborados con goma gellan, ya que tuvieron un valor de módulo elástico más alto. Esto sería en respuesta a cambios en la movilidad del solvente. Además, debido a que presentan mayor valor de módulo viscoso y, también, de factor de pérdida, es probable que las moléculas de pectina que no formaron parte de la red se encuentren incrementando apreciablemente la viscosidad de la fase fluida.

En particular, el sistema conteniendo 0,500% p/p de aspartamo mostró mayor grado de entrecruzamiento (mayor módulo elástico) en presencia de goma gellan comparado con el de pectina, acompañado por un menor valor de módulo viscoso y de factor de pérdida (0,030). Esto, nuevamente remarca la importancia de la interacción entre el aspartamo y las moléculas del hidrocoloide utilizado en la formulación.

Del comportamiento reológico mostrado por los geles constituídos por goma gellan o por pectina en los distintos sistemas estudiados se pondría en evidencia la diferente afinidad que presentan estos biopolímeros por el agua. Las macromoléculas de gellan adoptarían una conformación empaquetada tal como lo indican diversos trabajos. Los mismos proponen que los polímeros de gellan adoptan una conformación de densos agregados tipo 'vara' en los cuales la elasticidad que presentan los geles formados sería debida al estiramiento y al encogimiento de las hebras fibrosas (Ikeda y col., 2004; Milas y Rinaudo, 1996; Gibson, 1992; Gunning y Morris, 1990; Chandrasekaran y col., 1988). De hecho, la goma gellan gelifica macroscópicamente a concentraciones del hidrocoloide menores que la pectina. Podría inferirse que el agua sería un 'peor' solvente para la goma gellan que para la pectina (Lapasin y Pricl, 1995). Ello explicaría, en el presente trabajo, la rigidez (componente elástica) de los geles constituídos por goma gellan, así como el pobre efecto viscosante sobre la fase fluida soportada por el *network*, ambos observados cada vez que se ve, al límite, comprometida la disponibilidad de agua en su entorno, como ocurre en el sistema conteniendo glucosa, xilitol y 0,500% p/p de aspartamo. En cambio, las macromoléculas de pectina presentan dos factores que ejercen un efecto 'solubilizante' o modulador de la gelificación, los cuales son los sitios de interrupción de la cadena de homogalacturonano por ramnosa (*kinks*) y los grupos carboxilos esterificados. Por lo tanto, esta estructura presenta una conformación expandida en el medio

acuoso, se hincha en presencia de agua por su elevada capacidad de hidratación. Además, este comportamiento se ve considerablemente favorecido por la presencia de ramificaciones constituidas por arabinosa y galactosa sobre los residuos de ramnosa. Esto indicaría la mayor afinidad por el agua que presenta la pectina frente a la goma gellan y, por lo tanto, el por qué del mayor efecto viscosante de la fase fluida en presencia de pectina. Como consecuencia, las macromoléculas de pectina serían más sensibles a los cambios en la movilidad del agua circundante, producidos, ya sea por el incremento en el contenido de glucosa, por su reemplazo parcial por xilitol o por el agregado de una mayor concentración de una molécula hidrofóbica (aspartamo) para que se manifieste el efecto plastificante. En este último caso, debido a la elevada hidrofiliidad de la pectina, estas macromoléculas actuarían como 'buffer' respecto de solutos claramente hidrofóbicos, ya que fue sensible sólo a una concentración mayor de aspartamo.

IV.3.5 Vinculación entre las propiedades viscoelásticas y sensoriales de los sistemas

Resulta de interés la posibilidad de hallar una relación entre las propiedades reológicas de un sistema, determinadas mediante técnicas instrumentales (mediciones objetivas), y las propiedades sensoriales, derivadas de métodos subjetivos, ya que ambas se encuentran ligadas entre sí, es decir, no sólo la textura puede afectar la percepción del gusto de los alimentos, sino que las propiedades reológicas de los mismos pueden alterarse debido a la presencia de sustancias sápidas, las cuales, a su vez, pueden causar cambios en la percepción oral de la viscosidad y la textura de los alimentos. Sin embargo, no es tarea sencilla hallar dicha relación.

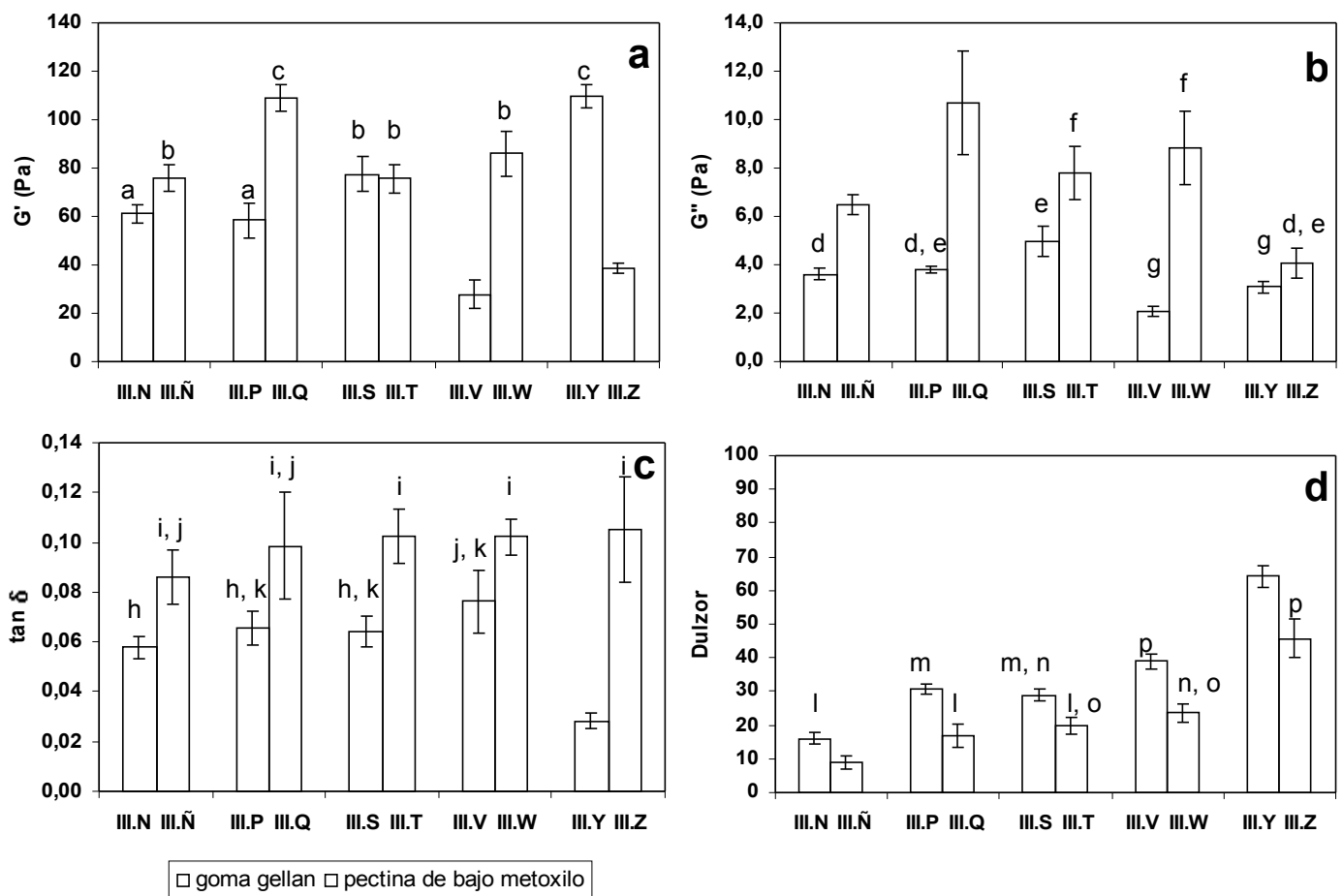
Con la intención de vincular las propiedades reológicas de los geles con las sensoriales, desarrolladas en el Capítulo III (sección III.3.2), se recopilaron las Figuras III.13, panel a, y IV.22, obteniéndose la Figura IV.23, en la cual se muestran los parámetros reológicos de los sistemas (paneles a, b y c) junto con el dulzor de los mismos (panel d). Del análisis de estos resultados se desprenden las siguientes relaciones generales entre los parámetros reológicos y la percepción del dulzor de los sistemas:

- i) El aumento simultáneo de los módulos elástico y viscoso así como del factor de pérdida conducen a una percepción menor del dulzor.
- ii) Una mayor percepción del dulzor estuvo asociada con la disminución simultánea de los módulos elástico y viscoso, y del factor de pérdida.

- iii) Ya sea la constancia o la disminución del módulo elástico, acompañada por los aumentos significativos del módulo viscoso y del factor de pérdida, estuvieron asociados a una menor percepción del dulzor. Contrariamente, el aumento del módulo elástico junto con la disminución significativa del módulo viscoso y del factor de pérdida se relacionaron directamente con una mayor percepción del dulzor.

Figura IV.23. Parámetros reológicos (panel a: módulo elástico, G' ; panel b: módulo viscoso, G'' ; panel c: factor de pérdida, $\tan \delta$) y dulzor (panel d) de los sistemas en función del tipo de hidrocoloide (HDC).

Las columnas que tienen la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar de las medias.



Desde el punto de vista de la naturaleza del hidrocoloide, se observa que los sistemas conteniendo pectina de bajo metoxilo fueron significativamente menos dulces que aquellos formulados con goma gellan. Este comportamiento estaría relacionado con los mayores valores de módulo viscoso y, especialmente, de factor de pérdida, obtenidos en los geles de pectina (Figura IV.23, paneles b, c y d, sistemas III.N, III.P, III.S, III.V, III.Y vs. III.N, III.Q, III.T, III.W, III.Z).

III.Z, respectivamente). Fundamentándose en esta relación, el incremento apreciable de la viscosidad de la fase fluida que producirían las moléculas de pectina, probablemente, retrase la liberación de los componentes responsables del dulzor, haciendo que su percepción sea menor.

El análisis del módulo elástico muestra que en los sistemas conteniendo glucosa ó la mezcla de glucosa, xilitol y 0,050% p/p de aspartamo, el mismo es mayor en los geles de pectina de bajo metoxilo respecto a los de goma gellan (Figura IV.23, panel a, sistemas III.N, III.P, III.V vs. III.Ñ, III.Q, III.W, respectivamente). El menor grado de entrecruzamiento que generan estos últimos geles, respecto a los de pectina, posiblemente favorezca la liberación del estímulo, incrementando su percepción. Sin embargo, en el sistema conteniendo 0,500% p/p de aspartamo, no se podría aplicar esta supuesta relación inversa entre el grado de entrecruzamiento y el dulzor, ya que este sistema mostró mayor valor de módulo elástico en presencia de goma gellan (sistema III.Y vs. III.Z), hecho que indicaría mayor grado de entrecruzamiento, pero su dulzor también resultó ser mayor que el del gel formulado con pectina. Llamativamente, el sistema constituido por goma gellan (sistema III.Y) mostró también el menor valor de factor de pérdida ($\sim 0,020$) de todos los sistemas medidos en el presente trabajo (Figura IV.23, panel c). Esto significa que el aumento significativo de rigidez de la red no fue acompañado en igual medida por el grado de compartimentalización de la fase fluida soportada por el *network* (bajo valor de módulo viscoso y mínimo valor de factor de pérdida). Si bien no se verificó descompartimentalización macroscópica de líquidos, puede decirse, en cambio, que la fase fluida retenida en el gel sería menos viscosa que en el caso de los geles de pectina o menos amortiguadora, lo que conjuntamente con la elevada rigidez del *network*, conduciría a un sistema que resulta quebradizo durante la masticación. Por lo tanto, cuando se somete el gel constituido por gellan y 0,500% p/p de aspartamo a las grandes deformaciones (velocidad de corte = 50 s^{-1} ; Izutsu y Wani, 1985) que se experimentan durante la masticación, una vez destruida la red (componente elástica), la fase líquida contenida (componente viscosa) fluye con facilidad y, dada, además, su menor viscosidad, este sistema se percibirá como más dulce que aquel constituido por pectina e igual concentración de aspartamo, tal como lo muestran los resultados obtenidos (Figura IV.23, panel d).

En conclusión, la naturaleza del hidrocoloide determina, entre otras propiedades, la estructura de la red formada así como la difusión del edulcorante a través de la misma y, por consiguiente, la percepción del dulzor.

Marshall y Vaisey (1972) estudiaron la percepción del dulzor de geles elaborados con diferentes hidrocoloides y concluyeron que el dulzor puede ser mayor en geles que se rompan más rápidamente en la boca. Este comportamiento es una característica propia de cada hidrocoloide, por ejemplo, geles elaborados con gelatina son más dulces que aquellos formulados con goma xántica o con goma gellan, debido a que se funden a la temperatura de la boca (Bayarri y col., 2003). En base a ello, deben destacarse el hecho de que la goma gellan produce geles que poseen buena capacidad de liberación del *flavor* debido a que produce geles muy quebradizos causando sensación de fusión en la boca (Durán y col., 1994; Gibson, 1992) y, además, de que la difusión del aspartamo en geles formulados con goma gellan se incrementa debido al aumento del nivel del edulcorante, dando como resultado mayor percepción del dulzor (Bayarri y col., 2003).

Observando la Figura III.16, panel b, puede verse que el perfil de dulzor de los edulcorantes en ausencia de hidrocoloides se mantiene cuando dichos edulcorantes están retenidos por cualquiera de las matrices de los hidrocoloides ensayados. Es de destacar que el agregado de hidrocoloides sólo modifica el grado de percepción del dulzor. Esto significa que la presencia de gellan o de pectina no modifica la percepción relativa que *per se* mostraron los edulcorantes, sino que afecta la intensidad con la que los mismos son percibidos. Esto último dependerá del número de moléculas de edulcorante que rodeen al quimiorreceptor en un instante dado, lo cual estará determinado por la facilidad con la que el edulcorante es liberado de la estructura en la que está retenido al llegar a la boca. Este comportamiento estuvo en correlación con las propiedades reológicas que fueron evaluadas en los geles de gellan y de pectina en condiciones de viscoelasticidad lineal.

IV.3.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que tanto la presencia de los edulcorantes como la naturaleza del hidrocoloide empleado tuvieron un efecto significativo sobre las propiedades reológicas de los sistemas, destacándose los siguientes hechos:

- a) En geles formulados con goma gellan, el incremento del contenido de glucosa no afectó las propiedades reológicas de los sistemas. Sin embargo, su reemplazo parcial por xilitol promovió la interacción de las moléculas del polímero e incrementó la compartimentalización de la fase fluida en la red del gel. Probablemente, este polioli interaccionaría, a través de puentes de hidrógeno, con los hidroxilos de las unidades de

dos macromoléculas de gellan próximas, constituyendo puentes de xilitol intercatenarios.

- b) En presencia de pectina de bajo metoxilo, el incremento de la concentración de glucosa favoreció la interacción entre polímeros, mientras que su reemplazo parcial por xilitol la disminuyó. Esto sería en respuesta al diferente grado de inmovilización del agua producido por los edulcorantes mencionados.
- c) El aspartamo mostró un efecto plastificante cuando se lo utilizó en un nivel de 0,050% p/p en geles de goma gellan, ó de 0,500% p/p en geles de pectina. Este comportamiento se relacionó con el carácter hidrofóbico del aspartamo.
- d) Una concentración de 0,500% p/p de aspartamo produjo el incremento de las interacciones entre las cadenas de gellan favorecido por la interacción edulcorante – polímero con el desplazamiento simultáneo de las moléculas de agua del entorno, dando origen a una estructura notablemente rígida que soporta una fase fluida poco viscosa y poco amortiguadora de la red.
- e) En general, se observó mayor grado de interacción polímero – polímero en geles formulados con pectina respecto a aquellos con goma gellan. Esto sería en respuesta a cambios en la movilidad del solvente.
- f) La presencia de pectina incrementó apreciablemente la viscosidad de la fase fluida en todos los sistemas estudiados. Este efecto, propio de la pectina, se debería a la conformación que presenta la misma cuando gelifica en presencia de agua.
- g) De ambos hidrocoloides empleados, las macromoléculas de pectina serían más sensibles a los cambios en la movilidad del agua circundante, producidos, ya sea por el incremento en el contenido de glucosa, por su reemplazo parcial por xilitol o por el agregado de aspartamo. Ello se debería a que el agua sería un mejor solvente para la pectina que para la goma gellan, tal como se puede inferir de la conformación que estos hidrocoloides adoptan al gelificar en agua.

El estudio de las propiedades reológicas de los sistemas permitió establecer la existencia de interacciones fisico-químicas entre los edulcorantes y los hidrocoloides, estando, las mismas, condicionadas por la presencia del agua utilizada como solvente.

Asimismo, se observó que las propiedades reológicas de los geles estarían ligadas con la percepción del dulzor dado que la naturaleza del hidrocoloide determinó, entre otras propiedades, las características estructurales de la red formada así como la difusión del edulcorante a través de la misma y, por consiguiente, la percepción del dulzor. En este sentido

cabe destacar que el agregado de gellan o de pectina de bajo metoxilo sólo modificó el grado de percepción del dulzor y no la percepción relativa que *per se* mostraron los edulcorantes.

CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ El estudio de la **interacción entre el ácido sórbico y el aspartamo** permitió obtener las siguientes conclusiones:
 - a) Ambos aditivos se degradaron apreciablemente en función del tiempo de almacenamiento y de la composición del sistema.
 - b) Las reacciones de degradación del ácido sórbico y del aspartamo ajustaron a cinéticas de primer y pseudo-primer orden, respectivamente, mientras que la formación de pigmentos pardos mostró una cinética de orden cero.
 - c) La adición de aspartamo, en ausencia o en presencia de glucosa, mejoró la estabilidad del ácido sórbico, pero incrementó su degradación cuando la sacarosa estuvo presente.
 - d) La adición de sorbato de potasio incrementó la degradación de aspartamo y esta tendencia aumentó cuando la actividad de agua fue deprimida a 0,971 por el agregado de glucosa o sacarosa.
 - e) La interacción de azúcares reductores con el aspartamo no contribuyó significativamente al desarrollo de pardeamiento no enzimático en los sistemas.
 - f) El aspartamo y los carbonilos formados durante la degradación del sorbato reaccionaron a través del mecanismo de Maillard detectándose la formación de pigmentos pardos.

- ✓ En cuanto al estudio de las **interacciones entre el ácido sórbico y humectantes dulces** se concluyó que:
 - a) En ausencia de glucosa, la degradación del preservador se incrementó debido a la adición de polioles.
 - b) En presencia de glucosa, la adición de manitol o sorbitol no produjo efecto sobre la estabilidad del sorbato. Sin embargo, la adición de xilitol disminuyó la degradación del mismo.
 - c) La adición de polioles disminuyó la velocidad del desarrollo de pardeamiento no enzimático tanto en ausencia como en presencia de glucosa. El sorbitol y el xilitol mostraron el mayor efecto.

- ✓ En particular, el análisis de los **sistemas conteniendo xilitol** permitió obtener las siguientes conclusiones:
 - a) Desde el punto de vista de reducir la degradación del sorbato de potasio, es conveniente el empleo de 11,00% p/p de xilitol, nivel necesario para alcanzar una actividad de agua de 0,985, en presencia de 0,500% p/p de aspartamo. En caso de no ser posible, la combinación del poliol con 10,00% p/p de glucosa (actividad de agua del sistema 0,971) sin el agregado del edulcorante artificial.
 - b) La degradación del aspartamo se minimiza cuando al xilitol se lo combina con glucosa en presencia de sorbato de potasio.
 - c) La presencia de xilitol disminuye significativamente el desarrollo de pigmentos pardos, ya sea en ausencia o en presencia de aspartamo, independientemente de la incorporación de glucosa.

- ✓ Con relación al **efecto de la depresión de la actividad de agua, de los distintos humectantes utilizados y de la adición de diferentes niveles de sorbato de potasio sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*** se concluyó que:
 - a) A medida que se aumentó la concentración de sorbato, el crecimiento de la levadura disminuyó gradualmente hasta llegar a inhibirlo totalmente a un nivel de 0,020, 0,025 ó 0,035% p/p, dependiendo de la composición del sistema.
 - b) Luego de 21 días de almacenamiento a 35°C, la concentración residual de sorbato de potasio en sistemas de actividad de agua reducida, libres de aspartamo, fue menor que la mínima concentración inhibitoria del preservador. Este hecho sugiere que el nivel de sorbato de potasio utilizado, 0,130% p/p, que corresponde al máximo nivel permitido por el Código Alimentario Argentino para alimentos modificados en su composición glucídica, no es suficiente para asegurar la efectividad del preservador a lo largo del período de almacenamiento estudiado.
 - c) A medida que se incrementó la concentración de sorbato de potasio, la velocidad de crecimiento de la levadura y la máxima población de la fase estacionaria disminuyeron gradualmente, mientras que la fase de latencia aumentó.
 - d) La velocidad de crecimiento disminuyó debido al descenso de la actividad de agua por el agregado de polioles en ausencia de sorbato de potasio. En particular, el xilitol fue el

soluto que promovió el mayor descenso de la velocidad de crecimiento y del nivel de la población de la fase estacionaria.

- e) En presencia del preservador, el descenso de la actividad de agua produjo diferentes efectos sobre la velocidad de crecimiento, dependiendo del nivel de actividad acuosa, del soluto adicionado y de la concentración del preservador. Debe indicarse que la depresión de la actividad de agua a 0,985 / 0,988 por la adición de un poliol o de glucosa, respectivamente, disminuyó la velocidad de crecimiento a todos los niveles de sorbato de potasio ensayados.
- f) La fase de latencia, en general, se incrementó debido al descenso de la actividad de agua, independientemente de la presencia y del nivel de sorbato de potasio, así como, de la presencia de aspartamo.
- g) Los polioles, ya sea en ausencia como en presencia de sorbato de potasio, produjeron un descenso del valor asintótico de la curva de crecimiento. En contraste, el uso de glucosa sola o en combinación con un poliol, incrementó el valor asintótico, independientemente del contenido de sorbato de potasio.
- h) Se observó sinergismo entre los humectantes (glucosa y polioles) y sorbato de potasio con relación a la inhibición del crecimiento. Este comportamiento permitiría disminuir la cantidad del preservador empleado, sin atentar contra la estabilidad microbiológica del producto.
- i) La presencia de aspartamo produjo diferentes efectos sobre la velocidad y la duración de la fase de latencia del crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*, los cuales dependieron del nivel de actividad de agua, del humectante y de la concentración del preservador. Es de destacar que el sistema que contiene xilitol y aspartamo produjo la menor velocidad de crecimiento.
- j) El agregado de aspartamo, ya sea en ausencia como en presencia de sorbato de potasio, incrementó el valor asintótico de los sistemas de actividad de agua reducida.
- k) El descenso de la actividad de agua a 0,985 en presencia de aspartamo, debido al agregado de xilitol, disminuyó la velocidad de crecimiento e incrementó la duración de la fase de latencia, independientemente de la presencia y del nivel de sorbato de potasio.
- l) El valor asintótico, en general, se incrementó con el descenso de la actividad de agua en presencia de aspartamo.

- m) La adición de 0,500% p/p de aspartamo al sistema conteniendo 0,010% p/p de sorbato de potasio y 11,00% p/p de xilitol produjo un efecto antagónico con relación a la inhibición del crecimiento de la levadura.
- ✓ El estudio del **efecto de la depresión de la actividad de agua, de los distintos humectantes utilizados y de la presencia de 0,025% p/p de sorbato de potasio sobre la inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii*** permitió obtener las siguientes conclusiones:
- a) La presencia de 0,025% p/p de sorbato de potasio, en general, incrementó significativamente la velocidad de inactivación térmica en los sistemas estudiados, por lo tanto, es recomendable su empleo para asegurar la estabilidad microbiológica de los mismos.
 - b) El descenso de la actividad de agua a 0,985 por la adición de un poliol, en ausencia de sorbato de potasio y de aspartamo, no produjo efecto sobre la inactivación térmica, mientras que el uso de 10,00% p/p de glucosa la incrementó. El último comportamiento fue también observado cuando la actividad de agua descendió a 0,971.
 - c) En presencia de sorbato de potasio, el descenso de la actividad de agua, generalmente indujo un incremento en la velocidad de inactivación térmica.
 - d) Un drástico descenso de la actividad de agua a 0,900, debido a la adición de glucosa, en ausencia de sorbato de potasio, aumentó significativamente la resistencia térmica de la levadura, en cambio, en presencia del preservador produjo el efecto contrario.
 - e) El uso combinado de sorbato de potasio y de la depresión de la actividad de agua por la adición de un poliol o de glucosa produjo un efecto sinérgico sobre la velocidad de inactivación de *Zygosaccharomyces bailii* en ausencia de aspartamo.
 - f) Se observaron diversos efectos antagónicos sobre la velocidad de inactivación térmica debido al uso conjunto de: i) sorbato de potasio y 19,58% p/p de xilitol; ii) 11,00% p/p de xilitol y aspartamo en ausencia de sorbato de potasio y, iii) sorbato de potasio y la mezcla xilitol / glucosa en presencia de aspartamo.
 - g) El agregado de aspartamo disminuyó la resistencia térmica de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas de actividad de agua reducida a 0,985 / 0,988, y no produjo cambios en los sistemas de actividad acuosa 0,971.

- ✓ El estudio de las **propiedades sensoriales de los sistemas líquidos** arrojó las siguientes conclusiones:
 - a) En general, la presencia de aspartamo, xilitol, glucosa o la mezcla de los mismos incrementó el dulzor y disminuyó la acidez de los sistemas.
 - b) La glucosa fue percibida como menos dulce que el xilitol en ausencia o en presencia de 0,050% p/p de aspartamo.
 - c) El agregado de 0,050% p/p de aspartamo al sistema conteniendo xilitol produjo un efecto sinérgico sobre la intensidad del dulzor. Basándose en ello, el uso de más de un edulcorante permitiría disminuir la cantidad total de los mismos para asegurar un nivel de dulzor específico.
 - d) Un nivel de aspartamo del 0,500% p/p no permitió diferenciar el dulzor de sistemas conteniendo xilitol, glucosa o la mezcla de ambos.

- ✓ El estudio de la **percepción del dulzor de los sistemas conteniendo hidrocoloides** permitió alcanzar las siguientes conclusiones:
 - a) La presencia de los hidrocoloides estudiados produjo un descenso de la percepción del dulzor de los sistemas.
 - b) La pectina de bajo metoxilo fue el hidrocoloide que mayor disminución del dulzor produjo.
 - c) El reemplazo parcial de glucosa por xilitol no modificó la intensidad del dulzor de los sistemas ya sea en ausencia como en presencia de los hidrocoloides. El posterior agregado de aspartamo a estos sistemas incrementó la intensidad del dulzor en presencia de goma gellan, mientras que cuando se utilizó pectina sólo se observó aumento del gusto dulce al agregarse el mayor nivel de aspartamo.

- ✓ El estudio de las **propiedades reológicas de los sistemas conteniendo hidrocoloides** arrojó las siguientes conclusiones:
 - a) En geles formulados con goma gellan, el incremento del contenido de glucosa no afectó las propiedades reológicas de los sistemas. Sin embargo, su reemplazo parcial por xilitol promovió la interacción de las moléculas del polímero e incrementó la

compartimentalización de la fase fluida en la red del gel. Probablemente, este poliol interaccionaría, a través de puentes de hidrógeno, con los hidroxilos de las unidades de dos macromoléculas de gellan próximas, constituyendo puentes de xilitol intercatenarios.

- b) En presencia de pectina de bajo metoxilo, el incremento de la concentración de glucosa favoreció la interacción entre polímeros, mientras que su reemplazo parcial por xilitol la disminuyó. Esto sería en respuesta al diferente grado de inmovilización del agua producido por dichos edulcorantes.
- c) El aspartamo mostró un efecto plastificante cuando se lo utilizó en un nivel de 0,050% p/p en geles de goma gellan, ó de 0,500% p/p en geles de pectina. Este comportamiento se relacionó con el carácter hidrofóbico del aspartamo.
- d) Una concentración de 0,500% p/p de aspartamo produjo el incremento de las interacciones entre las cadenas de gellan favorecido por la interacción edulcorante – polímero con el desplazamiento simultáneo de las moléculas de agua del entorno, originando una estructura notablemente rígida que soporta una fase fluida poco viscosa y poco amortiguadora de la red.
- e) En general, se observó mayor grado de interacción polímero – polímero en geles formulados con pectina respecto a aquellos con goma gellan. Esto sería en respuesta a cambios en la movilidad del solvente.
- f) La presencia de pectina incrementó apreciablemente la viscosidad de la fase fluida en todos los sistemas estudiados. Este efecto, propio de la pectina, se debería a la conformación que presenta la misma cuando gelifica en presencia de agua.
- g) De ambos hidrocoloides empleados, las macromoléculas de pectina serían más sensibles a los cambios en la movilidad del agua circundante, producidos, ya sea por el incremento en el contenido de glucosa, por su reemplazo parcial por xilitol o por el agregado de aspartamo. Ello se debería a que el agua sería un mejor solvente para la pectina que para la goma gellan, tal como se puede inferir de la conformación que estos hidrocoloides adoptan al gelificar en agua.
- h) Las propiedades reológicas de los geles estarían ligadas con la percepción del dulzor dado que la naturaleza del hidrocoloide determinó, entre otras propiedades, las características estructurales de la red formada así como la difusión del edulcorante a través de la misma y, por consiguiente, la percepción del dulzor. En este sentido cabe destacar que el agregado de gellan o de pectina de bajo metoxilo sólo modificó el grado

de percepción del dulzor y no la percepción relativa que *per se* mostraron los edulcorantes.

Los resultados obtenidos aportan información original a un área de vacancia en el país, como es el estudio de las interacciones entre aditivos y componentes de los alimentos. Dicha información es esencial para realizar una correcta elección de los aditivos a utilizar en la formulación y procesamiento de los alimentos y, de la concentración indispensable para asegurar la adecuada actividad biológica de los preservadores, la esperada funcionalidad de las macromoléculas (ie: espesantes) y la óptima calidad de los alimentos, contribuyendo a la obtención de alimentos sanos y sensorialmente adecuados.

A continuación se destacan algunos ejemplos:

- i) Para la formulación de una mermelada, que posee glucosa propia de las frutas, sería conveniente utilizar xilitol para deprimir la actividad de agua en lugar de los otros polioles estudiados, ya que de este modo la destrucción del preservador sería menor, así como el desarrollo de pardeamiento.
- ii) La adición de 0,500% p/p de aspartamo al sistema anterior permitiría realzar el gusto dulce y disminuir la acidez, sin afectar la estabilidad del preservador, la del edulcorante artificial ni el desarrollo de pardeamiento no enzimático.
- iii) En cambio, si se desea formular una bebida o jalea sintética para regímenes especiales, es indistinto el empleo de polioles o glucosa para la depresión de la actividad acuosa desde el punto de vista de la estabilidad del preservador ya que, el efecto que presentan estos humectantes sobre la destrucción del mismo no es significativamente diferente. Sin embargo, si tiene prioridad la disminución del pardeamiento, es aconsejable el empleo de xilitol o sorbitol.
- iv) Un sistema de actividad de agua 0,985, conteniendo xilitol, aspartamo y sorbato de potasio, permite la óptima inactivación térmica de *Zygosaccharomyces bailii* ya que el mismo posee uno de los menores valores de velocidad de inactivación térmica.
- v) Desde el punto de vista de las propiedades sensoriales, es importante tener en cuenta para la formulación de alimentos ácidos, el enmascaramiento de la acidez

que producen los edulcorantes. Otro factor a considerar es que la incorporación de hidrocoloides disminuye la percepción del dulzor, y este comportamiento depende de la existencia de interacciones físico-químicas entre los edulcorantes y los hidrocoloides, estando, las mismas, condicionadas por la presencia del agua utilizada como solvente. En conclusión, si se desea formular una mermelada o jalea de reducido tenor glucídico, la incorporación de goma gellan permitiría una mayor percepción del dulzor que en el caso de utilizar pectina de bajo metoxilo.

Todas las recomendaciones antes citadas se basan en el estudio realizado en sistemas modelo con la expectativa de que ocurra el mismo comportamiento en un alimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira Lopes, A., Ramos, J., y Loureiro-Dias, M. C. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **56**:191-197.
- AOAC. 1990. Secciones 20.098 – 20.101. Official Methods of Analysis. Ed. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC.
- An-Erl King, V. 1993. Studies on the control of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* by using response surface methodology to achieve affective preservation at high water activities. *International Journal of Food Science and Technology*, **28**:519-529.
- Arabie, P. y Moskowitz, H. R. 1971. The effects of viscosity upon perceived sweetness. *Perception and Psychophysics*, **9**:410-412.
- Arechederra, T. M. 2002. Informe especial de sistemas edulcorantes. Tentando los sentidos. *Énfasis Alimentación*, **6**:6-20.
- Arvisenet, G. y Cayot, N. 2001. Influence of aroma compounds on large deformation properties of starch-based systems during aging. *Journal of Texture Studies*, **32**:185-203.
- Arya, S. S. y Thakur, B. R. 1988. Degradation products of sorbic acid in aqueous solutions. *Food Chemistry*, **29**:41-49.
- Arya S. S. 1980. Stability of sorbic acid in aqueous solutions. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, **28**(6):1246-1249.
- Astley, T., Birch, G. G., Drew, M. G., Rodger, P. M. y Wilden, G. R. 1996. Computer modelling studies of the water-structuring properties of carbohydrates and the sweetness response. *Food Chemistry*, **56**(3):231-240.
- Augustin, J. C., Rosso, L., y Carlier, V. 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, **38**:137-146.
- Axelos, M. A. Y Thibault, J. F. 1991. The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. En: The chemistry and technology of pectin. Editado por Reginald H. Walter. Academic Press, Inc., New York, USA.
- Bandelin, F. J. 1958. The effect of pH on the efficiency of various mold inhibiting compounds. *J.Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* **47**, 691.
- Baranyi, J.; McClure, P. J.; Sutherland, J. P. y Roberts, T. A. 1992. Modeling bacterial growth responses. Presented at the Society for Industrial Microbiology. April, 12-15. Tampa. Florida.
- Batthey, S. A., Duffy, S. y Schaffner, D. 2002. Modelling yeast spoilage in cold filled ready to drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:1901-1906.
- Bayarri, S., Durán, L. y Costell, E. 2003. Compression resistance, sweetener's diffusion and sweetness of hydrocolloids gels. *International of Dairy Journal*, **13**:643-653.
- Bayarri, S., Rivas, I., Costell, E. y Durán, L. 2001. Diffusion of sucrose and aspartame in kappa-carrageenan and gellan gum gels. *Food Hydrocolloids*, **15**:67-73.
- Bell, L. y Labuza, T. 1991, a. Aspartame degradation as a function of water activity. In: Levine H, Slade L, editors. Water relationships in food. New York: Plentum Press. p337-349.
- Bell, L. y Labuza, T. 1991, b. Aspartame degradation kinetics as affected by pH in intermediate and low moisture food systems. *Journal of Food Science*, **56**(1):17-20.

- BeMiller, J. N. y Whistler, R. L. 1996. Carbohydrates. En: Food Chemistry. Vol I. Tercera Edición. Editado por O. R. Fennema. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Beuchat, L. R. 1982. Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *Journal of Food Science*, **47**:1679-1682.
- Beuchat, L. R. 1981 a. Combined effects of solutes and food preservatives on rates of inactivation of and colony formation by heated spores and vegetative cells of molds. *Applied and Environmental*, **41**(2):472-477.
- Beuchat, L. R. 1981 b. Synergistic effects of potassium sorbate and sodium benzoate on thermal inactivation of yeasts. *Journal of Food Science*, **46**:771-777.
- Beuchat, L. R. 1976. Effectiveness of various food preservatives in controlling the outgrowth of *Byssoschlamys nivea* ascospores. *Mycopathologia*, **59**, 175.
- Bhajakar, D. V. y Kulkarni, P. R. 1991. Osmotolerant yeast isolates from fruit preserves. *Die Nahrung*. 35, 99-101.
- Biliaderis, C. G. 1994. Characterization of starch networks by small strain dynamic rheometry. En: *Developments in carbohydrate chemistry*, R. J. Alexander & H. F. Zobel, (pp. 87-135). St Paul, Minnesota: The American Association of Cereal Chemists.
- Bills, S., Restaino, L, y Lenovich, L. 1982. Growth response of an osmotolerant sorbate-resistant yeast, *Saccharomyces rouxii*, at different sucrose and sorbate levels. *Journal of Food Protection*, **45**:1120-1124.
- Binstok, G. 1998. Reacciones entre sorbatos y nitritos en sistemas cárnicos. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Birch, G. G., Parke, S. Siertsema, R. y Westwell, J. M. 1996. Specific volumes and sweet taste. *Food Chemistry*, **56**(3):223-230.
- Birch, G. G. y Shamil, S. 1988. Structure, sweetness and solution properties of small carbohydrate molecules. *J Chem Soc Faraday Trans I*, **84**(8):2635-2640.
- Birch, G. G. 1984. The chemical basis of sweetness perception in beverages. *Food Chemistry*, **51**:359-364.
- Blocher, J. C. y Busta, F. F. 1985. Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. *Journal of Applied Bacteriology*, **59**:467-478.
- Braverman, J. B. 1967. Introduction to biochemistry of foods. Elsevier Publishing Company, Nueva York.
- Brul, S. y Klis, M. 2003. Food preservation and the development of microbial resistance. En: Food preservation techniques. Editado por Peter Zeuthen y Leif Bogh-Sorensen. CRC press, Boca Raton, USA.
- Buchanan, R. L. 1993. Developing and distributing userfriendly applications software, *Journal of Industrial Microbiology*, **12**:251.
- Buchanan, R. L., Golden, M. H. y Whiting, R. C. 1993. Defferentiation of yhe effects of pH and lactic or acetic concentration on the kinetics of *Listeria Monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection*, **56**(6):474-478, 484.
- Buchanan, R. L. 1991. Predictive microbiology: mathematical modelling of microbial growth in foods. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 484, 250-260.
- Buera, M. P. 1986. Cinética de las reacciones de pardeamiento no enzimático entre azúcares y glicina en soluciones de alta actividad de agua. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

- Buera, M. P., Lozano, R. D. y Petriella, C. 1986. Definition of color in the non-enzymatic browning process. *Die Farbe*, **32/33**:316-326.
- 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.
- Calviño, A. M., Garrido, D. y García, M. 2000. Potency of sweetness of aspartame, D-tryptophan and thaumatin evaluated by single value and time intensity measurements. *Journal of Sensory Studies*, **15**(1):47-64.
- Calviño, A. M. 1995. Sentidos químicos: gusto, olfato y trigémino. En Enciclopedia Iberoamericana de Psiquiatría. Directores: Vidal, G., Alarcón, R. D. y Lolas Stepke, F. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Vol III, 1083-1093.
- Calzada, J. F. y Peleg, M. 1978. Mechanical interpretation of compressive stress-strain relationships of solid foods. *Journal of Food Science*, **43**:1087-1092.
- Campos, C. A., Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N. 2000. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, **54**:117-122.
- Campos, C. A., Alzamora, S. M. y Gerschenson, L. N. 1997. Sorbate destruction and non-enzymatic browning in model aqueous systems. *Food Science and Technology International*, **3**(6):405-411.
- Campos, C. A. y Gerschenson, L. N. 1996. Effect of certain additives on sorbates stability. *Food Research International*, **29**(2):147-154.
- Campos, C. A. 1995. Estabilidad del ácido sórbico durante la preservación y el almacenamiento de alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., Alzamora, S. M. y Chirife, J. 1991. Determination of sorbic acid in raw beef: an improved procedure. *Journal of Food Science*, **56**(3):863-866.
- Carlevaro, M., Caffarena, E. R. y Grigera, J. R. 1998. Hydration properties of xilitol: computer simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **23**:149-155.
- Casas, E., de Ancos, B., Valderrama, M. J., Cano, P. y Peinado, J. M. 2004. Pentadiene production from potassium sorbate by osmotolerant yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, **94**:93-96.
- Castro, M. P., Garro, O., Campos, C. A. y Gerschenson, L. N. 2002. Interactions between additives: its effect on sorbate stability and *Z. bailii* minimum inhibitory concentration in model aqueous systems resembling salad dressings. *Food Science and Technology International*, **8**(1):33-39.
- Cerruti, P., Alzamora, S. M. y Chirife, J. 1990. A multiparameter approach to control the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in laboratory media. *Journal of Food Science*, **55**:839.
- Chai, E., Oakenfull, D. G., McBride, R. L. y Lane, A. G. 1991. Sensory perception and rheology of flavoured gels. *Food Australia*, **43**(6):256-261.
- Chan, L. W., Kurup, T. R., Muthaiah, A. y Thenmozhiyal, J. C. 2000. Interaction of p-hydroxybenzoic esters with beta-cyclodextrin. *Int J Pharm*, Feb; 195(1-2): 71-9.
- Chandrasekaran, R., Puigjaner, L. C., Joyce, K. L. y Arnott, S. 1988. Cation interactions in gellan: an X-ray study of the potassium salt. *Carbohydrate Research*, **181**:23-40.
- Cheftel, J. C. y Cheftel, H. 1976. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza.

- Cheng, L., Moghraby, J. y Piper, P. W. 1999. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiology Letters* **170**:89-95.
- Chichester, D. F. y Tanner, F. W. 1975. Antimicrobial Food Additives. En: *Handbook of food additives*. Ed. T. E. Furia. CRC Press, Cleveland.
- Christensen, C. M. 1980. Effects of solution viscosity on perceived saltiness and sweetness. *Perception and Psychophysical*, **28**(4):347-353.
- Clark, A. H. y Ross-Murphy, S. B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolimer gels. *Adv. Poly. Sci.*, **83**, 55-192.
- Clegg, K. M. 1964. Non enzymatic browning of lemon juice. *Journal of Science of Food Agriculture*, **15**:878.
- Cloninger, M. R. y Baldwin, R. E. 1974. L-aspartyl-phenylalanine methyl ester (aspartame) as a sweetener. *Journal of Food Science*, **39**:347-349.
- Código Alimentario Argentino. Ley 18.284. Decreto 2126/71. 1969. Actualizado al 2005. Capítulo XVII. Alimentos Dietéticos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Argentina.
- Cole, S. J. 1967. The Maillard reaction in food products. Carbon dioxide production. *Journal of Food Science*, **32**:245.
- Corry, J. 1976, a. The effect of sugars and polyols on the heat resistance and morphology of osmophilic yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, **40**:269-276.
- Corry, J. 1976, b. Sugar and polyol permeability of Salmonella and osmophilic yeast cell membranes measured by turbidimetry, and its relation to heat resistance. *Journal of Applied Bacteriology*, **40**:277-284.
- Costell, E., Durán, L. y Peyrolón, M. 2000. Influence of texture and type of hydrocolloid on perception of basic tastes in carrageenan and gellan gels. *Food Science and Technology International*, **6**(6):495-499.
- Costell, E.; Fiszman, S.M.; and Durán, L. 1997. Propiedades físicas I. Reología de sólidos y textura. En: Temas en Tecnología de Alimentos. Ed.: Aguilera, J.M. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia Y Tecnología para el desarrollo. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Crosby, G. A. 1976. New sweeteners. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 297-323.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., y McMeekin, A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, **23**:391-404.
- Deis, R. 1993. Low-calorie and bulking agents. *Food Technology*, December, 94.
- Dentini, m., Desideri, P., Crescenzi, V., Yuguchi, Y., Urakawa, H. y Kajiwara, K. 1999. Solution and gelling properties of gellan benzyl esters. *Macromolecules*, **32**:7109-7115.
- Deuel, H. J., Slater, R., Weil, C. S. y Smyth, H. F. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I Harmless of sorbic acid as a dietary component. *Food Research*, **19**:13-19.
- Dever, M. C., Beveridge, H. J. T., Cumming, D. B. y MacGregor, D. R. 1986. Measurement and stability of aspartame in a fruit spread. *Can Ins Food Sci Technol J*, **19**(2):86-88.
- Díaz de Tablante, R. V., Tapia de Daza, M. S., Montenegro, G. y Gonzalez I. 1993. Desarrollo de productos de mango y papaya de alta humedad estabilizados por métodos combinados.

- Boletín Internacional de Divulgación nº 1*. Ed. J. Welti, F. Vergara Balderas, P. Cortes Salazar y L. Lopez Leal. Universidad de las Américas, Puebla.
- Dierckx, S. y Huyghebaert, A. 2002. Effects of sucrose and sorbitol on the gel formation of a whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, **16**:489-497.
- Di Sipio, F. 1992. Analisi dell' acido sorbico in matrice alimentari. Estrazione per distillazione in corrente di vapore - purificazione per ripartizione liquido - liquido - dosaggio per spettrofotometria U.V. *Industrie Alimentari*. **31**, 103.
- Doublier, J. L.; Launay, L. y Cuvelier, G. 1992. Viscoelastic properties of food gels. En: *Viscoelastic Properties of Foods*. Eds.: Rao, M.A.; and Steffe, J.F.. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Doyon, L. y Smyrl, T. G. 1983. Interaction of thiamine with reducing sugars. *Food Chemistry*. **12**:127.
- Dryden, E. C. y Hills, C. 1959. Taste thresholds for sodium benzoate and sodium sorbate in apple cider. *Food Technology*, **13**:84-86.
- Durán, E., Costell, E., Izquierdo, L. y Durán, L. 1994. Low sugar bakery jams with gellan gum-guar mixtures. Influence of composition on texture. *Food Hydrocolloids*, **8**(3-4):373-381.
- Eichner, K. y Karel, M. 1972. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **20**(2):218-223.
- Eklund, T. 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, 383.
- Ellis, G. P. 1959. The Maillard reaction. *Adv Carbohydr Chem*, **14**:63.
- Farré, J. R., Ibarz, A. Y Garza, S. 2002. Gelificación inducida por Ca²⁺ en pectina de bajo metoxilo. Presentado en el 2º Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Lérida, España.
- Fennema O. 1996. Water and ice. In: Fennema O, editor. *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker Ed. p. 18-88.
- Fernández, J., Soto, T., Vicente-Soler, J., Cansado, J. y Gacto, M. 1996. Inhibition by polyols of the heat-shock-induced activation of trehalase in the yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, **38**(1):43-50.
- Francis, F. J. y Clydesdale, F. M. 1975. *Food Colorimetry: theory and applications*. The Avi Publishing Company, Inc.
- Frank, R. A., Jane, S., Mize, S. y Carter, R. 1989. An assessment of binary mixture interactions for nine sweeteners. *Chemical Senses*, **14**:621-632.
- Fu, J. T. y Rao, M. A. 1999. The influence of sucrose and sorbitol on gel-sol transition of low-methoxyl pectin + Ca²⁺ gels. *Food Hydrocolloids*, **13**:371-380.
- Galema, S. A., Howard, E. Engberts, J. B. F. N. y Grigera, J. R. 1994. The effect of stereochemistry upon carbohydrate hydration. A molecular dynamics simulation of b-D-galactopyranose and (a,b)-D-talopyranose. *Carbohydrate Research*, **265**:215-225.
- García, A. V., Sevillano, E., Castro, D., Acosta, V., García, A., Casals, A., Casals, C., Fernandez, C. y Nuñez, M. 1993. Conservación de pulpa de guayaba por métodos combinados. *Boletín Internacional de Divulgación nº 1*. Ed. J. Welti, F. Vergara Balderas, P. Cortes Salazar y L. Lopez Leal. Universidad de las Américas, Puebla.

- Garza, S. 1996. Caracterización reológica y microbiológica, y cinéticas de deterioro en cremogenado de melocotón. Tesis doctoral. Universidad de Lleida, España.
- Gerschenson, L. N. y Campos, C. A. 1995. Sorbic acid stability during processing and storage of high-moisture foods. En: Barbosa Cánovas G, Welti Chanes J, editores. Food preservation by moisture control. Fundamentals and applications. Lancaster, PA, U.S.A.: Technomic Publishing Co. p 761-790.
- Gerschenson, L. N., Alzamora, S. M. y Chirife, J. 1987. Effect of sodium Chloride and glycerol on the stability of sorbic acid solutions at reduced water activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **20**:98.
- Gerschenson, L. N., Alzamora, S. M. y Chirife, J. 1986. Stability of sorbic acid in model food systems of reduced water activity: sugar solutions. *Journal of Food Science*, **51**(4):1028-1031.
- Gibson, W. 1992. Gellan gum. En Thickening and gelling agents of food. Imeson, A. (ed.). Blakie Acad. Profss., London, pp. 227-249.
- Gibson, A. M., Bratchell, N. y Roberts, T. A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology*, **62**, 479-490.
- Gibson, B. 1973. The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, **36**:365-376.
- Giese, J. H. 1993. Alternative sweeteners and bulking agents. *Food Technology*, 114-126.
- Giese, J. H. 1992. Hitting the spot: beverages and beverage technology. *Food Technology*, 70-80.
- Golden, D. A. y Beuchat, L. R. 1992. Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**:524-530.
- González-Thomas, L., Carbonell, I., y Costell, E. 2004. Influence of type, concentration and flow behaviour of hydrocolloid solutions on aroma perception. *European Food Research and Technology*, **218**(3):248-252.
- Gould, G. W. 1988. Interference with homeostasis-food. En: Banks, J. G., Board, R. G., Gould, G. W. y Mittenbury, R. W., editores. Homeostatic mechanisms in microorganism. Bach University Press.
- Gould, G. W. 1985. Present state of knowledge of water activity effects on microorganisms. En Simatos, D. y Multon, J. L., editores. Properties of water in foods in relation to quality and stability (pp 229-245). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Grassi, M., Lapasin, R. y Pricl, S. 1996. A study of the rheological behavior of scleroglucan weak gel systems. *Carbohydrate Polymers*, **29**:169-181.
- Griffith, T. y Johnson, J. A. 1957. Relation of the browning reaction to storage stability of sugar cookies. *Cereal Chemistry*, **34**:159-169.
- Grigera, J. R. 1988. Conformation of polyols in water. *J Chem Soc Faraday Trans I*, **84**(8):2603-2608.
- Grosso, C. R. F. y Rao, M. A. 1998. Dynamic rheology of structure development in low-methoxyl pectin + Ca²⁺ + sugar gels. *Food Hydrocolloids*, **12**:357-363.
- Guerzoni, M. E., Gardini, F. y Duan, J. 1990. Interactions between inhibition factors on microbial stability of fruti-based systems. *International Journal of Food Microbiology*, **10**:1-18.
- Guirao, M. 1980. Los sentidos, bases de la percepción. Editorial Alambra, S. A., Madrid, España.

- Gunning, A. P. y Morris, V. J. 1990. Light scattering studies of tetramethyl ammonium gellan. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**:338-341.
- Harrington, W. O., Anne, S. J. y Hills, C. H. 1962. Spectrophotometric determination of sorbic acid in apple cider. *Journal of Food Science*, **27**:15.
- Hatcher, Jr., W. S., Weihe, J. L., Splittstoesser, D. F., Hill, E. C. y Parish, M. E. 1992. Fruit beverages. En: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Editado por C. Vanderzant y D. F. Splittstoesser. 3era edición. American Public Health Association. Edwards Brothers, Ann Arbor, MI, USA.
- Hill, M. A., Mitchell, J. R. y Sherman, P. A. 1995. The relationship between the rheological and sensory properties of a lemon pie filling. *Journal of Texture Studies*, **26**:457-470.
- Ho, C. –T., Huang T. –C., Cha, A. S. y Sotirhos, N. 1987. Studies on the stability of aspartame in the presence of glucosa and vanillin. En G. Charalambous, editor. *Frontiers of Flavor. Proceedings de la 5th International Flavor Conference* (p233-240), Chalkidiki, Grecia.
- Hodge, J. E. y Osman, E. M. 1967. Carbohydrates. En: *Principles of Food Science*. Ed. O. R. Fennema. Marcel Deckker Inc., Nueva York.
- Hodge, J. E. 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1**:928.
- Homler, B. 1984. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, **38**(7):50-55.
- Howard, E. I. Y Grigera, J. R. 1996. On the sweetness properties of aldoses: characterization of molecular active sites by computer simulation. *Carbohydrate Research*, **282**:25-40.
- Huang, T. –C., Soliman, A. A., Rosen, R. T. y Ho, C. –T. 1987. Studies on the maillard browning reaction between aspartame and glucose. *Food Chemistry*, **24**:187-196.
- Huhtanen, C. N. y Feinberg, J. 1980. Sorbic acid inhibition of *Clostridium botulinum* in nitrite-free poultry frankfurters. *Journal of Food Science*, **45**:453.
- Hunt, R. W. G. 1977. The specification of colour appearance. I. Concepts and terms. *Colour Research and Applications*, **2**:55.
- Hutchinson, S.A., Ho, G. S. Y Chi, T.H. 1999. Stability and degradation of high intensity sweeteners: aspartame, alitame and sucralose. *Food Reviews International*, **15**(2):249-261.
- Hutteau, F. y Mathlouthi, M. 1998. Physicochemical properties of sweeteners in artificial saliva and determination of a hydrophobicity scale for some sweeteners. *Food Chemistry*, **63**(2):199-206.
- Hutteau, F., Mathlouthi, M., Portmann, M. O. y Kilcast, D. 1998. Physicochemical and psychophysical characteristics of binary mixtures of bulk and intense sweeteners. *Food Chemistry*, **63**(1):9-16.
- Hyvönen, L., Kurkela, R., Koivistoinen, P. y Ala-Kulju, M. L. 1978. The relative sweetness of fructose, glucose and xilitol in acid solutions at different temperatures. *Lebensm.-Wiss. u. – Technol.*, **11**:11-14.
- Ikeda, S., Nitta, Y., Tamsiripong, T., Pongsawatmanit, R. y Nishinari, K. 2004. Atomic force microscopy studies on cation-induced network formation of gellan. *Food Hydrocolloids*, **18**:727-735.
- Imeson, A. 1992. Thickening and gellins agents for food. Chapman & Hall, Glasgow, Gran Bretania.

- Ivey, F.J. y Robach, M. C. 1978. Effect of sorbic acid and sodium nitrite on *Clostridium botulinum* outgrowth and toxin production in canned comminuted pork. *Journal of Food Science*, **43**, 1782.
- Izuysu, T. y Wani, K. 1985. Food texture and taste: a review. *Journal of Texture Studies*, **16**:1-28.
- Jackman, R. L. y Stanley, D. W. 1992. Failure mechanisms of tomato pericarp tissue suggested by large and small deformation test. *Journal of Texture Studies*, **23**:475-489.
- Jampen, S., Britt, I. J. y Tung, M. A. Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes. *Food Research International*, **33**:579-586.
- Jenkins, P., Poulus, P., Cole, M, Vandeven, M. & Legan, J. 2000. The boundary for growth of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified products described by models for time to growth and probability of growth. *Journal of Food Protection*, **63**:222-230.
- Jericó, S., Carubelli, C. R., Massabni, A. M. G., Stucchi, E. B., Leite, S. R. y Malta, O. 1998. Spectroscopic study of the interaction of Nd⁺³ with amino acids: phenomenological 4f-4f intensity parameters. *J Braz Chem Soc*, **9**(5):487-493.
- Juven, R. 1976. Bacterial spoilage of citric products of pH lower than 3,5. *J. Milk Food Technol.* **39**, 819.
- Katsuyama, K. 2001. US Patent 6, 328,984.
- Keating, K. R. y White, C. H. 1990. Effect of alternative sweeteners in plain and fruit-flavored yogurts. *Journal of Dairy Science*, **73**:54-56.
- Keast, R. S. y Breslin, P. A. 2002. An overview of binary taste-taste interactions. *Food Quality and Preference*, **14**:111-124.
- Keller, S. E., Newberg, S. S., Krieger, T. M. y Shazer, W. H. 1991 a. Degradation of aspartame in yogurt related to microbial growth. *Journal of Food Science*, **56**(1):21-23.
- Keller, S. E., Nash, T. C., Newberg, S. S. y Shazer, W. H. 1991 b. The degradation of aspartame in chocolate milk related to processing conditions and subsequent microbial load. *Journal of Dairy Science*, **74**:1214-1217.
- Khan, S., Royer, J. y Srinivasa, R. 1997. Rheology: Tools and methods. *Aviation Fuels with Improved Fire Safety: A Proceedings*, **6**:31-46
- Khandelwal, G. D. y Wedzicha, B. L. 1990. Nucleophilic reactions of sorbic acid. *Food additives and Contaminants*, **7**:685.
- King, B. M., Arents, P. y Duineveld, C. A. A. 2003. A comparison of aspartame and sucrose with respect to carryover effects in yogurt. *Food Quality and Preference*, **14**(1):75-81.
- King, B. M., Arents, P., Duineveld, C. A. A. y Moreau, N. 2000. En Bonnet, C., editor, Fechner Day '00, Proceedings del Sixteenth Annual Meeting de la International Society for Psychophysics (pp. 67-72). Strasbourg, Francia, The International Society for Psychophysics.
- Knerr, T., Lerche, H., Pischetsrieder, M. y Severin, T. 2001. Formation of a novel colored product during the Maillard reaction. *J Agric Food Chem*, **49**:1966-1970.
- Kubo, I. y Lee, S. H. 1998. Potentiation of antifungal activity of sorbic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46**:4052-4055.
- Labuza, T. P. y Riboh, D. 1982. Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology*, **36**(1):66-72.

- Labuza, T. P., Warren, R. y Warmbier, J. 1977. The physical aspects with respect to water and non-enzymatic browning. *Adv Exp Med Biol*, **86B**:379.
- Lambert, R. J. y Stratford, M. 1999. Weak-acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, **86**:157-164.
- Lapasin, R. y Prici, S. 1995. Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications. Editorial Chapman & Hall, London, UK.
- Lau, O. –W., Luk, S. –F. y Chan, W. –M. 1988. Spectrophotometric determination of aspartame in soft drinks with ninhydrin as reagent. *Analyst*, **113**:765-768.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. 1993. Principios de bioquímica. Editorial Omega, Barcelona, España.
- Leistner, L. 1995. Use of hurdle technology in food processing: recent advances. En: Barbosa Cánovas, G., Welti Chanes, J., editores. Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co. p 377-396.
- Leistner, L. y Gorris, G. M. 1995. Food preservation by combined processes. Final report FLAIR concerted action No. 7, Subgroup B. EUR 15776 EN/ISBN 90-900-7303-5.
- Lenovich, L. M., Buchanan, R. L., Worley, N. J. y Restaino, L. 1988. Effect of solute type on sorbate resistance in *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Food Science*, **53**(3):914-916.
- Liewen, M. B. y Marth, E. H. 1985. Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid: A review. *Journal of Food Protect*, **48**:364.
- Linden, G. y Lorient, D. 1999. New ingredients in food processing Biochemistry and agriculture. Editor: Dr. M. J. Lewis. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Lindsay, R. C. 1996. Flavor. En: Food Chemistry. Vol II. Tercera Edición. Editado por O. R. Fennema. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Lingnert, H. y Lundgren, B. 1980. Antioxidative Maillard reaction products.IV. Application in sausages. *Journal of Food Process and Preservation*, **4**:235-246.
- Loureiro, V. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Res Int*, **33**:247-256.
- Lozano, R. D. 1979. Diferencias de color. *Investigación y Ciencia*. **39**:8.
- Lozano, R. D. 1978. El color y su medición. Editorial América Lee, Buenos Aires.
- Lueck, E. 1980. *Antimicrobial Food Additives*. Springer-Verlag, Nueva York.
- Lueck, E. 1976. Sorbic acid as a food preservative. *International Flavors Food Additives*, **7**:122.
- Lugaz, O., Pillias, A. M., Boireau-Ducept, N. y Faurion, A. 2005. Time-intensity evaluation of acid taste in subjects with saliva high flow and low flow rates for acids of various chemical properties. *Chemical Senses*, **30**(1):89-103.
- Macosko, C. W. 1994. Rheology principles, measurements, and applications. Wiley-VCH, Inc.
- Makdesi, A. K. y Beuchat, L. 1996. Evaluation of media for enumerating heat-stressed benzoate-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, **33**:169-181.
- Mälkki, Y., Heiniö, R. L. y Autio, K. 1993. Influence of oat gum, guar gum and carboxymethyl cellulose and the perception of sweetness and flavour. *Food Hydrocolloids*, **6**(6):525-532.

- Marshall, S. G. y Vaisey, M. 1972. Sweetness in relation to some textural characteristics of hydrocolloid gels. *Journal of Texture Studies* **3**:173-185.
- Martinez, V. Y. 2005. Alteraciones microestructurales y ultraestructurales de tejidos vegetales mínimamente procesados. Impacto en las características mecánicas. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Mathlouthi, M., Hutteau, F. Y Angiboust, J. F. 1996. Physicochemical properties and vibrational spectra of small carbohydrates in aqueous solution and the role of water in their sweet taste. *Food Chemistry*, **56**(3):215-221.
- Mathlouthi, M. y Seuvre, A. M. 1988. Solution properties and the sweet taste of small carbohydrates. *J Chem Soc Faraday Trans I*, **84**(8):2641-2650.
- Matysiak, N. L. y Noble, A. C. 1991. Comparison of temporal perception of fruitiness in model systems sweetened with aspartame, an aspartame + acesulfame K blend, or sucrose. *Journal of Food Science*, **56**(3):823-826.
- Mauron, J. 1981. The Maillard reaction in food. A critical review from the nutritional standpoint. *Prog Food Nutr Sci*, **5**:5.
- May, C. D. 1992. Pectins. En Thickening and gelling agents of food. Imeson, A. (ed.). Blakie Acad. Profss., London, pp. 227-249.
- Mazur, R. H. 1976. Aspartame-a sweet surprise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **2**:243-249.
- McBride, R. L. y Finlay, D. C. 1990. Perceptual integration of tertiary taste mixtures. *Perception and Psychophysics*, **48**:326-330.
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. y Ratkowsky, D. A. 1993. Predictive microbiology: theory and application. (xx ed., pp. 11-86) Research Studies Press Ltd. England.
- Meilgaard, M, Civille, G. V. y Carr, B. T. 1987. Sensory evaluation techniques. Cap. II, CRC Pres, Inc. Florida.
- Melnick, D., Luckmann, F. H. y Gooding, C. M. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. V. Resistance of sorbic acid in cheese to oxidative degradation. *Food Res*, **19**:33.
- Meschter, E. E. 1953. Fruit color loss. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1**:574.
- Meyer, S. 2002. Investigating taste interactions. *Fruit Processing*, **12**(5):224-227.
- Meyer, S. y Riha III, W. E. 2002. Optimizing sweetener blends for low-calorie beverages. *Food Technology*, **56**(7):42-45.
- Milas, M. y Rinaudo, M. 1996. The gellan sol-gel transition. *Carbohydrate Polymers*, **30**:177-184.
- Montes de Oca, C., Gerschenson, L. N. y Alzamora, S. M. 1991. Effect of the addition of fruit juices on water activity of sucrose-containing model systems during storage. *Lebensm – Wiss Technol*, **24**(4):375-377.
- Montijano, H., Tomás-Barberán, F. A. y Borrego, F. 1998. Propiedades tecnológicas y regulación de los edulcorantes de alta intensidad en la Unión Europea. *Food Sci Technol Int*, **4**:5-16.
- Morel, J. P., Lhermet, C. y Morel-Desrosiers, N. 1988. Interactions between cations and sugars. *J Chem Soc Faraday Trans I*, **84**(8):2567-2571.
- Morikata, H., Kimura, S. y Fukuba, H. 2003. Rheological properties of matriz-particle gellan gum gel: effects of calcium chloride on the matrix. *Food Hydrocolloids*, **17**:653-660.

- Morikata, H. y Naito, S. 2002. Agar and gelatin gel flavor release. *Journal of Texture Studies*, **33**:201-214.
- Moskowitz, H. R. 1981. Changing the carbohydrate sweetness sensation. *Lebensm.-Wiss. u. – Technol.*, **14**:47-51.
- Moskowitz, H. R. y Arabie, P. 1970. Taste intensity as a function of stimulus concentration and solvent viscosity. *Journal of Texture Studies*, **1**:502-510.
- Namiki, M., Qsawa, T., Kada, T., Tsuju, K. y Namiki, K. 1983. Formation of C-nitro and C-nitroso mutagens by the reaction of nitrite with sorbic acid and its analogues and their inactivation with foods constituents. *Carcinogens Mutagens Environ*, **3**:109.
- Nickerson, M. T., Paulson, A. T. y Speers, R. A. 2003. Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation. *Food Hydrocolloids*, **17**:577-583.
- Norma Iram, 20018. 2002. Análisis sensorial. Metodología. Método de estimación de la magnitud. Instituto Argentino de Normalización.
- O'Brien Nabors L. 2002. Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. *Food Technology*, **56**(7):28-34, 45.
- Park, H. S. y Marth, E. H. 1972. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. *J. Milk Food Technol.* **35**:532-539.
- Park, H. S., Marth, E. H. y Olson, N. F. 1970. Survival of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. *J Milk Food Technol.* **35**, 532.
- Parke, S. A. y Birch, G. G. 1999. Solution properties and sweetness response of selected bulk and intense sweeteners. *J Agric Food Chem*, **47**:1378-1384.
- Pastor, M. V., Costell, E., Izquierdo, L. y Durán, L. 1996. Optimizing acceptability of a high fruit-low sugar peach nectar using aspartame and guar gum. *Journal of Food Science*, **61**(4):852-855.
- Pastor, M. V., Costell, E., Izquierdo, L. y Durán, L. 1994. Effects of concentration, pH and salt content on flow characteristics of xanthan gum solutions. *Food Hydrocolloids*, **8**(3-4):265-275.
- Pattanaargson, S., Chuapradit, C. And Srisukphonraruk, S. 2001. Aspartame degradation in solutions at various pH conditions. *Journal of Food Science*, **66**(6):808-809.
- Pederson, M., Albury, N. y Christiansen, M. D. 1961. The growth of yeasts in grape juice stored at low temperatures. IV. Fungistatic effects of organic acids. *Applied Microbiology*, **9**:162.
- Pekkarinen, L. 1969. The mechanism of oxidation of sorbic acid by molecular oxygen in water. *Suomen Kemistilehti*. **42**:147.
- Pekkarinen, L. 1964. Quantitative determination of sorbic acid in food by the thiobarbituric acid method. *Z Anal Chem*, **4**:423.
- Peleg, M. y Normand, M. D. 1983. Comparison of two methods for stress relaxation data presentation of solid food. *Rheologica Acta*, **22**:108-113.
- Pelletier, C. A., Lawless, H. T. y Horne, J. 2004. Sweet-sour mixture suppression in older and young adults. *Food Quality and Preference*, **15**:105-116.
- Pepper, T. y Olinger, P. M. 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology*, October:98-106.

- Pethybridge, A. D., Ison, R. W. y Harrigan, W. F. 1983. Dissociation constant of sorbic acid in water and water-glycerol mixtures at 25 °C from conductance measurements. *Journal of Food Technology*, **18**:789.
- Phillips, G. O. y Williams, P. A. 1995. Interaction of hidrocolloids in food systems. En: A. Gaonkar, editor. *Ingredient interactions, effects on food quality*. New York, Macel Dekker, Inc. p 131-169
- Pokorny, J. 1980. Effect of browning reactions on the formation of flavor substances. *Die Nahrung*, **24**:1433.
- Pollak, N. y Peleg, M. 1980. Early indications of failure in large compressive deformation of solid foods. *Journal of Food Science*, **45**:825-835.
- Powrie, W. D., Wu, C. H., Rosin, M. P. y Stich, H. F. 1981. Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems. *Journal of Food Science*, **46**:1433.
- Praphailong, W. y Fleet, G. H. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, **14**:459-468.
- Prudel, M., Davidková, J y Kminek, M. 1986. Kinetic of decomposition of aspartame hydrochloride (ual) in aqueous solutions. *Journal of Food Science*, **51**(6):1393-1415.
- Pszczola, D. 1999. Sweet beginnings to a new year. *Food Technology*, **53**(1):70-76.
- Rao, V.N.M. 1992. Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. En: *Viscoelastic Properties of Foods*. Eds.: Rao, M.A.; and Steffe, J.F.. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Reichart, O. y Mohácsi-Farkas, C. 1994. Mathematical modelling of the combined effect of water activity, pH and redox potential on the heat destruction. *International Journal of Food Microbiology*, **24**:103-112.
- Restaino, L., Lenovich, L. M. y Bills, S. 1982. Effects of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *Journal of Food Protection*, **45**:1138.
- Reyns, K., Soontjens, C., Cornelis, K. Weemaes, C. Hendrickx, E. y Michiels, C. 2000. Kinetic analysis and modelling of combined high-pressure-temperature inactivation of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, **56**:199-210.
- Roa, V. y Tapia de Daza, M. S. 1991. Evaluation of water activity measurement with a dew point electronic humidity meter. *Lebensm -Wiss Technol*, **24**(3):208-213.
- Robach, M. C. y Stateler, C. L. 1980. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole or ethylenediamine tetracetic acid. *Journal of Food Protection*. **43**, 208.
- Roberts, T. A., Gibson, A. M. y Robinson, A. 1982. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats.III. The effect of potassium sorbate. *Journal of Food Technology*. **17**, 307.
- Robinson, G., Manning, C. E. y Morris, E. R. 1991. Conformation and physical properties of the bacterial polysaccharides gellan, wellan, y rhamsan. En: E. Dickinson editor. *Food polymers, gels and colloids*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, EEUU. p 22-33.
- Rodrigues, G. y Pais, C. 2000. The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Food technol biotechnol*, **38**(1):27-32.

- Rodriguez-Hernández, A. I., Durand, S., Garnier, C., Tecante, A. y Doublier, J. L. 2003. Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. *Food Hydrocolloids*, **17**:621-628.
- Rogé, B., Aroulmoji, V. y Mathlouthi, M. 2005. FT-IR spectra as a probe for the study of the hydration of sucrose, caffeine and their mixtures in water. *Food Chemistry*, en prensa.
- Rojas, A. M. y Gerschenson, L. N. 2001. Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. *J Sci Food Agric*, **81**:1433-1439.
- Rojas, A. M. 1995. Destrucción de vitamina C en sistemas modelo de actividad acuosa reducida. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Rood, A. B., Davis, C. R., Dunstan, D. E., Forrest, B. A. y Boger, D. V. 2000. Rheological characterization of 'weak gel' carrageenan stabilised milks. *Food Hydrocolloids*, **14**:445-454.
- Rose, D. 1975. Physical responses of yeast cells to osmotic shock. *Journal of Applied Bacteriological*, **38**:169-175
- Rosenthal, A.J. 1999. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. En: *Food Texture. Measurement and Perception*. Ed.: Rosenthal A.J. An Aspen Publication.
- Samoilov, O. Y. 1965. Structure of aqueous electrolyte solutions and the hydration of ions. Consultants Bureau Enterprises, Inc. New York, USA.
- Schramm G. 1994. A Practical Approach to Rheology and Rheometry (Haake Rheometers). Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe, Federal Republic of Germany.
- Schiffenstein, H. N. J. 1995. Perception of taste mixtures. En Doty, R. L., editor, Handbook of Olfaction and Gustation (pp. 689-713), New York, Marcel Dekker, Inc.
- Schiffenstein, H. N. J. y Frijters, J. E. 1991. The effectiveness of different sweeteners in suppressing citric acid sourness. *Percept Psychophys*, **49**(1):1-9.
- Schiffenstein, H. N. J. y Frijters, J. E. 1990. Sensory integration in citric acid / sucrose mixture. *Chemical Senses*, **15**(1):87-109.
- Schiffman, S. S., Sattely-Miller, E. A., Graham, B. G., Zervakis, J., Butchko, H. H. y Stargel, W. W. 2003. Effecto of repeated presentation on sweetness intensity of binary and ternary mixtures of sweeteners. *Chemical Senses*, **28**:219-229.
- Schiffman, S. S., Sattely-Miller, E. A., Graham, B. G., Booth, B. J. y Gibes, K. M. 2000. Synergism among ternary mixtures of fourteen sweeteners. *Chemical Senses*, **25**:131-140.
- Schiffman, S. S., Booth, B. J., Carr, B. T. Loose, M. L., Sattely-Miller, E. A. y Graham, B. G. 1995. Investigation of synergism in binary mixtures of sweeteners. *Brain Res Bull*, **38**:105-120.
- Seow, C. C. y Cheah, P. B. 1985, a. Kinetics of degradation of sorbic acid in aqueous glycerol solutions. *Food Chemistry*, **17**:95.
- Seow, C. C. y Cheah, P. B. 1985, b. Reactivity of sorbic acid and glycerol in non-enzymatic browning in liquid intermediate moisture model systems. *Food Chemistry*, **18**:71-80.
- Seward, R. A., Deibel, R. H. y Lindsay, R. C. 1982. Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in microcultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1212.
- Skinner, G. E. y Larkin, J. W. 1994. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *Journal of Food Safety*, **14**:175-217.

- Smith, J. L., Benedict, R., Haas, M. y Palumbo, S. 1983. Heat injury in *Stahylococcus aureus* 196E: Protection by metabolizable and non-metabolizable sugars and polyols. *Applied and environmental microbiology*, **46**:1417-1419.
- Smittle, R. B. y Flowers, R. S. 1982. Acid-tolerant microorganisms involved in spoilage of salad dressings. *Journal of Food Protection*. **45**, 977.
- Smoot, L. A. y Pierson, M. D. 1981. Mechanisms of sorbate inhibition of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spore germination. *Appl. Envirom. Microbiol.* **42**, 477.
- Sofos, J. N. 1989. *Sorbate Food Preservatives*. Academic Press, Florida.
- Sofos, J. N. y Busta, F. F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*, **44**:614.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1980. Introducción a la bioestadística. Barcelona, España: Editorial Reverté. P 130-219.
- Sokal, R. R. y Rohlf, J. B. 1969. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Song, P. S., Chichester, C. O. y Stadtman, F. H. 1966. Kinetic behavior and mechanism of inhibition in the Maillard reaction. I. Kinetic behavior of the reaction between D-glucose and glycine. *Journal of Food Science*, **31**:906.
- Stamp, J. A. y Labuza. 1983. Kinetics of the maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperature. *Journal of Food Science*, **48**:543.
- Stanley, D.W.; and Tung, M.A. 1975. Microstructure of food and its relation to texture. En: *Rheology and Texture in Food Quality*. Eds.: De Man, J.M.; Voisey, P.W.; Rasper, V.F.; Stanley, D.W.. Westport, Connecticut. The Avi Publishing Company, Inc..
- Stannard, C. J.; Willians, A. P y Gibbs, P. A. 1985. Temperature/ growth relationship for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiol.* **2**:115-122.
- Steffe, J. F. 1996. Rheological methods in food process engineering. Freeman Press, East Lansing, MI, USA.
- Stegink, L. D. 1987. The aspartame story: a model for the clinical testing of a food additive. *Am J Clin Nutr*, **46**:204-15.
- Sugget, A. 1975. Water: a comprehensive treatise. Editado por Franks, F. Vol IV:531. Ed. Plenum, New York, USA.
- Suyama, K. y Adachi, S. 1979. Browning reaction between phospholipids and acetaldehyde. *Agric Biol Chem*, **43**:1981.
- Svorcova, L. 1980. Effect of ascorbic acid, potassium sorbate and the pH on nonsporulating bacteria in nonalcoholic beverages. *Chemical Abstract*, **92**:4825.
- Tapia, M. S., Argaiz, A., Lopez Malo, A. y Diaz, R. V. 1995. Microbial stability assessment in high and intermediate moisture foods: Special Emphasis on fruits products. En: Barbosa Cánovas, G., Welti Chanes, J., editores. Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co. P 575-602.
- Tateo, F., Triangeli, L., Panna, E., Berte, F. y Verderio, E. 1987. Stability and reactivity of aspartame in cola-type drinks. Frontiers of flavor, Proceedings of the 5th International Flavor Conference, Porto Karras, Chalkidiki, Grecia. p 217-231.
- Taylor, J. B. y Rowlinson, J. S. 1955. The thermodynamic properties of aqueous solutions of glucose. *Transaction Faraday Society*, **51**:1183-1192.

- Thakur, B. R., Singh, R. K. y Arya, S. S. 1994. Chemistry of sorbates – A basic perspective. *Food Rev Int*, **10**(1):71-91.
- Thakur, B. R. y Arya, S. S. 1991. Role of sorbic acid in non-enzymatic browning in liquid and solid model food systems. *International Journal of Food Science and Technology*, **26**:157.
- Thomas, D. S. y Davenport, R. R. 1985. *Zygosaccharomyces bailii*- a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, **2**:157-169.
- Tsoubeli, M. y Labuza, T. P. 1991. Accelerated kinetic study of aspartame degradation in the neutral pH range. *Journal of Food Science*, **56**(6):1671-1675.
- Tsuchido, T. y Shibasaki, I. 1980. Kinetics of microbial death by combined treatment with heat and antimicrobial agents. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**:107-118.
- Tunçel, T. y Araman, A. 1989. Stability of aspartame in some diet products marketed in Turkey. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **31**:61-66.
- Upstill, C., Atkins, E. D. T. y Attwood, P. T. 1986. Helical conformations of gellan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, **8**:275-288.
- Vaamonde, G., Scarmato, G., Chirife, J. y Parada, J. L. 1986. Inhibition of *Staphylococcus aureus* C-243 growth in laboratory media of water activity adjusted with less usual solutes. *Journal of Food Science*, **47**:1259-1262.
- Vaamonde, G., Chirife, J. y Scorza, O. 1982. An examination of the minimal water activity for *Staphylococcus aureus* ATCC 6583 P growth in laboratory media adjusted with less conventional solutes. *Journal of Food Science*, **47**(4):1259-1262.
- Vallejo, S., Raschi, A., Yurquina, A., Rudyk, R. y Molina, M. A. 1996. Estudio dieléctrico de soluciones acuosas del D-manitol. *Anales de la Asociación Química Argentina*, **84**(6):585-596.
- Van Tornout, Pelgroms, J. y Van der Meeren, J. 1985. Sweetness evaluation of mixtures of fructosa with saccharin, aspartame or acesulfame K. *Journal of Food Science*, **50**:469-472.
- Veiga, A. y Madeira-Lopes, A. 2000. Effects of weak acid preservatives on the growth and thermal death of the yeast *Pichia membranifaciens* in a commercial apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, **56**:145-151.
- Vidyasagar, K. y Arya, S. S. 1983. Stability of sorbic acid in orange squash. *J Agric Food Chem*, **31**(6):1262-1264.
- Wafwoyo, W., Hanen, P. M. T. y Chism, G. W. 1999. Interaction of aspartame with selected hydrocolloids: solubility of aspartame. *Food Hydrocolloids*, **13**:299-302.
- Wang, R. y Schroeder, S. A. 2000. The effect of caramel coloring on the multiple degradation pathways of aspartame. *Journal of Food Science*, **65**(7):1100-1106.
- Warth, A. D. 1977. Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic, sorbic and other weak acids used as food preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, **43**:215-230.
- Wedzicha, B. L. y Zeb, A. 1991. Catalysis of the sorbic acid – thiol reaction by bovine serum albumin. *Int J Food Sci Technol*, **26**:381.
- Wedzicha, B. L., Rimmer, Y. L. y Khandelwal, G. D. 1991. Catalysis of Maillard browning by sorbic acid. *Lebensm. -Wiss. u. Technol.*, **24**:278-280.
- Wedzicha, B. L. y Zeb, A. 1990. Catalysis of the reaction between sorbic acid and thiols by surfactants. *Int J Food Sci Technol*, **25**:168.

- Werner, H. y Jensen, F. 1981. Determination of low levels of sorbic acid in cheese. *Chemical Abstract*, **94**:63.880.
- Wientjes, R. H., Duits, M. H., Bakker, J. W., Jongschaap, R. J. y Mellena, J. 2001. Linear viscoelastic behavior of enzymatically modified guar gum solutions: structure, relaxations, and gel formation. *Macromolecules*, **34**:6014-6023.
- Wiet, S. G. y Beyts, P. K. 1992. Sensory characteristics of sucralose and other high intensity sweeteners. *Journal of Food Science*, **57**(4):1014-1019.
- White, G. W. 1970. Rheology in food research. *Journal of Food Technology*, **5**:1-32.
- Whiting, R. C. y Buchanan, R. L. 1994. Microbial modeling. *Food Technology*, **48**:113-120.
- Willamowski, G. 1971. Collaborative study of the colorimetric determination of sorbic acid in cheese. *J Assoc Off Anal Chem*, **54**:663.
- Wilson, C. E. y Brown, W. E. 1997. Influence of food matrix structure and oral breakdown during mastication on temporal perception of flavor. *Journal of Sensory Studies*, **21**:69-86.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A. S., Linton, R. H. y Sheard, M. A. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Food Microbiology*, **16**:269-279.
- Yurquina, A., Rudyk, R., Castillo, M. V., Raschi, A., Vallejo, S. y Molina, M. A. 1995. Estudio del comportamiento dieléctrico del xilitol asociado a moléculas de agua. *Anales de la Asociación Química Argentina*, **83**(3-4):115-127.