

Fabricación y caracterización de un yogur batido con reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9

Yadira Fernanda Carrillo Calala

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Fabricación y caracterización de un yogur batido con reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Yadira Fernanda Carrillo Calala

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Fabricación y caracterización de un yogur batido con reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9

Yadira Fernanda Carrillo Calala

RESUMEN. La industria alimentaria demanda productos saludables con contenido reducido de sal, azúcar, grasas saturadas y la adición de microorganismos probióticos, componentes bioactivos y ácidos ricos en omega-9. El estudio se realizó en el laboratorio de leche y derivados de la Universidad Estatal de Campinas (Unicamp), San Pablo, Brasil. El objetivo principal fue elaborar un yogur batido a partir de emulsiones, obtenidas de la mezcla de grasa de leche y aceite de girasol alto oleico (80% de C18: 1 cis-9) utilizando aislado proteico de suero de leche (WPI 2%) como agente emulsionante. Las emulsiones fueron preparadas con 10% de grasa anhidra de leche (GAL) o grasa anhidra de leche mezclado con aceite de girasol alto oleico (GAL:AGAO). Las emulsiones fueron utilizadas como base para preparar las mezclas a ser utilizadas en la fermentación de la leche. El tiempo de fermentación a 45 °C fue considerado el necesario para alcanzar un pH de 4.9 ± 0.05 , se almacenó durante 30 días a 5 °C. Con esta finalidad se evaluaron dos tratamientos: GAL y GAL:AGAO. Se utilizó un diseño experimental BCA con los 2 tratamientos y 3 repeticiones para un total de 6 unidades experimentales. El producto obtenido por la sustitución parcial de la GAL por AGAO puede ser caracterizado como yogur con bajo contenido de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9 según la legislación brasileña y Reglamento Técnico Centroamericano. Presentó un valor de 0.67 gramos (<1.5 g) y 64% ($>45\%$), respectivamente. Se recomienda evaluar la aceptación de ambos yogures.

Palabras clave: Aceite de girasol alto oleico, emulsiones, grasa anhidra de leche, proteína de suero.

Abstract. The food industry is demanding products with reduced content of salt, sugar, saturated fats and the addition of probiotics, among others. The addition of omega-rich fatty acids is the new trend. The study was carried out in the Milk and Derivatives Laboratory of Campinas State University of (Unicamp), São Paulo, Brazil. The main objective of the present investigation was to elaborate a shake yogurt from emulsions, obtained by the mix of milk fat and high oleic sunflower oil (80% C18: 1 cis-9), based on milk whey protein (WPI 2%) as an emulsifier. Emulsions were prepared with 10% of Anhydrous Milk Fat (AMF) or Anhydrous Milk Fat with High Oleic Sunflower Oil (GAL:AGAO). Emulsions were used as a base to prepare mixtures useful for the milk fermentation. Fermentation time at 45 °C was considered necessary to reach a pH of 4.9 ± 0.05 ; it was stored for 30 days at 5 °C. With that objective two treatments were evaluated: GAL and GAL:AGAO. A BCA experimental design was used with two treatments and three repetitions for each; six experimental units. The product obtained from the partial substitution of GAL by AGAO can be characterized as a yogurt reduced in saturated fatty acids and source of omega-9 according to Brazilian legislation and Central American Technical Regulation. It presented a value of 0.67 grams (<1.5 g) and 64% ($> 45\%$), respectively. It is recommended to evaluate the acceptance of both yogurts.

Key words: Anhydrous milk fat, emulsions, high oleic sunflower oil, whey protein.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexo.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4. CONCLUSIONES.....	23
5. RECOMENDACIONES.....	24
6. LITERATURA CITADA.....	25
7. ANEXO.....	30

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXO

Cuadros	Página
1. Diseño experimental.....	8
2. Diámetro medio de partículas (D_{32}) de las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C	11
3. Índice de polidispersidad (<i>Span</i>) de las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C	12
4. Efecto del tipo de emulsión, del tiempo de almacenamiento y de interacción de esos factores sobre el índice de polidispersidad (<i>Span</i>) y el diámetro (D_{32}) de las emulsiones (ANOVA).....	12
5. Composición físico-química, desviación estándar y valor de <i>p</i> de los yogures ..	15
6. Composición de ácidos grasos (g/100g de grasa) de los yogures	16
7. Efecto del tipo de yogur, tiempo de almacenamiento y la interacción de estos factores sobre el pH y acidez de los yogures.....	18
8. Recuento total de bacterias ácido lácticas de los yogures	20
9. Análisis de varianza (ANOVA) para la evaluación del efecto de tratamiento, del tiempo de almacenamiento y de la interacción entre esos factores sobre el recuento total de bacterias ácido lácticas de los youres	21
Figuras	Página
1. Preparación de la base lipídica y los yogures	4
2. Potencial zeta (mV) de la emulsión GAL:AGAO	10
3. Curvas de distribución de tamaño de partículas de las emulsiones con (a) GAL y (b) GAL:AGAO a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C.	11
4. Cambio en el perfil de dispersión de luz (Δbs) de las emulsiones (a) GAL y (b) GAL:AGAO, en función de la altura del tubo, en el almacenamiento	13
5. Curva de pH y acidez durante la fermentación de la leche	14
6. Efecto del pH y la acidez en los yogures durante el tiempo de almacenamiento refrigerado a 5 °C	19
7. Cambio en el perfil de dispersión de luz (Δbs) de los yogures con (a) GAL y (b) GAL:AGAO en función de la altura del tubo, en el almacenamiento	20
8. Efecto del tiempo sobre el recuento de bacterias lacticas de los yogures	22
Anexo	Página
9. Análisis estadístico del estudio.....	30

1. INTRODUCCIÓN

Cada vez más, la población tiene conciencia de la relación entre el consumo de alimentos saludables y su calidad de vida como un todo. La industria alimenticia ha respondido a esta demanda con el desarrollo de diferentes tipos de alimentos, para la contribución de una buena salud. Estos incluyen, la reducción de los niveles de grasa, fortificación con probióticos, adición de fibras solubles y enriquecimiento con diferentes nutrientes. El consumo de productos funcionales varía para los diferentes países. Estados Unidos representa un cuarto de las ventas globales de los productos orientados para la salud y bienestar; seguido por Francia y Canadá (Leal 2016; Statista 2014). Aunque el consumo de lácteos en Latinoamérica no es tan significativo como en países desarrollados; en Chile, México y Argentina el consumo creció entre 2012-2017. Brasil también representa el 37% de los ingresos lácteos. En Centroamérica, Costa Rica ha sido el país que ha tenido más popularidad con respecto al consumo de yogur (Euromonitor International 2013, 2018).

El yogur es definido como leche fermentada por dos cepas bacterianas viables *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, que se desarrollan en un ambiente controlado. Contiene nutrientes esenciales y es fuente de macronutrientes (proteínas, ácidos grasos y lactosa como carbohidrato) y micronutrientes (calcio, potasio, zinc, fósforo, magnesio, vitamina A, vitamina B5 y vitamina B12) que aportan beneficios a la salud (Marette y Picard 2014; Fisberg y Machado 2015). Estudios han demostrado que su consumo ayuda en la disminución de enfermedades crónicas no transmisibles (reducción en la grasa corporal, obesidad, enfermedades cardiovasculares, presión alta elevada) (Ralston *et al.* 2012; Astrup 2014).

El yogur es considerado uno de los alimentos más complejos y biológicamente activos en el mercado. El yogur está conformado por la combinación de dos componentes: leche y bacterias industriales. Estudios demuestran que el consumo del mismo se encuentra íntimamente relacionado con la edad, sexo, ingreso económico, nivel de educación del jefe del hogar y la presencia del hábito de fumar (Possa *et al.* 2015).

Según el Codex Alimentarius (2017), el aceite de girasol alto oleico debe contener más del 75% de ácido oleico. Razón por la cual, el alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados en el aceite de girasol alto oleico permiten que sea más tolerante a la oxidación en la exposición a altas temperaturas (Abbas *et al.* 2013). Una alimentación rica en ácido oleico como la dieta mediterránea reduce el riesgo cardiovascular, en conjunto, a los ácidos grasos monoinsaturados y otros componentes alimenticios ayuda a mejorar la inflamación oxidativa, obesidad, diabetes, entre otras (Babio *et al.* 2014).

De acuerdo a la legislación brasileña (Anvisa 2012), un producto alimenticio que presenta bajo contenido de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9 proporciona un máximo de 1.5 gramos de la suma de grasas saturadas y *trans* en la porción y como mínimo 45% de los ácidos grasos presentes corresponde al ácido oleico, respectivamente. En comparación con el Reglamento Técnico Centroamericano (2011), un producto es reducido cuando contiene al menos un 25% menos de grasa saturada por porción, con respecto al alimento de referencia.

En este contexto, es razonable suponer que la mezcla de la grasa de la leche con el aceite de girasol alto oleico (~ 80% de C18: 1 cis-9), con alta estabilidad oxidativa, sabor y aroma neutros, pueda ser una alternativa prometedora para el desarrollo de bases lipídicas estables, con bajo contenido de grasa saturada y fuente de omega-9.

Los alimentos funcionales tienen un efecto positivo para el organismo, proporcionando nutrición y prevención en enfermedades (Goetzke *et al.* 2014; Nisa *et al.* 2017). Los alimentos funcionales se encuentran en constante desarrollo siendo utilizados más en los productos de mayor consumo, como es el caso de los lácteos con el fin de mejorarla salud en millones de personas en el mundo (Reid 2015). Por tanto, los alimentos funcionales son de gran interés para la industria alimentaria, y se ha destacado especialmente en el desarrollo de productos lácteos biofortificados (Bigliardi y Galati 2013). Uno de los motivos quizás sea que la leche, por sí sola es un alimento saludable, que contiene proteínas de fácil digestión y alto valor biológico proporcionando además aminoácidos esenciales que el cuerpo humano necesita (Fernández *et al.* 2015).

Los objetivos de esta investigación fueron:

- Elaborar un yogur batido con reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9 adicionado de aceite de girasol alto oleico, cumpliendo con la Legislación Brasileña y Reglamento Técnico Centroamericano.
- Caracterizar las emulsiones de la grasa de la leche y aceite de girasol alto oleico (80% de C18: 1 cis-9) a base de proteína de suero como un emulsificante.
- Evaluar la composición físico-química, la post-acidificación, la estabilidad cinética y el perfil de ácidos grasos del yogur control y con contenido reducido en ácidos grasos saturados y fuente omega-9.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Leche y Derivados en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Estatal de Campinas, San Pablo, Brasil.

Materiales.

- Proteína de suero (Arla Foods, Dinamarca);
- Grasa anhidra de leche (Fonterra Ltda., Nueva Zelanda);
- Aceite de girasol alto oleico (Cargill Foods, Brasil);
- Leche desnatada UHT;
- Leche en polvo desnatado instantáneo;
- Cultivos lácticos mezcla de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* YF-L812 (Christian Hansen, Valinhos, SP, Brasil).

Esquema de la preparación de los yogures.

El esquema general de desarrollo del trabajo se presenta en la figura 1. En resumen, fue preparada una base lipídica a través de la mezcla de la Grasa Anhidra de Leche (GAL) y del Aceite de Girasol Alto Oleico (AGAO) en la proporción necesaria para obtener la base lipídica con la grasa bajo contenido de ácidos grasos saturados y ricos en omega-9. La base lipídica fue utilizada para la preparación de una pre-emulsión (10% de grasa) utilizando proteínas del suero como emulsificante (WPI 2%). Para efectos de comparación y control, se preparará una pre-emulsión GAL. Las pre-emulsiones se sometieron a la homogenización a alta presión para obtener microemulsiones (10% de grasa) que se utilizarán para la preparación de las mezclas, que fueron fermentadas para la fabricación de los yogures.

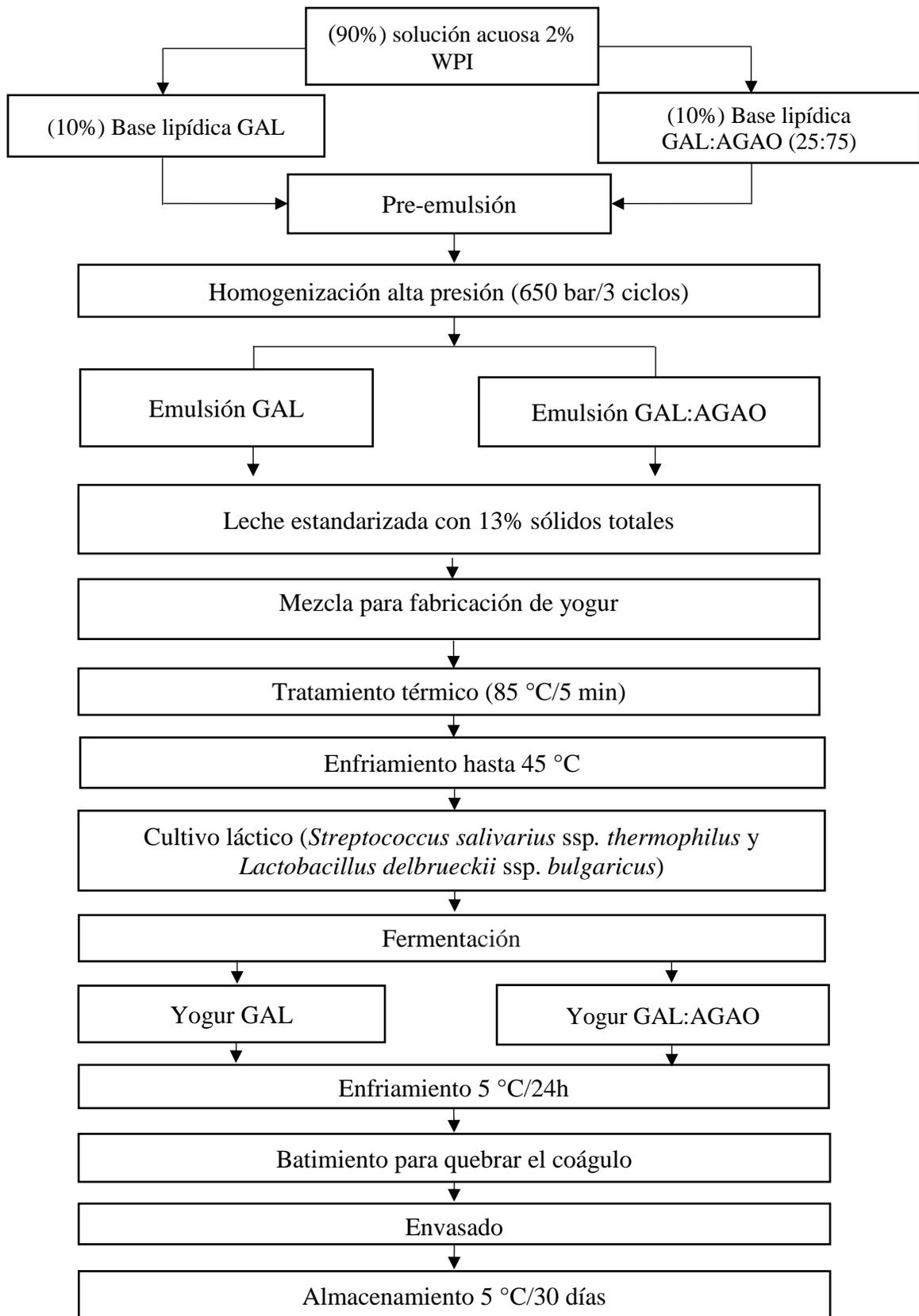


Figura 1. Preparación de la base lipídica y los yogures.

Caracterización de las materias primas.

Las materias primas (proteína de suero, leche desnatada UHT y leche en polvo desnatada instantánea) fueron caracterizadas en cuanto extracto seco total en una mufla a 105 °C, de acuerdo al método 920.116 (AOAC 2006), el contenido de grasa fue evaluado por el método de Monjonier de acuerdo al método 989.05 (AOAC 2006), el contenido de proteína se cuantificó por el método de micro-Kjeldahl de acuerdo con el método 991.20 (AOAC 2006) siendo el contenido de proteína total calculado por la multiplicación de nitrógeno total (NT) por el factor de conversión 6,38 y el contenido de cenizas se determinó por incineración en mufla a 550 °C (AOAC 2006).

Elaboración de las pre-emulsiones y de las emulsiones.

La solución acuosa conteniendo 2% (p/p) de WPI se preparó con agua filtrada y se mantuvo sobre agitación magnética por 1 hora a temperatura ambiente (~ 25 °C). La solución fue almacenada bajo refrigeración (5-7 °C) durante una noche para permitir la completa hidratación de las proteínas.

Las emulsiones (10% de grasa) se prepararon a partir de la GAL y de la mezcla GAL:AGAO en la proporción de 25:75 (m/m), de acuerdo a la metodología de Soares *et al.* (2018) Para la preparación de las pre-emulsiones, las bases lipídicas se calentaron a 40 °C y se añadieron lentamente a la solución acuosa a igual temperatura. Las mezclas se sometieron a agitación continua por 5 minutos a 15,000 rpm, utilizando agitador Ultra Turrax modelo T18 (IKA, Alemania). Las pre-emulsiones se sometieron a la homogenización de alta presión en caliente, en un homogeneizador FBF BUFALO HOMOLAB 2.20 de dos etapas. Se realizaron tres ciclos de homogeneización, utilizando 600 bar de presión en la primera etapa y 50 bar de presión en la segunda etapa. Las emulsiones obtenidas (Emulsión GAL y Emulsión GAL:AGAO) se almacenaron en cámara BOD a 5 °C.

Las emulsiones fueron determinadas en cuanto a estabilidad cinética, tamaño de partícula (TP), índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta. La estabilidad cinética se evaluó en las emulsiones frescas (tiempo cero) y después 01, 07, 10, 15 y 30 días de almacenamiento a 5 °C. En estos mismos tiempos, excepto en el tiempo cero, las emulsiones fueron evaluadas en cuanto a diámetro medio de las partículas, distribución de tamaño e índice de polidispersidad. Adicionalmente, después de un día de almacenamiento, se determinó en cuanto al potencial zeta.

Caracterización de las emulsiones.

Potencial zeta. El potencial zeta de las emulsiones se determinó utilizando Zetasizer (Instrumentos Malvern, Reino Unido). Las emulsiones, antes del análisis fueron diluidas en una concentración de 0,005% (p/p) en agua ultra pura.

Tamaño medio y distribución de tamaño de partícula. El tamaño de las partículas se analizó a través de la técnica dispersión de luz utilizando el equipo Mastersizer 2000 (Instrumentos Malvern, Malvern, Reino Unido). El tamaño medio de las partículas se

analizó en términos de diámetro medio superficial (D_{32}) obtenido por la ecuación 1. Y el índice de polidispersidad a través del cálculo de Span, ecuación 2.

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad [1]$$

$$Span = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad [2]$$

Donde: n, es el número de partículas con diámetro d_i ; d_{10} , d_{50} , d_{90} representan 10, 50 y 90% de volumen acumulado de gotas, respectivamente.

Estabilidad cinética. La estabilidad cinética se monitoreó utilizando el equipo Turbiscan ASG (*Formulation, l'Union*, Francia). Inmediatamente después de la preparación, las emulsiones fueron colocadas en tubos de vidrio cilíndricos con fondo plano (140 mm de altura y 16 mm de diámetro). La estabilidad de las emulsiones fue analizada utilizando perfiles de dispersión (BS), con escaneados en 880nm de longitud a diferentes alturas (mm).

Elaboración de los yogures.

Preparación de cultivos lácticos. Se utilizó el cultivo mixto YF-L812 que contiene *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* para la fermentación de la leche y la fabricación de los yogures. Los cultivos lácteos fueron inoculados en leche desnatada en polvo reconstituida y esterilizada en cámara de flujo laminar siguiendo la recomendación del fabricante. El cultivo se activó e incubó a 45 °C por 4 h.

Proceso de fabricación de yogur. La proporción de emulsión, leche UHT y leche en polvo para la obtención de la mezcla con el 13% de sólidos totales. Para la fabricación del yogur se calculó sobre la base de la composición de las materias primas. Se obtuvieron dos mezclas: una para la fabricación de los yogures con contenido de GAL y la otra para la fabricación de los yogures con contenido de GAL:AGAO. Las mezclas fueron tratadas térmicamente (85 °C/5 min) y enfriadas en baño de hielo hasta 45 °C para la fermentación. Las mezclas se distribuyeron en vasos de precipitación de vidrio de 1 litro, que posteriormente se añadieron el cultivo mixto previamente activado. Las mezclas fueron inoculadas con cultivo láctico tradicional constituido por *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (2,5% v/v). Así, dos yogures se fabricaron con la siguiente denominación: yogur GAL (yogur control) y yogur GAL:AGAO (yogur con reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9). Los vasos de precipitación fueron llevados a una estufa a 45 °C para la fermentación. Además, se separó una porción de cada tratamiento que se distribuyó en tubos de rosca (50 mL) y se colocó en baño maría (45 °C) para el seguimiento del pH y la acidez titulable durante la fermentación a intervalos de 30 minutos. El tiempo de fermentación fue considerado el necesario para que el pH alcance 4.9 ± 0.05 . Al final de la fermentación, los yogures fueron enfriados en baño de hielo y almacenados en refrigeración (5 ± 1 °C) durante 24 horas. Al día siguiente,

los yogures fueron batidos manualmente con ayuda de una espátula y distribuidos en vasos plásticos de 150 mL, sellados con tapas de aluminio termo soldables y almacenados en cámara fría (5 ± 1 °C). Las muestras se evaluaron después de 1, 7, 15 y 30 días de almacenamiento refrigerado.

Caracterización de los yogures.

Después de 15 días de almacenamiento a 5 ± 1 °C, los yogures fueron evaluados en cuanto al extracto seco total en mufla a 105 °C, de acuerdo con el método 920.116 (AOAC 2006), el contenido de grasa por el método de Monjonnier con el método 989.05 (AOAC 2006), el contenido de nitrógeno total (NT) por el método de micro-Kjeldahl de acuerdo con el método 991.20 (AOAC 2006) siendo el contenido de proteína total calculado por la multiplicación del nitrógeno total (NT) y el factor de conversión 6,38. El contenido de cenizas se determinó por incineración en mufla a 550 °C (AOAC 2006).

La composición de ácidos grasos se determinó después de la extracción de la fase lipídica, por el método de Monjonnier a través de la técnica de cromatografía en fase gaseosa (CGC Agilent 6850 Series GC System). La esterificación de los ácidos grasos se realizó según el método de Hartman y Lago (1973). Los análisis cromatográficos se hicieron en las siguientes condiciones: volumen inyectado: 1,0 μ L; división de flujo (Split) de 1:50; gas de arrastre: Helio; flujo de la columna: 1,0 mL.min⁻¹; La velocidad inicial del horno: 110 °C (5 min), con rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta 215 °C, siendo esta temperatura mantenida durante 24 min. La temperatura del inyector será de 250 °C y la del detector 280 °C.

Las separaciones de los ésteres metílicos se desarrollaron de acuerdo con el método Ce - 1f-96 (AOCS 2009) en columna capilar DB-23 (Agilent Technologies, EE.UU.) (50% cianopropilmetilpolisiloxano) con longitud de 60 m; ϕ int: 0,25 mm; espesor de la película: 0,25 μ m. Para la determinación de la composición cualitativa se utilizó un patrón comercial de metil éster de ácido graso C4-C24 (Sigma-Aldrich, Brasil). La composición cuantitativa se realizó por normalización de área, siendo expresada como porcentaje en masa (g/100g de ácidos grasos totales).

Después de 1, 7, 15 y 30 días los yogures fueron evaluados en cuanto a la post-acidificación por medidas de pH con la utilización de potenciómetro y acidez titulable de acuerdo al método 939.05 (AOAC 2006) y la estabilidad cinética fue monitoreada utilizando equipo Turbiscan ASG (*Formulation, l'Union*, Francia).

El conteo de bacterias ácido lácticas totales exigido por la legislación para caracterizar el producto durante su período de validez fue realizado después de 1 y 30 días de almacenamiento en refrigeración a través del método de recuento y siembra en profundidad y superficie en medio MRS agar. Esta determinación fue tercerizada y fue realizada en un laboratorio externo.

Diseño experimental.

Para las emulsiones y los yogures, en el estudio se evaluaron dos tratamientos: Grasa Anhidra de Leche (GAL) y Grasa Anhidra de Leche:Aceite de Girasol Alto Oleico (GAL:AGAO), se establecieron tres repeticiones para un total de seis unidades experimentales, utilizando un diseño bloques completos al azar (BCA) y se analizaron los datos en el programa estadístico “*Statistical Analysis Software*” versión 9.4, con cuadrados mínimos para la separación de medias (cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental.

Bloques	Tratamientos	
	GAL	GAL:AGAO (25:75)
B1	R1	R1
B2	R2	R2
B3	R3	R3

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO : Grasa anhidra de leche:Aceite de girasol alto oleico

En las emulsiones, el tamaño de partícula (TP), índice de polidispersidad (IP), estabilidad cinética (EC) y potencial zeta (PZ), se utilizó un análisis de variancia (ANOVA) y prueba de Tukey para comparación de medias a un nivel de significancia del 5%.

En el yogur, las características de acidez, pH, composición físico-química, estabilidad cinética y perfil de ácidos grasos se evaluaron por análisis de variancia (ANOVA) y test de Tukey para comparación de medias a un nivel de significancia del 5%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización química de las materias primas.

La leche UHT desnatada presentó pH 6.74, acidez titulable de 0.17 g de ácido láctico/100ml, 9.13% de extracto seco desengrasado, 0.40% de grasa, 3.26% de proteína, 0.80% de cenizas, 4.67% de lactosa. Comparando con el Reglamento Técnico de Identificación y Calidad de los Productos Lácteos (Ministerio de la Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento 1996) establece que los requisitos mínimos son de 0.14 a 0.18 g de ácido láctico/100ml, mínimo de 8.4% de extracto seco desengrasado (m/m) y máximo 0.5 de grasa (m/v). Se verificó que la leche UHT cumple los requisitos para su uso como materia prima. La leche desnatada en polvo utilizada para aumentar el contenido de sólidos de las mezclas presentaba 95.05% de sólidos totales.

Caracterización de las emulsiones.

El campo de la nanotecnología se ha expandido con el objetivo de obtener nuevas funcionalidades y de esa manera tener aplicación en diferentes campos como la investigación alimentaria, biotecnológica e incluso cosmética. Por esta razón, es necesario realizar distintas técnicas de control que aseguren la estabilidad de dichas soluciones u optimización del funcionamiento.

Potencial zeta. El potencial zeta mide la velocidad de movimiento de una partícula en un campo eléctrico (Ohshima 2013). El potencial zeta se desarrolla cuando una superficie sólida se pone en contacto con una solución acuosa y se genera una carga eléctrica en la interfaz; también se le denomina como el potencial electrostático que está en el límite que divide la capa compacta y la capa difusa (Glawdel y Ren 2015). Cuando el potencial zeta es alto confiere estabilidad, es decir, la solución resistirá a la agregación/floculación, sin embargo, cuando el potencial zeta es bajo la atracción excede la repulsión y la solución floculará. Se considera un valor de +/-25 mV como arbitrario para separar las superficies de baja carga de las superficies altamente cargadas (Williams 2016).

Se Observa en la figura 2, que el potencial zeta de las emulsiones no difieren significativamente entre sí. La emulsión Grasa Anhidra de Leche (GAL) y la emulsión Grasa Anhidra de Leche: Aceite de Girasol Alto Oleico (GAL:AGAO) presentaron potencial zeta de -36.9 y -32.4 mV, respectivamente. Según Kosegarten y Jiménez (2012), la estabilidad en el sistema de emulsión se encuentra en los valores por debajo de -30 y arriba de 30 mV. Por lo tanto, los valores obtenidos caracterizan a la emulsión GAL y GAL:AGAO como estables.

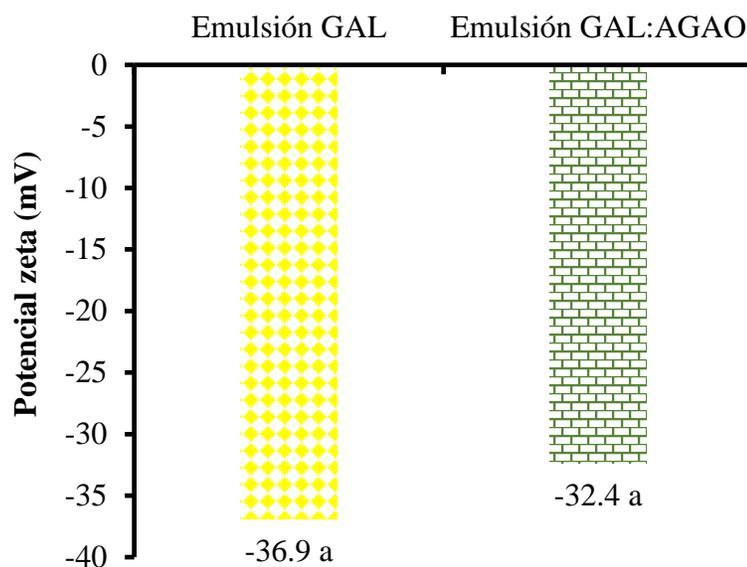


Figura 2. Potencial zeta (mV) de la emulsión GAL (Grasa anhidra de leche) y GAL:AGAO (Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico).

El pH es un factor altamente influyente en el potencial zeta debido al efecto que éste causa en la carga de las partículas. Es decir, las variaciones en el pH causan cambios en el potencial zeta y éste en la estabilidad de la emulsión. Un potencial zeta a pH 5, coincide con el punto isoeléctrico (4.6) provoca la precipitación de las macromoléculas (Maldonado *et al.* 2011). Lo anterior, se confirma por Mantovani *et al.* (2017) al realizar emulsiones de aceite en agua estabilizada por proteína de suero, donde un pH 3 (debajo del punto isoeléctrico) el potencial zeta fue $+49 \pm \text{mV}$ y un pH de 7 (encima del punto isoeléctrico) se obtuvo $-33 \pm \text{mV}$.

Tamaño medio y distribución de tamaño de partícula. La figura 3 muestra las curvas de distribución de tamaño de partículas de las emulsiones GAL y GAL:AGAO a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C. En la figura 3 se observa que tanto la emulsión de Grasa Anhidra de Leche (GAL) como la emulsión Grasa Anhidra de Leche: Aceite de Girasol Alto Oleico (GAL:AGAO) presentaron una distribución monomodal y casi perfecta durante el tiempo de almacenamiento, con excepción del día 30 en la emulsión GAL:AGAO. De acuerdo con McClements (2015), muchas de las propiedades de los productos se determinan por el tamaño de las gotas que contienen, por lo que, mientras menor es el tamaño de la partícula, mayor es la estabilidad de la emulsión. Con respecto a lo anterior, se observa que las emulsiones poseen un diámetro menor a $2\mu\text{m}$ con distribución homogénea, lo que significa que presenta buena estabilidad y eso afecta positivamente a la aplicación en los yogures.

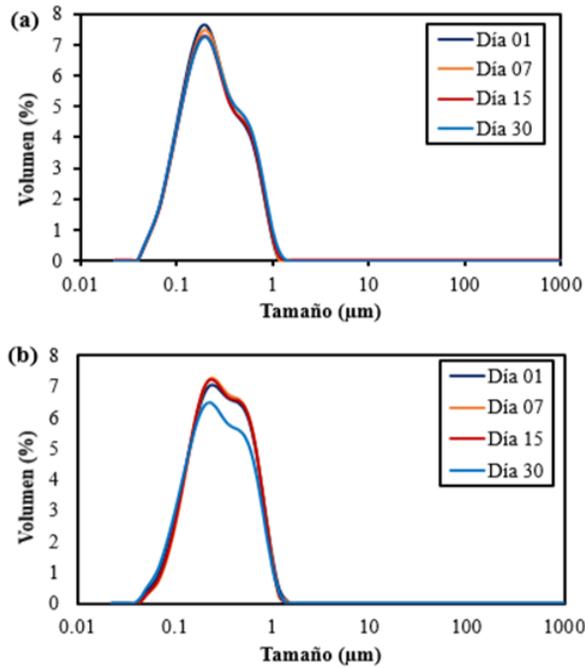


Figura 3. Curvas de distribución de tamaño de partículas de las emulsiones con (a) GAL (Grasa anhidra de leche) y (b) GAL:AGAO (Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico) a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Se observa en los cuadros 2 y 3 el diámetro medio de partículas (D_{32}) e índice de polidispersidad (Span) de las emulsiones durante el almacenamiento a 5 °C. En el cuadro 4 se muestra el efecto del tipo de emulsión, del tiempo de almacenamiento y de la interacción de esos factores sobre el índice de polidispersidad y el diámetro medio de las emulsiones.

Cuadro 2. Diámetro medio de partículas (D_{32}) de las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Tiempo (días)	D_{32} (nm)	
	Emulsión GAL	Emulsión GAL:AGAO
1	170.0 ± 8.35 ^{aA}	232.0 ± 21.5 ^{bA}
7	172.0 ± 15.27 ^{aA}	241.0 ± 18.0 ^{bA}
15	176.0 ± 20.29 ^{aA}	239.0 ± 20.5 ^{bA}
30	172.0 ± 9.91 ^{aA}	230.0 ± 25.5 ^{bA}

^{a, b} Letras minúsculas diferentes en la misma línea, difieren significativamente entre sí por el test de Tukey ($p < 0.05$).

^{A, B} Letras mayúsculas iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí por el test de Tukey ($p > 0.05$).

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico.

Cuadro 3. Índice de polidispersidad (*Span*) de las emulsiones a lo largo del tiempo de almacenamiento a 5 °C.

Tiempo (días)	Span	
	Emulsión GAL (Grasa)	Emulsión GAL:AGAO
1	2.25 ± 0.02 ^{aA}	1.98 ± 0.17 ^{bA}
7	2.25 ± 0.08 ^{aA}	1.90 ± 0.15 ^{bA}
15	2.42 ± 0.11 ^{aA}	1.92 ± 0.18 ^{bA}
30	2.32 ± 0.01 ^{aA}	2.30 ± 0.33 ^{aB}

^{a, b} Letras minúsculas diferentes en la misma línea, difieren significativamente entre sí por el test de Tukey ($p < 0.05$).

^{A, B} Letras mayúsculas iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí por el test de Tukey ($p > 0.05$).

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico.

Cuadro 4. Efecto del tipo de emulsión, del tiempo de almacenamiento y de la interacción de esos factores sobre el índice de polidispersidad (*Span*) y el diámetro medio (D_{32}) de las emulsiones (ANOVA) ($n = 3$).

Factores	GL	<i>p</i> -valor	
		D_{32}	Span
Tipo de emulsión*	1	<0.0001	0.0002
Tiempo de almacenamiento**	3	0.8099	0.0623
Tipo de emulsión x Tiempo de almacenamiento	3	0.9533	0.0645

* Tipo de emulsión: Emulsión GAL y Emulsión GAL:AGAO.

** Tiempo de almacenamiento: 01, 07, 15 y 30 días.

GL (Grados de Libertad); *p* (probabilidad de significancia <0.05).

El tipo de yogur afectó el diámetro medio y la polidispersidad de las emulsiones. La emulsión GAL presentó partículas menores que la emulsión GAL:AGAO. De acuerdo con Duffus *et al.* (2016) el tamaño de partículas en emulsiones con aceite de girasol varía entre 200 nm – 1000 nm. Los valores del diámetro medio de las gotas de la emulsión GAL:AGAO que presenta variaciones entre 230 a 241nm a lo largo del tiempo de almacenamiento están de acuerdo con lo esperado. Como se observa en el cuadro 4, el tiempo de almacenamiento no afectó el diámetro de las partículas (D_{32}). De la misma forma, en la interacción del tipo de emulsión con el tiempo de almacenamiento no presentó diferencia significativa ($p > 0,05$).

Los cuadros 2, 3 y 4 muestran que el tipo de emulsión afectó significativamente el índice de polidispersidad, que fue mayor para la emulsión GAL. Según Huck (2013) el tamaño de partícula y la distribución de las mismas lo proporciona la cantidad de emulsificante y equipo utilizado para la homogenización.

Estabilidad cinética. La estabilidad está determinada por el equilibrio de fuerzas superficiales de la región interfacial. En ausencia de perturbaciones externas, las emulsiones logran mantenerse estables indefinidamente. Las proteínas, ácidos grasos de cadena larga o partículas sólidas producen esta estabilidad. Por lo tanto, la región interfacial debe cumplir con la función de barrera repulsiva para evitar la floculación o agregación de gotas (Tadros 2015). La proteína que rodea la gota es también conocida como capa de adsorción que actúa para evitar la desestabilización de la emulsión por coalescencia, floculación o cremación. Las proteínas tienen una difusión lenta en la capa de adsorción, lo que permite formar una capa viscoelástica en la superficie de las gotas y siempre que la capa superficial no se rompa, entonces las gotas permanecerán estables (Williams y Philips 2014).

En la figura 4 (a) se muestra que la emulsión GAL permaneció estable durante todo el tiempo de almacenamiento. En la emulsión GAL:AGAO (figura 4 b), se observó una inestabilidad a lo largo del tiempo, como consecuencia del incremento del tamaño de las partículas. Según menciona Grasso (2013), el tamaño de partículas lipídicas de las semillas oleaginosas oscila entre 1 y 2 μm , por lo tanto, se justifica la desestabilización de la emulsión GAL:AGAO en el tiempo de almacenamiento.

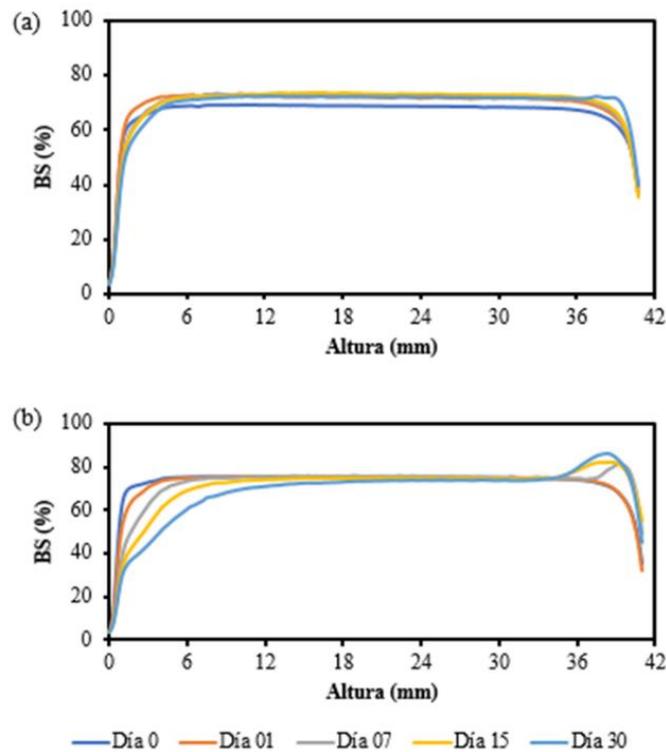


Figura 4. Cambio en el perfil de dispersión de luz (Δbs) de las emulsiones (a) GAL (Grasa anhidra de leche) y (b) GAL:AGAO (Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico), en función de la altura del tubo, en el almacenamiento.

BS: Backsatering = retrodispersión.

Caracterización de la fermentación de los yogures GAL (control) y GAL:AGAO (reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9).

Se observa en la figura 5 que el tiempo de fermentación de las mezclas, definido como el tiempo necesario para alcanzar un pH de 4.90 ± 0.05 fue el mismo para las mezclas preparadas con la emulsión Grasa Anhidra de Leche (GAL) y Grasa Anhidra de Leche:Aceite de Girasol Alto Oleico (GAL:AGAO), siendo 240 min para los dos yogures. La adición del aceite de girasol alto oleico no afectó el desarrollo de los cultivos lácteos y consecuentemente el desenvolvimiento del pH y acidez durante la fermentación. El porcentaje de ácido láctico 0.54 y 0.55% están de acuerdo con lo esperado según NOM-181-SCFI-2010 (Esteban y Linares 2017) y CODEX STAN 243-2003 (Codex Alimentarius 2011) que establecen que la acidez mínima debe ser entre 0.5 y 0.6%.

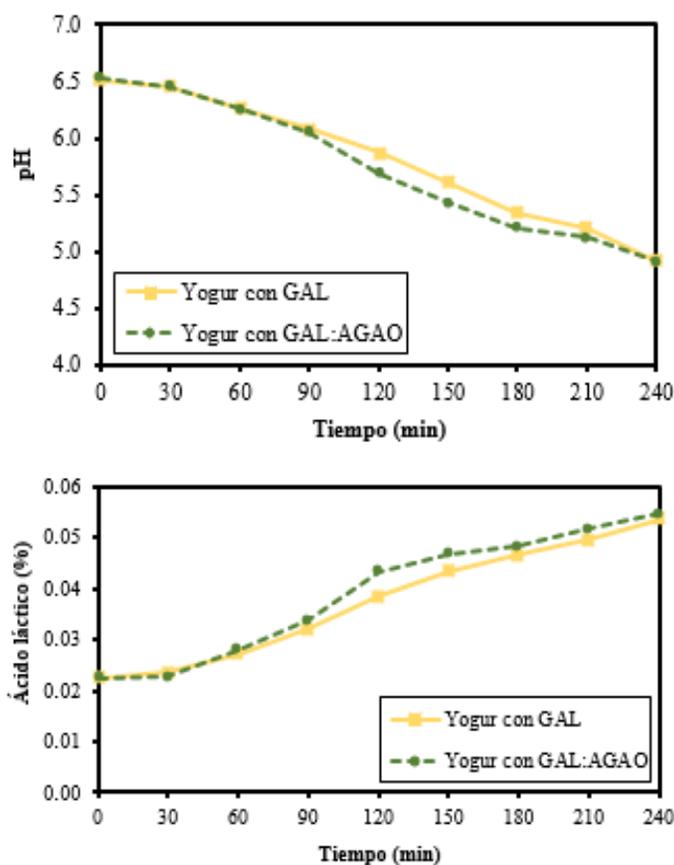


Figura 5. Curva de pH y acidez durante la fermentación de la leche.
GAL: Grasa anhidra de leche.
GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico.

Caracterización de los yogures.

Composición físico-química. El cuadro 5 presenta la composición físico-química, desviación estándar y valor p de los yogures almacenados a 5°C .

En el cuadro 5 se observa que los contenidos de sólidos totales, cenizas, proteína y lactosa no fueron afectados por la adición de aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico, a diferencia del contenido de grasa, que presentó diferencia significativa ($P<0.05$). Aunque de la estandarización deseada, el bajo contenido de grasa observado para el yogur Grasa Anhidra de Leche:Aceite de Girasol Alto Oleico (GAL:AGAO) puede relacionarse a pérdidas durante el proceso de homogeneización a alta presión al fabricar las emulsiones, cuando las mismas estaban siendo elaboradas, restos de la grasa se quedaron en el homogeneizador. Además, el aceite de girasol alto oleico por su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados es más tolerante a la oxidación en la exposición a altas temperaturas (Ali *et al.* 2013).

Cuadro 5. Composición físico-química, desviación estándar y valor de p de los yogures.

Determinación analítica	Yogur GAL	Yogur GAL:AGAO	p -valor
Sólidos totales (%)	12.25 ± 0.19 ^a	12.20 ± 0.06 ^a	0.6987
Cenizas (%)	0.86 ± 0.00 ^a	0.86 ± 0.01 ^a	0.4877
Proteínas (%)	4.25 ± 0.17 ^a	4.25 ± 0.19 ^a	0.9565
Grasa (%)	2.64 ± 0.02 ^a	2.55 ± 0.01 ^b	0.0225
Lactosa* (%)	4.50 ± 0.28 ^a	4.55 ± 0.17 ^a	0.5280

*Calculado por diferencia

^{a, b} Medias con letras diferentes en la misma línea difieren significativamente entre sí ($p\leq 0.05$).

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico.

El contenido de sólidos totales no presentó diferencias significativas, siendo 12.25 y 12.20% los valores entre los tratamientos. De igual forma el contenido de ceniza no tienen diferencias significativas entre sí y estos valores concuerdan con los datos obtenidos en yogures enriquecidos con ácidos grasos esenciales que varían entre 0.70-0.85 (Amaya 2016). El mayor contenido de proteína comparado a otros yogures comerciales se debe posiblemente al uso de aislado proteico de suero de leche (WPI) como emulsificante. Estos datos se comparan con los valores reportados en el yogur enriquecido con ácidos grasos esenciales que fueron de 3.11-4.37% (Amaya 2016) y los reportados en el yogur fortificado con omega-3 provenientes de fuente vegetal (3.3-3.6%) (Dal Bello *et al.* 2015). Los valores obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por Dal Bello *et al.* (2015) en los yogures fortificados con omega-3 provenientes de fuentes vegetales siendo 2.0 a 3.2 % y son inferiores a los obtenidos en el yogur helado fortificado con omega-3 y Vitamina E (3.6-3.9%) (Mahrous y Salam 2014).

De acuerdo al Reglamento Técnico Brasileño de Identidad y Calidad de leches fermentadas de la instrucción normativa N° 46 de octubre de 2007, los yogures que poseen una cantidad máxima de 2.9g/100g de grasa son clasificados como parcialmente desnatados (Ministerio de la Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento 2007). Este es el caso de los productos aquí desarrollados, que presentan 2.64 y 2.55% de grasa para los yogures GAL y GAL:AGAO,

respectivamente. De acuerdo al CODEX STAN 243-2003 (Codex Alimentarius 2011), 2.7% es la cantidad mínima de proteína láctea establecida para el yogur, siendo que los aquí desarrollados tienen 4.25% de proteína.

Ácidos grasos. El cuadro 6 presenta la composición de ácidos grasos del yogur Grasa Anhidra de Leche (GAL) y Grasa Anhidra de Leche: Aceite de Girasol Alto Oleico (GAL:AGAO).

Cuadro 6. Composición de ácidos grasos (g/100g de grasa) de los yogures (n=3).

Ácidos grasos	Yogur GAL	Yogur GAL:AGAO
C4:0 (Ác. Butírico)	0.80 ± 0.20 ^a	0.23 ± 0.07 ^a
C6:0 (Ác. Caproico)	1.50 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.00 ^b
C8:0 (Ác. Caprílico)	1.29 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.01 ^b
C10:0 (Ác. Cáprico)	3.41 ± 0.03 ^a	0.90 ± 0.02 ^b
C12:0 (Ác. Láurico)	4.92 ± 0.04 ^a	1.31 ± 0.00 ^b
C14:0 (Ác. Mirístico)	13.84 ± 0.04 ^a	3.86 ± 0.03 ^b
C15:0 (Ác. Pentadecanoico)	0.76 ± 0.04 ^a	0.20 ± 0.00 ^b
C16:0 (Ác. Palmítico)	36.34 ± 0.23 ^a	13.11 ± 0.17 ^b
C16:1 (Ác. Palmitoleico)	0.71 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.03 ^b
C17:0 (Ác. Margárico)	0.88 ± 0.02 ^a	0.29 ± 0.01 ^b
C17:1 (Ác. Margaroleico)	0.36 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.01 ^b
C18:0 (Ác. Esteárico)	11.05 ± 0.12 ^a	5.39 ± 0.01 ^b
C18:1 (Ác. Oleico)	20.16 ± 0.14 ^b	64.37 ± 0.14 ^a
C18:2t	0.10 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^b
C18:2 (Ác. Linoleico)	1.75 ± 0.04 ^b	8.46 ± 0.00 ^a
C18:3t	0.66 ± 0.00 ^a	0.28 ± 0.00 ^b
C18:3 (Ác. Linolénico)	1.32 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.01 ^b
C20:0 (Ac. Araquidónico)	0.15 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.00 ^a
Σ saturados	74.94 ± 0.20^a	26.27 ± 0.16^b
Σ insaturados	25.06 ± 0.20^b	73.73 ± 0.16^a

^{a, b} Letras minúsculas diferentes en la misma línea difieren significativamente entre sí por el test de Tukey ($p < 0.05$).

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico.

Los ácidos grasos saturados presentes en la grasa láctea están alrededor del 60-70% siendo principalmente el ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (18:0) (Fontecha y Juárez 2012). Con respecto a lo anterior, se observa en el cuadro 6 en el yogur GAL que la suma del ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0) contienen 13.84, 36.34 y 11.05%, respectivamente, suman alrededor del 61% confirmando lo antes dicho. Así mismo, en comparación con el yogur GAL:AGAO, se

observa que los mismos tres ácidos grasos saturados ya antes mencionados tienen una suma de 22.36%. Además, presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos lo que claramente se evidencia que hubo una reducción en dichos ácidos.

De acuerdo a lo esperado, los yogures presentaron diferencias significativas en relación a los contenidos de ácidos grasos saturados e insaturados. El yogur GAL:AGAO presentó menor contenido de ácidos grasos saturados y mayor cantidad de monoinsaturados. De esa manera, se observa en la cuadro 6 que el yogur GAL y el yogur GAL:AGAO si presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), debido a que la concentración total de ácidos grasos saturados se redujo en 48% al agregar aceite de girasol alto oleico, el contenido de monoinsaturados aumento en 50%. Cabe destacar que esta composición de ácidos grasos en el yogur lo hace un alimento de excelente valor nutricional.

Así mismo, el ácido oleico (C18:1, omega-9) aumento 44% entre los tratamientos; pasando de 20.16% para 64.37% y el ácido linoleico (C18:2 fuente de omega-6) aumentó de 1.75 a 8.46%. El yogur GAL:AGAO presentó 73.73% de ácidos grasos monoinsaturados, siendo el 64% pertenecientes al ácido oleico. Este valor es superior a los datos obtenidos del yogur enriquecido de ácidos esenciales (19-26%), sin embargo, el ácido oleico también representa la mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados (Amaya 2016).

Cabe destacar, que el ácido linoleico (C18:2) (ácido graso monoinsaturado) el cual es fuente de omega-6 incrementó en un 6%. La ingesta de ácido linoleico se asocia con un menor riesgo de enfermedad coronaria (Farvid *et al.* 2014). Así mismo, este en el organismo se transforma en ácido araquidónico (C20:0) que es un agente inflamatorio (Goyal 2014). Con lo anterior, se han realizado estudios con el objetivo de producir otros compuestos menos inflamatorios, así habrá competencia por las enzimas que producen ácido araquidónico y los demás compuestos (Jandacek 2017). Un metaanálisis realizado por Zhou *et al.* (2016), con respecto al cáncer de mamá comprobó que la ingesta de ácido linoleico disminuyó en un 1% por el incremento de cada 10g/día. Rodrigues *et al.* (2017), aseguraron que la ingesta de ácido linoleico en animales diabéticos indujo la angiogéneses, también tiene efectos procurativos, con esto aceleró el proceso de curación en ratas diabéticas.

En lo que respecta a un alimento reducido en ácidos grasos saturados, en el cuadro 6 se observa que el yogur adicionado de aceite de girasol alto oleico (GAL:AGAO) presenta el 26.27% de la suma de ácidos grasos saturados y *trans*, lo que corresponde a 0.67 g; cumpliendo así, con lo establecido por la Legislación Brasileña (Anvisa 2012) que menciona que un producto alimenticio es considerado bajo en grasa saturada cuando presenta máximo 1.5 gramos de la suma de grasa saturada y *trans* en la porción. Al igual que el Reglamento Técnico Centroamericano (RTC 2011), menciona que un alimento es reducido cuando contiene al menos un 25% menos de grasa saturada por porción, con respecto al alimento de referencia. Con lo anterior, el yogur GAL:AGAO redujo 48% de grasa saturada frente al yogur GAL (control). Por otro lado, la Legislación Brasileña (Anvisa 2012) menciona que como mínimo 45% de los ácidos grasos presentes debe corresponder al ácido oleico para considerarse como un alimento fuente de omega-9; así, el mismo presenta el 64% de los ácidos grasos en el yogur GAL:AGAO. Frente a lo anterior, el Reglamento Técnico Centroamericano no tiene una ley que defina cuando un alimento es fuente de omega-9.

Efecto del tiempo de almacenamiento refrigerado y del tipo de yogur en la post-acidificación.

Se observa en el cuadro 7 que el tipo de yogur no afectó significativamente la post-acidificación, pero sí fue afectada por el tiempo de almacenamiento. Ambos yogures sufrieron post-acidificación durante el almacenamiento, caracterizada por la reducción de pH y aumento de acidez.

Cuadro 7. Efecto del tipo de yogur, tiempo de almacenamiento y la interacción de estos factores sobre el pH y acidez de los yogures.

Factores	GL	p-valor	
		pH	Acidez (%)
Tipo de yogur*	1	0.8950	0.1953
Tiempo de almacenamiento**	3	<0.0001	<0.0001
Tipo de yogur x Tiempo de almacenamiento	3	0.5008	0.4498

* Tipo de yogur: yogur GAL y yogur GAL:AGAO.

** Tiempo de almacenamiento: 01, 07, 15 y 30 días.

GL (Grados de Libertad); *p* (probabilidad de significancia <0.05).

En la figura 6 se observa que el pH para el yogur GAL cambió de 4.70 a 4.56, mientras que para el yogur GAL:AGAO con reducción de ácidos grasos saturados y fuente de omega-9 varió de 4.73 a 4.52. Así, el yogur GAL y GAL:AGAO redujo 0.14 y 0.21 unidades de pH, respectivamente. Estos datos comparados con Estada *et al.* (2011) al realizar un yogur de fresa fortificado con aceite de pescado marino obtiene valores entre 4.4 y 4.5 de pH. La post-acidificación ocurre porque las bacterias fermentadoras incluso bajo refrigeración fermentan lactosa como fuente energética, liberando así el ácido láctico (Moreno *et al.* 2013).

La acidez varió de 0.78-0.90% y de 0.79-0.91% de ácido láctico para el yogur GAL y GAL:AGAO, respectivamente. Estos valores son semejantes a los obtenidos por un yogur enriquecido naturalmente con ácidos grasos esenciales que presentó valores de 0.71-0.96% de ácido láctico (Amaya 2016). Sin embargo, estudio realizado por Mahrous y Salam (2014) presentan valores que van desde 0.81-0.99% dependiendo la formulación, en yogures fortificados con omega-3 y vitamina E. Macedo *et al.* (2015) reportan un rango de 0.52-0.69% para un yogur enriquecido con micro cápsulas que contienen ácidos grasos omega 3. La media de ácido láctico del yogur GAL:AGAO fue 0.91g valor que se encuentra dentro del rango de 0.6 a 1.5g establecido por la legislación Brasileña (Ministerio de la Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento 2007).

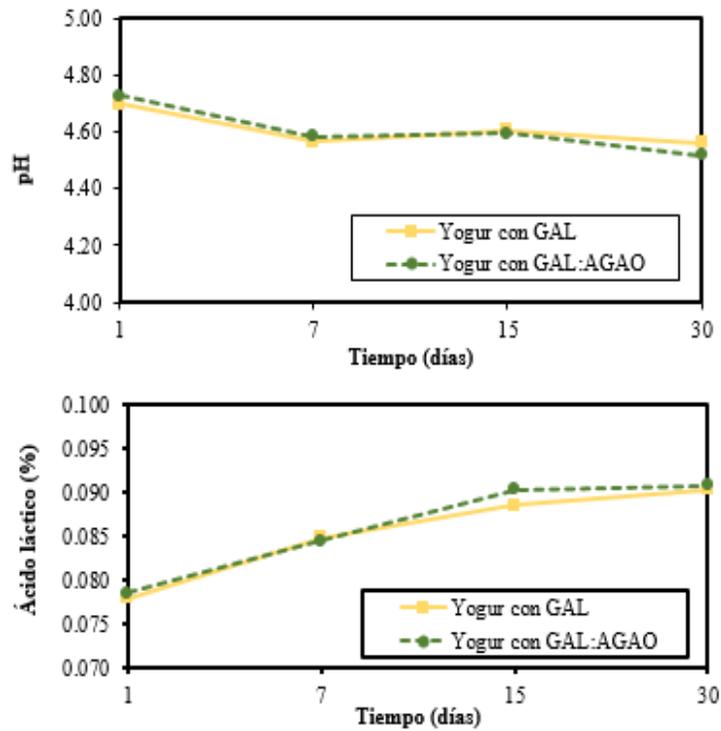


Figura 6. Efecto del pH y la acidez en los yogures durante el tiempo de almacenamiento refrigerado a 5 °C.

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico.

Estabilidad cinética. La figura 7 presenta la estabilidad cinética de los yogures durante el tiempo almacenamiento.

La figura 7 muestra la estabilidad del yogur GAL y GAL:AGAO durante los 30 días de almacenamiento. Se observa que la estabilidad cinética en los dos yogures fue similar, además no hubo variación entre los días evaluados. Como se mencionó en la figura 4 (b), la emulsión GAL:AGAO presentó desestabilización durante los 30 días de almacenamiento, esto no afectó la estabilidad del yogur adicionado de aceite de girasol alto oleico GAL:AGAO.

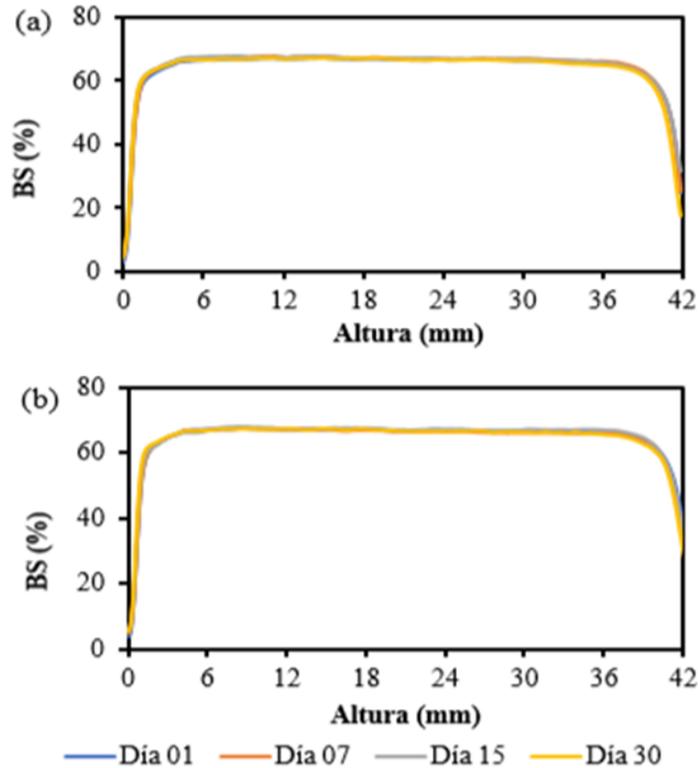


Figura 7. Cambio en el perfil de dispersión de luz (Δb_s) de los yogures con (a) GAL (Grasa anhidra de leche) y (b) GAL:AGAO (Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico) en función de la altura del tubo, en el almacenamiento.

Evaluación de la viabilidad de los microorganismos durante almacenamiento refrigerado.

El cuadro 8 presenta el conteo de las bacterias ácido lácticas de los yogures y el valor de p , después de 1 y 30 días de almacenamiento. Se observa que no hubo diferencia significativa en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas de los yogures que se mantuvieron en el orden de 9 log UFC/mL para los dos yogures durante los 30 días de almacenamiento.

Cuadro 8. Recuento total de bacterias ácido lácticas de los yogures.

	Yogur GAL	Yogur GAL:AGAO
Día 1 (log UFC/mL)	9.19 ± 0.02 ^a	9.17 ± 0.02 ^a
Día 30 (log UFC/mL)	9.07 ± 0.13 ^b	9.00 ± 0.06 ^b

^{a, b} Letras minúsculas diferentes en la misma columna difieren significativamente entre sí por el test de Tukey ($p < 0.05$).

GAL: Grasa anhidra de leche.

GAL: AGAO Grasa anhidra de leche: Aceite de girasol alto oleico

En el cuadro 9 y en la figura 8, puede observarse que el tiempo de almacenamiento afectó el número bacterias ácido lácticas viables de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. En la figura 8, se puede notar que el día 30 comparado con el día 1 existe una diferencia notable en el número de bacterias ácido lácticas. A pesar de la diferencia significativa en el conteo de bacterias lácticas, en el día 30 aún alcanzaron lo decretado por la legislación brasileña, que establece que el mínimo debe ser 10^7 UFC/g (Ministerio de la Agricultura Pecuaria y Abastecimiento 2007).

Los valores alcanzados de las bacterias ácido lácticas fueron 9.18 y 9.03 log UFC/mL en promedio en el día 1 y día 30, respectivamente. Se comparan con los valores obtenidos por Estrada *et al.* (2011) en un yogur de fresa fortificado con aceite de pescado marino que obtuvo valores finales de 6.29 y 6.31 log UFC/g. Benítez (2011) obtuvo recuentos de bacterias ácido lácticas en un yogur funcional de zanahoria, entre 7.1 y 8.2 log UFC/g. Así mismo lo reportado por Arenas *et al.* (2012) en una leche fermentada con quinua con valores entre 3.61 y 5.13 log UFC/mL. Por lo anterior, puede concluirse que se debe a la cantidad de lactosa disponible en el medio y a la resistencia que las bacterias ácido lácticas presentaron en el medio.

S. thermophilus y *L. bulgaricus* en el estómago son resistentes a los ácidos presentes en el mismo, actuando como una barrera protectora en contra de las bacterias patógenas, las cuales son beneficiosas para la flora intestinal porque se desarrollan produciendo ácido láctico (Vera 2011). De acuerdo con Vergara *et al.* (2014), los efectos inmunomodulares se relacionan con la capacidad de las bacterias probióticas de interactuar con receptores de linfocitarios de inmunidad innata y subpoblaciones de linfocitos, de esa manera, se genera la síntesis de citoquinas reguladores que tienen la capacidad de tolerancia inmunológica e inducen una respuesta inmune frente a patógenos intestinales no comensales de la microbiota intestinal.

Cuadro 9. Probabilidad del efecto del tratamiento, del tiempo de almacenamiento y de la interacción entre esos factores sobre el recuento total de bacterias lácticas de los yogures.

Factores	GL	p-valor
Tipo de yogur*	1	0.1432
Tiempo de almacenamiento**	1	0.0002
Tipo de yogur x Tiempo de almacenamiento	1	0.4674

* Tipo de yogur: Yogur GAL y Yogur GAL:AGAO.

** Tiempo de almacenamiento: 01 y 30 días.

GL (Grados de Libertad); *p* (probabilidad de significancia <0.05).

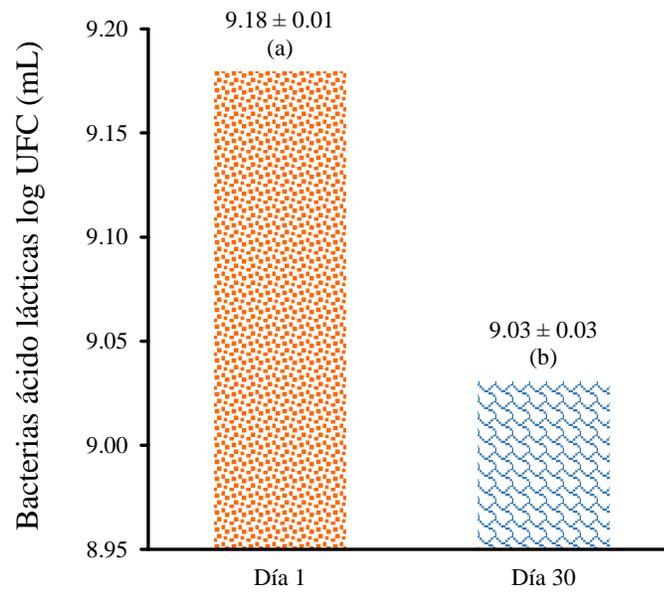


Figura 8. Efecto del tiempo sobre el recuento de bacterias ácido lácticas de los yogures.

4. CONCLUSIONES

- El yogur con aceite de girasol alto oleico cumplió con los requisitos para ser considerado bajo en ácido graso saturado y fuente de omega-9 según la legislación brasileña y Reglamento Técnico Centroamericano.
- El yogur con aceite de girasol alto tuvo una vida anaquel hasta el día 30 de almacenamiento a 5 °C.
- La post-acidificación, estabilidad cinética y composición química no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, esta última presentó diferencias estadísticas significativas con el contenido de grasa al igual que el perfil de ácidos grasos entre los yogures.
- El yogur con aceite de girasol alto oleico presentó 0.65 gramos (<1.5 g) de ácidos grasos saturados y 64% (>45%) de omega-9.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar la aceptación del yogur control y el adicionado de aceite de girasol alto oleico.
- Formular un yogur funcional para las personas intolerantes a la lactosa para evitar enfermedades patológicas.

6. LITERATURA CITADA

Abbas A, Ali H, Razam A, Othman H, Abdul F, Salleh L. 2013. Effect of heating at frying temperature on the quality characteristics of regular and high-oleic acid sunflower oils. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 12(2):159–176. ISSN. 1889-9594

Ali M, Najmaldien A, Latip R, Othman N, Majid F, Salleh L. 2013. Effect of heating at frying temperature on the quality characteristics of regular and high-oleic acid sunflower oils. *Rev. Ciencias biológicas, Tecnología de alimentos* 2:159–176. doi:10.3305/nh.2013.28.6.6856.

Amaya A. 2016. Elaboración de una bebida láctea fermentada enriquecida naturalmente con ácidos grasos esenciales [Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 77 p.

Anvisa (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria). 2012. Resolução RDC no 54, 12 de novembro de 2012, Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. *Diario oficial de la Unión: Brasília, Distrito Federal*, 12 de novembro de 2012. http://portal.anvisa.gov.br/documents/%2033880/2568070/rdc0054_12_11_2012.pdf/c5ac23fd-974e-4f2c-9fbc-48f7e0a31864

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2006. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Washington. http://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC/PS/PSOMP/AOAC_Member/SDCF/SDO MPCF/SDOMPM.aspx?hkey=216d4ba2-68ec-41db-bd32-abb12569cb00

AOCS (American Oil Chemists' Society). 2009. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign: American Oil Society. <https://www.aocs.org/store/shop-aocs>

Arenas C, Zapata R, Gutiérrez C. 2012. Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de Quinua (*CHENOPODIUM QUINOA*). Colombia: Universidad de Antioquia. 4 p. (vol. 19). ISBN: 0121-4004.

Astrup A. 2014. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: Epidemiologic and experimental studies. *Am J Clin Nutr.* 99(5 Suppl):1235S-42S. eng. doi:10.3945/ajcn.113.073015.

Babio N, Toledo E, Estruch R, Ros E, Martínez M, Castañer O, Bulló M, Corella D, Arós F, Gómez E, Ruiz V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela R, Serra L, Pintó X, Basora J,

Sorlí J, Salas J. 2014. Mediterranean diets and metabolic syndrome status in the predimed randomized trial. *CMAJ*. 186(17):E649-57. eng. doi:10.1503/cmaj.140764.

Benítez L. 2011. Formulación de un yogur funcional de zanahoria [Tesis]. España: Universidad Politecnica de Valencia. 21 p.

Bigliardi B, Galati F. 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*. 31(2):118-129 doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006.

Codex Alimentarius. 2011. Leche y Productos Lácteos (2 edición). CODEX STAN 243-2003. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud. ISBN 978-92-5-305837-2

Codex Alimentarius. 2017. Norma para aceites vegetales especificados. CODEX STAN 210-1999. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%2B210-1999%252FCXS_210s.pdf

Dal Bello B, Torri L, Piochi M, Zeppa G. 2015. Healthy yogurt fortified with n-3 fatty acids from vegetable sources. *Journal of Dairy Science*. 98(12):8375-8385. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9688>.

Duffus LJ, Norton JE, Smith P, Norton IT, Spyropoulos F. 2016. A comparative study on the capacity of a range of food-grade particles to form stable O/W and W/O Pickering emulsions. *J Colloid Interface Sci*. 473:9–21. eng. doi:10.1016/j.jcis.2016.03.060.

Esteban A, Linares J. 2017. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-181-SCFI/SAGARPA-2017, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. México. Secretaría de Economía, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5511978.

Estrada J, Boeneke C, Bechtel P, Sathivel S. 2011. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. *Journal of Dairy Science*. 94(12):5760–5769. eng. doi:10.3168/jds.2011-4226.

Euromonitor International. 2013. Euromonitor International identifica las 5 principales tendencias en alimentos envasados en países de norte y sudamérica. <http://www.marketwired.com/press-release/euromonitor-international-identifica-las-5-principales-tendencias-en-alimentos-ensados-1822426.htm>

Euromonitor International. 2018. Dairy in Latin America. <http://www.euromonitor.com/dairy-in-latin-america/report>

Farvid M, Ding M, Pan A, Sun Q, Chiuve S, Steffen L, Willett W, Hu F. 2014. Dietary Linoleic Acid and Risk of Coronary Heart Disease: A Systematic Review and Meta-

Analysis of Prospective Cohort Studies. *Circulation*. 130(18):1568-78. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010236.

Fernández E, Martínez JA, Martínez V, Moreno JM, Collado LR, Hernández M, Morán FJ. 2015. Documento de consenso: Importancia nutricional y metabólica de la leche [Consensus document: nutritional and metabolic importance of cow's milk]. *Nutr Hosp*. 31(1):92–101. spa. doi:10.3305/nh.2015.31.1.8253.

Fisberg M, Machado R. 2015. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutr Rev*. 73 Suppl 1:4–7. eng. doi:10.1093/nutrit/nuv020.

Fontecha A, Juárez M, editors. 2012. Avances científicos sobre el papel de la grasa láctea en la alimentación. España: Nemira. 241 p. ISBN: 9788494015298.

Glawdel T, Ren C. 2015. Zeta Potential Measurement: Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics. New York, NY: Springer New York. 11 p. ISBN: 978-1-4614-5488-5.

Goetzke B, Nitzko S, Spiller A. 2014. Consumption of organic and functional food. A matter of well-being and health? *Appetite*. 77:94–103. eng. doi:10.1016/j.appet.2014.02.012.

Goyal A. 2014. Microencapsulation of flaxseed oil for the fortification of omega 3 fatty acids in dairy products [Tesis]. India: Universidad Deemed. 212 p.

Grasso F. 2013. Diseño del proceso: Pretratamiento enzimático para extracción de aceites vegetales en un extractor de columna [Tesis]. Argentina: Universidad de la Plata. 194 p.

Hartman L, Lago R. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*. Researchgate. 22(6): 475-476.

Huck C. 2013 Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio [Tesis]. Argentina: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 321 p.

Jandacek RJ. 2017. Linoleic Acid: A Nutritional Quandary. *Healthcare (Basel)*. 5(2). 8 p. eng. doi:10.3390/healthcare5020025.

Kosegarten C., Jiménez M. 2012. Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectivos de Ingeniería de Alimentos*. <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Kosegarten-Conde-et-al-2012.pdf>

Leal M. 2016. Alimentos funcionales. 1st ed. Argentina: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. 323 p. (vol. 2016). ISBN: 978-987-1632-64-0.

Macedo R, Ramírez, Vélez J. 2015. Propiedades fisicoquímicas y de flujo de un yogur asentado enriquecido con microcápsulas que contienen ácidos grasos Omega 3. *Inf. tecnol*. 26(5):87–96. doi:10.4067/S0718-07642015000500012.

Mahrous H, Salam R. 2014. Production of a Functional Frozen Yoghurt Fortified with omega 3 and vitamin E. *American Journal of Food and Nutrition*. 2(5):77-84. doi:10.12691/ajfn-2-5-1.

Maldonado L, Latorre K, Rocha P, Medrano A, Abirached C, Panizzolo L. 2011. 33. Influencia del pH en la estabilidad de emulsiones elaboradas con proteínas de salvado de arroz. Uruguay: Universidad de la República de Uruguay. 4 p. <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/article/download/130/85/>.

Mantovani R, Pinheiro A, Vicente A, Cunha R. 2017. *In vitro* digestion of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein nanofibrils. *Food Res Int*. 99(Pt 1):790–798. eng. doi:10.1016/j.foodres.2017.06.049.

Marette A, Picard D. 2014. Yogurt consumption and impact on health: Focus on children and cardiometabolic risk. *Am J Clin Nutr*. 99(5 Suppl):1243S-7S. eng. doi:10.3945/ajcn.113.073379.

McClements D. 2015. *Food emulsions - principles practices and techniques*. Tercera Edición. U.S.: CRC Press. 714 p. ISBN 13: 978-1-4987-2669-6

Ministerio de la Agricultura Pecuaria y Abastecimiento. 2007. Instrução Normativa n° 46, de 23 de outubro de 2007, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasil. <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>.

Ministerio de la Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento. 1996. Reglamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria N° 146 de 07 de março de 1996. Brasil. http://www.dourados.ms.gov.br/wp-content/uploads/2016/05/RTIQ-Leite-Completo-PORTARIA-146_96-ok.pdf

Moreno L, Cervera P, Ortega R, Díaz J, Baladía E, Basulto J, Bel S, Iglesia I, López A, Manera M, Rodríguez E, Santaliestra A, Babio N, Salas J. 2013. Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Nutr Hosp*. 28(6):2039-2089. Doi: 10.3305/nh.2013.28.6.6856.

Nisa AU, Zahra N, Hina S, Masood S, Javed A, ManzarInam S. 2017. Development of Meat-based Functional Foods: A Review. *J App Biol Biotech*. 5(03):086-092. doi:10.7324/JABB.2017.50314.

Ohshima H. 2013. *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 14 p. ISBN: 978-3-642-20664-1.

Possa G, Castro MA de, Marchioni DML, Fisberg RM, Fisberg M. 2015. Probability and amounts of yogurt intake are differently affected by sociodemographic, economic, and lifestyle factors in adults and the elderly-results from a population-based study. *Nutr Res*. 35(8):700–706. eng. doi:10.1016/j.nutres.2015.05.020.

Ralston RA, Lee JH, Truby H, Palermo CE, Walker KZ. 2012. A systematic review and meta-analysis of elevated blood pressure and consumption of dairy foods. *J Hum Hypertens.* 26(1):3–13. eng. doi:10.1038/jhh.2011.3.

Reglamento Técnico Centroamericano. 2011. Resolución N° 277-2011 (COMIECO-LXI) de fecha 02 de diciembre de 2011 y su Anexo: Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.01.60:10 Etiquetado Nutricional de Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para la población a partir de 3 años de edad. http://www.cita.ucr.ac.cr/sites/default/files/archivos_adjuntos/Reglamento%20T%C3%A9cnico%20Centroamericano%20de%20Etiquetado%20Nutricional%20de%20Productos%20Alimenticios%20Preenvasados.pdf"

Reid G. 2015. The growth potential for dairy probiotics. *International Dairy Journal.* 49:16–22. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.04.004.

Rodrigues H, Vinolo M, Sato F, Magdalon J, Kuhl C, Yamagata A, Pessoa A, Malheiros G, Dos Santos M, Lima C, et al. 2017. Correction: Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. *PLoS ONE.* 12(5):e0179071. eng. doi:10.1371/journal.pone.0179071.

Soares R, De Souza M, Sundfeld M, Badan A, Gigante M. 2018. Milk fat as a structuring agent of plastic lipid bases. *Brasil. Food Research International.* 11(18):120-129. doi:10.1016/j.foodres.2018.05.015

Statista. 2014. Per capita consumption of yogurt worldwide in 2012. U.S.1 p. <https://www.statista.com/statistics/279596/global-yogurt-consumption-per-capita-by-country/>.

Tadros TF. 2015. Interfacial phenomena and colloid stability. Berlin: de Gruyter. 342 p. ISBN: 9783110388527. eng.

Vera E. 2011. Elaboración y aplicación gastronómica del yogur [Tesis]. Ecuador: Universidad de Cuenca. 242 p.

Vergara D, Carreras I, Ortega E, González M. 2014. Probióticos mas allá de la salud intestinal. *Nutr Hosp.* 30 (Supl. 2): 63-67. ISSN 0212-1611

Williams P. 2016. Zeta Potential: Encyclopedia of Membranes. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 16 p. ISBN: 978-3-662-44323-1.

Williams PA, Phillips GO, editors. 2014. Gums and stabilisers for the food industry 17: The changing face of food manufacture: the role of hydrocolloids. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 388 p. (Special publication; vol. 346). ISBN: 9781849738835. eng. <http://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-84973-883-5>.

Zhou Y, Wang T, Zhai S, Li W, Meng Q. 2016. Linoleic acid and breast cancer risk: a meta-analysis. *Public Health Nutr.* 19(8):1457–1463. eng. doi:10.1017/S136898001500289X.

7. ANEXO

Anexo 1. Análisis estadístico del estudio.

	Pr > F (%)	R² (%)	CV (%)
Potencial zeta	0.2551	0.82	5.94
Span	0.0041	0.76	6.55
Diámetro	<.0001	0.89	7.41
Composición físico-química			
Sólidos totales	0.6148	0.53	1.12
Cenizas	0.6034	0.54	1.03
Proteína	0.0963	0.93	1.51
Grasa	0.0635	0.96	0.70
Lactosa	0.0884	0.94	1.80
Ácidos grasos			
C4:0 (Ác. Butírico)	0.1585	0.97	18.59
C6:0 (Ác. Caproico)	0.005	1.00	0.56
C8:0 (Ác. Caprílico)	0.0151	1.00	1.77
C10:0 (Ác. Cáprico)	0.0141	1.00	1.64
C12:0 (Ác. Láurico)	0.0077	1.00	0.90
C14:0 (Ác. Mirístico)	0.0013	1.00	0.15
C15:0 (Ác. Pentadecanoico)	0.0108	1.00	1.25
C16:0 (Ác. Palmítico)	0.0019	1.00	0.18
C16:1 (Ác. Palmitoleico)	0.0293	1.00	3.65
C17:0 (Ác. Margárico)	0.0439	1.00	4.40
C17:1 (Ác. Margaroleico)	0.0715	0.99	7.26
C18:0 (Ác. Estearico)	0.0146	1.00	1.00
C18:1 (Ác. Oleico)	<0.0001	1.00	0
C18:2t	0.0276	1.00	5.53
C18:2 (Ác. Linoleico)	0.0042	1.00	0.55
C18:3t	0.0174	1.00	1.37
C18:3 (Ác. Linolénico)	0.0044	1.00	0.53
C20:0 (Ác. Araquídico)	0.0764	0.99	2.82
Grasa saturada	0.0006	1.00	0.06
Grasa insaturada	0.0006	1.00	0.06
Bacterias ácido lácticas	0.0088	0.69	0.82
pH	0.0005	0.83	0.99
acidez	<0.0001	0.97	1.34