

# FIBRA DIETÉTICA , ASPECTOS GENERALES Y ANALÍTICOS

**Dra. Lilia Masson**

**Profesor Emérito Universidad de Chile**

**Consejero Científico ACHIPIA**

**Consejero Científico ILSI Sur-Andino**

**RED CAPCHICAL**

**masson\_lilia@yahoo.es**

**Seminario ACHIPIA**

**«Metodologías analíticas aplicables al  
Etiquetado Nutricional»**

**Junio 1, 2016**



# Fibra Dietética (FD)



- Fue parte muy importante de la dieta del hombre primitivo modulando su fisiología
- Bajo este nombre se agrupa un número importante de componentes de diferente estructura química presentes en los alimentos de origen vegetal
- Cumplen funciones fisiológicas de gran relevancia para la salud humana e intervienen reduciendo el riesgo de algunas enfermedades no transmisibles (ENT)





# DEFINICIÓN GENERAL

- **FD** está formada por **polímeros de carbohidratos y polisacáridos no amiláceos** que son los principales componentes de las paredes de las células vegetales
- Incluye también **gomas y mucílagos**
- Su **no digestibilidad** en el intestino delgado y su **fermentación** en el intestino grueso por las bacterias colónicas, son características fisiológicas claves de la **FD**

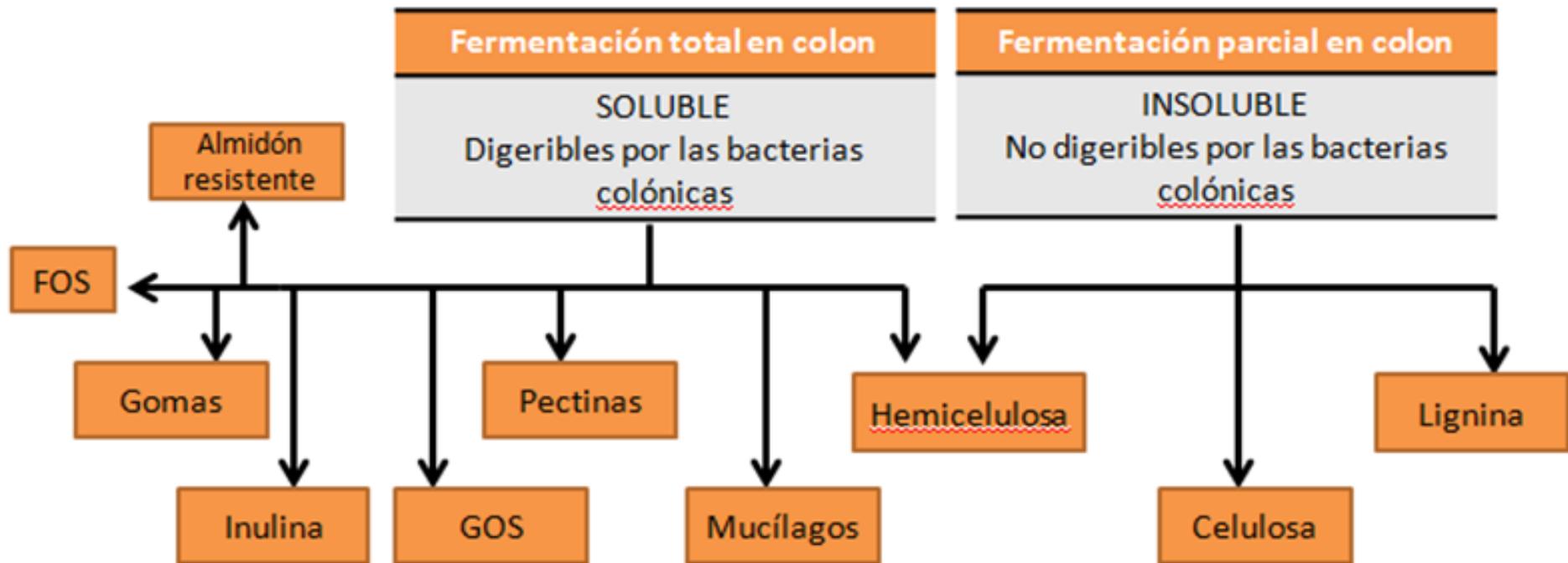
# CODEX ALIMENTARIUS 2009

- **FD son polímeros de carbohidratos no hidrolizados en el intestino delgado humano con un grado de polimerización no inferior a tres:**
  - a) Naturales
  - b) Obtenidos de materias primas por medios físicos, enzimáticos o químicos
  - c) Sintéticos
- **La decisión de incluir carbohidratos con grado de polimerización entre 3 y 10 se deja a decisión de las autoridades de cada país**

# FD SOLUBLE E INSOLUBLE

- Se denominó **solubles** a algunas fibras que **disminuyen principalmente la absorción de glucosa y grasa a nivel del intestino delgado**
- Son viscosas y forman geles ejemplo, pectinas,  $\beta$ -glucanos, gomas
- **Fermentación total en el colon**
- Se denominó ***insoluble***, a la fibra dietética con una mayor influencia en la función del intestino grueso: **Fermentación parcial en el colon**
- ***Corresponde a celulosa, hemicelulosa y lignina***
- Metodologías actuales proponen denominaciones basadas en PM e insolubilidad o solubilidad en etanol/agua

## Clasificación de la fibra en función de la solubilidad



### Producción de ácidos orgánicos

Acetato 40%  
Propionato 20%  
Butirato 20%

Producción de gases  
H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>

Fuente de energía para la microflora,  
células epiteliales del colon, hígado,  
tejidos periféricos. CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + ATP →  
1-2,5 kcal/g

# Etiquetado Nutricional

## INFORMACION NUTRICIONAL

Porción: 3/4 taza (30 g)

Porciones por envase: aprox. 11

100 g 1 porción

Energía (kcal)	350	105
Proteínas (g)	8,0	2,4
Grasa Total (g)	1,5	0,5
Grasa Saturada (g)	0,3	0,1
Grasa Monoinsat. (g)	0,4	0,1
Grasa Poliinsat. (g)	0,8	0,3
Grasas Trans (g)	0,0	0,0
Colesterol (mg)	0,0	0,0
Carbohidratos disp. (g)	71,8	21,5
Azúcares Totales (g)	7,5	2,3
Azúcar (sacarosa) (g)	5,1	1,5
Fibra Dietética Total (g)	8,4	2,5
Fibra Soluble (g)	5,3	1,6
Inulina (g)	3,6	1,1
Fibra Insoluble (g)	3,1	0,9
Maltitol (g)	5,0	1,5
Sodio (mg)	290	87
<b>Vitaminas y Minerales</b>		(*)
Vitamina C (mg)	28,2	14%
Vitamina B1 (mg)	1,4	30%
Vitamina B2 (mg)	1,5	28%
Vitamina B6 (mg)	2,0	30%
Vitamina B12 (µg)	0,9	27%
Niacina (mg EN)	17,6	29%
Ácido Fólico (µg)	170	43%
Hierro (mg)	13,8	30%
Zinc (mg)	14,7	29%
Calcio (mg)	375	14%

(\*) % en relación con la Dosis Diaria de Referencia (DDR) para Chile.

Edulcorante : 100 g 1 Porción  
Sucralosa (mg) 26,6 8,0

IDA en mg/kg peso corporal: < 15

IDA - Ingesta Diaria Admisible según FAO/OMS

Actualmente los consumidores parecen estar más motivados por el concepto de FD en relación a su salud

Sin embargo, el consumo de FD en la mayoría de los países desarrollados se encuentra muy por debajo de los niveles sub-óptimos. Estrategias para estimular a los consumidores que aumenten la ingesta de FD, han alcanzado una gran difusión, lo cual requiere «expertise» en las diferentes metodologías para determinar FDT y sus fracciones.

# FIBRA CRUDA

- Era la antigua determinación que realizábamos en el análisis proximal de los alimentos
- Corresponde principalmente a celulosa dado los enérgicos tratamientos de hidrólisis alcalina y ácida que realizábamos
- Esta determinación ya está fuera de los actuales protocolos del análisis proximal de los alimentos y de las metodologías a emplear para el Etiquetado Nutricional

# FD Natural y Sintética



**POLISACÁRIDOS NO AMILÁCEOS Y  
OLIGOSACÁRIDOS NO  
DIGERIBLES**

**CELULOSA**

**HEMICELULOSA**

**PECTINAS**

**β-GLUCANOS –**

**FRUCTANOS – INULINA**

**OLIGOFRUCTOSAS/FRUC**

**TOOLIGOSACÁRIDOS-**

**GOMAS – MUCÍLAGOS**

**CARBOHIDRATOS ANÁLOGOS**

**ALMIDÓN RS4 –DEXTRINAS**

**RESISTENTES – GALACTO –**

**OLIGOSACÁRIDOS -**

**CELULOSA MODIFICADA (metil  
celulosa,**

**hidroxipropilcelulosa) -**

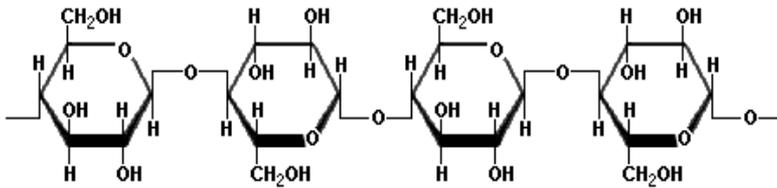
**POLIDEXTROSA**

**ASOCIADA NATURAL**

**LIGNINA**

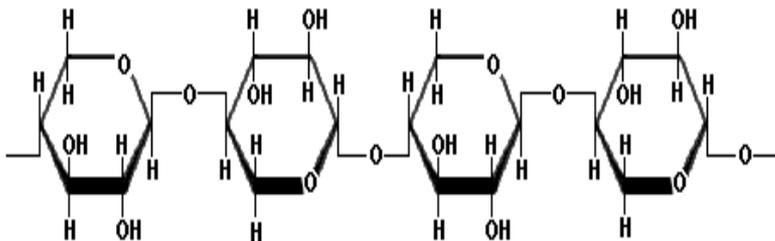
# ESTRUCTURAS QUÍMICAS

- CELULOSA (FD INSOLUBLE)
- Polisacrido  $\beta$ -D-Glucosa muy insoluble,

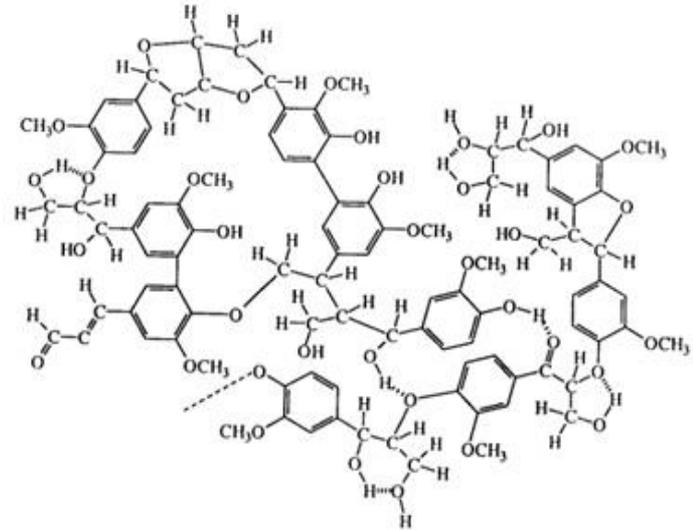


## HEMICELULOSA (FD insoluble)

Polisacrido lineal y ramificado, 50 - 200 unid. **pentosas** (xilosa y arabinosa), unidades **de hexosas** (glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, ácidos glucurónico y galacturónico)  
Por hidrólisis generan pentosanos



- Lignina (FD Insoluble)  
Polímeros de estructura aromática
- Es la única fibra no polisacrido

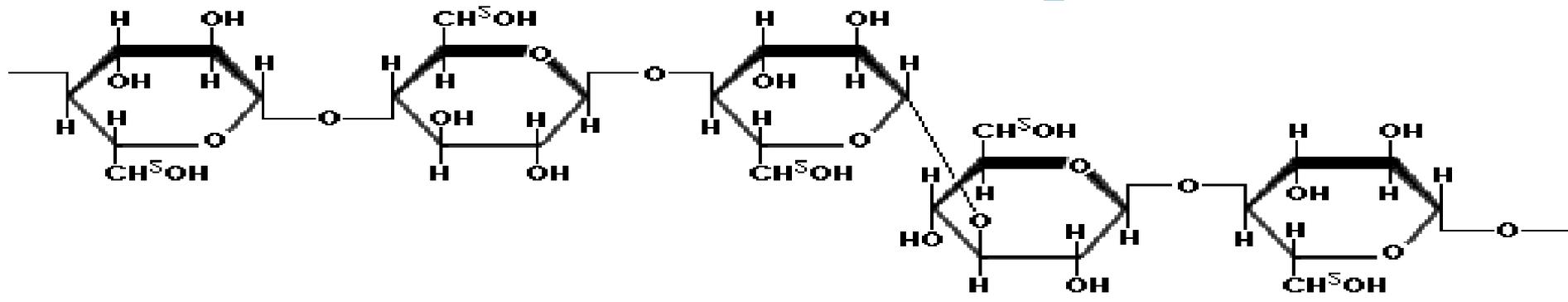
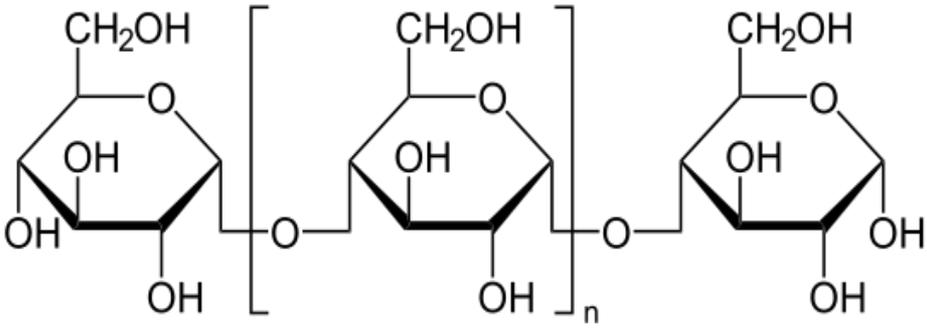


# Almidones resistentes (RS), (FDI)

- **RS1** – almidón físicamente inaccesible, encerrado en estructuras celulares naturales en alimentos como semillas de cereal parcialmente molidas, leguminosas,
- **RS2** – gránulos de almidón nativo (del tipo B al espectro de rayos X), maíz rico en amilosa, banana, papa cruda
- **RS3** – **amilosa retrogradada en alimentos horneados, refrigerados, etc. ej. pan, arroz cocido y enfriado, papas cocidas y enfriadas, almacenamiento**
- **RS4** – almidón modificado químicamente con uniones éter, éster, enlaces cruzados (incluye el almidón pirodextrinizado, pirolizado)
- **La cuantificación exacta del RS presente en un alimento al momento de consumirlo es compleja, ya que puede variar durante su almacenamiento**
- **Posteriormente a su ingesta, la reducción de su digestibilidad está influenciada por la fisiología propia de cada persona**

## DEXTRINAS RESISTENTES (FD Insoluble)

- Grado de polimerización del orden de 15
- **Se producen por calentamiento de almidón a pH alcalino**
- **Tratamiento enzimático de los almidones de maíz y de papas**

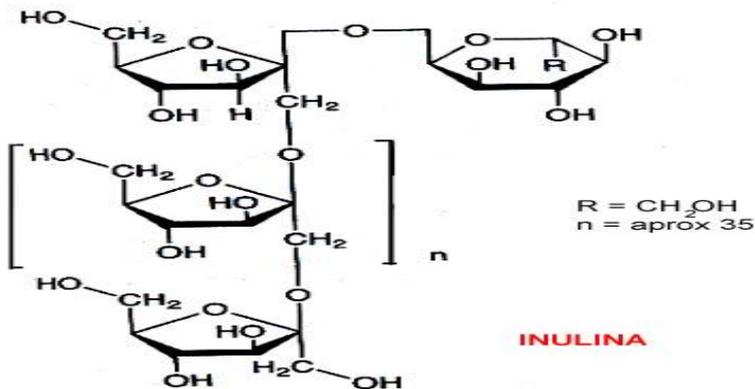


## β-Glucanos (FD Soluble)

- Polisacáridos de glucosa con enlaces glucosídicos 1β→3, 1β→4, 1β→6
- Moléculas con hasta 250.000 unidades glucosa
- **Fibra soluble, originan soluciones viscosas, pueden ser insolubles**
- **Principales fuentes: Avena, Hongos, Levadura de cerveza, Microalgas**

## INULINA (FD soluble)

- Es un **FRUCTOSANO** con cadenas de fructosa
- Sus enlaces  $\beta(1\rightarrow2)$  resisten la acción de ptialina, amilasa
- Se fermenta en el colon, son Prebióticos
- **Origina soluciones viscosas, gel** Presente en rizomas de achicoria, diente de león, yacón, topinambur, etc

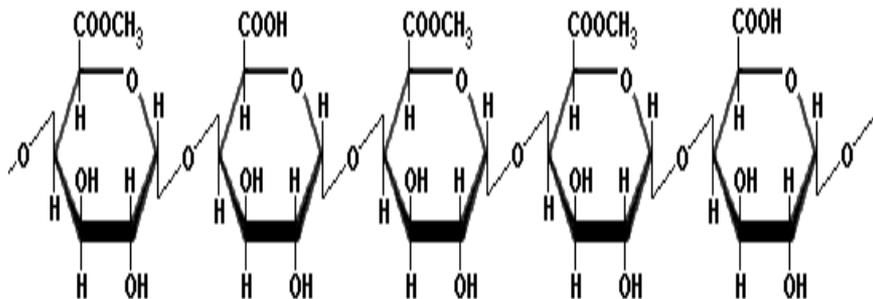


## DERIVADOS DE LA INULINA (FD Sol.)

- **FRUCTANOS**
  - Hidrólisis enzimática de la INULINA
  - Grado de polimerización 3-60
  - **ACTIVIDAD : PREBIÓTICOS**
  - Fuentes: Cebolla, raíz de achicoria, topinambur
- **Fructooligosacáridos (FOS)**
  - Oligosacárido lineal con 10 - 20 monómeros de fructosa, enlaces  $\beta(1\rightarrow2)$  Ej.: 1-kestosa.
  - **Obtención: Degradación enzimática o química de la inulina**
- **Prebióticos**
  - Se utilizan como substitutos del azúcar.
  - **Presentes: en banana, cebolla, ajo, espárrago, topinambur**

## PECTINAS (FD Soluble)

- Cadenas de 300 a 1000 unidades de ácido galacturónico metilado conectadas por enlaces  $1\alpha \rightarrow 4$
- Solubles en agua caliente y forman geles cuando se enfrían.
- El grado de esterificación (GE) afecta las propiedades gelificantes de la pectina
- Fuente industrial : Albedo de los frutos cítricos 30% pectina

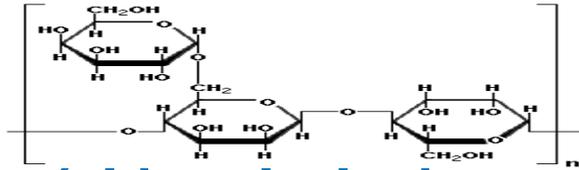


## GOMAS Y MUCÍLAGOS (FD Sol.)

- Los hidrocoloides abarcan un amplio rango de polisacáridos viscosos .
- **ORIGEN:**
  - Exudados vegetales goma arábica y tragacanto
  - Semillas gomas guar, garrofín
  - Extractos de algas como agar, carrageninas, alginatos (*Macrocystis pyrifera*)
- La goma xantan es producida por la bacteria *Xanthomonas campestris* que se encuentra en vegetales crucíferos como el repollo y coliflor.
- Se usan en alimentos como gelificantes, espesantes, estabilizantes y emulsionantes

# Estructuras Químicas

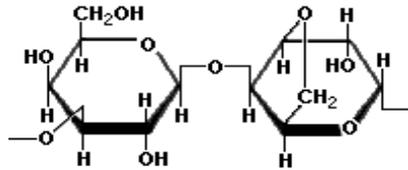
Goma Guar



Guaran polisacárido principal

Relación manosa : galactosa 2:1

**AGAR** Polímero de la agarobiosa, disacárido de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa.

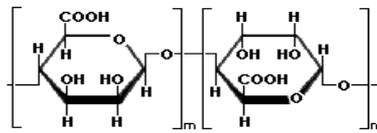


**CARRAGENANO**

Se diferencian del agar por sustituir algunos grupos hidroxilos con grupos sulfatos ( $-\text{OSO}_3^-$ ).

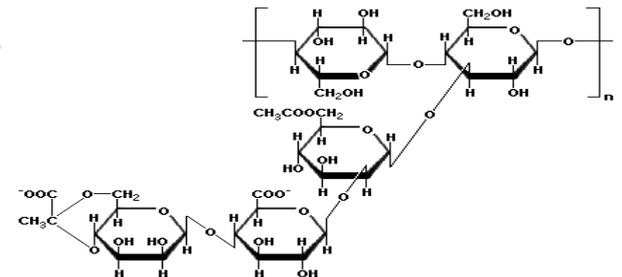
**ÁCIDO ALGÍNICO, ALGINATOS**

Unidades de ácidos  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico enlaces 1 $\rightarrow$ 4.



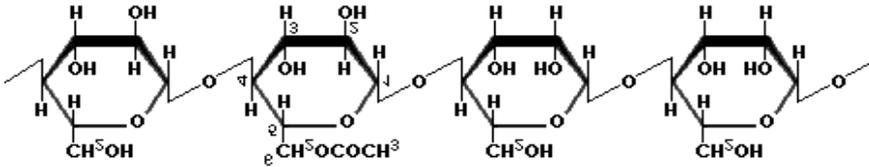
**GOMA XANTAN**

- Polisacárido  $\beta$ -D-glucosa como la celulosa, cada segunda unidad de glucosa está unida a un trisacárido de manosa, ácido glucurónico y manosa
- Se usa:
- Como **espesante** para salsas
- Prevenir la formación de **crisales de hielo** en los helados
- **Sustitutos de grasa** para rebajar calorías



# GLUCOMANANOS

- Polisacárido glucosa (G) y manosa (M) en una proporción 5:8 con enlaces  $1\beta\rightarrow4$ .



- **FD ORIGEN ASIA** tubérculos de *Amorphophallus konjac*
- Harina se hacen tallarines muy bajos en calorías, e.g., **los fideos japoneses shirataki.**
- Uso, Dietas: Reducir sensación hambre con sensación de plenitud, forma soluciones muy viscosas retardan la absorción de los nutrientes de alimentos

# GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS)

- Derivados de lactulosa (GOS-Lu)
- Se obtienen por procesos enzimáticos
- Elevada resistencia a las enzimas digestivas de los mamíferos
- **Mayor efecto bifidogénico en el intestino grueso respecto a los galacto-oligosacáridos disponibles en el mercado y derivados de lactosa (GOS-La).**

# FD FUNCIONALES

- FD Tradicional de trigo, avena, arvejas
- Ingrediente natural bajo costo

**FIBRAS ALIMENTARIAS  
FUNCIONALES  
MODIFICADAS**  
**Alto atrapamiento de  
agua**  
**Textura imita Grasas**  
**Excelentes Gelificantes**

Hidrocoloides  
tradicionales,  
Gelificantes  
alginatos, agar,  
pectinas  
ADITIVOS

Hidrocoloides  
tradicionales,  
Espesantes  
Goma guar, xantan,  
CMC  
ADITIVOS

Dosaje definido  
alto costo

# Procesos de Modificación

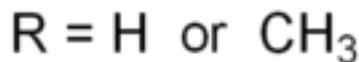
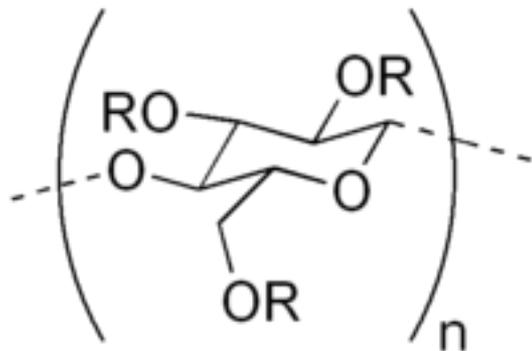
- Químicos- enzimáticos- mecánicos- térmicos- extrusión, Resultados:
- **Mejores propiedades texturales del alimento, y formular alimentos mas saludables: Más bajos en azúcar, en grasa total, en Na**
- Pectina bajo metoxilo unión amida forma gel con bajos % de azúcar
- Derivados de celulosa microcristalizada forma red 3D con agua, propiedades texturales similares a la grasa, uso en helados y aderezos bajos o libres de grasa
- Permiten formular alimentos con menor contenido de sal
- Goma Guar parcialmente hidrolizada (GGPH)  
Es transparente, baja viscosidad, permite usarla en alta concentración para que tenga efectos como FD
- Agar de bajo PM ha mostrado efectos potenciales prebiótico y antioxidante
- Alginatos de bajo PM efectos prebióticos
- Pectinas de bajo PM propiedades inmunomoduladoras

# Carbohidratos sintéticos (FD soluble)

## Metilcelulosa

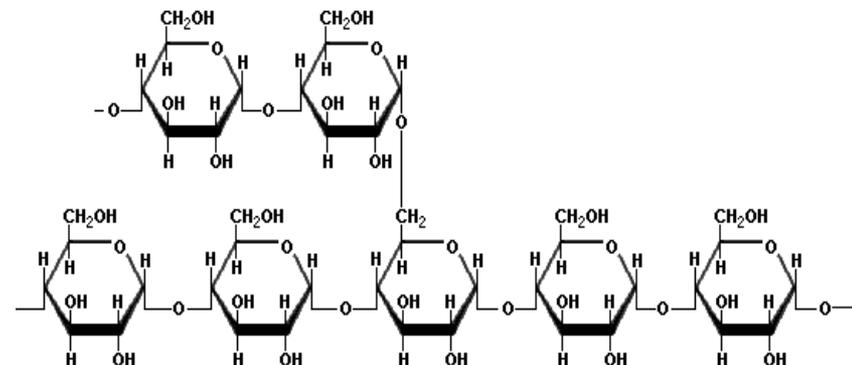
## Hidroxipropilmetilcelulosa

- Son derivados sintéticos de la celulosa
- **A diferencia de su molécula originaria, son solubles, pero rara vez se fermentan por la microflora colónica.**



## POLIDEXTROSA

- **Grado de polimerización 12**
- **Se sintetiza a partir de glucosa y sorbitol, utilizando ácido cítrico, como catalizador.**
- Estructura ramificada, resistente a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas
- **Fermenta parcialmente en el colon, propiedades digestivas y prebióticas.**



# PODEMOS MEDIR TODOS ESTOS TIPOS DE FD CON UN SOLO MÉTODO?

- Métodos generales que miden en conjunto:
- **FD del grupo de la llamadas insolubles: celulosa, hemicelulosa, lignina**
- **FD del grupo de las llamadas solubles de alto PM : Pectinas,  $\beta$ -Glucanos, gomas mucílagos**
- **Se han desarrollado métodos específicos para  $\beta$ -Glucanos, RS, RMD, INULINA, FOS, GOS, POLIDEXTROSA**
- Para efecto de cumplir con las definiciones regulatorias y fisiológicas se usan los métodos **enzimáticos - gravimétricos, enzimáticos - químicos**, oficiales AOAC, ACC
- Se requieren materiales y equipos muy específicos perfectamente detallados en cada Metodología
- **Debe contarse con Profesionales con alto conocimiento y entrenamiento en el desarrollo y aplicación de estas metodologías**

# Preparación de la muestra de análisis

- Etapa muy importante para que los valores obtenidos sean confiables
- Las Muestras deben analizarse tal como se consumen: horneadas, cocidas, fritas, extruidas, crudas ej. frutas
- Con mas de 10% de grasa deben desgrasarse de acuerdo al Método AOAC 985.29
- Muestras con humedad, sobre 25% deben liofilizarse
- **Es lo mas empleado para el análisis de FD en alimentos, menores modificaciones en sus componentes**
- Evitar secar la muestra a altas tº puede aumentar retrogradación del almidón
- La muestra homogeneizada debe pasar el tamiz de 0.5 mm
- **Tamaño de partícula muy importante, se favorecer la actividad hidrolítica de las enzimas tanto glicolíticas como proteolíticas empleadas en la metodología**
- La muestra de análisis pesada es del orden de  $1.000\text{g} \pm 0.005\text{ g}$  en duplicado **(4 crisoles por muestra que incluye los blancos)**

# Método de Englyst, Enzimático-Químico

- Definición: Polisacáridos no amiláceos (NSP) con enlace tipo  $\beta$  no glucosídico
- Mide: componentes estructurales de la paredes celulares de los vegetales
- La FD medida como NSP proporciona valores útiles para Etiquetado Nutricional Representa valores de dietas ricas en frutas, verduras o cereales integrales
- Está basado en las publicaciones de Southgate 1969.
- Fundamento:
- El almidón se retira completamente por tratamiento enzimático con enzimas termamyl y pancreatina
- Los NSP se miden como la suma de los azúcares individuales por GLC o HPLC después de hidrólisis ácida
- **Ref. Englyst H. *et al.* Analyst 1994, 119, 1497- 1509**

# Método Enzimático Gravimétrico de Prosky adoptado por la AOAC 985.29; 991.43

- Objetivo: determinar FDT, FDI, FDS
- FDI: **Se digieren los hidratos de carbono con  $\alpha$ -amilasa y las proteínas con pepsina y pancreatina a tº 90 º y 60ºC respectivamente**
- El residuo FDI total: celulosa, hemicelulosa, lignina, se determina por gravimetría.
- Valor de cenizas y proteínas remanentes , se restan del dato crudo obtenido
- FDS: El filtrado se trata con etanol 78% , precipitan en caso de estar presentes pectinas,  $\beta$ -Glucanos, gomas, etc.
- **Se las designa como Fibra Soluble de alto PM , HMWSDF , se determina gravimétricamente.**
- $FD\ Total = FDI + FDS$
- Método muy usado en el análisis proximal de Alimentos, Etiquetado Nutricional Ventajas. Relativamente económico
- **Desventajas:** No dan información detallada de los tipos de FD presente en el alimento o adicionada, práctica actual muy frecuente, hidrólisis enzimática no se hace a tº fisiológicas, no detecta LMWSDF, Hidrólisis parcial de RS

# Método Enzimático Gravimétrico Integrado

## Mc.Cleary AOAC 2009.01 Determina FD TOTAL

- Alcance : Aplicable a material vegetal, alimentos , ingredientes alimentarios, consistente con la definición del CODEX 2009
- Determina: FDT, que incluye RS, HMWIDF+HMWSDF que precipita con etanol al 78%,
- LMWSDF se determina en el filtrado del pp con etanol al 78% por HPLC

La hidrólisis del almidón se hace con  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglucosidasa por 16 h a 37°C

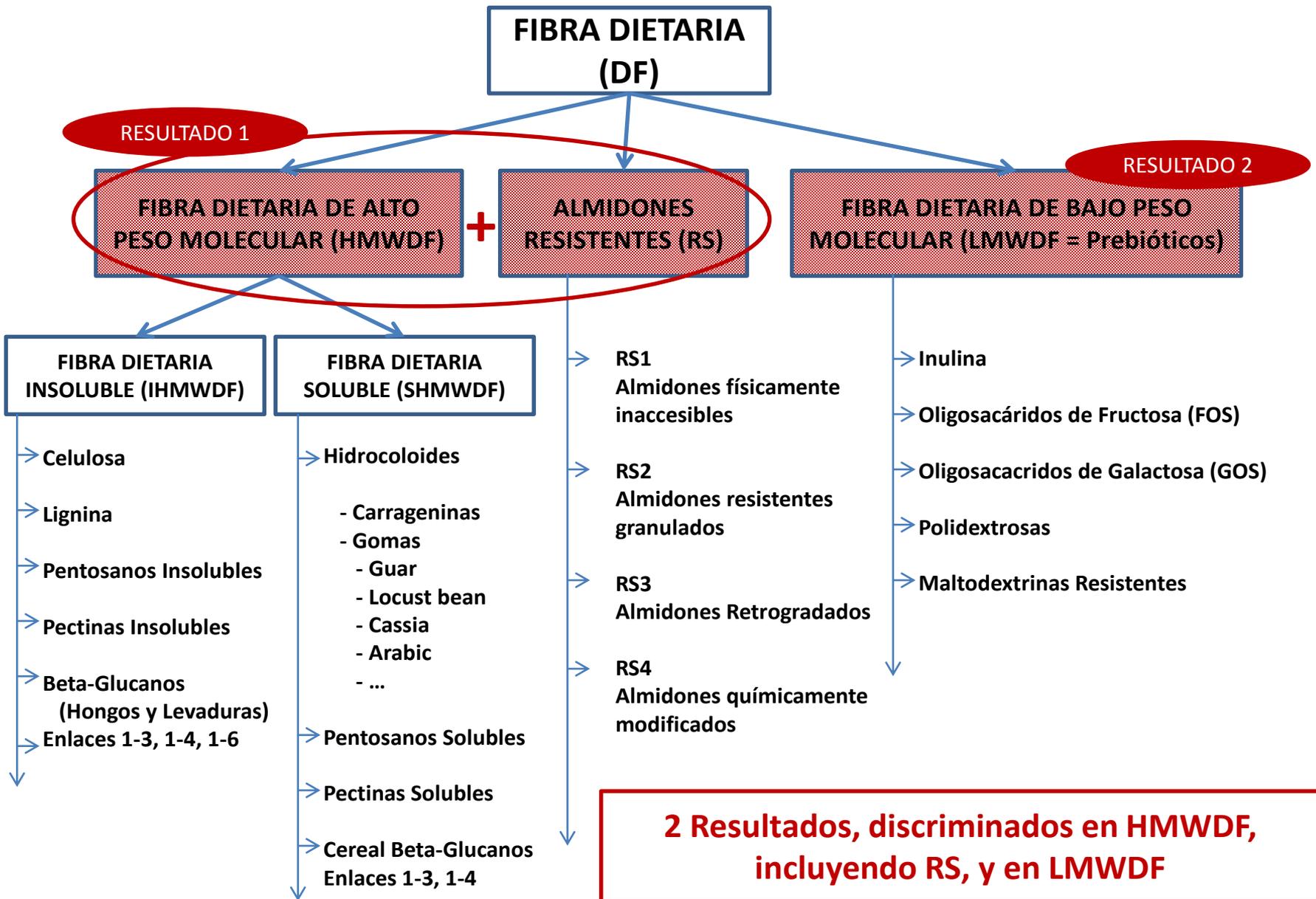
En esta etapa el RS se solubiliza e hidroliza a glucosa, maltosa, maltodextrinas de bajo grado de polimerización

La proteasa digiere las proteínas

La cantidad de FD de alto peso molecular que incluye FDI y FDS se obtiene por precipitación con etanol al 78%

El filtrado se trata con amiloglucosidasa para hidrolizar las maltodextrinas a glucosa y maltosa y determinarlas por HPLC

# MÉTODO AOAC 2009.01



# RESULTADOS

Muestras	g% FDTtotal
• Germen Cereal	31.24
• Broccoli liofilizado	30.42
• Zanahoria liofilizada	25.02
• Porotos Haricots	47.83
• Almidón Resistente	44.09
• Porotos Rojos	24.48
• Pan grano entero	11.57
• Pasta grano entero	12.65
• Nº Lab. Participantes 13-16	<b>Ref. Hollmann J, <i>et al.</i> Food.Chem 2013, 140, 586-589</b>

# Método AOAC 2011.25. Determina FD Insoluble, FD Soluble y FD Total

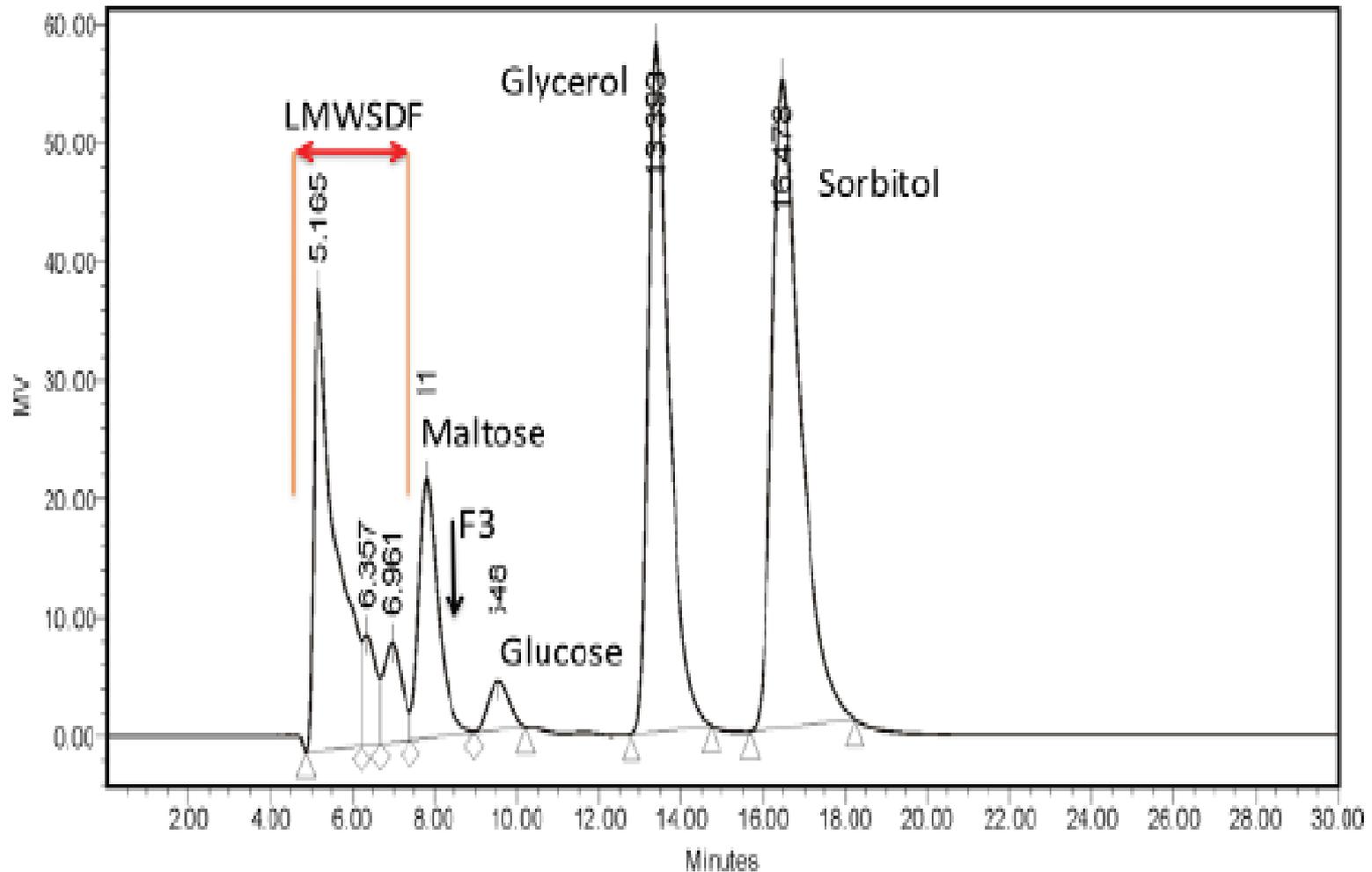
- Aplicable a material vegetal, alimentos, ingred. alimentarios, concordante definición CODEX 2009, incluye polímeros no amiláceos naturales, aislados, modificados, y sintéticos
- Determina 3 Fracciones, incluye Almidón Resistente, oligosacáridos y polisacáridos de  $GP \geq 3$  solubles en agua y etanol 78%.
- Combina atributos claves de los Métodos anteriores
- El tratamiento enzimático y los patrones internos sorbitol, glucosa, glicerol para la determinación por HPLC son iguales al Método AOAC 2009.01
- Diferencia con el Método AOAC2009.11, 3 Fracciones:
  - **Fracción 1 FDI o HMWIDF se determina gravimétricamente**
  - **Fracción 2 FDSP o HMWSDF corresponde a FD Soluble en agua que pp en etanol 78% , se determina por gravimetría**
  - **Fracción 3 corresponde a SDFS, que es soluble en agua y en etanol 78% que se determina por HPLC**
  - **FDT % = FDI % + SDF %**
  - **SDF% = SDFP % +SDFS %**

# Modificaciones a los Métodos Oficiales

## AOAC 2009.01 y 2011.25

- Objetivo: Lograr una menor sobreestimación de La fracción 3 LMWSDF SDFS en muestras que contengan almidón
- Los Métodos AOAC 2009.01 y 2011.25 emplean  $\alpha$ .amilasa pancreática (PAA) y amiloglucosidasa (AMG) a 37°C y pH 6 para no hidrolizar y medir RS y oligosacáridos que son resistentes a la digestión en condiciones fisiológicas
- Introducir una segunda incubación de la Fracción 3 SDFS o LMWSDF soluble en agua y etanol 78% con AMG antes de la determinación por HPLC
- Objetivo hidrolizar una fracción de Maltodextrinas Resistentes (RMDs) ramificadas que son hidrolizadas por el intestino humano y así evitar la sobreestimación de la fracción SDFS o LMWSDF
- No se afectan los FOS, GOS, XOL, RMDs, galactosyl-sacarosa oligosacáridos o polidextrosa

# Cromatograma tipo separación de componentes de FD solubles en agua y en etanol al 78%, (LMWSDF)



Resultados Método AOAC 2009.01 No Modif. y Modif. No incorporadas  
 Ref.Mc Cleary B. J. AOAC Int. 2014 , 97, 896- 901

Muestras	HMWDF %	SDFS% -AMG	SDFS% +AMG	TDF %-AMG	TDF% +AMG
Pan integral	12.39	1.76	1.66	14.15	14.09
<b>Galletas centeno</b>	<b>16.29</b>	<b>6.30</b>	<b>4.70</b>	<b>22.59</b>	<b>20.99</b>
Galletas de agua	4.20	1.71	1.53	5.91	5.73
Germen de avena	18.86	0.56	0.54	19.42	19.40
<b>Cereales para el desayuno</b>	<b>10.96</b>	<b>3.31</b>	<b>1.97</b>	<b>14.27</b>	<b>12.93</b>
Zanahoria	21.81	0.57	0.47	22.38	22.28
Papa cruda	31.74	0.20	0.47	31.94	32.21
<b>Papa cocida</b>	<b>10.66</b>	<b>2.63</b>	<b>0.57</b>	<b>13.29</b>	<b>11.23</b>
<b>Pasta trigo entero</b>	<b>9.90</b>	<b>2.77</b>	<b>1.89</b>	<b>12.67</b>	<b>11.79</b>
Poroto mantequilla	2.16	2.88	2.24	23.04	22.40

# MÉTODOS ESPECÍFICOS

## Método AOAC 2002.02

### Almidón Resistente (RS)

- Aplicable a muestras que contengan mas de 2% de RS
- **Fundamento: La muestra se trata con  $\alpha$ -amilasa pancreática y amiloglucosidasa, se incuba por 16 h a 37°C**
- El almidón se hidroliza y solubiliza el a D-Glucosa
- **El RS se recupera como un pellet se hidroliza cuantitativamente a D-Glucosa con amiloglucosidasa**
- Se mide con glucosa oxidasa/peroxidasa al espectrofotómetro a 510 n y se calcula el contenido de RS de la muestra

## • RESULTADOS

Muestras liofilizadas promedio RS %	
Almidón de maíz alto amilosa	46.29
Banana verde	43.56
Almidón nativo de papa	63.39
Almidón Retrogradado com.	39.04
Almidón Resistente comercial	48.28
Porotos Kidney en conserva	4.66
Flakes de Maiz	2.20

# Método AOAC 2001.03 Determinación de FD cuando se adiciona Maltodextrinas Resistentes (RMD)

- FDT= suma de 2 fracciones:
  - 1.- FDI + HMWSDF insoluble en etanol 78%
  - 2.- LMWRMD que se mide por HPLC donde se encuentran las maltodextrinas resistentes (RMD) adicionadas
  - Tres tratamientos de hidrólisis enzimática
  - $\alpha$ -amilasa a 95°, 30 min pH 6.0
  - Proteasa 60°C 30 min, pH 7.5
  - Amiloglucosidasa 60°C, 30 min. pH4.5
  - Las maltodextrinas resistentes (RMD) están disponibles comercialmente
  - Se obtienen de una pirolisis de almidón de maíz y posterior tratamiento enzimático
  - Son polímeros de glucosa con PM promedio de 2000 daltons
  - Ref. J.AOAC Int. 2000, 83, 1013 y 2002, 85, 435
- Este Método se puede emplear para la determinación de ISOMALTOSA OLIGOSACÁRIDOS (IMOS) adicionados, usando el Kit de enzimas KTDFR de Megazyme

# Determinación de Fructanos en Alimentos (INULINA)

## Método AOAC 997.08

- Aplicable a la determinación de fructanos adicionados a alimentos procesados
- Fructanos extraídos del alimento se hidrolizan con amiloglucosidasa para retirar el almidón
- Legos se tratan con inulasa para liberar glucosa y fructosa que se determinan por cromatografía de intercambio iónico con detector amperométrico (HPAEC-PAD)

## Método AOAC 999.03

- Los fructanos se extraen del alimento con agua caliente
- **3 Alícuotas del extracto se tratan:**
- **1.- Sucasas específicas hidrolizar sacarosa en glucosa y fructosa**
- **2.- Mezclas de enzimas que degradan el almidón a glucosa**
- **3.-El fructano se hidroliza con fructanasas purificadas de inulina**
- Los azúcares reductores de cada fracción se reducen a alcohol con BH3
- Determinación: Mét. Espectrofot. con ácido p-hidroxibenzoico e hidracida ácida (PAHBAH) a 410 nm

# Resultado de ensayos interlaboratorios en alimentos y materiales vegetales g/100g

Muestras	Valor promedio en g/100g	AOAC	Muestras	Valor promedio en g/100g	AOAC
	997.08	999.03			999.03
Chocolate	9.4	13.52	Control de Fructano		28.47
Galletas	12.2	-			
Leche en polvo	-	10.64	Fructano puro		95.87
Untable de queso	4.6	-			
Tabletas de vitaminas	-	4.00	Tallos de trigo		4.72
Cebolla	-	51.53	Alcachofa de Jerusalén		51.63
Bebida en polvo	15.5	-			
Untable bajo en grasa	8.1	8.19			

REF: Total fructans in Foods and Pets Foods. Stöber *et al.*  
 J.Agr.Food.Chem. 2004,52, 2141-45, Usa Método AOAC 997.08

# Método AOAC 2000.11. Polidextrosa en Alimentos por Cromatografía Iónica (HPAEC-ED)

- Aplicable a la determinación entre 2-9% de polidextrosa agregada a alimentos
- Principio: La polidextrosa se extrae con agua caliente y luego se centrifuga
- **El filtrado se trata con mezcla de enzimas : isoamilasa, amiloglucosidasa y fructanasas para retirar interferencias de oligosacáridos como malto-oligómeros y fructanos.**
- Para la cuantificación de polidextrosa de alto PM se emplea Cromatografía Aniónica de alta presión con detector electroquímico (HPAEC-ED), columna 250 x 4 mm tipo CarboPak PA 1 Dionex con pre-columna CarboPak PA 1 Guard, 23 x 3mm
- Emplea dos fases móviles en base a NaOH
- Método se puede usar en forma complementaria a los Métodos AOAC que det. FDT en alimentos
- Ref. J.AOAC Int. 2002, 84, 472

# Resultados ensayo interlaboratorio para determinación de povidexrosa en alimentos por Cromatografía Iónica . Nº lab 7-8

<b>Muestra</b>	<b>Valor promedio g %</b>
<b>Caramelo chocolate con leche</b>	<b>19.87</b>
<b>Te frío</b>	<b>1.86</b>
<b>Galleta con azúcar</b>	<b>8.11</b>
<b>Mermelada de Uva (Jelly)</b>	<b>5.14</b>
<b>Povidexrosa</b>	<b>92.57</b>
<b>Caramelo blando (Jelly)</b>	<b>33.14</b>
<b>Mezcla bebida en polvo</b>	<b>1.84</b>

# Método AOAC 995.16.

## $\beta$ -D- 1-3, 1-4 Glucanos.

- Campo de aplicación: Determinación de  $\beta$ -D- 1-3, 1-4 Glucanos (Mixed-Linkage) en avena, cebada, muestras de fibra, malta y cerveza.
- Las muestras en buffer pH 6.5, se incuban con enzima liquenasa purificada, y se filtra.
- Se adiciona  $\beta$ -D- glucosidasa, para hidrólisis completa a D-glucosa que se determina con glucosa oxidasa/ peroxidasa a pH 7.4 , leyendo en el espectrofotómetro a 510 nm
- Se indican los patrones respectivos a emplear y el detalle completo de la metodología para estos sustratos
- Se recomienda trabajar con muestras liofilizadas

## $\beta$ -D- 1-3, 1-4Glucanos en avena (8 lab)

- **Muestra Promedio % base seca**
- Harina de Avena 8.00
- Germen de avena 6.39
- Rollos de avena 4.27
- Germen de avena (cereal desayuno) 3.93
- Germen de avena instantáneo 8.00

# Método Megazyme para $\beta$ -D- 1-3, 1-6-Glucanos en Hongos y Levaduras (Insol)

- Fundamento:  $\beta$ -D- 1-3, 1-6-Glucanos;  $\beta$ -D- 1-3, Glucanos y  $\alpha$ -Glucanos se solubilizan en HCL concentrado 10N
- **.- Se hidrolizan a D-Glucosa con mezcla de exo-1,3  $\beta$ -glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa a pH específico se lee el color desarrollado en espectrofotómetro a 510 nm**
- Se dan los detalles específicos en las respectivas metodologías

## REFERENCIAS

- Mc Cleary B. and Glennie-Holmes , M. 1985. Enzymic quantification of 1-3, 1-4  $\beta$ -D- glucan in barley and malt J. Inst. Brew. 91. 285-295
- Mc Cleary B. and Codd, R. 1991, Measurement of 1-3, 1-4  $\beta$ -D- glucan in barley and oats. A streamline enzymic procedure. J.Sci.Fd. Agric. 55, 303-312
- Ariza Nieto , C. *et al.* 2000. Validación de una técnica enzimática para la determinación de  $\beta$ -glucanos totales y  $\beta$ - glucanos solubles en la fracción soluble ácida (FSA) del grano de cebada (*Hordeum vulgare*). Revista colombiana de Química 29, 65-81
- Santek, B. *et al.* Production of paramylon , a  $\beta$  1-3 glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic media. 2009. Eng. Life Sci. 9,23-28.
- Danielson, M. et al. 2010. Enzymatic Methods To Measure  $\beta$  1-3,  $\beta$  1-6 - Glucan content in Extracts and Formulated Products (GEM Assay). J.Agric.Food Chem. 58, 10305 -10308.

# Glucanos totales, $\alpha$ -Glucano, $\beta$ - Glucano en muestras de hongos comerciales

Muestras	Glucanos totales base seca	$\alpha$ -Glucano	$\beta$ - Glucano
Hongos negros secos	48.5	0.2	48.3
Honkos Maitake secos	43.4	1.6	42.8
Hongo Shitake	44.5	5.9	38.6
<i>Boletus edulis</i>	27.4	3.8	23.8
<i>Morchella conica</i>	26.8	18.9	7.9
Champignon negro	29.4	1.6	27.8
Hogos porcini	33.8	4.9	28.9

# Otras Referencias de la Literatura

Dos publicaciones del año 2013 son importantes de mencionar

**Ref 1.- Hollmann, J. *et al* 2013. Dietary fibre fractions in cereal foods measured by a new integrated AOAC method, Food Chem. 140, 586-589**

**Compara el método AOAC 991.43 con el Método AOAC 2009.01**

**Muestras : 6 tipos de panes de trigo, centeno y 8 productos horneados como galletas, galletas con inulina, wafers de arroz, palitos salados, etc muestreadas en un supermercado, total 15**

- Se analizó FDT y sus fracciones por los dos métodos
- Resultados más altos Método AOAC 2009.01 que los obtenidos por el Método AOAC 991.43
- Que no mide la LMWSDF soluble en agua y etanol 78% por HPLC
- Pan crujiente y galletas de mantequilla con inulina la LMWSDF representó 4.1 y 5.1 % respectivamente
- Deben revisarse los datos generados método AOAC 991.43 y aplicar el método AOAC 2009.01 , dados los efectos en la salud que tienen las diversas fracciones de FD contenida en un determinado alimento sea natural, elaborado, formulado con diferentes fracciones de FD

## **Ref 2.- Englyst, K. *et al.* 2013. Evaluation of methods of analysis for dietary fiber using real foods and model foods. Food Chem. 140, 568-573.**

- Comparar Métodos AOAC 991.43 (2001.03) y AOAC 2009.01 en la det. de RS, NSP (non starch polysac.), RO (Resistant oligosac.) en 6 alimentos del comercio :
- Pan tipo hecho en casa
- Cereal inflado de arroz
- Queso fresco sabor frutilla
- Galletas de hoja estilo casero
- Mezcla postre instantáneo
- Bebida en polvo formulada
- Paralelamente se prepararon en el laboratorio 6 alimentos similares con adición de diferentes fracciones de FD:
- Pan casero + 11.6% almidón de maíz alto en amilosa + 4.7%  $\beta$ -Glucanos de cebada
- Arroz inflado + 15% almidón alto amilosa retrogr. + 3% inulina depolimeriz. +3% polidextrosa
- Queso fresco + 4.1% inulina + 5.5% RMDextrinas

- Galletas de hoja + 8% de almidón de maíz alto en amilosa + 4% de GOS
- Postre instantáneo + 5% de celulosa + 5% goma Guar + 12% de polidextrosa
- Bebida en polvo + 15% GOS + 10% de FOS.
- En los dos lotes de muestras comerciales y formuladas se aplicaron:
  - Los métodos AOAC 991.43 y AOAC 2009.01 para det. HMW y LMW DF y se calculó la suma de las respectivas fracciones
  - Los Métodos para Fructanos AOAC 999.03, Englyst
  - Los Métodos para RS: RS3, T-RS, RO, NSP y se calculó la suma total de estas fracciones

**Resultados: Gran desafío para los analistas entre los métodos aplicados y acuerdo con las definiciones del CODEX para FD**

**Qué método único , o que combinación es la más conveniente aplicar para cualquier alimento dado?**

**Depende: De los ingredientes y Tipo de proceso empleado en la manufactura del alimento**

**Saber que fracciones se recuperan por los diferentes métodos, cuando pueden dar resultados bajos o altos**

- **Es esencial para determinar FD en un alimento procesado adicionado o no de diferentes fracciones de FD.**

# Nuestra Experiencia Práctica Método

## AOAC 2011.25

- 2013 Primer Seminario FD organizado por CAPCHICAL Participaron tres expertas extranjeras entre ellas Dr. Annete Evans, EEUU
- Desarrollamos en el Lab del ISP con 10 participantes del Seminario, el Método AOAC 2011.25 en una muestra patrón traída por ella.
- Los resultados estuvieron dentro de lo esperado
- Método muy laborioso, primera vez que lo practicábamos
- **2014. Minironda entre 4 Laboratorios**
- Método AOAC 2011.25 aplicado a una pre mezcla formulada y al pan de molde elaborado con la pre-mezcla:
- 3 FD adicionadas al 3%
- Almidón Resistente RS4
- $\beta$  glucano
- Inulina
- Más 1.6 % de FOS
- La Empresa GRANOTEC donó los KITS Megazyme

# RESULTADOS

- **PRE-MEZCLA**
- Los valores determinados entre los 4 laboratorios para el contenido de HMWIDF, HMWSDF y LMWSDF estuvieron entre rangos adecuados, ya que c/u tuvo que determinar además humedad, secar y desgrasar la pre-mezcla, determinar proteínas y cenizas en los residuos.
- **Pan de Molde**
- También se tuvo que determinar humedad, secar y desgrasar la muestra de pan, determinar proteínas y cenizas en los residuos.
- Tuvimos mas disparidad en los resultados para estas tres fracciones de FD sobre todo en la determinación de la Fracción LMWSDF determinada por HPLC.

# Conclusiones y Proyecciones a Futuro

- **Considero que falta «expertise» en el país en este tema analítico**
- **Repetir nuevos ensayos incorporando mas laboratorios que cuenten con la implementación instrumental necesaria, para validar la metodología AOAC 2011.25 de acuerdo a los protocolos analíticos establecidos**
- **Debería haber un desarrollo armónico a nivel de país de las diferentes Metodologías analíticas presentadas y comentadas de modo de contar a futuro con una Red de Laboratorios y profesionales especializados en el análisis de FD y sus diferentes fracciones de modo de responder adecuadamente a la demanda del Etiquetado Nutricional y como consecuencia a la información de los Consumidores.**

- **No conocemos el aporte de FDT y sus diferentes fracciones en la mayoría de los alimentos que se consumen en Chile, los datos de nuestra antigua Tabla informa mayoritariamente Fibra Cruda**
- **No conocemos el aporte de FDT y sus diferentes fracciones en la mayoría de los alimentos nativos chilenos, lo cual es un desafío en I&D, considero urgente la presentación de Proyectos y generación de publicaciones .**

**Gracias por vuestra atención**

