



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE FARMACIA
NUTRICIÓN Y DIETÉTICA



**ESTUDIO DE SACIEDAD DE UN PRODUCTO LÁCTEO
INCORPORANDO QUITOSANO COMO FUENTE DE FIBRA NO
TRADICIONAL EN ADULTOS JÓVENES SANOS**

Marisol Castillo Carrillo

Nevenka Figueroa Fernández

Grado académico Licenciado en Nutrición y Dietética

Tesis para optar al Título de Nutricionista

Directora de tesis

Paola Vera Fontecha

Co- Directora

Elisa Zúñiga Garay

Marzo 2014

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a:

Dios, por darme la vida y llenarla de bendiciones en todo este tiempo, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría y fortaleza suficiente para culminar mi carrera universitaria.

A mis padres, por su infinito amor, su comprensión y ayuda en cada momento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Por todo el esfuerzo para darme una profesión y hacer de mí una persona de bien, gracias por los sacrificios y la paciencia que demostraron todos estos años.

A mis amigos, por sus sonrisas de ánimo, y palabra de aliento en los momentos difíciles, en especial a Nevenka, que a lo largo de este trabajo aprendimos que nuestras diferencias se convierten en riqueza cuando existe respeto y amistad.

A cada uno de mis profesores y educadores, que de una u otra forma nos ayudaron a crecer como persona y como profesional. De manera especial a nuestra directora de tesis quién con sus conocimientos y apoyo supo guiar el desarrollo de la presente tesis

A mi pololo Andrés, quien ha estado conmigo en cada momento y ha sido capaz de contenerme y apoyarme cuando todo iba mal. Gracias por amarme como solo tú lo puedes hacer, por permitirme crecer contigo, por enseñarme a superar los problemas siempre juntos de la mano, que no existe en el mundo fuerza más grande e indestructible que el amor, y por hacer esto nuestro proyecto de vida.

Marisol Castillo Carrillo

A mi madre, por su apoyo incondicional, su ayuda y dedicación constante, por ser la persona más importante en mi vida y mejor amiga, la cual siempre estuvo en los momentos precisos para darme una palabra de aliento, porque gracias a ella soy la persona que soy.

A mi padre, por inspirarme a adquirir nuevos conocimientos y enseñanzas. Por siempre recordándome lo importante que es lograr nuestras metas y sueños, para llegar a ser una profesional.

A mis hermanas, por estar junto a mí todos estos años de estudios, por compartir risas, llantos y alegrías, por darme siempre su amor incondicional. Por ser mi motivación para ser una mejor persona y un gran ejemplo para ellas.

A mi novio, por su comprensión y paciencia, por acompañarme en esta etapa y darme siempre su amor y cariño. Por inspirarme a ser mejor y sacar todo mi potencial. Por sacrificar su tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío.

A Omar, por ser un gran ejemplo para mí y aportar siempre con su sabiduría y madurez.

A mis amigos y familiares, gracias por estar siempre a mi lado, dándome palabras de aliento y apoyo. Por creer en mí y confiar que podía cumplir todos los objetivos en mi vida. Gracias a todos los que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda. Especialmente a mi compañera Marisol por su paciencia y amor, gracias por compartir todo este tiempo conmigo y enriquecer nuestra amistad.

A mi directora de tesis y profesores, gracias por ser una parte fundamental en este proceso educativo. Por dar ayudarme a crecer personal y profesionalmente, y tener siempre la disposición de compartir sus conocimientos.

Agradezco a Dios por las infinitas bendiciones que me ha dado en mi vida, por ser mi guía constante, con su amor y sabiduría. Estoy eternamente agradecida por cumplir esta hermosa etapa.

Nevenka Figueroa Fernández

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
1. MARCO TEORICO.....	7
1.1. Situación alimentaria en Chile	7
1.2. Fibra dietética (FD).....	8
1.2.1 Fibras Insolubles	11
1.2.2 Fibras Solubles.....	11
1.2.2.1 Quitosano.....	13
1.3. Yogur	23
2. HIPÓTESIS.....	26
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1 Tipo de estudio.....	27
4.2 Características de población en estudio	27
4.3 Ensayos preliminares	27
4.4 Pruebas de evaluación sensorial.....	30
4.5 Prueba de tolerancia.....	34
4.6 Análisis químico - proximal de la formulación final	36
4.7 Estudio de Sacidad	40
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSION	67
7. CONCLUSION.....	76
8. ANEXOS	78
9. REFERENCIAS.....	90

RESUMEN

La producción y el consumo nacional de productos lácteos presentan una evolución positiva en la última década. En años recientes, diferentes ingredientes alimentarios han sido incluidos en las formulaciones de yogur para mejorar su valor nutricional y propiedades saludables, entre ellos la fibra dietética.

En el presente estudio se determinó el efecto sobre la saciedad en individuos jóvenes sanos al consumir un yogur adicionado con fibra de quitosano, en comparación con una muestra control. Para ello se seleccionaron 30 sujetos entre 18 y 35 años, que cumplieron con los criterios de selección establecidos para su participación. Se midió saciedad de dos maneras diferentes: subjetivamente a través de una escala visual análoga (EVA) y objetivamente mediante la cuantificación de alimentos en gramos y calorías luego que los participantes consumieran un almuerzo fijo con repetición. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba t- student de muestras no pareadas. Previamente, se efectuó evaluación sensorial, pruebas de tolerancia y determinación de la composición proximal de la muestra final mediante la metodología analítica oficial AOAC.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que al incluir fibra de quitosano, la sensación de saciedad es significativamente mayor ($p < 0,05$) en relación al control, a los 30 y 60 minutos después de su consumo. Asimismo, se observó una menor ingesta alimentaria y energética en el almuerzo fijo después de consumir el yogur experimental versus el control, con diferencias significativas ($p < 0,05$).

Podemos concluir que la adición de fibra comercial de quitosano aumenta la saciedad, confirmando la hipótesis planteada.

ABSTRACT

The production and national consumption of dairy products present a positive evolution in the past decade. In recent years, various food ingredients have been included within yogurt to improve their nutritional value and healthy properties, among those is the dietary fiber.

In this study the different effects that the chitosan fiber had on the satiety of young healthy consumers was observed. This was done by observing the effects of the serving of yogurt with the chitosan compared to the control sample of yogurt without the chitosan. 30 subjects were selected that aged from 18-35 years, all of which met the criteria that was set for said individuals. Satiety was measured in two different ways: subjectively, by a visual analog scale (VAS) and objectively, by quantification of food in grams and calories after the participants consumed set lunch with repetition. For statistical analysis the unpaired t-student sample test was used. Previously, sensory evaluation, tolerance tests, and determination of an approximate composition of the final sample were done by the ways set out by the official AOAC analytical methodology.

The results obtained in this research showed that when the chitosan fiber was included, the sensation of satiety was significantly stronger ($p < 0,05$) compared to the control at 30 to 60 minutes after its consumption. Also, less food and energy intake was observed from the set lunch after consuming the experimental yogurt versus the control, with significant differences ($p < 0,05$).

We can conclude that the addition of commercial chitosan fiber increases satiety, confirming the hypothesis.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Situación alimentaria en Chile

El comportamiento alimentario constituye un hecho social donde influyen diversos factores socioculturales. Los estilos de vida y los hábitos de consumo alimentario han manifestado importantes cambios en la sociedad actual alrededor de todo el mundo, presentando diferentes estadios de transición nutricional (1).

En las últimas décadas nuestro país al igual que toda América Latina, ha experimentado cambios sociales, demográficos y epidemiológicos, lo que ha llevado a un nuevo perfil de morbilidad en la población (2), el cual está caracterizado por un mayor consumo energético, una tendencia creciente al consumo de alimentos procesados industrialmente, elevadas cifras de sedentarismo y exceso de peso. Debido a estos cambios en los hábitos alimentarios y el modo de vida, las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) son causa cada vez más importantes de discapacidad y muerte prematura, siendo hoy en día la principal carga de enfermedad a nivel mundial (3). Las organizaciones internacionales de la salud han propuesto estrategias para reducir la incidencia de estas enfermedades, entre estas, está la adopción de estilos de vida más saludables, propiciando alimentos que tengan el potencial de reducir la ingesta alimentaria, propiedad atribuible a la fibra dietética por su capacidad de aumentar la sensación de saciedad.

De esta manera, se ha creado un nuevo escenario que muestra un gran interés por parte de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten

beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Esto ha generado una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición, lo que ha revolucionado la industria alimentaria, orientándola hacia la creación y búsqueda de alimentos que aporten beneficios a la salud, o la reducción de riesgo de una enfermedad (4).

1.2. Fibra dietética (FD)

Durante los últimos años se ha incrementado el interés por el uso y aplicación de la fibra dietética (FD) en productos alimentarios, debido a los diversos beneficios que trae a la salud.

Dentro de las definiciones de fibra dietética se encuentra la realizada por la *American Association of Cereal Chemist* (AACC) en el 2001, que define: “la fibra dietética es la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso. La fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias asociadas de la planta. Las fibras dietéticas promueven efectos beneficiosos fisiológicos como el laxante, y/o atenúa los niveles de colesterol en sangre y/o glucosa en sangre” (5).

Por otra parte, en Chile la definición aceptada de acuerdo a la Norma técnica sobre directrices nutricionales (Resolución Exenta N° 764/09) (6) es la generada por el *Codex Alimentarius* del año 2009 (7) sobre fibra dietética, la cual dice: “Polímeros de hidratos de carbono con 10 o más unidades monoméricas, que no son digeridas, ni absorbidas en el intestino delgado de humanos y que pertenecen a las siguientes categorías:

- Polímeros de hidratos de carbono comestibles que se encuentran presente naturalmente en el alimento en la forma que se consumen,
- Polímeros de hidratos de carbono, obtenidos de materias primas alimentarias, por medios físicos, químicos o enzimáticos y que se haya demostrado que tienen un efecto fisiológico o un beneficio para la salud, mediante evidencia científica,
- Polímeros de hidratos de carbonos sintéticos, los cuales han mostrado tener un efecto fisiológico o un beneficio para la salud, mediante evidencia científica” (6).

Dentro de los principales componentes de la fibra dietética se encuentran: polisacáridos no almidón, oligosacáridos resistentes, almidones resistente y lignina (8). La figura 1 muestra los distintos componentes de la fibra dietética y sus análogos.

Figura 1: Componentes de la fibra dietética

Fibra	Lignina		Insoluble en agua ("fibra insoluble")
	Polisacáridos no almidónicos	Celulosa	
		Hemicelulosa (tipo B)	
Hemicelulosa (tipo A) Pectinas Gomas Mucílagos Otros Polisacáridos		Soluble en agua ("fibra soluble")	
Sustancias análogas a la fibra	Inulina Fructooligosacáridos		En su mayoría soluble en agua
	Almidón resistente		
	Azúcares no digestibles		
	Quitosano		

Fuente: Propuesta adaptada de E Escudero y P González, 2006 (9).

Actualmente se dispone de diversas fuentes de fibra dietética, las principales se encuentran en los alimentos como cereales enteros, frutas, verduras, legumbres y los frutos secos. De acuerdo con el Comité de Expertos FAO/OMS, la recomendación diaria de fibra dietética total para adultos es de 25 g/día (10). Mientras que la *American Dietetic Association* (11) recomienda para adultos, entre 20 a 35 g/día para mantener un mejor control glucémico e insulínico, o bien, según el contenido calórico, de 10 a 14 gramos de fibra por cada 1.000 calorías.

En Chile, y en general en los países occidentales de similar desarrollo económico, la ingesta total de fibra diaria está muy por debajo de la recomendación (12). Diversos estudios y encuestas realizados a nivel nacional, han puesto de manifiesto el bajo consumo de fibra por parte de la población (13). En la última Encuesta Nacional de Salud (ENS) se dio a conocer, que sólo el 11,8% de la población consume cereales integrales todos los días, mientras que el 61,3% de la población dice no consumir nunca cereal integral. En cuanto al consumo diario de frutas y verduras, este es sólo de un 34,9% para frutas, y 60,8% para verduras (14). Sólo un 15,5% de la población cumple con la recomendación de 5 porciones de frutas y verduras al día de la OMS con el fin de prevenir enfermedades crónicas tales como cardiopatías, cáncer, diabetes u obesidad (10).

Por lo tanto, el consumo de fibra dietética en la vida moderna aún sigue siendo insuficiente (15). Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que un bajo consumo de fibra en la dieta puede ser un factor significativo que, conjuntamente con otros factores relacionados con la alimentación y estilo de vida, propiciaría el desarrollo de las

enfermedades más comunes de los países desarrollados como, cáncer de colon, trastornos intestinales, diabetes y enfermedades cardiovasculares (16,17).

Existen diversas propiedades y cualidades de la fibra dietética, siendo las principales solubilidad, fermentabilidad y viscosidad (18). Según solubilidad se puede clasificar en fibra soluble y fibra insoluble. Algunos autores sugieren que la fibra consumida debe tener una proporción de 3/1 entre insoluble y soluble (9).

1.2.1 Fibras Insolubles

Este tipo de fibra es capaz de retener agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal (19). Solo es capaz de fermentar en una parte limitada del colon. Se utiliza en el tratamiento y prevención de la constipación crónica (9).

1.2.2 Fibras Solubles

Las fibras solubles en contacto con el agua forman un retículo donde queda atrapada, originándose soluciones viscosas. Los efectos derivados de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo de lípidos e hidratos de carbonos. A nivel de estómago las fibras solubles, como consecuencia de su viscosidad, enlentecen el vaciamiento gástrico y aumentan su distensión prolongando la sensación de saciedad.

También produce una disminución en la absorción de los ácidos biliares, ya que estos se unen a los residuos fenólicos y a los ácidos urónicos en la matriz de los polisacáridos. Como consecuencia de la depleción de ácidos biliares disminuyen los niveles

de colesterol, al utilizarse éste en la síntesis de *novo* de nuevos ácidos biliares (20). El *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel* (NCEP ATP III), sugiere aumentar la ingesta de fibra dietética soluble para disminuir el colesterol sérico y reducir el riesgo de cardiopatía. Recomiendan 10-25 g de fibra soluble y 2 g/día de fitoesteroles. (21).

Dentro de las principales respuestas fisiológicas de la fibra se mencionan la regulación de la ingesta de alimentos, generando diferentes efectos beneficiosos para el organismo humano, como:

- Efectos Hormonales: La fibra aumenta la viscosidad intraluminal, disminuyendo la velocidad de vaciamiento gástrico y absorción de macronutrientes en el intestino delgado, lo que por un lado aumenta la sensación de saciedad que lleva a una menor ingesta energética, y por otro disminuye la glicemia postprandial, con la consecuente reducción de la secreción de insulina y su efecto lipogénico.
- Efectos Intrínsecos: La fibra dietética disminuye la densidad energética de los alimentos y aumenta el tiempo de masticación lo que limita la ingesta mediante la promoción de la secreción de saliva y jugo gástrico, resultando en una expansión del estómago y aumento de la saciación, con la consecuente disminución de la ingesta.
- Efectos Colónicos: Los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación de la fibra soluble, estimulan la liberación del péptido YY (22), este péptido actúa directamente inhibiendo la liberación del neuropéptido Y y estimulando la producción de un fragmento del péptido anorexígeno POMC, de tal manera que aumenta la sensación de saciedad, reduce el apetito y la ingesta

alimentaria. Otros efectos benéficos incluyen la disminución de la producción hepática de glucosa y los ácidos grasos libres, aumentando la sensibilidad a la insulina lo que favorece su menor secreción, y reduce su efecto lipogénico.

El reconocimiento de los efectos benéficos de la fibra dietética ha incrementado la demanda de productos "altos en fibra" por parte de los consumidores, lo que ha obligado a la industria alimentaria a producir una mayor variedad de productos que incluyan este compuesto (23).

Si bien la fibra dietética se ha considerado tradicionalmente de origen vegetal, existe aún la controversia si incluir a esta definición las partes no digeribles de los alimentos de origen animal. No obstante, debido a las características similares del quitosano a la fibra dietética de origen vegetal, y de acuerdo a la Norma técnica sobre directrices nutricionales aplicada en Chile (7), se podría considerar al quitosano como una fuente no tradicional de fibra dietética soluble.

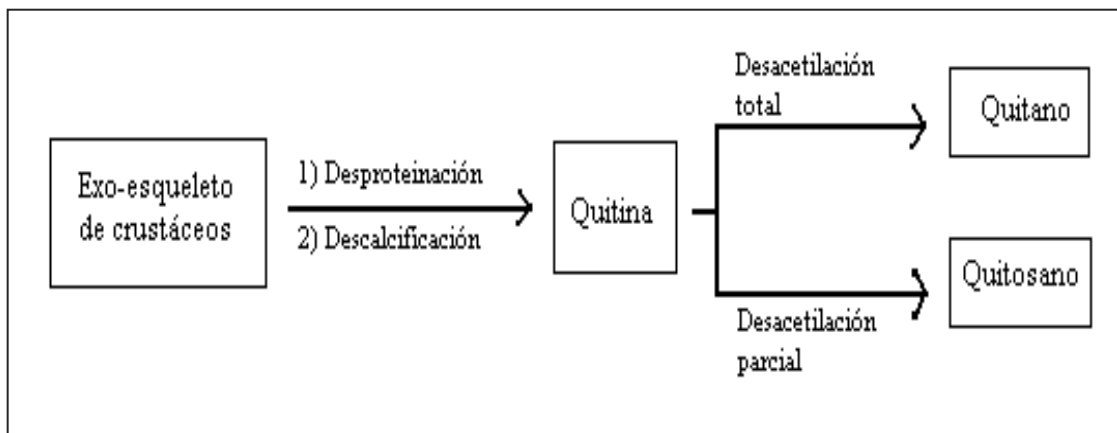
1.2.2.1 Quitosano

La industria procesadora de mariscos (camarón, cangrejos, etc.), es altamente generadora de desechos debido a que el 75- 85% del peso vivo de estos son desechos (conchas, cabezas y patas) que contaminan el medio ambiente y se convierten en una carga económica para las industrias procesadoras, debido a que su eliminación es problemática y costosa (24). En la actualidad existen alternativas tecnológicas para el aprovechamiento de estos desechos y su conversión en productos de utilidad como son la quitina y el quitosano.

Actualmente la quitina se obtiene principalmente del exoesqueleto de los crustáceos industrialmente procesados, tales como camarón, langosta, centolla, centollón y cangrejo. Los residuos del procesamiento de los mariscos contiene en general un 14-35% de quitina asociada a proteínas (30-40%), lípidos, pigmentos y depósitos de calcio (30-50%), estimándose por tanto una producción mundial anual de quitina de 120.000 toneladas (25). La quitina, además se encuentra formando parte estructural de un amplio número de invertebrados (insectos), así como en la pared celular de algunos hongos, algas y levaduras (26). Por esto, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (27).

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la quitina, al ser sometida en un medio alcalino a altas temperaturas, produciendo su desacetilación parcial. En el siguiente esquema se aprecia los pasos elementales en la obtención del quitosano a partir de la quitina:

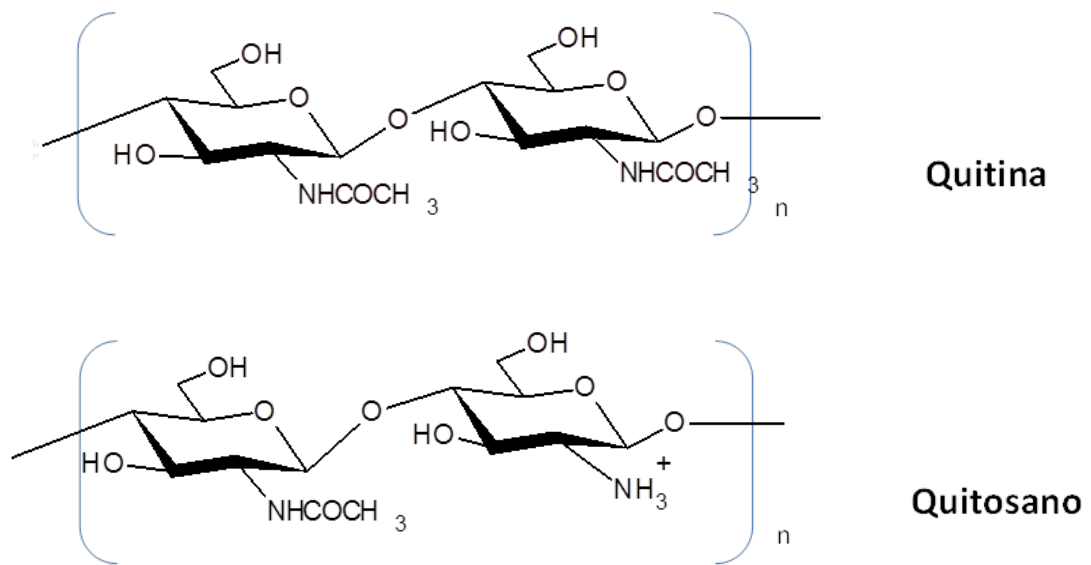
Figura 2: Esquema de obtención de quitosano como derivado de la quitina



Fuente: Velásquez C. (28).

El quitosano es un biomaterial de naturaleza polisacáridica, lineal, compuesto por unidades o monómeros al azar de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina y β -(1 \rightarrow 4)-D-N-acetilglucosamina (29), a diferencia de la quitina que está formada por β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa, tal como se muestra en la figura n° 3.

Figura 3: Estructura molecular quitina y quitosano



Fuente: Zhang, Y., 2008

Este polisacárido, resulta de la *N*-desacetilación parcial de la quitina, por lo que no es una única sustancia, sino una familia de biopolímeros con diferentes grados de desacetilación (igual o mayor a 60%). El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo *N*-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas. De esta manera el polisacárido se transforma en un polielectrolito en medio ácido (policatiónico).

Estos compuestos poseen diversas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, biotecnológica, cosmética, agricultura, medicina, entre otras. Esto debido a sus características como compuesto no tóxico, inocuo, biocompatible y biodegradable (30). Se presentan diversas especificaciones de acuerdo a su uso, tal como se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 1: Especificaciones técnicas del quitosano según su uso

Especificaciones	Grado farmacéutico	Grado alimenticio	Grado industrial
Apariencia	Polvo u hojuelas semitransparentes blanquecinas		
Olor	Inodoro	Inodoro	Inodoro
Grado de desacetilación	> 90 ~ 95,0 %	> 85,0 ~ 96,0 %	≥ 75 ~ 90 %
Humedad	< 8 %	< 8 %	< 12 ~ 13 %
Residuos de ignición	< 1 %	< 1 %	< 2 %
pH	7 ~ 8	7 ~ 8	7 ~ 8
Metales pesados (Pb)	15 ppm	15 ppm	
Metales pesados (As)	0,5 ppm	0,5 ppm	
Rcto. Total de bacterias	< 1.000 (ufc/g)	< 1.000 (ufc/g)	
Viscosidad	50 ~ 800 (mPa·s)		
Tamaño de las partículas	≥ 40Mesh, 60Mesh, 80Mesh, 100Mesh, etc.		

Fuente: I. Aranz, M. Mengibar, R. Harris, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, 2009 (26)

En el campo de los alimentos, el quitosano se utiliza principalmente en la formación de films biodegradables, inmovilización de enzimas, preservación de alimentos frente al deterioro microbiano, clarificación y desacidificación de jugos de frutas y bebidas, formación de emulsiones, espesantes, estabilización del color y suplementación dietaria (31). El éxito del quitosano en cada una de estas aplicaciones específicas está directamente relacionado con la investigación profunda en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

En los últimos años, ha tomado un gran interés en cuanto a las aplicaciones médicas y farmacéuticas, ya que posee propiedades interesantes que lo hacen adecuado para su uso en el campo biomédico. Se han reportado también otras propiedades como anticoagulante, antifúngico, inmunoestimulante, antiinflamatorio, agente cicatrizante de heridas, antioxidante, agente anticancerígeno, hipocolesterolémico, y antimicrobiano. A continuación se detallan cuatro de ellos, por su relevancia considerando el perfil epidemiológico nacional actual.

Antioxidante

El quitosano ha demostrado una capacidad de eliminación significativa contra diferentes especies de radicales, siendo los resultados comparables a los obtenidos con antioxidantes comerciales (26,32). Park PJ, et al, 2004. Evaluaron la capacidad del quitosano de secuestrar diferentes tipos de radicales libres, observado que a mayor desacetilación mayor era su capacidad antioxidante (33). Así también, Xing R, et al, 2005. Reportaron una correlación negativa entre peso molecular del quitosano y actividad antioxidante (34). La quelación de iones metálicos es una de las razones por las cuales quitosano puede ser considerado como un potencial antioxidante natural (39).

Anticancerígeno

Se ha reportado actividad antitumoral del quitosano por la inhibición del crecimiento de las células tumorales debido principalmente a un efecto en la estimulación inmune. Esta propiedad es aún muy controversial (35). Jeon y Kim han encontrado que los oligómeros de quitosano poseen actividad antitumoral probada tanto *in vitro* como *in vivo*

(36) Estudios llevados a cabo con ratones que ingirieron quitosano de bajo peso molecular, revelaron efectos antimetastásicos significativos del quitosano contra el carcinoma de pulmón de Lewis. Ueno et al. Han estudiado el efecto del quitosano sobre el crecimiento tumoral y la metástasis. La activación de macrófagos por acción del quitosano se sugiere para mediar sus efectos antitumorales in vivo (37).

Hipocolesterolémico

Es importante destacar que se han realizado diversos estudios en cuanto a la función del quitosano como hipocolesterolémico en animales (38) y en suplementación en humanos (39, 40). Se ha observado que la administración de quitosano produce una disminución de la grasa absorbida, aumentando su excreción (41).

El mecanismo de acción del quitosano estaría dado por su gelificación en estómago, el cual posee un pH ácido (1 a 3), moléculas con carga negativa se adhieren fuertemente al grupo amino libre ($-NH_3^+$) del quitosano. Por lo tanto, el quitosano reduce la absorción de grasas en el tracto gastrointestinal mediante la unión con los grupos carboxilo aniónicos de ácidos grasos y ácidos biliares, y que interfiere con la emulsión de lípidos neutros (por ejemplo, colesterol, otros esteroides) por ellos vinculante con enlaces hidrofóbicos. La consecuencia de este proceso es que al bloquear la absorción de las grasas se inhibe la formación de placas de ateroma, pudiendo disminuir el riesgo de aterosclerosis en individuos con hipercolesterolemia (42).

Efecto de saciedad

Las fibras dietéticas, como se ha mencionado, tienen diferentes efectos fisiológicos y proporcionan una variedad de beneficios para la salud, incluida la saciedad, beneficio atribuible principalmente a la fibra de tipo soluble. La saciación es definida como la satisfacción del apetito que se desarrolla durante el curso de una comida y, eventualmente resulta en el cese de comer. La saciedad, por el contrario, determina el tiempo entre una comida y otra, es decir, es la sensación de plenitud que persiste por un tiempo y nos lleva a permanecer sin comida hasta que retorna la sensación de hambre (43).

La saciedad puede evaluarse de diferentes maneras. Una de ellas consiste en medir parámetros bioquímicos, es decir, algunos péptidos gastrointestinales implicados en la regulación del apetito, como el péptido similar al Glucagón tipo 1 (GLP-1), la Colecistoquinina (CCK) o la Grelina. Estos parámetros permiten una medida objetiva. Sin embargo, su conversión a la sensación de saciedad percibida es indirecta. Esto se debe a que actúan como moduladores de la ingesta, y que todavía no hay datos que permitan definir la magnitud de sus variaciones con significancia biológica.

Una de las técnicas experimentales más influyentes que se utiliza para estudiar la regulación a corto plazo de la ingesta de alimentos es la prueba de pre- carga. Esta prueba consiste en la administración de un alimento en una cantidad determinada, la cual se ingiere antes de una comida principal del día (44). Además, existen herramientas para medir la percepción de saciedad de individuo, en este grupo se encuentra la Escala Visual Análoga (EVA), que es actualmente la más usada para evaluar saciedad subjetiva(45).

Diversos estudios han verificado el efecto sobre la saciedad de distintos tipos de fibras, tales como inulina y algunos hidrocoloides vegetales, como pectinas y gomas. M. Perrigue *et al*, 2009, evaluó el poder de de saciedad en yogures de baja y alta densidad energética adicionando 6 g. de inulina, como resultado aumentó el poder saciante en los yogur de baja densidad energética. El estudio siguió un diseño de precarga para evaluar saciedad (46).

Todas estas fibras ampliamente estudiadas son de origen vegetal, a diferencia de la fibra de quitosano, lo que la convierte en una nueva y novedosa fuente para ser analizada. En el estómago, el quitosano se comporta como fibra soluble, formando hidrogeles capaces de absorber grandes cantidades de agua y aumentar la distensión del estómago (47), lo cual desencadena señales aferentes vagales de plenitud otorgando así, mayor sensación de saciedad. El quitosano debido a su alto tamaño molecular y a su estructura lineal no ramificada, es un potente agente viscosante en medio ácido. La viscosidad de las soluciones de quitosano aumenta al incrementar la concentración de éste, mientras que disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación del producto.

Por otra parte, a nivel de intestino grueso el quitosano es fermentado por las bacterias colónicas, lo que generaría una mayor proliferación y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y gases (hidrógeno, anhídrido carbónico y metano) (48). Los AGCC producidos por la fermentación, estimulan la liberación del péptido YY (49), este péptido actúa directamente inhibiendo la liberación del neuropéptido Y y estimulando la producción de un fragmento del péptido anorexígeno POMC, de tal manera que aumenta la sensación de saciedad, reduce el apetito y la ingesta alimentaria. De esta propiedad derivan

muchos de los beneficios de la fibra soluble sobre las funciones en el organismo humano.

No obstante, una investigación más reciente ha sugerido un modo más complejo de la acción del quitosano sobre la regulación de la ingesta alimentaria, el cual estaría dado por el aumento de las concentraciones de leptina. Se ha propuesto que la glucosamina, componente del quitosano, puede estimular la expresión de genes LEP en adipocitos maduros (50). Esto se ha demostrado en estudios en animales con la administración de suplementos de 1,2 g de quitosano, los efectos observados sólo fueron significativos a un nivel de inclusión de 0,027 g de quitosano por kg de peso corporal (51). Esto equivaldría a una ingesta diaria de quitosano de 2 g/día para un individuo de 75 kg de peso corporal.

Algunos estudios, han mostrado que existe reducción de peso moderada con la ingesta de suplementos de quitosano, luego de la ingesta de 1,5 g antes de cada comida principal, sin estar acompañada de una dieta restrictiva en calorías. Posiblemente estos efectos sean producto de que el quitosano se comporta como una fibra soluble en el estómago, produciendo un aumento de la saciedad, una menor accesibilidad física de los nutrientes para ser absorbidos y una disminución de la ingestión de calorías por los consumidores.

A pesar de los beneficios descritos, la bibliografía sobre el efecto que tendría el quitosano en el proceso de saciedad, es aún escasa, por lo que se genera una nueva oportunidad de investigación.

Marco regulatorio

A pesar de las importantes propiedades atribuibles a este polímero, en el ámbito de la industria alimentaria el quitosano aún en la actualidad tiene que hacer frente a algunas limitaciones. Las barreras por las cuales el quitosano no se usa de forma masiva son principalmente por: la diversidad de fuentes de obtención y la falta de control de calidad de las empresas productoras de quitosano. La heterogeneidad de la fuente, tanto por los distintos tipos de especies (crustáceos, insectos, hongos) como por la zona geográfica y el hábitat de estos, incluso siendo de la misma especie podrían producir un quitosano diferente. El uso del quitosano como aditivo alimentario fue aprobado en Japón y Korea en 1983 y 1995, respectivamente (Weiner, 1992; KFDA, 1995). Su inclusión en el *Codex Alimentarius* fue considerada por su comisión en el 2003, pero actualmente no se recoge su uso en las listas generales estandarizadas de aditivos alimentarios, ya que falta la aprobación de la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria). Actualmente además de su uso como aditivo alimentario en países asiáticos existe un producto comercial (ChitoClear® Prymex ASA, Norway) que fue reconocido como producto GRAS (*Generally Recognised As Safe*) en Estados Unidos en el 2001 (52).

El quitosano presenta una baja toxicidad, con un DL 50 = 16 mL/kg, valor que sitúa a este compuesto en un nivel similar al azúcar y lo hace menos tóxico que la sal (53), por este motivo, el quitosano ya ha sido aceptado como suplemento dietario o como aditivo alimentario por la legislación de varios países como Italia, Francia, Noruega, Estados Unidos, Argentina y Japón. Los resultados de estas evaluaciones evidencian su

inocuidad y contribuye al avance de los aspectos regulatorios al respecto.

1.3. Yogur

Durante mucho tiempo, el yogur por sí mismo ha sido reconocido como un alimento saludable, debido a la acción beneficiosa de sus bacterias viables que compiten con las bacterias patógenas por nutrientes y espacio. Por este motivo se ha considerado esencial su consumo dentro de una dieta equilibrada (54).

Según el reglamento sanitarios de los alimentos y la Norma Chilena NCh2560 describe lo siguiente como yogur (55): “Es un producto lácteo obtenido por coagulación ácida derivada de la fermentación láctica de las bacterias *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsptermophilus*, y otras permitidas sobre la leche, con o sin aditivos opcionales autorizados. Los microorganismos, en el producto, deben ser viables y en cantidad superior a 1×10^6 UFC/g. El producto debe tener las propiedades físicas, químicas y sensoriales específicas de que indica la norma”.

En los últimos años, ha habido un aumento del consumo de yogur lo que ha llevado a incrementar la producción local. La producción a nivel de plantas industriales creció sostenidamente, con un incremento de 35,4% en el período comprendido entre los años 2006 y 2012. En el año 2012 se produjeron 229 millones de litros de yogur en el sector industrial lechero nacional. Esto significó un consumo per cápita que alcanzó a 13,8 litros, según informó la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura (56). Se destaca que la producción de yogur se ha duplicado casi en la última década, desde 127 millones de litros que se producían en el año 2002 a lo visto

actualmente, con un consumo per cápita que ha aumentado de 8,4 a 13,8 litros aproximadamente.

El consumo per cápita de yogur en Chile es más alto que el de la mayoría de los países latinoamericanos (Argentina,13,5; Uruguay, 13; Brasil, 6,7 y México, 5), e incluso, que el de algunos países desarrollados, como Estados Unidos (6,1) y Canadá (9,2), pero todavía está muy por debajo del que presentan algunos países europeos, donde los consumos son casi el doble del que se está alcanzando en Chile, como España (18,2), Alemania (18,3), Francia (21), Suecia (35,4) y Finlandia (40,6).

Las empresas del rubro alimentario, han puesto énfasis en ofrecer un portafolio cada vez más amplio de productos, adaptados casi a cada gusto y necesidad de los consumidores. Una evidencia clara es el cambio que se ha generado en el segmento del yogur, que pasaron del clásico “batido”, hasta segmentos gourmet, más cremosos y con más fruta que el promedio y con otros agregados que los convierten en opciones de postre, o los que prometen algún aporte a la salud como los de la categoría digestivos, prebióticos.

Dentro de las estrategias de las empresas, para mejorar las propiedades del yogur se encuentra la adición de fibra dietética. Si bien, la adición de fibra dietética a las bebidas y los alimentos se ha asociado con mayor saciedad (57) y con la reducción de la ingesta de energía a corto plazo, en este producto lácteo, la finalidad de su incorporación solo ha tenido relación con sus propiedades prebióticas, y sensoriales (58). Para ello, dentro las fibras más utilizadas en el mercado se encuentra: la inulina, fibra de tipo soluble constituida por polímeros de fructosa ampliamente utilizada por sus efectos en la

promoción del crecimiento bacterias saludables en el colon. En la actualidad se considera que para que pueda ejercer su efecto prebiótico, un producto con fibra soluble debe contener a lo menos 1,5 g por porción y el nivel mínimo de ingestión debería ser 3 g por día, con un máximo aconsejado de 30 g al día (59).

Se han realizado algunos estudios de aceptabilidad sensorial que muestran los efectos de la adición de inulina en yogures bajos en grasa, a concentraciones que varían entre 0 y 4%. En estas investigaciones han utilizado paneles de personas (entrenadas y no entrenadas) que evalúan diferentes propiedades sensoriales y organolépticas como: color, sabor, viscosidad, consistencia, entre otras. Encontrando diferencias significativas en cuanto al cambio de textura y consistencia de las muestras de yogures añadidas con inulina (60,58). Es así que en el mercado nacional encontramos productos con un aporte de inulina de 2,36 g por porción. Al contrario otros tipos de fibra tales como almidón modificado, agar, carragenina, son utilizados por sus propiedades espesantes y como sustitutos de grasa en productos de bajo contenido graso (61).

De esta manera, con los antecedentes antes expuestos, se presenta a continuación el trabajo de tesis que busca incorporar a un yogur comercial fibra de quitosano asociada a amplios beneficios para la salud humana, y evaluar su potencial efecto sobre la sensación de saciedad, constituyéndose como una alternativa de alimento saludable.

2. HIPÓTESIS

La incorporación de quitosano a un producto lácteo (yogur) como fuente de fibra no tradicional, otorga mayor saciedad en relación a un yogur sin adición de fibra.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de saciedad al consumir un producto lácteo (yogur) adicionado con quitosano comercial como fuente de fibra no tradicional en una población de adultos jóvenes sanos.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Formular preparaciones a partir de la incorporación de quitosano a muestras de yogur comercial.
- 3.2.2 Evaluar preferencia y aceptabilidad sensorial de las muestras elaboradas con quitosano en comparación con sus controles para definir un producto formulado.
- 3.2.3 Evaluar el nivel de tolerancia del producto formulado versus su control en adultos jóvenes sanos.
- 3.2.4 Determinar la composición químico-proximal de la preparación final.
- 3.2.5 Evaluar el efecto de la saciedad generada por la formulación final adicionada con quitosano en comparación con la muestra control en adultos jóvenes sanos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio

La presente investigación corresponde a un estudio de tipo analítico experimental transversal.

4.2 Características de población en estudio

La población en estudio estuvo constituida por jóvenes adultos sanos entre 18 y 35 años, en su mayoría estudiantes de la Facultad de farmacia, Universidad de Valparaíso, quienes debieron cumplir criterios de inclusión y exclusión según las pruebas realizadas, descritas a continuación.

4.3 Ensayos preliminares

4.3.1 Selección muestras de yogur comercial

Para determinar las muestras de yogur a utilizar, se realizó un estudio y análisis de la gama de productos ofrecidos en el mercado, según:

- Producción nacional: Marcas comerciales con mayor producción al año 2013.
- Precio: Menor precio según el promedio obtenido de las marcas seleccionadas.
- Información nutricional: Aporte calórico y de macro nutrientes por 100 g de producto batido entero y descremado.

De acuerdo con este análisis, se seleccionó una única marca de yogur para trabajar en las pruebas experimentales, de la cual se obtuvieron diversas unidades aplicando los siguientes criterios:

- Tipo de yogur: batido entero y descremado.
- Sabores: distintas variedades según lo ofrecido por la marca.

Las unidades de yogur seleccionadas fueron adquiridas en supermercados locales y se almacenaron entre 3-5°C antes de cada prueba, con un tiempo máximo de almacenamiento de 10 días para los productos sellados.

4.3.2 Obtención y descripción del quitosano (comercial)

El quitosano utilizado en este estudio fue donado por la empresa BIOTEX S.A., el cual es obtenido por métodos químicos a partir de la extracción de desechos industriales del camarón rojo, provisto por una empresa China productora del quitosano.

La presentación de este producto viene como polvo fino de color blanco, en un envase de 500 g. Posee un tamaño molecular de 575 kDa y con un porcentaje de desacetilación del 91,6%, según certificado de análisis del fabricante (Anexo N° 1), cumpliendo así con los parámetros establecidos para grado alimenticio.

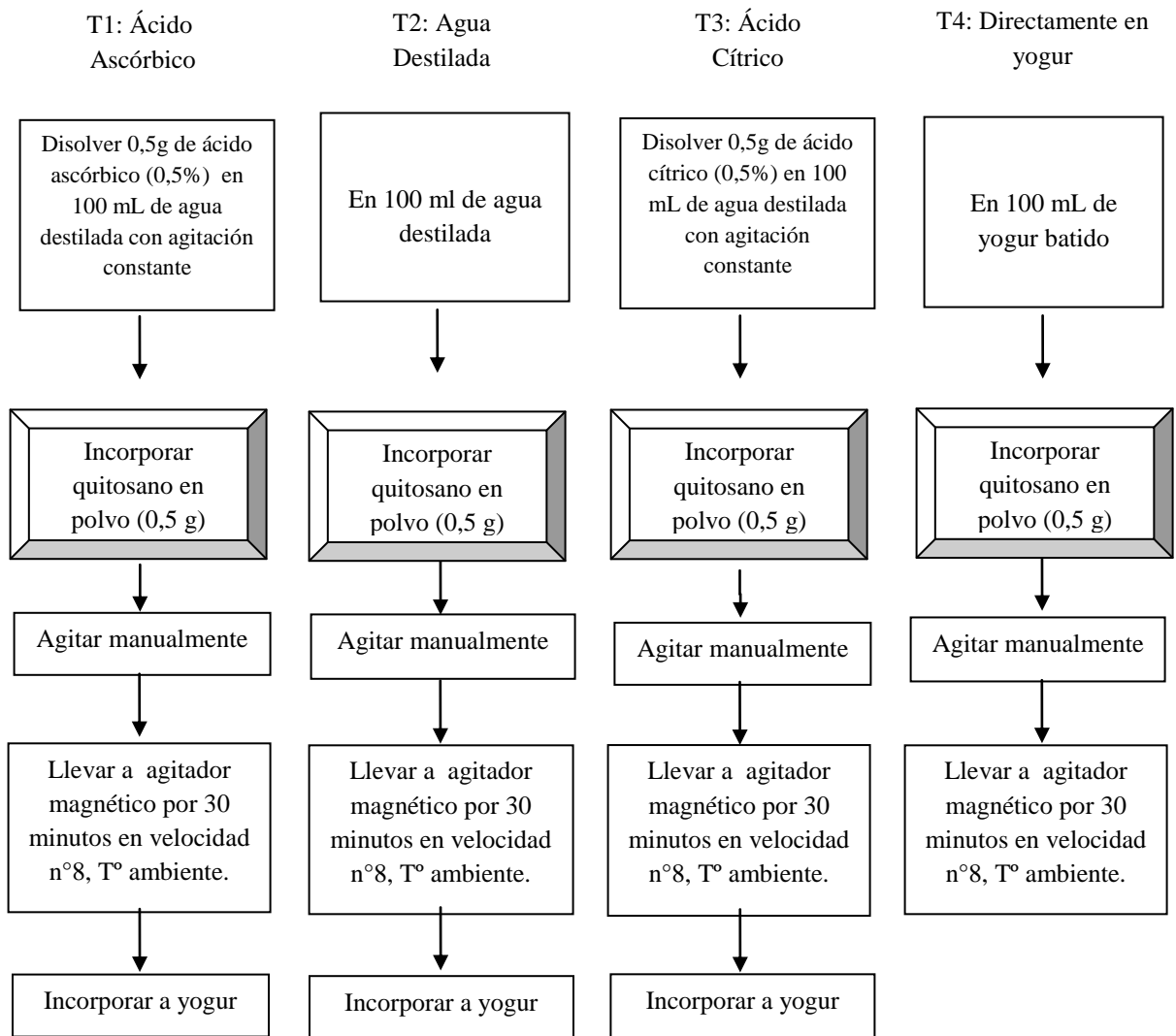
4.3.3 Selección metodología de incorporación de quitosano.

Para determinar la forma más idónea de incorporar el quitosano en polvo a las muestras de yogur, se realizaron diferentes tratamientos:

- T1: Ácido ascórbico + quitosano
- T2: Agua destilada + quitosano
- T3: Ácido cítrico + quitosano
- T4: Quitosano + yogur directamente

El siguiente diagrama presenta la metodología para la incorporación de quitosano en las muestras de yogur al 0,5% m/v.

Figura 4: Diagrama de procedimientos iniciales incorporando quitosano al 0,5 % m/v.



Estos procesos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación (UMCE) y en el Laboratorio 1 de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

La valoración de estos procedimientos se realizó de manera semi-cuantitativa por medio de evaluación visual de los integrantes de la investigación (alumnas tesistas, y directora de tesis) analizando de las siguientes variables: pH, color, olor, sabor, consistencia y textura. A partir de estas pruebas se seleccionó el tratamiento con mayor potencial para incorporar quitosano a las muestras de yogur.

Además se determinaron las concentraciones de quitosano y sabores a utilizar para las pruebas de evaluación sensorial.

4.4 Pruebas de evaluación sensorial: Test de preferencia (ranking) y de aceptabilidad sensorial.

4.4.1 Diseño experimental

En el presente ensayo se utilizó un diseño factorial (2x2x3), evaluando las siguientes variables experimentales: contenido de materia grasa, sabor, y concentración de quitosano, tal como se muestra en la tabla n° 1.

Tabla 2: Detalle de las formulaciones según diseño factorial.

CONTENIDO DE MATERIA GRASA		ENTERO			DESCREMADO		
SABOR	FRUTILLA	F1	F2	F3 c	F4	F5	F6 c
	DAMASCO	D1	D2	D3 c	D4	D5	D6 c
CONCENTRACIÓN QUITOSANO		0,25%	0,5%	0%(control)	0,25%	0,5%	0%(control)

En base a este diseño se realizó la aplicación de 12 tratamientos, equivalentes a las muestras obtenidas según las variables antes descritas.

4.4.2 Unidad experimental

La unidad experimental corresponde a las muestras de yogur (n=12) las cuales fueron distribuidas en recipientes idénticos de 20 mL, cuya incorporación de quitosano se realizó mediante la metodología escogida en las pruebas preliminares.

Cada muestra fue desarrollada en los laboratorios de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, estas fueron preparadas y suministradas a los participantes en un periodo de tiempo menor a 24 horas y conservadas refrigeradas a una temperatura de 3-5° C, evitando su deterioro y asegurando condiciones de inocuidad.

4.4.3 Procedimiento

Los participantes fueron contactados mediante correo electrónico y otros medios de comunicación. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Personas ambos sexos
- Rango de edad entre 18 y 35 años
- Sin antecedentes de intolerancia a la lactosa
- Sin alergias alimentarias.

Se excluyeron mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, personas con patologías con el sentido del gusto y/o del olfato alterado, e individuos con medicación que

pudiera alterar el apetito o los sentidos. Cada voluntario llenó una ficha de ingreso y consentimiento informado antes de realizar la prueba (Anexo N°2).

Se realizó un test de preferencia (Test de Ranking) entre las distintas muestras y sus controles, donde los jueces debieron ordenar de mayor a menor preferencia, ubicándose en el 1° lugar la de mayor preferencia y en el 6° lugar la muestra de menor (Anexo N°3). Por otra parte, para evaluar los resultados obtenidos de la prueba de aceptabilidad se utilizó una escala hedónica de 7 puntos (Anexo N°4), en la que los panelistas indicaron su aceptación de las preparaciones, con puntos de anclaje de 1 y 7, siendo 1 “me disgusta extremadamente” y 7 “me gusta extremadamente”.

Los voluntarios se dividieron en dos grupos de igual número, evaluando cada grupo un sabor distinto y en sesiones separadas. A cada panelista se le entregó una bandeja con 6 muestras en recipientes idénticos, en formato de 20 mL cada una, rotuladas con tres dígitos codificados. Los jueces se ubicaron en cubículos especiales aislados y sin ningún tipo de distracción. Además se les proporcionó un vaso de agua como limpiador paladar, 3 galletas de soda para neutralizar el sabor, una escupidera y las respectivas hojas de evaluación. En la siguiente figura se muestran las condiciones en las que se realizó la prueba.

Figura 5: Condiciones en que se realizó la evaluación sensorial



Ambas pruebas se desarrollaron en el Centro de Nutrición de la Universidad de Valparaíso (CENUVAL) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

4.4.4 Análisis estadístico de las pruebas de evaluación sensorial

Para el análisis estadístico de la prueba de aceptabilidad sensorial, se verifica si los resultados obtenidos se ajustan a una distribución normal con el método de ShapiroWilk para muestras pequeñas ($p > 0,05$), y se decide el método estadístico a utilizar que puede ser la prueba U de Mann-Whitney (no paramétrico) o *t-Student* para muestras independientes (paramétrico). Por otra parte, el test de ranking se evalúa mediante tabla de Kramer ($p < 0,05$).

4.5 Prueba de tolerancia: Evaluación de efectos adversos de la formulación propuesta.

4.5.1. Diseño experimental

Este estudio fue de tipo randomizado cruzado ciego, el cual se dividió en dos pruebas: tolerancia aguda y tolerancia a largo plazo. Para la realización de esta prueba se adaptó el diseño del estudio realizado por Gotteland M. et al. 2006, donde se evaluó la tolerancia gastrointestinal al consumo agudo de distintas cantidades de un yogur suplementado con 2 g de polidextrosa y 2 g de inulina (62).

4.5.2. Unidad Experimental

Se seleccionaron 20 sujetos para la prueba de tolerancia aguda y 10 para la prueba de tolerancia a largo plazo, con los mismos criterios de inclusión que las pruebas de evaluación sensorial, incorporando la variable que dentro de su dieta consuman yogur regularmente. También se excluyeron personas con patologías gastrointestinales que se vieran afectadas por el consumo de la preparación.

Los participantes fueron contactados mediante correo electrónico enviado a cada curso correspondiente de las carreras de Nutrición y Dietética y Química y Farmacia (1° a 5° año).

Cada panelista completó una ficha personal para determinar el cumplimiento de los criterios de selección (Anexo N° 5) y firmó un consentimiento informado para registrar su aprobación y conocimiento de las pruebas en las que participarán previa consejería (Anexo N°6).

4.5.3. Procedimiento

- Prueba de Tolerancia Aguda

Se citó a los participantes (n=20) en dos sesiones para medir tolerancia aguda, los cuales se dividieron al azar, recibiendo el yogur con quitosano (yogur Q) en una de las sesiones y en la otra el yogur control (yogur C). En ambos casos la cantidad entregada fue una porción de consumo habitual de 125 ml.

Se registraron síntomas antes y después del consumo por un lapso de 2 horas, según pauta de evaluación para tolerancia (Anexo N°7).

- Prueba de Tolerancia a Largo Plazo

Este estudio tuvo una duración de 10 días, en el cual los participantes (n=10) se dividieron en dos grupos al azar, consumiendo el yogur con quitosano por 5 días, y el yogur control por otros 5 días.

Ambos grupos consumieron el producto durante el desayuno o la primera comida del día, registrando antes y después de su consumo alguna molestia o síntoma gastrointestinal en la pauta de evaluación de tolerancia (Anexo N°7), por el espacio de tiempo que duró la prueba.

Las muestras fueron suministradas a los participantes durante un periodo de tiempo que no afectó la calidad del producto y en contenedores para mantener la temperatura de refrigeración. Junto con este kit se hizo entrega de un instructivo para una

adecuada realización de la prueba (Anexo N°8), y la pauta de evaluación para medir tolerancia.

4.5.1 Análisis Estadístico Prueba de Tolerancia

Para el análisis estadístico de la prueba de tolerancia aguda y a largo plazo se utilizó la prueba Chi- cuadrado (χ^2) ($p < 0,05$).

4.6 Análisis químico - proximal de la formulación final

Los análisis químicos de la formulación final fueron desarrollados en los laboratorios experimentales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. De acuerdo a las metodologías establecidas por la AOAC (1990-1995) para cada uno de los parámetros evaluados.

4.6.1. Determinación de humedad (N° 925.10)

Se pesa aproximadamente 1 g de muestra en una cápsula de porcelana. La muestra (m) se deseca calentando en estufa a una temperatura de 75 ° C entre 6-12 horas; luego se enfría en una desecadora y se pesa (mf). El proceso de secado se repite hasta obtener un peso constante. La humedad de la muestra, expresada en forma porcentual, se obtiene según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

4.6.2. Determinación cenizas (N° 930.22)

Se incinera 1g de muestra (mi) en un crisol de porcelana previamente incinerado y pesado (mc) a 550 ± 10° C hasta alcanzar la combustión completa

de la materia orgánica y obtener de un peso constante. Se enfría en la desecadora y se pesa (mf). El contenido de minerales expresado en forma porcentual, respecto a la cantidad de cenizas, se calcula de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(mf - mc) \times 100}{mi}$$

4.6.3. Determinación de extracto etéreo (EE) (N° 935.38)

Se pesa 1g de muestra seca (mi) y se coloca en sobres de papel filtro, los cuales son previamente secados en una estufa a $104 \pm 1^\circ\text{C}$. Los filtros con sus respectivas muestras se colocan dentro de una cámara de extracción Soxhlet y se vierten 100 mL de éter de petróleo, dejándolo sifonar durante 4 a 6 horas. El solvente que se encuentra en el balón se deja evaporar y se seca en la estufa a 60°C hasta obtener un peso constante (mf). Posteriormente, el balón receptor es secado y pesado (mb).

El contenido de grasas expresado en forma porcentual, respecto a la cantidad de extracto etéreo (EE), se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EE} = \frac{(mf - mb) \times 100}{mi}$$

4.6.4. Determinación de proteínas (N° 950.36)

Se utiliza el método Kjeldhal, el cual se fundamenta en la conversión de nitrógeno total presente en la muestra a sales de amonio que son posteriormente valoradas por volumetría ácido-base. El método de Kjeldhal

consta de tres etapas: digestión de la muestra, destilación con arrastre de vapor del amonio producido y valoración ácido-base de este amoniaco.

El contenido de nitrógeno expresado en forma porcentual de proteínas se determina mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{Proteínas} = V \text{ (mL)} * N * 14.007 * 6.25 * 100 / \text{masa muestra (mg)}$$

4.6.5. Determinación de fibra dietética total (N° 45.4.07)

Se pesa un duplicado de 1 g de muestra previamente desgrasada. Se coloca en un matraz Erlenmeyer 500 mL y adicionar 50 mL de buffer fosfato pH 6. Se adiciona 0,1 mL de α amilasa termoestable e incubar a 95° C en un baño termostático Memmert por 15 minutos. Luego se deja enfriar y se ajusta a pH 7,5 con hidróxido de sodio con pHmetro Oakton. Posteriormente se adiciona 0,1 mL de proteasa e incuba en baño maría termostático a 60 °C por 30 minutos. Se deja enfriar y se ajusta a pH entre 4 y 4,6 con ácido clorhídrico. Se adiciona 0,1 mL de aminoglucosidasa e incubar a 60° C por 30 minutos. Una vez enfriado, agregar 4 volúmenes de etanol 95% v/v frío, y se deja precipitar durante 12 horas. Se filtra a través de un crisol filtrante previamente seco y tarado (mc). Se lava el precipitado con etanol al 78 %, 95% v/v y acetona. Secar los crisoles y sus respectivos residuos en estufa a 105° C por 5 horas. Se enfría en desecadora y se pesar (mr). Además de incinera uno de los duplicados en mufla a 550 °C para determinar el contenido de cenizas (C). Al duplicado restante determinar el contenido de proteínas (P).

La determinación de FDT se realiza según la siguiente fórmula:

$$\%FDT = \frac{R - (P + C)}{m}$$

4.6.6. Determinación Extracto No Nitrogenado (ENN)

Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrientes no evaluados con los métodos señalados anteriormente dentro del análisis proximal, constituido principalmente por carbohidratos digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados. Este procedimiento se determinó por diferencia, a través del siguiente cálculo:

$$ENN (\%) = 100 - (A + B + C + D + E)$$

Donde:

A = Contenido de humedad (%)

B = Contenido de proteína (%)

C = Contenido de lípidos (%)

D = Contenido de fibra dietética (%)

E = Contenido de ceniza (%)

4.6.7. Análisis estadístico prueba proximal

Para el análisis estadístico se utilizó prueba de *t-student* para muestras independientes ($p < 0,05$).

4.7 Estudio de Saciedad

4.7.1 Diseño experimental

En la presente prueba se utilizó un diseño randomizado paralelo, en la cual se evaluó primeramente saciedad subjetiva y luego objetiva. Las pruebas se realizaron en dos sesiones, en el Laboratorio CENUVAL de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Los participantes se dividieron en dos grupos al azar, consumiendo el yogur C (control) y yogur Q (quitosano) paralelamente.

Con anterioridad se dio las indicaciones respecto a la preparación de la prueba (no ingerir alcohol, ni realizar ejercicio vigoroso, etc.) y el tipo de desayuno estándar que debía consumir, mediante una consejería saludable (Anexo N°9).

4.7.2 Unidad experimental

Se seleccionaron un total de 30 sujetos para medir saciedad. Para contactar a los participantes, se difundió por distintos medios electrónicos la invitación a participar del estudio.

Cada uno de los participantes debió cumplir con los criterios de inclusión y exclusión, además de firmar un consentimiento para su aprobación y conocimiento de la prueba. (Anexo N° 10).

Criterios de inclusión:

- Disponibilidad para realizar la prueba de saciedad.
- Edad entre 18 y 35 años.
- Ambos sexos.

- Estado nutricional normal: Para medir el estado nutricional de cada sujeto se evaluó antropométricamente peso y talla, con una TANITA SC-240 portátil y cintra métrica. Se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC), seleccionándose a los participantes con estado nutricional normal si el IMC resulta entre 18,5 kg/m² y 24,9 kg/m² (63).
- Consumo habitual de yogur.
- Sin intolerancia a la lactosa
- Sin alergias alimentarias

Se excluyeron del estudio a los sujetos que presentaron una o más de las siguientes condiciones:

- Medicación que afecte el apetito o la ingesta de alimentos.
- Dieta restrictiva o regímenes para perder o ganar peso.
- Patologías gastrointestinales o cualquier otra que sea vea afectada por el consumo del producto a evaluar.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

4.7.3 Procedimiento

Esta prueba se basó en administrar un producto lácteo (yogur) con quitosano mediante el método de pre-carga.

Los panelistas debieron tomar desayuno alrededor de 3 - 4 horas antes de asistir a la prueba. Se les entregó como pre-carga una porción de 150 ml de muestra, la cual debió ser consumida durante los primeros 15 minutos. Luego se evaluó saciedad de forma subjetiva y posteriormente de forma objetiva.

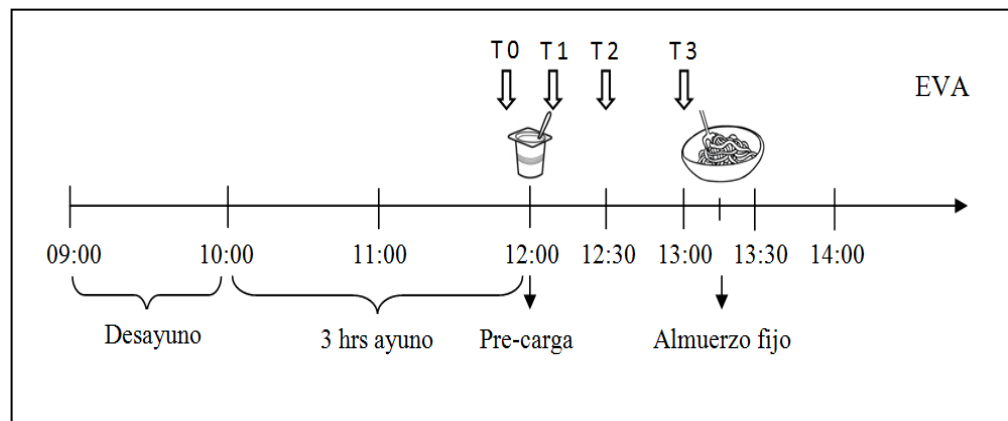
- **Prueba Subjetiva:** Para este fin se utilizó una Escala Visual Análoga (EVA), que consiste en una línea recta de 10 cm de longitud (Anexo N°11), en la que los panelistas marcaron el grado de saciedad, hambre, plenitud y deseo de ingerir un alimento (graso, salado, dulce, líquido) que sintieron de acuerdo a su percepción individual. La cronología de las sesiones se muestra en la figura 6.

El día de la prueba, los sujetos llegaron entre 11:30 y 12:00 de la mañana al laboratorio CENUVAL de la Facultad de Farmacia. Cada individuo contestó cuatro encuestas (EVA) en los siguientes tiempos:

- Tiempo 0: antes de consumir la muestra.
- Tiempo 1: después de consumir la muestra.
- Tiempo 2: 30 minutos después de consumir la muestra.
- Tiempo 3: 60 minutos después de consumir la muestra.

Durante este periodo los participantes no ingirieron ningún tipo de alimento o líquido.

Figura 6. Cronología de la sesión de prueba de saciedad.



- **Prueba Objetiva:** Luego de 75 minutos aproximadamente de haber ingerido la pre- carga a cada individuo se le entregó un almuerzo fijo con repetición, indicándoles que consumieran todo lo que desearan y que solicitaran libremente más del plato de fondo si apetecían.

El almuerzo diseñado para individuos adultos jóvenes sanos estuvo constituido por 822 Kcal correspondiente al 35% en base una dieta de 2300 kcal/día, según DRI (Dietary Reference Intakes) (64,65) para adultos y niños mayores de 4 años de edad, cuya distribución calórica fue: P% =12, G% = 27, CHO%= 61.

De acuerdo a este diseño, el almuerzo propuesto estuvo constituido por: fideos con salsa a la boloñesa, pan hallulla, agua mineral sin gas y postre fruta (manzana). El aporte de energía y macronutrientes del almuerzo fijo con repetición entregado se detalla en la tabla 3.

Tabla 3: Aporte de energía y macronutrientes del almuerzo entregado.

Ingredientes	Medidas caseras	Porción	Unid	Energía (kcal)	Prot (g)	CHO (g)	Lípidos (g)
Tallarines (cocidos)	1 taza	300	g	390	13,8	78,3	2,0
Salsa de tomate	1/2 taza	60	Cc	24	0,8	4,8	0,4
Zanahoria	1 cucharada	20	g	9	0,2	2,1	0,0
Carne molida de pavo	1/2 taza	60	g	37	6,6	0,4	0,9
Cebolla	1 cucharada	15	g	6	0,2	1,2	0,0
Pimentón	1 cucharada	10	g	3	0,0	0,6	0,0
Aceite	1 cucharada	20	Cc	180	0,0	0,0	20,0
Pan hallulla	1 unidad pequeña	40	g	115	3,6	22,2	1,3
Agua mineral	1 vaso	200	Cc	0	0,0	0,0	0,0
Manzana	1 unidad regular	100	g	59	0,2	15,2	0,4
Total				822	25,4	124,8	25,0

A todos los participantes se les otorgó el mismo gramaje de alimento, y se obtuvo la cantidad real consumida en gramos por pesada diferencial. El cálculo de energía consumida se estableció mediante la Guía de Composición Nutricional de Alimentos Naturales, de la Industria y Preparaciones Chilenas Habituales (66).

7.1. Análisis Estadístico Prueba de Saciedad

Para el análisis de los datos se utilizó el Software Estadístico Minitab Statistical Software v.16. Se realizó pruebas de normalidad con método Shapiro Wilk para determinar el método estadístico a utilizar.

7.1.1. Evaluación Subjetiva de saciedad: Los contrastes estadísticos para la escala visual análoga (EVA) fueron realizados a través de prueba *t*-student para muestras no pareadas ($p < 0,05$).

7.1.2. Evaluación Objetiva de Saciedad: Los análisis estadísticos para evaluar esta prueba, se realizarán a través de estadística descriptiva (promedio, desviación estándar y rango). Las diferencias entre la formulación final y la muestra control se analizarán a través de la prueba *t*-student para muestras no pareadas ($p < 0,05$).

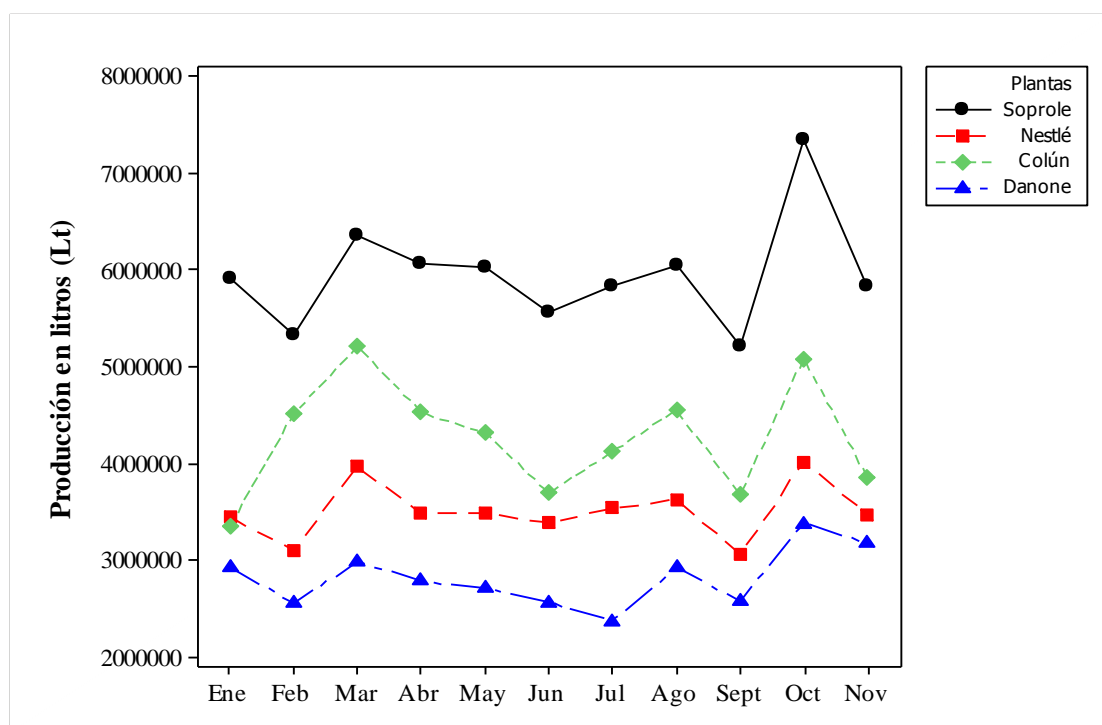
5. RESULTADOS

5.1 Pruebas preliminares

5.1.1 Selección muestras de yogur comercial

- Producción nacional: Se seleccionaron las cuatro principales empresas productoras de yogur, según los datos obtenidos por la ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias) (67). Se consideraron las marcas comerciales con mayor producción en litros al año 2013, expresados en el gráfico 1.

Gráfico 1: Producción en litros de yogur al año 2013, según plantas lecheras.



Según los datos recopilados, la mayor producción de litros de yogur a finales del año 2013 la obtuvo la planta lechera Soprole con 65.519.650 (L/año), seguido por Colún con 46.926.226 (l/año), siendo las marcas predominantes en el mercado.

- Precio: Se registraron los precios observados en los supermercados locales (Supermercado Lider) por las cuatro principales marcas (Soprole, Nestlé, Colún, Danone). Se obtuvo el precio promedio por 100 g de producto, considerando exclusivamente su línea de yogur batido entero y descremado.

Tabla 4: Precio promedio por 100 g de producto según principales marcas.

Precio	Soprole	Colún	Nestlé	Danone
Por 100 g	\$ 158	\$ 124	\$ 126	\$ 120

De estas cuatro marcas, Danone y Colún presentan el menor precio promedio por 100 g de producto.

- Información nutricional: El contenido nutricional fue obtenido desde las etiquetas de los productos adquiridos. Se consideró el aporte por 100 g de yogur batido entero y descremado de cada marca, como figura en las tablas 5 y 6.

Tabla 5: Información Nutricional Yogur Entero por 100 g de producto.

Marca comercial	Energía (Kcal)	Proteínas (g)	H. de C. Disp. (g)	Grasas (g)
Soprole	98	3,4	15,2	3,6
Colún	93	4,1	14,3	2,1
Nestlé	85	2,8	15,04	1,5
Danone (Calán)*	81	2,8	14,2	0,7

*Yogur semidescremado

Cabe mencionar que la empresa Danone, no cuenta con línea de yogur batido entero, solo posee sus marcas de yogur semidescremado (Calán) y descremado (Parmalat Diet), por lo que no se consideró en el análisis. El resto de las marcas presenta un aporte calórico que va entre 85 a 98 kcal/100 g, siendo Soprole la que contiene mayor cantidad de energía proveniente de las grasas, en contraste con la marca Nestlé que tiene el aporte calórico más bajo, debido a un menor contenido de proteínas y grasas. En cuanto a la marca Colún, presenta un aporte energético intermedio, con mayor cantidad de proteínas y menor contenido de hidratos de carbono disponibles.

Tabla 6: Información Nutricional Yogur Descremado por 100 g de producto.

Marca comercial	Energía (Kcal)	Proteínas (g)	H. de C. Disp. (g)	Grasas (g)
Soprole	42	4,3	5,6	0,2
Colún	53	4,5	8,5	0,1
Nestlé	67	4	12,1	0,3
Danone (Parmalat)	38	3,5	5,9	0,1

El rango entre los aportes calóricos de los yogures descremados es amplio, variando de 38 a 67 kcal/100 g debido a las diferencias en su contenido de hidratos de carbono disponibles. Se destaca la marca Colún por su mayor aporte proteico.

En base a los datos obtenidos según las variables producción, precio y contenido nutricional se seleccionó la marca comercial COLÚN, en sus variedades yogur batido entero/descremado y sus respectivos sabores: Cereza, Damasco, Frambuesa, Frutilla, Mora, Vainilla, Plátano*, Piña*, Papaya **.

*sólo yogur batido entero/ ** sólo yogur batido descremado.

5.1.2 Selección metodología de incorporación de quitosano, resultados preliminares.

Mediante la evaluación subjetiva realizada por los integrantes de la investigación, se determinó que el tratamiento n° 4, incorporando el quitosano directamente al yogur, era el más idóneo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7:

Tabla 7: Variables observadas por inspección visual en pruebas preliminares.

Nº Tratamiento	pH	Color	Olor	Sabor	Consistencia	Observaciones
T1	4,9	Transparente amarillento	++	+	Semi - líquido (tipo jarabe)	Mezcla homogénea debido al pH del ácido ascórbico. Se decidió incorporar a yoghurt observando cambio en la consistencia del producto (más líquido).
T2	7,8	Blanco pálido	+++	++	Líquido Aspecto turbio	Mezcla heterogénea, alta suspensión de partículas de Quitosano en el fondo (dos fases). Debido a lo observado no se incorporó al yogur.
T3	2,7	Transparente blanco pálido	++	+++	Semi-Líquida (tipo miel)	Baja suspensión de partículas de Quitosano en el fondo. Debido al pH muy ácido y su sabor intenso no se incorporó al yogur
T4 (Descremado)	4,4	No se modifica el color	+	++	No se modifica consistencia. Textura arenosa leve.	Ligero olor marino, pero se enmascara bien con el yogur, especialmente en los sabores frutilla y damasco. Se percibe un leve sabor astringente.
T4 (Entero)	4,6	No se modifica el color	+	+	No se modifica la consistencia. Textura suave al paladar.	Olor y sabor de quitosano es casi imperceptible.

Intensidad: + bajo; ++ medio; +++ alto.

5.1.3 Selección de sabor

Para la selección del sabor, se realizaron ensayos preliminares por parte del grupo de tesis, evaluando las distintas variedades ofrecidas por la marca Colún. De estas, se obtuvo que los sabores frutilla y damasco fueron los que mejor disimulaban el gusto del quitosano.

5.1.4 Selección concentración quitosano

Se probaron las siguientes concentraciones: 0,25% - 0,5% - 1% - 3% - 4%, observándose que niveles sobre el 1% afectaban las características organolépticas del yogur, principalmente sabor y olor. Por tanto, las concentraciones de quitosano seleccionadas fueron al 0,25% y 0,5%, con los gramajes que se describen en la tabla nº 7.

Tabla 8: Porcentaje concentración de quitosano y gramaje incorporado a las preparaciones.

% Concentración	Especificación por porción consumo habitual (125 mL)	Especificación por 20 mL (prueba aceptabilidad)
0,25%	0,3 g de quitosano	0,05 g de quitosano
0,5 %	0,6 g de quitosano	0,01 g de quitosano

5.2 Pruebas de evaluación sensorial

Se utilizó un panel piloto constituido por 38 jueces no entrenados, los cuales se dividieron en dos grupos (n=19) para evaluar por separado los sabores frutilla (Grupo I) y damasco (Grupo II).

Se realizaron dos pruebas de evaluación sensorial subjetiva, debido a la gran cantidad de muestra, las que fueron: Test de preferencia (Ranking) y Test de aceptabilidad sensorial.

5.2.1 Prueba de preferencia (ranking)

Los resultados para esta prueba se evaluaron a través de la tabla de Kramer (49-84) con una significancia estadística ($p < 0,05$) según la zona de preferencia (mayor, media y menor preferencia). En los gráficos 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos para ambos grupos, las muestras con mayor preferencia fueron el yogur control entero frutilla y damasco (F3c y D3c). Las muestras de yogur descremado en ambos sabores (F4, F5, D4 y D5) fueron las menos preferidas por los panelistas, por lo tanto, estas muestras fueron descartadas.

Se destaca una mayor preferencia por el sabor frutilla que damasco, ya que posee dos muestras con un nivel de preferencia mayor (F3c y F1).

Gráfico 2: Puntaje de preferencia por muestra sabor frutilla (grupo I).

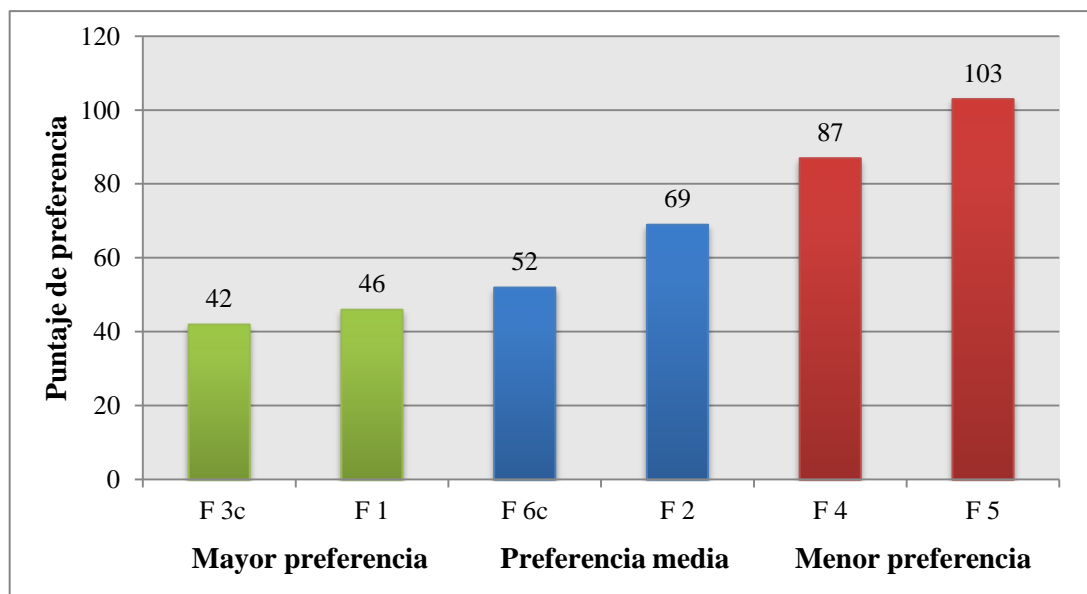
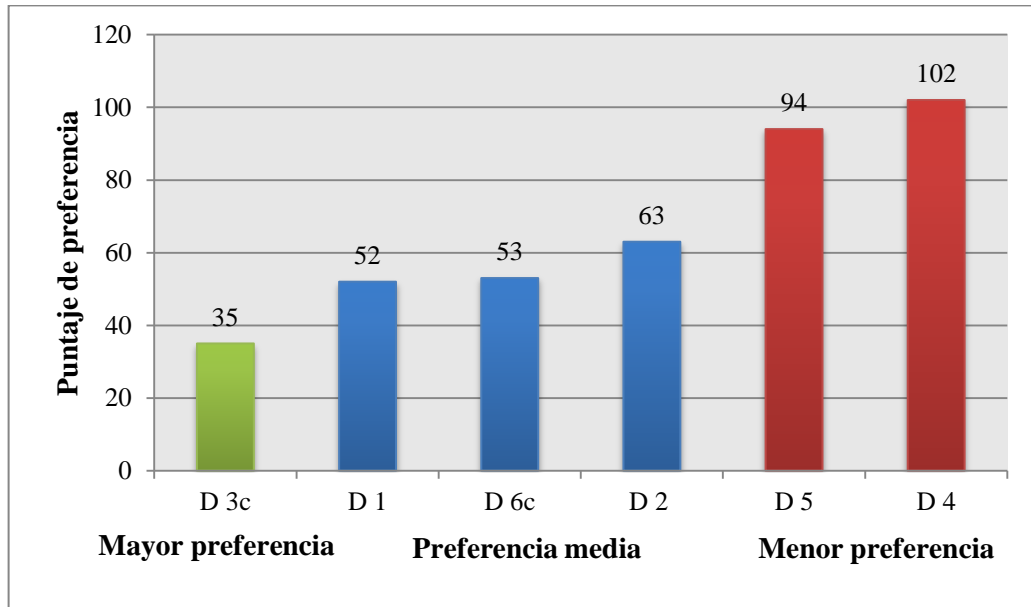


Gráfico 3: Puntaje de preferencia por muestra sabor damasco (grupo II).

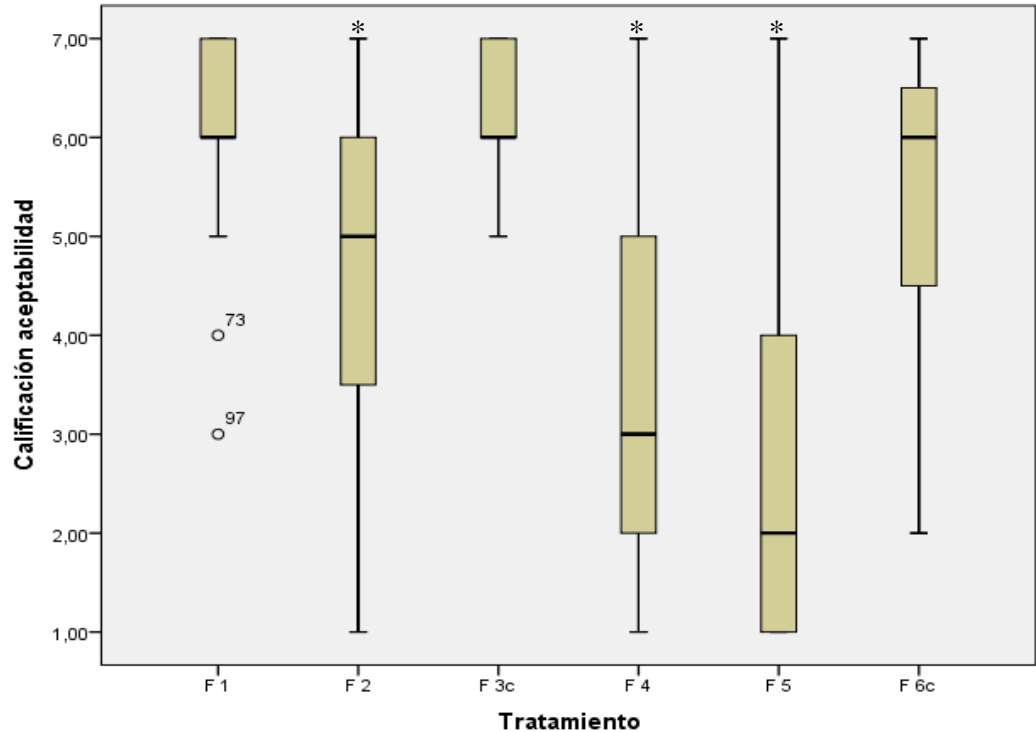


5.2.2 Prueba de Aceptabilidad Sensorial

Se realizó esta prueba para determinar la aceptabilidad de las preparaciones propuestas, tanto para el sabor frutilla como damasco (grupo I y II). Se evaluaron las muestras mediante escala hedónica, con puntuación de 1 a 7. En los gráficos 4 y 5 se muestra la distribución de los datos obtenidos por muestra y sabor.

Se utilizaron las medianas por cada muestra, para ver las diferencias estadísticas, dado que al someter los datos a prueba de normalidad con el método Shapiro Wilk, se concluyó que los datos no seguían una distribución normal ($p < 0,05$), por lo tanto, se utilizó la Prueba U de Mann-Whitney como versión no paramétrica.

Gráfico 4: Distribución de los resultados de la prueba de aceptabilidad para el sabor frutilla.

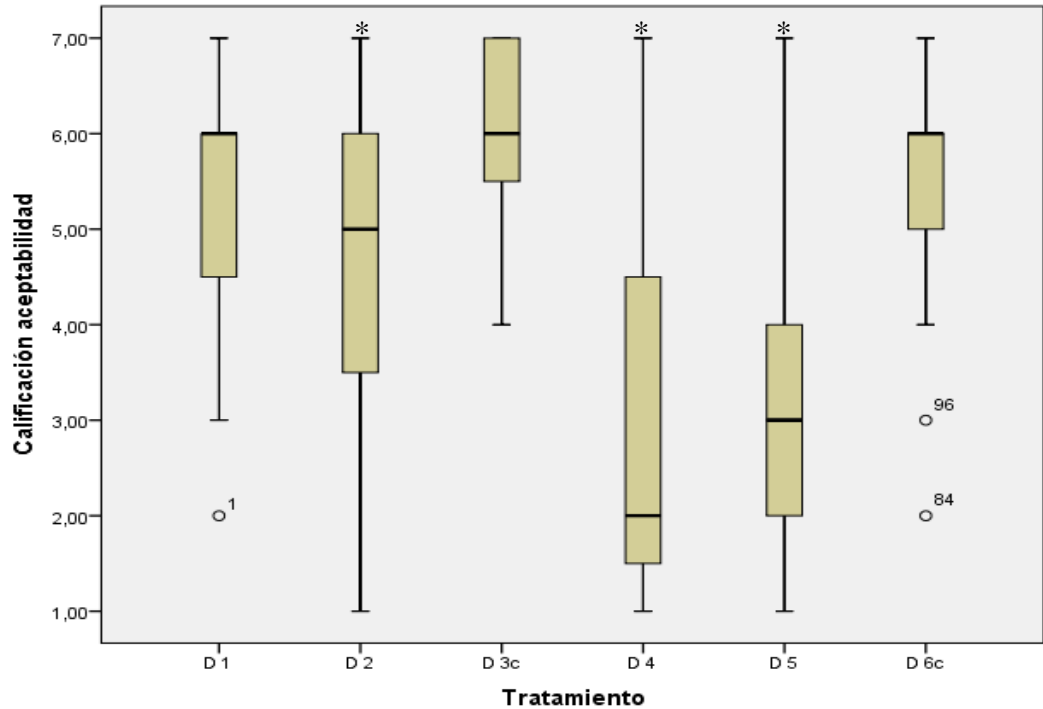


(*)Diferencias significativas según prueba U de Mann Whitney ($p < 0,05$)

De los datos obtenidos luego de realizar el análisis estadístico se señala que existen diferencias significativas ($p < 0,05$), entre las muestras F4 y F5 (descremadas con quitosano) y el resto de las muestras, con medianas inferiores a los 3 puntos equivalentes a “*me disgusta levemente*”. Además se observaron diferencias significativas entre la muestra F2 y su control (F3c).

Por otra parte, las medianas más altas las obtuvieron las muestras control (F3c y F6c) y las muestras de yogur entero con quitosano (F1 y F2) con valores sobre los 5 puntos de aceptabilidad, equivalente a “*me gusta ligeramente*”.

Gráfico 5: Distribución de los resultados de la prueba de aceptabilidad para el sabor damasco.



(*)Diferencias significativas según prueba U de Mann Whitney ($p < 0,05$)

Por otra parte se observa que los resultados obtenidos para el sabor damasco (grupo II) son muy similares que el sabor frutilla, con diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$). Los valores de la mediana más altos corresponden a las muestras control (D3c y D6c) y la muestra yogur entero 0,25% (D1), sobre los 6 puntos equivalente a “me gusta moderadamente”. Las muestras con menor aceptabilidad fueron D4 y D5, correspondiente a los yogures descremados con quitosano al 0,25% y 0,5% respectivamente.

Se seleccionó la muestra F2 (yogur entero frutilla 0,5%) para realizar las pruebas de tolerancia y finalmente saciedad. Si bien, se observaron diferencias significativas entre la muestra F2 y su control (F3c), se consideró que la mediana obtenida para esta muestra

fue de 5 puntos (“me gusta levemente”), puntaje que demuestra aceptación positiva por parte los panelistas. También, en la prueba de preferencia fue catalogada con una “preferencia media”, no siendo rechazada por los jueces y por último, se tuvo en cuenta que a una concentración de 0,25% de quitosano, podrían no obtenerse los resultados esperados por la baja cantidad de fibra adicionada.

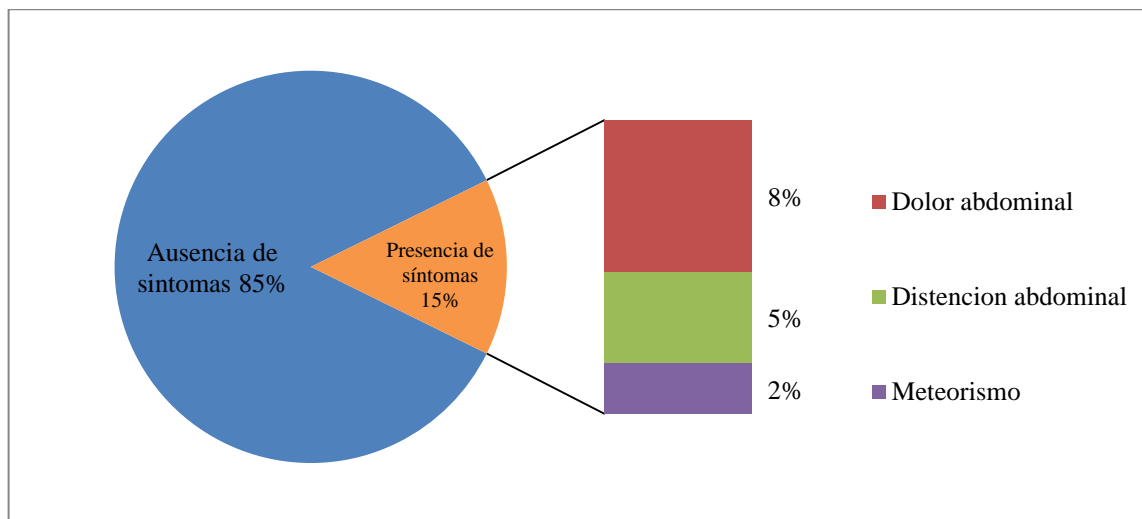
5.3 Prueba de Tolerancia

5.3.1 Prueba de Tolerancia Aguda.

En esta prueba participaron 20 sujetos, los cuales asistieron a dos sesiones distintas a fin de probar el yogur C (control) y yogur Q (quitosano).

En ambos casos, no se presentaron síntomas antes de consumir las muestras. Luego de dos horas post ingesta, el grupo control no manifestó efectos adversos. En cuanto al grupo experimental, 3 de los 20 participantes, equivalente al 15% de la población, presentaron los siguientes síntomas con intensidad de leve a moderada: Dolor abdominal, Distención abdominal y meteorismo; tal como se muestra en el gráfico n° 6.

Gráfico 6: Resultados prueba tolerancia aguda - grupo experimental.

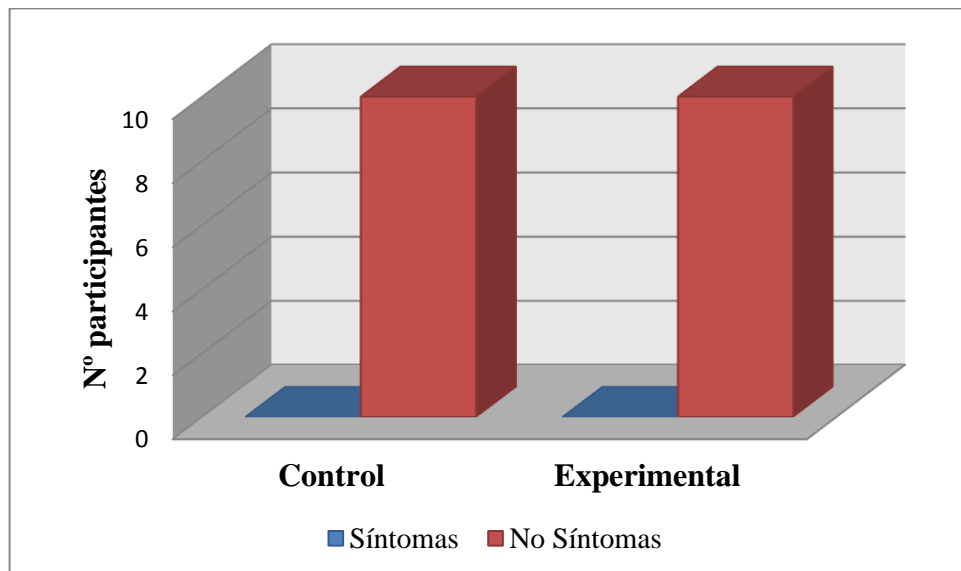


Según el análisis estadístico a través de la *chi-cuadrado* (prueba de independencia), se concluye que no existe relación entre el consumo de yogur con quitosano y la presencia de síntomas ($p > 0,05$).

5.3.2 Prueba de Tolerancia a Largo Plazo

En la evaluación de efectos adversos asociados al consumo diario de yogur Q y yogur C durante un período de 10 días, no se observaron síntomas por parte de ningún voluntario (n=10), tal como se muestra en el gráfico 7.

Gráfico 7: Resultados Prueba Tolerancia a Largo Plazo en grupo experimental y control.



5.4 Análisis Proximal

En la tabla 9, se presentan los resultados obtenidos del análisis químico proximal del yogur con quitosano entero frutilla al 0,5% (yogur Q).

Tabla 9: Composición química de la formulación experimental y control en porciones de 100 g (promedio \pm desviación estándar).

Muestras	Cenizas	EE	Humedad	Proteína	Fibra**	E.N.N
Yogur Q	1,27 \pm 0,35	2,32 \pm 0,5	76,83 \pm 0,4	4,1*	0,5	14,98
Yogur C	0,7	2,1	79,5	4,1	0	14,3

*Valor del etiquetado nutricional del yogur comercial

**Se considera como fibra dietética, el total de quitosano incorporado al yogur.

En base a estos resultados, se determinó la información nutricional para ambas muestras por 125 g de yogur, refleja en la tabla 10.

Tabla 10: Información Nutricional yogur experimental y control.

Porción de 125g	Yogur Q	Yogur C
Energía (Kcal)	122	116
Proteínas (g)	5,1	5,1
Grasas (g)	2,9	2,6
H. d C. Disp. (g)	18,7	17,9
Fibra dietética total (g)	0,6	0

Cabe señalar que no se pudo realizar el análisis de proteína y fibra dietética total. Se consideró para el cálculo de fibra total el 100% del aporte de quitosano incorporado en el yogur. Mientras que para proteína el valor referencial del etiquetado nutricional del yogur control (comercial).

5.5. Prueba de Saciedad

Se seleccionaron 30 sujetos, los cuales se dividieron en dos grupos: control (n=15) y experimental (n=15), ambos consumieron una porción de 150 mL de yogur (yogur C y Q).

Dado que los participantes no pudieron asistir a dos sesiones, no fue posible realizar un estudio cruzado, donde los mismos individuos testearan el yogur Q versus C, sino de forma paralela.

El horario de llegada de los participantes fue entre las 11:30 y 12:00 horas. En promedio se demoraron 5 minutos en consumir la precarga experimental (4 minutos hombres y 5 mujeres) y 4 en consumir la precarga control (3 minutos hombres y 4 mujeres).

En la tabla 11 se entrega una descripción de los participantes por edad, peso, talla e IMC, según sexo.

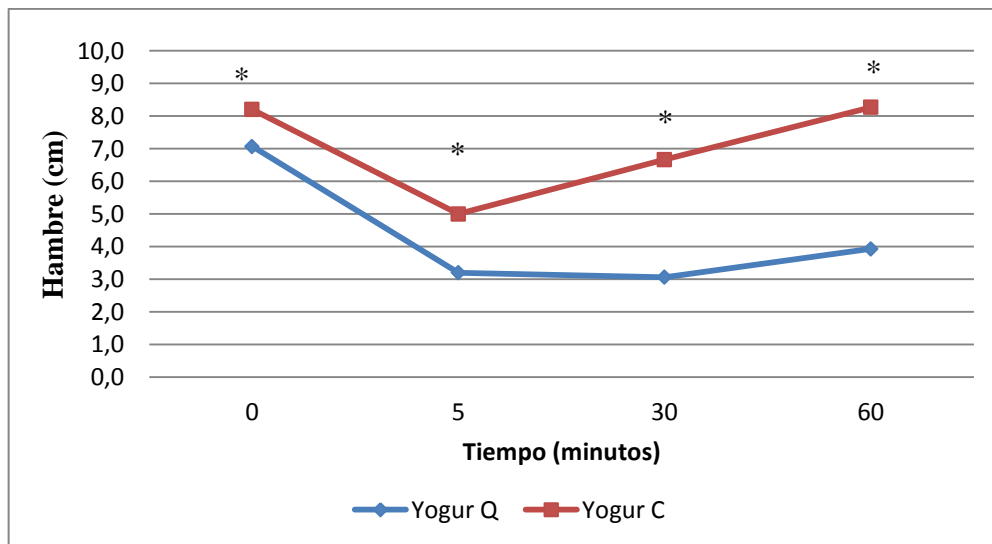
Tabla 11: Características de los sujetos (n=30) participantes en el estudio (promedio \pm DS).

	Sujetos (n=30)	Hombres (n=9)	Mujeres (n=21)
Edad (años)	23 \pm 2,8	23 \pm 2,8	23 \pm 2,9
Peso (kg)	61,7 \pm 8,8	69,5 \pm 6,4	58,3 \pm 7,5
Talla (m)	1,64 \pm 0,1	1,71 \pm 0,1	1,62 \pm 0,1
IMC (kg/m²)	22,5 \pm 1,8	23,7 \pm 0,9	22,1 \pm 1,9

6.5.1. Prueba Saciedad Subjetiva

Al someter los valores de las escalas visuales análogas para las variables hambre, saciedad, plenitud, deseo de ingerir un alimento general, graso, salado, dulce o líquido, a la prueba de normalidad por el método Shapiro Wilk se obtuvo una distribución normal ($p > 0,05$), por lo que para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t-student* de muestras no pareadas en cada uno de los tiempos (0, 5, 30 y 60 minutos).

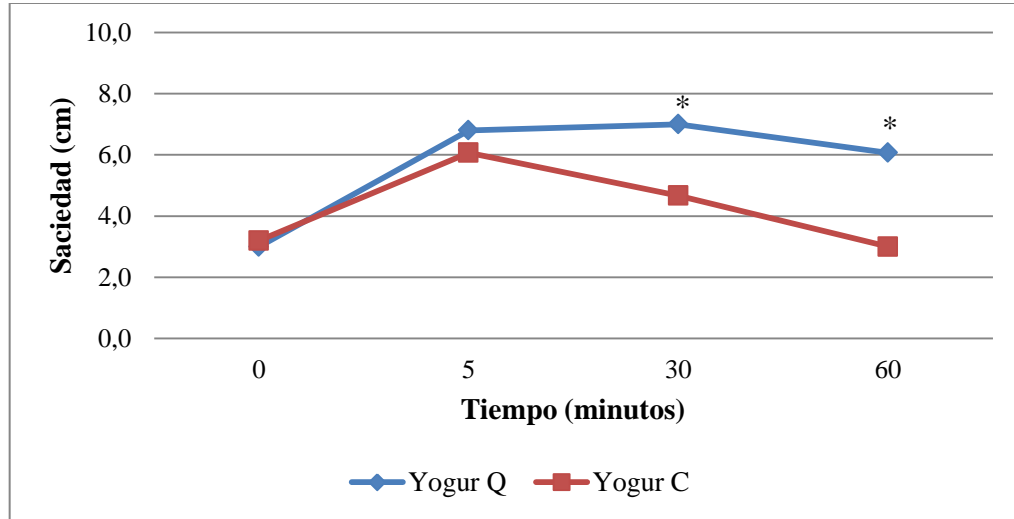
Gráfico 8: Puntuación Escala Visual Análoga para sensación de hambre de la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



(*) Diferencias significativas según prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$).

El gráfico 8 muestra que existen diferencias significativas para la sensación de hambre entre la muestra Q y C, en cada uno de los tiempos. Aumentando considerablemente esta diferencia hasta los 60 minutos post ingesta ($p < 0,05$).

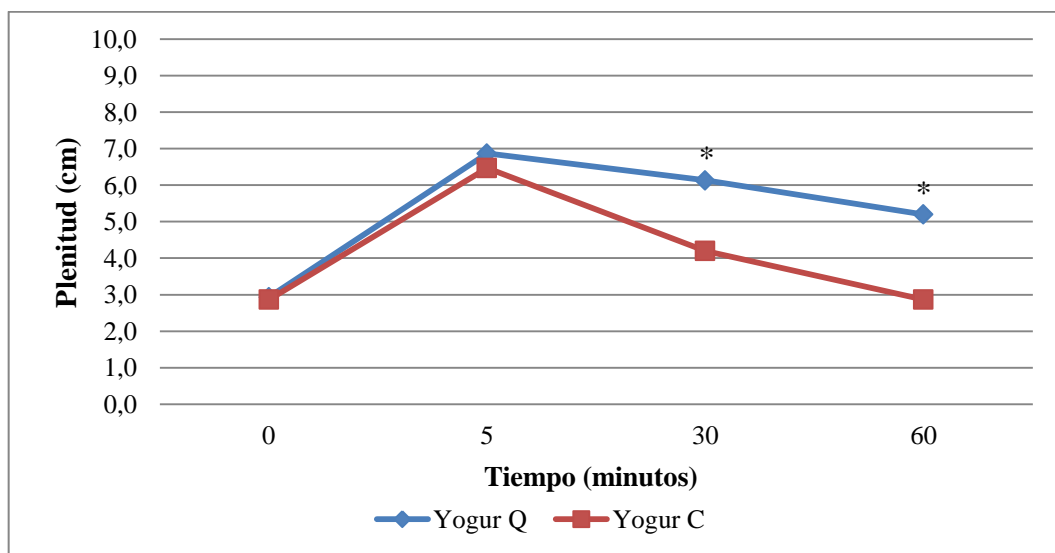
Gráfico 9: Puntuación Escala Visual Análoga para sensación de saciedad de la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



(*) Diferencias significativas según prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$)

En el gráfico 9 se visualiza que existen diferencias significativas para la sensación de saciedad a los 30 y 60 minutos después de consumir las pre-cargas.

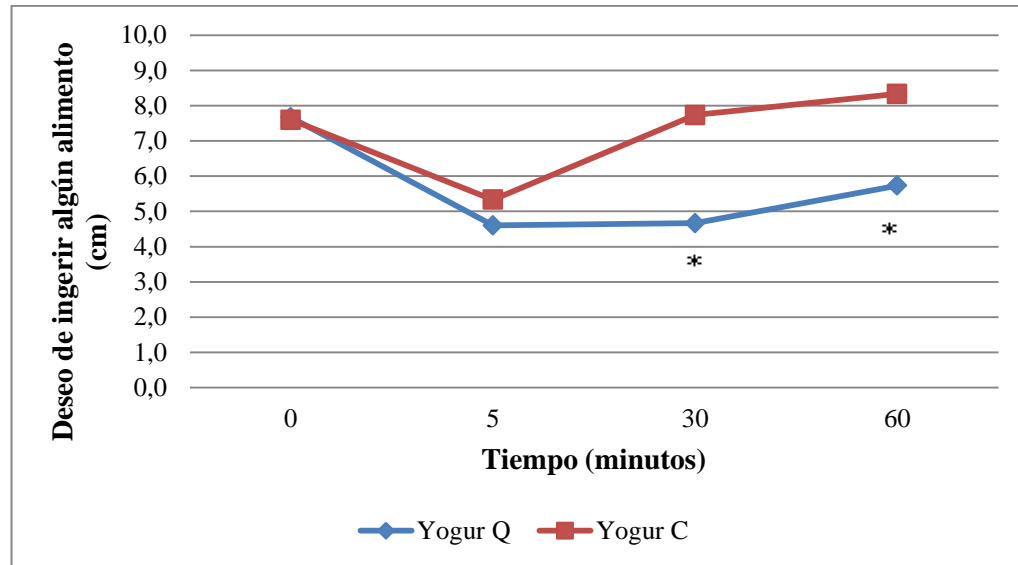
Gráfico 10: Puntuación Escala Visual Análoga para sensación de plenitud de la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



(*) Diferencias significativas según prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$)

El gráfico anterior presenta diferencias significativas para la sensación de plenitud en los 30 y 60 minutos post ingesta de las pre-cargas.

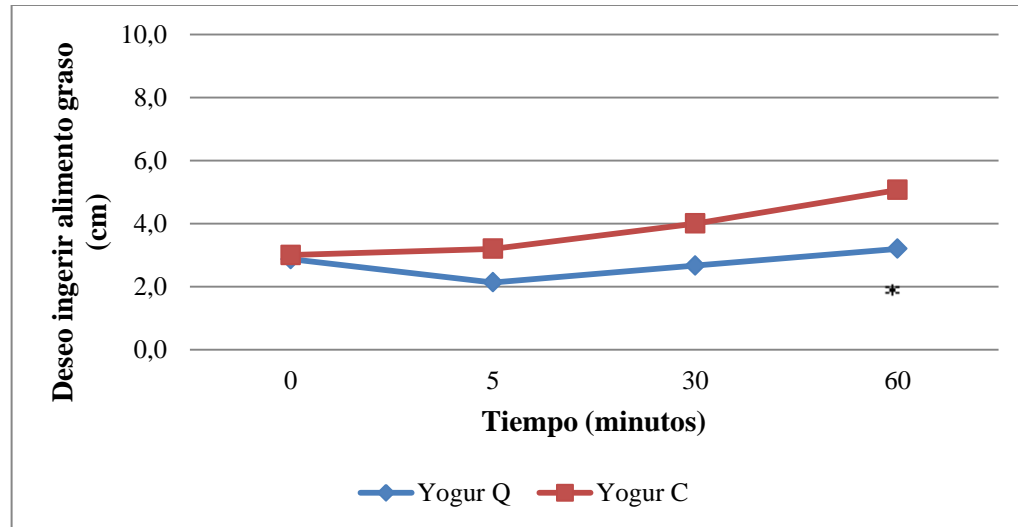
Gráfico 11: Puntuación Escala Visual Análoga para deseo de ingerir algún alimento entre la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



(*) Diferencias significativas según prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$).

El gráfico 11 muestra que existen diferencias significativas para el deseo de ingerir algún alimento, a los 30 y 60 minutos después de consumir las pre-cargas.

Gráfico 11a: Puntuación Escala Visual Análoga para deseo de ingerir algún alimento graso entre la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.

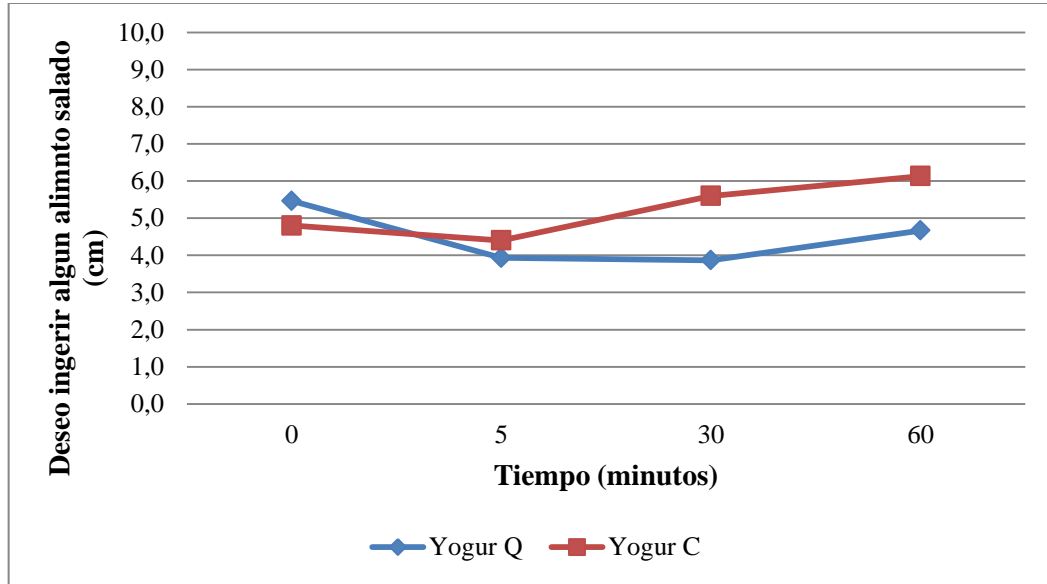


(*) Diferencias significativas según prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$).

En el gráfico 11a se visualiza que existen diferencias significativas para la sensación de ingerir algún alimento graso sólo a los 60 minutos después de consumir las pre-cargas.

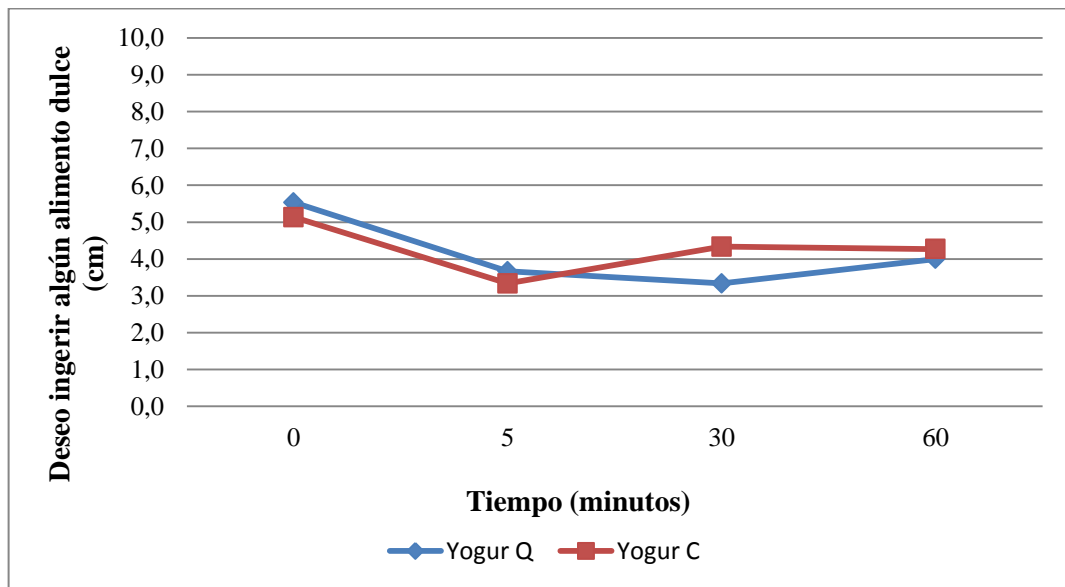
Para el deseo de ingerir algún alimento salado, dulce o líquido, no se observaron diferencias significativas entre el consumo de la precarga Q versus C, tal como se muestra en los gráficos 11b, 11c, 11d.

Gráfico 11b: Puntuación Escala Visual Análoga para deseo de ingerir algún alimento salado entre la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



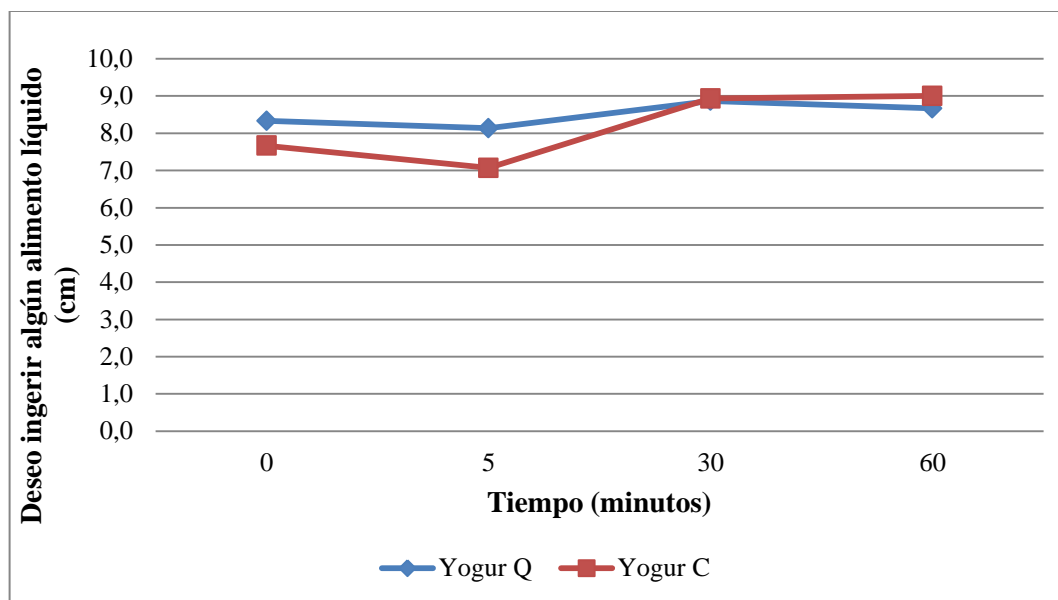
Prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$)

Gráfico 11c: Puntuación Escala Visual Análoga para deseo de ingerir algún alimento dulce entre la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



Prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$)

Gráfico 11d: Puntuación Escala Visual Análoga para deseo de ingerir algún alimento líquido entre la muestra de yogur comercial con quitosano (0,5%) versus control.



Prueba *t-student* para muestras no pareadas ($p < 0,05$)

6.5.2. Prueba Saciedad Objetiva

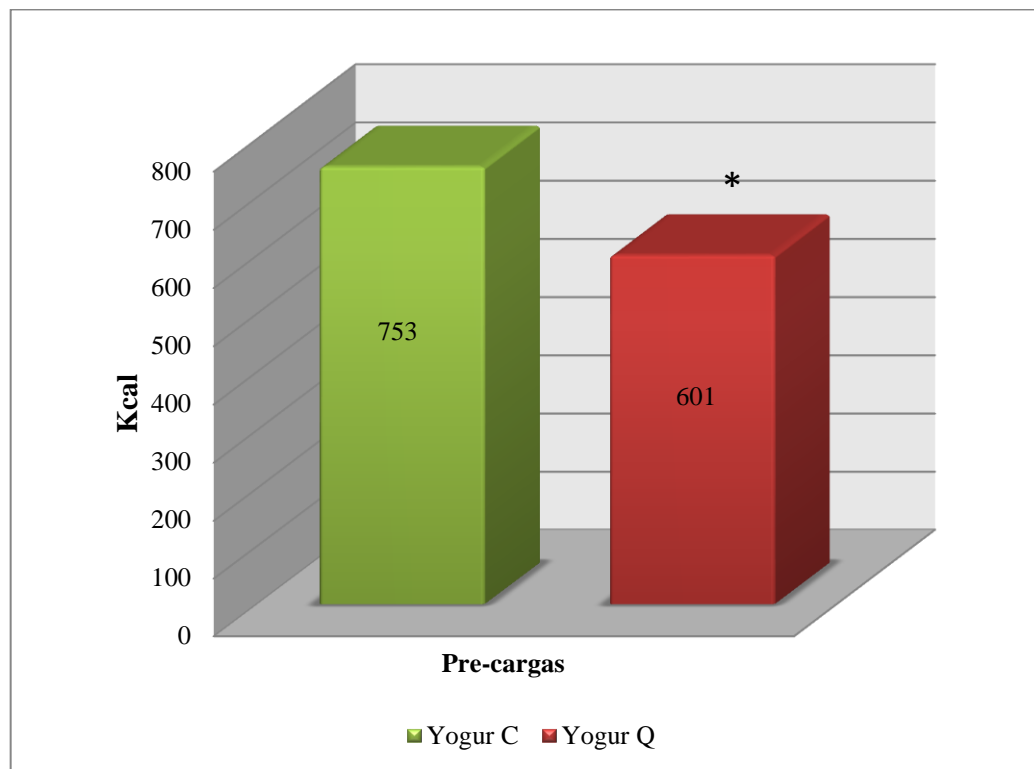
Se determinó la ingesta energética mediante el promedio de las calorías consumidas por los participantes, también se obtuvo la ingesta alimentaria medida en gramos, los cuales fueron analizados a través de estadística descriptiva tal como se muestra en la tabla n 12.

Tabla 12: Ingesta energética (kcal) y alimentaria (gramos) por tipo de precarga (Promedio \pm DS, Rango)

	Ingesta Calórica (kcal)	Ingesta Alimentaria (gramos)
Precarga experimental	601 \pm 108 (372-737)	466,9 \pm 95,7 (270-595)
Precarga Control	753 \pm 62,5 (676-877)	583,9 \pm 44,4 (531-701)

Se comprobó que los datos siguen una distribución normal según la prueba de Shapiro Wilk ($p > 0,05$), por lo que se utilizó la prueba *t-student* de muestras no pareadas para evaluar diferencias significativas, tal como se muestra en los siguientes gráficos.

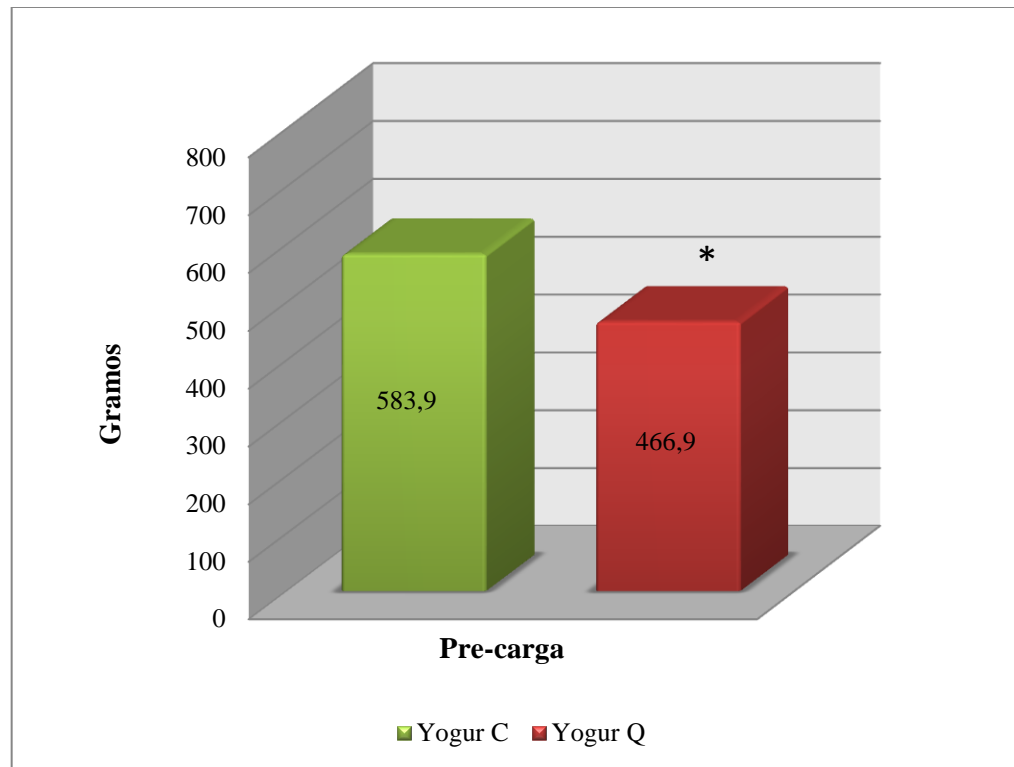
Gráfico 12: Promedio de las ingesta energética del almuerzo fijo expresada en calorías.



(*)Diferencias significativas según prueba *t-student* de muestras no pareadas ($p < 0,05$).

Se observó una menor ingesta energética (152 kcal) después del consumo del yogur Q, con diferencias significativas ($p < 0,05$), con respecto al yogur control.

Gráfico 13: Promedio de las ingesta alimentaria del almuerzo fijo expresada en gramos.



(*)Diferencias significativas según prueba *t-student* de muestras no pareadas ($p < 0,05$).

En el gráfico anterior se observa una menor ingesta alimentaria (117 gramos) en el almuerzo fijo con repetición después de consumir el yogur Q versus el C, con diferencias significativas ($p < 0,05$).

6. DISCUSION

El presente estudio se generó con el objetivo de desarrollar un producto alimenticio que presentara características beneficiosas para la salud y calidad de vida de las personas, por ello, se formuló un producto de consumo masivo, que consistió en un yogur batido entero adicionado con un tipo de fibra soluble no tradicional.

6.1. Ensayos preliminares

Para la selección del tipo de alimento se consideró el aumento en el consumo de productos lácteos, especialmente del yogur en la población chilena. Estudios establecen la evolución positiva que muestra la producción nacional de yogur, alcanzando un consumo per cápita cercano a los 14 Lt en el 2012, similar a lo observado en el año 2013 (68), situándose como el país con mayor consumo de la región y EE.UU. Son nueve las empresas que elaboraron yogur industrialmente al año 2013, el 86% de la actividad se concentró en cuatro: Soprole, Colún, Nestlé y Danone (67).

El presente estudio analizó los productos ofrecidos en función tipo, sabor y precio, optando por la marca Colún por su disponibilidad, estabilidad, acceso y precio en los mercados locales.

Según proyecciones realizada por la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), esta tendencia sobre el consumo de yogur seguiría en aumento con los años, especialmente para el consumo de yogur batido, que es el que tiene mayor consumo en el país. Por este motivo se seleccionó esta línea, en ambas versiones (descremado y entero), mostrando la marca Colún una amplia variedad de sabores y características nutricionales afines, con un aporte mayor de proteína y menor aporte en hidratos de carbonos.

Se ha aceptado que las proteínas tienen un potente efecto de saciedad que propicia la inhibición del hambre (69), este fenómeno se observa cuando las proteínas son del 11 al 14% del valor energético total de la dieta (70), por lo que la cantidad aportada por el yogur no es significativa alta (1% app.) para interferir con el objetivo del estudio. Sin embargo, se puede considerar como un factor positivo para una colación.

En cuanto a la metodología de incorporación de quitosano, debido a su capacidad de ser soluble en soluciones ácidas, se sometió a diferentes tratamientos en los siguientes medios: ácido ascórbico y ácido cítrico; aditivos ampliamente utilizados por la industria alimentaria. En el organismo humano ambos al ser ingeridos se incorporan al metabolismo normal, degradándose totalmente, perfectamente inocuos a cualquier dosis concebiblemente presente en un alimento.

Además, se probó en agua destilada con el fin de corroborar la insolubilidad del quitosano en un medio no ácido, y por último se incorporó directamente al yogur.

El mejor resultado se obtuvo al incorporar directamente al yogur, debido a que al ser un producto lácteo coagulado, obtenido por fermentación láctica mediante la acción de dos bacterias termófilas (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) presenta un acidez titulable expresada en porcentaje de ácido láctico de 0,6 y un pH variable de aproximadamente 4.0 a 4.5 (71), por lo que es adecuado para actuar como medio ácido y reaccionar con el quitosano. Al observar que no hubo modificaciones en las características organolépticas del producto al incorporarlo, se seleccionó esta metodología.

Para determinar la cantidad de quitosano a incorporar en el yogur, se consideraron los niveles de suplementación en humanos de acuerdo a estudios internacionales y la cantidad de fibra soluble incorporada en estos tipos de productos en el mercado local.

Fang-Hsuean L. *et al.*, 2007, administraron 936 mg/día como suplementación vía oral, durante un periodo de 8 semanas, donde participaron 60 pacientes hiperlipidémicos (72). Otros estudios realizados por Gades MD & Stern JS utilizaron concentraciones de quitosano de 2,5 a 5,25 g/día como suplementación oral a hombres y mujeres para evaluar la absorción de grasa (73) (74). Así mismo, Guerciolini y sus colegas (75) suministraron 2,67 g de quitosano por día a siete hombres y cinco mujeres (n=12). No se han observado efectos adversos hasta niveles de 4,5 g de quitosano vía oral (76).

La adición de distintos tipos de fibra dietética en yogur varía entre 1,2 a 4 %, según los estudios observados (77) (78). Mientras que en el mercado nacional se observan cantidades similares; Next[®] con Biobalance de Soprole contiene 4,13 g de fibra total, proveniente de inulina (2,36 g) y polidextrosa (1,77g de).

Seo M. H. *et al* 2009 (79), evaluaron las propiedades físico-químicas, microbianas y sensoriales de un yoghurt suplementado con quitosano a concentraciones de 0,1-0,3-0,5-0,7%. Las concentraciones que evaluamos (0,25- 0,5- 1- 3- 4%) son similares a las que se han reportado anteriormente.

Se determinó que concentraciones sobre el 1% afectaban las características organolépticas del yogur, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio anteriormente citado (79), el cual sugiere que concentraciones de 0,1 a 0,5% de quitosano podrían ser usadas para la producción de yogur, sin deteriorar las propiedades sensoriales. Las muestras evaluadas en dicho estudio, expusieron diferencias significativas en color, gusto y sabor a una concentración de 0,7% p/v. En cuanto al color, las puntuaciones fueron menores (color muy leve), probablemente debido al color original del quitosano (blanco-amarillo) y se presentó un mayor gusto “marino” y un sabor astringente, estas últimas

observaciones fueron similares a las realizadas por los panelistas en nuestros ensayos pilotos de aceptabilidad.

6.2 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las formulaciones mostró una mayor aceptabilidad y preferencia por las muestras de yogur entero que las descremadas, para ambos sabores, con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras. Lo cual podría deberse al contenido graso del producto. La explicación podría atribuirse a que las grasas mejoran la palatabilidad de los alimentos y enmascaran otros sabores. Las propiedades hedónicas (olor, sabor y textura) tienen una función importante en la selección e ingestión de los alimentos, se piensa que la palatabilidad ejerce un potente efecto en el proceso de saciamiento y que, tal vez genere alguna influencia en la regulación de la saciedad (80).

Además, debido al carácter catiónico del quitosano en solución, provoca que moléculas con carga negativa, tales como los grupos carboxilo aniónicos de las grasas, se adhieren fuertemente al grupo amino terciario positivo ($-NH_3^+$) del quitosano, funcionando como un imán, dado que fabrica una especie de gel con carga positiva que atrayendo a las moléculas de grasa. Esta capacidad de interacción con las grasas podría atenuar el sabor propio del quitosano en las muestras de yogur entero y no así en los yogures descremados.

6.3 Prueba de tolerancia: Evaluación de efectos adversos

En la prueba de tolerancia aguda, no hubo cambios significativos en ninguno de los parámetros clínicos testeados en comparación con el grupo control, observándose que un 15% de los voluntarios presentó dolor abdominal, distensión abdominal y meteorismo. En estudios a corto plazo de hasta 12 semanas en humanos, no se observaron síntomas

clínicamente significativos al ingerir suplementos de quitosano en comparación con el placebo, asimismo, se han reportado una baja incidencia de náuseas y estreñimiento leve y transitoria en 2.6 a 5.4 % de los sujetos voluntarios. (81)

En cuanto a la evaluación de efectos adversos a largo plazo, los resultados indicaron que la administración de dosis repetidas del yoghurt con quitosano al 0,5% no generó síntomas adversos en los voluntarios. La exposición humana a niveles de quitosano se ha producido a partir de la ingesta de suplementos de la dieta oral y sin hallazgos adversos observados. Niveles de 4,5 g de quitosano al día se han tomado por vía oral en voluntarios humanos sin efectos adversos reportados (82). Incluso altos niveles orales de hasta 6,75 g fueron reportados como seguro (83). Aunque el quitosano ha sido clínicamente bien tolerado, no se recomienda a personas alérgicas a los crustáceos por precaución (84).

En la actualidad sigue en discusión el uso de quitosano en la industria alimentaria. Es necesario el desarrollo de más investigaciones de su uso *in vivo*, y por otro, existen limitaciones legales que hacen que este polímero no se use todavía en todo el ámbito internacional. Aunque ha sido aprobado en algunos países (Italia, Francia, Noruega, Estados Unidos, Argentina, Korea y Japón) como aditivo alimentario (85), aún no ha sido aprobado ni por la FDA (Food and Drug Administration), ni por la EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria). Sin embargo, el uso del quitosano como suplemento dietético se encuentra regulado por la Dietary Supplement Health and Education Act (DHSEA) y de acuerdo con esta disposición legal no se requieren pruebas de inocuidad y seguridad para suplementos dietéticos desde 1994.

6.4 Análisis proximal

No se presentaron diferencias significativas entre la muestra con quitosano y su control, debido principalmente a que se utilizó el yogur comercial (control) como la fórmula base para añadir el quitosano.

6.5 Prueba de saciedad

Investigaciones han revelado, que la adición de fibra dietética en bebidas y alimentos se le atribuye un rol positivo en la regulación de la ingesta energética, en donde un alto consumo de ésta actúa produciendo una mayor sensación de saciedad (86). Para analizar el efecto causado por el quitosano, como tipo de fibra soluble no tradicional, en la inclusión de un alimento lácteo (yogur) se utilizaron el método: subjetivo, evaluando la percepción que los sujetos tuvieron sobre las variables (hambre, saciedad, plenitud y apetito) y objetivo mediante la cuantificación de la ingesta energética y alimentaria en un almuerzo fijo con repetición.

A través del método subjetivo la sensación de hambre, resultó significativamente menor para el yogur experimental con quitosano (0,5%) en relación al control, si bien fue en cada uno de los tiempos (incluido tiempo 0, antes de la ingesta), la diferencia aumento considerablemente después del consumo de las pre-cargas en los tiempos 30 y 60 minutos post-ingesta.

La sensación de saciedad alcanzada por los sujetos fue una variable relevante de analizar, debido a las diferencias significativas observadas por el consumo del yogur añadido con quitosano versus el control, donde el grupo experimental tuvo un mayor efecto

de saciedad después de haber consumido la pre-carga, específicamente a los 30 y 60 minutos, lo que contrasta totalmente con el grupo control. El proceso de saciedad no ocurre de forma instantánea, sino que se desarrolla en un determinado tiempo, alrededor de 30 minutos después de haber ingerido la comida (87).

Si bien, el quitosano se comporta como una fibra soluble en el estómago, formando hidrogeles capaces de absorber grandes cantidades de agua, aumentando la distensión del estómago y desencadenando señales aferentes vagales de plenitud y saciedad (88), el porcentaje de incorporación de quitosano solo equivale aproximadamente al 8% de la recomendación de ingesta de fibra soluble, por lo tanto, el mecanismo de acción del quitosano no estaría dado por la cantidad añadida, sino por la expresión de péptidos y hormonas anorexígenas. Aun existen pocos estudios al respecto en humanos, se ha evaluado el efecto del quitosano en la sensación de saciedad en animales. Qinna N. *et al*, 2013, evaluaron la ingestión de una preparación con 1% de quitosano en ratas, resultando en la reducción de peso corporal e ingesta de alimentos y agua ($p < 0,05$) (89).

Por otro lado, investigaciones más reciente ha sugerido un modo más complejo de la acción de quitosano sobre la regulación de la ingesta y su efecto en la sensación de saciedad, lo que estaría dado por el aumento de las concentraciones de leptina. Esto se registró en ratones suplementados con quitosano (90,91) y cerdos (92), a estos últimos se le suministraron 1,2 g de quitosano oral, viendo una disminución de la ingesta dietética, que se asoció con un aumento de las concentraciones de leptina en suero y una disminución en las concentraciones de PCR. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto nuevos

mecanismos endocrinos nutricionales por el cual quitosano presenta propiedades anti-obesidad y saciedad *in vivo*.

Los resultados obtenidos para saciedad coinciden con los observados para la sensación de plenitud y apetito, este último evaluado a través del deseo de ingerir un alimento, siendo significativamente diferentes entre los grupos después de consumir las pre-cargas. El grupo experimental presentó una mayor sensación de plenitud y un menor deseo de consumir otro tipo de alimento después de haber ingerido el yogur con quitosano, en los tiempos 30 y 60 minutos post-ingesta y antes de consumir el almuerzo fijo.

Por otra parte, en la prueba objetiva, la ingesta energética y alimentaria en el grupo experimental fue menor que el control, lo que corrobora los resultados obtenidos en la prueba subjetiva, siendo significativamente mayor la sensación de saciedad para el grupo que consumió el yogur con quitosano.

Cabe destacar, dos puntos relevantes en cuanto a la prueba de saciedad. Primeramente a pesar de que el porcentaje de incorporación de quitosano solo equivale a un 8% de la recomendación de ingesta para fibra soluble, se observaron efectos benéficos significativos, lo que hace que sea un compuesto con gran potencial para la industria de los alimentos. Por otra parte, debido a que los panelistas no fueron sus propios controles en la prueba saciedad, existe la posibilidad que los resultados estén sobreestimados, siendo una limitante del estudio. Aun así, la concordancia obtenida entre la percepción subjetiva y objetiva en nuestro estudio, es un dato relevante a considerar puesto que no suele darse tal correlación en estudios de saciedad

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han permitido el desarrollo de un producto alimenticio con adición de fibra de quitosano, con altas expectativas de ser utilizado en la industria alimentaria por su positiva evaluación sensorial, sin presentar efectos adversos, y potencialmente capaz de aumentar la sensación de saciedad, contribuyendo a una menor ingesta energética.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitieron cumplir con los objetivos propuesto, de tal modo que:

- Se logró la formulación de 12 preparaciones a partir de la incorporación de quitosano a diferentes concentraciones en muestras de yogur comercial (batido entero y descremado).
- A través de las pruebas de preferencia y aceptabilidad sensorial se determinó que la adición de quitosano a las formulaciones base interfiere en la aceptabilidad del producto resultante, de manera tal que a menor concentración de quitosano y mayor contenido graso del yogur se obtiene una mejor aceptabilidad. Sin embargo, se seleccionó una única muestra que a mayor incorporación de quitosano no afectó significativamente sus características organolépticas.
- No se presentaron efectos adversos significativos con el consumo de yogur con quitosano (0,5%) en las pruebas de tolerancia aguda y largo plazo en sujetos adultos jóvenes sanos.
- Se determinaron las características nutricionales de la formulación final, a través de análisis proximal y teórico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el yogur control.
- Se observó el efecto de saciedad objetiva y subjetiva sobre la adición de quitosano en yogur entero versus control. Se presentaron diferencias significativas en los principales parámetros evaluados tanto para la prueba subjetiva (hambre, saciedad,

plenitud y apetito) en los tiempos 30 y 60 minutos; como para la prueba objetiva, con una menor ingesta calórica y alimentaria.

En síntesis y según los datos obtenidos en este estudio y bajo estas condiciones, se acepta la hipótesis, la cual postula que la incorporación de quitosano como fuente de fibra no tradicional en un yogur, otorga mayor saciedad en relación a un yogur sin adición de fibra.

8. ANEXOS

Anexo N°1

Certificado de análisis: Quitosano Comercial en polvo

Nombre del producto	Chitosan (high density)	
Cantidad	100 g	
	Resultados	Especificaciones
Apariencia	Polvo blanco pálido	Polvo blanco pálido
Desacetilación (%)	91,6	>85
Densidad aparente (g/mL)	0,61	>0,6
Viscosidad (mpa.s 20°C)	57	<200
Contenido de humedad (%)	8,4	<10
Contenido de ceniza (%)	0,7	<1,0
Pb (mg/kg)	0,1	<2,0
As (mg/kg)	0,07	<0,5
Recuento total (cfu/g)	120	<1000
Hongo y levadura	10	<100
E. coli	Negativo	Negativo
Tamaño partícula	100	100 mesh

Anexo N°2

Ficha personal de ingreso



Antecedentes Personales

Nombre	Edad
Apellido	Sexo
Correo electrónico	Teléfono Móvil/ Fijo

Antecedentes médicos

	Si	No	
Intolerancia a la lactosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Alergia a la proteína de la leche de vaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Embarazada o Nodriz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Otras alergias alimentarias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Especifique: _____

Patologías

Medicamentos

Consentimiento informado

Declaro estar de acuerdo en participar en la prueba de aceptabilidad sensorial de un producto lácteo (yoghurt) adicionado con Qitosano, a realizarse entre los días martes 01 y viernes 04 de Octubre del 2013, desde las 15:00 a 17:30 hrs. en el Centro de Nutrición de la Universidad de Valparaíso (CENUVAL). Se me ha explicado el estudio y aclarado mis dudas, por lo que voluntariamente doy mi consentimiento.

Fecha

Firma

Anexo N°3

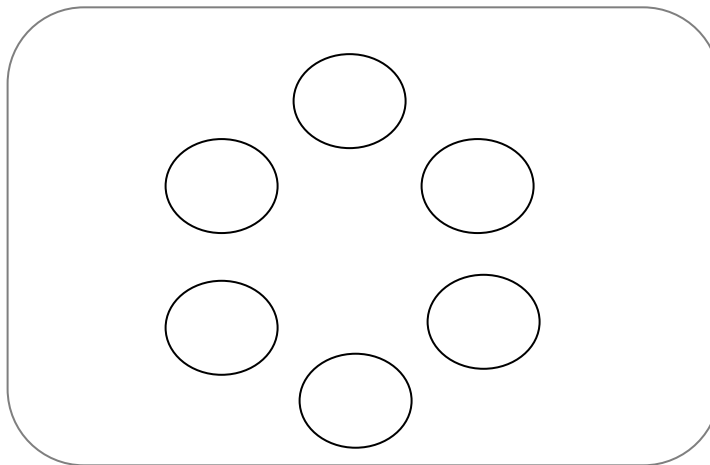


Test de preferencia

Método de Ranking o test de ordenamiento

Nombre:.....Fecha:.....

Por favor, ordene las muestras de acuerdo a su preferencia del 1 al 6 de menor a mayor valor, siendo el número 1 de mayor preferencia y el número 6 de menor preferencia por usted.



Orden: 1 _____ 2 _____ 3 _____ 4 _____ 5 _____ 6 _____

Comentarios: _____

Gracias por su participacion

Anexo N°4

Prueba de aceptabilidad sensorial
Escala hedónica



Nombre:..... Fecha:.....

Deguste las muestras de yoghurt presentadas, e indique con una X en el casillero correspondiente su grado de aceptabilidad de 1 a 7 según escala verbal-numérica. Se permite degustar la muestra las veces necesarias para que establezca su evaluación sensorial.

	1	2	3	4	5	6	7
N° muestra	Me disgusta mucho	Me disgusta moderadamente	Me disgusta levemente	No me gusta, ni me disgusta	Me gusta ligeramente	Me gusta moderadamente	Me gusta mucho

Gracias por su participacion

Anexo N° 5

Ficha personal



Antecedentes Personales

Nombre	Edad
Apellido	Sexo
Correo electrónico	Teléfono Móvil/ Fijo

Antecedentes médicos

	Si	No	
Intolerancia a la lactosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Alergia a la proteína de la leche de vaca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Embarazada o Nodriz	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Otras alergias alimentarias	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Especifique: _____
Patologías gastrointestinales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Patologías

Medicamentos

Frecuencia de consumo de yoghurt semanal

- Ninguna vez por semana
- 1-2 veces por semana
- 3-5 veces por semana
- Más de 5 veces por semana

Anexo N°6



Consentimiento Informado

PARTICIPARÁ EN EL “PRUEBA DE TOLERANCIA DE UN PRODUCTO LÁCTEO INCORPORANDO QUITOSANO COMO FUENTE DE FIBRA NO TRADICIONAL”

En Valparaíso, a.....de..... del 2013.

Yo,..... (Nombre del participante), RUT....., certifico que Marisol Castillo Carrillo RUT 17.808.323-6 y Nevenka Figueroa Fernández, RUT 17.119.732-5.

Me han informado que:

- 1) Está en curso un proyecto de investigación de tesis, en una de sus fases de experimentación, que requiere determinar la tolerancia aguda y a largo plazo producida tras el consumo de un alimento control y un alimento en experimentación que consiste en yoghurt con adición de fibra de Quitosano.
- 2) Se procederá con todas las condiciones de seguridad alimentaria necesarias para el procedimiento, reduciendo al máximo todo tipo de riesgos para los participantes. No obstante, se podrían generar efectos secundarios adversos tales como malestar gastrointestinal.
- 3) Los resultados de este estudio pueden ser publicados sin embargo, mi nombre o identidad se mantendrá bajo reserva.

ACUERDO:

Se me ha explicado el estudio y he aclarado mis dudas. Voluntariamente doy mi consentimiento para participar en el estudio, renunciando a toda forma de compensación por esta decisión voluntaria.

Firma Responsable Investigación

Firma Voluntario

Anexo N°7

Pauta de evaluación de Tolerancia

NOMBRE:.....FECHA:.....

Por favor, encerrar en un círculo según corresponda por tiempo de consumo:

ANTES DE CONSUMIR

DESPUES DE CONSUMIR

Indique si presenta o no algún síntoma:

1. PRESENCIA DE SINTOMAS

2. AUSENCIA DE SINTOMAS

Si presenta algún síntoma, indique con una X la puntuación que mejor describa su síntoma presentado.

Síntomas	Ninguno 1	Leve 2	Moderado 3	Intenso 4	Muy intenso 5
Dolor Abdominal					
Diarrea					
Constipación					
Distensión abdominal					
Ardor					
Náuseas					
Vómitos					
Reflujo					
Eructos					
Meteorismo					
Dolor de cabeza					
Mareos					
Picazón en cualquier zona					
Otro					

En caso de presentar otro síntoma especifique cuál:

.....

Gracias por su participacion

Anexo N°8



Instructivo Prueba de Tolerancia

Tesis: “Estudio de saciedad en un producto lácteo incorporando Quitosano como fuente de fibra no tradicional”

Por favor seguir las siguientes instrucciones para realizar la prueba de tolerancia a largo plazo:

- Este estudio tiene un periodo de duración de 10 días, en el que se le proporcionará un yoghurt diario de 125 mL (Total: 10 unidades).
- El producto (yoghurt) se entregará en recipientes herméticos e idénticos cada 3 días, asegurando las respectivas condiciones de higiene. Cualquier daño del producto durante su transporte o distribución deberá ser notificado y devuelto inmediatamente a las personas encargadas.
- Una vez recepcionado el producto cada participante se hará responsable de su correcto uso y consumo.
- Este producto deberá ser almacenado a una temperatura de 3 a 5° C, en un lugar fresco y limpio.
- Se deberá consumir durante el desayuno o la primera comida del día, con un horario que no supere las 11:00 hrs.
- Antes y después de su consumo deberá registrar los síntomas o molestias según la hoja de evaluación para tolerancia, la cual está adjuntada.

Estas instrucciones se deben mantener durante todo el periodo de la prueba, para asegurar resultados adecuados y evitar cualquier perjuicio. El incumplimiento de estas disposiciones, será motivo de exclusión inmediato del estudio y sin excepciones.

Gracias por su participacion

Anexo N° 9 Consejería saludable: desayuno tipo

Opción Desayuno 1:

Ingrediente	Gramaje (g/cc)	Kcal	Kcal/g	Proteínas (g)	Carbohidratos (g)	Lípidos (g)
Leche descremada	200	68	2,9	6,8	10	0
Pan Marraqueta	50	144	0,34	4,5	27,7	1,5
Jamón de pavo	30	38	0,78	5,7	0,1	1,5
Fruta	100	59	1,7	0,2	15,2	0,3
	380	309	1,2	17,2	53	3,3

Opción Desayuno 2:

Ingrediente	Gramaje (g/cc)	Kcal	Kcal/g	Proteínas (g)	Carbohidratos (g)	Lípidos (g)
Yoghurt	125	108	1,1	3,8	17,5	2,5
Avena	40	153	0,26	6,4	26,8	2,5
Jugo de Fruta Natural	200	59	3,4	0,2	15,2	0,3
	365	320	1,1	10,4	59,5	5,3

Opción Desayuno 3:

Ingrediente	Gramaje (g/cc)	Kcal	Kcal/g	Proteínas (g)	Carbohidratos (g)	Lípidos (g)
Yoghurt	125	108	1,1	3,8	17,5	2,5
Galleta de soda	30	126	0,2	2,5	21,7	3,2
Quesillo	30	32	0,9	5	0,9	0,9
Fruta	100	59	1,7	0,2	15,2	0,3
	285	325	0,9	11,5	55,3	6,9

Anexo N°10



Consentimiento Informado

PARTICIPARÁ EN EL “ESTUDIO DE SACIEDAD EN UN PRODUCTO LÁCTEO INCORPORANDO QUITOSANO COMO FUENTE DE FIBRA NO TRADICIONAL”

En Valparaíso, a.....de..... del 2013.

Yo,..... (Nombre del participante), RUT....., certifico que Marisol Castillo Carrillo RUT 17.808.323-6 y Nevenka Figueroa Fernández, RUT 17.119.732-5

Me han informado que:

- 1) Está en curso un proyecto de investigación de tesis, en una de sus fases de experimentación, que requiere determinar la saciedad producida tras el consumo de un alimento control y un alimento en experimentación que consiste en yoghurt enriquecido con fibra de Quitosano.
- 2) Se procederá con todas las condiciones de seguridad alimentaria necesarias para el procedimiento, reduciendo al máximo todo tipo de riesgos para los participantes. No obstante, se podrían generar efectos secundarios adversos tales como malestar gastrointestinal.
- 3) Los resultados de este estudio pueden ser publicados sin embargo, mi nombre o identidad se mantendrá bajo reserva.

ACUERDO:

Se me ha explicado el estudio y he aclarado mis dudas. Voluntariamente doy mi consentimiento para participar en el estudio, renunciando a toda forma de compensación por esta decisión voluntaria.

Firma Responsable Investigación

Firma voluntario

Anexo N° 11



Escala Visual Análoga (EVA) para evaluar Saciedad

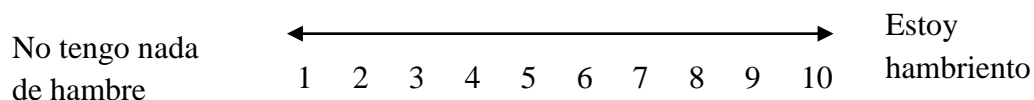
Nombre:.....

Fecha:.....

Hora:.....

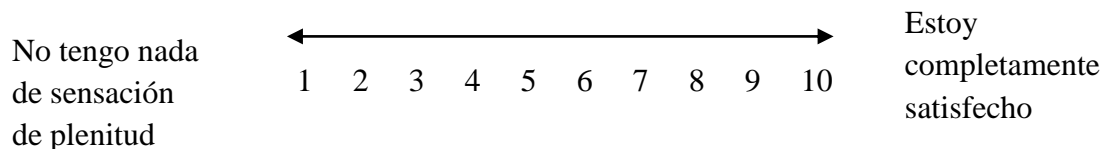
La valoración de esta escala irá de 1 (mínimo) a 10 (máximo) puntos.

1. Marque con una **línea vertical su grado de hambre** en la siguiente escala:



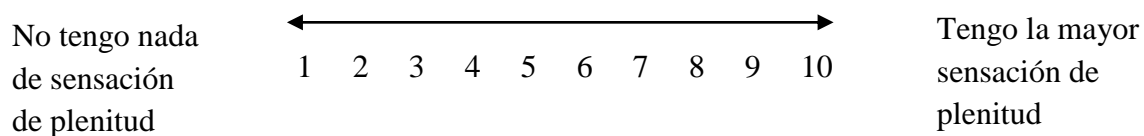
* Hambre: sensación fisiológica de necesidad de ingerir algún alimento.

2. Marque con una **línea vertical su grado de saciedad** en la escala siguiente:



*Saciedad: sensación de no requerir comer durante cierto tiempo.

3. Marque con una **línea vertical su grado de plenitud** en la siguiente escala:



*Plenitud: comer hasta un estado cómodo de llenura

9. REFERENCIAS

- (1) Barría M. Amigo H. Transición Nutricional: una revisión del perfil latinoamericano, Caracas 2006, ALAN v.56 n.1.
- (2) Albala C, Vio F, Kain J, Uauy R. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. *Public Health Nutr*, 2001; 5:1-7.
- (3) Organización Mundial de la Salud. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas; Serie de Informes Técnicos N° 916, Ginebra: OMS 2002.
- (4) A. Alvírez, B. Edelia, Z. Jiménez. “Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales” Facultad de Salud Pública y Nutrición. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2002; Vol 3 No.3.
- (5) Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association Of Cereal Chemists. Submitted January 10, 2001.
- (6) Ministerio de salud, Subsecretaria de Salud Pública, Normas Técnicas sobre directrices nutricionales que indica, para la declaración propiedades saludables de los alimentos, Resolución Exenta N° 764, Publicada en el Diario Oficial de 05.10.09.
- (7) Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. “Informe de la 30ª Reunión del Comité Del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales” Ciudad del Cabo, Sudáfrica, 2008 27-54 Apéndice II.
- (8) Ha MA, Jarvis MC, Mann JL: A definition for dietary fibre. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:861-864.

-
- (9) E. Escudero Álvarez y P. González Sánchez, La fibra dietética Dietary fibre, Nutr. Hosp. v. 21 supl. 2 Madrid mayo 2006.
- (10) WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: WHO; 2003.
- (11) Position of the American Dietetic Association. Health implications of dietary fiber. J Am Diet Assoc. ADA Reports 1996; 1157-59
- (12) Valenzuela A, Maiz A. Role of dietary fiber in enteral nutrition. Revista Chilena de Nutrición, 2006; 33:342-351.
- (13) Mirta Crovetto, Ricardo Uauy. Cambios en el consumo aparente de nutrientes en el Gran Santiago 1988-1997 en hogares según ingreso y su probable relación con patrón de enfermedades crónicas no transmisibles. Rev. méd. Chile 2010; 138:9.
- (14) Ministerio de Salud de Chile. Encuesta Nacional de Salud (ENS), 2009. <http://www.minsal.cl>. Visitada 08 junio 2013.
- (15) Chawla R, Patil G.R. Soluble Dietary Fiber, Compr Rev Food Sci Food Safety 2010; 9: 178-96.
- (16) Meier R, Gassull MA: Consensus recommendations on the effects and benefits of fibre in clinical practice. Clinical Nutrition Supplements 2004; 1:73-80.
- (17) Saura-Calixto F. Evolución del concepto de fibra. En Carbohidratos en Alimentos Regionales Iberoamericanos. Sao Paulo: Editora de Universidad de de Sao Paulo. 2006, 237-53.
- (18) García Peris P, Álvarez de Frutos V: Fibra y salud. Nutrición y obesidad 2000; 3:127-135.

-
- (19) Molina M, Paz A. La fibra dietética procesada como alimento funcional, Fomento de su consumo desde la oficina de farmacia;2007; 26:1.
- (20) Trantwein EA, Kunath-Ran A, Erbersdobler HF: Increased fecal bile acid excretion and changes in the circulating bile acid pool are involved in the hypocholesterolemic and gallstonepreventive actions of psyllium in hamsters. *J Nutr* 1999; 129:896-902.
- (21) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) . *JAMA* . 2001;285:2486–2497
- (22) Cherbut C, Ferrier L, Roze C, Anini Y, Blottiere H, Lecannu G, Galmiche JP. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275: G1415-22.
- (23) María Del Refugio Falcón V., Jesús Manuel Barrón H., Ana Lourdes Romero B., Milagros Francisca Domínguez S. Efecto Adverso En La Calidad Proteica De Los Alimentos De Dietas Con Alto Contenido De Fibra Dietaria, *Rev Chil Nutr* 2011, Vol. 38, N°3, págs.: 369-375.
- (24) Gildberg A., Stenberg E.A. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry* 36, 2001, 809-812.
- (25) Pastrana Bonilla E., Importancia industrial de la quitina. *Bioquímica, facultad de ingeniería, USCO*. 2010

-
- (26) I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 2009, 3: 203-230
- (27) Krajewska B. Diffusion of metal ions through gel chitosan membranes. *Reac & Func Polym*, 2001, 47: 37-47
- (28) Velásquez C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, *Rev Iberoamericana de Polímeros*, 2003, 4:2.
- (29) Mármol Z., Páez g., Rincón M., Araujo K., Aiello C., Chandler C., Gutierrez E., Quitina y Quitosano polímeros amigables, una revisión de sus aplicaciones, *Rerv. Tecnocientífica URU*, Julio- Diciembre 2011; ISSN: 2244-775X
- (30) J. Vasquez, M. Vidal. Caracterización y Alternativa de Uso de una Película Biodegradable de Quitosano a partir de la Extracción de Quitina de Langostino (Pleuroncodes planipes) para la Industria de Alimentos. Universidad de El Salvador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela de Ingeniería Química, 2011.
- (31) J. Nakamatsu. La Quitosana. *Revista de Química PUCP*, 2012, Vol. 26:1-2
- (32) Yogeshkumar G., Atul G., Adhikrao Y. Chitosan and Its Applications: A Review of Literature. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. Jan– Mar 2013, Vol. 4 (1).
- (33) Park PJ, Je JY, Kim SK. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr Polym* 2004; 55(1): 17-22.
- (34) Xing R, Liu S, Guo Z, et al. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. *Bioorg Med Chem* 2005; 13(5): 1573-7.

-
- (35) Kim SK, Rajapakse N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr Polym* 2005; 62(4): 357-68.
- (36) Jeon YJ, Kim SK. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *J Microbiol Biotechnol* 2002; 12(3): 503-7.
- (37) Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 52: 105-15.
- (38) Gallaher CM, Munion J, Hesslink R Jr, Wise J, Gallaher DD. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J Nutr.* 2000 Nov;130(11):2753-9.
- 39 Gades MD, Stern JS. Chitosan Supplementation and Fat Absorption in Men and Women. *J Am Diet Assoc.* 2005; 105:72-77.
- (40) Guerciolini R, Radu-Radulescu L, Boldrin M, Dallas J, Moore R. Comparative evaluation of fecal fat excretion induced by orlistat and chitosan. *Obes Res.* 2001, 9:364-367.
- (41) Barroso Aranda J, Contreras F, Bagchi D, Preuss HG. Efficacy of a novel chitosan formulation on fecal fat excretion: A double-blind, crossover, placebo-controlled study. *J Med.* 2002; 33: 209-225.
- (42) Ormrod DJ, Holmes CC, Miller E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 138: 329-334.
- (43) J.L. Slavin. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21; 2005; 411-418.

-
- (44) Blundell J, de Graaf C, Hulshof T, Jebb S, Livingstone B, Lluch A, Mela D, Salah S, Schuring E, van der Knaap H, Westerterp M. Appetite control: methodological aspects of the evaluation of foods. *Obes Rev*; 2010; 11(3):251-70.
- (45) Sadoul BC, Schuring EA, Symersky T, Mela DJ, Masclee AA, Peters HP. Measuring satiety with pictures compared to visual analogue scales. An exploratory study. *Appetite*. 2012;58(1):414-7.
- (46) Martine M. Perrigue, Ms; Pablo Monsivais, Phd, Mph; Adam Drewnowski. Added Soluble Fiber Enhances The Satiating Power Of Low-Energy-Density Liquid Yogurts. *J Am Diet Assoc*. 2009;109:1862-1868.
- (47) Giraudó, M., Ugarte M., Scollo D., Nonzioli A., Sánchez Tuero H. Carbohidratos en los alimentos funcionales. Quitosano como suplemento dietario, aditivo y nutracéutico. *Actualización en nutrición*; 2010; vol 11-Nº 4.
- (48) Yao HT, Chiang MT. Chitosan shifts the fermentation site toward the distal colon and increases the fecal short-chain fatty acids concentrations in rats. *Int J Vitam Nutr Res*. 2006; 76(2):57-64.
- (49) Cherbut C, Ferrier L, Roze C, Anini Y, Blottiere H, Lecannu G, Galmiche JP. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275: G1415-22.
- (50) Bahar B, O'Doherty JV, O'Doherty AM, Sweeney T. Chito-oligosaccharide inhibits the de-methylation of a 'CpG' island within the leptin (LEP) promoter during adipogenesis of 3T3-L1 cells. *PLoS One*. 2013;8(3)

-
- (51) Walsh AM, Sweeney T, Bahar B, O'Doherty JV. Multi-functional roles of chitosan as a potential protective agent against obesity. *PLoS One*. 2013;8(1):e53828.
- (52) Sagoo, S.K., R. Board y S. Roller. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts (2002). *Lett. Appl. Microbiol*, (3), 34, 168-172.
- (53) Romanazzi, G.; Nigro, F.; Ippolito, A.; Divenere, D.; Salerno, M. Effect of pre- and post harvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *J. Food Sci.* 2002; 67(5):1862-1867.
- (54) FESNAD, Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética. Junio de 2013
- (55) Norma Chilena Oficial NCh2569.of2000. Productos Lácteos – Yoghurt o Yogur – Requisitos.
- (56) Ministerio de Agricultura, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Boletín de leche, 2012.
- (57) Martine M. Perrigue, Monsivais P, Drewnowski A. Added Soluble Fiber Enhances the Satiating Power of Low-Energy-Density Liquid Yogurts. *J Am Diet Assoc.* 2009; 109:1862- 1868.
- (58) M. Dello Staffolo, N. Bertola, M. Martino, A. Bevilacqua. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *Int Dairy J* 14, 2004, 263–268.
- (59) Gotteland M, Brunser O. Efecto De Un Yogur Con Inulina Sobre La Función Intestinal De Sujetos Sanos o Constipados. *Rev Chil Nutr*;2006; Vol. 33, N°3.

-
- (60) P. Kipa, D. Meyerb, R.H. Jellemac; Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yogurts, *Int Dairy J*; 2006; 16: 1098–1103.
- (61) Brennan C, Tudorica C. Carbohydrate-based fat replacers in the modification of the rheological, textural and sensory quality of yoghurt: comparative study of the utilisation of barley beta-glucan, guar gum and inulin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2008, 43, 824–833.
- (62) Gotteland M., Brunser O. Efecto de un Yogur con Inulina sobre la Función Intestinal de Sujetos Sanos o Constipados. *Rev Chil Nutr*, 2006 Vol. 33, N°3.
- (63) Organización Mundial de la Salud, Comité de Expertos de la OMS sobre la obesidad: Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO technical report series, 894. Ginebra (Suiza), 2000.
- (64) National Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board; Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients); 2005; 107-240.
- (65) S. Olivares, I. Zacarías. Guía de Alimentación para una vida más sana. INTA, Uni. de Chile, 2006.
- (66) Gattás V., Guía de Composición Nutricional de Alimentos Naturales, de la Industria y Preparaciones Chilenas Habituales. 1° Edición 2009. Universidad de Chile-INTA. Chile
- (67) Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura. Industria Láctea: Avance de Recepción y Producción, Noviembre 2013.
- (68) Ministerio de Agricultura, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). Boletín de leche, 2013.

-
- (69) Rania Abou-Samra, Lian Keersmaekers, Dino Brienza, Rajat Mukherjee, Katherine Macé, Efecto sobre la satisfacción del apetito y la saciedad a corto plazo de diferentes fuentes de proteína consumidas como entrada, *Nutrition Journal*, 2011, 10:139
- (70) Bludell JE, King NA. Overconsumption as a cause of weight gain: Behavioural physiological interactions in the control of food intake (appetite). *Ciba Found Symp* 1996; b 201:138-54
- (71) Santos Moreno, A. Manual de Elaboración de Productos Lácteos. Universidad Autónoma Chapingo, Depto Ingeniería Agroindustrial. 2001; 133p
- (72) Fang-Hsuean Liaoa, Ming-Jer Shieha, Nen-Chung Changb, Yi-Wen Chien, Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients, *Nutrition Research* 27, 2007, 146– 151.
- (73) Gades MD, Stern JS. Chitosan supplementation does not affect fat absorption in healthy males fed a highfat diet, a pilot study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:119-122.
- (74) Gades MD, Stern JS. Chitosan Supplementation and Fat Absorption in Men and Women, *J Am Diet Assoc*. 2005;105:72-77.
- (75) Guerciolini R, Radu-Radulescu L, Boldrin M, Dallas J, Moore R. Comparative evaluation of fecal fat excretion induced by orlistat and chitosan. *Obes Res*. 2001; 9:364-367.
- (76) Gades MD, Stern JS. Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men. *Obes Res*. 2003;11:683-688.

-
- (77) P. Kipa, D. Meyerb,_, R.H. Jellemac; Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yogurts, *Int Dairy J* 2006; 16:1098–1103.
- (78) M. Dello Staffoloa, N. Bertolaa,b, M. Martinoa,b, y A. Bevilacqua,b; Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt, *Int Dairy J*, 2004; 14: 263–268.
- (79) M.H. Seo, S.Y. Lee, Y.H. Chang, H.S. Kwak, Physicochemical, microbial, and sensory properties of yogurt supplemented with nanopowdered chitosan during storage, *Journal of Dairy Science*, 2009, V. 92, 12: 5907–5916.
- (80) Bludell JE, King NA. Overconsumption as a cause of weight gain: Behavioural physiological interactions in the control of food intake (appetite). *Ciba Found Symp*, 1996; b 201:138-54
- (81) Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung*. 2002;52(1):1-7
- (82) Gades, M.D., Stern, J.S., 2003. Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men. *Obes. Res*. 2011; (5), 683–688.
- (83) Tapola, N.S., Lyyra, M.L., Kolehmainen, R.M., Sarkkinen, E.S., Schauss, A.G., 2008. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets. *J. Am. Coll. Nutr.* 27 (1), 22–30.
- (84) Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung*. 2002; 52(1):1-7.
- (85) Weiner, M.L. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients, 1992; 663-670.

-
- (86) J. Slavin and H. Green, Dietary fibre and satiety, Journal compilation British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin , 2007; 32 (1): 32–42
- (87) N. Ramos. Hambre, saciedad y apetito. Su repercusión en el estado de nutrición de los individuos. Nutrición Clínica 2002;5 (4):296-308
- (88) Giraudo, M., Ugarte M., Scollo D., Nonzioli A., Sánchez Tuero H. Carbohidratos en los alimentos funcionales. Quitosano como suplemento dietario, aditivo y nutracéutico. Actualización en nutrición; 2010, vol 11-Nº 4.
- (89) Nidal A. Qinna, Faisal T. Akayleh, Mayyas M. Al Remawib, Basma S. Kamona, Hashem Taha, Adnan A. Badwan. Evaluation of a functional food preparation based on chitosan as a meal replacement diet. Journal of Functional Foods 5, 2013;1125 – 1134.
- (90) Kumar SG, Rahman MA, Lee SH, Hwang HS, Kim HA, et al. Plasma proteome analysis for anti-obesity and anti-diabetic potentials of chitosan oligosaccharides in ob/ob mice. J Proteomics, 2009; 9: 2149–2162.
- (91) Rahman MA, Kumar SG, Yun JW (2010) Proteome analysis in adipose tissue of ob/ob mice in response to chitosan oligosaccharides treatment. Biotechnol Bioprocess Eng 15: 559–571.
- (92) Walsh AM, Sweeney T, Bahar B, O'Doherty JV. Multi-functional roles of chitosan as a potential protective agent against obesity. PLoS One. 2013;8(1):e53828.