

INFORME TÉCNICO FINAL

PROGRAMA ASTURIAS

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE I+D+i			
Referencia proyecto	IDI/2021/000420		
Acrónimo	INMICRO		
Título del Proyecto	Alternativas tecnológicas de enriquecimiento en ingredientes funcionales mediante el empleo de microencapsulación y evaluación de su bioaccesibilidad/biodisponibilidad		
Periodo de Justificación	Desde:	01/08/2021	Hasta: 31/12/2023

En Noreña , a 15 de marzo de 2024

1. MEMORIA TÉCNICA

Explique **DETALLADAMENTE** las actividades realizadas, incluyendo la descripción de la metodología empleada, con referencia expresa a los hitos, tareas y plan de trabajo de la solicitud.

En la memoria de la propuesta se definía un objetivo general y varios objetivos específicos que se describen a continuación:

El objetivo general del proyecto consistía en el desarrollo de ingredientes funcionales mediante tecnologías de encapsulación y evaluación de la biodisponibilidad para su incorporación a alimentos con un perfil nutricional saludable orientados a contribuir en la mejora del estado de salud y bienestar general de la población senior y/o población con necesidades nutricionales específicas.

Objetivos específicos del proyecto:

O1-Desarrollo de ingredientes mediante una línea de microencapsulación de ingredientes funcionales (bacterias ácido lácticas, ácidos grasos omega 3 y vitaminas) que garanticen la posible presentación de alegaciones nutricionales al incorporarlos a diferentes alimentos.

O2- Evaluación de la estabilidad de dichos ingredientes en productos tanto en crudo como tras tratamiento térmico y estudio de posibles declaraciones nutricionales para su inclusión en el etiquetado.

O3-Bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad de los ingredientes altamente funcionales incorporados en matrices alimentarias.

A continuación, se describe como se abordaron y ejecutaron parte de las tareas de este primer HITO:

HITO.1- Identificación y desarrollo de estrategias para microencapsular ingredientes que aporten funcionalidad a matrices alimentarias

En este Hito se desarrollaron microencapsulados mediante el empleo del equipo de spray drying, modelo B-290 Mini Spray Dryer de Buchi.

La microencapsulación de bacterias ácido lácticas, ácidos grasos omega 3 y vitaminas permite añadir cantidades pequeñas de los mismos preservando sus características y propiedades naturales.

H.1.T1- Puesta a punto, desarrollo y obtención de microencapsulados de ácidos grasos omega 3.

A la hora de formar los encapsulados es importante saber la naturaleza del ingrediente funcional que queremos encapsular, ya que por ejemplo en función de su afinidad por el agua (hidrofílica o hidrofóbica) tendremos que elegir una emulsión u otra.

Estas capsulas se obtienen por recubrimiento o atrapamiento de un material o una mezcla (material encapsulado) en otro material (polímero, macromolécula, lípido). De manera que tenemos dos fases:

- Material encapsulado: núcleo activo, relleno, fase interna, carga

- Material encapsulante o protector: cápsula, esfera, material polimérico, membrana

Para lograr los microencapsulados se llevó a cabo una revisión bibliográfica para ver que agentes encapsulantes nos podían proporcionar mejores resultados, hay que evaluar el principio activo en cada caso y la tecnología de encapsulación a aplicar. La revisión bibliográfica llevada a cabo en el caso de la microencapsulación de ácidos grasos omega 3 se seleccionaron los materiales que se recogen en la tabla 1:

Material de recubrimiento	Características	Ingrediente encapsulado
Almidón modificado	Polisacárido: muy buen emulsionante	Aceite lino/pescado
Maltodextrinas	Polisacárido: emulsionante, encapsulante	Aceite lino/pescado
Carragenatos	Polisacárido: emulsionante, encapsulante	Aceite lino/pescado
Dextrosa	Polisacárido: emulsionante, encapsulante	Aceite lino/pescado
Goma arábica	Polisacárido: emulsionante, formador de película	Aceite lino/pescado
Goma garrofin	Polisacárido: emulsionante, formador de película	Aceite lino/pescado
Goma xantana	Polisacárido: emulsionante, formador de película	Aceite lino/pescado
Ciclodextrinas	Polisacárido: emulsionante, encapsulante	Aceite lino/pescado
Gelatinas	Proteína: emulsionante, encapsulante	Aceite lino/pescado

Tabla 1: Materiales de recubrimiento empleados en microencapsulación

La bibliografía consultada se recoge a continuación:

- (1) Estudio de encapsulados de extractos supercríticos de salvado de trigo, Juan Gonzalez Redondo, grado en Ingeniería Química, Universidad de Valladolid, 2015.
- (2) Micro- y nanoencapsulación de aditivos y otros compuestos de interés alimentario, Juan M. Irache, Ier Congreso Nacional de Agroalimentación Pamplona (Mayo 2010)
- (3) Materiales usados en la encapsulación, NA Guevara Breton, MT Jimenez Munguia, Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 2 (2008):22-27.
- (4) Nota aplicación Buchi: Encapsulation of olive oil
- (5) Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión
Microencapsulation of oily substances by aspersion drying, Orestes Darío López Hernández, Ingeniero Químico. Máster en Ingeniería de los Procesos Biotecnológicos. Investigador Agregado. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.
- (6) Microencapsulation by Spray Drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds, A Soottitawat, H. Yoshii, T. Furuta, Mohkawara and P.Linko, Food Engineering and Physical Properties, JOURNAL OF FOOD SCIENCE—Vol. 68, Nr. 7, 2003
- (7) Applications of spray-drying in microencapsulation of Food ingredients: An overview
Adem Gharsallaoui , Gaelle Roudaut, Odile Chambin, André e Voilley, Rémi Saurel, Review, Food Research International 40 (2007) 1107–1121.
- (8) Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying Seid Mahdi Jafari a; Elham Assadpoor a; Yinghe He b; Bhesh Bhandari, Drying Technology,26:7,816 — 835, 2008.
- (9) Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability, S. Drusch *, S. Berg, Food Chemistry 109 (2008) 17–24.
- (10) BUCHI Spray Drying and Encapsulation Seminar, Dr. David Ruetti, Buchi, November 15, 2012.
- (11)Nota aplicación Buchi: Encapsulation of caraway oil
- (12)Nota aplicación Buchi: Encapsulation of cardamon oil
- (13)Nota aplicación Buchi: Encapsulation of cinamom oil
- (14)Nota aplicación Buchi: Encapsulation of Lemon oil
- (15)Nota aplicación Buchi: Encapsulation of soy oil

Estos recubrimientos son los recomendados en el caso de encapsulamiento de lípidos. Para incorporar la mezcla de agentes encapsulantes, lípidos y agua al equipo y lograr una correcta microencapsulación de manera que los lípidos queden en el centro de las partículas y el agente que recubre rodeando el núcleo lipídico es necesario formar una emulsión, los pasos a seguir se recogen en el siguiente esquema:

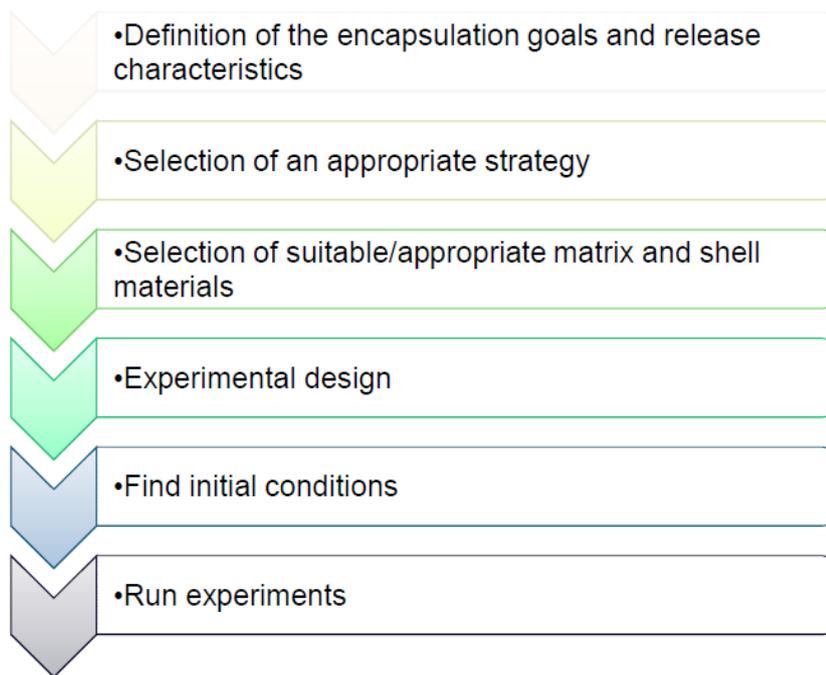


Figura 1: Esquema de pasos a seguir para la obtención de microencapsulados mediante spray drying

De manera que se plantearon las siguientes pruebas:

Prueba 1	g	%
aceite lino /pescado	5	25,00
maltodextrina	15	
goma arábica	5	
agua	75	75

Prueba 2	g	%
aceite lino /pescado	15	50,00
maltodextrina	32,5	
goma arabiga	2,5	
agua		50,00

Prueba 3	g	%
aceite lino /pescado	0,20	20,00
maltodextrina	4	
goma arabiga	7,8	
agua	80	80,00

Prueba 4	g	%
aceite lino /pescado	5	20,30

maltodextrina	5	
gelatina	10.3	
agua	70	79,70

Prueba 5	g	%
aceite lino /pescado	0,20	20,00
carragenato	4	
goma garrofin	7,8	
agua	80	80,00

Prueba 6	g	%
aceite lino /pescado	0,20	20,00
Almidón modificado	4	
goma arábica	7,8	
agua	80	80,00

Prueba 7	g	%
aceite lino /pescado	0,50	50,00
carragenato	10	
goma xantana	19,5	
agua	80	50,00

Prueba 8	g	%
aceite lino /pescado	0,50	50,00
dextrosa	10	
goma arábica	19,5	
agua	80	50,00

Tabla 2: Pruebas con ácidos grasos

Para cada prueba se llevaron a cabo ensayos tanto con el aceite de lino como con el de pescado.

Los aceites seleccionados tienen la siguiente composición:

Aceite de lino:

	SPECIFICATIONS / ESPECIFICACIONES	RESULTS / RESULTADOS
ECOFILAX® Ω3:		
Linolenic Acid / Ácido Linolénico	Min. 45.0%	57.0%
Linoleic Acid / Ácido Linoleico		16.7%
Oleic Acid / Ácido Oleico		15.8%
Stearic Acid / Ácido Esteárico		3.5%
Palmitic Acid / Ácido Palmítico		5.1%

Aceite de pescado:

	SPECIFICATIONS / ESPECIFICACIONES	RESULTS / RESULTADOS
BIOMEGA-TECH® DHA 80 TG:		
Eicosapentaenoic Acid / Ácido Eicosapentaenoico (EPA)		8.6%
Docosahexaenoic Acid / Ácido Docosahexaenoico (DHA)	Min. 80.0%	80.5%

Los pasos que se hicieron fue:

- 1) Preparación de la emulsión en el momento de incorporarla al equipo Mini spray dryer (se hicieron emulsiones con Thermomix)
- 2) A continuación, es necesario filtrar la emulsión antes de colocarla en el equipo, ya que no puede tener partículas superiores a 0.7 micras:



Figura 2. Obtención de las emulsiones con la thermomix

- 3) Una vez obtenida la emulsión, se enciende el equipo y se controlan las temperaturas del inlet, del outlet, de aspiración, la bomba y la presión del gas.

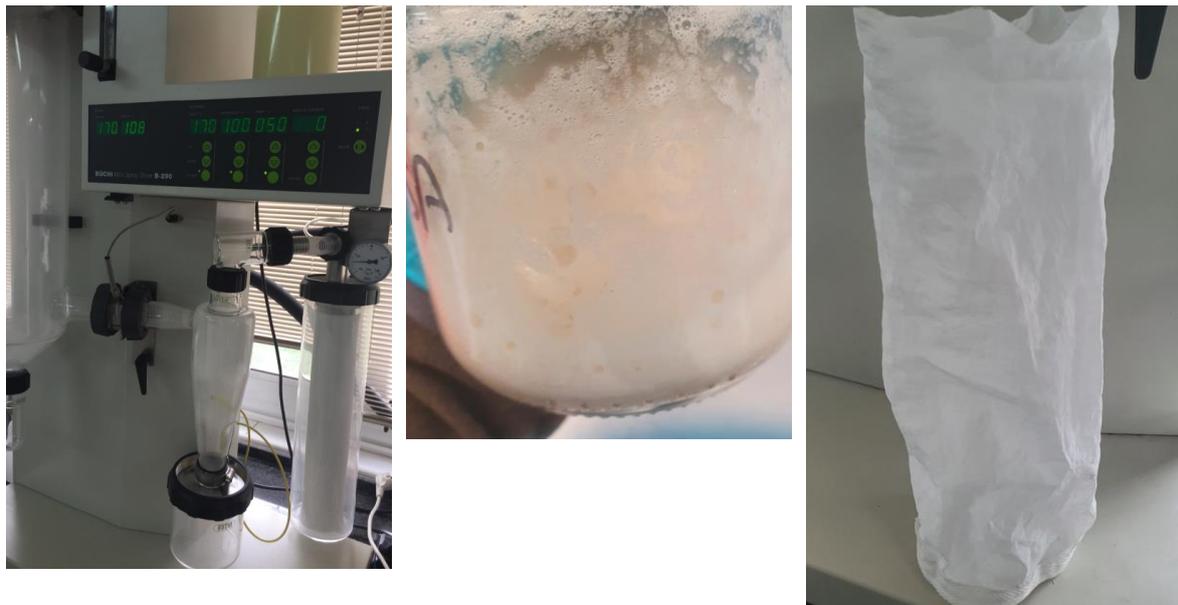


Figura 3. Equipo de microencapsulación con la emulsión y el filtro de 70 micras.

Esos parámetros son clave para obtener los microencapsulados, fue necesario optimizarlos en cada caso en función de la emulsión empleada. Anteriormente se habían llevado a cabo pruebas para familiarizarnos con el equipo, pero no se había logrado microencapsulados con rendimientos adecuados que proporcionasen a los alimentos a los que se les incorpora un contenido en omega 3 adecuado para etiquetar debido a ese bajo rendimiento.

En el caso de la temperatura del inlet (temperatura de entrada), esta temperatura es necesario optimizarla de manera que se mantenga a la salida una temperatura aproximada de 70°C (no puede bajar de esa temperatura porque se introduce agua en la zona donde se está recogiendo el microencapsulado, y tampoco temperaturas superiores a 70 °C porque se degradarían los lípidos).

Se hicieron pruebas variando la temperatura de inlet desde: 130-220°C.

Se optimizaron también el porcentaje de aspiración (entre 50-100 %) y el % de bombeo (el cual depende de la emulsión, de la temperatura y del flujo) se probaron distintos porcentajes entre un (20 % a un 60 %).

Es necesario optimizar las condiciones de trabajo para cada emulsión ya que los distintos componentes y concentraciones presentes en las emulsiones hacen que las temperaturas de trabajo puedan variar.

Tras cada una de las pruebas es necesario llevar a cabo una etapa de limpieza del equipo exhaustiva para evitar restos de las emulsiones en las conexiones que puedan quedar adheridas y obturar el equipo.

Una vez optimizados esos parámetros se empiezan a recoger los microencapsulados obtenidos:

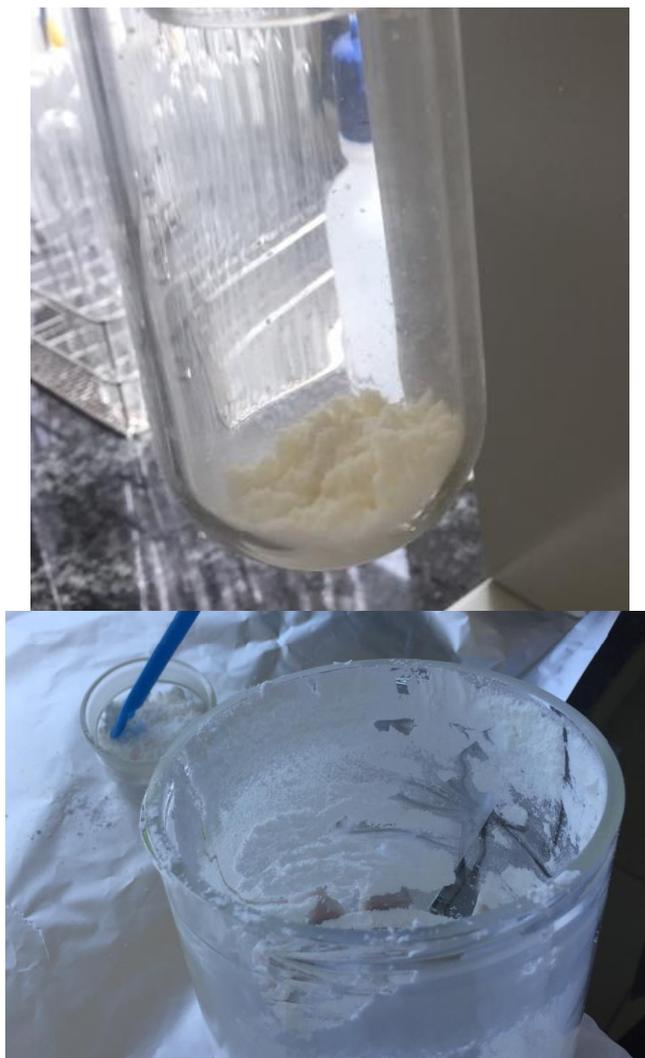


Figura 4. Microencapsulados obtenidos tras el proceso

Las condiciones óptimas finalmente seleccionadas tanto de composición de la emulsión como los parámetros del equipo se recogen a continuación, hay que destacar que estas condiciones se han seleccionado en función de la cantidad de microencapsulado que se ha conseguido, será necesario incorporarlos a las muestras y ver si realmente el rendimiento de la microencapsulación es adecuado:

Prueba 2	g	%
aceite lino /pescado	15	50,00
maltodextrina	32,5	
goma arabiga	2,5	
agua		50,00

Parámetros óptimos del equipo para prueba 2:

Temperatura inlet: 130 °C (con estas condiciones se mantiene el outlet a 75 °C).

Aspiracion:60%

Bomba: 60%.

Prueba 4	g	%
aceite lino /pescado	5	20,30
maltodextrina	5	
gelatina	10.3	
agua	70	79,70

Parámetros óptimos del equipo para prueba 4:

Temperatura inlet: 140 °C (con estas condiciones se mantiene el outlet a 78 °C).

Aspiracion:80%

Bomba: 60%.

Algunas de las pruebas anteriores también nos dieron buenos resultados, pero como el contenido incorporado de aceites era menor se han seleccionado las que más contenido nos proporcionan.

Se procederá a incorporar estos microencapsulados en las muestras y ver que contenidos en omega 3 se recuperan, así como la evaluación no solo a nivel físico químico sino sensorial de las muestras.

Indicador de grado de avance del Proyecto: se han seleccionado las condiciones que nos proporcionan mayor rendimiento tanto para el aceite de lino como para el de pescado, ahora será

necesario la incorporación a las matrices en los hitos posteriores para seleccionar finalmente las condiciones óptimas para obtener microcápsulas de ácidos graso omega 3.

H.1.T2- Puesta a punto, desarrollo y obtención de microencapsulados de vitaminas.

Tras la microencapsulación de ácidos omega 3 se procedió a llevar a cabo búsqueda bibliográfica de agentes de encapsulación para llevar a cabo el proceso con las vitaminas, para diseñar las pruebas a realizar, seleccionando los materiales de encapsulación y las vitaminas de interés.

En el caso de las vitaminas es necesario plantear varias estrategias distintas ya que hay vitaminas de naturaleza hidrosoluble y liposoluble y los planteamientos a la hora de la microencapsulación son diferentes.

Se plantearon tres estrategias:

-Microencapsulación liposoluble

-microencapsulación hidrosoluble

-Microencapsulación mix vitaminas (mezcla liposoluble e hidrosoluble)

De manera general en la bibliografía consultada se recogen principalmente tecnologías de microencapsulación sobre todo para vitaminas liposolubles. La bibliografía consultada ha sido muy amplia, de ese análisis exhaustivo se ha seleccionado como relevante la que recoge a continuación:

- (1) Nota aplicación Buchi: vitamin E and A
- (2) Nota aplicación Buchi: vitamin D3
- (3) Nota aplicación Buchi AN 712: vitamin E and A
- (4) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods Calude P Champagne and Patrick Fustier, *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18:184–190
- (5) Recent Developments in microencapsulation of Food ingredients, Kashappa Goud H. Desai and Hyun Jin Park, *Drying Technology* 23, 1361-1394, 2005
- (6) Micro- y nanoencapsulación de aditivos y otros compuestos de interés alimentario, Juan M. Irache, Ier Congreso Nacional de Agroalimentación Pamplona (Mayo 2010)
- (7) Materiales usados en la encapsulación, NA Guevara Breton, MT Jimenez Munguia, *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos* 2 (2008):22-27.
- (8) Applications of spray-drying in microencapsulation of Food ingredients: An overview
Adem Gharsallaoui , Gaelle Roudaut, Odile Chambin, André'e Voilley, Ré'mi Saurel, *Review, Food Research International* 40 (2007) 1107-1121.

En base a dicha bibliografía se plantearon diferentes pruebas en función de las necesidades de operación de trabajo del equipo.

Se evaluarán diferentes concentraciones de vitaminas (5, 10, 20 y 30 %) para conseguir incrementar la eficiencia de la microencapsulación.

Para llevar a cabo estas pruebas se combinarán diferentes materiales de recubrimientos: gelatina, goma arábica, goma xantana, goma garrofin, chitosan (polisacárido) con agua como solvente.

Indicador de grado de avance del Proyecto: Se ha llevado a cabo búsqueda bibliográfica, análisis y evaluación de la documentación y planteamiento de estrategias para el microencapsulamiento de vitaminas (hidrosolubles y/o liposolubles).

A continuación, se intentó evaluar las deficiencias habituales que se encuentran en los productos prototipo que se quieren desarrollar y que se corroboran analíticamente en la tarea 2.1, encontrándose que habitualmente en los productos seleccionados hay deficiencias de Vitamina B12 (hidrosoluble), con lo cual se llevó a cabo el desarrollo necesario para desarrollar los microencapsulados de esta vitamina. Sería importante que dicha vitamina no sufra degradación por el propio proceso de microencapsulación.

En este punto destacar, tal y como se explica con mayor profundidad en la tarea H2T2, que a la vista de los insatisfactorios resultados obtenidos en el Hito 4 en los estudios de biodisponibilidad realizados por Gaiker Centro Tecnológico en los que se evidenció que las muestras suplementadas con vitamina B12 microencapsulada no alcanzaba el límite de cuantificación analítica, se decidió ampliar el portfolio de vitaminas a microencapsular a las vitaminas D y B9.

De manera que para la microencapsulación de vitamina B12 se plantearon las siguientes pruebas en base a la bibliografía consultada:

Prueba 1	g	%
Vitamina B12	5	25
Gelatina	20	
agua	75	75

Prueba 2	g	%
Vitamina B12	10	25
Goma garrofin	15	
agua	75	75

Prueba 3	g	%
Vitamina B12	20	25
Goma Xantana	5	
agua	75	75

Prueba 4	g	%
Vitamina B12	30	45
Gelatina	15	
agua	55	55

Prueba 5	g	%
Vitamina B12	10	30
Gelatina	10	
Maltodextrina	10	
agua	70	70

Prueba 6	g	%
Vitamina B12	10	25
Maltodextrina	15	
agua	75	75

Prueba 7	g	%
Vitamina D	10	30
Gelatina	10	
Maltodextrina	10	
agua	70	70

Prueba 8	g	%
Vitamina B9	10	30
Gelatina	10	
Maltodextrina	10	
agua	70	70

Tabla 3: Pruebas con vitaminas

De igual manera que se ha comentado anteriormente y con más detalle se comentará en lo expuesto en la tarea H2.T2, las pruebas 7 y 8 se plantearon a raíz de los resultados insatisfactorios del estudio de biodisponibilidad para la vitamina B12 ejecutado en la anualidad 2022, en donde no se llegaba al límite de cuantificación de la técnica para abordar la segunda fase del estudio de biodisponibilidad, optando por evaluar las vitaminas D y B9.

Los pasos que se hicieron fueron:

- 1) Preparación de la emulsión en el momento de incorporarla al equipo Mini spray dryer (se hicieron emulsiones con Thermomix)
- 2) A continuación, es necesario filtrar la emulsión antes de colocarla en el equipo, ya que no puede tener partículas superiores a 0.7 micras:
- 3) Una vez obtenida la emulsión, se enciende el equipo y se controlan las temperaturas del inlet, del outlet, de aspiración, la bomba y la presión del gas.

En el caso de la temperatura del inlet (temperatura de entrada), esta temperatura es necesario optimizarla de manera que se mantenga a la salida una temperatura aproximada de 70°C (es crítico si baja de esa temperatura porque se introduce agua en la zona donde se está recogiendo el microencapsulado, y tampoco temperaturas superiores a 70 °C porque se degradarían las vitaminas).

Se hicieron pruebas variando la temperatura de inlet desde: 120-200°C.

Se optimizaron también el porcentaje de aspiración (entre 50-100 %) y el % de bombeo (el cual depende de la emulsión, de la temperatura y del flujo) se probaron distintos porcentajes entre un (30 % a un 60 %).

Es necesario optimizar las condiciones de trabajo para cada emulsión ya que los distintos componentes y concentraciones presentes en las emulsiones hacen que las temperaturas de trabajo puedan variar.

Tras cada una de las pruebas es necesario llevar a cabo una etapa de limpieza del equipo exhaustiva para evitar restos de las emulsiones en las conexiones que puedan quedar adheridas y obturar el equipo.

Las condiciones óptimas finalmente seleccionadas tanto de composición de la emulsión como los parámetros del equipo se recogen a continuación, hay que destacar que estas condiciones se han seleccionado en función de la cantidad de microencapsulado que se ha conseguido, será necesario incorporarlos a las muestras y ver si realmente el rendimiento de la microencapsulación es adecuado:

Prueba 5	g	%
Vitamina B12	10	30
Gelatina	10	
Maltodextrina	10	
agua	70	70

Prueba 7	g	%
Vitamina D	10	30
Gelatina	10	
Maltodextrina	10	
agua	70	70

Prueba 8	g	%
Vitamina B9	10	30
Gelatina	10	
Maltodextrina	10	
agua	70	70

Parámetros óptimos del equipo para las pruebas 5, 7 y 8:

Temperatura inlet: 130 °C (con estas condiciones se mantiene el outlet a 72 °C).

Aspiracion:80%

Bomba: 50%.

Algunas de las pruebas anteriores también nos dieron buenos resultados, pero como el contenido incorporado de vitaminas era menor y se han seleccionado las que más contenido nos proporcionan. En el caso de las pruebas con contenidos superiores de vitamina, es decir las pruebas 3 y 4 no proporcionaron resultados satisfactorios porque gran parte del microencapsulado se quedaba en las

paredes del equipo sin llegar al depósito final (ver imagen 5), y aunque se modificaron las condiciones de trabajo no fue posible recuperar más cantidad. En el caso de la prueba 6 se obtuvieron también buenos resultados, pero un poco menos satisfactorios que con la prueba 5.



Figura 5. Proceso de microencapsulación con pérdidas en el equipo (pruebas 3 y 4).

Se procederá a incorporar estos microencapsulados en las muestras y ver que contenidos en vitamina B12 se recuperan, así como la evaluación no solo a nivel físico químico sino sensorial de las muestras.

Indicador de grado de avance del Proyecto: se han seleccionado las condiciones que nos proporcionan mayor rendimiento para la microencapsulación de Vitamina B12, ahora será necesario la incorporación a las matrices en los hitos posteriores para seleccionar finalmente las condiciones óptimas para obtener microcápsulas de vitamina B12

H.1.T3- Puesta a punto, desarrollo y obtención de microencapsulados de bacterias ácido lácticas.

Se procedió a llevar a cabo búsqueda bibliográfica de agentes de encapsulación para llevar a cabo el proceso de microencapsulación de bacterias ácido lácticas, para diseñar las pruebas a realizar, seleccionando los materiales de encapsulación y el proceso a llevar a cabo. En este caso la viabilidad de los microorganismos probióticos sometidos a este procedimiento dependerá en gran medida de las temperaturas de entrada y de salida utilizadas en el proceso debido al daño que puede ocurrir en la membrana celular, con lo cual es necesario una adecuada optimización de las mismas.

La bibliografía consultada ha sido muy amplia, de ese análisis exhaustivo se ha seleccionado como relevante la bibliografía que se recoge a continuación (además de los artículos generales y reviews recogidos en el H1T1 y H1 T2):

- (1) Nota aplicación Buchi: lactic acid bacteria
- (2) Nota aplicación Buchi: lactic acid bacteria

- (3) Nota aplicación Buchi: lactic acid bacteria AN 552
- (4) Nota aplicación Buchi: lactobacillus paracasei AN 552
- (5) Nota aplicación Buchi: lactobacillus fermented AN 552
- (6) Nota aplicación Buchi: yeast
- (7) Nota aplicación Buchi: yeast 38-18-6
- (8) Nota aplicación Buchi: yeast extract
- (9) Nota aplicación Buchi: skimmed milk
- (10) Nota aplicación Buchi: pseudomonas bacteria
- (11) Nota aplicación Buchi: probiotic milk
- (12) Nota aplicación Buchi: whole milk
- (13) Nota aplicación Buchi: milk powder
- (14) Nota aplicación Buchi:lactosa
- (15) Nota aplicación Buchi:lactoglobulin
- (16) Nota aplicación Buchi:lactobacillus paracasei (1)
- (17) Nota aplicación Buchi:lactobacillus fermented
- (18) Nota aplicación Buchi:colostrum
- (19) Nota aplicación Buchi:bifidobacteria
- (20) Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. Boulardi with different Wall materials by spray drying, S. Arslan, M. Erbas, I. Tontul, A. Topuz, DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.034.
- (21) *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to be used in food industry, Joana Barbosa, Sandra Borges & Paula Teixeira, International Journal of Food Science and Technology 2015.
- (22) Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures, Xixuan Jin , Dan Custis, Biological Control 56 (2011) 202–208.
- (23) Reimann, PhD-work on Mini Spray Dryer B-290, institute of Food nutrition and health, ETH Zurich, Spray drying of Probiotics (Lactobacillus, Bifidobacteria)
- (24) Microencapsulation of gram-negative bacteria by spray drying, C. Yu, D. Han, W. Wang, International Journal of Food Engineering, 2010, vol 6 Issue 2 article 3.

Según algunos autores en la microencapsulación de bacterias ácido lácticas se necesitan unos agentes protectores de microorganismos probióticos como son los oligosacáridos tipo jarabe de maíz, sucrosa y maltodextrina, donde esta última se utiliza principalmente como material pared en técnicas de

secado por aspersión por su efecto protector frente a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos. Además, se tienen en cuenta la incorporación de lípidos, siendo los más utilizados la cera, parafina, ácidos esteáricos, diglicéridos y aceites. Estos aumentan la viabilidad durante el almacenamiento a bajas temperaturas y los protegen de los fluidos intestinales y gástricos.

Con lo cual, una vez analizada y evaluada la bibliografía se han planteado numerosas pruebas donde se evalúen distintas concentraciones de bacterias ácido lácticas: en rangos de 10^5 - 10^9 cfu/mL.

Indicador de grado de avance del Proyecto: Se ha llevado a cabo búsqueda bibliográfica, análisis y evaluación de la documentación y planteamiento de estrategias para el microencapsulamiento de bacterias ácido lácticas.

De manera que en base a la bibliografía se plantearon las siguientes pruebas:

Prueba 1	g	%
Bacterias ácido lácticas 10^9 cfu/mL	20	40
maltodextrina	10	
Leche en polvo desnatada	10	
agua	60	60

Prueba 2	g	%
Bacterias ácido lácticas 10^7 cfu/mL	20	40
maltodextrina	10	
Leche en polvo desnatada	10	
agua	60	60

Prueba 3	g	%
Bacterias ácido lácticas 10^5 cfu/mL	20	40
maltodextrina	10	
Leche en polvo desnatada	10	
agua	60	60

Prueba 4	g	%
Bac. Ac. Lac. Medio cultivo 10^9 cfu/mL	30	30
agua	70	70

Prueba 5	g	%
Bacterias ácido lácticas 10^9 cfu/mL	20	30
Leche en polvo desnatada	10	
agua	70	70

Tabla 4: Pruebas con bacterias ácido lácticas

En el caso de la temperatura del inlet (temperatura de entrada), esta temperatura es necesario optimizarla de manera que se mantenga a la salida una temperatura aproximada de 80-85°C (según bibliografía se observan temperaturas superiores a las consideradas en las otras pruebas realizadas).

Se hicieron pruebas variando la temperatura de inlet desde: 130-230°C.

Se optimizaron también el porcentaje de aspiración (entre 50-100 %) y el % de bombeo (el cual depende de la emulsión, de la temperatura y del flujo) se probaron distintos porcentajes entre un (30 % a un 60 %).

Es necesario optimizar las condiciones de trabajo para cada emulsión ya que los distintos componentes y concentraciones presentes en las emulsiones hacen que las temperaturas de trabajo puedan variar.

Tras cada una de las pruebas es necesario llevar a cabo una etapa de limpieza del equipo exhaustiva para evitar restos de las emulsiones en las conexiones que puedan quedar adheridas y obturar el equipo.

Las condiciones óptimas finalmente seleccionadas tanto de composición de la emulsión como los parámetros del equipo se recogen a continuación, hay que destacar que estas condiciones se han seleccionado en función de la cantidad de microencapsulado que se ha conseguido, será necesario incorporarlos a las muestras y ver si realmente el rendimiento de la microencapsulación es adecuado:

Prueba 5		g	%
Bacterias acido lácticas 10⁹ cfu/mL		20	30
Leche en polvo desnatada		10	
agua		70	70

Prueba 1		g	%
Bacterias acido lácticas 10⁹ cfu/mL		20	40
maltodextrina		10	
Leche en polvo desnatada		10	
agua		60	60

Parámetros óptimos del equipo para prueba 5 y 1:

Temperatura inlet: 170 °C (con estas condiciones se mantiene el outlet a 85 °C).

Aspiracion:70%

Bomba: 40%.

Algunas de las pruebas anteriores también nos dieron buenos resultados, pero como el contenido incorporado de bacterias era menor y se han seleccionado las que más contenido nos proporcionan.

En el caso de la prueba 4, el rendimiento es mucho más ajo que en el resto de las pruebas.

Se procederá a incorporar estos microencapsulados en las muestras y ver que contenidos de bacterias ácido lácticas se recuperan, así como la evaluación no solo a nivel microbiológico, físico químico sino sensorial de las muestras.

Indicador de grado de avance del Proyecto: se han seleccionado las condiciones que nos proporcionan mayor rendimiento para la microencapsulación de bacterias ácido lácticas, ahora será necesario la incorporación a las matrices en los hitos posteriores para seleccionar finalmente las condiciones óptimas para obtener microcápsulas de bacterias ácido lácticas.

H.1.T4- Puesta a punto, desarrollo y obtención de microencapsulados combinados

Una vez se han obtenido las microcápsulas de las tareas anteriores se procedió a evaluar la combinación de principios activos encapsulados para incorporar (como cuarta línea de trabajo) a las matrices alimentarias en un único ingrediente la combinación de principios activos. Ya que el simplificar la adición de dichos microencapsulados se puede facilitar a las empresas los procesos de elaboración de estos productos saludables. Por esta razón y porque a nivel económico pueda resultar más rentable para las empresas, se procederá a evaluar una cuarta línea de trabajo, que es la que se desarrollara en esta tarea.

Esto supone un reto tecnológico importante ya que existe muy poca información en el mercado sobre microcápsulas de varios nutrientes. Se llevo a cabo búsqueda bibliográfica y lo que se encontró fue la combinación de principios activos con naturalezas químicas muy parecidas en cuanto a lipofilia y solubilidad.

A continuación, se recoge la bibliografía encontrada:

- (1) Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying Seid Mahdi Jafari a; Elham Assadpoor a; Yinghe He b; Bhesh Bhandari, Drying Technology, 26:7, 816 — 835, 2008.
- (2) Applications of spray-drying in microencapsulation of Food ingredients: An overview Adem Gharsallaoui , Gaelle Roudaut, Odile Chambin, André'e Voilley, Ré'mi Saurel, Review, Food Research International 40 (2007) 1107-1121.
- (3) Nota aplicación Buchi AN 712: vitamin E and A
- (4) Nota Aplicación Buchi: Vitamina E and A.
- (5) Solvent evaporation, Solvent extraction and Spray drying for Polylactide Microsphere preparation. Int. J. Pharm., Vol. 84, No. 2, p. 151-159 (1992).

De manera que en base a la bibliografía se plantearon las siguientes pruebas:

Prueba 1		g	%
Bacterias ácido lácticas	10⁹ cfu/mL	20	40
maltodextrina	10		
Vitamina B12	10		
agua		60	60

Prueba 2		g	%
----------	--	---	---

Aceite lino/pescado	20	40
maltodextrina	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 3	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
maltodextrina	10	
Bacterias acido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 4	g	%
Bacterias acido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	20	40
Leche en polvo desnatada	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 5	g	%
Bacterias acido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	20	40
Leche en polvo desnatada	10	
Aceite lino/pescado	10	
agua	60	60

Prueba 6	g	%
Bacterias acido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	20	40
maltodextrina	10	
Aceite lino/pescado	10	
agua	60	60

Prueba 7	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
Leche en polvo desnatada	10	
Bacterias acido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 8	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
Goma Xantana	10	

Bacterias ácido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 9	g	%
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	30
Leche en polvo desnatada	10	
Vitamina B12	10	
agua	70	70

Prueba 10	g	%
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	40
Maltodextrina	20	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 11	g	%
Aceite lino/pescado	10	30
maltodextrina	10	
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	
agua	70	70

Prueba 13	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
maltodextrina	10	
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 14	g	%
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	30
Alginato	10	
Vitamina D	10	
agua	70	60

Prueba 15	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
Alginato	10	
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	
Vitamina B9	10	

agua	60	60
------	----	----

Tabla 5: Pruebas combinadas

En el caso de la temperatura del inlet (temperatura de entrada), esta temperatura es necesario optimizarla de manera que se mantenga a la salida una temperatura aproximada de 70-75°C (según bibliografía se observan temperaturas superiores a las consideradas en las otras pruebas realizadas).

Se hicieron pruebas variando la temperatura de inlet desde: 130-230°C.

Se optimizaron también el porcentaje de aspiración (entre 50-100 %) y el % de bombeo (el cual depende de la emulsión, de la temperatura y del flujo) se probaron distintos porcentajes entre un (30 % a un 60 %).

Es necesario optimizar las condiciones de trabajo para cada emulsión ya que los distintos componentes y concentraciones presentes en las emulsiones hacen que las temperaturas de trabajo puedan variar.

Tras cada una de las pruebas es necesario llevar a cabo una etapa de limpieza del equipo exhaustiva para evitar restos de las emulsiones en las conexiones que puedan quedar adheridas y obturar el equipo

Destacar que los probióticos finalmente seleccionados fueron los correspondientes a las cepas de la especie *Bifidobacterium lactis* (comercialmente denominada FD-DVS-nutrish BB12) debido a que son una de las cepas mejor estudiadas y con mejor respuesta fisiológica a nivel funcional, además de estar perfectamente caracterizada en cuanto a su concentración óptima para ejercer el efecto beneficioso.

De igual manera que se ha comentado anteriormente y con más detalle se comentará en lo expuesto en la tarea H2.T2, las pruebas 14 y 15 se plantearon a raíz de los resultados insatisfactorios del estudio de biodisponibilidad para la vitamina B12 ejecutado en la anualidad 2022, en donde no se llegaba al límite de cuantificación de la técnica para abordar la segunda fase del estudio de biodisponibilidad, optando por evaluar las vitaminas D y B9

Las condiciones óptimas finalmente seleccionadas tanto de composición de la emulsión como los parámetros del equipo se recogen a continuación, hay que destacar que estas condiciones se han seleccionado en función de la cantidad de microencapsulado que se ha conseguido, y de la especie concreta de la bacteria ácido láctica (*bifidubacterium lactis*), así como de su concentración en el inóculo acorde con la recomendación para ejercer un efecto beneficioso. En cualquier caso, será necesario incorporarlos a las muestras y ver si realmente el rendimiento de la microencapsulación es el adecuado:

Prueba 5	g	%
Bacterias ácido lácticas 10 ⁹ cfu/mL	20	40
Leche en polvo desnatada	10	
Aceite lino/pescado	10	
agua	60	60

Prueba 9	g	%
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	30
Leche en polvo desnatada	10	
Vitamina B12	10	
agua	70	60

Parámetros óptimos del equipo para las pruebas 5 y 9:

Temperatura inlet: 130 °C (con estas condiciones se mantiene el outlet a 72 °C).

Aspiracion:80%

Bomba: 50%.

Prueba 13	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
maltodextrina	10	
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	
Vitamina B12	10	
agua	60	60

Prueba 14	g	%
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	30
Alginato	10	
Vitamina D	10	
agua	70	60

Prueba 15	g	%
Aceite lino/pescado	10	40
Alginato	10	
<i>Bifidubacterim lactis</i> BB12 10 ¹¹ cfu/mL	10	
Vitamina B9	10	
agua	60	60

Parámetros óptimos del equipo para las pruebas 13, 14 y 15:

Temperatura inlet: 140 °C (con estas condiciones se mantiene el outlet a 74 °C).

Aspiracion:70%

Bomba: 50%.

Indicador de grado de avance del Proyecto: Se ha llevado a cabo búsqueda bibliográfica, análisis y evaluación de la documentación y planteamiento de estrategias para el microencapsulamiento de principios activos combinados.

HITO.2 – Evaluación de la estabilidad de dichos ingredientes funcionales en productos tanto en crudo como tras tratamiento térmico y estudio de posibles declaraciones nutricionales para su inclusión en el etiquetado.

Tras la obtención de las microcápsulas de los micronutrientes en el HITO 1, se fueron incorporando a la matriz alimentaria con el objeto de obtener un producto final (enriquecido en bacterias ácido lácticas y/o ácidos omega 3 y/o vitaminas). Para ello se tuvo en cuenta el característico proceso tecnológico para la elaboración de los productos donde se le somete a un tratamiento térmico, con lo cual es necesario comprobar la estabilidad de los principios funcionales incorporados tras este proceso de calentamiento y un control estricto de las etapas del proceso. En base a este proceso se diseñaron en esta etapa las estrategias a seguir con las modificaciones de proceso necesarias para lograr las matrices alimentarias saludables.

Como ya se ha comentado en la tarea anterior se desarrollaron microcápsulas de manera independiente, y microcápsulas combinadas, que se fueron añadiendo a diferentes productos (producto cárnico y producto derivado de la pesca).

Se revisó también la formulación para intentar disminuir el contenido en grasa, sal y azúcares de estos preparados de manera que se obtuvieran productos con un perfil nutricional más equilibrado y saludable y además enriquecidos en los micronutrientes funcionales de interés. Para ello se realizó una selección de las materias primas con el objetivo de reducir los ácidos grasos saturados, así como otros aditivos que aportan elevado contenido en sodio y azúcares, modificando la formulación sin que el producto se vea afectado sensorialmente.

H.2.T1- Caracterización de la composición microbiológica, físico química y sensorial inicial de los productos de partida (productos cárnicos y productos derivados de la pesca)

En esta tarea se evaluó la composición microbiológica y físico química de los productos seleccionados para conocer la concentración y carga microbiana que presentan de partida tanto a nivel de parámetros microbiológicos y de composición nutricional (grasa, proteína, azúcares, sal, etc.). así como de vitamina B12 (vitamina añadida y objeto de estudio) y de perfil lipídico.

Destacar que el gasto previsto en la anualidad 2023 de subcontratación para la determinación FQ de productos iniciales no fue necesario llevarlo a cabo al disponer de información suficiente con los resultados obtenidos en la caracterización subcontratada ejecutada en la anualidad 2022, habiéndose sobrestimado la previsión de coste necesaria en la solicitud sin ser realmente necesaria.

Esta información es muy importante ya que este estudio nos permitió hacer el cálculo para conocer exactamente en qué nivel concentración hay que fortificar (enriquecer) esos productos para poder aportar mediante encapsulados las cantidades necesarias de los principios activos para cumplir con la legislación y poder etiquetar adecuadamente cada producto.

Fue necesario también llevar a cabo una evaluación sensorial de los productos para poder comparar con los productos una vez que se han modificado sus formulaciones para incluir los encapsulados y verificar que los atributos sobre todo textura, olor y sabor no se ven alterados tras la incorporación de los principios activos.

En principio, se seleccionaron dos tipos de producto: Nuggets de pollo y barritas de merluza. En ambos casos estos productos se someten a un tratamiento térmico basado en fritura (lo que supone temperaturas bastante elevadas) y por esta razón se eligieron para comprobar la estabilidad térmica de los microencapsulados.

A continuación, se detalla el proceso habitual de obtención de estos productos y las características iniciales que poseen:

Nuggets Pollo:

DENOMINACIÓN	NUGGETS POLLO	
ELABORACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - Recepción de carne (pollo a $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la papada a $\leq 7^{\circ}\text{C}$) y especias y aditivos (T^{a} ambiente) - Almacenamiento de la carne (pollo a $\leq 4^{\circ}\text{C}$, la papada a $\leq 7^{\circ}\text{C}$) y especias y aditivos a T^{a} ambiente - Acondicionamiento de la carne - Picado carne placa 6 mm - Adobado de todos los ingredientes durante 3 minutos - Reposo en cámara de refrigeración 1 día - Conformado de los Nuggets - Rebozado - Envasado - Almacenamiento del producto terminado ($T^{\text{a}} < 4^{\circ}\text{C}$) - Expedición 	
COMPOSICIÓN	INGREDIENTES CÁRNICOS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Pollo - Papada 	
	INGREDIENTES NO CÁRNICOS	
	<ul style="list-style-type: none"> - Sal - Nuez Moscada - Ajo Polvo - Pimienta Negra - Fibra Guisante - Harina arroz 	

Barritas de Merluza:

DENOMINACIÓN	BARRITAS MERLUZA	
ELABORACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> - Recepción de pescado ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) y especias y aditivos (T^{a} ambiente) - Almacenamiento de la carne (merluza a $\leq 4^{\circ}\text{C}$) y especias y aditivos a T^{a} ambiente - Acondicionamiento del pescado - Preparación barritas - Rebozado con almidón trigo, huevo y pan rallado - Envasado - Almacenamiento del producto terminado ($T^{\text{a}} < 4^{\circ}\text{C}$) - Expedición 	
COMPOSICIÓN	INGREDIENTES PESCADO	
	<ul style="list-style-type: none"> - Merluza 	

INGREDIENTES NO PESCADO	
-	Sal
-	Huevo
-	Pan rallado
-	Aceite de oliva
-	Almidón trigo

A continuación, se recoge el estudio nutricional de los productos iniciales donde se evaluaron los siguientes parámetros: humedad, grasa, proteína, cenizas, hidratos de carbono, azúcares, sal, perfil lipídico completo con omega 3. En los parámetros mayoritarios se indican promedios y desviaciones estándar (n=3).

PARÁMETROS	Nuggets pollo	Barritas merluza
<i>Energía (Kcal/100g)</i>	136 +/-10	175+/-12
<i>Hidratos de carbono (g/100g)</i>	16.93+/-1.2	20.23+/-1.3
<i>Fibra (g/100g)</i>	<0.5	<0.5
<i>Humedad (g/100g)</i>	64.2+/-1.5	61.02+/-1.5
<i>proteína (g/100g)</i>	16.75+/-0.7	11.88+/-0.6
<i>cenizas (g/100g)</i>	1.94+/-0.5	1.71+/-0.5
<i>Grasa (g/100g)</i>	0.16+/-0.1	5.16+/-0.3
<i>Sal (g/100 g)</i>	1.5	0.83
<i>Ácidos grasos saturados (g/100g)</i>	0.054	0,0217
<i>Ácidos grasos monoinsaturados (g/100g)</i>	0.058	0,048
<i>Ácidos grasos poliinsaturados (g/100g)</i>	0.0474	0,089
<i>Vitamina B12 (µg/100g)</i>	<0.5	<0.5
<i>Omega 3 (g/100g)</i>	0.0035	0,0035
<i>Omega 6 (g/100g)</i>	0.0438	0,0856

Tabla 6: Estudio nutricional productos iniciales

Se elaboró una ficha de cata con los atributos: *aspecto, olor, textura y sabor* y una escala numérica de 1 a 7 para poder cuantificar cada atributo, así como una valoración global.

FICHA CATA DE CONSUMIDOR		asincan centro tecnológico	
Fecha:			
Nombre:			
Producto:			
CÓDIGO Nº:			
ASPECTO			
OLOR			
TEXTURA			
SABOR			
VALORACIÓN GLOBAL			

- Valor "1", me desagrada mucho
- Valor "2", me desagrada bastante
- Valor "3", me desagrada algo
- Valor "4" ni me gusta ni me disgusta
- Valor "5" me gusta algo
- Valor "6" me gusta bastante
- Valor "7" me gusta mucho

Los resultados que se presentan a continuación se han obtenido del análisis estadístico de la “moda” de las puntuaciones otorgadas por cada uno de los catadores, con el fin de obtener el valor que se repite con mayor frecuencia. Los resultados obtenidos para los productos elaborados en los ensayos experimentales se resumen en las siguientes tablas.

ATRIBUTOS (1-7)	Nuggets	Barritas
ASPECTO	2	3
OLOR	4	1
TEXTURA	3	1
SABOR	4	2
VALORACIÓN GLOBAL	4	3

Tabla 7: Puntuaciones análisis sensorial

Posteriormente se realizaron catas a diferentes tiempos de conservación, concretamente a t =0 y a t= 15 días, manteniendo los productos en condiciones de congelación (pues este tipo de productos son enormemente perecederos, por el grado de manipulación que presentan), obteniendo los siguientes resultados de la “moda” estadística:

ATRIBUTOS (1-7)	Nuggets		Barritas	
	t = 0 días	t = 15 días	t = 0 días	t = 15 días
ASPECTO	3	3	3	2
OLOR	4	2	2	2
TEXTURA	4	3	1	1
SABOR	4	2	2	1
VALORACIÓN GLOBAL	4	3	3	2

Tabla 8: Puntuaciones análisis sensorial a diferentes tiempos

Cabe destacar que tras 15 días de congelación el producto presenta una ligera pérdida de aceptación sensorial a la vista de las puntuaciones obtenidas de los cálculos de la moda estadística obtenidos de las puntuaciones otorgadas por los catadores durante el proceso de cata.

Asimismo, los catadores hicieron una ficha descriptiva para cada producto que se recoge a continuación:

CARÁCTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y TECNOLÓGICAS NUGGEST POLLO

Olor característico y a especias de intensidad media

Sabor a carne característico, ligero sabor salado

Color naranja característico

Masticabilidad media, untuosidad

CARÁCTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y TECNOLÓGICAS BARRITAS MERLUZA

Olor característico y a especias de intensidad media

Sabor a pescado característico, ligero sabor salado

Color naranja característico del rebozado

Masticabilidad media, untuosidad

De la misma manera que para las puntuaciones de los diferentes atributos, se realizó una ficha descriptiva de los productos catados tanto para a tiempo inicial como a tiempo 15 días, mantenidos los productos de igual manera en condiciones de congelación:

DESCRIPTIVA ORGANOLÉPTICA Y TECNOLÓGICA	Nuggets		Barritas	
	t = 0 días	t = 15 días	t = 0 días	t = 15 días
OLOR	Característico Especias (pimienta)	No se aprecian cambios	Típico a pescado rebozado	Ligero olor a "congelado"
SABOR	Típico Salado y especiado	Ligera disminución de sabor	Sabor propio de la merluza	No se aprecian cambios
COLOR	Dorado anaranjado	No se aprecian cambios	Color rebozado característico	No se aprecian cambios
MASTICABILIDAD	Compacto Untuoso	Se aprecia menos compacto	Compacto, Jugoso	Menos compacto, más "baboso"

Tabla 9: sensorial descriptivo

Además, se llevó a cabo una evaluación microbiológica para evaluar la carga microbiana inicial determinando para ello:

- Recuento de Aerobios mesófilos

- Recuento de Enterobacterias
- Recuento de bacterias ácido-lácticas
- Investigación Salmonella sp.
- Investigación Listeria monocytogenes

INICIAL	<i>NUGGEST POLLO</i>	<i>BARRITAS MERLUZA</i>
Recuento de Aerobios mesófilos	3.50E+02 ufc/g	2.70E+03 ufc/g
Recuento de Enterobacterias	<10	<10
Recuento de bacterias ácido-lácticas	<10	<10
Investigación <i>Salmonella</i> spp	Ausencia	Ausencia
Investigación <i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia	Ausencia

Tabla 10: Caracterización microbiológica inicial

De la misma manera, se compararon los resultados microbiológicos obtenidos en la caracterización de los productos de partida, con los que arrojaría tras 15 días en condiciones de congelación, sin ningún cambio sustancial:

t = 15 DÍAS EN CONGELACIÓN	<i>NUGGEST POLLO</i>	<i>BARRITAS MERLUZA</i>
<i>Recuento de Aerobios mesófilos</i>	4.10E+02 ufc/g	5.30E+03 ufc/g
<i>Recuento de Enterobacterias</i>	<10	<10
Recuento de bacterias ácido-lácticas	<10	<10

Investigación <i>Salmonella</i> spp	Ausencia	Ausencia
Investigación <i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia	Ausencia

Tabla 11: Caracterización microbiológica a los 15 días

Como se observa en las tablas son valores aceptables en todos los casos.

Indicadores de grado de avance del Proyecto: se han llevado a cabo los análisis de las muestras de partida, se elabora un entregable con los mismos.

H.2.T2- Incorporación de microencapsulados, revisión de formulaciones para optimizar perfil nutricional: Combinación de procesos de reformulación y microencapsulación

En un primer momento, en base a los resultados del HITO1 y la tarea H2T1 se diseñaron estrategias de incorporación de los encapsulados y se evaluó también la reformulación de los productos para mejorar el perfil nutricional de los mismos.

Tras la obtención de las microcápsulas de los micronutrientes en el HITO 1, se fueron incorporando a las matrices alimentarias con el objeto de obtener un producto final (producto cárnico y producto derivado de la pesca) enriquecido.

Se han elegido Nuggets de pollo y Barritas de merluza ya que se someten a un tratamiento térmico basado en fritura y por esta razón se eligen para comprobar la estabilidad térmica de los microencapsulados, ya que en fritura se pueden alcanzar temperaturas muy elevadas de 180-200°C.

Se revisó el característico proceso tecnológico para la elaboración de cada producto, revisando las etapas donde se les somete a un tratamiento térmico, con lo cual es necesario comprobar la estabilidad de los principios funcionales incorporados tras este proceso de calentamiento y un control estricto de las etapas del proceso. En base a este proceso se diseñaron en esta etapa las estrategias a seguir con las modificaciones de proceso necesarias para lograr las matrices alimentarias saludables. Evaluando las concentraciones a utilizar en cada caso.

Las estrategias planteadas a la hora del enriquecimiento con los microencapsulados se resumen en la siguiente tabla:

Pruebas planteadas	Nuggets pollo	Barritas merluza
--------------------	---------------	------------------

<p>P1</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P2</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P3</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 5</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P4</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P5</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Pruebas 5 y 1</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de guisante proporción 25:75 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón trigo proporción 25:75 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P6</p> <p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9 y 13</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P7</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación fibra de</p>	<p>Incorporación etapa mediante rebozado incorporación Almidón</p>

<p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>guisante proporción 25:75 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>trigo proporción 25:75 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P8</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencp. Vitam. D Prueba 7</p> <p>Microencp. Vitam. B9 Prueba 8</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p> <p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P9</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencp. Vitam. D Prueba 7</p> <p>Microencp. Vitam. B9 Prueba 8</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p> <p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación de alginato sódico</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación de alginato sódico</p>

Tabla 12: Estrategias planteadas

Se evaluaron inicialmente los resultados tras la incorporación de los microencapsulados y posteriormente se evaluó la posibilidad de ajustar la formulación para lograr productos con un perfil nutricional más equilibrado. En este último sentido y a la vista de los resultados de composición nutricional obtenidos en la tarea H.2.T1 la posible optimización en la reformulación se centró exclusivamente en dos aspectos; por un lado disminuir un 30 % el contenido de sal añadida para lograr un perfil “bajo en sodio” y por otro lado, emplear aceite de girasol alto oleico en la fritura, ya

que el aceite de girasol alto oleico presenta las bondades del girasol en cuanto al elevado contenido de vitamina E, junto con las bondades del de oliva al presentar un perfil lipídico monoinsaturado, y con mayor resistencia a la fritura.

En este punto es fundamental destacar que se ampliaron los trabajos de reformulación no sólo a nivel de la composición cualitativa, sino a la vitamina a micronencapsular, además de la vitamina B12 inicialmente seleccionada, concretamente ampliando a las vitaminas D y B9 (ácido fólico). Este hecho vino derivado por dos cuestiones. En primer lugar, los resultados que arrojó el estudio de biodisponibilidad realizado por Gaiker Centro Tecnológico en la anualidad 2022 no logró obtener una concentración de vitamina B12 dentro del límite de cuantificación para poder abordar la segunda fase de biodisponibilidad (tras la digestión realizada en la primera fase de bioaccesibilidad), hecho que llevó a evaluar otro tipo de vitaminas con el fin de poder tratar de evidenciar una adecuada biodisponibilidad tras la digestión. En segundo lugar, hay un elevado porcentaje de la población que presenta niveles insuficientes de vitamina D, tanto en población joven sana, y que no se relaciona con las horas de insolación ni con el factor de protección solar, así ni como por la escasa ingesta de alimentos ricos en vitamina D y la ausencia de alimentos enriquecidos, ni junto con la escasa insolación efectiva en este grupo de edad, como en población menor y mayor de 65 de años¹²³. De la misma manera ocurre con los niveles de vitamina B9, tanto en población sénior, como en ciertos grupos de edad⁴, además de ser un nutriente esencial a la hora del desarrollo intrauterino para la prevención de gravísimas malformaciones durante la gestación⁵.

Este hecho no supuso alteración alguna en el diseño experimental planteado, más bien al contrario, pues a la vista de los resultados poco satisfactorios obtenidos en el estudio de biodisponibilidad de la anualidad 2022, para la vitamina B12, dentro del Hito 4, se corrigió el planteamiento técnico, ampliando el repertorio de vitaminas, tratando de solventar así las dificultades técnicas y riesgos tecnológicos que se encontraron para tratar de solucionarlos y tratar de lograr los objetivos planteados. Asimismo, respecto a la estrategia de incorporación, se siguió la misma que para la vitamina B12, por lo que no se incurrió en un gasto a mayores, encontrando una alternativa rápida, eficaz y técnicamente sostenible.

Indicadores de grado de avance del Proyecto: se realizó un Informe/Documento de trabajo con las formulaciones a desarrollar.

¹ Rodríguez-Rodríguez, E., Aparicio, A., Sánchez-Rodríguez, P., Lorenzo-Mora, A. M., López-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2019). Deficiencia en vitamina D de la población española. Importancia del huevo en la mejora nutricional. *Nutr. hosp.*, 3-7.

² Calatayud, M., Jódar, E., Sánchez, R., Guadalix, S., & Hawkins, F. (2009). Prevalencia de concentraciones deficientes e insuficientes de vitamina D en una población joven y sana. *Endocrinología y Nutrición*, 56(4), 164-169

³ Bennasar, A. B., Vizoso, A. B., del Castillo, P. A., Garcia, M. P., Guerrero, M. Á. E., & Garcia, D. M. (2020). Niveles de vitamina D en la Población Balear. *Medicina balear*, 35(3), 11-15.

⁴ del Carmen Vazquez-Pedrazuela, M., Canton-Alvarez, M. B., de la Fuente, M. D. C., Soloaga-Morales, A., Collazos-del Castillo, J. M., & Sertal-Parcero, R. (2012). El déficit de vitamina B12 y ácido fólico en la población mayor de 65 años: estudio descriptivo. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 47(6), 259-261.

⁵ Álvarez García-morán, B. (2022). *Estado nutricional de Vitaminas D, B12 y ácido fólico en embarazadas en el primer trimestre de gestación* (Bachelor's thesis).

H.2.T3- Obtención de al menos un prototipo de cada producto

En esta tarea se desarrolló un prototipo de cada una de las pruebas planteadas en la anterior tarea H2.T2. La realización de esta tarea tuvo lugar en la planta piloto de ASINCAR, elaborando lotes de suficiente cantidad acordes con la cantidad mínima de procesado para el correcto funcionamiento de cada equipo de procesado de la planta piloto.

De esta manera, inicialmente se elaboró un prototipo de cada una de las pruebas planteadas en la tarea anterior, desde la P1 hasta la P9, con todas las subpruebas que en cada una de ellas están contempladas.

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

Pruebas planteadas	Nuggets pollo	Barritas merluza
P1 Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4 Microencp. Vitam. B12 Prueba 5	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.
P2 Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2 Microencp. Vitam. B12 Prueba 5	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.
P3 Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4 Microencp. Vitam. B12 Prueba 5 Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 5	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.
P4 Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2 Microencp. Vitam. B12 Prueba 5 Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.
P5	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de	Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón

<p>Microencap. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2</p> <p>Microencap. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Pruebas 5 y 1</p>	<p>guisante proporción 25:75 g:g (microencap: fibra) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.</p>	<p>trigo proporción 25:75 g:g (microencap: almidón) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.</p>
<p>P6</p> <p>Microencap, combinado Pruebas 5, 9 y 13</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado</p>
<p>P7</p> <p>Microencap, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de guisante proporción 25:75 g:g (microencap: fibra) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 25:75 g:g (microencap: almidón) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado</p>
<p>P8</p> <p>Microencap. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencap. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Vitam. D Prueba 7</p> <p>Microencap. Vitam. B9 Prueba 8</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p> <p>Microencap, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>
<p>P9</p> <p>Microencap. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencap. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Vitam. D Prueba 7</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación de alginato sódico</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación de alginato sódico</p>

<p>Microencp. Vitam. B9 Prueba 8</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p> <p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>		
--	--	--

Tabla 13: Prototipos desarrollados

Una vez elaborado un prototipo de cada una de las pruebas y comprobada su aceptación a través de los trabajos desarrollados en la siguiente tarea H2.T4, se repitieron los prototipos que mejor aceptación y resultados y arrojaron, principalmente y en primer lugar a nivel organoléptico, pues es un aspecto fundamental a validar antes que cualquier otro aspecto nutricional, físico-químico o incluso microbiológico, ya que si un alimento no es atractivo y satisfactorio en términos de aceptación sensorial, cualquier otra cuestión adicional carece de importancia, ya que la base de cualquier alimento es que en primera instancia debe gustar al consumidor.

Las pruebas que arrojaron resultados satisfactorios iniciales se repitieron, desarrollándose de nuevo los siguientes prototipos para centrar en estos la validación final y los estudios de biodisponibilidad:

Pruebas planteadas	Nuggets pollo	Barritas merluza
<p>P1</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de quisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.</p>
<p>P2</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 2</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de quisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo mitad y mitad que cada microencapsulado.</p>
<p>P3</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 5</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación fibra de quisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.</p>	<p>Incorporación etapa rebozado mediante incorporación Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón) Añadiendo un 7% de cada microencapsulado.</p>

<p>P8</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencp. Vitam. D Prueba 7</p> <p>Microencp. Vitam. B9 Prueba 8</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p> <p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante fibra de guisante proporción 20:80 g:g (microencap: fibra)</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante Almidón trigo proporción 20:80 g:g (microencap: almidón)</p>	
<p>P9</p> <p>Microencp. Omega 3 (aceite lino) Prueba 4</p> <p>Microencp. Vitam. B12 Prueba 5</p> <p>Microencp. Vitam. D Prueba 7</p> <p>Microencp. Vitam. B9 Prueba 8</p> <p>Microencap. Bacterias acido-lácticas Prueba 1</p> <p>Microencp, combinado Pruebas 5, 9, 13, 14 y 15</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación de alginato sódico</p>	<p>Incorporación etapa amasado mediante incorporación de alginato sódico</p>	

Tabla 14: Prototipos repetidos

La realización de esta tarea tuvo lugar en la planta piloto de ASINCAR, aunque la maquinaria de la que dispone es a nivel de planta piloto, fue necesario elaborar unidades o lotes de producción de suficiente volumen tanto por la cantidad mínima de materia prima que necesita cada maquinaria para su correcto funcionamiento como, sobre todo, para tener suficiente cantidad de productos para posteriormente poder realizar los diferentes estudios contemplados.

PRUEBA 1/2/3 Nuggets Pollo

Las pruebas fueron realizadas según las formulaciones y siguiendo el proceso de elaboración detallado en la tarea 2.1 y según el diseño experimental cuantitativo de concentraciones de microencapsulados y de ingredientes con funcionalidad tecnológica planteados en la tarea 2.2.

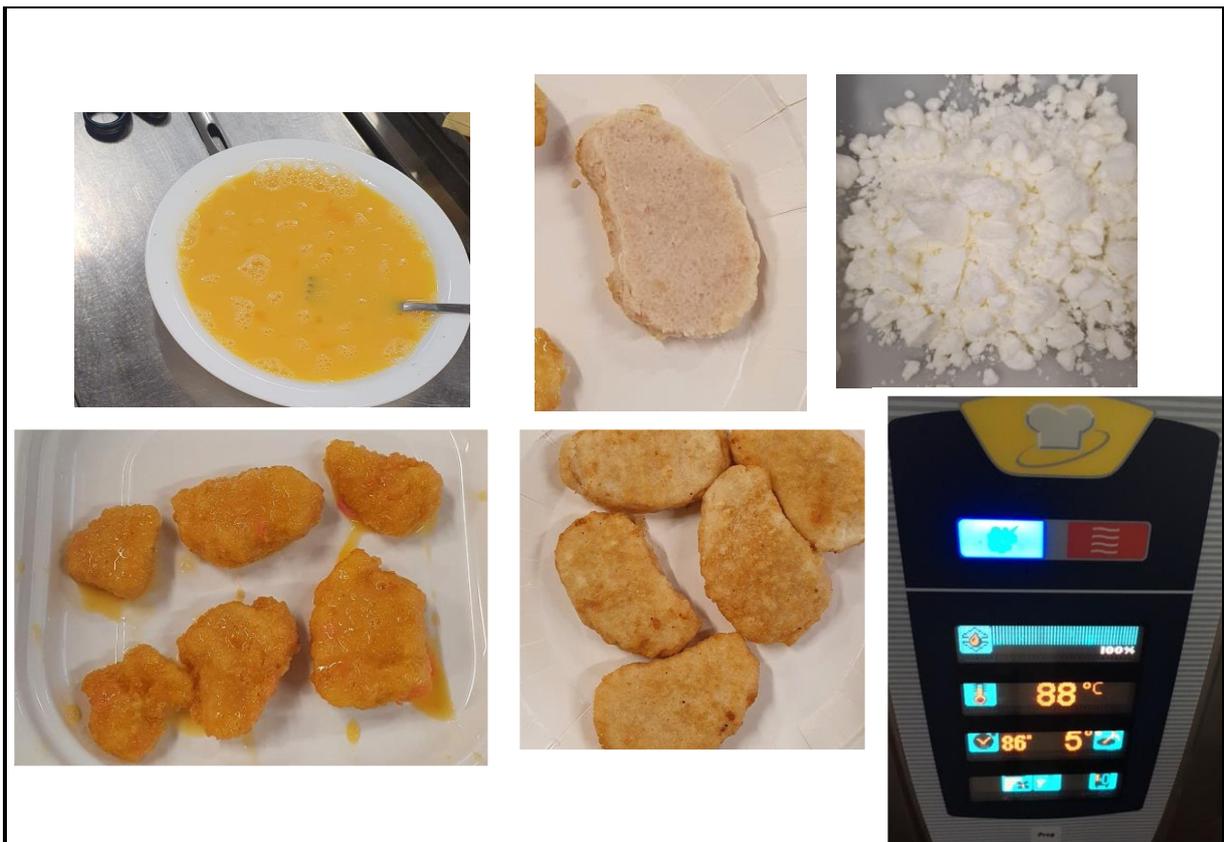


Figura 6. Proceso de elaboración y cocción en horno de Nuggets de pollo enriquecidos.

PRUEBA 1/2/3 Barritas merluza

Las pruebas fueron realizadas según las formulaciones y siguiendo el proceso de elaboración detallado en la tarea 2.1. y según el diseño experimental cuantitativo de concentraciones de microencapsulados y de ingredientes con funcionalidad tecnológica planteados en la tarea 2.2.

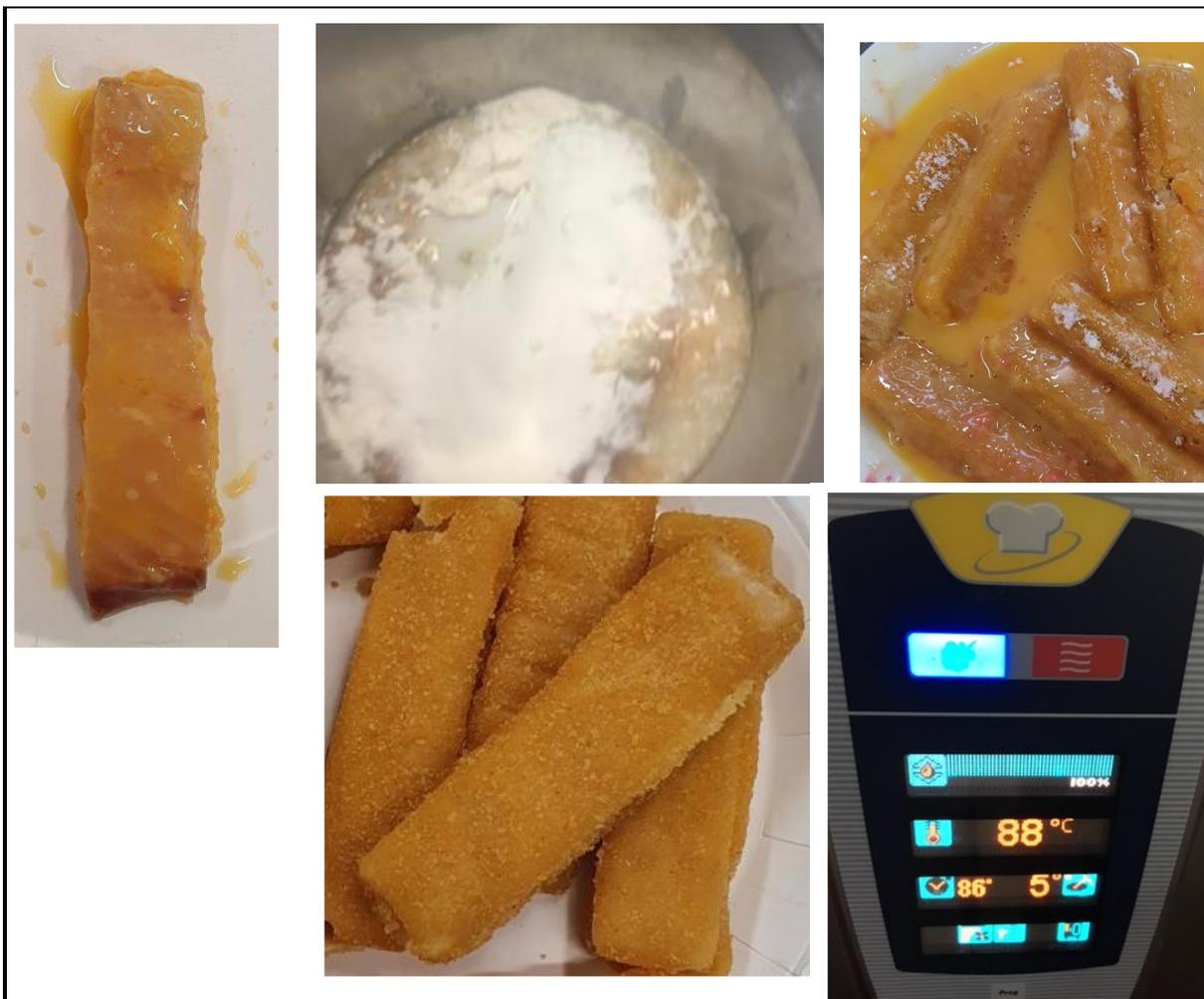


Figura 7. Proceso de elaboración y cocción en horno de Barritas de merluza enriquecidos.

En todos los casos, se hicieron dos pruebas una en el rational (condiciones 88°C, alcanzando 86°C en el centro del producto) y otra en freidora a 170°C, alcanzando 76°C en el centro del producto). Estas condiciones se optimizaron en función de las pruebas de análisis sensorial.

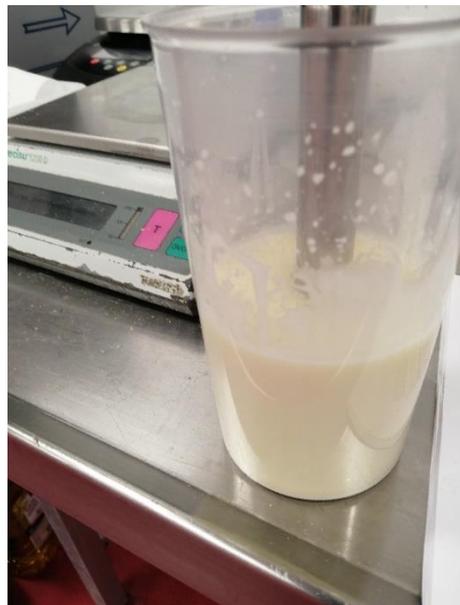


Figura 8. Proceso de elaboración en freidora de Barritas de merluza enriquecidos.

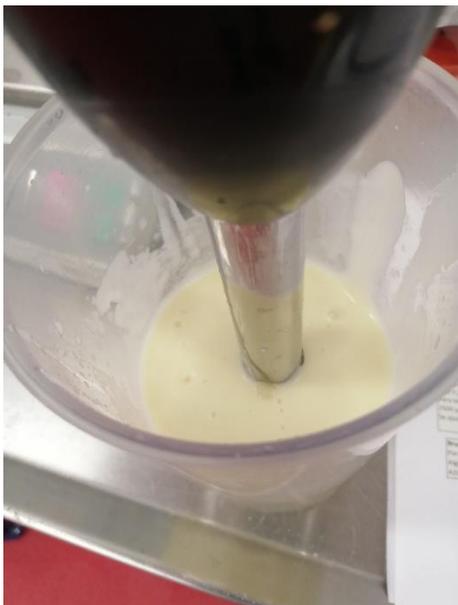
PRUEBAS 8 y 9 con sus respectivas SUBPRUEBAS 4 Omega 3, 5 Vit B12, 7 Vit D, 8 Vit B9, 1 Bacterias ácido-lácticas *Bifidubacterium lactis* y 5, 9, 13, 14 y 15 combinados, todos con fibra de guisante y su variante con alginato, tanto para Nuggets de pollo como para barritas de merluza



Microencapsulación con alginato



Premezcla con fibra de guisante

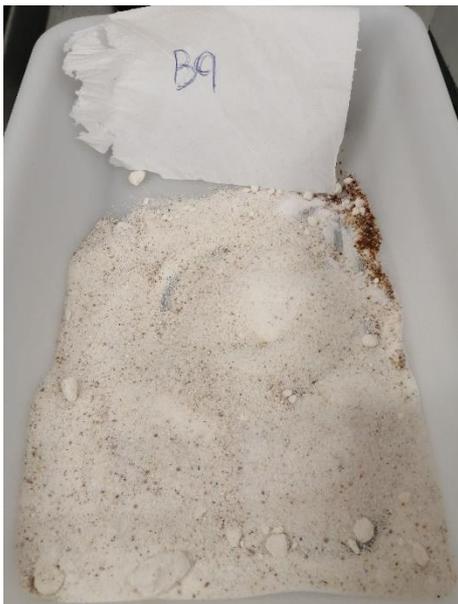


Premezcla con almidón

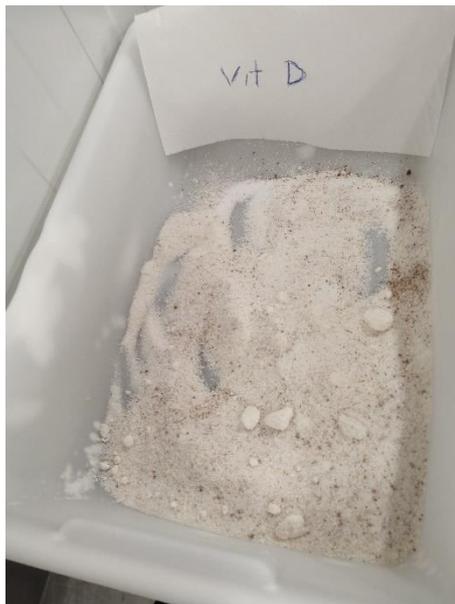


Microencapsulado combinado

Figura 9: Emulsiones ensayadas para microencapsulación



Formulación nugget con vitamina B9



Formulación barrita de merluza con Vitamina D

Figura 10: Formulaciones vitaminas



Muestras Nuggets con alginato y vitamina B9



Muestras Nuggets con emulsión de Vitamina D



Proceso fritura nuggets



Muestras nuggets

Figura 11: Algunos ejemplos de los desarrollos

En este caso se empleó la fritura como tratamiento culinario por dos razones; en primer lugar, es un tratamiento más extendido a nivel doméstico que el horneado de productos rebozados tal y como se hizo con las pruebas 1, 2 y 3 y en consecuencia más utilizado de manera general por la población. En segundo lugar, por el hecho de haber empleado aceite de girasol alto oleico para maximizar bondades del girasol en cuanto al elevado contenido de vitamina E, junto con las bondades del de oliva al presentar un perfil lipídico monoinsaturado, y con mayor resistencia a la fritura.

Indicadores de grado de avance del Proyecto: Se realizará un Informe/Documento de trabajo con los prototipos desarrollados.

H.2.T4- Comprobación de los productos desde el punto de vista nutricional/microbiológico y sensorial para cumplimiento declaraciones nutricionales. Estudios de estabilidad de los microencapsulados incorporados.

A continuación, se detallan los estudios realizados a los prototipos desarrollados en el hito anterior.

Se elaboró una ficha de cata con los atributos: *aspecto*, *olor*, *textura* y *sabor* y una escala numérica de 1 a 7 para poder cuantificar cada atributo, así como una valoración global.

FICHA CATA DE CONSUMIDOR			
Fecha:			
Nombre:			
Producto:			
CÓDIGO Nº:			
ASPECTO			
OLOR			
TEXTURA			
SABOR			
VALORACIÓN GLOBAL			

- Valor "1", me desagrada mucho
- Valor "2", me desagrada bastante
- Valor "3", me desagrada algo
- Valor "4" ni me gusta ni me disgusta
- Valor "5" me gusta algo
- Valor "6" me gusta bastante
- Valor "7" me gusta mucho

Los resultados que se presentan a continuación se han obtenido del análisis estadístico de la "moda" de las puntuaciones otorgadas por cada uno de los catadores, con el fin de obtener el valor que se repite con mayor frecuencia. Los resultados obtenidos para los productos elaborados en los ensayos experimentales se resumen en las siguientes tablas.

Nuggets de pollo					
ATRIBUTOS (1-7)	FÓRMULA 1	FÓRMULA 2	FÓRMULA 3	FÓRMULA 8	FÓRMULA 9
ASPECTO	4	3	1	6	5
OLOR	2	3	2	4	4
TEXTURA	2	1	1	6	5
SABOR	3	2	4	6	6
VALORACIÓN GLOBAL	4	3	2	6	5

Barritas de merluza					
ATRIBUTOS (1-7)	FÓRMULA 1	FÓRMULA 2	FÓRMULA 3	FÓRMULA 8	FÓRMULA 9
ASPECTO	3	4	1	4	3
OLOR	2	1	2	1	1
TEXTURA	2	2	1	2	2

SABOR	2	3	1	3	2
VALORACIÓN GLOBAL	3	3	1	3	2

Tabla 15: Sensorial prototipos desarrollados

En los estudios iniciales las formulaciones mejor valoradas fueron la 1 y la 2, tanto para los Nuggets como para las barritas de merluza y tras los ensayos nutricionales que se muestran a continuación, la fórmula 2 de nuggets y la 1 de barritas de merluza fueron las que inicialmente se emplearon para los estudios de bioaccesibilidad y biodisponibilidad planteados en el hito 4.

Posteriormente y a medida que se continuó con el desarrollo del proyecto y tras los resultados insatisfactorios en cuanto al contenido de Vitamina B12 obtenido en el Hito 4 (hecho que derivó en la decisión de ampliar el porfolio de vitaminas a las vitaminas D y B9) las fórmulas 8 y 9 de Nuggets fueron las las mejor valoradas, incluso con mejor puntuación en la valoración que las estudiadas inicialmente. Por el contrario, las formulaciones 8 y 9 de las barritas de merluza tuvieron una insuficiente aceptación y en ninguna de las 5 formulaciones ensayadas se llegó si quiera al valor medio comprendido en el rango del 1 al 7 de puntuación. Este hecho derivó en centrar los desarrollos y las posteriores validaciones en las matrices de Nuggets, tanto con los microencapsulados de vitamina D y vitamina B9, como con las bacterias ácido lácticos de la especie *Bifidobacterium lactisd* BB-12.

A continuación, se recoge el estudio nutricional de los productos inicialmente seleccionados (formulaciones 1 y 2) pruebas donde se evaluarán los siguientes parámetros: humedad, grasa, proteína, cenizas, hidratos de carbono, azúcares, sal, perfil lipídico completo con omega 3 y 6 así como vitamina B12. En los parámetros mayoritarios se indican promedios y desviaciones estándar (n=3).

PARÁMETROS	Nuggets pollo inicial	Nuggets F1	Nuggets F2
<i>Energía (Kcal/100g)</i>	136 +/-10	209+/-14	227+/-16
<i>Hidratos de carbono (g/100g)</i>	16.93+/-1.2	16.69+/-1.3	23.77+/-1.4
<i>Fibra (g/100g)</i>	<0.5	<0.5	<0.5
<i>Humedad (g/100g)</i>	64.2+/-1.5	58.84+/-1.5	52.31+/-1.4
<i>proteína (g/100g)</i>	16.75+/-0.7	13.11+/-0.6	14.28+/-0.6
<i>cenizas (g/100g)</i>	1.94+/-0.5	1.33+/-0.2	1.36+/-0.2
<i>Grasa (g/100g)</i>	0.16+/-0.1	10.03+/-0.2	8.28+/-0.15
<i>Sal (g/100 g)</i>	1.5	0.85	0.83

Ácidos grasos saturados (g/100g)	0.054	1.91	1.28
Ácidos grasos monoinsaturados (g/100g)	0.058	3.62	2.61
Ácidos grasos poliinsaturados (g/100g)	0.0474	4.45	4.35
Vitamina B12 (µg/100g)	<0.5	1400	5800
Omega 3 (g/100g)	0.0035	0.381	0.71
Omega 6 (g/100g)	0.0438	4.07	3.64

Tabla 16: Nutricional prototipos Nuggets desarrollados

Como se observa en el caso de los Nuggets de pollo la fórmula 2 nos proporciona mayor contenido en omega 3 y en Vitamina B12 que la fórmula 1.

PARÁMETROS	Barritas merluza inicial	Barritas F1	Barritas F2
Energía (Kcal/100g)	175+/-12	190	191
Hidratos de carbono (g/100g)	20.23+/-1.3	22	21
Fibra (g/100g)	<0.5	<0.5	<0.5
Humedad (g/100g)	61.02+/-1.5	58.77	59.23
proteína (g/100g)	11.88+/-0.6	11.51	11.46
cenizas (g/100g)	1.71+/-0.5	1.48	1.52
Grasa (g/100g)	5.16+/-0.3	6.21	6.79
Sal (g/100 g)	0.83	0.9	1

Ácidos grasos saturados (g/100g)	0,0217	1.07	1.19
Ácidos grasos monoinsaturados (g/100g)	0,048	1.96	2.14
Ácidos grasos poliinsaturados (g/100g)	0,089	3.144	3.42
Vitamina B12 (µg/100g)	<0.5	1600	320
Omega 3 (g/100g)	0,0035	0.49	0.72
Omega 6 (g/100g)	0,0856	2.65	2.69

Tabla 17: Nutricional prototipos Barritas merluza desarrollados

Como se observa en el caso de la barrita de merluza la fórmula 2 nos proporciona mayor contenido en omega 3 y sin embargo es la fórmula 1 la que mayor contenido en Vitamina B12 nos proporciona.

Inicialmente se seleccionaron la fórmula 2 en el caso de los Nuggets de pollo y la fórmula 1 en el caso de las barritas de merluza para continuar con los estudios del HITO 4.

Posteriormente se, tal y como se ha comentado, a medida que se continuó con el desarrollo del proyecto, las fórmulas 8 y 9 de Nuggets fueron las mejor valoradas, incluso con mejor puntuación en la valoración que las estudiadas inicialmente, mientras que las barritas de merluza no obtuvieron en ningún caso una mínima aceptación.

A continuación, se recoge el estudio nutricional de los productos posteriormente seleccionados (formulaciones 8 y 9), pruebas donde se evaluarán los siguientes parámetros: humedad, grasa, proteína, cenizas, hidratos de carbono, azúcares, sal, perfil lipídico completo con omega 3 y 6 así como vitamina B12. En los parámetros mayoritarios se indican promedios y desviaciones estándar (n=3).

PARÁMETROS	Nuggets pollo inicial	Nuggets F8	Nuggets F9
Energía (Kcal/100g)	136 +/-10	152+/-16	125+/-14
Hidratos de carbono (g/100g)	16.93+/-1.2	8.50+/-1.4	10.70+/-1.3

<i>Fibra (g/100g)</i>	<0.5	<0.5	<0.5
<i>Humedad (g/100g)</i>	64.2+/-1.5	61.30+/-1.4	66,70+/-1.5
<i>proteína (g/100g)</i>	16.75+/-0.7	15.94+/-0.6	14,87+/-0.6
<i>cenizas (g/100g)</i>	1.94+/-0.5	2.06+/-0.2	1.87+/-0.2
<i>Grasa (g/100g)</i>	0.16+/-0.1	6.03+/-0.15	2.47+/-0.2
<i>Sal (g/100 g)</i>	1.5	1.30	1.30
<i>Ácidos grasos saturados (g/100g)</i>	0.054	1.36	0.80
<i>Ácidos grasos monoinsaturados (g/100g)</i>	0.058	3.84	1.22
<i>Ácidos grasos poliinsaturados (g/100g)</i>	0.0474	0.82	0.43
<i>Vitamina D (µg/100g)</i>	<0.5	4.8	-
<i>Vitamina B9 (µg/100g)</i>	<0.5	-	510

Tabla 18: Nutricional prototipos Nuggets mejor valorados desarrollados

Destacar que el gasto previsto en la anualidad 2023 de subcontratación FQ de esta tarea se ejecutó parcialmente debido a los resultados insatisfactorios obtenidos en los desarrollos experimentales de las barritas de merluza, centrando y optimizando el gasto en los resultados más que satisfactorios que arrojaron las pruebas con la matriz de Nuggets con los microencapsulados de vitamina D y vitamina B9.

A nivel microbiológico, se determinó el recuento de bacterias ácido lácticas y el de bacterias ácido lácticas de la especie *Bifidobacterium lactis*. Se realizó un estudio por triplicado con n=3 para que los resultados fueran representativos, mostrándose a continuación el valor de la media.

	NUGGEST POLLO				BARRITAS MERLUZA	
	<i>Nuggets F1</i>	<i>Nuggets F2</i>	<i>Nuggets F8</i>	<i>Nuggets F9</i>	<i>Barritas F1</i>	<i>Barritas F2</i>
<i>Recuento de bacterias ácido-lácticas</i>	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Recuento de bacterias ácido-lácticas especie *Bifidobacterium lactis*

<10 <10 5.10E+03 7.30E+03 <10 <10

Tabla 19: Microbiología prototipos desarrollados

Indicadores de grado de avance del Proyecto: Informe de las comprobaciones sensoriales, nutricionales y microbiológicas de los productos desarrollados.

HITO.3-Evaluación físico química – microbiológica de los productos desarrollados tanto en crudo como tras tratamiento térmico

En este hito se comprobó la estabilidad de los microencapsulados a lo largo de la vida útil en los diferentes ambientes de conservación así como su estabilidad tras el tratamiento térmico de fritura propio de este tipo de alimentos.

H.3.T1- Validación final de los productos desde un punto de vista nutricional, sensorial y microbiológico para comprobación de la estabilidad de los principios activos.

A nivel sensorial se realizaron los correspondientes análisis desde dos perspectivas; por un lado combinando las pruebas por comparación y las de discriminación, para evaluar cambios en los productos a lo largo de la vida útil, y por otro lado realizando un estudio de consumidor para detectar la valorización y la aceptación global de los productos a lo largo de la vida útil.

Todos los resultados que se muestra a continuación representan el valor de la moda estadística, representando de esta manera el valor que aparece con mayor frecuencia en un conjunto de datos.

Nuggets de pollo										
ATRIBUTOS (1-7)	F1		F2		F3		F8		F9	
	t = 0	t = 15								
ASPECTO	4	4	3	3	1	1	6	6	5	5
OLOR	2	1	3	2	2	1	4	4	4	4
TEXTURA	2	1	1	1	1	1	6	5	5	4
SABOR	3	2	2	2	4	2	6	6	6	5

Barritas de merluza										
ATRIBUTOS (1-7)	F1		F2		F3		F8		F9	
	t = 0	t = 15								
ASPECTO	3	2	4	3	1	1	4	3	3	3
OLOR	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1
TEXTURA	2	1	2	1	1	1	2	1	2	2
SABOR	2	1	3	1	1	1	3	2	2	2

Nuggets de pollo					
ATRIBUTOS (1-7)	F1	F2	F3	F8	F9

	t = 0	t = 15								
VALORACIÓN GLOBAL	4	3	3	3	2	2	6	5	5	5

Barritas de merluza										
ATRIBUTOS (1-7)	F1		F2		F3		F8		F9	
	t = 0	t = 15								
VALORACIÓN GLOBAL	3	1	3	1	1	1	3	2	2	2

Tabla 20: Sensorial prototipos desarrollados

A nivel físico-químico y microbiológico se realizaron estudios nutricionales con el objetivo de verificar la estabilidad de los nutrientes microencapsulados y de las bacterias ácido lácticas microencapsuladas, tras el proceso de fritura típico al que se someten este tipo de productos, pudiendo de esta manera verificar el grado de eficiencia de los microencapsulados ensayados.

De igual manera que se ha comentado anteriormente, los estudios realizados se concentraron en los desarrollos que arrojaron resultados más que satisfactorios de las pruebas con la matriz de Nuggets con los microencapsulados de vitamina D, vitamina B9 y bacterias ácido lácticas de la especie *Bifidobacterium lactis*. En este sentido, el gasto previsto en la anualidad 2023 de subcontratación FQ de esta tarea se ejecutó parcialmente debido a los resultados insatisfactorios obtenidos en los desarrollos experimentales de las barritas de merluza, optimizando de esta manera el gasto sin que afectara negativamente en ningún caso al desarrollo y resultados del proyecto.

NUGGETS DE POLLO						
MUESTRA	Vit D3	Vit B9	Vit D3	Vit B9	Vit D3	Vit B9
F9 crudo	< 0,5 µg/100 g	520 µg/100 g	< 0,5 µg/100 g	470 µg/100 g	< 0,5 µg/100 g	540 µg/100 g
F8 crudo	4,5 µg/100 g	< 5 µg/100 g	5,1 µg/100 g	< 5 µg/100 g	4,8 µg/100 g	< 5 µg/100 g
F9 frito	< 0,5 µg/100 g	670 µg/100 g	< 0,5 µg/100 g	680 µg/100 g	< 0,5 µg/100 g	640 µg/100 g
F8 frito	5,2 µg/100 g	6,1 µg/100 g	5,6 µg/100 g	6,7 µg/100 g	5,2 µg/100 g	7,5 µg/100 g

Tabla 21: Validación micronutrientes prototipos mejor valorados (Resultados con n=3)

Los estudios se realizaron a lo largo de la vida útil estableciendo dos casuísticas; a t = 0 y a t = 15 días en condiciones de congelación y a t = 0 y t = 5 días en condiciones de refrigeración, obteniéndose los siguientes resultados:

Nuggets de pollo en condiciones de refrigeración

Tiempo	A. mesófilos (UFC/g)	Enterobacterias (UFC/g)	BAL (UFC/g)	Bifidobacterias (UFC/g)
--------	----------------------	-------------------------	-------------	-------------------------

<i>F9 crudo</i>	t=0	6,7E+04	1,9E+02	7,0E+01	2,5E+03
	t=5	5,5E+05	2,1E+02	8,5E+03	4,1E+05
<i>F8 crudo</i>	t=0	1,4E+04	9,3E+02	3,0E+01	8,5E+02
	t=5	8,3E+04	4,5E+02	7,2E+03	5,1E+05

Tabla 22: Validación microbiológica prototipos mejor valorados a diferentes tiempos en refrigeración (Resultados con n=3)

Nuggets de pollo en condiciones de congelación

	Tiempo	A. mesófilos (UFC/g)	Enterobacterias (UFC/g)	BAL (UFC/g)	Bifidobacterias (UFC/g)
<i>F9 crudo</i>	t=0	9,3E+04	2,1E+02	4,9E+03	7,0E+08
<i>F9 frito</i>		<1,0E3	<10	<10	<10
<i>F9 crudo</i>	t=15	7,9E+04	2,9E+02	5,3E+03	5,3E+08
<i>F9 frito</i>		<1,0E3	<10	<10	<10
<i>F8 crudo</i>	t=0	2,2E+04	4,9E+02	3,5E+03	7,3E+08
<i>F8 frito</i>		<1,0E3	<10	<10	<10
<i>F8 crudo</i>	t=15	4,8E+04	3,6E+02	5,4E+03	6,2E+08
<i>F8 frito</i>		<1,0E3	<10	<10	<10

Tabla 23: Validación microbiológica prototipos mejor valorados a diferentes tiempos en congelación (Resultados con n=3)

Indicadores de grado de avance del Proyecto: Informe/Documento de trabajo con las validaciones realizadas

H.3.T2- Evaluación de posibles declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de acuerdo a la legislación europea.

A lo largo de esta tarea se estudiaron y trabajaron los Reglamentos (CE) 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, 432/2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos, así como el Reglamento y 1169/2011 sobre la información facilitada al consumidor.

Se cotejó la información reglada y legislada en dichos Reglamentos con los valores analíticos de micronutrientes obtenidos en cuanto a concentración presente en las diferentes matrices alimentarias ensayadas y validadas y poder de esta manera realizar el correspondiente estudio de funcionalidad en cuanto al cumplimiento de las posibles declaraciones nutricionales y saludables.

Los parámetros cuantificados a nivel analítico se extrapolaron a las siguientes posibles alegaciones nutricionales reflejadas en el Reglamento (CE) 1924/2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables:

FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES]

Solamente podrá declararse que un alimento es una fuente de vitaminas y/o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo una cantidad significativa tal como se define en el Anexo de la Directiva 90/496/CEE o una cantidad establecida por las excepciones concedidas en virtud del artículo 6 del Reglamento (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, [sobre la adición de vitaminas, minerales y otras determinadas sustancias a los alimentos]]⁽¹⁾.

ALTO CONTENIDO DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES]

Solamente podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de vitaminas y/o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene como mínimo dos veces el valor de la «fuente de [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] y/o [NOMBRE DE LOS MINERALES]».

Figura 12 Declaraciones nutricionales tipificadas en el Reglamento 1924/2006:

Respecto a lo que constituye una cantidad significativa, el Reglamento 1169/2011, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n o 1924/2006 y (CE) n o 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n o 608/2004 de la Comisión, indica lo siguiente:

ANEXO XIII

INGESTAS DE REFERENCIA

PARTE A — INGESTAS DIARIAS DE REFERENCIA PARA LAS VITAMINAS Y LOS MINERALES (ADULTOS)

1. Vitaminas y minerales que pueden declararse y sus valores de referencia de nutrientes (VRN)

Vitamina A (µg)	800	► Cl Cloruro (mg) ◀	800
Vitamina D (µg)	5	Calcio (mg)	800
Vitamina E (mg)	12	Fósforo (mg)	700
Vitamina K (µg)	75	Magnesio (mg)	375
Vitamina C (mg)	80	Hierro (mg)	14
Tiamina (mg)	1,1	Zinc (mg)	10
Riboflavina (mg)	1,4	Cobre (mg)	1
Niacina (mg)	16	Manganeso (mg)	2
Vitamina B6 (mg)	1,4	► Cl Fluoruro (mg) ◀	3,5
Ácido fólico (µg)	200	Selenio (µg)	55
Vitamina B12 (µg)	2,5	Cromo (µg)	40
Biotina (µg)	50	Molibdeno (µg)	50
Ácido pantoténico (mg)	6	Yodo (µg)	150
Potasio (mg)	2 000		

2. Cantidad significativa de vitaminas y minerales

Como regla general, para decidir lo que constituye una cantidad significativa deben considerarse los siguientes valores:

- 15 % de los valores de referencia de nutrientes especificados en el punto 1, suministrado por 100 g o 100 ml, en el caso de los productos distintos de las bebidas,
- 7,5 % de los valores de referencia de nutrientes especificados en el punto 1, suministrado por 100 ml, en el caso de las bebidas, o
- 15 % de los valores de referencia de nutrientes especificados en el punto 1 por porción, si el envase solo contiene una porción.

PARTE B — INGESTAS DE REFERENCIA DEL VALOR ENERGÉTICO Y LOS NUTRIENTES SELECCIONADOS DISTINTOS DE LAS VITAMINAS Y LOS MINERALES (ADULTOS)

Valor energético o nutriente	Ingesta de referencia
Valor energético	8 400 kJ/2 000 kcal
Grasa total	70 g
Ácidos grasos saturados	20 g
Hidratos de carbono	260 g
Azúcares	90 g
Proteínas	50 g
Sal	6 g

Figura 13: IR y VRN legislados en el Reglamento 1924/2006

La evaluación de las alegaciones nutricionales y saludables se centró en las pruebas realizadas con os Nuggets de pollo con microencapsulados de vitamina D, vitamina B9 y bacterias ácido-lácticas de la especie *Bifidobacterium lactis*, debido al mismo hecho expuesto en la tarea anterior por los

desarrollos que arrojaron resultados más que satisfactorios de las pruebas con la matriz de Nuggets con los microencapsulados de vitamina D, vitamina B9 (Ácido fólico/Folatos) y bacterias ácido lácticas de la especie *Bifidobacterium lactis*.

Respecto a las alegaciones saludables aprobadas de acuerdo al Reglamento 432/2011 por el que se establece una lista de declaraciones saludables en alimentos, las alegaciones relacionadas con la capacidad de refuerzo del sistema inmunitario en función del micronutriente, las especificaciones legisladas son las siguientes:

Nutriente, sustancia, alimento o categoría de alimentos	Declaración	Condiciones de uso de la declaración	Condiciones o restricciones de uso del alimento o bien declaración o advertencia complementaria	Número del boletín de la EFSA (EFSA Journal)	Número de referencias en la lista de declaraciones saludables dada que se refirió a la EFSA en su evaluación
Vitamina D	La vitamina D contribuye a la absorción y utilización normal del calcio y el fósforo.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1227	152, 157,
Vitamina D	La vitamina D contribuye al mantenimiento de niveles normales de calcio en sangre.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1227 2011; 9(6):2203	152, 157, 215
Vitamina D	La vitamina D contribuye al mantenimiento de los huesos en condiciones normales.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1227	150, 151, 350
Vitamina D	La vitamina D contribuye al funcionamiento normal de los músculos.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2010; 8(2):1468	155
Vitamina D	La vitamina D contribuye al mantenimiento de los dientes en condiciones normales.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1227	151, 157,
Vitamina D	La vitamina D contribuye al funcionamiento normal del sistema inmunitario.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2010; 8(2):1468	154, 157,
Vitamina D	La vitamina D contribuye al proceso de división celular.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de vitamina D de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1227	153
Folatos	Los folatos contribuyen al crecimiento de los tejidos maternos durante el embarazo.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1213	2882
Folatos	Los folatos contribuyen a la síntesis normal de aminoácidos.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2010; 8(10):1760	195, 2882

Folatos	Los folatos contribuyen a la formación normal de células sanguíneas.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1213	79
Folatos	Los folatos contribuyen al metabolismo normal de la homocisteína.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1213	80
Folatos	Los folatos contribuyen a la función psicológica normal.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2010; 8(10):1760	81, 85, 8
Folatos	Los folatos contribuyen al funcionamiento normal del sistema inmunitario.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1213	91
Folatos	Los folatos ayudan a disminuir el cansancio y la fatiga.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2010; 8(10):1760	84
Folatos	Los folatos contribuyen al proceso de división celular.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que son, como mínimo, fuente de folatos de acuerdo con la declaración FUENTE DE [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] Y/O [NOMBRE DE LOS MINERALES] que figura en el anexo del Reglamento (CE) n° 1924/2006.		2009; 7(9):1213 2010; 8(10):1760	193, 195,
Ácido linoleico	El ácido linoleico contribuye a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo.	Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que aporten un mínimo de 1,5 g de ácido linoleico por 100 g y 100 Kcal. Se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 10 g de ácido linoleico.		2009; 7(9):1276 2011; 9(6):2235	489, 28

Figura 14: declaraciones saludables de acuerdo al Reglamento CE 432/2012

De esta manera, se obtuvieron finalmente las siguientes alegaciones nutricionales y saludables de acuerdo con la legislación europea vigente:

	<i>Vitamina D</i>	<i>Vitamina B9</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Alegación nutricional</i>	<i>Alegación saludable</i>
<i>Nugget F8 crudo</i>	4,8 µg/100 g	-	7,0E+08 ufc/g	Alto contenido en Vitamina D	Ver tabla declaraciones saludables
<i>Nugget F8 frito</i>	5,3 µg/100 g	-	<10 ufc/g		
<i>Nugget F9 crudo</i>	-	510 µg/100 g	7,3E+08 ufc/g	Alto contenido en vitamina B9 (ácido fólico)	Ver tabla declaraciones saludables
<i>Nugget F9 frito</i>	-	663 µg/100 g	<10 ufc/g		

Tabla 24: Alegaciones nutricionales logradas

HITO.4-Puesta a punto de la evaluación de bioaccesibilidad o biodisponibilidad de ingredientes funcionales, microencapsulados, etc.

En este Hito se evaluaron los prototipos desarrollados y enriquecidos estudiando la biodisponibilidad de dichos principios activos incorporados.

En un primer momento el alimento sufre una primera digestión en la boca como resultado de la acción mecánica y de las enzimas salivares; sigue una digestión estomacal y posteriormente una digestión pancreática. Tras avanzar en el intestino, el producto debe ser liberado y absorbido por células intestinales alcanzando el torrente sanguíneo y distribuyéndose al resto de células del organismo.

La biodisponibilidad es un concepto que hace referencia a la velocidad o fracción, en este caso determinados compuestos funcionales (ácidos grasos omega 3 y vitaminas,) incorporados a un producto alimenticio, alcanza su tejido diana.

En el caso que nos ocupa trataremos de evaluar la capacidad de incorporación de los suplementos alimenticios incorporados microencapsulados mediante la estimación de la capacidad de absorción de los mismos a nivel intestinal.

H.4.T1-Evaluación de la bioaccesibilidad de los principios activos microencapsulados incorporados a las matrices alimentarias

Los productos desarrollados se sometieron a una digestión oral in vitro, tratando de asemejarlo a las primeras fases de la digestión. El medio que modeliza la composición de la saliva contiene enzimas bucales tales como amilasa, lipas y lisozima.

Posteriormente los productos son sometidos a digestión estomacal in vitro utilizando un pH ácido y enzimas digestivas como la tripsina. Se determinó el contenido en ácidos grasos omega-3/vitaminas y bacterias ácido lácticas del producto obtenido.

Como último proceso dentro de la fase de digestión, se trató de modelizar una digestión pancreática utilizando pancreatina y sales biliares para analizar nuevamente el producto resultante.

Para el correcto desarrollo de esta tarea se contó con GAIKER Centro tecnológico para la subcontratación de las pruebas de bioaccesibilidad llevadas a cabo en los productos desarrollados.

Por tanto, se llevó a cabo el estudio de bioaccesibilidad y biodisponibilidad planteados con el siguiente desarrollo:

ENSAYOS

En las primeras fases de desarrollo del proyecto se solicitó la determinación de ALA (ácido alfa-linolénico) y vitamina B12 tras someter a las muestras a una digestión in vitro, analizando los dos analitos en el producto resultante. A medida que fue avanzando la ejecución del proyecto y tras los resultados más que satisfactorios obtenidos con la matriz de Nuggets y los microencapsulados de vitamina D y vitamina B9 (ácido fólico/folatos), se continuó con los estudios de bioaccesibilidad y

biodisponibilidad en estas últimas muestras validadas a todos los niveles tal y como se ha expuesto en las tareas anteriores.

DESCRIPCIÓN DE ENSAYO

Se realizó el ensayo de digestión in vitro siguiendo el método INFOGEST consensuado de manera internacional. Se resume el método a continuación. Se tomaron las muestras, por duplicado, y se inició la fase oral añadiéndoles en un ratio 1/1, una solución tampón, que simula el fluido oral ajustada a pH=7 conteniendo el enzima alfa-amilasa. Esta fase se realizó agitando a 37°C dos minutos.

Se continuó con la fase gástrica, para ello se mezcló la muestra resultante de la fase oral con fluido gástrico simulado a pH=3 en un ratio 1/1 conteniendo pepsina, durante 2 horas a 37°C con agitación. Pasado este tiempo ya en la fase intestinal, se añadió en un ratio 1/1 el fluido intestinal simulado a pH=7 que contenía pancreatina y ácidos biliares, se agitó a 37° C durante dos horas. Se paró la reacción por congelación de las muestras.

En los ensayos iniciales en las primeras fases de ejecución del proyecto, para determinar el contenido de los ácidos grasos ALA (ácido alfa-linolénico), en las muestras resultantes, y basándonos en la norma UNE-EN 1186-2, se derivatizaron las muestras con trifluoruro de boro metanólico convirtiendo en metil esteres los ácidos grasos, La cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) con las condiciones del método de FAMES de Agilent, bajando el límite de detección lo máximo posible (1ppm) en rectas de calibración utilizadas. Asimismo, para determinar el contenido de la vitamina B12 se analizaron las muestras por cromatografía líquida utilizando un equipo de cromatografía de Waters ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) unido a detector de triple cuadrupolo MS/MS y cuantificando frente a una recta de calibración del patrón comercial.

Los resultados de esas primeras muestras se muestran a continuación:

	µg ALA/g muestra	% ALA	g Vit B12/g muestra	% Vit B12
Nuggets pollo F2	98.36	0.0098	21.69	0.0022
Barritas merluza F1	105.16	0.0105	10.07	0.0010

Tabla 25: Resultados bioaccesibilidad ácidos grasos

Posteriormente se continuó con los estudios de bioaccesibilidad para la matriz de Nuggets con los microencapsulados de vitamina D y vitamina B9 (ácido fólico/folatos) siguiendo la misma metodología de ensayo, con la diferencia en este caso de que para determinar el contenido de vitamina D (en forma de D3) y de vitamina B9 se analizaron las muestras por cromatografía líquida utilizando un equipo de cromatografía de Waters ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) unido a detector de triple cuadrupolo MS/MS y cuantificando frente a una recta de calibración del patrón comercial.

Los resultados de estos segundos análisis se muestran a continuación:

	µg vit D/g muestra	% VitD	µg vit B9/g muestra	% Vit B9
Nuggets pollo F8	0.00884	0.0000009	-	-
Nuggets pollo F9	-	-	0.8344	0.0000834

Tabla 26: Resultados bioaccesibilidad vitaminas

H.4.T2-Evaluación de la biodisponibilidad de los principios activos microencapsulados incorporados a las matrices alimentarias

En las dos muestras analizadas inicialmente se detectó la vitamina B12 y el ALA, en la cantidad expresada en la tabla mostrada en la tarea H4T1; aun estando presente una cantidad significativa de vitamina B12 y de ALA, tras la fase de la digestión oral, estomacal y pancreática los niveles encontrados serían indetectables en una segunda fase de absorción (mediante el uso de las células CaCO₂, células del epitelio intestinal); se han realizado pruebas para comprobar si se podían detectar y los contenidos obtenidos están por debajo del Límite de cuantificación en esta segunda etapa.

En las dos muestras analizadas posteriormente se detectó vitamina D (en forma de D3) y vitamina B9 (ácido fólico/folatos) en la cantidad expresada en la tabla mostrada en la tarea H4T1; de la misma manera que en los estudios iniciales, aun estando presente una cantidad significativa de vitamina D y de vitamina B9, tras la fase de la digestión oral, estomacal y pancreática los niveles encontrados serían indetectables en una segunda fase de absorción (mediante el uso de las células CaCO₂, células del epitelio intestinal); en este sentido se volvieron a realizar pruebas analíticas para comprobar si se podían detectar y los contenidos obtenidos se encontraban por debajo del Límite de cuantificación de la técnica en esta segunda etapa.

Indicadores de grado de avance del Proyecto: Informe/Documento de trabajo con las condiciones de biodisponibilidad ensayadas

Indicadores de gestión: se realizan los estudios de bioaccesibilidad con cantidades de ácidos grasos omega 3 y vitaminas estudiadas tras las digestiones, pero estas cantidades observadas no son suficientes para que estén biodisponibles en el individuo, es decir son bioaccesibles, pero no biodisponibles.

HITO 5: Coordinación, seguimiento y evaluación de resultados

H5.T1.- Coordinación y seguimiento del proyecto

A lo largo del desarrollo el proyecto se llevaron a cabo tareas de coordinación para garantizar la correcta consecución de las tareas planteadas y por tanto el alcance de los objetivos descritos.

Esta coordinación para identificar y seleccionar las estrategias de microencapsulación se fue llevando a cabo a lo largo de la ejecución del proyecto. A lo largo del Hito 2 se fueron coordinando todos los

desarrollos experimentales a lo largo del tiempo, siendo necesario coordinar el aprovisionamiento y disponibilidad de materias primas con las pruebas experimentales en función de las estrategias tecnológicas y formulaciones de ingredientes estudiadas. A lo largo del Hito 3 fue necesario organizar. Además, se coordina con el HITO 4 para una correcta evaluación de la funcionalidad.

H5.T2.- Explotación de resultados conseguidos

El análisis y evaluación de resultados se ha llevado a cabo de forma continua a lo largo del desarrollo del proyecto y estableciéndose reuniones de carácter mensual que han permitido evaluar la evolución del proyecto.

En base a los resultados obtenidos se comenzó una labor de *networking* con industrias cárnicas, industrias del sector de la pesca y productores de platos preparados del Principado de Asturias con el objetivo de trasladar los resultados obtenidos con estas matrices y evidenciar de primera mano los posibles desarrollos de alimentos funcionales enriquecidos. A la vista de los resultados se fueron centrando los esfuerzos en la industria cárnica y en productores de carne de ave, con la vista en productos tipo Nuggets enriquecidos en vitaminas, enfocando en todo momento las reuniones y la difusión en el valor añadido de poder producir un alimento (nugget de pollo) con una alegación saludable acerca de la vitamina D y la vitamina B9 en el etiquetado de acuerdo con la legislación de declaraciones nutricionales y saludables.

2. RESULTADOS CONSEGUIDOS

Enumerar brevemente, pero con claridad y precisión, los resultados obtenidos, haciendo referencia expresa a los resultados inicialmente previstos.

De manera general se ha conseguido:

- Se ha llevado a cabo búsqueda bibliográfica de materiales de microencapsulación para ácidos omega 3, vitaminas, bacterias ácido lácticas y principios activos combinados.
- Se han optimizado las emulsiones y las condiciones de trabajo para obtener microencapsulados para: omega 3, vitamina B12 y bacterias ácido lácticas.
- Se han optimizado las condiciones de trabajo del equipo ajustando la temperatura tanto de entrada como de salida, claves en este proceso, y ajustadas para cada emulsión evaluada.
- Se han caracterizado los productos de partida, se han enriquecido y se ha evaluado a nivel nutricional y sensorial los prototipos.
- Se ha evaluado la funcionalidad a nivel de bioaccesibilidad de los prototipos desarrollados.
- Coordinación adecuada a lo largo de la ejecución de las tareas.

De manera específica se ha conseguido:

- Se ha logrado desarrollar un prototipo de Nuggets de pollo con vitamina D microencapsulada estable tras el proceso de fritura.
- Se ha logrado desarrollar un prototipo de Nuggets de pollo con vitamian B9 (ácido fólico/folato) microencapsulada estable tras el proceso de fritura

3. RESULTADOS PREVISTOS NO CONSEGUIDOS

Indique y explique las causas.

- Obtener un microencapsulado de bacterias ácido lácticas estables tras el procesado térmico: en los prototipos a estudiar se obtuvieron buenos recuentos de bacterias ácido lácticas, sin embargo tras el tratamiento térmico la viabilidad se vio comprometida, probablemente por la fisiología propia de los microorganismos.
- Obtener concentraciones superiores al límite de cuantificación para evidenciar una adecuada biodisponibilidad en la matrices alimentarias estudiadas.