



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

USO DE EMULSIONES SUSTITUTAS DE GRASA PARA EL DESARROLLO DE CREMAS DE RELLENO. EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE LAS GRASAS Y DE LA ESTRUCTURA TRAS LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: DESAMPARADOS EMBUENA CANDELA

TUTOR/A ACADEMICO: AMPARO QUILES CHULIÀ

COTUTOR/A: ISABEL HERNANDO HERNANDO

DIRECTORA EXPERIMENTAL: ANA SALVADOR ALCARAZ

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2016

USO DE EMULSIONES SUSTITUTAS DE GRASA PARA EL DESARROLLO DE CREMAS DE RELLENO. EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE LAS GRASAS Y DE LA ESTRUCTURA TRAS LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

Desamparados Embuena Candela, Amparo Quiles Chulià, Isabel Hernando Hernando y Ana Salvador Alcaraz.

RESUMEN

En una sociedad actual en la que el consumidor valora cada vez más los alimentos saludables y bajos en grasa, no cesa de crecer el interés por el diseño, formulación y desarrollo de alimentos capaces de aportar menos calorías al organismo. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar si la sustitución de la grasa original (aceite de girasol, mantequilla) empleada en la elaboración de cremas de relleno por emulsiones aceite/agua (O/W), elaboradas con distintos éteres de celulosa como emulsionantes, permite desarrollar cremas con grasa de menor digestibilidad y por lo tanto de menor aporte calórico. Para ello se ha estudiado la digestibilidad *in vitro* de la grasa tanto en las cremas originales como en las elaboradas con las emulsiones O/W. Además, se ha relacionado la digestibilidad de la grasa con la textura (*back extrusion*) y estructura (microscopía laser confocal de barrido (CLSM) y microscopía óptica (LM)) de las diferentes cremas. Los resultados mostraron que las cremas elaboradas con las emulsiones O/W fueron más consistentes y liberaron menos ácidos grasos tras la digestión *in vitro* que las cremas elaboradas con aceite o mantequilla. La estructura de los glóbulos de grasa se vio menos afectada por el proceso de digestión *in vitro* en las cremas elaboradas con las emulsiones O/W que en las cremas originales elaboradas con aceite o mantequilla. El uso de estas emulsiones O/W con éteres de celulosas, constituye una alternativa viable para sustituir la grasa original de las cremas de relleno y reducir su aporte calórico.

Palabras clave: celulosas, sustitutos de grasa, cremas, textura, microestructura, *in vitro*, digestibilidad.

RESUM

En una societat actual en la que el consumidor valora cada vegada més els aliments saludables i baixos en greix, no cessa de créixer l'interés pel disseny, formulació i desenvolupament d'aliments capaços d'aportar menys calories a l'organisme. Este treball té com a objectiu avaluar si la substitució del greix original (oli de gira-sol, mantega) empleada en l'elaboració de cremes de farcit per emulsions oli/aigua (O/W), elaborades amb distints èters de cel·lulosa com a emulsionants, permet desenvolupar cremes amb greix de menor digestibilitat i per tant de menor aportació calòrica. Per a això s'ha



estudiat la digestibilitat *in vitro* del greix tant en les cremes originals com en les elaborades amb les emulsions O/W. A més, s'ha relacionat la digestibilitat del greix amb la textura (*back extrusion*) i estructura (microscòpia làser confocal d'agranat (CLSM) i microscòpia òptica (LM)) de les diferents cremes. Els resultats van mostrar que les cremes elaborades amb l'emulsions O/W van ser més consistents i van alliberar menys àcids grassos després de la digestió *in vitro* que les cremes elaborades amb oli o mantega. L'estructura dels glòbuls de greix es va veure menys afectada pel procés de digestió *in vitro* en les cremes elaborades amb les emulsions O/W que en les cremes originals elaborades amb oli o mantega. L'ús d'estes emulsions O/W, elaborades amb èters de cel·luloses, constituïx una alternativa viable per a substituir el greix original de les cremes de farcit i reduir la seua aportació calòrica.

Paraules clau: cel·luloses, substituïts de greix, cremes, textura, microestructura, *in vitro*, digestibilitat.

ABSTRACT

In a contemporary society in which the consumer values increasingly healthy and low-fat foods, is growing interest in the design, formulation and development of food able to provide fewer calories to the body. This work aims to evaluate whether replacing the original fat (sunflower oil, butter), used in prepare filling creams, by oil/water emulsions (O/W), prepared with different cellulose ethers as emulsifiers, can develop creams with less digestible fat and lower caloric intake. For this purpose, it has been studied *in vitro* fat digestibility in the original creams and in the creams prepared with the O/W emulsions. Also, it has been associated the fat digestibility with texture (*back extrusion*) and structure (laser scanning confocal microscopy (CLSM) and light microscopy (LM)) of the different creams. The results showed the creams made with the O/W emulsion were more consistent and released less fatty acids after *in vitro* digestion that the creams made with oil or butter. The structure of the fat globules was less affected by the process of *in vitro* digestion in the creams made with O/W emulsions than the original creams made with oil or butter. Using these O/W emulsions, prepared with cellulose ethers is a viable replacement for the original fat of the filling creams and reduce their caloric intake.

Keywords: celluloses, fat replacers, creams, texture, microstructure, *in vitro*, digestibility.

INTRODUCCIÓN

La relación existente entre alimentación y salud es un hecho innegable, dado que la dieta es un factor determinante en la salud del individuo. Por tanto, el control de la dieta es la mejor prevención para un gran número de patologías (Vidal-García, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) recomiendan que el consumo de grasas sea menor al 30% de la ingesta de calorías totales y que de éstas menos de un 10% sean grasas saturadas (Dietary Guidelines for Americans, 2005). Además, la Unión Europea (UE), en su política de nutrición, sugiere que únicamente el 20-30% de la energía ingerida debe de ser proveniente de la grasa (O'Connor 1992), ya que existen evidencias de que una mayor ingesta de este componente está relacionada con enfermedades coronarias (LaRosa 1990), además de obesidad, cáncer y colesterol alto en sangre (Akoh 1998). Por todo ello, no cesa de crecer el interés por el diseño, formulación y desarrollo de alimentos con un menor contenido en grasa (Sudha et al., 2007) y/o capaces de aportar una menor proporción de grasa al organismo y, consecuentemente, de calorías. En este sentido, es importante el papel de la investigación para conseguir que las propiedades organolépticas de los nuevos alimentos diseñados o reformulados sean adecuadas y de elevada calidad.

Las cremas de relleno están constituidas generalmente a base de grasa y azúcar y son componentes importantes en diferentes alimentos de confitería a los que proporcionan sabor y textura (Miele et al., 2015). El azúcar es el principal ingrediente, siendo la sacarosa el más utilizado (Birkett, 2009). Éste actúa tanto como edulcorante como de agente de carga, y además afecta a algunas propiedades sensoriales como el dulzor y la dureza del producto final. El contenido en grasa de las cremas de relleno puede ser de hasta un 60% y tiene un gran efecto sobre sus propiedades sensoriales, reológicas y texturales (Manley, 2001). Las grasas más utilizadas son, generalmente, la mantequilla o la margarina (Miele et al., 2015). Con el fin de reducir el contenido de calorías, la grasa se puede reemplazar por un sistema que proporcione características de textura, sabor y palatabilidad apropiadas para la crema (Manley, 2001). La parte más compleja de la reformulación de un alimento para sustituir la grasa es conseguir que propiedades como la sensación en boca, la textura, el sabor y la lubricación sean equivalentes a las que se consiguen con los ingredientes tradicionales (Sudha et al., 2007).

Para reemplazar la grasa de los alimentos se pueden emplear emulsiones. Una emulsión es una mezcla homogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí. Uno actúa como fase dispersa y el otro se encuentra en suspensión en forma de pequeñas gotas o partículas. Los principales tipos de emulsiones son de aceite en agua (O/W) (ejemplos: leche o mayonesa) o de agua en aceite (W/O) (ejemplos: mantequilla o margarina), dependiendo estas de factores como el porcentaje de cada sustancia o el tipo de emulsionante. Aunque también hay formas más complejas como O/W/O o W/O/W.

Las emulsiones constan de tres partes, la fase continua, la fase dispersa y la interfase entre estos dos medios. En general, son sistemas termodinámicamente inestables que pueden sufrir una separación de fases a través de diversos factores (floculación, separación gravitacional, coalescencia y maduración de Ostwald) (Piorkowski y McClements, 2013). Sin embargo, es posible formar emulsiones cinéticamente más estables mediante la adición de un agente emulsionante y/o espesante antes de la homogenización (McClements, 1999).

Algunos hidratos de carbono tienen capacidad para ligar agua, son estabilizantes, espesantes y aportan una textura y una sensación agradable en boca que hace que puedan ser utilizados como sustitutos de la grasa. Estos se obtienen a partir de productos de origen vegetal y pueden ser digeribles y no digeribles. Los carbohidratos digeribles aportan 4 kcal/g, mientras que los no digeribles aportan menos calorías y son considerados como fibra dietética (Yáñez y Biolley, 1999).

La celulosa en distintas variantes puede ser utilizada como sustituta de grasa en diferentes grupos de alimentos. A partir de ésta y mediante diferentes procesos se obtienen derivados de la celulosa como la celulosa microcristalina o la celulosa en gel que se obtiene por despolimerización química y desintegración mecánica húmeda y la carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa que se obtienen por derivatización química (Akoh, 1998). Los derivados de la celulosa producen una red de gel que estabiliza espumas y emulsiones, modifica la textura, aumenta la viscosidad y aporta fibra dietética (Yáñez y Biolley, 1999).

La metilcelulosa (MC) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) son hidrocoloides obtenidos por eterificación de la celulosa. La MC posee sustituciones de tipo metoxilo mientras que la HPMC tiene distintas ratios de sustituciones hidroxipropilo y metoxilo (The Dow Chemical Co., 1996). Los éteres de celulosa tienen la capacidad de termogelificar reversiblemente y son solubles en agua fría. El mecanismo de gelificación se debe a la interacción hidrofóbica entre moléculas con grupos metoxilo. Los éteres de celulosa tienen numerosas aplicaciones a nivel de la industria alimentaria, como por ejemplo en salsas y aliños de ensalada, helados, sopas, recubrimientos comestibles (Zúñiga et al., 2012), tempuras para rebozados (Taberner, 2003) y reducción del contenido de grasa en productos de bollería y horneados (Tarancón, 2013; The Dow Chemical Co., 2014).

La forma más común de utilizar estos éteres de celulosa es mediante su incorporación a una emulsión, gracias a su papel emulsionante.

En el diseño de emulsiones alimentarias para combatir enfermedades relacionadas con la obesidad es importante conocer cómo se digieren a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI). En los humanos, la digestión de las grasas se inicia en el estómago, con la presencia de la lipasa gástrica. No obstante, es en el intestino donde se realiza la mayor parte de la digestión de los lípidos, del 70% al 90%, debido a la lipasa pancreática (Mun, et al., 2007). La lipasa actúa rompiendo los enlaces entre los ácidos grasos (AG) que se encuentran esterificados a la molécula de glicerina, liberando así dos AG, y quedando el tercero unido al glicerol, formando un monoglicérido. Para que la



lipasa pancreática pueda catalizar la digestión de los lípidos, ésta se debe adsorber a la superficie de los glóbulos grasos con el fin de encontrarse en proximidad suficiente a los lípidos. Es por ello que la interfase entre los glóbulos grasos y el medio acuoso tiene un papel determinante a la hora de la digestión de las grasas, pudiendo hacer que se realice en mayor o en menor grado. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Mun et al. (2006) en el que se utilizó una emulsión de aceite en agua con lecitina como emulsionante, se comprobó que cuando los glóbulos se recubrían con quitosano, la digestión de los lípidos era claramente inferior.

A consecuencia de todo lo expuesto anteriormente, hay un interés creciente en el mundo científico por entender y controlar el nivel en que los lípidos presentes en los alimentos se pueden digerir (Li et al., 2011). En ocasiones, puede ser interesante potenciar el grado en que se digieren los TG, para favorecer la liberación de ácidos grasos beneficiosos, o compuestos lipofílicos de interés para el cuerpo humano (Qiu et al., 2015), pero en otros casos, es más conveniente conseguir una digestión menor de los TG, con el fin de reducir el aporte calórico de los alimentos, entre otras cosas para combatir enfermedades relacionadas con la obesidad y el sobrepeso, o como reclamo para el consumidor interesado en la pérdida o mantenimiento del peso. Además, Estudios recientes muestran que las emulsiones que se mantienen estables en el estómago y/o que tienen una digestión retardada en el intestino delgado pueden estimular la liberación de hormonas intestinales que inducen saciedad y de esta forma reducir la ingesta de alimentos (Seimon et al., 2009).

En este sentido, una buena línea de investigación para luchar contra la obesidad y todas las enfermedades relacionadas podría ser la incorporación de emulsiones a los alimentos tradicionales que reemplacen la grasa original y que contengan una proporción de grasa media para modificar lo mínimo posible las propiedades fisicoquímicas y sensoriales. Una condición importante sería que dichas emulsiones fueran de digestibilidad reducida; es decir, que pasaran por el TGI siendo menos digeridas que las emulsiones y grasas habitualmente utilizadas en la formulación de los alimentos.

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar si la sustitución de la grasa original empleada en la elaboración de cremas de relleno por emulsiones O/W, elaboradas con distintos éteres de celulosa como emulsionantes, permite desarrollar cremas con grasa de menor digestibilidad y por lo tanto de menor aporte calórico. Para ello se ha estudiado la digestibilidad de la grasa tanto en las cremas originales como en las elaboradas con emulsiones aceite/agua. Además, se ha relacionado la digestibilidad de la grasa con la textura y estructura de las diferentes cremas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la emulsión

Se comenzó con la preparación de la emulsión sustituta de la grasa. Para ello se mezcló aceite vegetal (girasol), agua y un éter de celulosa. Se utilizaron dos tipos de éteres de celulosa con diferente capacidad de termogelificación: una hidroxipropilmetilcelulosa (K4M) y una metilcelulosa (A4M) suministrados por The Dow Chemical Co. En la tabla 1 se muestran las composiciones centesimales de las emulsiones.

TABLA 1. Formulación centesimal de las emulsiones.

Aceite (%)	47
Agua (%)	51
Éter de celulosa (%)	2

En la tabla 2 se presentan los niveles de sustitución metoxilo e hidroxipropilo para cada tipo de éter de celulosa. Todos ellos poseen la misma viscosidad (4.000 mPa.s-1, en solución acuosa al 2% a 20°C medido por The Dow Chemical Company siguiendo los métodos de referencia ASTM D1347 y ASTM D2363).

TABLA 2. Grado de metil e hidroxipropil sustitución en los éteres de celulosa utilizados.

Nombre comercial	Tipo de celulosa	% grupos metoxilo	% grupos hidroxipropilo
A4M	metilcelulosa	30.0	0.0
K4M	hidroxipropilmetilcelulosa	22,5	7,7

El aceite vegetal utilizado fue un aceite refinado de girasol con alto contenido en ácido oleico (65%) (KoipeSol, Carrefour, Madrid, España). El equipo instrumental utilizado consistió en un agitador (Heidolph RZR 1, Schwabach, Alemania) y un homogeneizador (Ultra Turrax, IKA, T18-ba ic, Staufen, Alemania).

La preparación de la emulsión se realizó según el protocolo desarrollado en el laboratorio del IATA-CSIC. El éter de celulosa se dispersó en el aceite con la agitación más suave posible durante 5 min, a continuación, se añadió agua fría (10°C) y se procedió finalmente a realizar la emulsión con un homogeneizador Ultra Turrax: 1 min a 6500rpm, 1 min a 13500rpm y 1 min a 17500rpm.

Elaboración de la crema

Los ingredientes utilizados para la elaboración de las diferentes formulaciones de cremas se muestran en la tabla 3. Se elaboraron 2 tipos de cremas control y 2 tipos de cremas estudio. La grasa utilizada para la elaboración de una de las cremas control fue mantequilla (Puleva sin sal, 82% materia grasa, Vitaminas A+D, Hipercor, Madrid, España), mientras que para la elaboración de la otra crema control se utilizó aceite vegetal de girasol (KoipeSol, Carrefour, Madrid, España). Para las muestras restantes se utilizó la emulsión elaborada con los distintos éteres de celulosa como sustituto de la grasa. El resto de ingredientes utilizados fue común en todas las formulaciones.

TABLA 3. Formulación de las cremas.

INGREDIENTES	CANTIDAD (g)		
	Control Mantequilla	Control Aceite	K4M, A4M
Azúcar	20	20	20
Leche en polvo	8	8	8
Almidón	16	16	9
Agua	262	262	163
Emulsión	-	-	200
Mantequilla	94	-	-
Aceite	-	94	-

La preparación de la crema se realizó en una Thermomix modelo TM31 (Thermomix, Vorwerk, Wuppertal, Alemania) y se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, se mezclaron todos los ingredientes, a excepción de la grasa (emulsión, mantequilla o aceite, según el caso), a velocidad 2 durante 6 minutos a 90°C y, a continuación, se dejó enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente. En la segunda etapa se añadió la grasa y se mezcló a velocidad 2 durante 5 minutos. Una vez realizada la crema, ésta se almacenó en nevera a 5°C. Todos los análisis se realizaron a las 24 horas de la elaboración de las cremas.

Digestibilidad de las grasas. Ácidos grasos libres y grasa total liberada tras la digestión *in vitro*.

Para evaluar la digestibilidad de las grasas de las cremas se realizó un procedimiento de digestión *in vitro* establecido por el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y se determinaron los ácidos grasos libres y la grasa total liberada tras el proceso de digestión *in vitro*.

El proceso de simulación *in vitro* de las condiciones de digestión se separó en tres fases principales: etapa oral, etapa gástrica y etapa intestinal. Para ello se prepararon los distintos fluidos necesarios para la digestión *in vitro*.

La preparación de la saliva se llevó a cabo según el método propuesto por Mishellany-Dutour et al., (2011) con algunas modificaciones, empleando un ratio saliva:muestra=1:50. El fluido salival simulado contenía mucina (M2378, Sigma®) y α -amilasa (A3176, Sigma®). Ésta se mezcló con la muestra agitando durante 5 s.

A continuación, se añadió el fluido gástrico preparado según el estudio de Sanz et al. (2007) con modificaciones. Éste contenía pepsina de mucosa gástrica de cerdo (P7000, Sigma®), siguiendo un ratio 1:250 (enzima:sustrato) (Zhang y Vardhanabhuti, 2014). Después, se ajustó a pH 2 con HCl 6N (Scharlau®) y se dejó en agitación durante 1h a 37°C.

Para la realización de la fase intestinal se siguió el protocolo propuesto por el estudio de Sanz et al. (2007), López-Pena y McClements., (2015) y Qiu et al. (2015) con algunas modificaciones. Se añadieron sales biliares (B8631, Sigma®) (46,84 mg/mL) y una disolución de electrolitos. A continuación se ajustó a pH 7 con una solución de amonio 25% (Scharlau®) y se añadió pancreatina (P1750, Sigma®) (ratio 1:14 (enzima:sustrato)). A continuación, se dejó en baño con agitación 2h a 37°C.

Tras la etapa intestinal, se determinó la influencia que las celulosas, ubicadas en la interfase de los glóbulos grasos, tienen sobre la biodisponibilidad de la grasa en la crema. Para ello, se cuantificaron los ácidos grasos libres que no han sido digeridos durante la digestión simulada. Cada tipo de emulsionante estudiado tiene diferente efecto en la capacidad de la lipasa pancreática, por lo que esta presenta distintos grados de accesibilidad a las gotas de grasa de la emulsión, consiguiendo en mayor o menor grado unirse a su superficie e hidrolizar los triglicéridos. El protocolo a seguir fue añadir a la muestra resultante tras la digestión completa (etapa oral, gástrica e intestinal) 15mL de etanol 96% v/v (Scharlau®) y centrifugar 10min a 1000rpm con una temperatura de 10°C consiguiendo así separar la fase grasa, que queda suspendida en el sobrenadante. Este sobrenadante se recogió y se valoró mediante una volumetría con hidróxido de sodio 0,05M (Panreac®), empleando fenolftaleína como indicador. Con el resultado de esta valoración, se determinaron los gramos de ácido oleico por gramo de aceite presente en la crema utilizando la recta patrón obtenida empleando ácido oleico a las concentraciones 0, 50, 100, 150, 200 y 250mM.

Para la determinación de grasa total liberada tras el proceso de digestión *in vitro* también se centrifugó la muestra a 10.000 rpm a 10°C durante 10 minutos, a continuación, se recogió el sobrenadante en un matraz (previamente pesado vacío) y se pesó, obteniendo el peso del sobrenadante. Este sobrenadante se llevó a ebullición en un baño a 100°C y a estufa de secado a una temperatura de 100°C durante 30 minutos con la finalidad de eliminar totalmente los restos de etanol y agua. Finalmente, se decantaron las muestras, ya que habían sido sometidas al proceso digestivo y contenían restos de bilis, pancreatina y otras sustancias que pueden actuar como interferentes en el cálculo de la grasa. El aceite decantado se recogió y se pesó.



Textura

Con el fin de estudiar la consistencia de las cremas y evaluar los efectos de las diferentes etapas de la digestión (oral y gástrica) sobre la textura del producto, se utilizó un texturómetro TA.XT.plus (Stable Microsystems, Godalming, UK) asociado al software Texture exponent (versión 2.0.7.0). Al texturómetro se le acopló la sonda *Back extrusión Rig (A/BE)*, compuesta por una cubeta de 5 cm de diámetro y 7,5 cm de altura, y una sonda de compresión de 4,5 cm de diámetro. El ensayo de extrusión inversa consistió en hacer avanzar el embolo circular de base plana a una velocidad constante de 1 mm/s hasta una distancia de 15 mm extruyendo el producto hacia arriba y alrededor del borde del disco.

La medida de la capacidad de extrusión se realizó utilizando para cada una de las medidas 50g de muestra que se introdujeron en la cubeta, correspondiéndose con un llenado de 4cm respecto a la base del recipiente.

Cuando la muestra se haya en la cubeta es importante homogeneizarla para que no queden burbujas de aire que queden registradas en la gráfica, produciendo una distorsión de los resultados; pero esto debe hacerse con especial cuidado para no modificar la textura de la muestra. Seguidamente se acercó el émbolo a la muestra con los comandos que encontramos en el aparato, sin llegar a tocarla, y se comenzó el análisis.

Para cada una de las muestras analizadas se obtuvieron unas curvas de fuerza-distancia y se calculó el área bajo la curva como índice de la consistencia de la muestra.

Para llevar a cabo estos ensayos, fue necesaria una previa digestión de las cremas realizada según el protocolo desarrollado. La crema se midió directamente, mientras que el ensayo oral se realizó tras pesar 50 g de la muestra, añadirle 1mL de saliva artificial y remover durante 5s con una varilla de vidrio. Para la etapa gástrica, además de seguir el protocolo anterior, se añadieron 16 mL de fluido gástrico simulado, se ajustó a pH 2 con HCL 6N (Scharlau®) y se introdujo en un baño con agitación a 37°C durante 1h.

Para comprobar el efecto de la enzima, también se prepararon diluciones de las distintas etapas digestivas sustituyendo el fluido simulado correspondiente por agua destilada, sin necesidad de ajustar el pH.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Microscopia

MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL DE BARRIDO (CLSM)

Las observaciones por Microscopía láser confocal de barrido (CLSM) de las diferentes muestras se realizaron mediante un microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado a un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E (Nikon, Tokio, Japón).

El láser empleado para excitar los agentes de tinción fluorescentes, fue el láser Ar-Kr ($\lambda_{\text{ex máx}}$ 488 nm). Para visualizar las muestras se utilizaron dos lentes objetivas diferentes: 40x/1.0/Oil DIC H/Plan Apo Nikon y 60x/1.40/Oil

Plan Apo VC Nikon, ambas con aceite de inmersión. Las imágenes se obtuvieron y almacenaron con una resolución de 1024x1024 píxeles utilizando el software del microscopio (EZ-C1 v.3.40, Nikon, Tokyo, Japan).

Las tinciones empleadas fueron Nile Red (0.1 g/L en polietilenglicol (PEG) 200) y Rodamina B (2 g/L en agua destilada). El Nile Red (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) tiene una $\lambda_{ex\ máx}$ de 488 nm y una $\lambda_{em\ máx}$ de 515/530 nm y se utiliza como agente de tinción para la grasa. La Rodamina B (Fluka, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) tiene una $\lambda_{ex\ máx}$ 488 nm y una $\lambda_{em\ máx}$ de 580 nm. Este fluorocromo se utiliza para teñir proteínas y carbohidratos.

Para observar y estudiar las diferentes cremas en sus distintos estados de digestión, se colocó una pequeña cantidad de muestra sobre un portaobjetos, se le añadió 20 μ L de disolución de Nile Red y se dejó reposar durante 10 min. En segundo lugar, se realizó el mismo procedimiento con la Rodamina B y se cubrió con un cubreobjetos de vidrio.

MICROSCOPIA ÓPTICA (LM)

Para el estudio de la microestructura de las diferentes cremas se utilizó un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 (Nikon Eclipse 80i, Nikon Co., Ltd., Tokyo, Japan). Como agente de tinción se usó azul de toluidina (1 g/L). Se tomó una pequeña cantidad de muestra y se colocó en un portaobjetos de vidrio, se tiñó con el agente de tinción, se cubrió con un cubreobjetos de vidrio y se visualizaron las diferentes muestras a 4x y 10x aumentos (lentes objetivas 4x/0.13 Plan Fluor Nikon y 10x/0.45 DIC N1 Plan Apo Nikon, respectivamente). Las imágenes fueron capturadas y almacenadas en formato 1280 x 1024 píxeles usando el software del microscopio (NIS-Elements F, Version 4.0, Nikon, Tokyo, Japan).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa XLStat 2016 y se realizó un análisis de la varianza de un factor para evaluar los cambios de estructura que se producen en las cremas cuando se utilizan las distintas celulosas o las grasas convencionales. Para determinar las diferencias entre las muestras se utilizó el test de Tukey a un nivel de significación del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ácidos grasos libres y grasa total

En la tabla 4 se muestra la cantidad de ácido oleico liberado para las distintas cremas estudiadas expresado como g oleico/g aceite obtenidas a partir de la valoración del sobrenadante resultante tras la digestión completa y la centrifugación.

TABLA 4. Cantidades de ácido oleico liberado por gramo de aceite según el tipo de crema. A4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante emulsión preparada con metilcelulosa A4M como emulgente. K4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante una emulsión preparada con hidroxipropilmetilcelulosa K4M como emulgente.

Crema	g oleico/g aceite
Aceite	0,158±0,007 ^a
Mantequilla	0,187±0,003 ^b
A4M	0,127 ±0,004 ^c
K4M	0,129±0,006 ^c

Valores expresados en gramos (M±SD).

^{abc} Letras diferentes para cada tipo de crema indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la tabla 4, existieron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la cantidad de ácidos grasos liberados (AGL) de las distintas cremas. Las cantidades mínimas de g oleico/g aceite liberadas correspondieron a las cremas elaboradas con emulsiones preparadas con celulosas, mientras que en las cremas elaboradas con mantequilla y aceite se observaron mayores valores de AGL, siendo mayores en las cremas elaboradas con mantequilla. Esto puede deberse a que las celulosas empleadas como emulsionantes dificultan la acción de la lipasa pancreática, obstaculizando su accesibilidad a la grasa que constituye la emulsión. Este efecto ayudaría a reducir la cantidad de grasa asimilada por el organismo.

Para complementar los resultados obtenidos en los análisis de AGL, también se determinó la grasa total liberada tras la digestión *in vitro*. Los resultados se muestran en la tabla 5, donde se puede observar que la cantidad de grasa total liberada tras la digestión *in vitro* fue significativamente menor ($P < 0,05$) en las cremas elaboradas con emulsiones de celulosa que en las elaboradas con aceite. Lo que corroboró los resultados obtenidos en la determinación de AGL. En las cremas elaboradas con mantequilla no se pudo determinar la grasa total liberada, porque el método empleado en esta determinación favoreció la solidificación de la grasa.

TABLA 5. Grasa total liberada tras la digestión de las diferentes cremas estudiadas. A4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante emulsión preparada con metilcelulosa A4M como emulgente. K4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante una emulsión preparada con hidroxipropilmetilcelulosa K4M como emulgente.

Crema	Grasa total
Aceite	1,051 ± 0,031 ^a
Mantequilla	-
A4M	0,516 ± 0,016 ^b
K4M	0,722 ± 0.026 ^c

Valores expresados en gramos (M±SD).

^{abcd} Letras diferentes para cada tipo de crema indican diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Textura

La figura 1 muestra las curvas de textura correspondientes a las diferentes cremas estudiadas elaboradas con diferentes grasas (aceite, mantequilla, emulsión con A4M y emulsión con K4M) antes y tras las fases de digestión oral y gástrica *in vitro* y sus correspondientes diluciones.

Se puede observar cómo todas las cremas tuvieron un comportamiento similar, siendo las muestras no digeridas las que mayor consistencia presentaron. En cada una de las etapas digestivas las cremas tuvieron un comportamiento muy diferenciado, siendo en la etapa gástrica *in vitro* donde en general, presentaron una mayor fluidez y menor resistencia a la extrusión. Además, también se observó cómo la crema elaborada con la metilcelulosa A4M presentó en todas las etapas de la digestión *in vitro* mayor consistencia que las demás cremas estudiadas.

Para determinar si la diferencia de consistencia de las cremas, tras las etapas de digestión *in vitro*, se debe a la acción de las condiciones del proceso o al efecto de la dilución, se repitieron los ensayos con las muestras diluidas con agua en la misma cantidad que los fluidos digestivos de las etapas de digestión oral y gástrica *in vitro*.

Para todas las cremas estudiadas, se encontró menores valores de consistencia en las muestras sometidas a digestión oral *in vitro* que en las sometidas a dilución, ya que la enzima α -amilasa actúa sobre el almidón hidrolizándolo y provocando con ello la consecuente pérdida de consistencia (Sanz et al., 2007). En el caso de la etapa gástrica *in vitro* se observó cómo las curvas de las muestras de dilución presentaron la misma consistencia que las respectivas curvas obtenidas tras la adición de pepsina en cada crema, por lo que, estos resultados indicaron que el cambio de textura en esta etapa se debe únicamente al aumento de volumen por efecto de dilución y no a las condiciones de la etapa digestiva gástrica *in vitro*, como el pH y las enzimas propias.

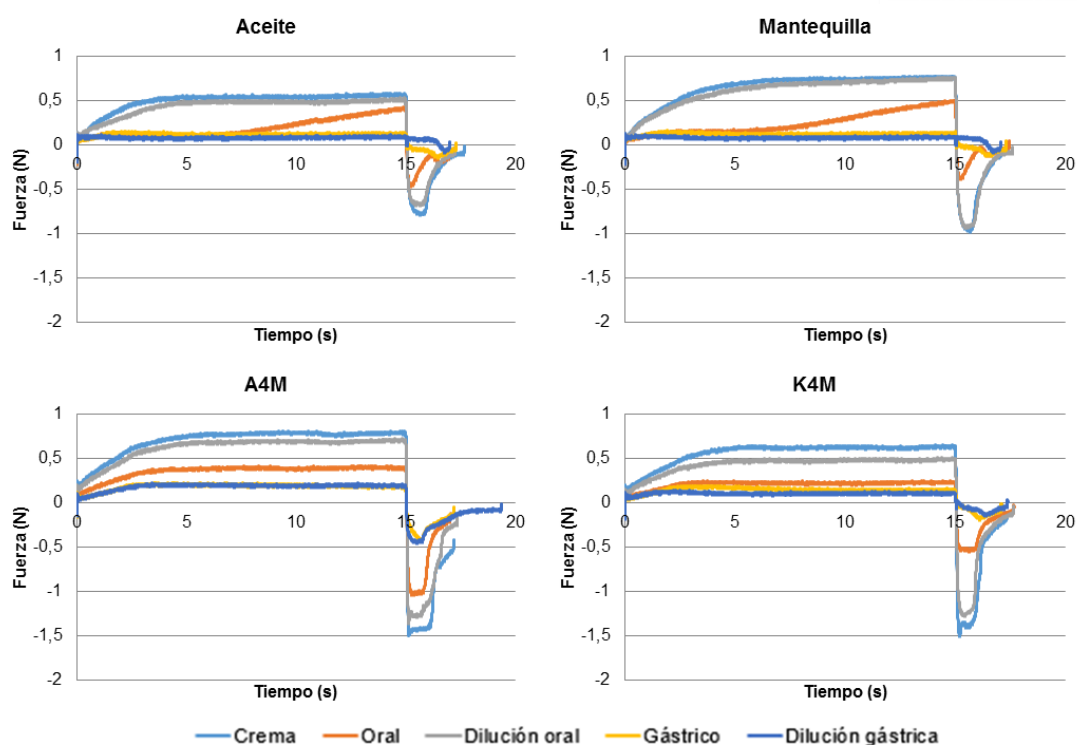


FIGURA 1. Perfiles de extrusión inversa de las diferentes cremas antes y tras las fases de digestión oral y gástrica *in vitro* y sus correspondientes diluciones. Aceite: crema elaborada con 23,5% aceite de girasol. Mantequilla: crema elaborada con un 23,5% de mantequilla. A4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante emulsión preparada con metilcelulosa A4M como emulgente. K4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante una emulsión preparada con hidroxipropilmetilcelulosa K4M como emulgente.

Con el fin de saber si estas diferencias de consistencia fueron estadísticamente significativas, se calculó el área bajo la curva (N*s) para cada caso estudiado. La tabla 6 muestra los valores de área bajo la curva (N*s) obtenidos por el ensayo de extrusión antes y tras las fases de digestión oral y gástrica *in vitro* y sus correspondientes diluciones para cada una de las cremas estudiadas.

En la tabla 6 se observa cómo la consistencia es significativamente diferente ($P < 0,05$) para cada una de las cremas, siendo la crema elaborada con la emulsión preparada con la metilcelulosa A4M la que mayor resistencia presentó a la extrusión. La crema elaborada con aceite de girasol fue la que menor consistencia presentó, debido posiblemente a que no posee ácidos grasos saturados ni una red de celulosas que estabilicen la matriz proporcionándole consistencia. Al comparar las cremas elaboradas con las celulosas entre sí, se observó cómo la crema elaborada con la metilcelulosa A4M presentó mayor consistencia que la crema elaborada con la hidroxipropilmetilcelulosa K4M, lo que probablemente se debió a que las emulsiones elaboradas con la metilcelulosa tienen una consistencia firme, mientras que la elaboradas con

hidroxipropilmetilcelulosas tienen una consistencia más suave (The Dow Chemical Company, 2002).

TABLA 6. Valores de área bajo la curva obtenidos por el ensayo de extrusión inversa de las diferentes cremas antes y tras las fases de digestión oral y gástrica *in vitro* y sus correspondientes diluciones (Aceite: crema elaborada con 23,5% aceite de girasol. Mantequilla: crema elaborada con un 23,5% de mantequilla. A4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante emulsión preparada con metilcelulosa A4M como emulgente. K4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante una emulsión preparada con hidroxipropilmetilcelulosa K4M como emulgente).

	Etapas	Área
Aceite	Crema	7,291±0,053 ^{aA}
	Oral	3,471±0,568 ^{bA}
	Dilución oral	6,634±0,066 ^{aA}
	Gástrico	1,841±0,121 ^{cA}
	Dilución gástrica	1,307±0,007 ^{cA}
Mantequilla	Crema	9,789±0,409 ^{aB}
	Oral	3,535±0,235 ^{bA}
	Dilución oral	9,187±0,074 ^{cB}
	Gástrico	1,902±0,119 ^{dA}
	Dilución gástrica	1,374±0,060 ^{dAB}
A4M	Crema	10,573±0,080 ^{aC}
	Oral	5,558±0,204 ^{bB}
	Dilución oral	8,961±0,627 ^{cB}
	Gástrico	2,578±0,348 ^{dB}
	Dilución gástrica	2,661±0,208 ^{dC}
K4M	Crema	8,594±0,113 ^{aD}
	Oral	3,171±0,376 ^{bAC}
	Dilución oral	6,878±0,411 ^{cA}
	Gástrico	2,197±0,144 ^{dAB}
	Dilución gástrica	1,553±0,108 ^{dB}

Valores expresados en N*s (M±SD).

abcd Letras minúsculas distintas muestran diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$) entre etapas de la digestión para una crema en concreto.

ABCD Letras mayúsculas distintas muestran diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$) entre cremas para una etapa de la digestión en concreto.

Todas las cremas estudiadas, siguieron la misma tendencia ya que la consistencia de éstas resultó significativamente diferente ($P < 0,05$) para cada etapa de la digestión *in vitro*. En el caso de la etapa oral, las muestras a las que se sometieron a la acción de las enzimas (mucina y α -amilasa) tuvieron una consistencia significativamente menor ($P < 0,05$) que las muestras a las que no se les introdujo las enzimas (dilución oral), lo que probablemente se deba a la acción de la α -amilasa, como ya se ha explicado anteriormente. Sin embargo, en la etapa gástrica, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las muestras sometidas a las condiciones de pH y actividad enzimática (pepsina) y las muestras dilución gástrica tal y como se apreciaba en los perfiles de textura.

En las etapas de la digestión *in vitro* oral y gástrico, se puede observar cómo las cremas elaboradas con la metilcelulosa A4M tuvieron una mayor consistencia que las demás cremas estudiadas en las mismas etapas de la digestión. En la digestión oral, se observó una menor consistencia en las cremas elaboradas con la hidroxipropilmetilcelulosa K4M, lo que contrasta con los altos valores de las cremas elaboradas con la metilcelulosa A4M, siendo ambas significativamente diferentes ($P < 0,05$). En la etapa gástrica *in vitro*, la consistencia de las cremas elaboradas con A4M fue significativamente superior ($P < 0,05$) a la de las cremas elaboradas con mantequilla y aceite. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las cremas elaboradas con ambas celulosas. Lo que podría indicar una resistencia de la estructura de las emulsiones O/W a las etapas digestivas *in vitro*.

Microscopia

En la figura 2 se pueden observar las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM) de las diferentes cremas, en las distintas etapas de la digestión. Con esta técnica, se puede conocer la distribución de los ingredientes en la crema y su grado de homogeneización, así como el estado de sus diferentes componentes macroscópicos al final de cada etapa de la digestión, especialmente de la grasa. Al tratar la muestra con los agentes de tinción Rhodamine B y Nile Red, se observan las proteínas y los hidratos de carbono en rojo y la grasa en verde.

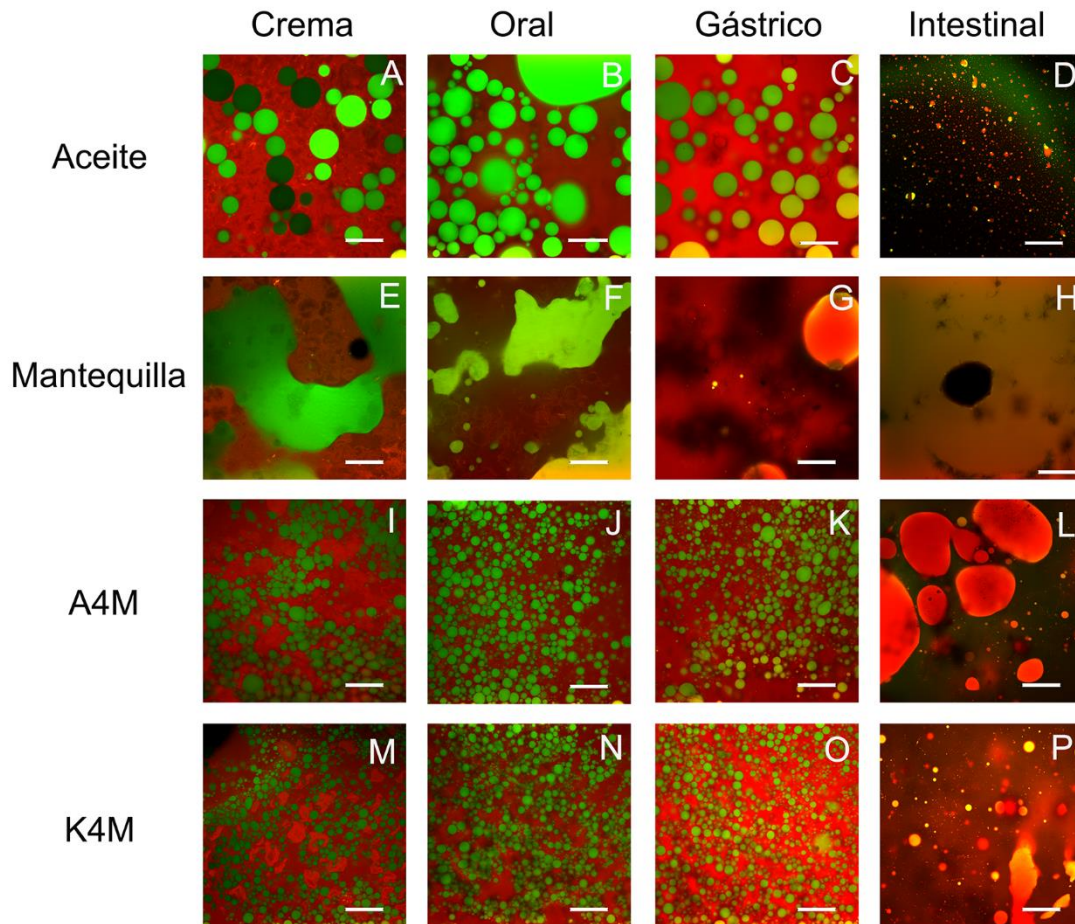


FIGURA 2. Imágenes tomadas con microscopio confocal laser de barrido (CLSM) de las cremas aceite, mantequilla, A4M y K4M, antes y durante la digestión *in vitro* al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal. Barra blanca correspondiente a 60 μm . Aceite: crema elaborada con 23,5% aceite de girasol. Mantequilla: crema elaborada con un 23,5% de mantequilla. A4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante emulsión preparada con metilcelulosa A4M como emulgente. K4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante una emulsión preparada con hidroxipropilmetilcelulosa K4M como emulgente.

Como se observa en la figura 2A, la crema control elaborada con un 23,5% de aceite vegetal presenta una matriz continua rojo-naranja formada principalmente por almidón, proteína de la leche y carbohidratos, los glóbulos de grasa, en verde, se distribuyen de manera irregular con forma redondeada y de tamaño no uniforme. Por su parte, la grasa presente en la crema elaborada con mantequilla (figura 2E) no posee estructura globular, sino que se encuentra en forma de gotas de tamaños muy diferentes sin estructura definida. Los procesos digestivos oral y gástrico afectaron de mayor forma a las cremas elaboradas con aceite y mantequilla (figuras 2B, 2C, 2F y 2G)



observándose fenómenos de coalescencia especialmente en la etapa oral en la crema elaborada con aceite (figura 2B). En el caso de la crema elaborada con mantequilla, se observa cómo en la etapa gástrica (figura 2G), la grasa ya está parcialmente atacada por los enzimas. Lo que puede deberse a que la grasa, al estar más dispersa y sin estructura, está más disponible de ser atacada por los enzimas. Pero no es hasta la etapa intestinal (figuras 2D y 2H) donde la grasa está completamente digerida por la acción de la lipasa pancreática, principalmente.

En las cremas elaboradas con celulosas (figuras 2I y 2M), sin embargo, se observan unos glóbulos de grasa mucho más homogéneos en tamaño y forma, siendo éstos pequeños y de estructura redondeada sin apenas diferencias entre la crema elaborada con una metilcelulosa (A4M) (figura 2I) y una hidroxipropilmetilcelulosa (K4M) (figura 2M). Probablemente, esto se deba a que los glóbulos se estabilizaron debido a la formación de una red de celulosa hidratada presente en la fase acuosa que inmoviliza los glóbulos de grasa de la fase dispersa (Li et al., 2003), lo que pudo prevenir fenómenos de floculación y coalescencia debido a una menor movilidad de los glóbulos dentro de la matriz (Aranberri et al., 2006; Piorkowski y McClements, 2013). En estos casos, las etapas oral y gástrica (figuras 2J, 2K, 2N y 2O) no afectaron de manera sustancial a la microestructura de las cremas, ya que las celulosas se sitúan en la interfase protegiendo a la grasa de ser atacada por los enzimas. Es en la etapa gástrica, sin embargo, donde se observan fenómenos de floculación y coalescencia en la crema elaborada con la celulosa A4M (figura 2K). En la etapa intestinal (figuras 2L y 2P), las dos cremas difieren en su comportamiento, ya que la que posee la metilcelulosa (A4M) en su formulación, está menos digerida. Como puede observarse en la figura 2L, la superficie de los glóbulos de grasa, que todavía mantienen su forma redondeada, está cubierta de enzimas, aunque no están tan atacados como en el caso de la crema elaborada con la celulosa K4M (figura 2P).

En la figura 3 se observan las diferentes cremas estudiadas en los distintos estados de digestión *in vitro* por microscopía óptica. En todas las micrografías se observan zonas con tonos azules que corresponden con residuos ácidos de proteínas.

La figura 3, apoya lo anteriormente visto en las micrografías obtenidas por CLSM. En el caso del aceite (figura 3A) podemos observar cómo los glóbulos de grasa son de tamaño poco uniforme y que éstos aumentan de tamaño en la fase oral (figura 3B) debido a fenómenos de coalescencia. En la etapa gástrica (figura 3C) los glóbulos son más homogéneos hasta que son atacados por la lipasa pancreática en la fase intestinal (figura 3D).

En la crema elaborada con mantequilla (figura 3E) se siguen observado formaciones de grasa poco estructuradas que comienzan a ser atacadas en la fase oral (figura 3F) hasta ser completamente digeridas en la fase intestinal por la acción de la lipasa pancreática (figura 3H).

En las emulsiones elaboradas con emulsiones de celulosas (figuras 3I y 3M) se observa cómo los glóbulos de grasa se encuentran perfectamente homogeneizados con un tamaño y una distribución uniformes. En estos casos, las etapas oral y gástrica (figuras 3J, 3K, 3N y 3O) no afectan demasiado a la

grasa, que se ve atacada por los enzimas en la fase intestinal (figuras 3L y 3P), siendo el caso de la crema elaborada con la celulosa A4M la que menos se digiere (figura 3L).

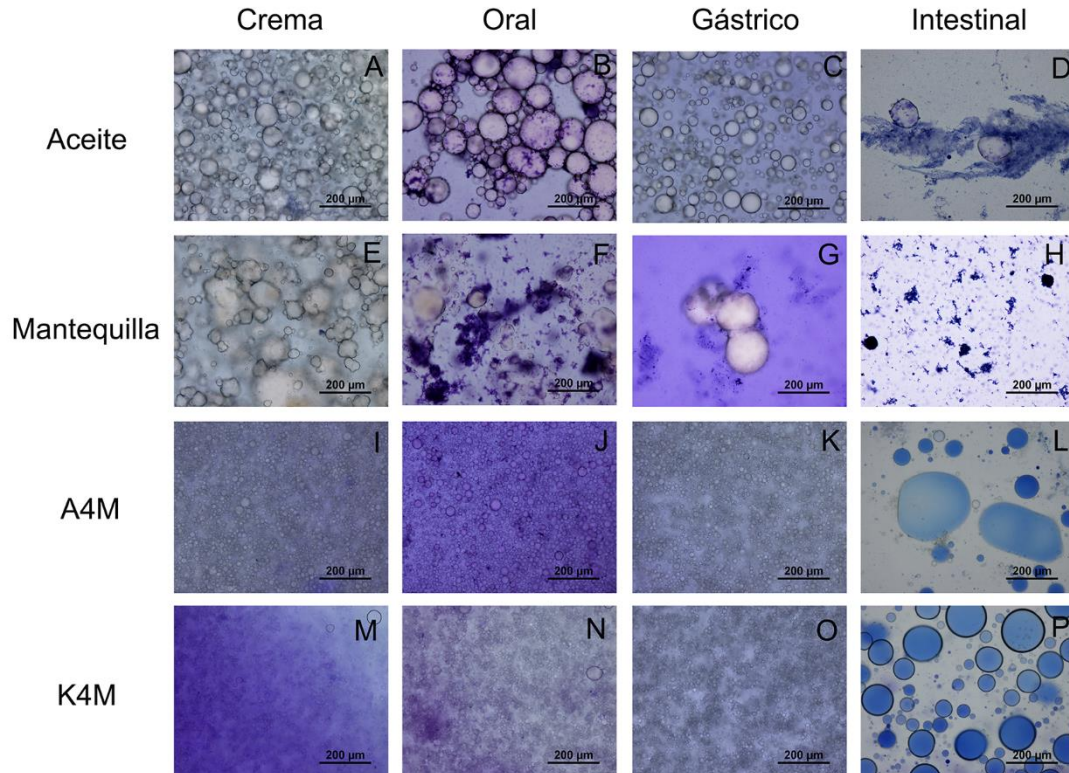


FIGURA 3. Imágenes tomadas con microscopio óptico (LM) de las cremas aceite, mantequilla, A4M y K4M, antes y durante la digestión *in vitro* al finalizar las fases oral, gástrica e intestinal. Barra blanca correspondiente a 60 μm . Aceite: crema elaborada con 23,5% aceite de girasol. Mantequilla: crema elaborada con un 23,5% de mantequilla. A4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante emulsión preparada con metilcelulosa A4M como emulgente. K4M: crema elaborada con un 23,5% de aceite incorporado mediante una emulsión preparada con hidroxipropilmetilcelulosa K4M como emulgente.

CONCLUSIONES

Las cremas elaboradas con las emulsiones O/W, con éteres de celulosas como emulgentes, presentan menor digestibilidad *in vitro* de la grasa que las cremas originales elaboradas con aceite o mantequilla. Las cremas elaboradas con la metilcelulosa A4M como emulgente tienen menor digestibilidad y mayor consistencia, antes y tras las diferentes etapas (oral y gástrica) de digestión *in vitro*, que las elaboradas con la hidroxipropilmetilcelulosa K4M, aceite y mantequilla. Las cremas elaboradas con las emulsiones O/W, con éteres de celulosas como emulgentes,

mantienen parte de la grasa estructurada tras la etapa intestinal *in vitro*. Este efecto se aprecia en mayor medida en la crema A4M que en la K4M. En general, el uso de estas emulsiones O/W, elaboradas con éteres de celulosas, podría constituir una alternativa viable para sustituir la grasa original de las cremas de relleno y reducir su aporte calórico. La investigación en este sentido sería de interés para el avance de una industria de alimentos enfocada el desarrollo de alimentos saludables.

REFERENCIAS

- Akoh C.C. (1998). Fat replacers. *Food Technology* 52, 3, 47-53.
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3).
- Birkett, J., & Talbot, G. (2009). Fat-based centres and fillings. Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products. Ed. Talbot G., WP & CRC Press, Cambridge, UK, 101-122.
- Dietary Guidelines for Americans, 2005. Basis for Federal food and nutrition education programs [en línea]. Department of Health and Human Services (HHS) and the Department of Agriculture (USDA). Dirección URL: <<https://health.gov/Dietaryguidelines/dga2005/document/default.htm>>. [Consulta; 13 Sept. 2013].
- LaRosa, J. C., Hunninghake, D., Bush, D., Criqui, M. H., Getz, G. S., Gotto Jr, A. M., Grundy S.M., Rakita L., Robertson R.M., Weisfelt M.L., Cleeman J.I. (1990). The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation*, 81(5), 1721-1733.
- Li, Y., Hu, M., & McClements, D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*, 126(2), 498–505.
- Li, L., Wang, Q., & Xu, Y. (2003). Thermoreversible association and gelation of methylcellulose in aqueous solutions. *Nihon Reoraji Gakkaishi*, 31(5), 287–296.
- Lopez-Pena, C. L., & McClements, D. J. (2015). Impact of a food-grade cationic biopolymer (ϵ -polylysine) on the digestion of emulsified lipids: *In vitro* study. *Food Research International*, 75, 34–40.
- Manley D., Ed., 2001. Recipes for secondary processes, Biscuit, Cracker and Cookie Recipes for the Food Industry, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 135-154.
- McClements, D. J. (1999). Emulsion rheology. *Food Emulsions-Principles, practice and techniques*, 235-266.
- Miele N., Di Monaco R., Masi P., Cavella S., 2015, Reduced-calorie filling cream: formula optimization and mechanical characterization, Chemical Engineering Transactions, 43, 67-72.
- Mishellany-Dutour, A., Peyron, M. A., Croze, J., François, O., Hartmann, C., Alric, M., & Woda, A. (2011). Comparison of food boluses prepared in vivo and by the AM2 mastication simulator. *Food Quality and Preference*, 22(4), 326–331.
- Mun, S., Decker, E. a., & McClements, D. J. (2007). Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40(6), 770-781.
- Mun, S., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J., & McClements, D. J. (2006). Influence of interfacial composition on *in vitro* digestibility of emulsified lipids: Potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. *Food Biophysics*, 1(1), 21–29.

- O'Connor, M. (1992). Europe and nutrition: prospects for public health. *BMJ: British Medical Journal*, 304(6820), 178-182.
- Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- Qiu, C., Zhao, M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Influence of protein type on oxidation and digestibility of fish oil-in-water emulsions: Gliadin, caseinate, and whey protein. *Food Chemistry*, 175, 249–257.
- Taberner, M. T. S. (2003). Proceso innovador de fabricación de alimentos rebozados congelados que evita la etapa de prefrutura industrial. Universitat de València. Facultat de Farmàcia.
- Sanz, T., Handschin, S., Nuessli, J., & Conde-Petit, B. (2007). Effect of thickening agent and fat in custard microstructure upon *in vitro* enzymatic digestion. *Food Science and Technology International*, 13(5), 381-388.
- Seimon, R. V., Wooster, T., Otto, B., Golding, M., Day, L., Little, T. J., ... & Feinle-Bisset, C. (2009). The droplet size of intraduodenal fat emulsions influences antropyloroduodenal motility, hormone release, and appetite in healthy males. *The American journal of clinical nutrition*, 89(6), 1729-1736.
- Sudha ML, Srivastava AK, Vetrmani R. Leelavathi K. (2007). Fat replacement in soft dough biscuits: Its implications on dough rheology and biscuit quality. *Journal of Food Engineering*, 80, 922-930.
- Tarancón P, Salvador A., Sanz T. (2013). Sunflower oil–water–cellulose ether emulsions as trans-fatty acid-free fat replacers in biscuits: texture and acceptability study. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (9), 2389-2398.
- The Dow Chemical Company. A food technologist's guide to Methocel food grade gums. 1996.
- The Dow Chemical Company. A food technologist's guide to Methocel food grade gums. 2014.
- The Dow Chemical Company. Methocel Cellulose Ethers. Technical Handbook. 2002.
- Vidal-García. 2009. Conceptos. En: Manual práctico de nutrición y dietoterapia. 1ª ed. Vidal-García (editor). Ed. *Monsa-Prayma*. Barcelona. Capítulo 1 pp 3-4.
- Yáñez, E., Biolley, E., 1999. Sustitutos de grasa en la alimentación humana, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49 (2), 101-103.
- Zhang, S., & Vardhanabhuti, B. (2014). Intragastric gelation of whey protein-pectin alters the digestibility of whey protein during *in vitro* pepsin digestion. *Food & Function*, 5 (1), 102-110.
- Zúñiga RN, Skurtys O, Osorio F, Aguilera JM, & Pedreschi F. Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: effect of their microstructure. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90 (2), 1147–1158.