

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UN YOGUR ENRIQUECIDO CON ÁCIDO FÓLICO CON BIOACCESIBILIDAD CONTROLADA

Autor: Vicent Gimeno Pardo. Directores: Ana Fuentes López, Isabel Fernández Segovia

ABSTRACT:

The aim of the present work is to study the effect of the incorporation of Folic Acid encapsulated in a mesoporous silica particle on the physicochemical properties of a whole fat and a fat free yogurt along its storage in refrigeration. The mesoporous MCM-41 material was synthesized, loaded with folic acid and functionalized with polyamines obtaining solid S1. The amount of folic acid and the release kinetics from S1 were characterized by HPLC. Subsequently, two types of yogurts were fortified with folic acid by adding the amount of S1 that provides the DRI of this vitamin. Finally we evaluated the influence of the addition of S1 and well as the storage time on the physicochemical properties (pH, color and syneresis) and rheology behavior for both, control and fortified yoghurts. The results indicate that solid S1 is capable of inhibiting the release of folic acid in both, lactic acid medium at pH 4 (yogurt) and an acidic solution at pH 2 (stomach). Moreover, S1 is able to controllably release their contents in neutral pH (intestine), thereby modulating the bioaccessibility. Moreover, it was found that fortification generally not alter the physicochemical properties of both types of yogurt. Thus, the acceptability of such products by consumers should not be affected.

Key words: Folic acid, yoghurt, MCM-41, fortification, colour, syneresis, rheology,

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la incorporación de ácido fólico encapsulado en un material mesoporoso sobre las propiedades fisicoquímicas y reológicas de yogur entero y desnatado durante su almacenamiento en refrigeración. Para ello se ha sintetizado un material mesoporoso MCM-41, cargado con ácido fólico y funcionalizado con poliaminas (S1) y se ha caracterizado la cantidad y cinética de liberación de ácido fólico en función del medio. Posteriormente se han fortificado con ácido fólico los dos tipos de yogur a través de la adición de la cantidad de S1 que aporta la CDR de esta vitamina. Finalmente se ha evaluado la influencia de la adición de partícula y el tiempo de almacenamiento sobre las propiedades fisicoquímicas (pH, color y sinéresis), así como la reología,

tanto de los yogures control como de los fortificados. Los resultados indican que el sólido S1 es capaz de inhibir la liberación del ácido fólico tanto en un medio de ácido láctico a pH 4 (yogur) como en una solución a pH ácido (estómago). Sin embargo, es capaz de liberar controladamente su contenido en condiciones de pH neutro (intestino) modulando así la bioaccesibilidad. Por otra parte, se ha comprobado que la fortificación no modificó en términos generales las propiedades fisicoquímicas de ambos tipos de yogur, de manera que la aceptabilidad de estos productos por parte de los consumidores no debería de verse afectada

Palabras clave: Ácido fólico, yogur, MCM-41, fortificación, sinéresis, reología

RESUM

L'objectiu del present treball és estudiar l'efecte de la incorporació d'àcid fòlic encapsulat en un material mesoporós sobre les propietats fisicoquímiques i reològiques de iogurt sencer i desnatat durant el seu emmagatzematge. L'objectiu del present treball és estudiar l'efecte de la incorporació d'àcid fòlic encapsulat en un material mesoporós sobre les propietats fisicoquímiques i reològiques de iogurt sencer i desnatat durant el seu emmagatzematge en refrigeració. Per tal de dur-ho a terme s'ha sintetitzat un material mesoporós MCM-41, carregat amb àcid fòlic i funcionalitzat en poliamines (S1) i s'ha caracteritzat la quantitat i cinètica d'alliberació de l'àcid fòlic en funció del medi. Seguidament s'ha fortificat amb àcid fòlic els dos tipus de iogurt mitjançant l'addició de la quantitat de S1 que aporta la QDR d'aquesta vitamina. Finalment s'ha avaluat la influència de l'addició de partícula i el temps d'emmagatzemament sobre les propietats físico-químiques (pH, color y sinéresis), així com també la reologia tant dels iogurts control com dels iogurts fortificats. Els resultats indiquen que el sòlid S1 és capaç d'inhibir l'alliberació de l'àcid fòlic tant en un entorn d'àcid làctic a pH 4 (iogurt) i també en una solució a pH àcid (estomac). D'altra banda, és capaç d'alliberar controladament el seu contingut en condicions de pH neutre (intestí) modulant d'aquesta manera la bioaccesibilitat. Per altra part en aquest estudi també s'ha comprovat que la fortificació no va modificar en termes generals les propietats físico-químiques dels dos tipus de iogurt, per tant l'acceptabilitat per part dels consumidors deuria ser la mateixa.

Paraules clau: Àcid fòlic, iogurt, MCM-41, fortificació, sinéresis, reologia.

INTRODUCCIÓN

Los términos ácido fólico o folato hacen referencia a un grupo de vitámeros hidrosolubles del complejo B, conocidos como vitamina B9 (Chan et al., 2013). Los folatos se encuentran principalmente en alimentos vegetales de hoja verde, legumbres, cítricos, cereales y derivados (Pérez-Esteve et al., 2014). La importancia del ácido fólico en el organismo se debe a que se trata de una vitamina esencial en numerosos procesos biológicos, como la síntesis y reparación de ADN, o en el proceso de crecimiento y división celular (Lucock, 2000). Asimismo, cantidades suficientes de ácido fólico en la dieta pueden prevenir ciertas enfermedades y problemas en la salud humana. Su deficiencia es especialmente importante en la etapa de gestación, ya que un déficit de la vitamina durante el embarazo provoca malformaciones en el desarrollo del tubo neural del feto (Czeizel y Dudás, 1992). Recientes investigaciones han relacionado también niveles bajos de ácido fólico con ciertas enfermedades degenerativas como el Alzheimer, Parkinson o la demencia senil (Cacciapuoti, 2013).

La deficiencia de esta vitamina en el organismo puede venir producida por diversos factores como un consumo dietético inadecuado, mala absorción del folato por el organismo o por presentar una necesidad dietética incrementada como sucede en el caso de niños, embarazadas o madres lactantes. Aunque se trata de una vitamina ampliamente distribuida en los alimentos, la ingesta deficitaria puede producirse por su degradación durante el proceso de preparación y elaboración de los alimentos, de forma que durante el cocinado se puede llegar a perder hasta el 50% del folato contenido en los alimentos (Younis et al., 1997).

Con el objeto de prevenir situaciones carenciales de esta vitamina, se emplean habitualmente suplementos de ácido fólico. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el margen entre el beneficio que produce una dosis apropiada y el exceso de ácido fólico es muy estrecho (Lucock y Yates, 2009). En particular, se ha estudiado que durante el proceso de biotransformación del ácido fólico, la ruta metabólica se satura a dosis que oscilan entre 266 y 400 μg . A partir de esta cantidad, el ácido fólico no metabolizado pasa al plasma sanguíneo, hecho que podría estar asociado a un aumento del riesgo de padecer cáncer, una mayor resistencia a la insulina y lesiones preneoplásicas y neoplásicas (Kim, 2004). Estos efectos nocivos sobre la salud señalan el interés de diseñar sistemas de dosificación de ácido fólico a lo largo de la digestión que permitan controlar su bioaccesibilidad y biodisponibilidad durante la absorción.

La bioaccesibilidad de un nutriente se define como la cantidad de nutriente que se libera de una matriz alimentaria durante la digestión y que lo hace accesible para la absorción en la mucosa intestinal (Hedrén et al., 2002). Una posibilidad para modular la bioaccesibilidad de una molécula consiste en su encapsulación y liberación controlada mediante estímulos adecuados. Los sistemas clásicos de encapsulación han consistido tradicionalmente en el uso de bases orgánicas (lípidos e hidratos de carbono) que actúan como soporte (Tomiuk et al., 2012). Sin embargo, estas bases orgánicas tienen algunos inconvenientes importantes, tales como la

dificultad para una producción a gran escala (Chen et al., 2006; Fathi et al., 2012), baja estabilidad de las estructuras durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, dificultad en el control de la velocidad de liberación y también una pobre capacidad para proteger el elemento encapsulado durante la digestión debido a que las extremas condiciones a las que son expuestos los alimentos durante el proceso de digestión las degradan (McClemens y Li, 2010).

Como alternativa a la encapsulación clásica se han desarrollado sistemas basados en materiales mesoporosos inorgánicos (Vallet-Regí et al., 2004), tales como las partículas de sílice mesoporosas (PSM). Las partículas mesoporosas son soportes sólidos de tamaño de poro entre 2-50 nm. Se sintetizan mediante una reacción entre un precursor orgánico y un surfactante, de manera que cambiando alguno de los componentes o condiciones de síntesis se obtienen diferentes familias de sólidos (Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, 2014). Las PSM presentan unas características únicas como soportes para encapsular moléculas bioactivas y controlar su liberación, ya que se trata de materiales con una estabilidad muy alta (Ghedini et al., 2010), biocompatibilidad adecuada (Al Shamsi et al., 2010), sin toxicidad aparente (Suh et al., 2009), gran capacidad de carga (Coll et al., 2011) y ofrecen la posibilidad de incluir “puertas moleculares” en su superficie externa que controlen la apertura y cierre del mesoporo. Esta última característica permite controlar la bioaccesibilidad mediante la liberación del material encapsulado como consecuencia de un estímulo externo. En este sentido, se ha estudiado una combinación basada en aminas ancladas en la superficie del PSM que actúan como un sistema adecuado para la entrega de la carga en función de cambios de pH (Bernardos et al., 2008). Una representación gráfica del mecanismo de acción de una puerta molecular se muestra en la Figura 1.

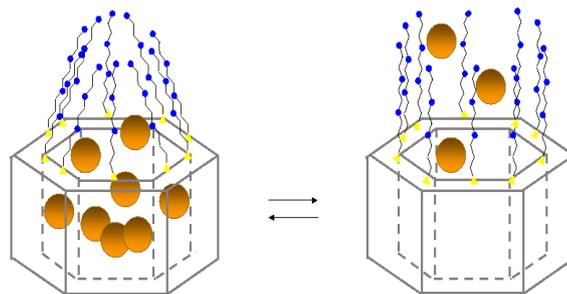


Figura 1. Representación esquemática de una puerta nanoscópica en la superficie exterior de un material mesoporoso.

Con el objetivo de conseguir un aporte extra de un determinado nutriente pueden emplearse diferentes estrategias. La administración de suplementos dietéticos en forma de pastillas, cápsulas o como preparados en polvo, en bebidas y barras energéticas ha sido muy utilizada en el pasado y su uso todavía está muy extendido en determinados países como Estados Unidos. Sin embargo, en los últimos años, el uso de estos suplementos está siendo sustituido por el consumo de alimentos enriquecidos y/o fortificados.

Los lácteos presentan muy buenas cualidades para convertirse en alimentos enriquecidos y/o fortificados, ya que la incorporación de nutrientes resulta muy sencilla, y de ahí la gran cantidad de lácteos funcionales desarrollados hasta la fecha (Bonet et al., 2009). En este sentido, el yogur es el producto lácteo sobre el que se realizan más enriquecimientos y fortificaciones. En España, el consumo de yogur enriquecido y/o fortificado ha aumentado en prácticamente 2 g/persona y día desde el año 2000 (12,5 g/persona y día) hasta el año 2006 (14,2 g/persona y día). Los yogures suelen enriquecerse o fortificarse con vitaminas (principalmente A, D, E, B6, ácido fólico y B1), minerales (calcio y hierro), fibra, probióticos, prebióticos, simbióticos, esteroides vegetales, soja y ácido linoleico conjugado (FEN, 2011).

Los yogures comercializados presentan valores nutricionales y características sensoriales muy diversas. El diferente porcentaje en grasa es una de las variables más habituales, con el objetivo de conseguir un producto adecuado para todo tipo de dietas. Las variedades con diferentes texturas, son también muy habituales en el mercado, en este sentido existen yogures cremosos, de estructura firme o en forma de yogur batido. El yogur batido se consigue al desintegrar su estructura mediante un proceso de cizalla previo al envasado con la finalidad de producir un yogur menos viscoso y sin la estructura de gel, que facilita la incorporación de nuevos ingredientes tales como frutas, fibras... (Ramírez-Sucre y Vélez-Ruiz, 2012). Por último, su pH cercano a 4, le convierte en una matriz apropiada para incorporar matrices porosas con puertas moleculares que responden a cambios de pH, debido a que a pH ácido éstas puertas se encuentran en su forma cerrada (Bernardos et al, 2008).

Existen diferentes estudios que caracterizan la influencia de la adición de diferentes ingredientes funcionales en las propiedades físico-químicas de los yogures (Sendra et al., 2010; Cruz et al., 2013a). En la mayoría de estos estudios se comparan las características reológicas, sinéresis, pH y color, con la finalidad de determinar el efecto de la incorporación de estos ingredientes y determinar la aceptabilidad final del nuevo producto.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la incorporación de ácido fólico encapsulado en un material mesoporoso sobre las propiedades fisicoquímicas de yogur entero y desnatado durante su almacenamiento en refrigeración

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Los reactivos tetraetilortosilicato (TEOS), trietanolamina (TEAH₃), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), hidróxido de sodio (NaOH), 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propilo (N₃), ácido acético (CH₃COOH), cloruro sódico (NaCl), fosfato monosódico (NaH₂PO₄), fosfato disódico (Na₂HPO₄) y el tetrabutilamonio hidrógeno sulfato (TBAHS) fueron adquiridos en Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España). El ácido fólico se obtuvo de los laboratorios Schircks (Jona, Suiza). El acetonitrilo con grado HPLC fue suministrado por Scharlau (Barcelona, España).

Dos tipos de yogures cremosos naturales batidos, uno entero azucarado (E) y otro desnatado edulcorado (D) (Senoble, Ocaña, España), fueron utilizados como materia prima. La tabla 1 muestra la composición centesimal de los dos tipos de yogur utilizados, tal y como indica el etiquetado de los mismos. Los yogures fueron adquiridos en un supermercado local en envases de 500 mL y siempre con una fecha de caducidad superior a 21 días desde el día de la compra.

Tabla 1. Composición centesimal (g/100 g) de los dos tipos de yogur utilizados

	Entero azucarado	Desnatado edulcorado
Proteína	4,1	4,7
Hidratos de carbono	12,2	5,3
Grasa	3,4	0,1

2.2 Preparación de las partículas mesoporosas de óxido de silicio: síntesis, cargado, funcionalización y caracterización.

La síntesis de material mesoporoso (MCM-41) se realizó a través de la llamada 'ruta de los atranos'. La relación molar entre los reactivos es 7 TEAH₃: 2 TEOS: 0,52 CTABr: 0,5 NaOH: 180 H₂O. En esta síntesis se pesaron 25,79 g (172 mmoles) de TEAH₃ sobre los que se añadieron 0,49 g (12,33 mmoles) de NaOH disueltos previamente en 2 mL de agua. La mezcla se puso en agitación y se calentó hasta alcanzar 120°C. A continuación, se dejó enfriar hasta 70 °C y entonces se añadieron 11 mL de TEOS (48,9 mmoles), volviéndose a calentar la mezcla hasta 120°C. Una vez alcanzada esta temperatura, se añadieron 4,68 g de CTABr (12,8 mmoles). Posteriormente, se dejó enfriar la mezcla hasta 70°C y se añadieron 80 ml de agua destilada (4,4 mmoles). La mezcla se dejó en

agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 h. El gel obtenido se envejeció en estufa a 100 °C durante 20 h. Finalmente el sólido obtenido se filtró y lavó con abundante agua hasta conseguir un pH cercano a 7 y se secó en estufa a 70 °C. Para preparar el material poroso final, el sólido mesoestructurado fue calcinado a 550 °C bajo una atmosfera oxidante.

El sólido mesoporoso resultante (MCM-41) fue cargado con ácido fólico mediante un proceso de impregnación. Para ello, 100 mg de MCM-41 fue impregnada con 0,5 mL de una disolución de ácido fólico en PBS (10 mg/mL) en tres ciclos de adición. Tras cada uno de los ciclos de adición, se colocó el sólido en una estufa a 37 °C para eliminar los restos de agua.

El sólido mesoporoso cargado con ácido fólico se funcionalizó con 3-[2-(2-aminoetilamino)etilamino]propilo. Para ello, 100 mg de sólido cargado fueron suspendidos en 10 mL de una disolución de ácido acético al 5%, donde se añadió un exceso de N3 (0,43 mL, 0,015 mmol). La mezcla fue agitada durante 5,5 h a temperatura ambiente. El sólido final (S1) se aisló mediante filtración a vacío, se lavó con 300 mL de disolución de ácido acético, y secó a 37 °C durante 24 h.

La caracterización de los diferentes sólidos mesoporosos (MCM-41 y S1) se realizó mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión (TEM). La difracción de rayos X se realizó utilizando un difractómetro BrukerD8 Advance utilizando radiación CuK α . Para la microscopía TEM, la MCM-41 se dispersó en diclorometano y se sometió a sonicación durante 2 min para evitar los agregados. La suspensión se depositó sobre rejillas de cobre recubiertas con película de carbono (Aname SL, Madrid, España). La adquisición de imagen se realizó mediante un microscopio JEOL JEM-1010 (JEOL Europa SAS, Francia) funcionando a un voltaje de aceleración de 80 kV.

2.3 Determinación de las cinéticas de liberación de ácido fólico desde las partículas.

Para determinar el efecto del pH en la liberación de ácido fólico desde el sólido S1, 10 mg del sólido se colocaron en 25 mL de agua ajustada a diferentes valores de pH para reproducir las condiciones de acidez típicas del estómago (pH 2), del yogur (pH 4 ajustado con ácido láctico) y del intestino (pH 7,5). De esta disolución, se tomaron periódicamente alícuotas, las cuales se filtraron con filtros de nilón de 0,45 μ m y se analizaron para determinar la concentración de ácido fólico presente.

El ácido fólico fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, según el método descrito por (Póo-Prieto et al., 2011) con pequeñas modificaciones. Para ello se empleó un cromatógrafo Hitachi LaChrom (Hitachi Ltd., Tokyo, Japón) con detector Ultravioleta (modelo L-2400). Para la separación se utilizó una columna Kromaphase C18 5 μ m (250 mm x 4,6 mm) (Scharlab, Barcelona, España).

Las fases móviles estaban formadas por la fase (A) compuesta por 125 mM de NaH₂PO₄, 0,875mM de Na₂HPO₄ y 0,4mM TBAHS en agua y la fase (B) compuesta por una mezcla de acetonitrilo y fase A, 65:35. La longitud de onda del detector UV fue fijada en 280nm. El programa de elución empleado se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Programa de elución para el análisis ácido fólico.

Tiempo (min)	Flujo(mL/min)	Fase móvil A (%)	Fase movil B (%)
0	1.0	90	10
5	1.0	90	10
15	1.0	64	36
30	1.0	40	60
35	1.0	90	10
40	1.0	90	10

La capacidad máxima de liberación del sólido S1 se determinó cuantificando la cantidad de ácido fólico liberada tras alcanzar el equilibrio (4h). Esta cantidad máxima de liberación se utilizó para establecer la cantidad de sólido S1 necesaria para liberar la cantidad diaria recomendada (CDR) de ácido fólico en la población con mayor necesidad de este nutriente (600µg/día en embarazadas) (Eichholzer et al., 2006).

2.4 Preparación de las muestras

Para cada tipo de yogur, entero (E) y desnatado (D), se preparó una muestra control (C) y otra muestra con partícula (P). A la muestra con partícula (P) se le añadió la cantidad de sólido S1 necesaria para aportar la CDR de ácido fólico y se agitó hasta distribuir homogéneamente el material en el producto. A la muestra control (C) se le realizó el mismo proceso de agitación pero sin añadir el sólido S1.

De cada tipo de yogur (E-C, E-P, D-C y D-P) se prepararon 6 lotes y cada día de muestreo (día 0, 7 y 21 de almacenamiento) se analizaron dos lotes por tipo de muestra. Cada día de análisis se determinó el pH, color, sinéresis y propiedades reológicas de las muestras.

2.5 Determinaciones analíticas

La medida de pH se realizó mediante un pH-metro (Crison Basic 20+, Crison Instruments S.A, Barcelona, España) con electrodo de punción. Las medidas de pH se tomaron directamente sobre la muestra de yogur. Las medidas se realizaron por triplicado.

Las coordenadas de color CIEL*a*b* (observador 10° e iluminante D65) fueron obtenidas midiendo el espectro de reflexión de las muestras (Minolta, CM 3600D, Tokyo, Japón), previo calibrado con placas negras y blancas. A partir de las coordenadas de color L*, a* y b* se calculó el ángulo del tono (h_{ab}^*) y el croma (C_{ab}^*) (Eq. 1 y Eq. 2, respectivamente). Las mediciones se realizaron en el interior de una cubeta de metracrilato y todas las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

$$h_{ab}^* = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad \text{Eq. 1}$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eq. 2}$$

Para determinar la sinéresis del producto, se centrifugaron aproximadamente 20 g de yogur durante 10 min a 8000 rpm y 4°C en una centrífuga Eppendorf 5804 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Tras la centrifugación, el suero liberado fue extraído y pesado. El porcentaje de sinéresis se calculó mediante la Eq. 3. Las determinaciones de sinéresis se realizaron por duplicado.

$$\text{Sinéresis} = 100 \times \frac{(g_{\text{yogur}} - g_{\text{suero}})}{g_{\text{yogur}}} \quad \text{Eq. 3}$$

Las propiedades reológicas se determinaron mediante un reómetro de tensión controlada (Haake RheoStress 1, Karlsruhe, Alemania) a 4° C. Tres ciclos consecutivos de subida y bajada desde 0 a 300 s⁻¹ fueron realizados con el objetivo de eliminar la tixotropía de la muestra. El área de histéresis fue calculada utilizando el programa RheoWin 3.61 Data Manager. Los datos obtenidos en el tercer barrido de bajada se ajustaron al modelo de Herschel-Bulkley para fluidos no Newtonianos (Eq 4), en la cual la deformación experimentada por una muestra se relaciona con el esfuerzo aplicado a la misma. Tres parámetros caracterizan esta relación: el índice de consistencia k, el índice de flujo n, y el umbral de fluencia σ_0 . Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

$$\sigma = \sigma_0 + K\gamma^n \quad \text{Eq. 4}$$

2.6 Análisis estadístico

Las diferencias entre las muestras debidas a la tipología de yogur, a la adición de partícula y al tiempo de almacenamiento se determinaron a través de un análisis de la varianza (ANOVA multifactorial), con un nivel de confianza LSD del 95% ($p < 0.05$). El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los sólidos mesoporosos

Los diferentes sólidos (MCM-41 antes y después de la calcinación, sólido cargado con ácido fólico S0 y sólido cargado con ácido fólico y funcionalizado con aminas S1) preparados se caracterizaron mediante técnicas estándar. Los patrones de difracción de rayos X se muestran en la Figura 2. La curva (a) muestra los esperados cuatro picos de una matriz hexagonal indexada ordenada (100), (110), (200) y (210) reflexiones de Bragg. Un cambio significativo en la reflexión (100) en el polvo de XRD de la muestra MCM-41 calcinado se aprecia claramente en la curva b, que corresponde a una contracción de las células relacionadas con condensación de silanoles durante la etapa de calcinación. Las curvas c y d muestran la pérdida de las reflexiones (110), (200) y (210). Sin embargo, la presencia del pico (100) en todos los casos indica que el proceso de carga de los poros con ácido fólico, y la funcionalización adicional con la poliamina, no modificó la porosidad típica del material mesoporoso MCM-41.

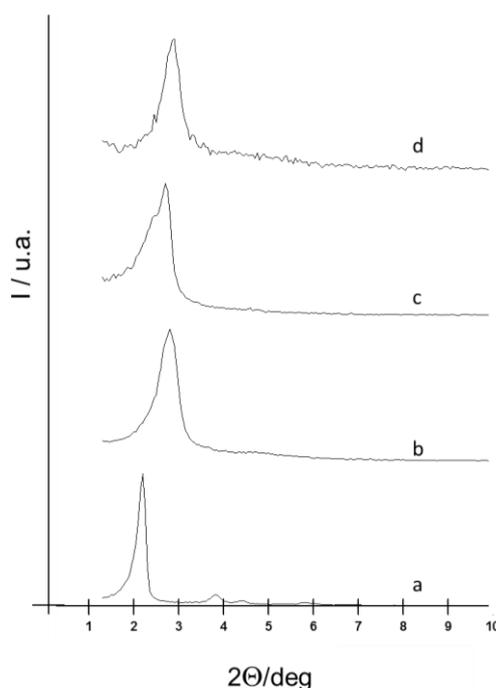


Figura 2. Patrones en polvo de rayos X de los sólidos MCM-41 tras la síntesis (a), MCM-41 calcinado (b), sólidos no nivelados que contienen la vitamina B9 (S0) (c) y matriz mesoporosa cargada y funcionalizada (S1) (d).

La mesoestructura MCM-41 después de ser cargada con ácido fólico y funcionalizada con poliaminas también fue confirmada por TEM (Fig. 3). Los mesoporosos se observan como esferas claras en el amalgama de sílice oscuro.

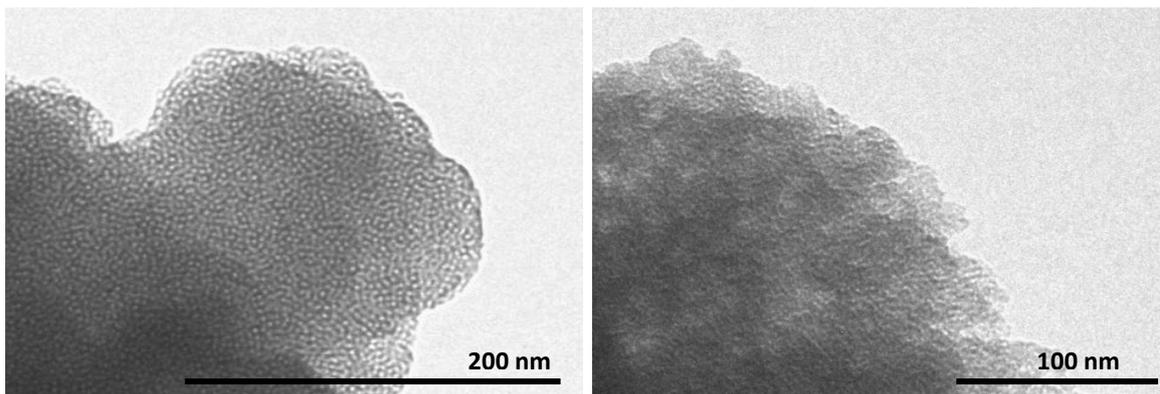


Figura 3. Imagen obtenida mediante TEM del material MCM-41 calcinado (a) y sólido cargado S1 (b).

3.2 Perfiles de liberación del sólido S1 y cuantificación del ácido fólico liberado por el sólido

Los perfiles de liberación del sólido S1 a diferentes valores de pH (pH 2, 4 ajustado con ácido láctico y pH 7,5) se muestran en la figura 4. Como puede observarse en la figura, a pH 2 (pH del estómago) se alcanza una liberación máxima del 5% a las 4 h. Valores similares se alcanzan cuando la liberación del sólido S1 se realiza en un medio ácido ajustado a pH 4 con ácido láctico (pH del yogur). Estos datos confirman que en ambos medios la liberación del ácido fólico está inhibida por dos mecanismos diferentes: por una parte la escasa solubilidad del ácido fólico en medio ácido y por otra que al pH de ambas disoluciones las aminas presentes en la superficie se encuentran protonadas. Este factor favorece las repulsiones coulombicas entre las aminas, tendiendo estas a adoptar un estado rígido que bloquea la entrada a los poros. Por el contrario, a pH 7,5 la baja protonación de las aminas favorece la interacción por puentes de hidrógeno entre aminas próximas y como consecuencia de estas interacciones los poros se desbloquean y queda libre el paso de un ácido fólico altamente soluble debido al cambio de pH (Pérez-Esteve et al., 2014). La combinación de ambos fenómenos favorece que a pH 7,5 se produzca una liberación controlada (efecto del pH) y sostenida en el tiempo (efecto de las aminas que actúan como puerta molecular).

Este comportamiento permitiría modular la bioaccesibilidad del ácido fólico a lo largo del tubo digestivo, ya que en el yogur y en el estómago las aminas se encontrarán protonadas y por tanto las puertas estarían cerradas, evitando de este modo la salida del ácido fólico. Al llegar el yogur enriquecido al intestino, las puertas moleculares se abrirían por efecto del cambio de pH y el ácido fólico saldría de manera controlada a lo largo del proceso de digestión.

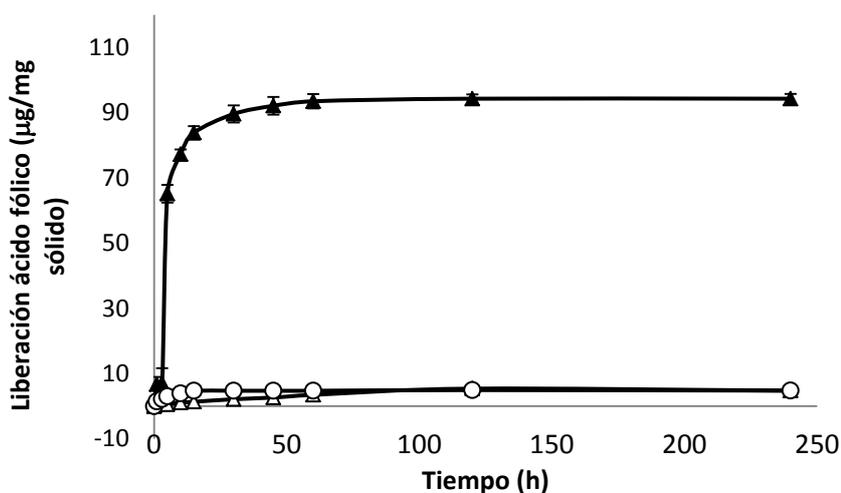


Figura 4. Perfiles de liberación del sólido S1 en agua ajustada a pH 2 – estómago- (Δ), pH 4 ajustado con ácido láctico –yogur- (o) y pH 7 –intestino- (▲).

La cantidad de máxima de ácido fólico liberada por el sólido S1 se calculó a partir de la curva de liberación a pH 7,5 (Fig. 4) cuantificando la cantidad de ácido fólico liberada en el momento de alcanzar la máxima liberación (4h). A este tiempo, 1 mg de sólido S1 libera 85,5 µg de ácido fólico. A partir de estos resultados, se establecerá que para cubrir la máxima CDR en embarazadas (600µg) se necesitan alrededor de 7 mg de sólido S1. Por tanto, 7mg será la cantidad de sólido S1 que debe ser incorporado en una ración de yogur (125g). Esta preparación del yogur será que la se utilice en las fases posteriores del presente trabajo.

3.3 Caracterización de las materia prima utilizada: yogur desnatado y yogur entero

Se llevó a cabo una caracterización inicial de los yogures empleados como materia prima en el presente estudio. Para ello se determinaron las propiedades físico-químicas de los dos tipos de yogur batidos comerciales (desnatado y entero) de los cuales se analizaron diferentes lotes de fabricación, adquiridos y analizados en diferentes días.

La tabla 3 muestra los valores de pH, sinéresis, color y parámetros reológicos de ambos tipos de yogur. Se observaron diferencias significativas para los parámetros de pH, sinéresis y reología entre el yogur entero y desnatado. Sin embargo, respecto al color de las muestras, únicamente el tono y el parámetro a^* , cuyo desplazamiento desde valores positivos a negativos describe coloraciones de rojo a verde, variaron en función del tipo de muestra. Respecto al color destacar que los valores obtenidos en el presente estudio coinciden con los obtenidos por otros autores (Cruz et al., 2013b). Tal y como cabría esperar, ambas muestras se caracterizaron por

altos valores de luminosidad, no observándose diferencias significativas en función del contenido lipídico del mismo.

Las muestras analizadas de yogur entero poseían valores más bajos de pH y sinéresis. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores para yogures enteros y desnatados (Brennan y Tudorica, 2008; Ramirez-Sucre y Vélez-Ruiz, 2013). En ambos estudios se reporta cómo la presencia de glóbulos de grasa dificulta la agregación de la caseína y previene la contracción y reorganización de la red tridimensional de proteína en una estructura más compacta y con menos capacidad para retener el suero. Por tanto, la disminución del contenido en grasa en el yogur desnatado afecta a la estructura del gel, y por tanto hace que incremente la sinéresis.

Respecto a los parámetros de reología, los valores analizados son similares a los obtenidos por otros autores para yogures batidos enteros y yogures bajos en grasa (Ramirez-Sucre y Vélez-Ruiz, 2013). Debido a que los diferentes tipos de muestras presentaban importantes diferencias en cuanto a sus características físico-químicas se decidió estudiar ambos tipos de muestra por separado, evaluando en cada caso el efecto de la adición del material mesoporoso (S1) y el tiempo de almacenamiento sobre sus propiedades físico-químicas.

Tabla 3: Caracterización fisicoquímica de los yogures empleados como materia prima (valores promedio±desviación estándar).

Parámetro	Entero	Desnatado	α
pH	4,08±0,04	4,23±0,12	***
Sinéresis	51±3	47.2±0,4	*
L*	91.3±1,4	90,3±1,6	ns
a*	-1,72±0,06	-2,52±0,06	***
b*	11,1±0,8	10,9±1,1	ns
C _{ab} *	11,1±0,8	11,2±0,8	ns
h _{ab} *	98,8±0,4	103,0±1,1	***
σ_0 (Pa)	11,1±0,3	8,7±0,3	***
n	1,29±0,03	0,0734±0,006	***
K (Pas ⁿ)	0,029±0,004	0,67±0,04	***
Histéresis	9520±596	5897±469	***

Nivel de significación (α): *** (p<0.001), ** (p<0.01), * (p<0.1), ns (no significativo)

3.4 Efecto de la adición de partícula y tiempo de almacenamiento en las características físico-químicas del yogur batido desnatado y yogur batido entero

La figura 5 muestra los valores de pH tanto de los yogures enteros (E) y desnatados (D). Como puede apreciarse, para ambos tipos de yogur, la adición del ácido fólico encapsulado en el material mesoporoso no provocó ningún cambio sobre el pH (Tabla 4). Sin embargo, el pH de las muestras se incrementó significativamente (Tabla 4) a lo largo del almacenamiento en refrigeración, especialmente al inicio del periodo de estudio. A diferencia de lo cabría esperar en los yogures tradicionales, el pH no disminuye a lo largo del tiempo, sugiriendo una escasa post-acidificación durante el almacenamiento. La disminución del pH a lo largo del almacenamiento indicaría una post-acidificación del producto, aspecto que trata de evitar la nueva tendencia de elaboración mediante una adecuada selección de cultivos lácticos (Cruz et al., 2013a).

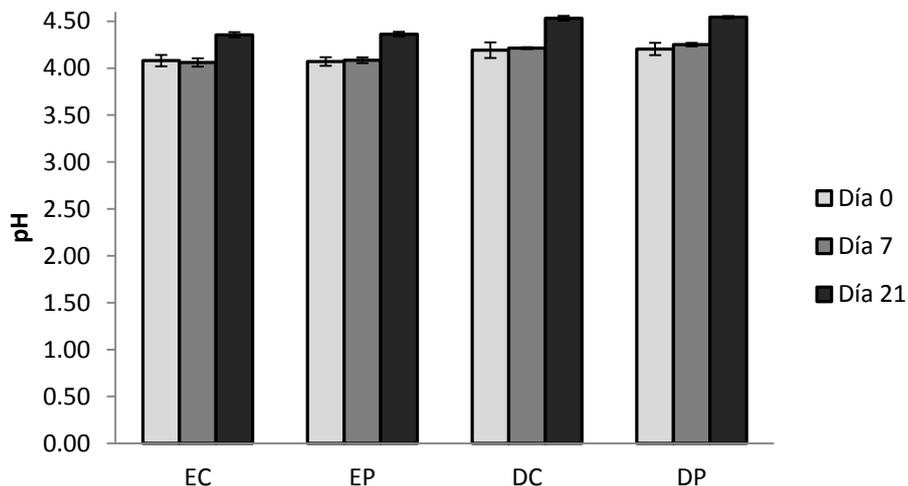


Figura 5. Valores (media±desviación estándar) de pH para las muestras entero control (EC), entero partícula (EP), desnatado control (DC) y desnatado partícula (DP).

Los valores de sinéresis (figura 6) aumentaron ligeramente durante el almacenamiento y son superiores en el caso de los yogures desnatados. Este aumento sugiere que el almacenamiento provocó en ambos casos una pérdida de la red tridimensional de proteínas. Por el contrario, no se halló diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los yogures control y los fortificados con el sólido S1 a cada uno de los tiempos de almacenamiento.

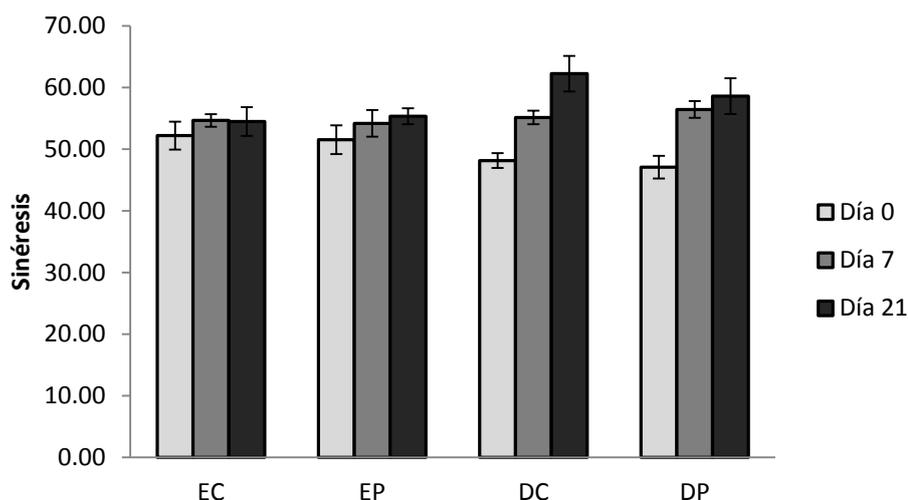


Figura 6. Valores (media \pm desviación estándar) del porcentaje de sinéresis para las muestras de yogur entero control (EC), entero partícula (EP), desnatado control (DC) y desnatado partícula (DP).

Tabla 4. ANOVA F-ratio para cada uno de los dos factores, tiempo de almacenamiento t , presencia de partícula S1 P , así como su interacción.

Parámetro	F-ratio entero			F-ratio desnatado		
	P	t	P * D	P	t	P * D
pH	0.38ns	664.40***	3.52*	01.39ns	171.05***	0.43ns
Sinéresis	1.08ns	11.34*	2.04ns	1.56ns	5.08*	1.05ns
L*	0.39ns	6.01**	0.36ns	0.40ns	11.16***	0.04ns
a*	16.07***	6.18**	6.51**	11.09**	36.62***	0.38ns
b*	0.07ns	1.24ns	0.27ns	0.07ns	0.05ns	0.08ns
C*	0.00ns	1.35ns	0.16ns	0.07ns	0.02ns	0.07ns
h*	2.00ns	0.33ns	1.41ns	2.14ns	1.22ns	0.24ns
σ_0	41.02***	24.07***	5.99*	0.42ns	18.53***	3.54ns
K	2601.32***	654.31***	651.46***	0.53ns	26.97***	0.73ns
n	370.63***	110.65***	93.07***	0.79nw	41.21***	0.65ns
Histéresis	143.12***	89.90***	14.67***	2.06ns	2.27ns	2.76ns

Nivel de significación (α): *** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$), * ($p < 0.1$), ns (no significativo)

Los valores de las coordenadas de color, así como los de tono (h^*_{ab}) y croma (C^*_{ab}) se muestran en la tabla 5. Ambas muestras presentaron un color blanco amarillento ($h^*_{ab} \approx 100$) y elevada luminosidad ($L^* \approx 92$). Esta similitud entre ambas muestras puede deberse a la tendencia de la industria a aproximar los productos enteros y aquellos con reducción calórica (desnatados) con el objetivo de que los productos desnatados no pierdan las propiedades sensoriales.

La adición de partícula provocó un aumento estadísticamente significativo (<0.001) en los valores de la coordenada a^* (cromaticidad en el eje verde-rojo) tanto en los yogures enteros como desnatados. Por su parte, el tiempo de almacenamiento afectó significativamente a los parámetros de luminosidad, siendo este efecto mayor en el caso del producto desnatado, tal y como indican los mayores valores de F-ratio y los niveles de significación en el caso del yogur bajo en grasa. Algunos autores (Ramirez-Sucre y Vélez-Ruiz, 2013; Vélez-Ruiz et al., 2013) han descrito la tendencia al cambio de color neto debido al almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, en el presente estudio estos cambios sólo son patentes para la luminosidad.

Atendiendo al comportamiento reológico descrito por las curvas de flujo, todas las muestras mostraron un comportamiento no newtoniano, así como dependencia con el tiempo (tixotropía). Este tipo de comportamiento está en concordancia con ensayos realizados por otros autores en yogures y postres lácteos semisólidos (Tárrega y Costell, 2006; Cruz et al., 2013b). Por otra parte, los reogramas de los yogures enteros y desnatados fueron diferentes, indicando la importancia que tiene la grasa en el comportamiento reológico de una muestra (Ramirez-Sucre y Vélez-Ruiz, 2013b).

La tixotropía de las muestras se evaluó como el área de histéresis entre las curvas de subida y bajada en un mismo ciclo. Como puede observarse en la tabla 6, los yogures enteros presentaron una mayor área de histéresis que los yogures desnatados. Esta área de histéresis está relacionada con el grado de ruptura de la estructura que ocurre durante la cizalla. La tabla 4 muestra cómo en el yogur entero tanto la adición de partícula como en el almacenamiento afectaron significativamente a la histéresis. Sin embargo, únicamente el factor de almacenamiento fue significativo sobre el comportamiento reológico. Asumiendo que el área de histéresis es un índice de la energía necesaria para destruir la estructura responsable de la dependencia del tiempo, los datos experimentales indicaron que la materia prima es el parámetro de máxima influencia, y que tanto el tiempo de almacenamiento como la presencia de partícula tienen un efecto ligero (entero) o no significativo (desnatado).

A partir de los 3 ciclos de subida y bajada el área de histéresis disminuyó significativamente respecto a los valores del primer y segundo ciclo (datos no mostrados). Por tanto, se consideró que durante el tercer ciclo se elimina la tixotropía y el comportamiento reológico es independiente del tiempo.

Las curvas de flujo del tercer ciclo se ajustaron al modelo Herschel-Bulkley (Tabla 6), consiguiendo valores de ajuste R^2 superiores a 0.99 en todas las muestras y confirmándose la adecuación del modelo para modelizar este comportamiento reológico. Como puede observarse en la tabla, los valores más altos de consistencia (k) y más bajos de umbral de

fluencia (σ_0) se encontraron en las muestras de yogur desnatado. Los valores de índice de comportamiento al flujo (n) indican claramente que las muestras de yogur desnatado presentan un comportamiento pseudoplástico ($0 < n < 1$), mientras que que las muestras de yogur entero se comportan plásticos de Bingham ($n > 1$). Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Ramirez-Sucre y Vélez-Ruiz (2013).

CONCLUSIONES:

El sólido S1 sintetizado es capaz de modular la bioaccesibilidad del ácido fólico en función del pH del medio, siendo capaz de inhibir la liberación en medios ácidos donde no se desea que libere, y liberar controladamente en el tiempo en medios neutros (condiciones del intestino). Por otra parte, la evaluación físico-química muestra cómo las diferencias encontradas entre las muestras control y fortificadas son mínimas, probablemente debido a que para alcanzar la CDR de ácido fólico es suficiente con la adición de una pequeña cantidad de S1 (7 mg S1/125g de yogur). El almacenamiento provocó cambios en algunas propiedades físico-químicas, teniendo éstas la misma tendencia tanto en los yogures controles como en los enriquecidos. Atendiendo a estos resultados puede concluirse que la fortificación de yogures con ácido fólico encapsulado en soportes mesoprosos funcionalizados con aminas actuando como puertas moleculares es una buena estrategia para modular la bioaccesibilidad de esta vitamina sin modificar las características físico-químicas del alimento.

Tabla 5. Valores medios (y desviación estándar) de los parámetros de color de las muestras analizadas

Muestra	L*			a*			b*			C* _{ab}			h* _{ab}		
	0	7	21	0	7	21	0	7	21	0	7	21	0	7	21
NC	90,8±1,4	92,7±0,2	92,61±0,19	-1,72±0,08	-1,61±0,05	-1,67±0,03	11,3±0,8	10,68±0,11	11,1±0,4	11,4±0,8	10,80±0,11	10,95±0,18	98,7±0,3	98,5±0,2	98,8±0,1
NP	90,9±1,4	92,6±0,2	92,54±0,11	-1,60±0,04	-1,61±0,04	-1,61±0,05	11,3±0,6	10,79±0,14	10,94±0,07	11,3±0,6	10,91±0,14	11,06±0,07	98,1±0,4	98,5±0,	98,4±0,2
DC	89,7±1,4	91,9±0,2	92,0±0,2	-2,52±0,08	-2,64±0,03	-2,64±0,02	11±1	10,98±0,11	11,07±0,10	11,5±1,2	11,29±0,11	11,38±0,10	102±1	103,5±0,1	10,34±0,1
DP	89,3±1,7	91,8±0,2	92,0±0,3	-2,47±0,03	-2,58±0,05	-2,61±0,02	11±1	11,03±0,14	11,22±0,13	11,6±1,2	11,33±0,14	11,52±0,13	102±1	103,2±0,1	10,31±0,1

Coordenadas de Color Cielab y valores de croma (C*_{ab}) y tono (h*_{ab})

Tabla 6. Valores medios (y desviación estándar) de los parámetros reológicos del modelo de Herschel-Bulkley ajustado a los datos experimentales obtenidos en el tercer ciclo de baja y del área de histéresis.

Muestra	σ ₀ (Pa)			K (Pa s ⁿ)			n			Histéresis		
	0	7	21	0	7	21	0	7	21	0	7	21
NC	11,64±1,05	11,36 ±0,75	9,87 ±0,92	0,030±0,004	0,028±0,004	0,026±0,010	1,290±0,032	1,282± 0,037	1,245± 0,078	9520±597	6678± 841	8174± 1161
NP	11,74 ±0,97	11,23 ±1,90	10,69 ±1,35	0,029±0,004	0,032 ±0,016	0,028±0,004	1,278±0,031	1,266 ±0,091	1,268±0,026	8675±433	8273± 457	7615± 403
DC	8,72±0,29	7,81±0,24	7,73 ±0,28	0,671±0,039	0,525±0,024	0,493±0,023	0,739±0,006	0,764± 0,005	0,767 ±0,006	5897±470	5174± 256	4370± 809
DP	8,40±0,13	8,07 ±0,02	6,99 ±2,00	0,658±0,017	0,537±0,012	0,887±0,708	0,740 ±0,004	0,763± 0,003	0,699± 0,123	4939 ±636	4881± 172	4103±1130

Umbral de fluencia (σ₀), índice de consistencia (k), índice de comportamiento al flujo (n)

AGRADECIMIENTOS:

Agradecer ante todo a Édgar y Ana por haber hecho de guía durante el trabajo, por su amabilidad, simpatía y excelente trato en todo momento. Agradecer también a todo el personal de los laboratorios tanto de química como de alimentos su ayuda en el desempeño experimenta, dado que más de una vez han perdido el tiempo conmigo por ayudarme. A Gemma por su infinito ánimo y apoyo. Y por último a mis padres porque sin ellos nada habría sido posible.

REFERENCIAS:

Al Shamsi, M.; Al Samsri, M.T.; Al-Salam, S.; Conca, W.; Shaban, S.; Benedict, S.; Tariq, S.; Biradar, A.V.; Penefsky, H.S.; Asefa, T.; Souid, A.K. 2010. Biocompatibility of calcined mesoporus silica particles with cellular bioenergetics in murine tissues, *Chem.Res.Toxicol.***23**: 1796-1805.

Bernardos, A.; Aznar, E.; Coll, C.; Martínez-Mañez, R.; Barat, J.M.; Marcos, M.D.; Sancenón, F.; Benito, A.; Soto, J. 2008. Controlled release of vitamin B2 using mesoporous materials funcionalizad with amine-bearing gate-like scaffoldings. *J. Control Release* **131**: 181-189.

Bernardos, A.; Mondragón, L.; Aznar, E.; Marcos, M.D.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Soto, J.; Barat, J.M.; Pérez-Palla, E.; Guillem, C.; Amorós, P. 2011. Enzyme-responsive intracelular controlled release using nanometric silica mesoporus support capped with 'saccharides', *ACS nano* **4**: 6353-6368.

Bonet, B.; Juarez, M.; Moreno, B.; Ortega, R.M.; Suarez, L. 2009. Libro blanco de los lacteos. Ed: Fenil-MARM.

Brennan C.; Tudorica, C.M. 2008. Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilisation of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *International Journal of Food Science & Technology* **43** (5): 824–833.

Cacciapuoti, F. 2013. Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease *J Thromb Thormbolysis*, **36**: 258-262.

Chan, Y.; Bailey, R.; O'Connor, D.; L. 2013. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), **4**(1): 123-125.

Chen, L.; Remondetto, G.E.; Subirade, M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems, *Trends Food Sci. Tech.* **17**: 272-283.

Coll, C.; Mondragón, R.; Martínez-Mañez, R.; Sancenón, F.; Marcos, M.D.; Soto, J.; Amorós, P.; Pérez-Payá, E. 2011. Enzyme-mediated controlled release systems by anchoringpeptide sequences on mesoporus silica supports, *Angew. Chem.Int.Ed*, **50**: 2138-2140.

Cruz, A.G.; Cadena, R.S.; Alvaro, M.B.V.B.; Sant'Ana, A.S.; Oliveira, C.A.F.; Faria, J.A.F.; Bolini, H.M.A.; Ferreira, M.M.C. 2013. Assessing the use of different chemometric techniques to discriminate low-fat and full-fat yogurts. *Food science and technology*, **50**: 210-214

Cruz, A.G.; Cavalcanti, R.N.; Guerreiro, L.M.R.; Sant'Ana, A.S.; Nogueira, L.C.; Oliveira, C.A.F.; Deliza, R.; Cunha, R.L.; Faria, J.A.F.; Bolini, H.M.A. 2013. Developing a prebiotic yogurt: Rheological, physic-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of food engineering*, **114**: 323-330.

Czeizel, A.E; Dudás, I. 1992. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation, *New Engl.J.Med*, **327**: 1832-1835.

Eichholzer, M; Tönz, O.; Zimmermann, R. 2006. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*, **367**: 1352-1361.

- Fathi, M.; Mozafari, M.R.; Mohebbi, M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems, Trends Food Sci. Tech, **23**: 13-27.
- Fundación Española de Nutrición, FEN (2011). Evaluación del consumo de alimentos enriquecidos/fortificados en España a través del Panel de Consumo Alimentario. URL:<<http://www.fen.org.es>>. [Consulta: 1 Septiembre. 2014]
- Ghedini, E.; Signoretto, M.; Pinna, F.; Crocellà, V.; Bertinetti, L.; Cerrato, G. 2010. Controlled release of metoprolol tartrate from nanoporous silica matrices, Micropor. Mesopor. Mat, **132**: 258-267.
- Hedrén, E.; Diaz, U.; Svanverg. 2002. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method. Eur.J.Clin:Nutr, **56**: 425-430.
- Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. División de estudios y postgrado. Tópico de nuevos materiales catalíticos [En línea] David Macías Ferrer. Materiales Mesoporosos MCM-41 y SBA-15, URL:<<http://www.slideshare.net/mtrodavidmaciasferrer/materiales-mesoporosos-sba15-y-mcm41>>. [Consulta: 10 Junio. 2014]
- Kim, Y.I. 2004. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies, Environ. Mol. Mutagen, **44**: 10-25.
- Lucock, M. 2000. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes, Mol.Genet.Metab.**71**: 121-138
- Lucock, M.; Yates, Z. 2009. Folic acid fortification: a double-edged sword, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, **12**: 555-564.
- McClemens, D.J.; Li, Y. 2010. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. Food Funct, **1**:32-59.
- Pérez-Esteve, E.; Fuentes, A.; Coll, C.; Acosta, C.; Bernardos, A.; Marcos, D.; Martínez-Máñez, R.; Barat, J.M. 2014. Modulation of folic acid bioaccessibility by encapsulation in pH-responsive gated mesoporous silica particles. Aceptado en MICROPORUS AND MESOPORUS MATERIALS.
- Poó-Prieto, R; Alonso-Aperte, E.; Varela-Moreiras, G. 2011. Analysis of folate from distribution in Spanish beer using combined affinity and ion-pair chromatography, J.I. Brewing, **117**: 188-194.
- Ramírez-Sucre, M.; Vélez-Ruiz, J.F; 2013. Physicochemical, rheological and stability characterization of a caramel flavored yogurt. Food science and technology, **51**: 233-241.
- Sendra, E.; Kuri, V.; Fernández-López, J.; Sayas-Barberá, E.; Navarro, C.; Pérez-Alvarez, J.A. 2010. Viscoelastic properties of orange fiber enriched yogurt as a function of fiber dose, size and thermal treatment. Food Science and technology **43**: 708-714.
- Suh, W.H.; Suslick, K.S.; Stucky, G.D.; Suh, Y.H. 2009. Nanotechnology, nanotoxicology and neuroscience, Prog.Neurobiol, **87**: 133-170.
- Tomiuk, S.; Liu, Y.; Green, T.J.; King, M.J.; Finglas, P.M.; Kitts, D.D. 2012. Studies on the retention of microencapsulated 1-5-methyltetrahydrofolic acid in baked bread using skim milk powder, Food Chem, **133**: 249-255.
- Vallet-Regí, M.; Doadrio, J.C.; Doadrio, A.L.; Izquierdo-Barba, I.; Pérez-Pariente, J. 2004. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin, Solid State Ionics, **172**: 435-439.
- Vélez-Ruiz, J.F.; Hernandez-Carranza, P.; Sosa-Morales, M. 2013 physicochemical and flow properties of low-fat yogurt fortified with calcium and fiber. Journal of Food Processing and Preservation, **37**: 210-221.
- Younis, I.R.; M.K Stamatakis, P.S.; Callery, P; Meyer-Stout, J. 2009. Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. Int.J.Pharm, **367**: 97-102.