

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Nutrición y Bromatología II**



**Influencia del tratamiento térmico en la fibra alimentaria y  
azúcares solubles de productos vegetales**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**María Dolores Rodríguez Sevilla**

**Directoras**

**Araceli Redondo Cuenca**

**María José Villanueva Suárez**

**Madrid 2005**

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II:  
BROMATOLOGIA

**«INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA FIBRA ALIMENTARIA  
Y AZUCARES SOLUBLES DE PRODUCTOS VEGETALES»**

Tesis Doctoral que presenta

**Dña María Dolores Rodríguez Sevilla**

para optar al grado de Doctor en Farmacia.

*DIRECTORAS*

**Dña. Araceli Redondo Cuenca**

**Dña. María José Villanueva Suárez**

Profesoras Titulares

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

MADRID, 1993



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II  
Bromatología

**MARIA ESPERANZA TORIJA ISASA, CATEDRATICA  
Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICION  
Y BROMATOLOGIA II: BROMATOLOGIA DE LA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID.**

**CERTIFICA:** Que el presente trabajo titulado «**Influencia del  
tratamiento térmico en la fibra alimentaria y azúcares  
solubles de productos vegetales**» se ha realizado en este  
Departamento bajo la dirección de la **Dra. Dña. Araceli  
Redondo Cuenca** y **Dra. Dña. María José Villanueva Suárez**  
y constituye la memoria que presenta la Licenciada **Dña.  
María Dolores Rodríguez Sevilla** para optar al Grado de  
Doctor en Farmacia

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid a  
veintisiete de septiembre de mil novecientos noventa y tres.

DEPARTAMENTO  
BROMATOLOGIA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

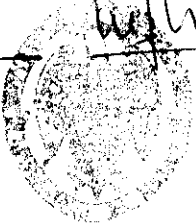
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II  
Bromatología

**ARACELI REDONDO CUENCA Y MARIA JOSE VILLANUEVA SUAREZ, PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II: BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.**

**CERTIFICAN:** Que el presente trabajo titulado «**Influencia del tratamiento térmico en la fibra alimentaria y azúcares solubles de productos vegetales**» se ha realizado en este Departamento bajo nuestra dirección y constituye la memoria que presenta la Licenciada **Dña. María Dolores Rodríguez Sevilla** para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid a veintisiete de septiembre de mil novecientos noventa y tres.

*Araceli Redondo C*  
*Maria Jose Villanueva*



DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II

Deseo expresar mi agradecimiento:

- A las Dras D<sup>a</sup> Araceli Redondo Cuenca y D<sup>a</sup> María José Villanueva Suárez por su dirección que ha contribuido de forma muy significativa a mi formación científica, así como por su colaboración y ayuda en todo momento.
- A la Dra D<sup>a</sup> María Esperanza Torija Isasa, Catedrática y Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología, por su interés y valiosos consejos.
- A la Dra D<sup>a</sup> María Dolores Saco Sierra, Profesora Titular de Biología Vegetal, por su colaboración y asesoramiento en el estudio microscópico.
- Al Dr. W.J. Klopper, director del CIVO-TNO Food Analysis Institute y al doctor P. Slump director del General Food Analysis Department del CIVO-TNO, Zeist (Holanda) por aceptar mi estancia en su departamento. Al Dr. K. D. Bos y a M.G.E. Wolters por la dirección del trabajo que realicé en dicho centro así como por su hospitalidad y consejos.
- A D. Jorge Zapico por su asesoramiento en el estudio estadístico.
- A D. David Blanco y D. José Antonio Budía por su colaboración en la informatización de esta memoria.
- A D. José Manuel de Prádena por su colaboración a lo largo del desarrollo de esta tesis.
- A todos mis compañeros del departamento que de alguna manera han contribuido al quehacer diario.
- Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una Beca para Formación de Personal Investigador así como por la Ayuda para estancias breves en el extranjero.

*A mis padres y a Arturo,  
a Mercedes y a Juan Angel III,  
a Amadeo y a mi hijo Amadeo.*

## INDICE

página

### I PARTE GENERAL

1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES VEGETALES ESTUDIADOS .....	4
2.1. Zanahoria .....	4
2.1.1. Características morfológicas de la planta.....	4
2.1.2. Variedades .....	5
2.1.3. Cultivo .....	6
2.1.4. Operaciones postcosecha .....	8
2.1.5. Producción y consumo .....	9
2.2. Remolacha de mesa .....	10
2.2.1. Características morfológicas de la planta .....	10
2.2.2. Variedades .....	11
2.2.3. Cultivo .....	11
2.2.4. Operaciones postcosecha .....	12
2.2.5. Producción y consumo .....	13
2.3. Nabo .....	13
2.3.1. Características morfológicas de la planta .....	13
2.3.2. Variedades .....	14
2.3.3. Cultivo .....	14
2.3.4. Operaciones postcosecha .....	14
2.3.5. Producción y consumo .....	15
2.4. Aspectos histológicos de la raíz .....	15
2.4.1. Estructura primaria .....	16
2.4.2. Estructura secundaria .....	22
2.4.3. Estructura de las raíces de almacenamiento .....	24
2.4.3.1. Zanahoria .....	25
2.4.3.2. Remolacha .....	27
2.4.3.3. Nabo .....	30
3. Estudio de la pared celular vegetal .....	32
3.1. Características generales .....	32

3.2. Ontogenia .....	32
3.3. Composición química de la pared celular .....	36
3.3.1. Polisacáridos esturcturales .....	36
3.3.1.1. Celulosa .....	36
3.3.1.2. Hemicelulosas .....	39
3.3.1.3. Sustancias pécticas .....	40
3.3.2. Glicoproteínas .....	45
3.3.2.1. Glicoproteínas estructurales .....	45
3.3.2.2. Glicoproteínas enzimáticas .....	47
3.3.3. Otros componentes asociados .....	47
3.3.3.1. Lignina .....	47
3.3.3.2. Cutina. Suberina. Ceras .....	48
3.3.3.3. Taninos .....	50
3.3.3.4. Sales minerales .....	50
3.4. Biosíntesis de los principales componentes .....	50
3.4.1. Biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular .....	51
3.4.1.1. Síntesis de precursores. Polimerización .....	51
3.4.1.2. Biosíntesis de celulosa .....	56
3.4.1.3. Biosíntesis de hemicelulosas .....	57
3.4.1.4. Bisíntesis de pectinas .....	57
3.4.2. Biosíntesis de glicoproteínas .....	59
3.4.3. Biosíntesis de lignina .....	60
3.5. Estructura de la pared celular .....	60
3.5.1. Pared primaria .....	60
3.5.1.1. Pared primaria de plantas dicotiledóneas .....	62
3.5.1.2. Pared primaria de plantas monocotiledóneas .....	68
3.5.2. Pared secundaria .....	70
4. Evolución del concepto de fibra alimentaria .....	71
4.1. Investigaciones preliminares .....	71
4.2. Estudios epidemiológicos y primeras definiciones .....	73
4.3. Nuevas definiciones y discusión sobre los componentes .....	74
5. Efectos fisiológicos de la fibra alimentaria: investigaciones actuales .....	78

5.1. Aspectos generales .....	78
5.2. Efectos fisiológicos más importantes .....	84
5.2.1. Retardo del vaciamiento gástrico .....	84
5.2.2. Descenso de la absorción de nutrientes .....	84
5.2.3. Descenso del colesterol plasmático .....	85
5.2.4. Aumento del peso de las heces .....	86
6. Métodos analíticos para la determinación de fibra alimentaria .....	89
6.1. Métodos para la determinación de fibra bruta .....	89
6.2. Métodos detergentes .....	90
6.3. Métodos enzimático-gravimétricos .....	94
6.4. Métodos de fraccionamiento .....	103
6.4.1. Método de Southgate .....	103
6.4.2. Otros métodos de fraccionamiento .....	104
6.5. Métodos cromatográficos .....	104
6.5.1. Cromatografía de gas-líquido: GLC .....	105
6.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia: HPLC .....	115
7. Influencia de los tratamientos térmicos sobre la fibra alimentaria .....	118
7.1. Modificaciones cuantitativas .....	119
7.2. Modificaciones cualitativas .....	124

## **II PARTE EXPERIMENTAL**

1. Diseño experimental .....	128
1.1. Planteamiento .....	128
1.2. Preparación de las muestras .....	129
2. Métodos analíticos .....	131
2.1. Humedad .....	131
2.2. Fibra alimentaria .....	133
2.2.1. Métodos gravimétricos .....	133
2.2.1.1. Métodos detergentes .....	133
2.2.1.2. Método enzimático-gravimétrico: método de Asp .....	134
2.2.2. Métodos cromatográficos .....	138

2.2.3. Método espectrofotométrico: determinación de sustancias pécicas .....	152
2.3. Azúcares solubles .....	156
2.3.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) .....	156
2.3.2. Espectrofotometría visible .....	157
2.4. Estudio histológico y citológico por microscopía .....	161
2.4.1. Preparación de las muestras para su observación directa al microscopio .....	161
2.4.2. Preparación de las muestras para inclusión en parafina .....	161
2.4.3. Microtomía: realización y recogida de los cortes .....	164
2.4.4. Desparafinado, hidratación y montaje de las preparaciones .....	165
2.4.5. Tinciones utilizadas .....	166
3. Estudio de los métodos de análisis .....	167
3.1. Estudio de los métodos de análisis de fibra alimentaria .....	167
3.1.1. Ensayo de los métodos gravimétricos .....	167
3.1.1.1. Ensayo de precisión .....	167
3.1.2. Ensayos de los métodos cromatográficos .....	169
3.1.2.1. Análisis de fibra alimentaria por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) .....	169
3.1.2.2. Análisis de fibra alimentaria por Cromatografía de Gases (GLC) .....	180
3.1.2.3. Resumen comparativo de los ensayos realizados a los métodos cromatográficos .....	185
3.1.3. Métodos espectrofotométricos .....	186
3.1.3.1. Extracción de sustancias pécicas .....	186
3.1.3.2. Cuantificación de sustancias pécicas por el método del 3,5-dimetilfenol.....	186
3.2. Estudio del método de análisis de azúcares solubles .....	191
3.2.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	191
3.2.2. Espectrofotometría visible: método del ferricianuro potásico ....	194
Apéndice de reactivos .....	197

### III RESULTADOS Y DISCUSION

1. Resultados.....	199
1.1. Tablas .....	199
1.2. Gráficos.....	202
1.3. Estudio estadístico .....	203
2. Discusión de los resultados .....	320
2.1. Estudio comparativo de los métodos de análisis empleados .....	320
2.1.1. Estudio de los resultados obtenidos para la fibra alimentaria ....	320
2.1.1.1. Métodos detergentes .....	320
2.1.1.2. Método enzimático-gravimétrico de Asp .....	325
2.1.1.3. Método cromatográfico (HPLC) .....	332
2.1.1.4. Método espectrofotométrico para sustancias pécticas: 3,5-dimetilfenol .....	350
2.1.1.5. Estudio de los valores de fibra total .....	351
2.1.2. Estudio de los resultados obtenidos para azúcares solubles.....	354
2.1.2.1. Método cromatográfico (HPLC) .....	354
2.1.2.2. Método espectrofotométrico: ferricianuro potásico .....	359
2.1.2.3. Comparación de los resultados obtenidos para azúcares solubles por el método de HPLC y por el método del ferricianuro potásico .....	360
2.2. Comparación de los resultados obtenidos en las hortalizas frescas y en las procesadas .....	361
2.2.1. Expresión de los resultados.....	361
2.2.1.1. Cálculo del factor de corrección .....	362
2.2.2. Comparación de los valores de humedad obtenidos en fresco y en procesado .....	364
2.2.3. Comparación de los valores de fibra alimentaria en las muestras frescas y en las procesadas obtenidos por diferentes métodos ...	365
2.2.3.1. Métodos detergentes .....	366
2.2.3.2. Método enzimático-gravimétrico de Asp .....	370
2.2.3.3. Método cromatográfico (HPLC) .....	373

2.2.3.4. Método espectrofotométrico para sustancias pécticas: 3,5-dimetilfenol .....	376
2.2.3.5. Comparación de los valores de fibra alimentaria total ..	378
2.2.4. Estudio del contenido en azúcares solubles en las hortalizas frescas y procesadas .....	383
2.2.4.1. Método cromatográfico (HPLC) .....	383
2.2.4.2. Método espectrofotométrico del ferricianuro potásico .....	385
2.2.4.3. Estudio de la distribución de azúcares solubles y monosacáridos que forman la fibra alimentaria .....	386
2.3. Discusión de los resultados obtenidos por microscopía óptica .....	387
2.3.1. Generalidades .....	387
2.3.2. Celulosa y hemicelulosas .....	388
2.3.3. Sustancias pécticas .....	389
2.3.4. Lignina .....	389
<b>IV CONCLUSIONES .....</b>	<b>402</b>
<b>V BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>407</b>

# **I PARTE GENERAL**

## 1. INTRODUCCION

La fibra alimentaria ha suscitado, desde hace años, un interés progresivo dentro de la comunidad científica internacional a raíz de los estudios epidemiológicos que establecieron una relación entre la carencia de este componente en la dieta y la mayor incidencia de ciertas enfermedades y trastornos fisiológicos característicos de las sociedades desarrolladas.

No es extraño, por tanto, que una serie de grupos de investigación haya centrado su atención en esta fracción de los alimentos considerada, hasta ese momento, sin ningún valor por el hecho de no ser digerible. Su esfuerzo se encuentra plasmado en la abundante bibliografía existente sobre el tema. Dichas investigaciones han ido encaminadas a delimitar la definición de fibra alimentaria ("dietary fibre"), desarrollar técnicas analíticas adecuadas, estudiar las propiedades físicoquímicas y profundizar en los efectos fisiológicos. En la actualidad los proyectos más aventajados tratan de aislar e identificar cada uno de los polisacáridos constituyentes de dicha fracción y el resto de los componentes asociados a ella, así como determinar la forma en que se encuentran en las paredes celulares de diferentes tejidos.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, quedan aún sin respuesta muchas cuestiones relacionadas, por una parte, con la aceptación unánime de una definición y, por otra, con la analítica de estos compuestos, donde tampoco hay acuerdo, proponiéndose diversas modificaciones por parte de los científicos.

El auge de la fibra alimentaria se debe, sin duda, a la trascendencia de sus efectos fisiológicos. Se ha indicado que su consumo puede prevenir una serie de enfermedades de gran importancia, sobre todo en la civilización occidental, como el cáncer de colon, la arteriopatía coronaria y la diabetes. La relación entre la acción fisiológica de la fibra alimentaria y el descenso de determinadas dolencias tiene un origen puramente epidemiológico; es necesario, por tanto, un conocimiento más profundo sobre su comportamiento real en el organismo. Actualmente se están llevando a cabo estudios de distinta amplitud para conocer las propiedades físicoquímicas de la fibra y trabajos experimentales sobre el comportamiento de sus diferentes componentes en el tracto digestivo

humano. El estado actual del tema es tal que se debe exigir a los científicos, y cuanto más a los profanos, una cierta prudencia a la hora de informar a los consumidores.

Cada día el término "fibra alimentaria" es más discutido y, como se ha indicado anteriormente, no hay acuerdo sobre su definición y los componentes que la forman. Diversos estudios han señalado que la verdadera importancia reside en la pared celular de los vegetales. No sólo hay que tener en cuenta que los componentes que constituyen la fibra alimentaria proceden, en su mayoría, de la pared, sino que es de gran trascendencia fisiológica como se encuentran en dicha pared.

Como se acaba de indicar la tendencia de las investigaciones actuales se encamina hacia el conocimiento de la pared celular, ya que se debe entender la fibra alimentaria no como la suma de una serie de compuestos aislados sino como integrantes de complejas estructuras; de ahí el interés del estudio de los productos de origen vegetal destinados al consumo humano.

En el presente trabajo se trata de profundizar en el conocimiento de los materiales vegetales seleccionados para el mismo: zanahoria (*Daucus carota* L. var. *sativa*), remolacha (*Beta vulgaris* L. var. *cruenta*) y nabo (*Brassica napus* L. var. *sculenta*). Se da una visión general de las características morfológicas y de cultivo, así como de las manipulaciones que sufren dichas hortalizas encaminadas a su comercialización.

Una vez conocidos el origen y los aspectos generales de los materiales con los que se va a trabajar en este estudio, se procede a desarrollar los aspectos más importantes de la pared celular: propiedades, ontogenia, composición química y estructura. Después de revisar los fundamentos principales de la pared, se puede entender mejor el concepto de fibra alimentaria, su composición, incluso los efectos fisiológicos que se le atribuyen y los problemas ligados a su determinación analítica, ya que los componentes de la fibra proceden principalmente de la pared celular de los vegetales.

Existe un interés creciente por parte de los consumidores por los problemas relacionados con su alimentación como son el conocimiento de la composición de los alimentos, el efecto que los distintos constituyentes ejercen en el organismo, así como los requerimientos necesarios

para conseguir una dieta sana y equilibrada. En este contexto los estudios relativos a la fibra alimentaria ocupan un lugar relevante. Es más, la importancia de su consumo ha motivado a la industria alimentaria para que desarrolle nuevos productos con alto contenido en fibra, que a veces procede de suplementos con fibras vegetales.

Si el estudio de la composición de los alimentos es un tema prioritario, no menos importante es determinar el contenido pormenorizado que poseen después de ser elaborados o sometidos a un tratamiento térmico, ya que los procesos pueden modificar determinados compuestos debido a reacciones con otros elementos, degradaciones, solubilizaciones, etc. Además, hoy en día existe una tendencia a introducir en los productos alimenticios finalizados el etiquetado nutritivo de los mismos, en donde cabría incluir el componente fibra alimentaria.

El objetivo planteado en el presente trabajo es el conocimiento de la fibra alimentaria y azúcares solubles de tres hortalizas de gran consumo y las posibles modificaciones que puede sufrir por el procesado. Este objetivo general se concreta en los siguientes puntos:

- Estudio de los conocimientos actuales sobre los diversos aspectos de la fibra alimentaria, teniendo en cuenta la estructura de la que procede, es decir, la pared celular.

- Estudio y comparación de las diversas metodologías empleadas para la determinación de fibra alimentaria y azúcares solubles, con especial hincapié en la puesta a punto de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia por estar menos experimentada en este campo y por las grandes posibilidades que presenta.

- Cuantificación y caracterización de la fibra alimentaria y azúcares solubles de tres hortalizas: zanahoria, remolacha y nabo.

- Estudio de la influencia del tratamiento térmico en la fibra alimentaria y en los diversos componentes de la misma, así como de los azúcares solubles, de los vegetales estudiados.

## **2. MATERIALES VEGETALES ESTUDIADOS**

En este apartado se describirán distintos aspectos referentes a cada uno de los materiales vegetales objeto de este estudio: zanahoria, remolacha y nabo. Finalmente, dado que la parte de la planta destinada al consumo, en los tres casos, es la raíz, se hará un breve estudio de las características morfológicas e histológicas de la misma.

A continuación se describirán brevemente algunos de los aspectos más interesantes de las tres hortalizas a estudiar, como son las características morfológicas, variedades, cultivo, operaciones postcosecha, producción y consumo (Holdsworth, 1988; Maroto, 1989; Maroto, 1990; Southgate 1992).

### **2.1. ZANAHORIA**

#### **2.1.1. Características morfológicas de la planta**

Su origen se sitúa en Asia Menor y su nombre científico es *Daucus carota* L. Pertenece a la familia *Umbeliferae*.

Es una planta bianual. Presenta la raíz hipertrofiada, principalmente a base de parénquima cortical; las hojas con peciolo largos, doble ó triplemente pinnado-partidas y dispuestas en roseta, y el tallo floral que en el segundo año se desarrolla ampliamente pudiendo alcanzar una altura de 1,5 m.

Las flores en umbela pueden ser blancas, amarillentas ó azuladas y las semillas de pequeño tamaño, son de color verde oscuro y con dos caras asimétricas, una plana y otra convexa, provista en sus extremos de aguijones curvados. Su capacidad germinativa media es de tres años.

### 2.1.2. Variedades

En general, las variedades más apreciadas son las de raíces rojo-anaranjadas, dentro de las cuales existe una gran variabilidad en función de su longitud que puede ser:

- Largas, de longitud superior a los 20-25 cm como: *Hicolor, Becoro, Flacoro, Saint Valery, Scarla*.

- Semilargas, con una longitud de 15-20 cm como: *Primato, Nantesa, Tip-Top, Forto, Express, Slendero, Marko, Romosa*.

- Semicortas, cuya longitud es de 10-12 cm como: *Obtusa de guerande, Foram, Chantenay*.

- Cortas cuya longitud es inferior a los 10 cm como: *Roja de Nancy, Early French Frame, Corta de Guerande*.

De este grupo, sin duda alguna, las de mayor aceptación para el mercado en fresco son las semilargas, mientras que para la industria se cultivan principalmente variedades de unos 10 cm de longitud y de 1 a 2 cm de diámetro.

En Estados Unidos se prefiere un tipo de zanahoria cónica, puntiaguda y larga, mientras que en algunos países de Europa se tiende hacia variedades cilíndricas y semilargas.

La adaptación varietal a una determinada circunstancia climática (meses cálidos ó fríos) es asimismo un carácter importante de cara a la clasificación de los distintos cultivares.

En los últimos años se están desarrollando ampliamente los cultivares híbridos. Entre los muchos existentes pueden citarse las variedades: *Spartan, Tancar, Nandor, Revo, Nanco, Camillo, Fígaro, Montan, Pioneer, Buror, Commander, Rondino, Tiana, Tamino, Nevesta, Bingo, Caropak, Paramount, Mokum, Lady, Cellobunch*, etc., que suelen pertenecer a los grupos de raíces largas y semi-largas.

### 2.1.3. Cultivo

Las zanahorias se siembran entre los meses de febrero y noviembre aunque, si las temperaturas de la zona son suaves, puede sembrarse durante todo el año.

Las distintas variedades de zanahoria tienen un ciclo de cultivo variable, entre 75 y 100 días.

Su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 16 y 18°C. Puede soportar heladas siempre y cuando no sean de intensidad excesiva. Posee exigencias importantes de humedad y, en caso de sufrir sequía, la raíz adquiere un aspecto que deprecia su valor.

En cuanto al suelo conviene que sea profundo, de textura ligera, con la suficiente cantidad de arena capaz de retener adecuadamente la humedad. Se han estudiado los efectos de la compactación del suelo en la producción de zanahorias comprobando que, al incrementarse el grado de compactación las raíces producidas son de un peso, longitud y diámetro más pequeño; así los terrenos pedregosos dan lugar a la formación de raíces bifurcadas. Este tipo de hortaliza no resiste los terrenos ácidos, si bien hay que decir que tampoco son adecuados los suelos excesivamente alcalinos. Además, es considerada generalmente como una hortaliza sensible a la salinidad.

A continuación se describen de una forma resumida las técnicas de cultivo más frecuentes para obtener cosechas de elevado rendimiento y calidad, así como los factores ligados a ellas.

Para conseguir un buen desarrollo de la raíz se debe, primeramente, acondicionar el terreno aplicando aquellas técnicas que consigan airearlo, mullirlo y lo dejen suelto hasta una adecuada profundidad, que será mayor en las variedades largas y semilargas. Como norma general se aplicará una labor en profundidad con vertedera o arado de discos, que dará un volteo a la tierra enterrando la parte superior junto con los restos de cosechas anteriores, seguido de varias labores de vibrocultivador o una labor de rotavator que desmenuzará los posibles terrones que hayan quedado de las labores de profundidad y de esta manera quedarán las capas superiores del suelo adecuadamente mullidas y preparadas.

Para realizar la siembra, debe procederse previamente al asurado. La siembra puede realizarse de distintas formas. Una posibilidad es sembrar en surcos separados, por el procedimiento denominado "al chorrillo" con máquinas en las que la semilla cae en forma de chorro después de haber sido dosificada en función de la velocidad de trabajo, lo que supone un gran consumo de semilla y la necesidad de realizar un aclareo grande, o sembrar con máquinas de precisión que seleccionan una a una las semillas y las deja caer al suelo a la distancia requerida, lo que supone un consumo menor de semilla y un aclareo posterior escaso. La distancia a la que deben quedar las plantas entre sí depende de la variedad empleada, la finalidad de las zanahorias, es decir, si se destinan al consumo directo o a la industria, así como de la fertilidad del suelo.

La fertilización se calcula en base a las necesidades de elementos nutritivos que requiere la cosecha, fundamentalmente nitrógeno,  $P_2O_5$  y  $K_2O$  en cantidades que dependen de diversos condicionantes; si se detectase bajo nivel de boro en el suelo, se hará alguna aplicación poniendo especial cuidado de no sobrepasar los niveles óptimos. Esta reposición de elementos fertilizantes puede realizarse con aplicaciones de materia orgánica o sales minerales, comprobándose la no conveniencia de la aplicación de estiércol fresco salvo si se aplica en el cultivo precedente.

En esta hortaliza es de especial importancia el momento de la fertilización, especialmente la aplicación del nitrógeno debido a la influencia que ejerce en la formación de carotenos y vitaminas, así como en el contenido en nitratos de la propia zanahoria, lo que hay que tener en cuenta sobre todo cuando va a ir destinada a la alimentación infantil (Granger y Quinche, 1983).

El aclareo es con frecuencia una operación obligada, debido a que surge un número de plantas superior a las necesarias y por tanto se impide el desarrollo óptimo de la cosecha.

La escarda es otra labor a realizar para eliminar las malas hierbas que competirían con el cultivo por los nutrientes y humedad del suelo, así como por la luz del sol. Es una labor aconsejable y se puede realizar por métodos físicos, o por métodos químicos con herbicidas selectivos.

Finalmente, la recolección puede realizarse de forma manual ó mecanizada, dependiendo sobre todo de que las extensiones sembradas puedan rentabilizar la utilización de máquinas.

Los rendimientos de estos cultivos pueden verse afectados por distintos factores: encharcamientos y sequía, deformaciones y necrosis de las raíces, plagas de determinados insectos y nemátodos, así como algunas enfermedades criptogámicas, bacterianas y víricas. Las técnicas de cultivo aquí resumidas son muy similares en las tres hortalizas objeto de este trabajo, debido a la característica común de aprovechamiento de sus raíces, por lo que no se incidirá nuevamente en su comentario en los siguientes apartados.

#### **2.1.4. Operaciones postcosecha**

Las zanahorias recolectadas, antes de ser destinadas al consumo, deben sufrir una serie de operaciones o manipulaciones que aseguren su adecuada comercialización.

Las exigencias comerciales para las zanahorias están reguladas por una norma de calidad, cuyo objetivo es definir las características de calidad, envasado y presentación que deben reunir estas raíces comestibles después de su acondicionamiento y manipulación destinadas al mercado interior (Orden de 2 de julio de 1985, B.O.E. nº162).

La aplicación de la norma de calidad a los productos hortícolas es un instrumento adecuado para mejorar su comercialización, orientar la producción de manera que satisfaga las exigencias de los consumidores y facilitar las relaciones comerciales.

Entre las operaciones que requieren las zanahorias se señalan, en primer lugar, la limpieza o lavado que va a eliminar los restos de tierra y materias extrañas que suelen acompañar a estos productos hortícolas.

La operación de selección se realiza manualmente y su finalidad es separar todas aquellas raíces que no cumplan las condiciones mínimas para su comercialización como el grado de firmeza, la presencia de raíces defectuosas (rotas, torcidas, bifurcadas, manchadas), o

aquellas otras afectadas de podredumbre.

Se define el calibrado como la operación que determina la separación del producto según los distintos tamaños y se realiza en función del diámetro de sección máxima perpendicular al eje o por el peso neto de la raíz sin hojas.

La norma de calidad para las zanahorias establece varias categorías según las calidades del producto: Extra, I y II a las que atribuye una serie de características que deben reunir y admite un margen de tolerancia para los productos no conformes con las exigencias de la categoría indicada.

Finalmente, el envasado debe asegurar una protección conveniente de forma que los materiales no causen a los productos alteraciones internas o externas. La forma de presentación comercial puede ser en envases en bolsas de polietileno que se depositan en cajas o bien sin envasar, en cuyo caso pueden presentarse algunas veces en manojos sin deshojar. El envase o embalaje debe presentar un etiquetado que incluya en, caracteres claros y bien visibles, la información obligada por la norma anteriormente mencionada (denominación de producto, origen, identificación de la empresa, características comerciales).

La conservación en cámara frigorífica a 0°C y 90-95% de humedad relativa puede permitir un almacenamiento en buenas condiciones durante dos o tres meses.

#### **2.1.5. Producción y consumo**

En España la producción total de zanahorias asciende a 252.228 Tm, destacando Segovia (63.120 Tm) y Valladolid (30.186 Tm), dentro de la Comunidad de Castilla-León que es la de mayor volumen de producción (96.152 Tm). Son también importantes las cifras correspondientes a Cádiz (49.122 Tm) dentro de la Comunidad Autónoma de Andalucía, que presenta una producción total de 74.316 Tm (Anuario de estadística agraria, 1990).

Las cifras destinadas a exportación son importantes siendo Francia el principal país

destinatario.

## **2.2. REMOLACHA DE MESA**

### **2.2.1. Características morfológicas de la planta**

Pertenece a la familia *Chenopodiaceae* y su nombre científico es el de *Beta vulgaris* L, variedad *cruenta* Alef.

Es una planta bianual que durante el primer año de cultivo produce una roseta de hojas de márgenes enteros o sinuosos, de forma oval, con peciolo alargados y limbo liso ó abullonado. Paralelamente, en este primer año, hipertrofia la parte superior de su raíz junto con elementos caulinares, formando un tubérculo hipocotíleo cuya forma puede ser alargada, redondeada ó aplastada, que es de color rojizo o amarillento, según la proporción de betacianina/betaxantina, estando controlado el contenido en betaxantina por un gen recesivo sencillo.

Si se hace un corte transversal en el tubérculo hipocotíleo, se pueden observar una serie de capas concéntricas, que pueden alternar el color rojo con capas de coloración rosa pálido. Si este contraste de color es muy acusado, se manifiesta lo que se conoce como "zonificación" de la remolacha de mesa, característica que deprecia comercialmente a esta hortaliza. Las capas concéntricas corresponden alternativamente a elementos de tejido vascular y de parénquima de reserva en el que se acumula el azúcar.

En el segundo año de cultivo, la planta emite el tallo floral que aloja una inflorescencia compleja, larga y laxa, en la que las flores, son de color verde-amarillento. Como consecuencia del crecimiento ininterrumpido de los cálices tras la floración, se forman glómérulos que engloban, cada uno de ellos 2 ó 3 semillas reniformes, cuya capacidad germinativa es de cuatro-seis años.

Aunque se trata de una planta probablamente originaria de Europa, no fue empleada como

hortaliza hasta el siglo XVI.

### **2.2.2. Variedades**

En función de la forma de sus raíces, comercialmente se distinguen dos grupos:

- Alargadas: *Larga Roja Virtudes, Larga de Covent Garden, Cylindra, Crapaudine, Cheltenham* (pueden llegar a tener hasta 30-40 cm de longitud).

- Redondeadas o aplastadas :*Roja de Egipto, Roja Globo, Detroit Mejorada, Bikores, Globe-Rondarka, Dwergina, Boltardy, Redpack, Globe-Faro, Detroit-Precoz, Detroit-Nero, Detroit Dark Red, Negra de Egipto raza Emir, Monopoly, Aplastada de Egipto*. Este segundo tipo de remolachas de mesa son las más cultivadas y las más aceptadas con miras a la exportación.

### **2.2.3. Cultivo**

La siembra de la remolacha de mesa se hace desde enero-febrero hasta mediados de otoño en zonas templadas, como es el litoral mediterráneo español, siempre y cuando el régimen de temperaturas bajas no sea muy intenso. El ciclo de cultivo queda cubierto entre 65 y 90 días.

Prefiere climatologías suaves, húmedas, aunque es de adaptación relativamente fácil . La temperatura óptima de germinación es de 25°C, si bien es poco exigente para iniciarla (5-8°C). Durante los primeros estadios de desarrollo resiste muy poco el frío.

En lo referente a suelos puede indicarse lo mismo que se dijo en el caso de la zanahoria, es decir, suelos ligeros, profundos, homogéneos y frescos. La remolacha es una planta altamente resistente a la salinidad.

En términos generales, las remolachas de mesa redondas se cosechan cuando han adquirido un diámetro comprendido entre 3 y 6 cm, aunque ésto es variable según las variedades, el destino a que van dirigidas y las exigencias del mercado. En conjunto las remolachas más apreciadas son las que pesan entre 100 y 300 gramos.

#### **2.2.4. Operaciones postcosecha**

Las remolachas deben ser transportadas lo más rápidamente posible a la central hortofrutícola donde se realizarán las operaciones previas a su comercialización.

Es frecuente que una elevada proporción de remolacha se comercialice ya procesada, mejorando con el procesado su aspecto y presentación así como su facilidad de utilización y consumo. Para obtener productos de buena calidad es recomendable que las remolachas estén recién recolectadas y con madurez adecuada, que no presenten síntomas de reblandecimiento o decoloración y que sean suficientemente tiernas, es decir, es imprescindible partir de materia prima adecuada.

Es aconsejable que estos productos hortícolas sufran, en la medida de lo posible, las operaciones post-cosecha que van a mejorar sus características, concretamente, aquellas partidas de remolacha que no sean procesadas y se destinen directamente al consumo, que es como han sido adquiridas para este estudio.

En las raíces comestibles la operación de limpieza es muy importante, ya que presentan elevadas cantidades de tierra, barro, etc. adheridos a su superficie.

La selección interesa realizarla para eliminar los productos que no satisfagan unas exigencias de calidad mínimas (podredumbres, magulladuras, etc.) para favorecer la comercialización.

No existen normas oficiales para clasificar las remolachas, pero puede realizarse según criterios aceptados por los operadores de mercado. Además se podría recurrir al Decreto 2257/1972, disposición general que regula la normalización de productos agrícolas en el

mercado interior.

La conservación a 0°C y 90-95% de humedad relativa permite mantener en buenas condiciones la remolacha de mesa durante uno a tres meses. En el almacenamiento deben evitarse aglomeraciones de raíces, prefiriéndose los embalajes planos que permiten una buena circulación de aire.

### **2.2.5. Producción y consumo**

La superficie y producción de este cultivo ha sufrido altibajos desde 1968, pero se observa cierta tendencia a su mantenimiento.

La producción nacional asciende a 20.272 Tm. Dentro de las comunidades autónomas destaca la producción de Andalucía (10.236 Tm), siendo la principal productora Cádiz (5.420 Tm). También es importante la producción de la Comunidad Valenciana (4.523 Tm), estando en cabeza la provincia de Valencia (3.774 Tm) (Anuario de estadística agraria, 1990).

## **2.3. NABO**

### **2.3.1. Características morfológicas de la planta**

Se cree que el origen de esta especie se localiza en Europa o Asia Central. Pertenece a la familia *Cruciferae* y su nombre científico es *Brassica napus* L.

Es una planta bianual, con hojas normalmente hendidas y de márgenes festoneados. El tallo floral es liso y las flores son de color amarillo. La fructificación es en silicuas y las semillas son redondeadas de color rojizo oscuro. Su capacidad germinativa media es de cuatro años.

Su sistema radicular está engrosado, existiendo dos tipos varietales distintos, unos globulosos y otros alargados. Su coloración varía entre el blanco y el rojo.

### **2.3.2. Variedades**

-De estructura radicular alargada: *Virtudes*, *Virtudes-Martillo*, *Fuencarral*, *Nantais*, *Semilargo de Croissy* raza *Paros*, *Nantés* raza *Candía*.

-De estructura radicular redondeada: *Bola de Nive*, *Rojo de Milán*, *Bola de oro*, *Just Right* (híbrido) *De Nancy*, *Shogoin*, *Supertop Bency*, *Pingpong* (híbrido japonés de color muy blanco).

En la agrupación varietal debe señalarse que cada cultivar muestra una determinada adaptación a su producción, en los meses más cálidos y en los más fríos.

### **2.3.3. Cultivo**

La siembra se hace normalmente entre julio y octubre, para recolecciones otoñales e invernales, y entre marzo y abril para recolectar en verano. El ciclo de cultivo varía entre 40 y 100 días.

Requiere un clima fresco y húmedo. El calor estival afecta negativamente a este cultivo. Es una planta exigente en agua. Existen variedades que pueden soportar heladas ligeras.

En cuanto al suelo, este cultivo prefiere terrenos de textura media con una buena retención del agua, siempre que estén bien drenados. Su pH óptimo está entre 6,5 y 7.

La recolección puede realizarse de forma manual o mecánica, dependiendo de la extensión de cultivo necesaria para rentabilizar la mecanización.

### **2.3.4. Operaciones postcosecha**

Los nabos cosechados son transportados a las centrales hortofrutícolas en donde se realizarán

las funciones de recepción, clasificación y embalajes.

No existe una normativa que clasifique las distintas partidas de nabos en lotes homogéneos, según factores de aspecto y presentación, por lo que estas operaciones se acogerán a los criterios del Decreto 2257/1972, de aplicación a todos los productos agrícolas con el fin de prepararlos adecuadamente para su expedición a los centros consumidores.

Una vez realizada la recolección las raíces se deshojan, se lacan, se trían y se calibran, pudiéndose comercializar en manojos, cajas o sacos.

El almacenamiento frigorífico a 0°C y una humedad relativa del 90-95% puede permitir una conservación adecuada durante cuatro-cinco meses.

#### **2.3.5. Producción y consumo**

La producción de esta hortaliza se ha multiplicado en los últimos años por 3,5. La producción nacional es de 20.272 Tm. Por comunidades autónomas la más elevada corresponde a Andalucía (8.016 Tm), en la que destaca Málaga (3.380 Tm). Otros productores importantes son la Comunidad Valenciana (1.557 Tm) y Cataluña (2.951 Tm) cuya principal provincia productora es Barcelona (1.097 Tm) (Anuario de estadística agraria, 1990).

#### **2.4. ASPECTOS HISTOLOGICOS DE LA RAIZ**

Las hortalizas podrían clasificarse según la parte del vegetal que se destine al consumo humano fundamentalmente en: hojas, tallos, raíces y frutos. Dado que los materiales vegetales objeto de este estudio son raíces, a continuación se repasan las características generales de estos órganos comestibles.

La raíz es la parte subterránea de la planta. Su función es, por una parte, la absorción de agua y sales minerales, y, por otra, la fijación de la planta al suelo. La mayoría de las raíces

también representan una importante zona de reserva nutritiva para la planta (Cortés, 1990).

Desde el punto de vista histológico, el tallo y la raíz de las plantas pueden tener tejidos primarios y/o secundarios. Los tejidos primarios son aquellos que se forman a partir de los meristemos primarios (sus células derivan directamente de las embrionarias), mientras que los tejidos secundarios derivan de los meristemos secundarios; estos últimos son tejidos jóvenes presentes en el vegetal adulto que recuperan su capacidad de crecimiento cuando la planta, por causas fisiológicas o patológicas, lo necesita.

Todos los vegetales presentan crecimiento primario pero no obligatoriamente crecimiento secundario.

#### **2.4.1. Estructura primaria**

En las raíces de crecimiento primario, y en las zonas de las raíces relativamente próximas a las células meristemáticas radicales, se pueden distinguir las siguientes regiones: la cofia, la epidermis, el córtex ó corteza y el cilindro vascular ó central (Esau, 1977; Raven y col. 1992) (Esau, 1977; Raven y col., 1991) (Figuras nº 1 y 2).

##### **- Cofia o caliptra**

Está constituida por células parenquimáticas. Su función es proteger al meristemo radical y también facilitar la penetración de la raíz en el suelo durante su crecimiento.

##### **- Epidermis**

Está constituida por células de paredes delgadas y forma alargada, dispuestas de manera muy compacta.

Generalmente es monoestratificada. Lo más característico de la epidermis de la raíz es la

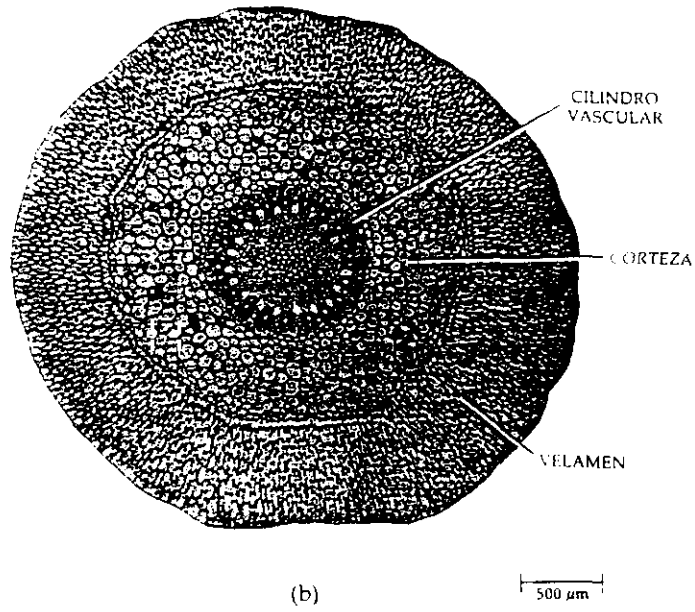


Figura n°1.- Sección transversal de una raíz primaria (Raven y col., 1991)

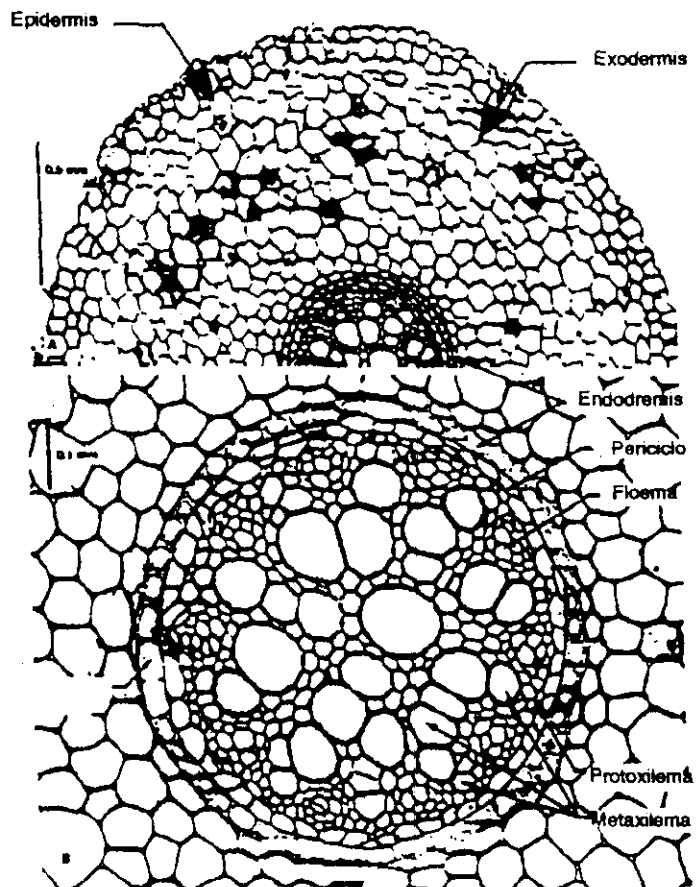


Figura n°2.- Sección transversal de una raíz primaria (Esau, 1977).

formación de pelos radicales. Se suelen situar próximos al ápice, y su función fundamental es incrementar la superficie de absorción de la raíz.

Generalmente no existe cutícula recubriendo a dicha epidermis, aunque, a veces, las paredes más externas, incluyendo las de los pelos radicales, experimentan cutinización.

A veces, en las zonas expuestas al aire o en aquellas zonas en las que la epidermis persiste largo tiempo, las paredes más externas se engruesan y pueden presentar lignina o sustancias de color oscuro que, todavía, no se han identificado totalmente.

#### - Córtex ó corteza

El córtex es la zona que se encuentra debajo de la epidermis; suele ser la principal zona de reserva de la planta.

En general, en la mayoría de las gimnospermas y dicotiledóneas, dicho córtex está formado principalmente por células parenquimáticas, generalmente de reserva. Se pueden distinguir dentro del córtex las siguientes zonas:

+ *Exodermis*: En muchas plantas las paredes de las células más externas del córtex, situadas en la zona subepidérmica, se suberizan y constituyen la exodermis.

Por sus características estructurales y citoquímicas la exodermis se puede considerar un tejido protector. Las paredes de las células de la exodermis pueden presentar lignina y/o suberina, pero sus protoplastos son viables. La exodermis puede estar constituida por una o varias capas de células.

+ *Endodermis*: La capa más interna del córtex es la endodermis. Es una capa que se presenta en todas las plantas vasculares; suele ser uniseriada (constituida por una única capa de células).

En las células de las capas endodérmicas jóvenes se observa sobre las paredes anticlinales la

banda de Caspary. Dicha banda es un engrosamiento de la pared celular constituido por suberina y, según algunos autores, también por lignina (Fahn, 1985).

En la región de pared correspondiente a la banda de Caspary no se observan plasmodesmos, en contraposición con lo que ocurre en el resto de la pared de estas células donde suelen ser abundantes. El plasmalema de la célula endodérmica está íntimamente unido a dicha banda ya que no se separa de ella cuando la célula es sometida a algún tipo de tratamiento (Peterson, 1987).

Generalmente las paredes de las células con banda de Caspary van sufriendo depósitos sucesivos de celulosa y suberina e incluso, en algunos casos, también pueden lignificarse. Estas modificaciones no se realizan simultáneamente en todas las células endodérmicas. En las primeras fases de diferenciación celular, la formación de las bandas de Caspary se inicia en las zonas próximas al floema y se va extendiendo hasta las cercanías del xilema. Las células endodérmicas próximas al xilema pueden tener sólo banda de Caspary, y se denominan células de paso porque permiten el paso de sustancias entre el cilindro vascular y el córtex (Fahn, 1985).

#### - Cilindro vascular.

Ocupa la zona central de la raíz. A veces se le denomina médula. El cilindro vascular está constituido por: el periciclo, los tejidos vasculares y el parénquima.

+ *Periciclo*: Está constituido por una ó varias capas de células parenquimáticas que se sitúan entre la endodermis y los tejidos vasculares. Conserva la capacidad de crecimiento meristemático y origina los primordios de las raíces laterales y parte del cambium y del felógeno en las raíces con crecimiento secundario.

+ *Tejidos vasculares*: En el cuerpo primario de la raíz, la cara interna del periciclo bordea los cordones de floema y xilema.

El tejido vascular primario es el primero que aparece. Empieza a funcionar cuando la planta

es joven y luego crece y se desarrolla hasta alcanzar un estado definitivo cuando la planta es adulta.

El floema está en forma aislada en la periferia del cilindro vascular. Se dispone en forma de haces o cordones por dentro del periciclo.

El xilema puede formar un cuerpo central, que presenta en muchas plantas una apariencia estrellada en cortes transversales o bien disponerse en forma de cordones que alternan con haces floemáticos, observándose en algunos casos una médula parenquimática o esclerenquimática especialmente en muchas monocotiledóneas (Fahn, 1985).

La raíz presenta generalmente un xilema y floema exarco, es decir, que sus primeros elementos maduran en la parte externa del cilindro vascular. El protoxilema en la raíz está, por ello, localizado periféricamente en el cilindro vascular, mientras que el metaxilema, con sus elementos conductores de mayor calibre, se encuentra en el interior. En el floema la diferenciación también es centripeta.

Según el número de cordones xilemáticos que aparecen dispuestos radialmente se dice que la raíz es diarca (ej. géneros *Nicotiana*, *Daucus*, *Beta*, ...), triarca (*Pisum*, *Ervum*), tetraarca (*Vicia*, *Phaseolus* ..) poliarca ( monocotiledóneas) (Esau, 1977) (Figura nº 3).

Los elementos traqueales del sistema se hallan normalmente comunicados entre sí por anastomosis laterales. En las raíces que presentan médula es posible encontrar también conexiones laterales entre grupos de floema (Cortés, 1990).

En las raíces de la mayoría de las plantas, el floema no tiene fibras (células muy lignificadas que forman parte del tejido de sostén: esclerenquima).

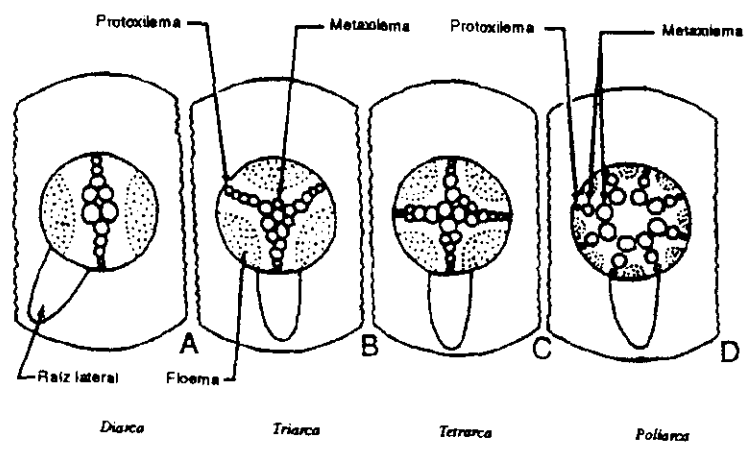


Figura n<sup>o</sup>3.- Disposición de los cordones de xilema (Esau, 1977).

+ *parénquima* En cuanto al parénquima, sus células se encuentran asociadas a los elementos conductores tanto del xilema como del floema. En muchas raíces maduras, que no experimentan crecimiento secundario, tiene lugar una esclerificación de dicho parénquima asociado a los tejidos vasculares primarios. Suele recibir el nombre de parénquima medular por estar situado en la médula de la raíz.

#### **2.4.2. Estructura secundaria**

Durante el crecimiento secundario se desarrolla un cambium vascular (que da origen a los tejidos conductores secundarios de la raíz) y un cambium suberoso o felógeno (que origina la peridermis o tejido protector correspondiente).

No todas las plantas presentan este tipo de crecimiento, así las criptógamas vasculares y la mayoría de las monocotiledóneas no lo tienen.

En la raíz, el cambium vascular se origina normalmente a partir de células del procambium que permanecen indiferenciadas entre el floema y el xilema primarios. Seguidamente también dan lugar a cambium las células del periciclo adyacente a los polos (parte más periférica del protoxilema).

Este cambium se añade a las bandas ya existentes y se forma así un tejido continuo. En este estado, el cambium no es cilíndrico sino lobulado, siguiendo el contorno del xilema primario.

El cambium vascular que tuvo su origen a partir de células del procambium que habían permanecido indiferenciadas en el límite interno del floema, comienza primero su actividad, formándose xilema secundario hacia el interior, hasta que el cambium aparece en forma circular en sección transversal (es desplazado hacia afuera por el xilema secundario formado). Continúa entonces el cambium dividiéndose y produce floema secundario hacia el exterior de la raíz y más xilema secundario hacia el interior de la misma. Como resultado los tejidos conductores secundarios de la raíz se disponen formando cilindros concéntricos (Figura n<sup>o</sup>4).

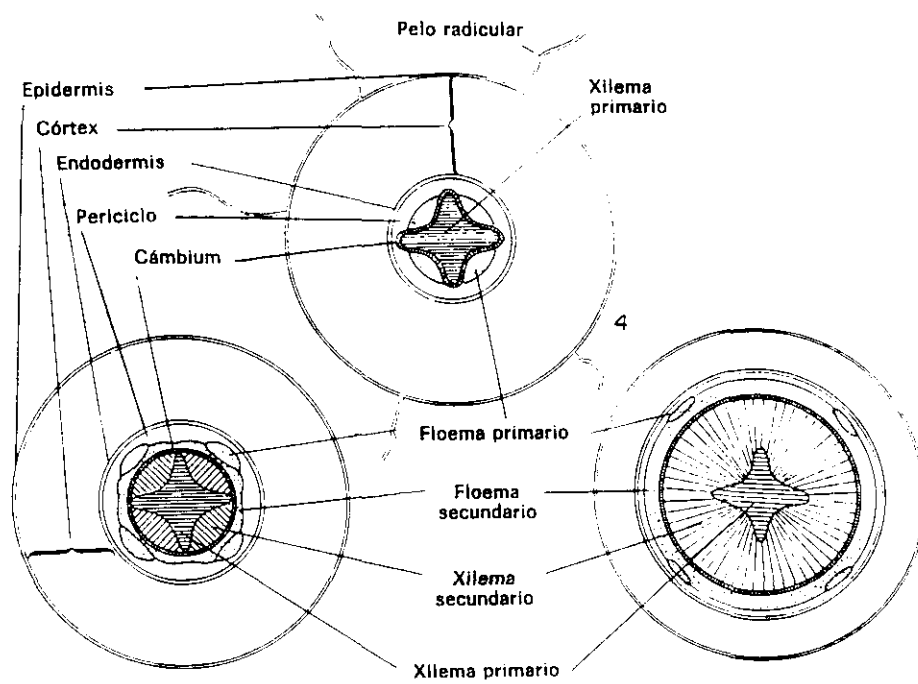


Figura n°4.- Sucesivas etapas del engrosamiento secundario (Fahn, 1985).

La producción de peridermis tiene lugar después de haber comenzado la producción de los tejidos vasculares secundarios. Son las células del periciclo, también, las que mediante activas divisiones periclinales, producen el felógeno o cambium suberoso de la raíz.

Consiste el mismo en un cilindro de tejido, que funcionando de manera similar al cambium vascular, origina súber hacia el exterior de la raíz y, felodermis o córtex secundario hacia el interior de la misma, para originar un conjunto de tejidos que constituyen la peridermis; asimismo los tejidos que se encuentran exteriormente al súber (endodermis, resto del córtex y epidermis) terminan desprendiéndose.

#### - Crecimiento secundario anómalo

En algunos casos el crecimiento secundario no ocurre como se ha descrito. A veces la diferencia consiste simplemente en que en el xilema y el floema se presenta una gran cantidad de parénquima, como ocurre en algunas raíces de reserva (género *Daucus*, por ejemplo), siendo por lo demás el crecimiento secundario normal.

En otros casos se forman varios cambiums adicionales dispuestos concéntricamente por fuera del cilindro vascular, a partir del periciclo y el floema (género *Beta*, por ejemplo). Cada uno de los meristemas produce una cierta cantidad de floema hacia el exterior y xilema hacia el interior de la raíz. También se presenta en estos casos gran cantidad de parénquima de reserva.

#### **2.4.3. Estructura de las raíces de almacenamiento**

Las raíces objeto de este estudio son todas raíces de almacenamiento. Es decir, raíces que además de la función normal de reserva radical, se desarrollan formando órganos gruesos y carnosos que funcionan principalmente como órganos de almacenamiento. El origen de estas estructuras de almacenamiento puede ser diferente.

#### 2.4.3.1. Zanahoria

El hipocotilo y la raíz axonomorfa se engruesan, y al desarrollarse la peridermis se desprende el córtex. Como consecuencia del desarrollo excesivo del parénquima el órgano se hace carnoso.

La zanahoria es una raíz diarca. En un corte transversal de una raíz joven filiforme se puede observar la estructura típica con los haces alternantes de xilema y floema. El cilindro central está limitado por el periciclo que se encuentra rodeado por una endodermis sin engrosamientos lignificados visibles. Esta raíz joven también presenta parénquima cortical y epidermis pilífera. A medida que la raíz crece se activa el cambium que genera los tejidos conductores secundarios; estos xilema y floema secundarios se intercalan entre los haces vasculares primarios. El periciclo aumenta su grosor y comienza a formarse la peridermis. El origen de este nuevo tejido conlleva la exfoliación de los tejidos externos, es decir, la endodermis, el parénquima cortical y la epidermis inicial. Las características anatómicas generales de la raíz de zanahoria ya desarrollada se pueden observar en la figura nº 5 (Géneves, 1962). Las paredes de las células superficiales están ligeramente suberificadas (capa superficial peridérmica). A continuación se encuentra el parénquima de células grandes, a menudo alargadas tangencialmente. El parénquima y la capa externa son de naturaleza pericíclica.

El floema está repartido en haces separados entre sí por anchos radios de células parenquimáticas. Todas estas células están alineadas próximas al cambium y de forma menos nítida cuanto más se aleja del meristemo; estas células constituyen un tejido de naturaleza secundaria. El cambium comprende numerosas capas de células dispuestas regularmente en filas radiales. No tiene el mismo espesor en las diferentes filas. Sobre la cara interna produce tejidos de xilema relativamente poco lignificados y parénquima que se dispone a modo de radios a continuación de los radios parenquimáticos del floema.

Por tanto, los vasos, de pequeño diámetro, están dispuestos en filas radiales más ó menos largas. Están incluidos en un parénquima secundario muy abundante, con paredes celulares finas celulósicas. Los tejidos lignificados son, pues, relativamente reducidos en la zanahoria joven.

# ZANAHORIA

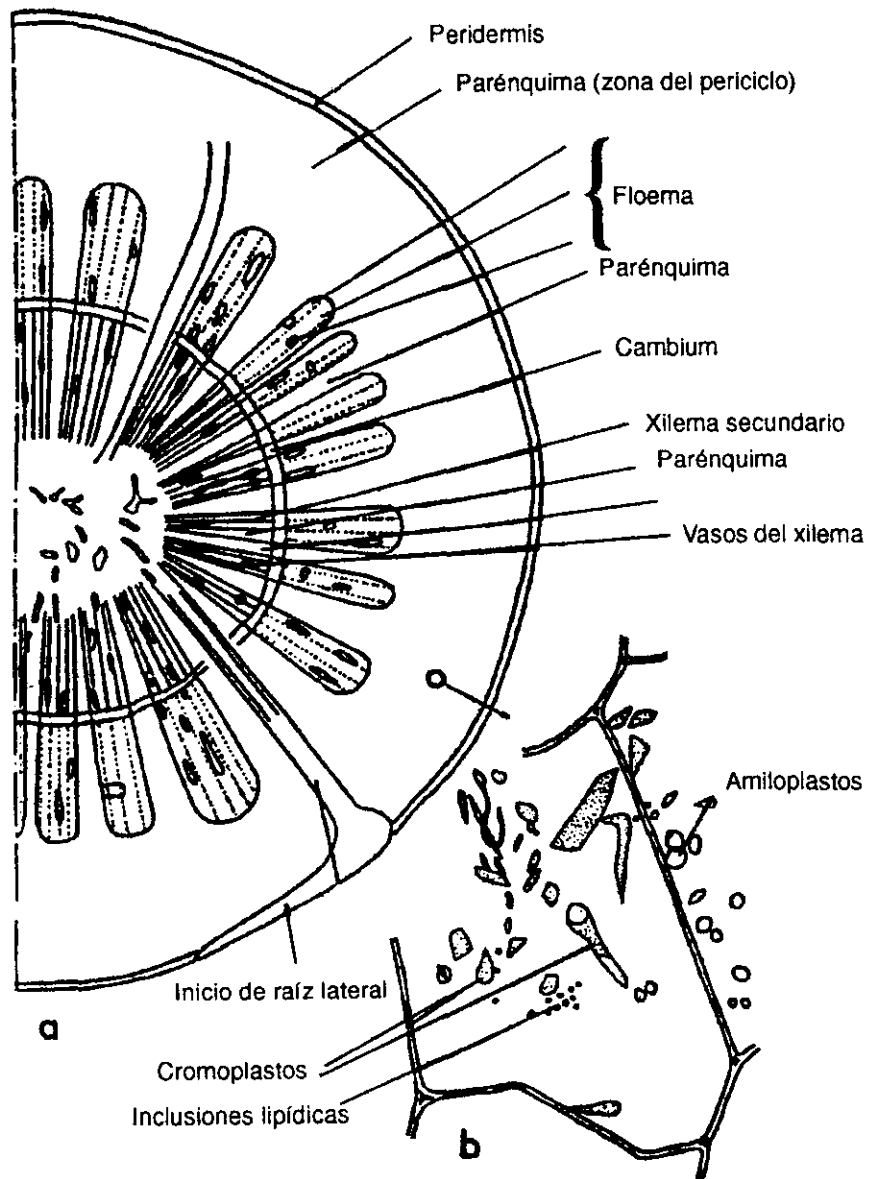


Figura n° 5.- Estructura de la raíz de la zanahoria (Géneves, 1962)

Las células parenquimáticas (Figura nº 5) tienen paredes finas celulósicas. Contienen amiloplastos, inclusiones lipídicas y cromoplastos donde se sitúan los carotenos responsables del color naranja típico de la raíz de zanahoria.

#### **2.4.3.2. Remolacha**

En la remolacha el hipocotilo y la raíz se hacen carnosos como resultado de un crecimiento secundario en grosor anómalo, típico de *Chenopodiaceae*. Al activarse diferentes tejidos cambiales, se van formando capas de tejido secundario y parénquima donde se van repartiendo los tejidos conductores. El azúcar, en esta remolacha, es sustancia de reserva en las células del parénquima secundario.

En un corte transversal de una raíz de remolacha joven todavía poco tuberizada se pueden observar los siguientes tejidos:

En el cilindro central se sitúan dos pequeños haces vasculares primarios con diferenciación centrípeta, rodeados completamente por células de parénquima celulósicas e incluso lignificadas. El cambium responsable de la formación de los tejidos conductores secundarios se sitúa alrededor de estos haces vasculares primarios, como en el resto de las raíces de plantas dicotiledóneas.

A continuación se puede observar una corona de xilema secundario con vasos de gran diámetro, asociados a células parenquimáticas dispuestas en forma radial. El cambium muestra algunas capas de células dispuestas en filas radiales. A continuación, hacia el exterior, se ha formado el floema secundario igualmente dispuesto en círculo concéntrico.

Cuando la raíz es joven no posee otros tejidos conductores a ese nivel; una zona pericíclica la rodea. Al desarrollarse, el crecimiento secundario anómalo determina la formación de un nuevo cambium, mientras que el primero funcionaba todavía.

Este nuevo cambium forma nuevos haces vasculares de xilema y floema también en

disposición concéntrica, pero que, a diferencia de los precedentes, se encuentran aislados los unos de los otros (Esau, 1982) (Figura nº 6). Este cambium también ha producido radios parenquimáticos interfasciculares. Cada uno de los nuevos haces comprende un haz de xilema centrífugo, sobre la cara interna y un haz de floema sobre la zona cambial. Es importante señalar el pequeño número de vasos con pared lignificada y la gran abundancia de parénquima celulósico que forma el haz vascular.

El cambium nuevo, constituido en la región media del periciclo, ha dejado en el interior algunas capas de células pericíclicas. Estas han proliferado al mismo tiempo que funcionaba el nuevo cambium, y han originado unas capas de parénquima que separan los nuevos haces vasculares de los precedentes. La parte periférica del periciclo se ha dividido igualmente y se ha hecho más gruesa. De esta forma se han originado círculos concéntricos sobre los cuales se disponen haces conductores, derivados del funcionamiento del cambium supernumerario. Las zonas meristemáticas cambiales son tanto más numerosas cuanto más tuberizada está la raíz.

Por otra parte, durante este crecimiento secundario de la raíz de remolacha, en la zona externa de los haces vasculares periféricos (en la corteza de la raíz) se activa el cambium suberoso o felógeno. Al dividirse las células de este meristemo originan la peridermis, constituida por la felodermis que separa al felógeno del parénquima pericíclico, y por varias capas de células suberificadas en filas radiales que forman el corcho o súber el cual limita exteriormente el órgano.

A veces, a partir de las células felodérmicas, se puede recuperar la actividad meristemática; el comportamiento es similar al de los cambiums supernumerarios precedentes y se pueden formar nuevos haces vasculares que quedarían separados por radios parenquimáticos.

En consecuencia, la raíz de remolacha posee parénquimas abundantes ricos en reservas glucídicas, representadas esencialmente por sacarosa en solución en el jugo vacuolar. Las vacuolas de la remolacha roja contienen además pigmentos antociánicos.

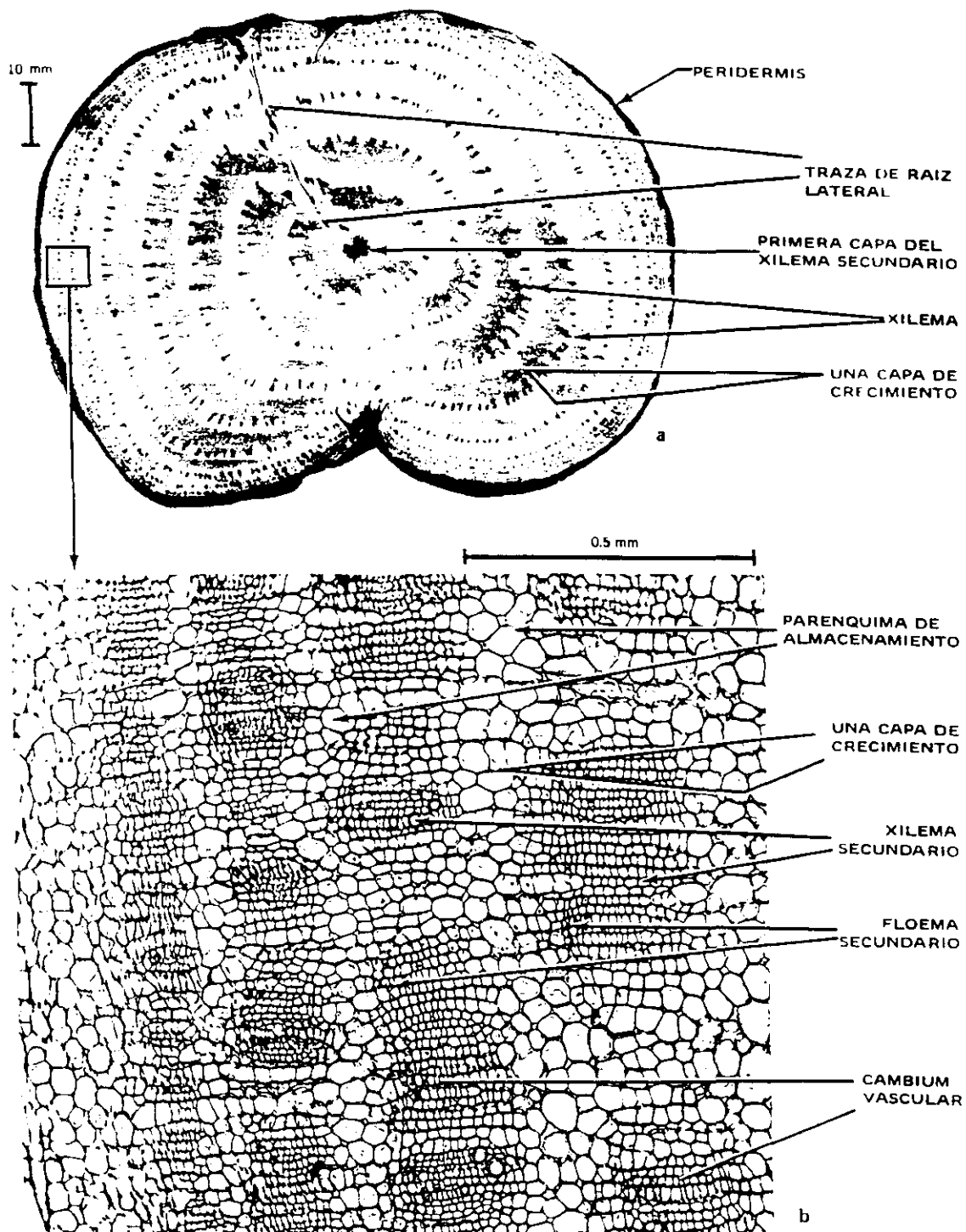


Figura n°6.- Estructura de la raíz de remolacha (Esau, 1982).

### 2.4.3.3. Nabo

Al igual que la zanahoria y la remolacha también es una raíz en la que la parte carnosa está especializada como órgano de almacenamiento.

En la familia *Brassicaceae*, el crecimiento secundario anómalo que determina el carácter de almacenamiento de la raíz consiste en la aparición de un cambium anómalo: en el cilindro central el parénquima medular situado entre los vasos de xilema se incrementa. Posteriormente, en el crecimiento secundario, además de los meristemos normales, en este parénquima también aparece otro cambium que origina tejido vascular y nuevas células parenquimáticas (Figura nº 7).

Un carácter común a las tres raíces objeto de estudio es la presencia de gran cantidad de parénquima de reserva intercalado con tejidos vasculares. Esta asociación entre los tejidos conductores y de almacenamiento deriva de las distintas formas de desarrollo anómalo del crecimiento secundario (Esau, 1982).

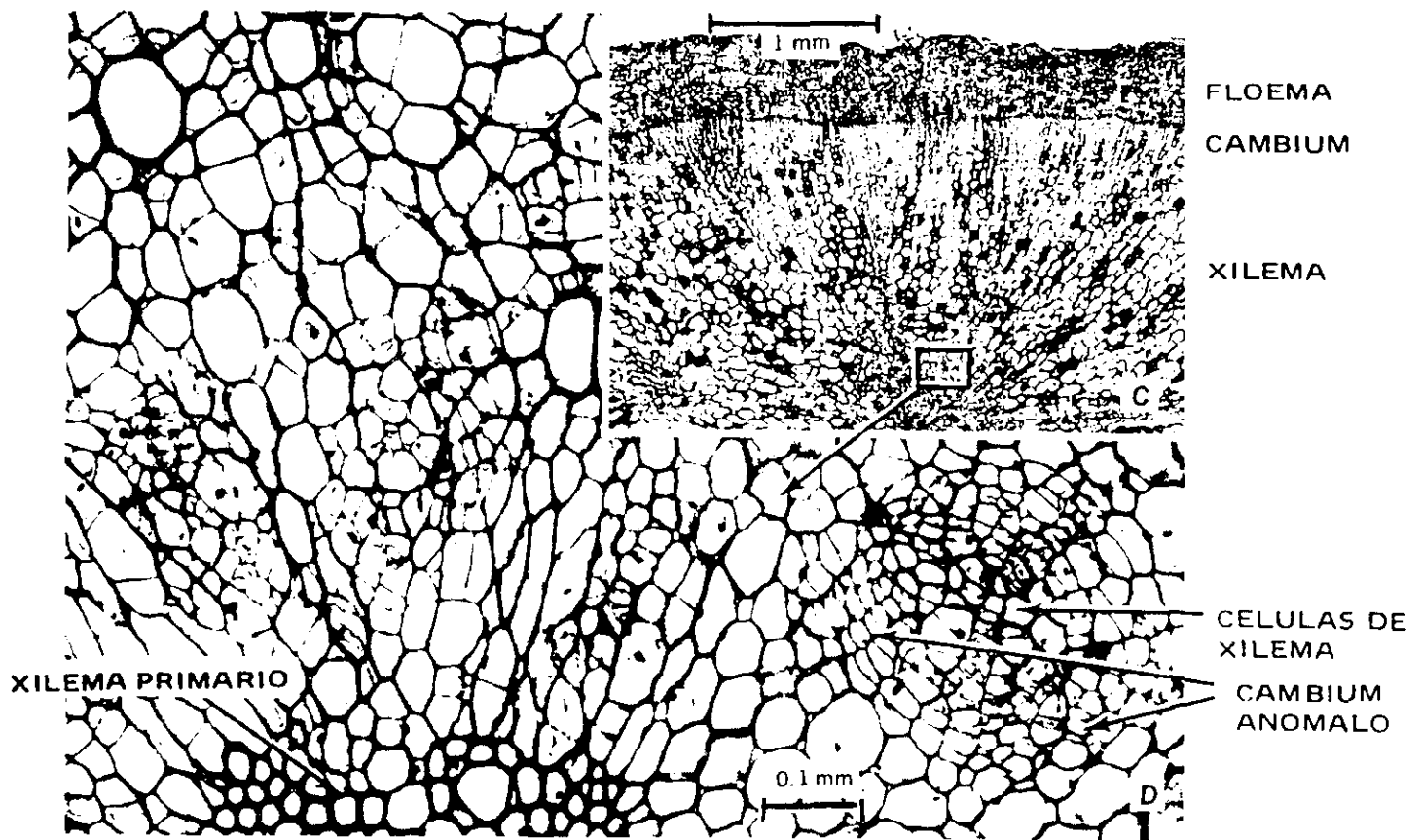


Figura nº7.- Estructura de la raíz de *Brassicaceae* (Esau, 1982).

### **3. ESTUDIO DE LA PARED CELULAR VEGETAL**

La química fundamental de la fibra alimentaria reside en la estructura de la pared celular (Carpita, 1990). Esta pared es una capa gruesa y consistente que rodea a la membrana plasmática de las células vegetales. Fue la primera estructura celular detectada según Carpita (1990) y, a pesar del tiempo transcurrido, aún hoy día no se conoce con exactitud.

La pared celular está constituida mayoritariamente por polisacáridos y proteínas, íntimamente asociados y entrelazados formando un complejo entramado reticular responsable de las propiedades morfológicas y mecánicas de la célula vegetal.

#### **3.1. CARACTERISTICAS GENERALES**

La pared celular es una de las particularidades que diferencia a los organismos vegetales de los animales. Sus características generales se pueden resumir de la siguiente forma:

- Presenta una estructura muy organizada que confiere rigidez y fuerza, considerándose como el exoesqueleto que proporciona el sostén mecánico que el vegetal necesita.

- Ejerce una función protectora frente al medio ambiente (desección, agentes extraños...), actuando como una barrera.

- Aísla y al mismo tiempo comunica unas células con otras mediante los plasmodesmos que permiten el paso de determinadas sustancias sin ejercer un control activo sobre este transporte.

- El desarrollo de la pared está íntima y recíprocamente relacionado con el de la célula vegetal. Sus componentes se sintetizan en el interior celular y la pared se va secretando desde el hialoplasma hacia el exterior. Los procesos de crecimiento y diferenciación celulares son, en elevada proporción, consecuencia de la síntesis y organización de la pared celular.

Hoy día se pueden distinguir en la pared tres partes, desde el exterior hacia el interior:

- Lámina media.
- Pared primaria.
- Pared secundaria.

En la figuras nº 8 y 9 se reproducen diferentes representaciones de la disposición de las distintas partes de la pared celular.

### 3.2. ONTOGENIA.

La pared celular se forma en la etapa final del proceso de división celular, durante la división del citoplasma. Los trabajos llevados a cabo por microscopía electrónica indican que las vesículas del aparato de Golgi, formadas por los dictiosomas y dirigidas por los microtúbulos, se funden en la zona ecuatorial de la célula en división constituyendo la placa celular, que es el primer tabique de separación que se forma entre las dos células hijas. Esta placa no es continua, está atravesada por canales de retículo endoplásmico que en la pared celular desarrollada constituirán los plasmodesmos, estructuras que permiten la comunicación entre las células adyacentes. El contenido de las vesículas de Golgi, principalmente pectinas, origina la lámina media y sus membranas constituyen la nueva membrana celular o plasmalema. El proceso continúa hasta que la lámina media nueva se introduce en las paredes celulares existentes en la célula madre y llega a establecer contacto con la lámina media que ya existía alrededor de la célula madre. Entre la lámina media y el plasmalema cada célula forma de inmediato su pared primaria. El esquema de las diferentes fases de este proceso de formación de la pared celular se representa en la figura nº 10.

Una vez formada la lámina media empiezan a depositarse a ambos lados de la misma hemicelulosas y también algo de celulosa, segregadas por las dos células hijas contiguas que están separadas por aquella, formándose la pared celular primaria. Esta pared es extensible y puede adaptarse al aumento de tamaño de la célula en crecimiento. Cuando la célula ha dejado de crecer pueden empezar a depositarse sobre la pared primaria, hacia el interior de

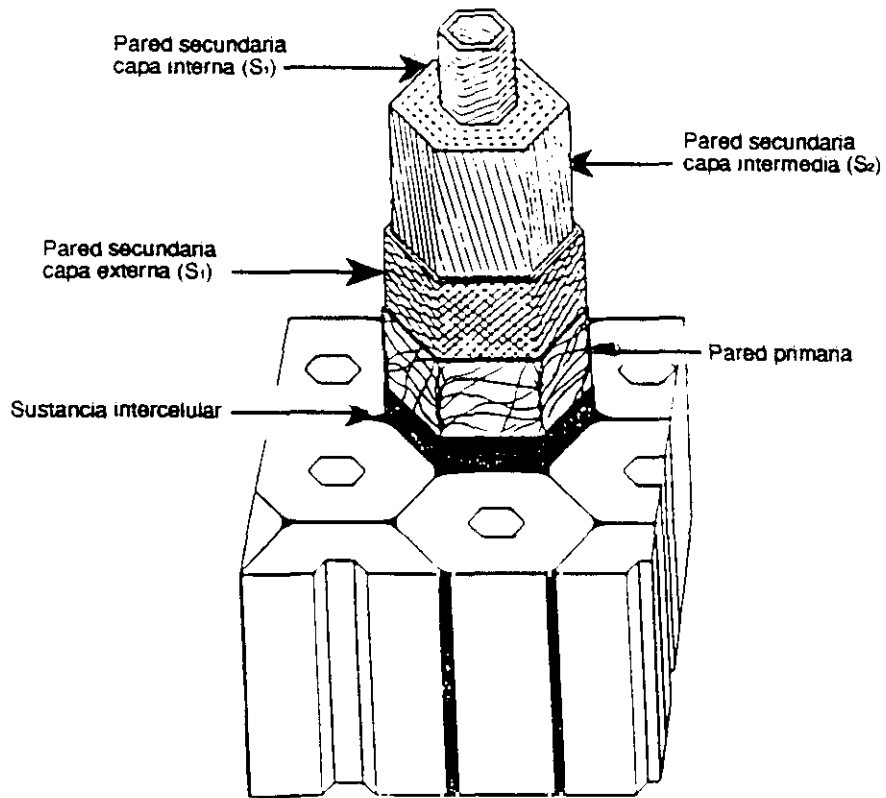


Figura n<sup>o</sup>8.- Estructura de la pared celular (Barceló y col., 1992).

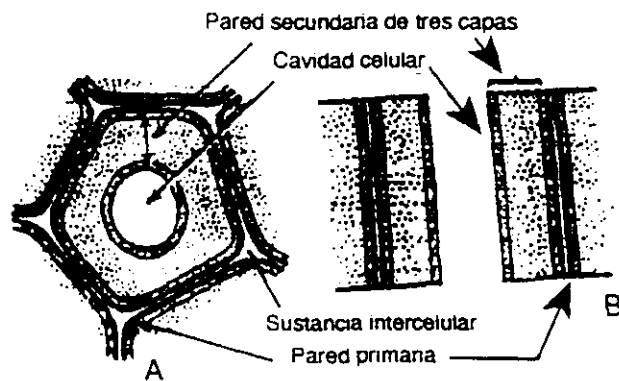


Figura n<sup>o</sup>9.- Esquema de la pared de la célula vegetal (Esau, 1972).

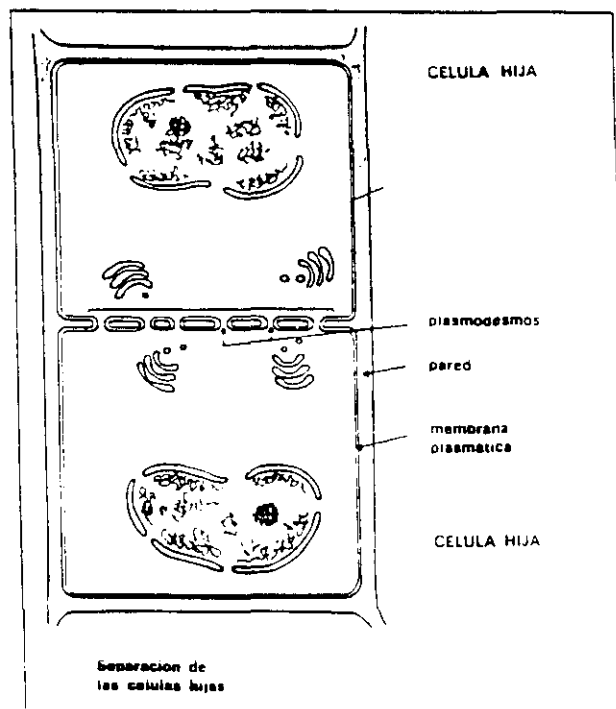
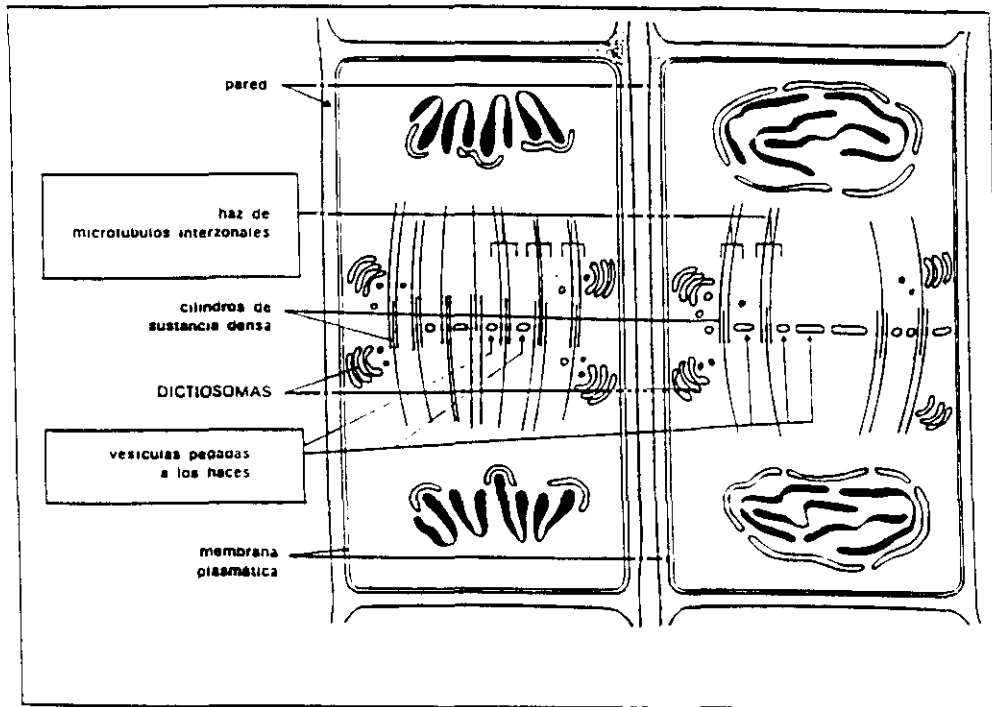


Figura nº 10.- Formación de la pared celular (Berkaloff y col., 1982).

la célula, fibras de celulosa que van cambiando su orientación hasta constituir un verdadero entramado que forma la pared secundaria, responsable directa de la rigidez de la pared celular.

### **3.3. COMPOSICION QUIMICA DE LA PARED CELULAR**

Los componentes de la pared celular se pueden clasificar en tres grupos:

Polisacáridos estructurales:

- celulosa
- hemicelulosas
- sustancias pécticas

Glicoproteínas:

- estructurales
- enzimáticas

Otros componentes:

- lignina
- cutina
- suberina
- ceras
- taninos
- sales minerales

#### **3.3.1. Polisacáridos estructurales**

##### **3.3.1.1. Celulosa**

Es el polisacárido estructural más abundante de los vegetales, localizándose en la pared primaria y sobre todo en la secundaria. Está formada por cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. El grado de polimerización de la celulosa oscila entre 8.000 y

14.000 unidades (Barceló y col., 1992), lo que supone una longitud de cadena de 40.000 Å a 60.000 Å y un peso molecular superior a 1.000.000. La variación en el grado de polimerización, así como en la complejidad y estabilidad de la estructura, dependen de la fase de desarrollo de las paredes primaria y secundaria.

Los grupos hidroxilo de las unidades de glucosa favorecen la formación de numerosos puentes de hidrógeno, intra e intermoleculares, que estabilizan la estructura. Así, las cadenas de celulosa se disponen de forma paralela, asociándose intermolecularmente mediante puentes de hidrógeno, establecidos entre el hidrógeno del grupo -OH del C<sub>3</sub> y los puentes de oxígeno de las moléculas de glucosa adyacentes, y entre los grupos -OH del C<sub>6</sub> y los oxígenos glicosídicos de las cadenas adyacentes (Figura nº 11). Las cadenas de celulosa, debido a su configuración molecular, tienden a agregarse, y, en función del número de cadenas que se asocien, se denominan de la siguiente manera:

- Fibrilla elemental o micela: formada por treinta y dos cadenas de celulosa. Mide entre 3,5 y 7,5 nm de espesor y tiene una longitud de varios  $\mu\text{m}$ . No puede ser observada al microscopio óptico. En las fibrillas elementales las moléculas de celulosa están orientadas longitudinalmente, formando un agregado cristalino fuertemente ordenado, en el que todas las moléculas presentan la misma polaridad, esto es, tienen su extremo reductor orientado hacia el mismo extremo de la microfibrilla.

- Microfibrilla: está formada por veinte fibrillas elementales. Es discernible al microscopio electrónico. En este estado se encuentra la celulosa en la pared primaria.

- Macrofibrilla o fibrilla: formada por doscientas cincuenta microfibrillas y visible al microscopio óptico.

- Fibra: formada por, aproximadamente, mil quinientas fibrillas. Constituye la estructura macromolecular de la pared celular.

La disposición de estos componentes puede apreciarse en la figura nº 12. La celulosa se presenta en la pared celular vegetal en forma de agregados fibrilares cristalinos que confieren a la pared la mayor parte de su resistencia, si bien a lo largo de su estructura existen también

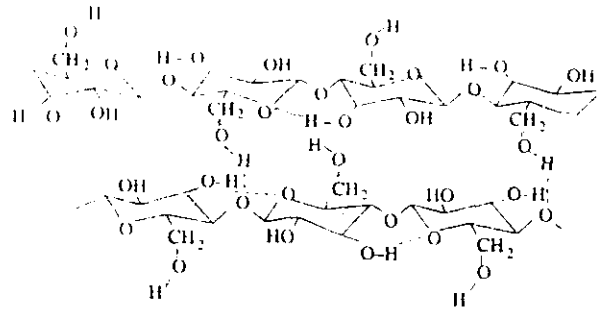


Figura n°11.- Estructura de la celulosa (Barceló, 1992).

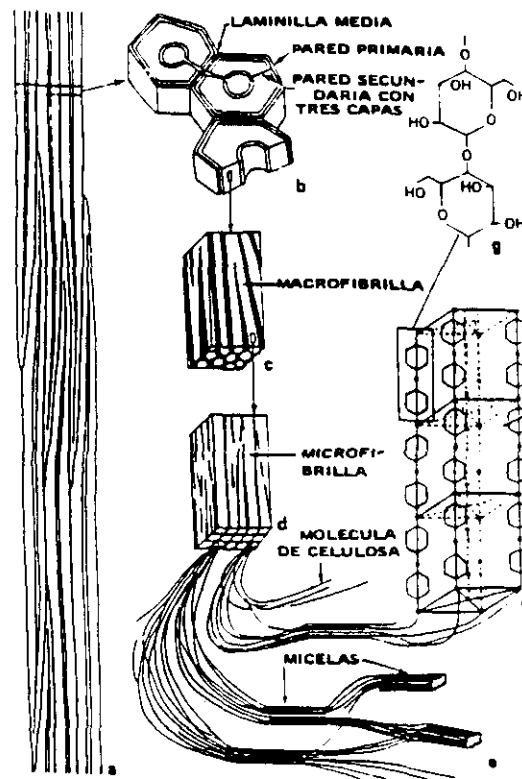


Figura n°12.- Estructura detallada de las paredes celulares (Esau, 1976)

- (a) Cordón de fibras
- (b) Corte transversal de capas
- (c) Fragmento de la capa media de la pared secundaria mostrando las macrofibrillas (blanco) y los espacios interfibrilares (en negro)
- (d) Fragmento de una macrofibrilla mostrando las microfibrillas (en blanco)
- (e) Micelas
- (f) Fragmento de una micela
- (g) Fragmento de una molécula de celulosa

regiones no cristalinas. La susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis, tanto ácida como enzimática, parece estar relacionada con la extensión de regiones no cristalinas con bajo grado de ordenamiento ( Southgate, 1969; Cummings, 1981).

### 3.3.1.2. Hemicelulosas

Se agrupan bajo esta denominación polisacáridos de estructura compleja y diferente composición química, que por hidrólisis generan pentosas, hexosas y ácidos urónicos.

Aunque su clasificación es difícil, el criterio más generalizado se basa en el residuo monomérico predominante. De esta manera se hablaría de xilanos, arabinoxilanos, glucoarabinoxilanos, glucuronoxilanos, galactomananos, glucomananos, galactoglucomananos, xiloglucanos ... (Theander, 1981). Si se atiende a las propiedades químicas, entonces, se tendrían: hemicelulosas A que precipitan con ácido acético y hemicelulosas B que precipitan con etanol (Southgate, 1969). En general se puede decir que son solubles en álcali pero no en agua.

Todas las hemicelulosas poseen dos características estructurales comunes:

-Son polímeros que presentan una cadena principal plana de azúcares, unidos casi siempre mediante enlaces  $\beta$ -1,4 de la que pueden salir un número variable de ramificaciones laterales cortas (Southgate, 1969; Barceló y col., 1992); respecto al grado de ramificación hay diferencias según los distintos autores (Theander, 1981; Barceló y col., 1992).

-Poseen alguna característica que les impide formar agregados cristalinos y, por tanto, su estructura es menos rígida que la de la celulosa. Pueden cristalizar con las cadenas de celulosa formando puentes de hidrógeno entre los grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$  de las cadenas de celulosa y los oxígenos glicosídicos de las hemicelulosas.

Entre la diversidad de polímeros hemicelulósicos existentes, se pueden considerar como más abundantes xiloglucanos y xilano:

- Xiloglucanos: poseen una cadena principal de residuos de glucosa unidos por enlace  $\beta$ -1,4, a la que se unen por cadenas laterales cortas cadenas de residuos de xilosa ( $\alpha$ -D-xilopiranos) unidos por el carbono 6 de glucosa de la cadena principal; estas cadenas laterales pueden agrandarse con restos de  $\beta$ -D-galactopiranos, L-arabinofuranosa ó  $\beta$ -L-fucopiranosil-(1,2)- $\beta$ -D-galactopiranos (Figura n°13).

- Xilano: la cadena principal está constituida por unidades de xilosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4, y pueden presentar cadenas laterales de residuos de arabinosa unidas al C<sub>3</sub> de algunas unidades de xilosa; así como también de ácido galacturónico y 4-O-metil-glucurónico unidos al C<sub>2</sub> de xilosa (Figura n° 14).

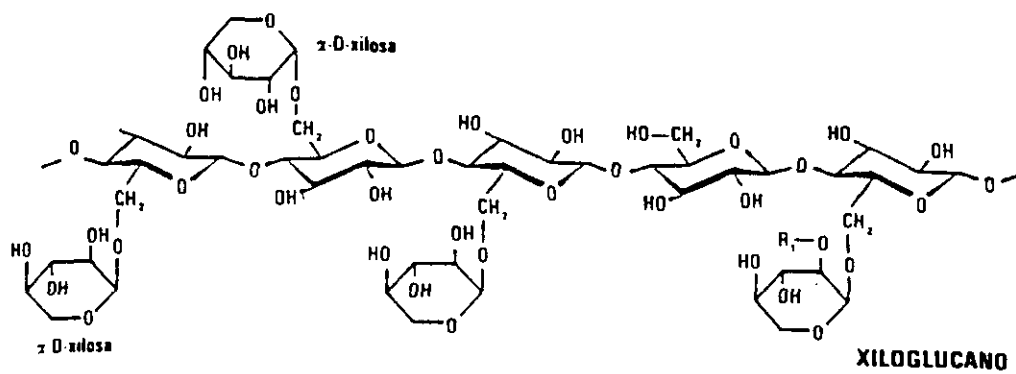
La distribución de las hemicelulosas está relacionada con la taxonomía, pero ningún grupo parece exclusivo de un determinado tipo de plantas. Los xiloglucanos, que constituyen un componente mayoritario de la pared primaria de las dicotiledóneas (hasta el 20% del peso seco total), representan hasta el 5% en la pared primaria de las gramíneas; en éstas hasta el 20% de los carbohidratos de la pared son xilanos siendo un componente más escaso (no más del 5%) en la pared de las dicotiledóneas. Se ha observado la presencia de  $\beta$ -glucanos no celulósicos en paredes celulares de monocotiledóneas tales como avena, maíz, trigo y cebada con enlaces del tipo  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 y  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3. (Fry, 1989; Hayashi, 1989)

### 3.3.1.3. Sustancias pécticas

Son el componente mayoritario de la lámina media donde actúan como elemento de unión entre las células y también se presentan en la pared primaria. Son polisacáridos ricos en ácido galacturónico y, según Carpita, (1990) se pueden distinguir las siguientes estructuras:

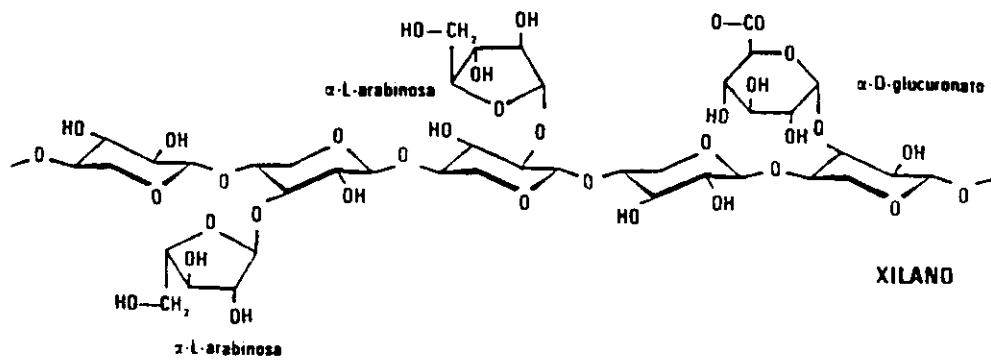
- Homogalacturonano.
- Ramnogalacturonano I.
- Ramnogalacturonano II.

El homogalacturonano es una estructura no ramificada, que está formado por unidades de ácido galacturónico con enlaces  $\alpha$ -1,4.



**XILOGLUCANO**  
 $R_1 \begin{cases} \text{L-arabinosa } \beta(1 \rightarrow 2) \\ \text{D-galactosa } \beta(1 \rightarrow 2) \\ \text{L-fucosa } \alpha(1 \rightarrow 2) \text{ D-galactosa } \beta(1 \rightarrow 2) \end{cases}$

Figura nº13.- Estructura de xiloglucano (Guardiola y García, 1990).



**XILANO**  
 Cadenas laterales unidas a las moléculas de Arabinosa:  
 D-galactosa  $\beta(1 \rightarrow 5)$   
 D-xilosa  $\beta(1 \rightarrow 2)$   
 D-xilosa  $\alpha(1 \rightarrow 3)$

Figura nº14.- Estructura de xilano (Guardiola y García, 1990).

Los ramnogalacturonanos tipo I son polímeros constituidos por uniones  $\alpha$ -1,4 entre residuos de ácido galacturónico, intercalados con residuos de ramnosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2 (Figura nº15). Aproximadamente la mitad de las moléculas de ramnosa están unidas a cadenas laterales formadas por: arabinosa (arabinanos), galactosa (galactanos) y arabinogalactosa (arabinogalactanos). Los arabinanos están más o menos ramificados según la fuente vegetal de la que procedan, y los galactanos son relativamente poco frecuentes. Las cadenas de arabinogalactano pueden ser de dos tipos en función de la mayor o menor ramificación y se denominan arabinogalactano tipo I y arabinogalactano tipo II (Barceló, 1985; Carpita, 1990) (Figura nº16). Existen estudios que demuestran que los polímeros aislados (galactanos, arabinanos) son productos de degradación de polisacáridos pécticos más complejos.

En cuanto al ramnogalacturonano tipo II parece que es un polímero más complejo que el de tipo I, cuya estructura no ha sido claramente delimitada y cuyo papel fisiológico no se conoce bien todavía (Carpita, 1990). Los trabajos encaminados a su caracterización han identificado una amplia variedad de residuos terminales como ácido galacturónico, galactosa, arabinosa, azúcares metilados, y ramnosa, así como también diversos sustituyentes de la cadena, tales como ácido glucurónico, apiosa, ramnosa, galactosa y fucosa. La gran cantidad de residuos glicosídicos encontrados sugiere una molécula altamente ramificada.

Otros autores (Barceló y col., 1992; Melford y Prakash, 1986) consideran a los galactanos, arabinogalactanos y arabinanos como polisacáridos pécticos y no como productos procedentes de la hidrólisis de polisacáridos más complejos.

Los grupos carboxilos de los ácidos urónicos pueden estar parcial o totalmente esterificados por grupos metilos. Según el grado de metilación se establece la siguiente clasificación:

- pectinas: sustancias pécticas altamente metiladas
- ácidos pectínicos: sustancias pécticas parcialmente metiladas
- ácidos pécticos: sustancias pécticas exentas de grupos metílicos

Los ácidos pectínicos y pécticos, dado su carácter de ácido débil, tienen posibilidad de formar sales con iones como calcio y magnesio que se denominarán:

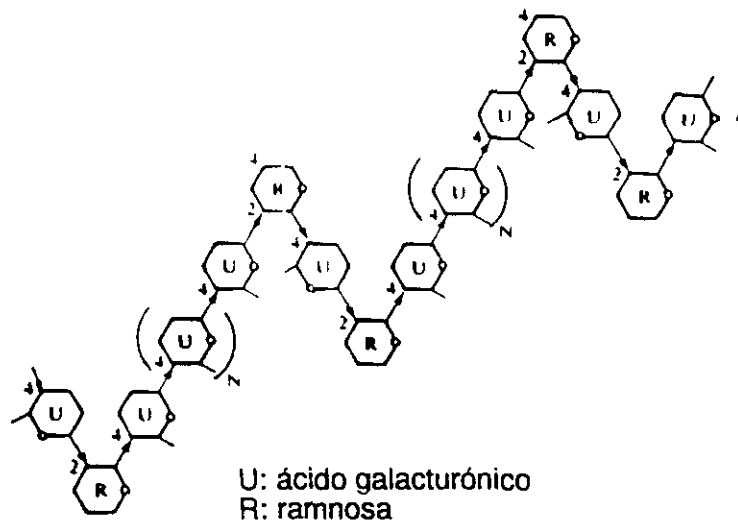


Figura nº15.- Estructura de ramnogalacuronano (Barceló y col., 1985)

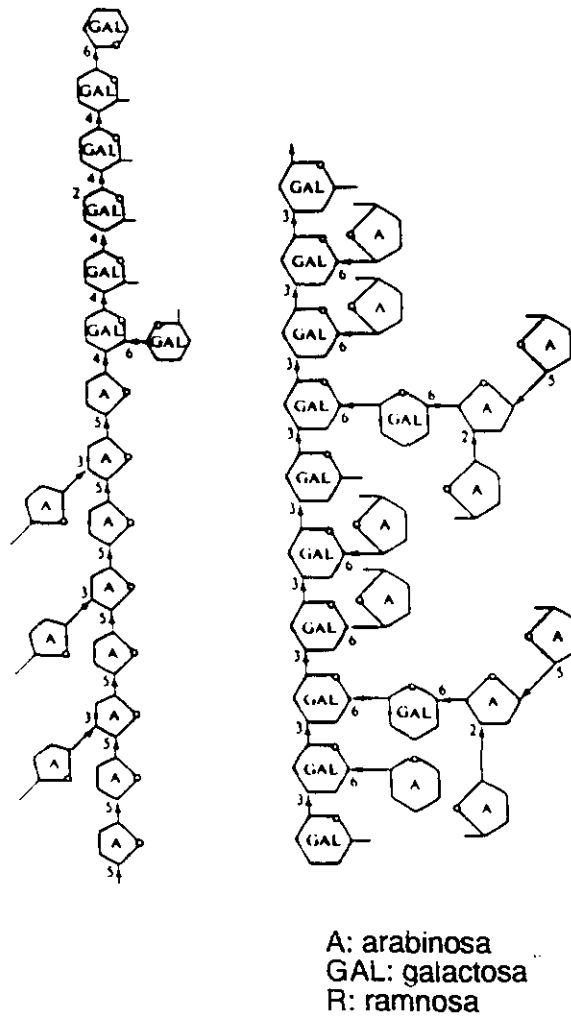


Figura nº16.- Estructura de arabinogalactanos (Barceló y col., 1985)

- pectinatos : sales ácidas o neutras de los ácidos pectínicos
- pectatos: sales ácidas o neutras de ácidos pécticos que constituirán el componente predominante en la lámina media o sustancia cementante.

Estos compuestos pueden unirse a través de las moléculas de azúcares a otros constituyentes tales como celulosa, hemicelulosas y proteínas, formando la protopectina insoluble (Theander, 1981).

Las sustancias pécticas pueden ser extraídas de las paredes celulares, sólo parcialmente, con agua caliente, ácidos minerales diluidos y calientes o soluciones de agentes quelantes (EDTA, oxalato amónico, hexafosfato sódico) en caliente. La acción disolvente del agente quelante dependerá, en parte, de su capacidad para complejar el calcio unido a las sustancias pécticas de la pared.

Mediante diferentes procesos bioquímicos, condicionados por la fisiología de la planta, los monómeros de la celulosa se transforman en ácidos urónicos originando compuestos pécticos. La pared así constituida tiene mayor cantidad de pectinas que en condiciones normales; como consecuencia esta pared pierde rigidez y se licúa o gelifica.

El proceso de gelificación o liquefacción de la pared celular puede originar la formación de: gomas y mucílagos.

**Gomas.** Se forman como consecuencia de procesos fisiológicos o patológicos vegetales que desencadenan la gelificación de las paredes celulares. Se extraen a partir de los exudados de las plantas que proceden de las incisiones practicadas en las mismas, y además presentan una localización interna en el vegetal como compuestos de reserva destinados a ser consumidos por la planta.

Son polisacáridos que se pueden clasificar según la unidad monomérica más frecuente: galactano, glucuronomanano, galactomanano, xilano, xiloglucano (Southgate, 1969).

Presentan la propiedad común de ser sustancias con carácter hidrofílico, que dan soluciones

viscosas cuando se tratan con agua caliente ó fría.

**Mucílagos.** Son polisacáridos formados en el metabolismo normal de la planta. Entre los más conocidos están los de semillas y los de las células externas de vegetales acuáticos. Las cadenas están formadas por galactomananos, glucomananos, arabinoxilanos, xiloarabinano y galacturonorramnanos. Son solubles en agua (Southgate, 1969).

**Polisacáridos algínicos.** Son polisacáridos obtenidos a partir de algas marinas que forman parte de la estructura rígida de sus paredes.

### **3.3.2. Glicoproteínas**

Una proporción variable del peso de la pared, de hasta más del 10% del total, es debida a proteínas. Casi invariablemente las proteínas se encuentran unidas covalentemente a carbohidratos, bien a moléculas de monosacáridos (arabinosa y galactosa frecuentemente) o de oligosacáridos y aún de polisacáridos, por lo que se denominan apropiadamente glicoproteínas de la pared (Figura nº 17). Se pueden dividir en estructurales y enzimáticas.

#### **3.3.2.1. Glicoproteínas estructurales**

Algunas de las glicoproteínas de la pared no tienen asociada actividad enzimática, por lo que se clasifican como proteínas estructurales. La mayor parte de estas proteínas estructurales *caracterizadas presentan un elevado contenido de uno o dos aminoácidos, que representan más del 40% del total de aminoácidos de la molécula; se conocen proteínas de este tipo ricas en hidroxiprolina, prolina, treonina, histidina, triptófano y glicina, entre otros.*

De estas proteínas, las más estudiadas y mejor caracterizadas son las proteínas ricas en hidroxiprolina, denominadas extensinas, llamadas de este modo por creerse inicialmente que estaban implicadas directamente en el proceso de alargamiento celular. Son abundantes en las paredes primarias de las dicotiledóneas donde llegan a representar hasta el 10% de su peso

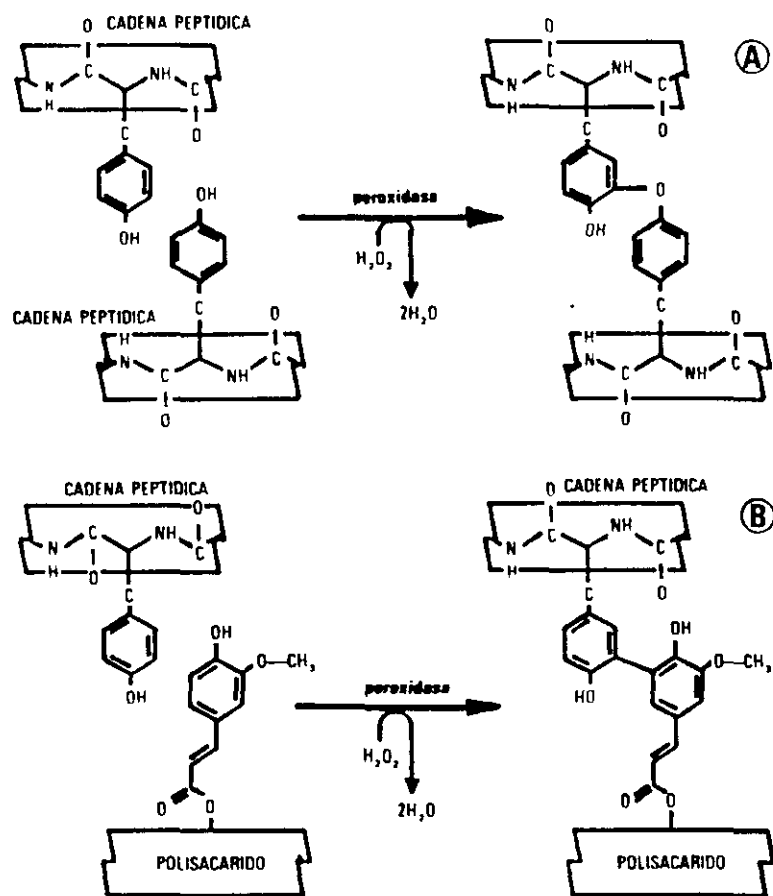


Figura nº17. A) Dimerización de los grupos fenólicos del aminoácido tirosina, con la formación de un puente de isoditrosina entre dos cadenas peptídicas.  
 B) Enlace entre un grupo tirosina de una cadena proteica, y el ácido felúrico unido a un carbohidrato (Guardiola y García, 1990)

seco, no tanto en las paredes de las monocotiledóneas, y se cree que están ausentes en la mayor parte de las paredes secundarias. Unidas a los grupos -OH de serina e hidroxiprolina se encuentran numerosas cadenas laterales de hasta cuatro monosacáridos de arabinosa y, en menor cantidad, moléculas de galactosa.

De este modo las moléculas de extensina forman un entramado tridimensional intercalado entre los polisacáridos de la pared y unido covalentemente a algunos de ellos.

### **3.3.2.2. Glicoproteínas enzimáticas**

En las paredes celulares se han detectado también glicoproteínas enzimáticas, en su mayor parte hidrolasas (glucanasas, galactosidasas, etc.) y peroxidasas capaces de actuar sobre los componentes de la pared (Guardiola y García, 1990).

### **3.3.3. Otros componentes asociados**

#### **3.3.3.1. Lignina**

La lignina sólo se deposita en determinados tipos de células, en las cuales constituye, junto con las proteínas, la fracción mayoritaria de los componentes no polisacáridos de la pared celular. Su formación sólo se inicia una vez finalizada la pared secundaria, comienza en la lámina media y se infiltra en la matriz provocando su expansión por todas las capas de la pared (Lewis y Yamamoto, 1990).

La lignina se puede definir como polímero de alto peso molecular, que se forma por deshidrogenación enzimática y posterior polimerización de los alcoholes aromáticos, principalmente, coniferol, cumarol y sinapinol. Es un compuesto que carece de estructura única ya que su síntesis se lleva a cabo sin control enzimático de la polimerización que tiene lugar al deshidrogenarse los alcoholes fenólicos (Lewis y Yamamoto, 1990) (Figura nº 18).

El proceso de lignificación tiene dos funciones: cementa y sujeta las microfibrillas de celulosa y otros polisacáridos de la matriz y, debido a que los complejos lignina-polisacáridos son fuertes, el conjunto ofrece una gran resistencia, dureza e impermeabilidad (es hidrófoba), previniendo la degradación bioquímica y los daños físicos.

Debido al elevado tamaño molecular de la lignina, la gran estabilidad de su estructura y su unión covalente con los polisacáridos (hemicelulosas y celulosa), la lignina confiere a la pared una gran rigidez, que impide el crecimiento celular. Además, la lignina, al ocupar el espacio entre los polisacáridos que antes era agua, disminuye la hidratación de la pared así como su permeabilidad al agua y los solutos. Por esta razón, una célula con elevado grado de lignificación será una célula muerta ya que se encontrará prácticamente aislada.

### 3.3.3.2. Cutina. Suberina. Ceras

Los tres son compuestos de naturaleza lipídica, que cuando se presentan en la célula originan modificaciones de la pared celular: cutinización y suberificación, fundamentalmente.

**Cutina.** Las paredes cutinizadas se suelen presentar en las células externas de los órganos aéreos vegetales. La cutina está constituida por polímeros de hidroxiácidos de 16-18 átomos de carbono (Figura nº 19). Tiene carácter bipolar, que le permite disponerse entre la estructura polisacárida típica de la pared. El depósito se inicia en la lámina media.

**Suberina.** La suberina se suele presentar en tejidos o células especializadas como el súber, las cubiertas seminales y la banda de Caspary de la endodermis de la raíz (Guardiola y García, 1990). Su composición química es similar a la de la cutina, pero la suberina contiene mayor número de ácidos dicarboxílicos y de fenoles (Figura nº 19). Se deposita en el lado interno de la pared celular hacia la pared primaria, pudiendo llegar incluso a enmascarar a la celulosa.

**Ceras.** Son mezclas de alcoholes, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos. Se suelen presentar junto a cutina y suberina en las paredes cutinizadas y suberificadas.

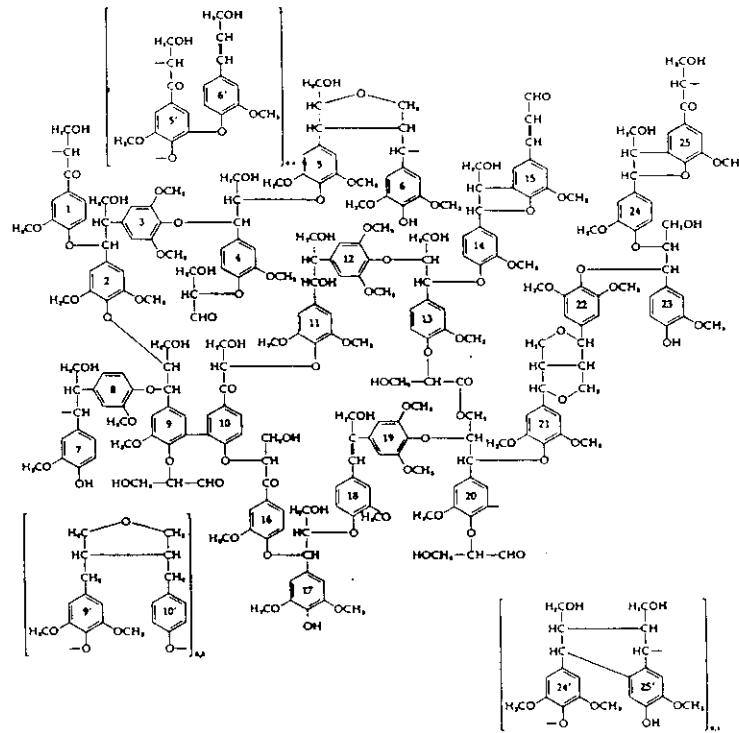


Figura nº18.- Posible estructura de la lignina (Barceló y col., 1992).

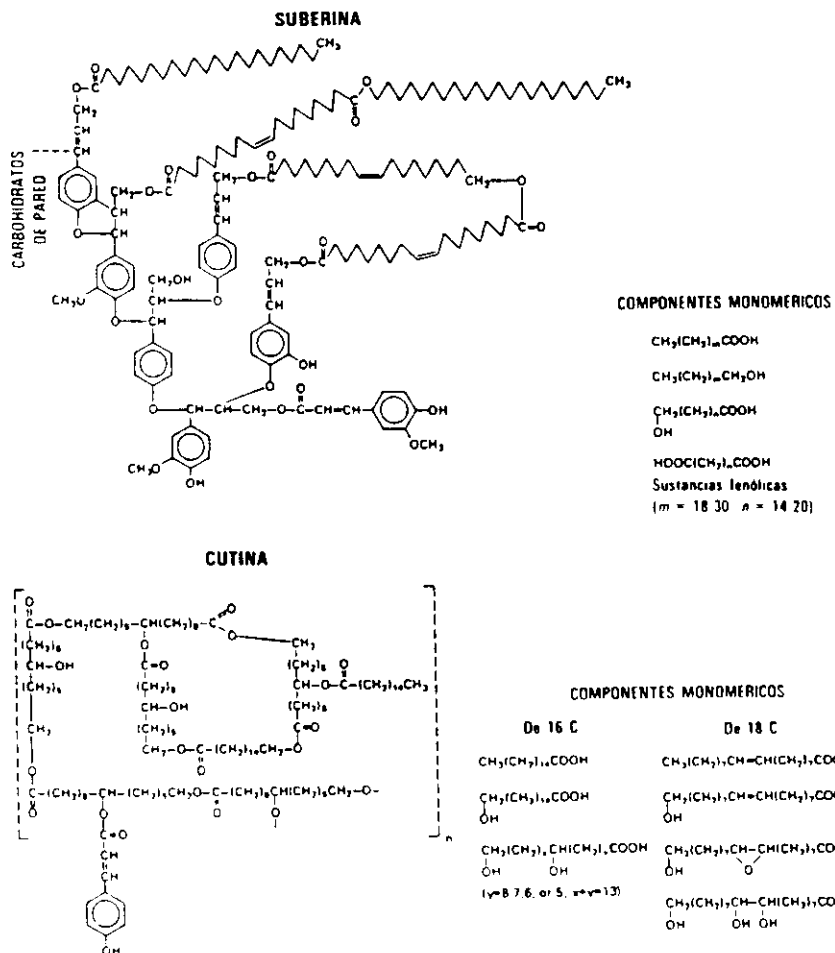


Figura nº19.- Estructura de las moléculas de suberina y de cutina (Guardiola y García, 1990).

### **3.3.3.3. Taninos**

Son componentes minoritarios de la pared pero que influyen en sus propiedades y funcionalidad.

En algunas ocasiones se han determinado junto con la lignina obteniéndose valores anómalos de la misma. Pueden ser hidrolizables, liberando como productos de hidrólisis glucosa y ácidos fenólicos, como el ácido gálico, y no hidrolizables, formados por flavanos (Theander, 1981). Se pueden extraer del vegetal mediante soluciones alcalinas y soluciones detergentes.

### **3.3.3.4. Sales minerales**

Del resto de los compuestos asociados a las paredes celulares es importante citar la sílice y otras sales minerales como carbonato cálcico, carbonato de magnesio y oxalato cálcico. Cuando se presentan de forma anómala en la pared celular, producen su mineralización.

## **3.4. BIOSINTESIS DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES**

Las paredes celulares carecen de capacidad biosintética y los elementos monoméricos de sus componentes se sintetizan en el citoplasma. La polimerización de estos monómeros puede realizarse tanto en el citoplasma como en la misma pared, según el componente de que se trate (Andersen y Beardall, 1991).

La síntesis de polisacáridos y proteínas de la pared así como de sus monómeros (monosacáridos y aminoácidos) son procesos citoplasmáticos asociados a los sistemas membranosos de la célula: membrana de retículo endoplasmático y/o aparato de Golgi para todos los componentes, excepto para celulosa y calosa cuya síntesis está asociada a la membrana plasmática.

La formación de lignina tiene lugar en la pared por la polimerización *in situ* de precursores secretados asimismo en vesículas derivadas del aparato de Golgi. También la cutina y la suberina se polimerizan *in situ* en la pared, y la síntesis de sus componentes monoméricos tiene lugar en el interior celular.

En este apartado se exponen los aspectos más importantes de la síntesis de los polisacáridos, proteínas y lignina de la pared celular (Gahan, 1984; Brett y Hillman, 1985).

### **3.4.1. Biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular**

#### **3.4.1.1. Síntesis de precursores. Polimerización**

Los azúcares-nucleótidos son los donadores de los carbohidratos en la formación de polisacáridos de la pared celular.

Se puede dividir el proceso de formación de un azúcar-nucleótido en dos etapas: la primera consiste en la obtención del polisacárido fosforilado (ej. glucosa-1-fosfato). Puede sintetizarse mediante la fosforilación del monosacárido con la intervención de ATP, una quinasa y una mutasa (Figura nº 20) y también a partir del almidón por una reacción catalizada por una fosforilasa.

Las reacciones de la segunda etapa, catalizadas por diferentes pirofosforilasas, permiten la adición del azúcar al nucleótido para obtener un monosacárido con enlaces de alta energía, que permitirán la incorporación posterior de otros monosacáridos en el correspondiente proceso de polimerización.

El uridín difosfato de glucosa es el donador de azúcar en la mayoría de las reacciones de transglicosilación, en la biosíntesis de los componentes de la pared celular (Figura nº 21).

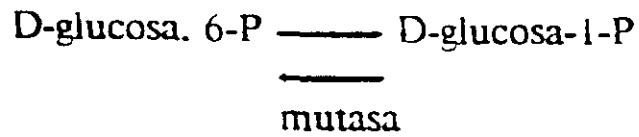
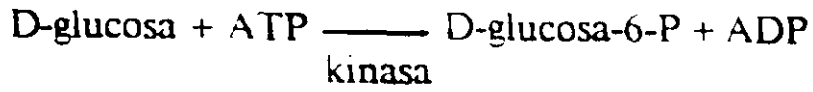


Figura nº20.- Fosforilación del monosacárido (Barceló y col., 1992).

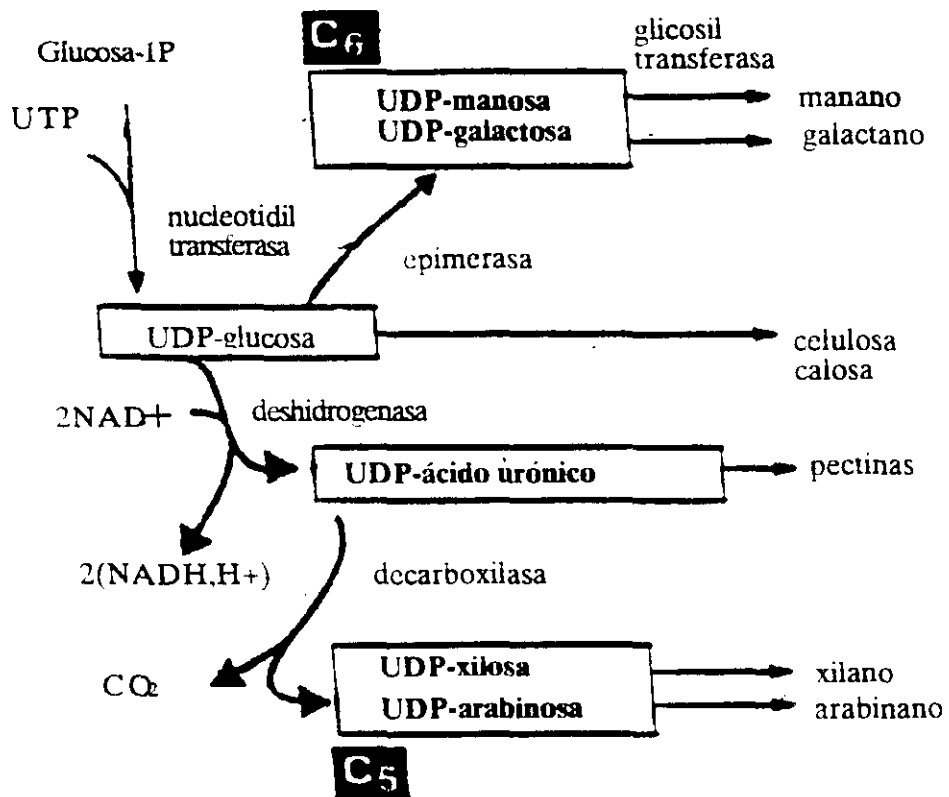


Figura nº21.- Interconversión de nucleósidos difosforados a partir de UDP-glucosa (Robert y Roland, 1992).

Otros nucleótidos de azúcar tienen una estructura similar, sustituyendo la base nitrogenada por una de las bases púricas o pirimídicas (adenina, guanina, citosina, etc.), o la molécula de azúcar por el monosacárido correspondiente (Guardiola y García, 1990).

Entre todos los nucleótidos de azúcar posibles, solamente los derivados del uracilo y de la guanina son donadores de azúcar en la síntesis de polisacáridos estructurales. En el cuadro n° I se observan los principales donadores en el caso de las hemicelulosas.

También son posibles las interconversiones de unos azúcares-nucleótidos en otros, lo que será de gran importancia para la biosíntesis de los polímeros no celulósicos de la pared celular. Las enzimas catalizadores de estos procesos son: deshidrogenasas, decarboxilasas y epimerasas.

La polimerización de estos compuestos en los polisacáridos estructurales de la pared tiene lugar por la acción de sintetetasas, enzimas asociadas a las membranas del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi y en algunos casos del propio plasmalema. Los polisacáridos así sintetizados se acumulan en el interior de sáculos o vesículas y son secretados al exterior mediante un proceso de exocitosis.

Durante el transporte, los polisacáridos pueden ser modificados por la acción de enzimas específicas. Estas modificaciones de las moléculas incluyen procesos como son la esterificación, la formación de ésteres metílicos y etílicos, la eterificación, la adición de compuestos fenólicos, etc.

La secreción final a la pared implica la fusión de las vesículas de Golgi con el plasmalema, y mediante exocitosis se vierte el contenido hacia la pared celular. A continuación se produce la ordenación de las moléculas en la estructura de la pared, proceso poco conocido en sus detalles. Después de la secreción, los polisacáridos son modificados por las enzimas de la pared, lo que involucra probablemente la unión covalente de algunas moléculas. En la figura n° 22 se muestra un resumen simplificado de los procesos de síntesis y secreción de los polisacáridos estructurales.

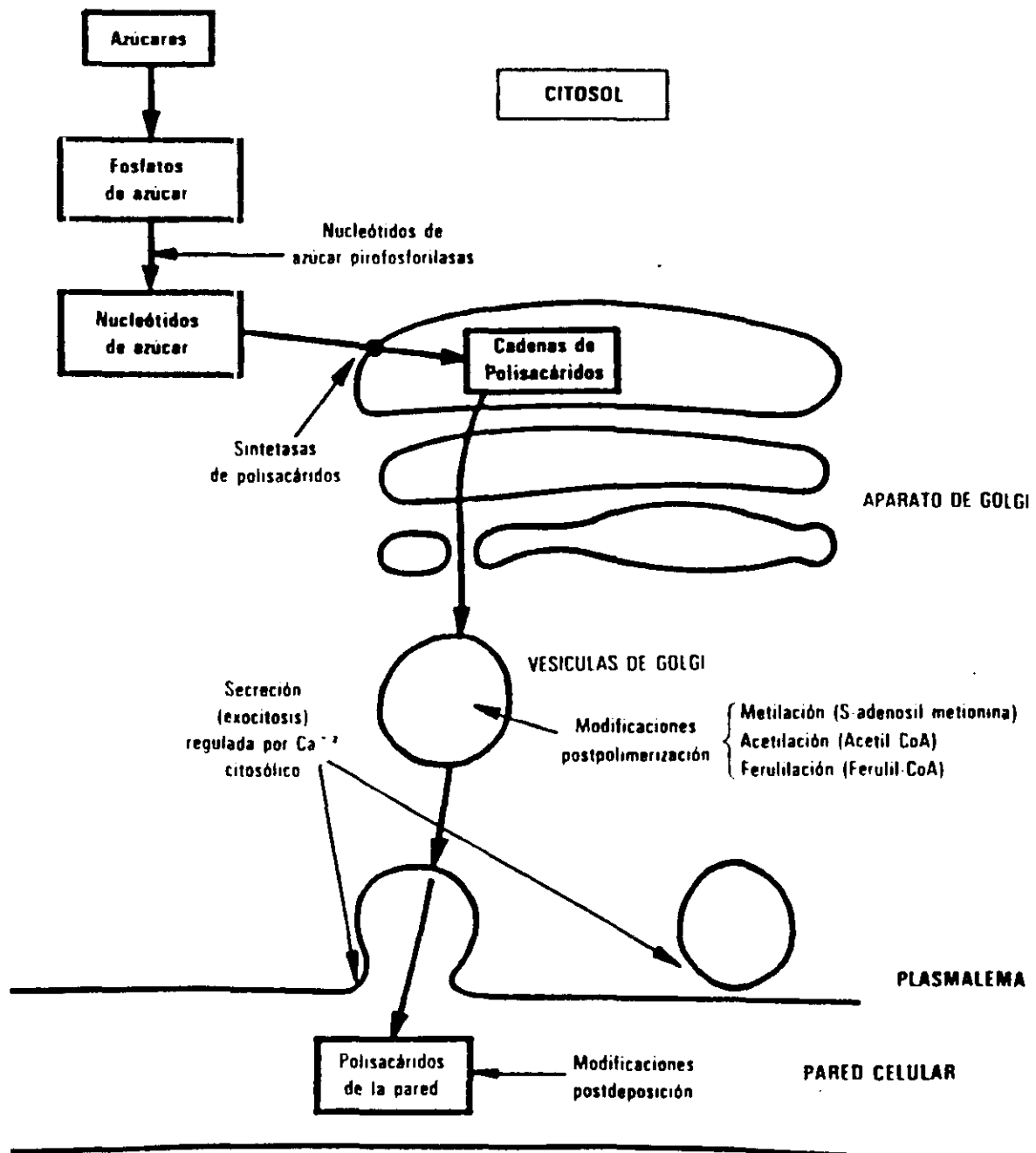


Figura nº22. Esquema de la localización de los procesos de síntesis y secreción de los polisacáridos hemicelósicos y pécticos.

**Cuadro nº I. Resumen de la biosíntesis de hemicelulosas.**

<b>Nucleótido donador de azúcar</b>	<b>Producto formado</b>
UDP ó TDP-ácido galacturónico	Acido poligalacturónico
[S-Adenosilmetionina] UDP-arabinosa, UDP-xilosa	[Esteres metílicos de poliurónidos] Arabano, xilano
UDP-xilosa, UDP-ácido glucurónico	Glucuronoxilano
UDP-galactosa	Galactano
GDP-manosa	Manano
UDP-xilosa, UDP-glucosa	Xiloglucano
GDP-manosa, GDP-glucosa	Glucomanano
UDP-apiosa, UDP-ácido galacturónico	Apiogalacturonano
UDP-glucosa	Glucano con enlace mixto Glucano $\beta$ -1,3

El control del proceso está ejercido por la secreción de macromoléculas desde el interior al exterior de la célula (Barceló y col., 1992). Este proceso está condicionado por la síntesis de las macromoléculas que puede estar controlada por:

-La sintetasa correspondiente (cantidad y actividad de la misma).

-Transporte de precursores hacia el sistema endomembranoso, proceso que debe implicar la presencia de transportadores específicos, ya que aunque las sintetetasas se encuentren dentro del lumen del sistema membranoso no son funcionales hasta que se ponen en contacto con sus sustratos específicos.

-La incorporación de estos polisacáridos a la pared celular depende de su transporte empaquetados en vesículas y de la fusión de estas vesículas con el plasmalema.

-La tasa de fusión parece ser otro factor regulador de la formación de la pared celular, ya que el número de vesículas aptas para la fusión excede al número de las que realmente se fusionan.

#### **3.4.1.2. Biosíntesis de celulosa**

Se asocia al plasmalema en lugar de a las membranas del aparato de Golgi.

Aún no se conoce con exactitud cómo se sintetiza. La mayor dificultad para ello reside en la incapacidad para obtener un sistema *in vitro* a partir del cual se produzca celulosa identificable y en cantidad apreciable. Actúa como precursor UDP-Glucosa y hay un requerimiento absoluto de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y celobiosa que, probablemente, actúa como aceptor de restos de glucosa, iniciándose así la formación de la cadena de celulosa.

La enzima sintetasa de celulosa, que no ha sido aislada todavía, polimeriza UDPG citosólico, secretando directamente la molécula formada al exterior de la célula en la superficie interna de la pared. Se ha observado la existencia de agregados macromoleculares asociados a un

extremo de las microfibrillas, que se interpretan como complejos enzimáticos integrados en la membrana. Cada uno de estos complejos sintetiza simultáneamente todas las cadenas de celulosa que forman la microfibrilla, teniendo lugar la ordenación cristalina de las moléculas después de la síntesis, probablemente a corta distancia del complejo enzimático.

La ordenación paralela de las fibrillas de celulosa está relacionada con la orientación de los microtúbulos en el citosol (Figura nº 23). Aunque se han propuesto algunos esquemas para explicar esta relación, el mecanismo que regula la orientación de las microfibrillas de celulosa no se conoce con precisión (Emons y col., 1992).

#### **3.4.1.3. Biosíntesis de hemicelulosas**

Como ya se vió anteriormente en su estructura se incluyen xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico.

Una vez formados los precursores y, teniendo en cuenta la posibilidad de las interconexiones de unos azúcares-nucleótidos con otros, éstos pueden ceder el azúcar a un aceptor, de igual forma que sucede en la síntesis de celulosa. Así, se han estudiado sistemas celulares de vegetales superiores capaces de transferir xilosa desde UDP-D-xilosa a un xilano  $\beta$ -1,4, o manosa desde UDP-D-manosa a un manano  $\beta$ -1,4 etc. Un sistema enzimático es capaz también de transferir el grupo metilo a partir de S-adenosilmetionina a las subunidades de ácido glucurónico que forman parte de hemicelulosas.

#### **3.4.1.4. Biosíntesis de pectinas**

A partir de *Phaseolus aureus* se ha obtenido un sistema capaz de formar cadenas de  $\alpha$ -1,4-ácido galacturónico utilizando como donador UDP-D-ácido galacturónico.

En un sistema obtenido a partir de tomate, la incorporación de ácido galacturónico tiene lugar a partir de TDP-D-ácido galacturónico.

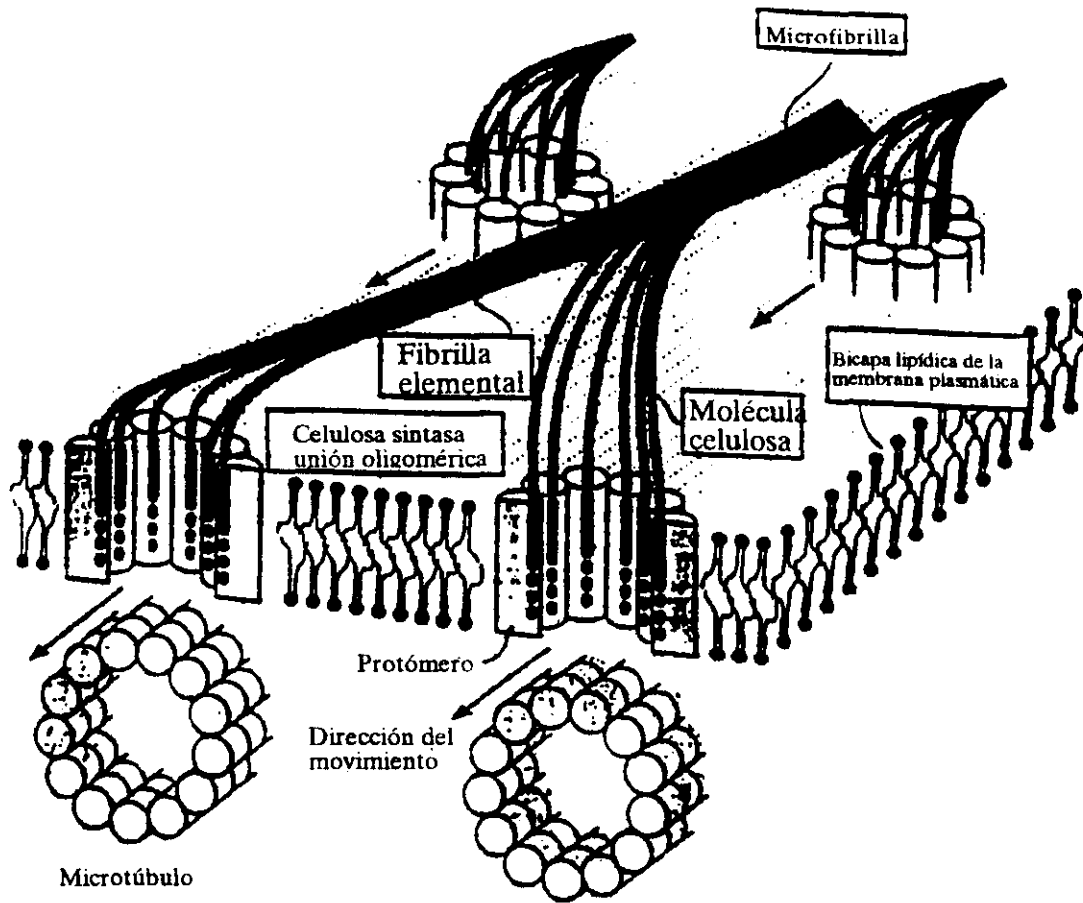


Figura nº23.- Modelo especulativo para la síntesis de celulosa en la membrana plasmática de los vegetales (Emons y col., 1992).

En remolacha se ha visto que esta planta contiene incluso un sistema enzimático capaz de convertir TDP-glucosa en TDP-D-ácido galacturónico.

La metilación de los grupos carboxilo tiene lugar después de que se ha formado la cadena de ácido poligalacturónico; parece ser que el donador de los grupos metilo es el compuesto S-adenosil-L-metionina.

#### **3.4.2. Biosíntesis de glicoproteínas**

Las proteínas de la pared se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, siendo secretadas al exterior por el mismo procedimiento que los carbohidratos, en vesículas del aparato de Golgi. Previamente a su secreción las moléculas de proteína se acumulan en las vesículas.

Sufren varias modificaciones después de la síntesis de las cadenas peptídicas y antes de su secreción a la pared. Entre estas transformaciones hay que destacar la formación de hidroxiprolina en las cadenas de extensina. En el código genético existe un codón para la prolina pero no para la hidroxiprolina que se tiene que formar por reacciones de post-traducción.

La unión de las cadenas laterales de mono- y oligosacáridos a las moléculas de proteína tiene lugar también antes de su secreción a la pared. El mecanismo no es bien conocido pero involucra probablemente la transferencia desde nucleótidos de azúcar por la acción de transferasas específicas. La glicoproteína en forma soluble es secretada en vesículas hacia la pared celular. Su insolubilización y unión fuerte a la pared parece ser debida a la formación de enlaces o puentes de isoditrosina, proceso catalizado por una peroxidasa. El esquema de la biosíntesis de extensina puede observarse en la figura nº 24.

### **3.4.3. Biosíntesis de lignina**

El primer paso parece ser la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, que pueden convertirse en diversos derivados del ácido cinámico; estos por reducción dan lugar a los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico a partir de los cuales se forma lignina. Las ligninas se forman ya en la pared por reacciones de polimerización espontánea (no catalizadas enzimáticamente) de los alcoholes cinámicos (Figura nº 25). Este carácter espontáneo determina que la lignina no sea un compuesto único y homogéneo sino un grupo de sustancias de ciertas propiedades comunes.

Para la lignina, la síntesis de los precursores que tiene lugar en asociación con membranas del retículo endoplasmático parece estar regulada por los niveles de algunas enzimas como fenilalanina-amonio-liasa (PAL). La polimerización ocurre en la pared celular y parece estar regulada por las enzimas implicadas, una peroxidasa y/o ascorbato liasa (Lewis y Yamamoto, 1990; Barceló y col., 1992).

## **3.5. ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR**

La forma en que se unen los diferentes componentes de la pared celular es, en gran parte, desconocida. Esto es debido principalmente a la poca información que existe sobre sus estructuras.

A continuación se describirá la organización de la pared primaria y de la pared secundaria.

### **3.5.1. Pared primaria**

En la pared celular primaria las hemicelulosas y las sustancias pécticas presentan una disposición amorfa mientras que los haces que constituyen la celulosa son los que actúan como verdadero componente estructural.

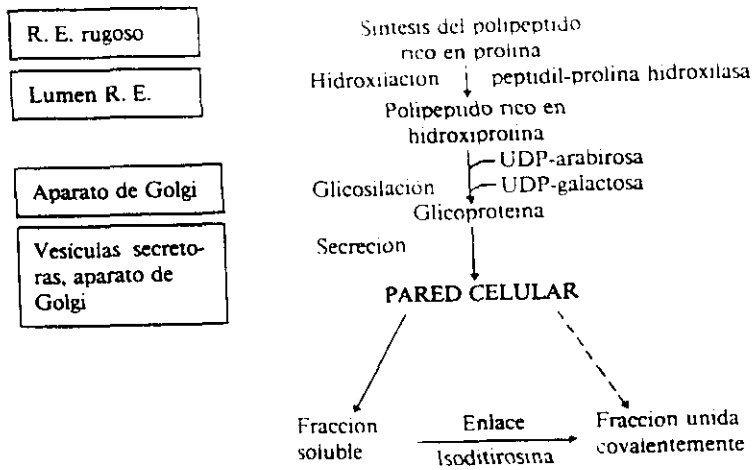


Figura nº24.- Esquema de biosíntesis de extensina (Guardiola y García, 1990).

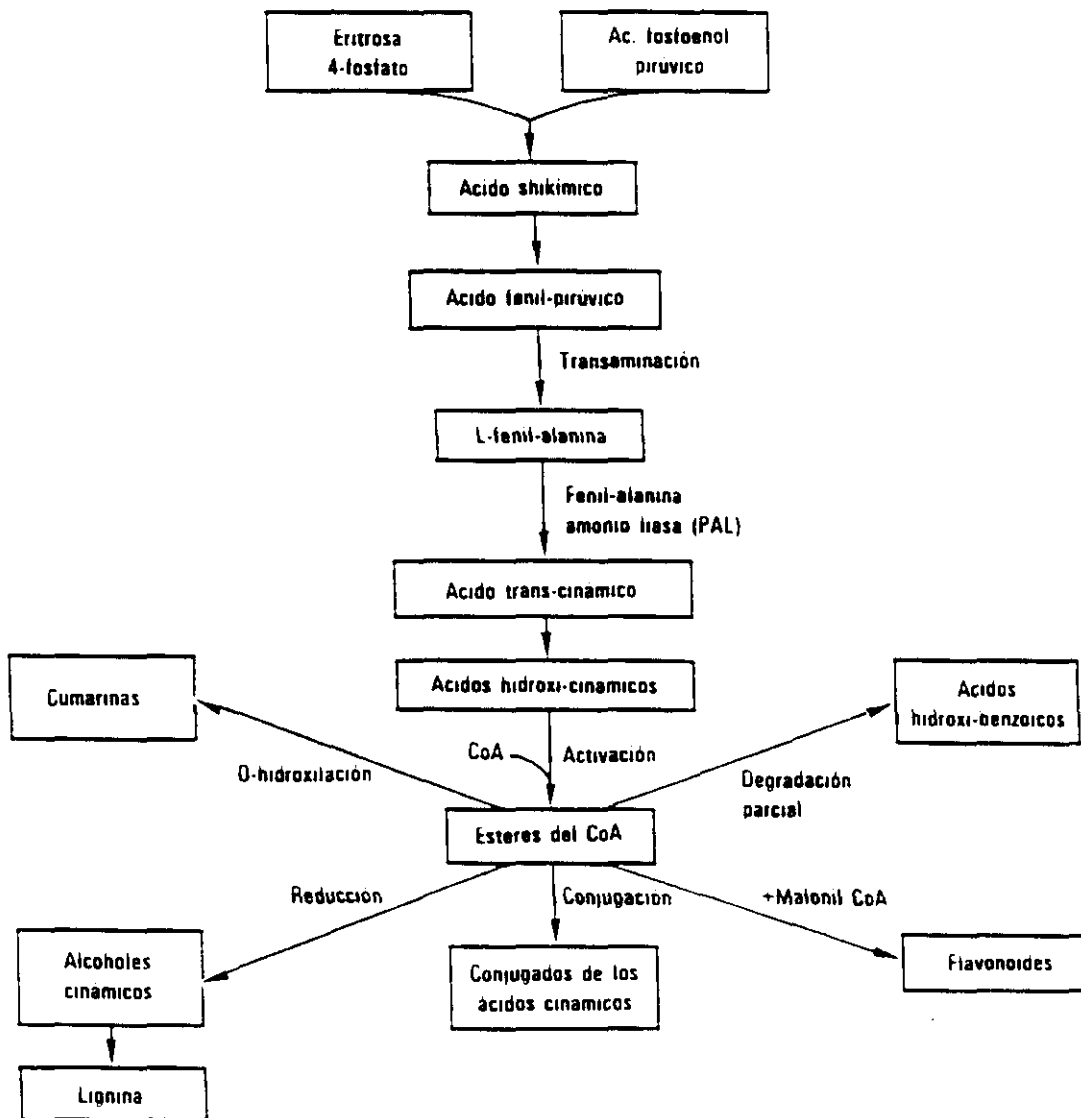


Figura nº25.- Esquema de la biosíntesis de sustancias fenólicas (Guardiola y García, 1990).

Los polímeros estructurales de la pared están interconectados entre sí mediante diferentes tipos de enlaces que pueden ser covalentes o no covalentes. Entre los enlaces de tipo covalente se encuentra el enlace glicosídico (ej. xiloglucano-pectina) y como enlaces no covalentes aparecen el enlace por puente de hidrógeno (ej. xilolucano-celulosa) y los enlaces iónicos (ej. enlaces entre polisacáridos pécticos) (Melford y Prakash, 1986).

Sobre la base de estas observaciones se han expuesto varios modelos estructurales de pared celular que serán diferentes según procedan de plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. Cualquier modelo de pared celular primaria debe permitir explicar las siguientes propiedades:

- gran resistencia para soportar fuerte oposición
- facilidad para crecer sin resistencia
- comportamiento en el tratamiento químico ó enzimático

#### **3.5.1.1. Pared primaria de plantas dicotiledóneas**

Aunque ninguno de los modelos estructurales propuestos hasta la fecha justifican plenamente la disposición estructural de los distintos componentes de la pared celular de las dicotiledóneas, se describirán aquellos que están basados en un mayor número de evidencias experimentales y gozan de la mayor aceptación entre los científicos, si bien hay que tener en cuenta que los modelos propuestos se basan en el estudio de un número limitado de tejidos vegetales y se deben considerar sólo modelos teóricos.

##### **\* Modelo de Albersheim y colaboradores**

Fue propuesto por el equipo de Albersheim (Keegstra y col., 1973; Albersheim, 1975; Albersheim, 1978).

Se basa en la idea de que todos los componentes de la pared celular pueden interaccionar entre sí por medio de enlaces covalentes y su unión a través del xiloglucano mediante puentes de hidrógeno con las fibrillas de celulosa. Para explicar este modelo se han propuesto los

esquemas de las figuras n° 26 y 27.

En ellos puede apreciarse que las fibrillas de celulosa, agregadas lateralmente mediante puentes de hidrógeno, están cubiertas completamente por una capa de xiloglucano de una molécula de espesor. La unión entre ambos polisacáridos se hace mediante puentes de hidrógeno. En el extremo opuesto estas moléculas de xiloglucano se unen a arabinogalactanos. Los extremos reductores de arabinogalactanos se unen a las cadenas de ramnogalacturonanos por enlace glicosídico.

Los residuos de proteína de esta pared enlazan con los polisacáridos mediante restos de hidroxiprolina, se unen glicosídicamente a tetraarabinósidos y dan lugar a los protoglicanos y glicoproteínas.

Por último, unidas covalentemente al ramnogalacturonano, se encuentran las cadenas de arabinogalactanos conectadas a restos de serina de la proteína de la pared.

Aunque hay evidencia del enlace de hidrógeno entre los xiloglucanos y las fibrillas de celulosa, hay poco apoyo experimental que justifique los enlaces covalentes entre xiloglucano y cadenas laterales neutras de pectina. Sin embargo, la observación de que la extracción catalizada con poligalacturonasa facilita la separación de una pequeña cantidad de xiloglucano de las paredes celulares, sugiere que hay algún grado de interacción (probablemente no covalente) entre la fracción péctica y el xiloglucano.

La glicoproteína, rica en hidroxiprolina, es un componente de las paredes celulares primarias pero, a pesar de ello, Albersheim (1978) ha propuesto un modelo reformado en el que excluyen dicha proteína sobre la base de que no se ha demostrado experimentalmente que estuviera unida de forma covalente a los polisacáridos de la pared celular. Desde entonces otras fuentes han subrayado, igualmente, la ausencia de enlace covalente entre los polisacáridos y la proteína de la pared.

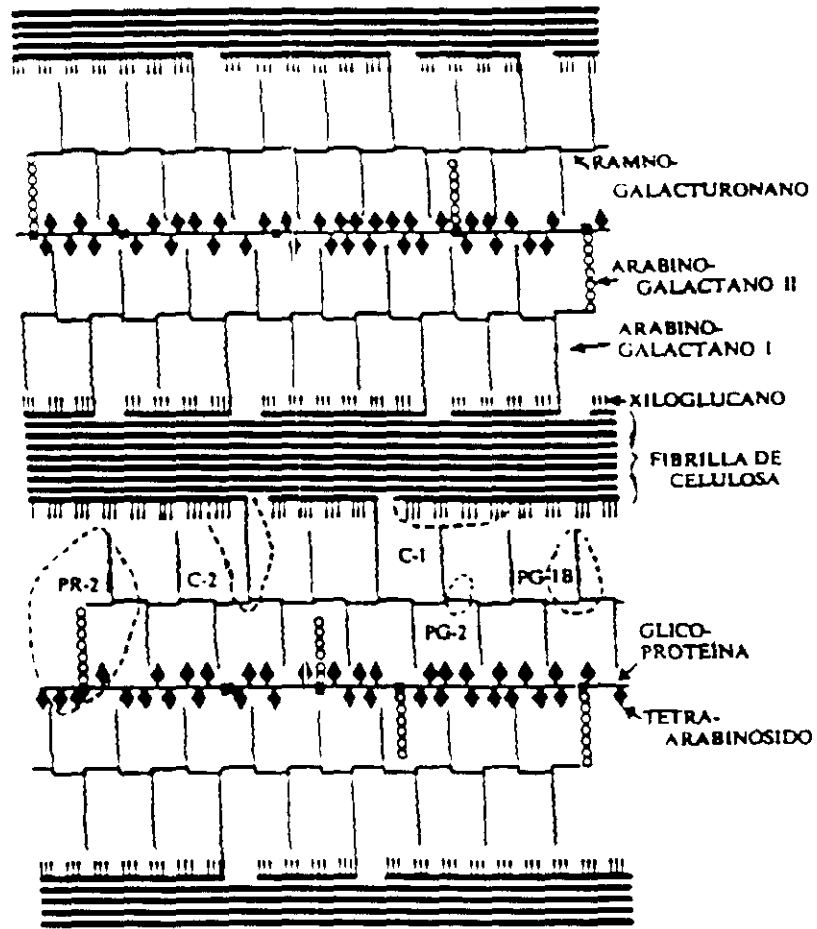


Figura nº 26.- Modelo estructural de pared primaria según Albersheim (Barceló y col., 1992).

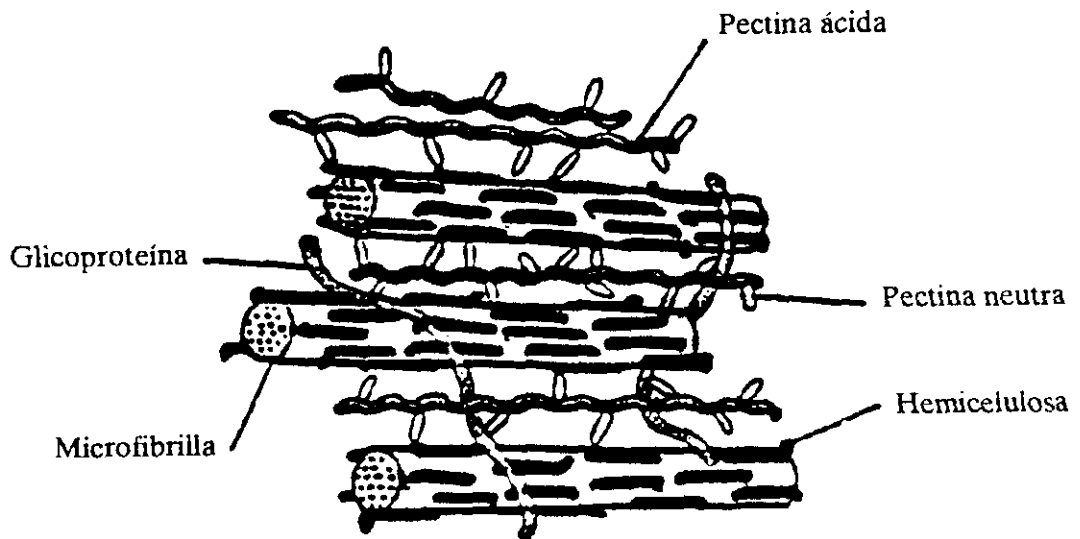


Figura nº 27.- Modelo estructural de pared primaria según Albersheim (Cortés, 1990)

### **\* Modelo de Lamport**

Este modelo se basa en la existencia en la pared de una estructura entramada que consta de dos polímeros: microfibrillas de celulosa penetrando en la malla de una red de extensina, "suspendidas" en un gel hidrofílico de pectina-hemicelulosa. Los esqueletos de celulosa y extensina, aún sin estar covalentemente unidos, están entrelazados por la formación de lazos cerrados de extensina alrededor de las microfibrillas. Esta hipótesis permite que la pared celular sea rígida y al mismo tiempo capaz de extenderse de manera controlada, implicando al xiloglucano en el control de este crecimiento. El xiloglucano unido por puentes de hidrógeno a la celulosa actuaría como un cerrojo que se abre durante su giro, permitiendo que las microfibrillas de celulosa se deslicen a través de la malla de extensina haciendo posible el crecimiento en extensión (Melford y Prakash, 1986) (Figura nº 28).

### **\* Otros modelos**

#### **-Modelo de Monro.**

Este modelo se basa en los estudios hechos sobre paredes celulares de lupino. Coincide con el modelo de Albersheim en la consideración de microfibrillas de celulosa interconectadas por una matriz de polisacáridos.

Este modelo dibujado por Monro en 1976 está recogido por Melford y Prakash en 1986 (Figura nº 29). El esquema se explica de la siguiente forma: la mitad de la figura representa el entramado extensina-hemicelulosa y la otra mitad representa por separado el entramado de sustancias pécticas que se cree no incluye la glicoproteína de la pared, la extensina. Así, las microfibrillas de celulosa están enlazadas entre sí por dos retículos de polímeros separados. El primero está compuesto por glico-proteína de la pared y polisacárido (probablemente hemicelulosas), y el segundo está compuesto por los polímeros pécticos.

#### **-Modelo de Melford y Prakash.**

Todos los esquemas propuestos tratan de explicar la unión de unos polisacáridos a otros pero faltaría explicar con claridad si todas esas uniones dan lugar a varias capas y cómo se disponen éstas.

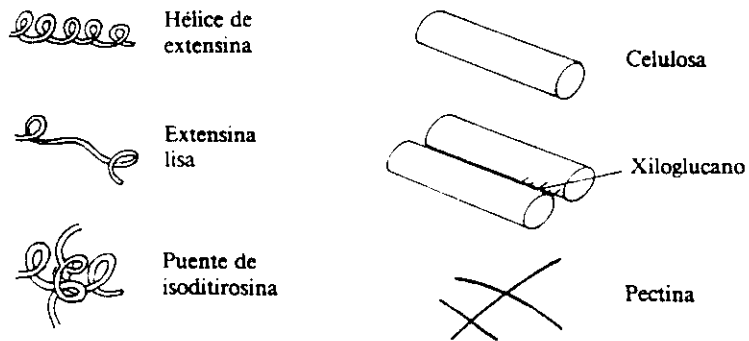
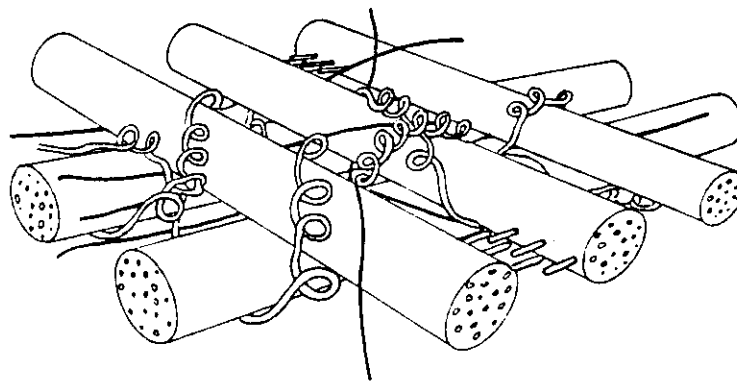
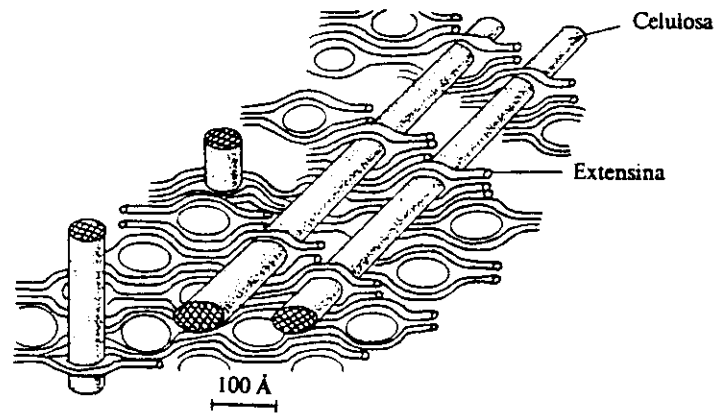


Figura nº 28.- Modelo estructural de pared primaria según Lamport y Epstein (Barceló y col., 1992).

**Cuadro n° II. Contenido relativo de los distintos tipos de polímeros presentes en paredes celulares de monocotiledoneas y dicotiledoneas.**

<b>Componentes</b>	<b>Monocotiledoneas % pared celular</b>	<b>Dicotiledoneas % pared celular</b>
Hemicelulosa	65	24
Xiloglucano	+	+++
Glucuronoarabinoxilano	+++	+
$\beta$ -D-glucano mixto	++	?
Celulosa	15	23
Pectina	10	34
Acido (1→4) $\alpha$ -D-Galacturónico	+	+++
Ramnogalacturonano I	+	++
Ramnogalacturonano II	?	+
Arabinano, galactano, AGP	+	++
Proteína	10	19
Extensina	±	++
AGP	++	++

Dadas las limitaciones que presentan los modelos anteriores, Melford y Prakash (1986) proponen otra forma de representar tridimensionalmente la disposición de los polisacáridos de la pared cuyo esquema se recoge en la figura nº 30.

En este modelo, en la parte más externa de la pared celular se depositan varias capas de pectina que forman un entramado reticular externo que constituye la lámina media. Las cadenas pécticas que forman dichas capas están interconectadas por enlaces covalentes y puentes de calcio, y presentan algunas moléculas de glucosa y xilosa unidas covalentemente. No se proponen uniones covalentes entre las sustancias pécticas y ningún otro componente de la pared celular, si bien algunas regiones de estos polímeros están fuertemente unidas a xiloglucanos por enlaces de hidrógeno. Bajo las capas de la lámina media se sitúan varias capas de fibras de celulosa unidas al xiloglucano mediante enlace no covalente. La unión entre xiloglucanos asociados a la celulosa está facilitada por la glicoproteína rica en hidroxiprolina, a través de uniones no covalentes que incluye puentes de isoditrosina.

#### **3.5.1.2. Pared primaria de plantas monocotiledóneas**

Las paredes celulares primarias de monocotiledóneas, del tipo de las gramíneas, presentan una naturaleza diferente a las paredes de dicotiledóneas, por lo que ninguno de los modelos estructurales anteriormente mencionados es válido para este tipo de plantas.

En el cuadro nº II se compara el contenido relativo de los diversos polímeros presentes en dichas paredes primarias (Carpita, 1990).

En monocotiledóneas, el tipo de polisacárido más abundante son las hemicelulosas, con una proporción entre el 50 y el 70%, siendo el glucuronoxilano el polímero mayoritario, mientras que la proporción de hemicelulosas en dicotiledóneas es inferior y la fracción predominante es el xiloglucano. Al contrario que en las dicotiledóneas, la celulosa es menos abundante en los tejidos de monocotiledóneas; asimismo las sustancias pécticas se encuentran en menor proporción en las monocotiledóneas, aproximadamente un 10% frente a un 34% en las dicotiledóneas. Por último, la proteína es más abundante en dicotiledóneas (Carpita, 1990).

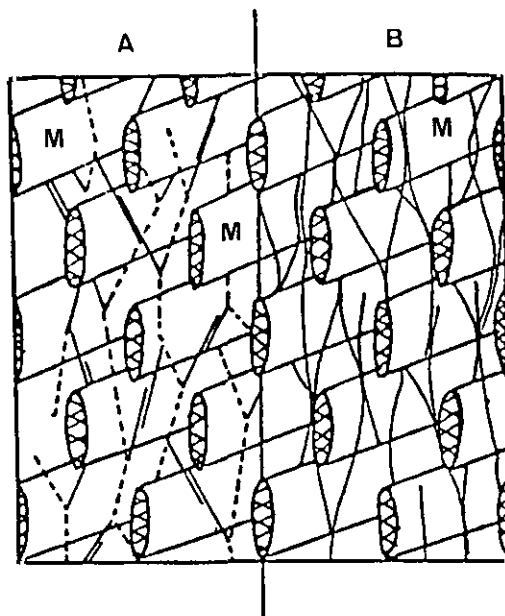


Figura 29.- Modelo estructural de pared primaria según Monro (Melford y Prakash, 1986)  
 A: entramado de extensina-hemicelulosa.  
 B: entramado de sustancias pécticas.  
 M: microfibrillas.

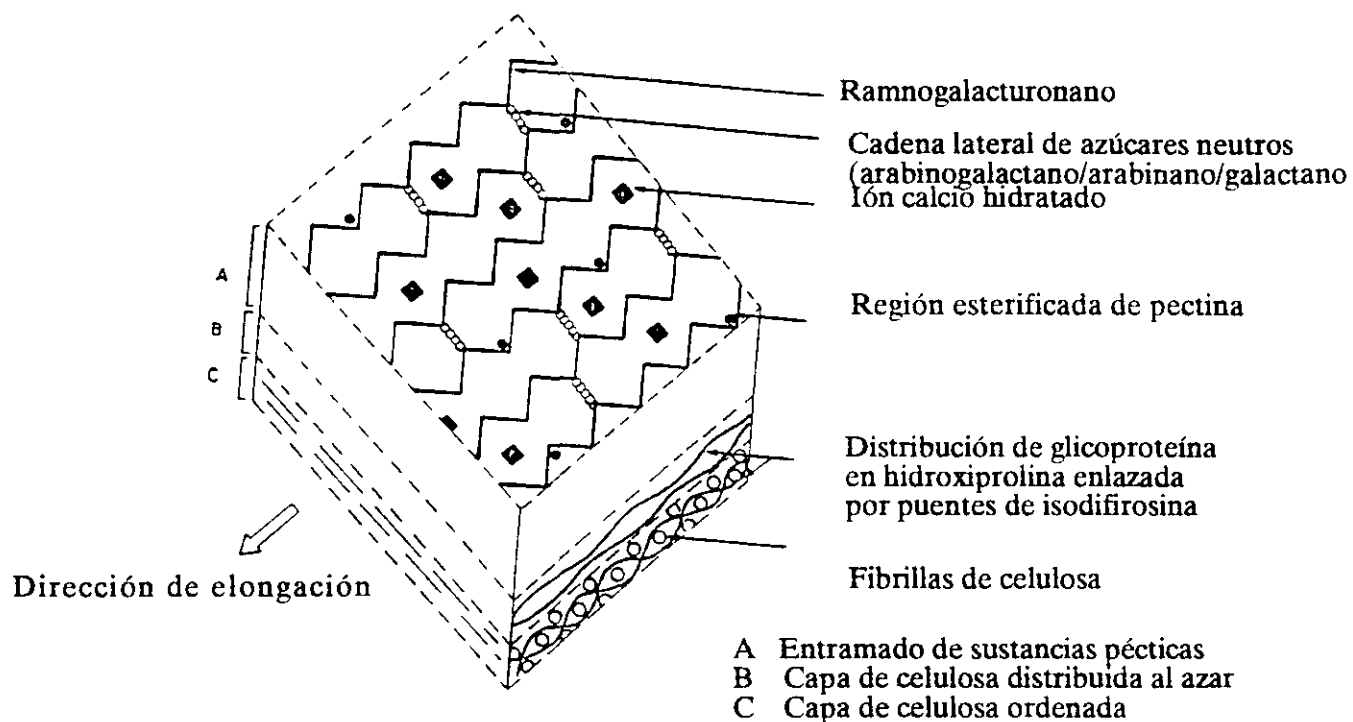


Figura n°30.- Modelo estructural de pared primaria según Melford y Prakash (1986)

### 3.5.2. Pared secundaria

El material fibrilar de la pared secundaria está orientado de forma más regular que en la pared primaria y el ángulo de orientación de este material cambia durante la formación, lo que permite distinguir, según algunos autores (Barceló y col., 1992) varias capas:

-Capa  $S_1$ : es la capa externa o más próxima a la pared primaria, en donde las espirales de celulosa forman un ángulo amplio con el eje celular.

-Capa  $S_2$ : es la capa intermedia y la de mayor tamaño de la pared secundaria.

-Capa  $S_3$ : es la capa interna, que está en contacto con el protoplasto. En esta capa la inclinación de las microfibrillas es menor.

Aparte de la celulosa hay otros polisacáridos como hemicelulosas aunque son relativamente menos abundantes que en la pared celular primaria. Otras sustancias, principalmente lignina, pueden depositarse en esta pared secundaria.

La formación de la pared secundaria está acompañada a menudo por una modificación en la composición de la pared primaria y la lámina media (modificaciones secundarias en la composición). Normalmente la modificación es debida a la impregnación con suberina (suberificación) o con lignina (lignificación). De forma característica la lignificación se inicia en la lámina media progresando gradualmente hacia la pared primaria y, finalmente hacia la secundaria.

Las paredes exteriores, así como las células que bordean los espacios intercelulares en algunos órganos (ej. la cavidad subestomática de las hojas), acumulan cutina. Esta sustancia puede impregnar las paredes (cutinización) y aún depositarse en superficie (cuticularización). La cuticularización no impide el crecimiento de la pared.

## **4. EVOLUCION DEL CONCEPTO DE FIBRA ALIMENTARIA**

El término "fibra alimentaria" corresponde a un grupo de compuestos de diferente estructura química y no siempre bien identificados. En el momento actual todavía no hay acuerdo sobre cuáles son estos compuestos y, menos aún, sobre su actividad fisiológica.

Hellendoorn (1981) se refirió a la fibra alimentaria como "una abstracción". Quizá fue demasiado lejos pero realmente pensar en la fibra alimentaria como un concepto es más adecuado que considerarla una sustancia. De hecho abarca una serie de conceptos cada uno de los cuales tiene su propia validez y sus propias limitaciones. El término fibra alimentaria es simplemente una expresión abreviada que cubre una amplia variedad de conceptos.

El desarrollo de este término pasa por varias etapas que, siguiendo un orden cronológico, se pueden clasificar de la siguiente forma:

- Investigaciones preliminares.
- Estudios epidemiológicos y primeras definiciones.
- Nuevas definiciones y discusión sobre los componentes.

### **4.1. INVESTIGACIONES PRELIMINARES**

La primera referencia bibliográfica que se tiene de la fibra data de 1805 en la cual se denomina "fibra bruta" al residuo que se obtiene por tratamiento químico de la muestra (Heredia, 1980; Asp y Johansson, 1984).

Como puede deducirse de la definición, el concepto de fibra bruta es totalmente analítico y no lleva implícita ninguna consideración respecto a los componentes que en ella figuran ni en cuanto a la trascendencia fisiológica de los mismos.

La inquietud por esta fracción del alimento ha sido constante, a lo largo del siglo XX, en los

investigadores dedicados al campo de la alimentación. Ya en 1929 MacCance y Lawrence clasificaron los carbohidratos en disponibles y no disponibles (Southgate, 1969). Es la primera vez que se hace referencia a la no biodisponibilidad fisiológica de un componente del alimento, sin precisar cuales son las características estructurales que lo hacen indigestible.

Durante los años 30, algunos investigadores como Williams y Olmsted (Asp y Johansson, 1984) aislan analíticamente, mediante tratamientos enzimáticos, un residuo insoluble que representa una confirmación experimental "*in vitro*" de la no disponibilidad fisiológica de ciertos componentes de los alimentos.

Todo este trabajo, bibliográficamente escaso, lleva a acuñar el término "fibra alimentaria" dado como tal por Hipsley en 1953 (Asp y Johansson, 1984). A partir de este momento dos conceptos marcharán unidos: fibra alimentaria y no disponibilidad fisiológica.

En la década de los 60 el máximo exponente de la tendencia a relacionar la fibra alimentaria con su no digestibilidad fisiológica fue Van Soest. En 1966 la define como el "material orgánico insoluble e indigestible por las enzimas de los animales". La dualidad conceptual anteriormente mencionada se ve reflejada en un método que no reproduce ningún tipo de condición fisiológica pero a partir del cual Van Soest identifica unos componentes concretos por primera vez: celulosa, hemicelulosas y lignina. La definición se modifica quedando como sigue: "la fibra es el material insoluble vegetal que no es digestible por las enzimas proteolíticas y diastásicas, y que no puede ser utilizada excepto por la fermentación microbiana en el tracto digestivo de los animales". En esta definición se introducen dos nuevas ideas: la procedencia de la fibra de las células de origen vegetal y el hecho de una posible utilización fisiológica de la misma.

Gran parte de los estudios analíticos correspondientes a esta época, sobre los que se han desarrollado estas ideas, han sido realizados sobre materiales destinados a la alimentación animal.

## 4.2. ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS Y PRIMERAS DEFINICIONES

El concepto y término fibra alimentaria se confirman totalmente en relación con su actividad fisiológica en el organismo humano en el año 1972, a partir de los estudios epidemiológicos realizados por Burkitt y Trowell, según los cuales existe una relación entre carencia de fibra en la dieta y aparición de una serie de enfermedades digestivas y metabólicas (Burkitt y col., 1972). Este hecho significa introducir un nuevo matiz: la repercusión fisiológica más amplia para un componente que era ya admitido como no disponible.

La primera definición de fibra alimentaria dada por Trowell data de 1974 y consiste en lo siguiente: "residuo de las paredes celulares vegetales que no es hidrolizado por las enzimas digestivas del hombre". Se establece así un marco de referencia para la fibra alimentaria dentro de la célula vegetal pero es imprecisa por dos hechos:

- Se refiere a un residuo en el que no se sabe exactamente qué componentes hay.
- Al incluir "las paredes celulares" excluye algunos compuestos no estructurales que, al ser indigestibles, pueden ser considerados como fibra alimentaria.

Por estas razones la definición anterior se modificó para quedar como a continuación se expresa: "polisacáridos y lignina de las plantas que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del hombre" (Trowell y col, 1976).

Parece, pues, que queda unánimemente admitido que la característica fisiológica común a polisacáridos y lignina es la de ser indigestibles por las enzimas del tracto gastrointestinal humano.

Después de los estudios de Burkitt y Trowell (1973) se desarrollará una línea de trabajo totalmente centrada en la alimentación humana que va encaminada a:

- Localizar la fibra alimentaria dentro de la estructura celular correspondiente.
- Definir cuáles son los componentes que forman en realidad la fibra alimentaria.
- Establecer la actividad fisiológica exacta de dichos componentes.

Cada uno de estos puntos está siendo ampliamente debatido en la actualidad. Se han sucedido encadenadamente una serie de definiciones cada una de las cuales amplía a la anterior en cuanto a la incorporación de nuevos conceptos se refiere. Algunas de éstas inciden en lo que ya había señalado Van Soest, pero en todos los casos estas definiciones adolecen de alguna imprecisión.

#### **4.3. NUEVAS DEFINICIONES Y DISCUSION SOBRE LOS COMPONENTES**

Southgate y col. (1978) opinan que la segunda definición dada por Trowell tiene el inconveniente de no considerar como fibra alimentaria a todos aquellos compuestos que, aunque no son de origen vegetal, tienen propiedades semejantes a los componentes de la misma. Por esta razón proponen la siguiente definición: "suma de lignina y de polisacáridos que no son digeridos por las secreciones endógenas del tracto digestivo humano" que es compatible con la hipótesis de Burkitt y Trowell (1975).

Schweizer y Würsch en 1979 y Selvendran y col., también en 1979, aceptan la definición anterior, señalando que, entre los compuestos que quedarían excluidos en la definición de Trowell (Trowell y col., 1976) se encuentran las celulosas modificadas.

De la definición de Southgate se deduce que la fibra alimentaria está formada por una mezcla de materiales de la pared celular, de polisacáridos no estructurales y de polisacáridos utilizados como aditivos alimentarios.

En este momento se dispone de dos ideas unánimemente aceptadas:

- El marco de origen del material que forma la fibra alimentaria.
- La actividad fisiológica que todas ellas comparten.

Sin embargo esta situación no durará mucho tiempo puesto que al intentar concretar qué compuestos forman la fibra alimentaria surge la controversia.

El mismo Southgate, años más tarde propone otra manera de definir la fibra, aunque el

concepto de la misma se mantiene respecto al que sugirió anteriormente: "suma de lignina y de polisacáridos de una dieta que no son  $\alpha$ -glucanos, o de una forma simplificada "suma de lignina y de polisacáridos no almidón". Este investigador añade que se trata de una definición de trabajo, es decir, una aproximación con fines analíticos. De aquí que no se contemplen aquellos componentes de la pared celular que, aunque se encuentran en pequeñas cantidades, podrían modificar la conducta fisiológica de los polisacáridos.

Englyst y col. (1982) proponen una definición que se aproxima al punto de vista mantenido por Southgate, ya que considera la fibra alimentaria como polisacáridos no almidón, exclusivamente, eliminando la lignina.

Por lo dicho hasta el momento, se puede apreciar una tendencia a considerar como fibra alimentaria únicamente a carbohidratos y lignina, sin embargo hay autores que también tienen en cuenta otra serie de compuestos. Así, a principios de los 80 han sido propuestos (Theander, 1983) como componentes de fibra los siguientes:

a) Proteína, taninos y cutina que están frecuentemente asociados con los principales componentes de la pared celular. Parece que todos ellos se comportan como la lignina, presentando resistencia a las enzimas digestivas y a la microflora intestinal.

b) También se indica que habría que considerar a aquellos polímeros y productos de degradación de los constituyentes de los alimentos que son resultado de los procesos térmicos a los que son sometidos. A esta categoría pertenecen los complejos tanino-proteína, los polímeros resultantes de la caramelización y las reacciones de Maillard y el almidón modificado.

Entre estas dos tendencias ha habido ambigüedad en algunos autores como es el caso de Cummings, 1981. Por una parte intenta delimitar el concepto desde un punto de vista químico. Considera que la fibra debe ser definida por los componentes químicos más que en virtud de su actividad fisiológica como propugnaba Trowell. Señala que la fibra alimentaria está formada fundamentalmente por polisacáridos no almidón y los clasifica en celulósicos y no celulósicos, admitiendo la presencia, dentro de los no celulósicos, de hemicelulosas,

sustancias pécticas, polisacáridos de almacenamiento como inulina y goma guar y las gomas y mucílagos vegetales. Sin embargo no desestima la lignina, apoyándose en la importancia que este componente ha demostrado tener en alimentación animal y dado que no se conoce con exactitud lo que sucede a nivel humano. Por otro lado se cuestiona la trascendencia fisiológica que pueda tener la íntima asociación estructural entre almidón y fibra en alimentos como los cereales.

El debate sobre la definición de fibra enfrenta ahora a dos grupos:

-El de Englyst y col. (1982) para el cual la fibra alimentaria está formada únicamente por polisacáridos no almidón, excluyendo claramente la lignina y el resto de las sustancias. Con el tiempo Cummings ha adoptado también esta posición, (Cumming y col., 1985).

-El de otros autores (Asp y col., 1983 y Theander, 1983) que se cuestionan como fibra alimentaria los componentes que se citan posteriormente, en virtud de dos hechos principalmente: su interrelación estructural y la no digestibilidad en el tracto gastrointestinal humano.

Se discute el papel de numerosas sustancias dentro de la fibra alimentaria: lignina y otros polifenoles, proteína indigestible y almidón resistente. Lignina y almidón resistente son ampliamente debatidos mientras que en proteína resistente y taninos trabajan un número limitado de grupos investigadores. En general, la proteína resistente no es tenida en cuenta; sin embargo algunos autores (Trowell, 1988; Saura-Calixto y col., 1991), reivindican que debería ser considerada como componente de la fibra. Respecto a los taninos, se han encontrado en elevada cantidad en los residuos de fibra insoluble (Saura-Calixto y col., 1991).

Mientras que la definición más aceptada considera polisacáridos no almidón y lignina (Asp, 1987), en el Reino Unido se utiliza la de polisacáridos no almidón. En realidad esto es volver, en líneas generales, a la definición de Trowell, pero habiendo definido, desde el punto de vista químico, las diferentes sustancias y habiendo empezado el desarrollo de estudios que permiten comprobar ciertos aspectos de la actividad fisiológica de estas sustancias (Van Soest

1973; Rérat (1978); Fetzer y col., 1979; Kies y col., 1984; Van Soest 1984; Englyst y Cummings, 1985; Englyst y Cummings, 1986; Englyst y Cummings, 1987).

En 1990 el informe de la British Nutrition Foundation (Heaton, 1990) no adopta ninguna postura oficial, dejando el término fibra alimentaria sujeto al discurso científico, pero aconseja a la comunidad científica que se refiera en términos precisos al material en cuestión, ej: salvado de trigo, pectina de citrus, carboximetilcelulosa, etc. Esta nueva forma de trabajo facilita la planificación y descripción de los experimentos pero conlleva una interpretación de los resultados muy restringida (en términos de hipótesis que relacionan enfermedades con hábitos alimentarios).

Esta nueva manera de hacer referencia al material de trabajo parece más científica, ya que a la hora de planificar un experimento es necesario normalmente enfocar hacia una manifestación muy restringida de la fibra, pero para interpretar los resultados es importante dirigirse a la fibra de forma lo más amplia posible, sin perder de vista todos los posibles aspectos involucrados.

En el seno de la Comunidad Económica Europea se han organizado grupos de trabajo cuyos planteamientos obedecen a este enfoque. Así el BCR (Bureau Communautaire de Référence: metrología aplicada y análisis químicos) está llevando a cabo estudios interlaboratorio que permitan la certificación del contenido de fibra en ciertas muestras por diferentes métodos independientemente de la discusión sobre la definición o de la comparación de resultados entre dichos métodos.

Recientemente (Abril, 1993) tuvo lugar la 6ª reunión del Comité de Gestión COST-92 (Dietary Fibre). En ella, Cummings informó sobre las reuniones del comité científico (Food Subcommittee on Dietary Fibre, CEC, DG III) para llegar a una definición oficial de fibra. Tras diversas reuniones sigue sin alcanzarse un acuerdo radicando el principal problema en la inclusión o no del almidón.

## **5. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA FIBRA ALIMENTARIA: INVESTIGACIONES ACTUALES**

### **5.1. ASPECTOS GENERALES**

Durante mucho tiempo la fibra alimentaria ha sido el componente olvidado de los alimentos debido, probablemente, a su valor nutritivo relativamente intrascendente. En los últimos años el interés de los científicos ha ido creciendo progresivamente a partir de los estudios de Burkitt y Trowell (1975). El efecto preventivo de la fibra está en función de sus efectos fisiológicos y éstos, a su vez, de las propiedades fisicoquímicas de la misma.

Cleave fue uno de los primeros en referirse al salvado de trigo como laxante y abogó por dejar de eliminar el salvado y otros elementos, y no por añadir fibra a la dieta. Indicó que los alimentos transformados por el hombre, como azúcar refinada y harina blanca, podrían originar enfermedades (Heaton, 1990).

En aquel momento la epidemiología de las enfermedades crónicas estaba iniciándose y la nutricional no existía como tal. Ambas recibieron un gran estímulo de las hipótesis de Burkitt y Trowell (Heaton, 1990).

Burkitt extendió y popularizó las ideas de Cleave, pero enfatizó el valor protector de la fibra en oposición al efecto dañino de los alimentos en los que se había eliminado la misma. Esta teoría tuvo un gran atractivo para el público y dió a los científicos una hipótesis, aparentemente sencilla, para trabajar.

Desde que se comenzó a destacar la importancia fisiológica de esta fracción del alimento, su consumo se ha asociado al efecto preventivo de una serie de enfermedades como cáncer de colon, diverticulosis, estreñimiento, diabetes, etc. (Burkitt y col., 1972; Hellendorn, 1973; Burkitt y col., 1974; Colmey, 1978; Heredia, 1980; Martínez Para y Torija Isasa, 1980; Trowell y col., 1985) (Figura nº 31).

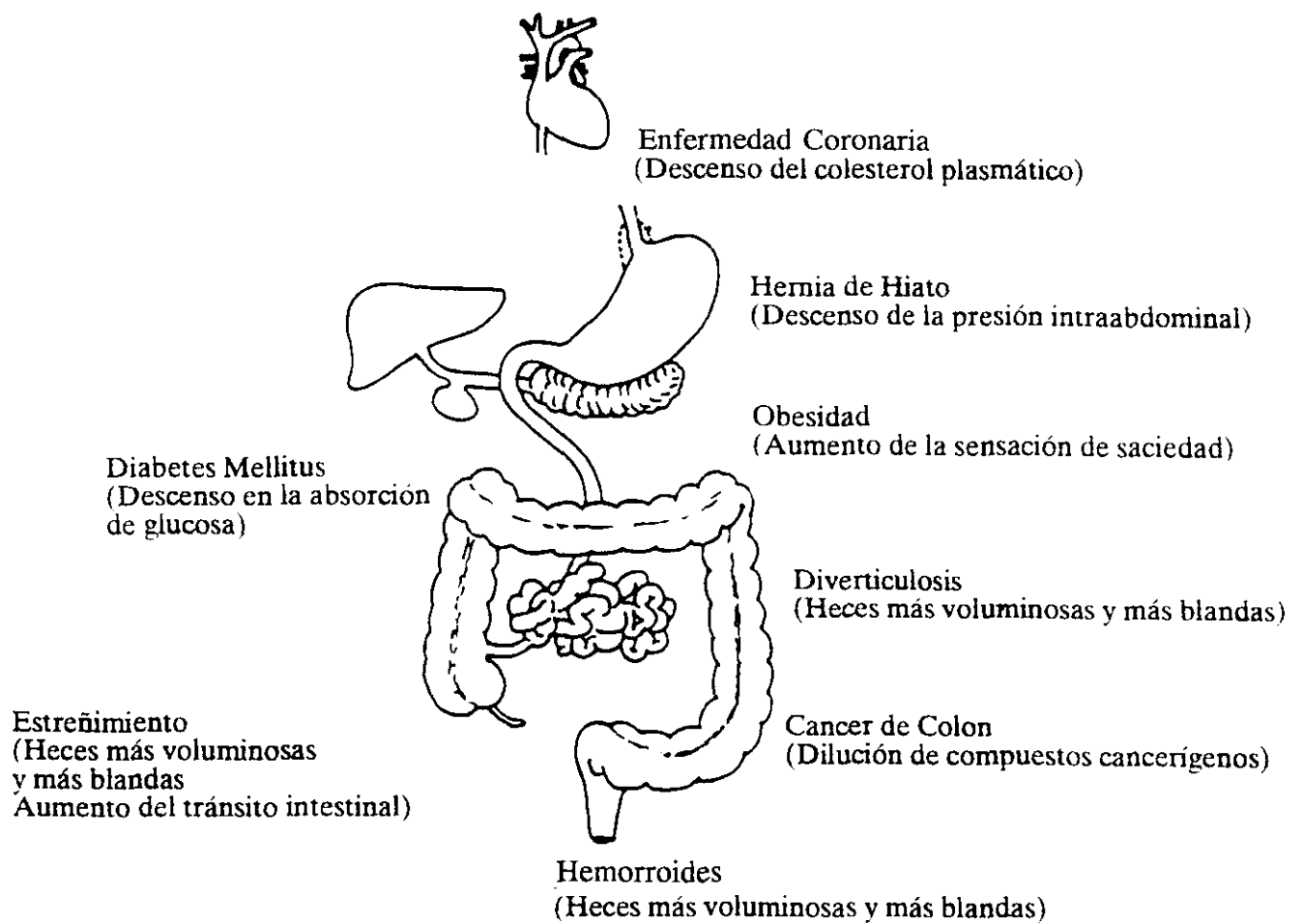


Figura n° 31.- Efectos fisiológicos de la fibra alimentaria y prevención de enfermedades.

La acción beneficiosa de la fibra de cara a la prevención de diversas patologías, como se ha indicado antes, ha sido señalada en la bibliografía de forma reiterada:

-Diverticulosis: Cummings y col., 1978; Olds, 1978; Gear y col., 1979; Fisher y col., 1985.

-Estreñimiento: Harvey y col., 1973; Henning y col., 1986.

-Cáncer de colon: Burkitt, 1978; McLennan, 1978; Cummings, 1981; Sjöding y col., 1985; O'Neill y col., 1990a; O'Neill y col., 1990b; Szende y col., 1990; Benito y col., 1991.

-Arteriosclerosis y cardiopatías: Lebeille y Sauberlich, 1966; Sundaravalli y col., 1971; Heaton y Pomare, 1974; Kies y Fox, 1977.

-Diabetes: Jenkins y col., 1977; Olds, 1978; Worthington-Roberts, 1981; Zavoral y col., 1983; Bantle, 1988; Scott y col., 1988; Akanji y col., 1989; Hollander y Szekely, 1989; Malmlof y col., 1989; Carra y col., 1990; Kirsten y col., 1991; Librenti y col., 1992.

-Obesidad: Worthinton-Roberts, 1981; Rigaud y col., 1987; Solum y col., 1987.

-Hipercolesterolemia: Judd y Truswell, 1981; Anderson y Gustafson, 1988; Hoagland, 1989; Mongeau y col., 1990; Klopfenstein, 1990; Anderson y col., 1990; Cobiac y col., 1990; Riccardi y Rivellese, 1991; Bridges y col., 1992.

En algunos casos se habla de componentes en particular y en otros se considera la fibra como un todo. No se indican en profundidad los mecanismos que dan lugar a los efectos beneficiosos que se citan, aunque todos los autores coinciden en señalar la relación existente entre las propiedades fisicoquímicas de la fibra alimentaria y sus efectos fisiológicos.

Algunos investigadores (Eastwood, 1992; Eastwood y Morris, 1992) están llevando a cabo estudios muy rigurosos, centrándose en los polisacáridos como principales constituyentes de la fibra alimentaria y en el hecho de que estos compuestos tienen un amplio espectro de propiedades fisicoquímicas en función de su estructura.

La determinación cuantitativa de la fibra alimentaria no permite predecir su acción biológica, ya que los efectos fisiológicos dependen fundamentalmente de las propiedades fisicoquímicas, que no están relacionadas directamente con la composición química (Schneeman, 1986; Brosio, 1992).

La fibra alimentaria, como se ha visto, no es un único compuesto sino una mezcla de componentes que pueden presentarse de una forma aislada o integrados en una estructura tan compleja como es la pared celular de los vegetales.

Se puede hablar, por un lado, de las cadenas de polímeros que se agrupan en conjuntos ordenados, como es el caso de las fibrillas de celulosa, que son casi resistentes a la hidratación y al ataque enzimático, por otro lado, de las cadenas de polisacáridos que pueden existir en solución como "hélices desordenadas", presentando entre ellas interacciones físicas, que son fácilmente accesibles a la acción de las enzimas, tales como las sustancias pécticas. Por último, habría que hablar de los entramados reticulares hidratados típicos de las paredes celulares de los tejidos vegetales.

En cada caso en particular, los enlaces se estabilizan o se rompen en determinadas circunstancias. Así, por ejemplo, las uniones ordenadas se estabilizan con enlaces no covalentes muy débiles y es necesario un cierto número de ellos para conferir fortaleza, lo que implica una determinada longitud de la cadena. Son muy susceptibles a pequeños cambios de temperatura y de concentración de sólidos disueltos. Las propiedades reticulares de polisacáridos específicos dependen en gran parte del espaciado entre irregularidades estructurales minoritarias a lo largo de la cadena, en lugar de depender de la composición general como la determinada en su análisis, que informa de la proporción de azúcares constituyentes.

En las estructuras de la pared celular las propiedades fisicoquímicas y la actividad fisiológica son función de la integridad de la propia pared. Dicha integridad depende de la alteración del tejido, del grado de maduración y de los tratamientos a los que se someta.

La fibra alimentaria puede actuar en el tracto digestivo de tres formas principalmente:

- como conjuntos macromoleculares,
- como cadenas de polímeros solubles,
- como conjuntos reticulares, hinchados e hidratados.

Aunque algunos de los componentes de la fibra son intrínsecamente insolubles (celulosa),

otros pueden cambiar su forma física con el tiempo por la agitación mecánica debida a los movimientos peristálticos y/o por la alteración de sus condiciones físicas a lo largo del tracto gastrointestinal (sustancias pécticas y hemicelulosas). En general, tales cambios irán destinados a aumentar la solubilidad e hidratación de la fibra; sin embargo, ciertos componentes, particularmente los polisacáridos cargados, tales como las sustancias pécticas, pueden encontrar en el lúmen condiciones que impidan o reviertan el proceso de hidratación (cambios en el pH, asociaciones intercadena promovidas por contraiones específicos, reducción de la calidad del solvente por pequeños solutos o por coacervación con proteínas).

Para explicar las propiedades fisiológicas, la fibra alimentaria se compara a un sistema fisicoquímico de las siguientes características (Eastwood y Brydon, 1985):

Los componentes de la fibra soluble se pueden considerar como integrantes de una fase de sol continua en la que los constituyentes insolubles e hidratados se dispersan como una fase de partículas discontinuas. Las partículas de diferente composición química y/o forma física pueden ser consideradas como constituyentes de fases discontinuas separadas. De forma semejante, otros componentes de la dieta que no forman parte de la fase continua homogénea (por ejemplo, grasa que no está en micelas) pueden ser tratados como fases separadas. En tales sistemas de dos fases o de multifases ciertas propiedades fisicoquímicas, como la densidad, obedecen a una simple regla de mezclado; sin embargo, otras como la viscosidad son mucho más complejas y puede ser muy difícil o imposible predecir el comportamiento a partir de las fases individuales aisladas (Eastwood y Morris, 1992).

En el cuadro n° III se pueden observar las propiedades fisicoquímicas más importantes de la fibra alimentaria y su relación con los efectos fisiológicos.

A continuación se hará una breve descripción de los efectos más estudiados que se resumían en la figura n° 31, y se exponen en relación con las propiedades físicoquímicas en cuadro n° III.

**Cuadro nº III. Relación entre las propiedades fisicoquímicas de la fibra alimentaria y sus efectos fisiológicos.**

<b>PROPIEDAD FISICOQUIMICA</b>	<b>EFECTO FISIOLÓGICO</b>
Viscosidad	Retardo del vaciamiento gástrico. Disminución de la absorción de nutrientes Descenso del colesterol plasmático
Capacidad de retención de compuestos orgánicos	Descenso de la absorción de nutrientes Descenso del colesterol plasmático
Susceptibilidad a la fermentación bacteriana	Descenso del colesterol plasmático Aumento del tránsito intestinal Aumento del peso de las heces
Capacidad de retención de agua	Aumento del peso de las heces
Capacidad de intercambio iónico	Descenso de la absorción de cationes

## **5.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS MÁS IMPORTANTES**

### **5.2.1. Retardo del vaciamiento gástrico**

La presencia de polisacáridos solubles hace que la velocidad de vaciamiento gástrico disminuya y el tiempo aumente. Estos polisacáridos, polímeros hidrofílicos, tienen la propiedad de formar en medio acuoso soluciones viscosas, esta propiedad hace que el contenido estomacal se haga también viscoso y el vaciamiento gástrico más lento.

El efecto que se deriva de esta lentitud en el paso del contenido estomacal al intestino es un aumento de la sensación de saciedad después de las comidas. Este efecto se ha asociado con la prevención de la obesidad.

Algunos investigadores opinan que no hay correlación entre el aumento del tiempo de vaciamiento gástrico y la absorción intestinal de nutrientes (Edwards, 1990), otros asocian este efecto a un descenso en la absorción (Schneeman, 1986).

### **5.2.2. Descenso de la absorción de nutrientes**

Diversos estudios han demostrado que la ingesta de fibra da lugar a un menor incremento de la glucosa plasmática después de las comidas, a un descenso de la absorción de carbohidratos, lípidos y otros nutrientes (Edwards, 1990; Eastwood, 1992; Eastwood y Morris, 1992).

La absorción de nutrientes en el intestino delgado se debe a dos mecanismos:

1) Las contracciones intestinales crean una turbulencia que mezcla el contenido luminal y aproxima los nutrientes al epitelio.

2) Los nutrientes difunden a través de la capa de fluido adyacente a la mucosa intestinal.

Los polisacáridos solubles, debido a la viscosidad que originan, disminuyen la turbulencia,

el mezclado del contenido luminal, la interacción con enzimas y la disgregación de partículas sólidas, y aumentan el grosor de la capa adyacente al epitelio disminuyendo la difusión.

Se ha hablado también de que los polisacáridos solubles secuestran, en el gel que forman, nutrientes, enzimas digestivas y ácidos biliares, e incluso de una acción directa sobre el epitelio intestinal (Schneeman, 1987).

Los polisacáridos insolubles tienen poco efecto en la fisiología del intestino delgado aunque también descienden, en menor medida, la glucemia postprandial (Edwards, 1990). Este efecto se asocia con la presencia de almidón resistente. Se ha postulado que el mecanismo que tiene lugar es el secuestro por adsorción de carbohidratos en la matriz que forman y que es resistente al ataque de enzimas pancreáticas.

Este efecto en la absorción, sobre todo de glucosa, ácidos biliares y colesterol, tiene importancia respecto a la prevención de la obesidad, de la diabetes, de la hipercolesterolemia y de las cardiopatías que de ella se derivan.

### **5.2.3. Descenso del colesterol plasmático**

Los polisacáridos solubles fijan ácidos biliares y colesterol en el intestino delgado y reducen su reabsorción en el ileon terminal. Por consiguiente, es mayor la cantidad de ácidos biliares que llega al colon para su excreción con las heces y menor la que regresa al hígado por medio de la circulación enterohepática. Esto se interpreta como una señal para aumentar la síntesis de estos ácidos en el hígado. Como los hepatocitos catabolizan colesterol para formar ácidos biliares, su concentración disminuye en el interior de la célula y esto produce el paso de colesterol desde el plasma disminuyendo allí su concentración (Kohn y Ribeiro, 1991).

En el colon, la celulosa y la lignina prácticamente no son fermentables; las sustancias pécticas sí lo son y las hemicelulosas parcialmente (Eastwood, 1986; Schneeman, 1986).

La fermentación bacteriana de la fibra soluble da lugar a la producción de ácidos grasos de cadena corta, metano, anhídrido carbónico, hidrógeno y agua. Una gran cantidad de los

ácidos grasos producidos (acético, butírico y propiónico) es absorbida por la mucosa del colon y llega a la vena porta. Se ha demostrado que el ácido propiónico inhibe tanto la biosíntesis hepática de colesterol como la periférica y aumenta su aclaramiento plasmático (Kohn y Ribeiro, 1991).

El descenso del colesterol plasmático, promovido por la ingesta de fibra, se puede considerar como una prevención de la arterosclerosis y arteriopatía coronaria.

#### **5.2.4. Aumento del peso de las heces**

En algunos estudios se ha observado que de los constituyentes de la dieta, sólo la fibra alimentaria influye en el peso de las heces (Eastwood y col., 1984).

Los diferentes tipos de fibra difieren en su capacidad para alterar este peso (Audiotomre y col, 1990). El salvado de trigo (fibra insoluble, principalmente) tiene una acción eficaz y predecible, mientras que en el caso de frutas y verduras (sobre todo fibra soluble) el efecto es impredecible.

El peso de la heces se ve aumentado por la propia presencia física de la fibra que ha resistido la degradación bacteriana (fibra insoluble) y por la retención de agua que origina (fibra soluble).

Los polisacáridos solubles tienen una gran capacidad hidrofílica por la presencia de restos de azúcares con grupos polares libres. La celulosa, con enlaces intermoleculares, tiene poca capacidad de retención de agua.

En contra de lo que se podría esperar, los polisacáridos solubles tienen muy poca influencia en el peso de las heces debido a que fermentan con mucha facilidad en el colon. Esta fermentación produce un aumento en el crecimiento microbiano que no da lugar a un aumento en el peso de la heces pero hay un efecto osmótico añadido de los productos de la fermentación bacteriana en la masa fecal. Los ácidos grasos producidos pueden tener un papel importante en el peso fecal y en el tiempo del tránsito.

Se ha visto que un aumento de ácidos grasos de cadena corta en heces da lugar a un aumento en la eliminación de agua fecal (Eastwood, 1992).

La degradación bacteriana se asocia con un descenso del tiempo del tránsito intestinal y con el aumento de la frecuencia de las deposiciones. La fermentación acelera el tránsito por mecanismos poco claros. Se producen compuestos gaseosos (metano, anhídrido carbónico e hidrógeno) y ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico y propiónico). Los compuestos gaseosos pueden distender el intestino y facilitar la evacuación. El ácido butírico y el propiónico estimulan las contracciones del colon medio y distal. También tiene lugar por la fermentación bacteriana la liberación de ácidos biliares y de ácidos grasos que estaban adsorbidos en la fibra en el intestino delgado. Estos compuestos por la acción bacteriana se transforman en sustancias con propiedades laxantes (Edwards, 1990).

El metabolismo bacteriano produce cambios en los contenidos colónicos que alteran la osmolalidad y la absorción. Las observaciones realizadas se pueden aplicar a otras sustancias poliméricas de la dieta: proteínas, grasa y almidón. El tiempo de mantenimiento de una estructura física particular varía a lo largo de tracto gastrointestinal. En el caso de la proteína y el almidón gelatinizado la capacidad de inmovilización de agua es transitoria porque se digieren rápidamente. El almidón original y retrogradado inmovilizan el agua de una forma mucho más persistente (Eastwood, 1992).

En la actualidad se está llevando a cabo un estudio dentro de los proyectos pertenecientes al programa "Food Linked Agro-Industrial Research" (FLAIR 1989-1993) (DG XII. CEE), cuyo objetivo es el conocimiento de las implicaciones fisiológicas del consumo de almidón resistente.

Masas fecales más voluminosas y más blandas suponen un menor esfuerzo para la evacuación, reduciendo de esta forma el riesgo de procesos tales como la formación de divertículos, hernia de hiato y venas varicosas, que tienen todos en común la elevación de la presión intraabdominal. La dieta rica en fibra que produce heces más blandas y menos esfuerzos es también eficaz para el tratamiento de las hemorroides.

La fibra alimentaria puede reducir la producción y excreción en el organismo de carcinógenos fecales y determinados estudios han revelado una relación inversa entre ingesta de fibra e incidencia de cáncer de colon (Kohn y Ribeiro, 1991). También se ha hablado de que la fibra ejerce, al retener agua, un efecto de dilución de los compuestos cancerígenos.

Por último, respecto a los efectos fisiológicos de la fibra alimentaria en el organismo, hay que insistir en que el tipo de efecto depende de cada tipo de fibra en particular y que los mecanismos más profundos que expliquen los efectos producidos están todavía por dilucidar.

Los últimos congresos científicos dedicados monográficamente a la fibra alimentaria, así como proyectos internacionales coordinados dedican especial atención al tema de los efectos fisiológicos.

En la conferencia europea "Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects", celebrada en 1990 en Norwich (Reino Unido), se trató de los efectos en el intestino delgado, en el grueso y de las repercusiones en el metabolismo de minerales. En la siguiente, titulada "Topics in Dietary Fibre Research" (Roma, 1992) se expusieron gran cantidad de acciones de la fibra alimentaria, destacando la relación con el cáncer en diferentes regiones del intestino. El próximo congreso bianual se celebrará en Nantes (Francia) en junio de 1994 y se denominará "Dietary Fibre. Mechanisms of Action in Human Physiology and Metabolism" y tendrá como temas prioritarios, entre otros, la digestión en el tracto gastrointestinal superior, fermentación y control de la actividad metabólica de las bacterias, fermentación y fisiología gastrointestinal y metabolismo de los nutrientes.

## **6. METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE FIBRA ALIMENTARIA**

El análisis de la fibra alimentaria va encaminado al conocimiento e identificación de una forma exacta de cada uno de sus componentes y a su cuantificación, teniendo en cuenta el concepto fisiológico de la misma.

La evolución metodológica abarca desde tratamientos sencillos, de aislamiento y posterior gravimetría, hasta aquellos que permiten identificar diferentes fracciones dentro de la fibra alimentaria, bien mediante colorimetría o bien por medio de técnicas cromatográficas.

### **6.1. METODOS PARA LA DETERMINACION DE FIBRA BRUTA**

El primer método para evaluar fibra data de los primeros años del siglo XIX aunque no hay acuerdo sobre la fecha exacta (1805, 1809) (Monte y Vaugham, 1982); se denomina método de Weende (Asp y Johansson, 1984) y el tratamiento de la muestra se realiza mediante un ataque secuencial con ácido ( $H_2SO_4$ ) y álcali (NaOH) al 1,25% y al residuo insoluble obtenido por filtración se le denomina fibra bruta. Es el primer método que se conoce para el análisis de fibra. En un primer momento se destinó al análisis de forrajes y posteriormente se aplicó al análisis de alimentos. En la actualidad se utiliza para el primero de los objetivos.

Williams y Olmsted (Asp y Johansson, 1984) indicaron que este método no valora un 40% de los carbohidratos no disponibles, y Van Soest y McQueen en 1973 precisaron que un 80% de las hemicelulosas, un 60% de la lignina y un 50% de celulosa no se cuantifican. Otros autores (Burdaspal y col., 1980) han señalado la gran diferencia cuantitativa que se produce al emplear un método de fibra bruta para evaluar la fibra alimentaria. Así pues los valores reales de lo que hoy día se entiende por fibra pueden ser unas cinco veces superiores a los valores de fibra bruta (Dreher, 1987).

## 6.2. METODOS DETERGENTES

En el método de Weende el tratamiento con hidróxido sódico se utiliza para la eliminación de constituyentes nitrogenados. Sin embargo, se produce abundante gelatinización de almidón y pérdida de lignina en el filtrado. Para corregir estos inconvenientes se propuso utilizar exclusivamente una digestión ácida, denominándose el residuo obtenido en este caso Fibra Normal Acida (NAF) (Walker y Hepburn, 1955). Este método no permite una disolución total de la proteína por lo cual no es considerado totalmente satisfactorio. Según Van Soest (1963), la estimación del valor real de esta fracción por este método es menos exacta que la obtenida por el método de la fibra bruta, a menos que se utilicen tiempos de digestión excepcionalmente largos.

Puesto que los detergentes aniónicos han demostrado facilitar la disolución de proteínas en un medio ligeramente alcalino y los compuestos de amonio cuaternario son eficaces para la disolución de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, se estudia su utilidad en la preparación de residuos de fibra con un contenido bajo en nitrógeno a partir de forrajes. Por otra parte, la sustitución del hidróxido sódico por un detergente adecuado podría ayudar a mantener la integridad de la fracción de lignina ya que las condiciones serían más suaves.

Van Soest inicia en 1963 la publicación de una serie de trabajos en los que propone el uso de soluciones detergentes a pH ácido y neutro para el análisis de fibra alimentaria.

En el primer artículo (Van Soest, 1963a) presenta datos sobre la capacidad de una serie de detergentes para eliminar el nitrógeno en forrajes. Se estudian los factores que afectan a la obtención y composición de la fibra, utilizando soluciones detergentes a distintos valores de pH. Los detergentes utilizados a pH neutro fueron: lauril sulfato sódico, aril alquil sulfonato sódico, miristato sódico, cloruro de cetil piridinio, bromuro de cetil trimetil amonio, lauril amina, tween 21 y monolaurato de etilen glicol.

En general los detergentes aniónicos extrajeron más nitrógeno a pH muy bajo.

Van Soest indica que, aunque es difícil medir de una forma precisa la fibra alimentaria, el

término debería implicar un residuo que esté estrechamente relacionado con la indigestibilidad.

El método ácido detergente (Van Soest, 1963b) utiliza bromuro de cetil trimetil amonio en  $H_2SO_4$  1N y determina, en principio, celulosa y lignina.

Según este autor el método da una buena correlación entre fibra alimentaria y digestibilidad en 18 forrages ( $r=-0.79$ ), mientras que en el caso de la fibra bruta es algo menor ( $r=-0.73$ ).

En el residuo de Fibra Acido Detergente (FAD) se estudia, de forma más detallada, el contenido de lignina y proteína en alimentos que han sido sometidos a varios procedimientos de calentamiento y desecación revelándose que el método es sensible frente al daño debido a las reacciones de pardeamiento no enzimático.

A continuación tiene lugar el desarrollo del método neutro detergente (Van Soest, 1967). Se utiliza como detergente lauril sulfato sódico y se evalúa igualmente fibra insoluble, pero en este caso incluye, además de celulosa y lignina, también hemicelulosas.

El reactivo lleva en su composición edetato sódico, agente complejante que permite la solubilización de sustancias pécticas (Belo y Lumen, 1981).

Este método ha sido adaptado para el análisis de alimentos ricos en almidón, para el análisis de heno (Golding y col., 1985) y para la determinación de sustancias pécticas (Belo y Lumen, 1981).

Para el primer grupo de alimentos, se propone la introducción de una enzima amilolítica, bien antes del tratamiento con el detergente (McQueen y Nicholson, 1979), en mitad de dicho tratamiento (Robertson y Spiller, 1977; Robertson y van Soest, 1977) o después del mismo (AACC Committe on Dietary Fiber, 1981; Asp y Johansson, 1984).

Para el análisis de heno, se sugiere la eliminación de sulfito sódico en aquellas muestras que

contienen un 30% o menos de proteína, y la eliminación de decalina ya que produce un aumento del valor de la Fibra Neutro Detergente (FND). Belo y Lumen (1981) establecen un método para la determinación de sustancias pécticas después de tratar la muestra con la solución detergente.

Heller (1977) estudia la influencia de factores como el pH y el tamaño de partícula en la pérdida de hemicelulosas, comprobando que, en salvado de trigo, pericarpo de maíz purificado y tegumento de cacahuete, el contenido de hemicelulosas desciende al disminuir el tamaño de partícula y al aumentar el pH.

Con el tiempo, el método neutro detergente ha resultado ser el mejor que existe para el análisis de fibra alimentaria en heces, dada su gran eficacia en la eliminación del nitrógeno proteico (Slavin y Marlett, 1983).

En el análisis de alimentos los métodos detergentes presentan una serie de inconvenientes que han sido señalados reiteradamente en la bibliografía.

Dreher (1987) resume algunos inconvenientes del método ácido detergente:

1) Los alimentos ricos en almidón, proteína o grasa son muy difíciles de filtrar (Van Soest y McQueen, 1973).

2) La posible precipitación de ácidos orgánicos puede causar valores anómalos (Robertson y Van Soest, 1981).

3) El residuo puede formar grumos e interferir en la subsiguiente determinación de lignina (Robertson y Van Soest, 1981).

4) Una muestra de pequeño tamaño puede hacer difícil la medida de la precisión, y el aumento de la misma puede producir espuma y otras dificultades en la filtración (Southgate, 1986).

Respecto a los inconvenientes del método neutro detergente, Selvendran y Dupont (1984) indican pérdidas de lignina y componentes solubles en el detergente y la contaminación del residuo con almidón modificado, llevando a una valoración falsa de FND. Wolters y col. (1992) y Redondo y col. (1990) coinciden en detectar la presencia de una proporción considerable de ácido urónicos en el residuo neutro detergente.

Aunque la diferencia FND-FAD puede ser estimada teóricamente como hemicelulosas, en la práctica esta consideración es errónea debido a:

1. Las sustancias pécticas, taninos y sílice se disuelven durante el tratamiento con detergente neutro, pero son parte del residuo FAD. Esto podría originar un descenso en la estima de hemicelulosas.

2. La proteína de la pared celular se recupera en el residuo FND y se disuelve en el FAD. Esto podría originar un aumento en la estimación de hemicelulosas.

Experimentalmente, Schweizer y Würsch (1979) han comprobado, en patata y en coliflor, que los valores de FND y FAD son muy similares dado el bajo contenido de hemicelulosas que presentan estos vegetales. Este hecho ha sido constatado igualmente en berenjena, calabacín y pepino por Redondo y col. (1987). Morrison en 1980 indica que puede haber una retención parcial de hemicelulosas por parte de la lignina y la celulosa. Cummings en 1981 y Saura-Calixto y col. en 1983 señalan que se puede producir contaminación del residuo de FAD con restos de proteína, e incluso una solubilización parcial de lignina en el tratamiento con la solución detergente ácida. Por último, Marlett y Lee (1980) indican que en el residuo de FAD puede ir incluida una parte de las sustancias pécticas. Añaden que el tratamiento con el detergente a pH ácido parece extraer las pectinas de los tejidos no foliares pero no totalmente de los foliares.

Los métodos detergentes de Van Soest han sido ampliamente utilizados en el análisis de todo tipo de alimentos, aunque la necesidad de aplicar el concepto de digestibilidad había sido señalada ya con anterioridad por Remy en 1931, Williams y Olmsted en 1935, Macy en 1942 y Weinstock y Benham en 1951, que proponen el análisis de fibra según métodos enzimático-

gravimétricos (Asp y Johansson, 1984).

### 6.3. METODOS ENZIMATICO-GRAVIMETRICOS

El tratamiento en este caso se hace sometiendo la muestra a la acción de enzimas que eliminan fundamentalmente almidón y proteína.

Algunos de estos métodos evalúan la fibra alimentaria sin diferenciar entre sus distintas fracciones: soluble e insoluble. Otros, sin embargo permiten realizar este tipo de fraccionamiento.

Se han propuesto numerosos métodos enzimáticos que, con el paso del tiempo, han ido incluyendo enzimas de mayor eficacia. En el cuadro n<sup>o</sup> IV figura un resumen de los principales métodos enzimático-gravimétricos y se detallan los tipos de enzimas utilizados por cada autor.

En general se puede decir (Greenwood y Milne, 1968) que dentro de las  $\alpha$ -amilasas el mecanismo de acción depende de la fuente de la enzima. Hidrolizan enlaces  $\alpha$ -D-1,4. No hidrolizan maltosa y al actuar sobre las amilosas sustituidas determinados grupos representan impedimento estérico para la enzima. La  $\alpha$ -amilasa de cereales tiene una afinidad mucho más baja para azúcares pequeños que para los grandes, mientras que las enzimas de mamíferos tienen una afinidad similar por ambos tipos de sustratos. Para las  $\alpha$ -amilasas de bacterias y hongos, en el caso de *B. subtilis* existe mayor afinidad por la amilosa que por las dextrinas. Hidrolizan amilosa a D-glucosa y maltosa.

Remy utiliza enzimas amilolíticas y proteolíticas para solubilizar el almidón y la proteína. Williams y Olmsted emplean pancreatina acompañada de una hidrólisis ácida. Macy modifica el método anterior para evaluar hemicelulosas. Weinstock y Behan se encuentran entre los primeros en utilizar enzimas de origen microbiano para eliminar almidón y proteína, pero estas eran de uso industrial y cuando dejaron de utilizarse con este fin dejaron de estar disponibles en el mercado. Posteriormente en los años setenta Salo y Kotilainen utilizan

**Cuadro n° IV. Principales métodos enzimático-gravimétricos y enzimas que utilizan**

AUTOR	ENZIMAS
McCance y Lawrence (1929)	Takadiastasa
Williams y Olmsted (1935)	Pancreatina
Weinstock y Benhan (1951)	Enzimas microbianas
Salo y Kotilainen (1970)	Pepsina o tripsina
Thomas (1975)	Pancreatina Rhozyme
Hellendoorn (1975)	Pepsina Pancreatina
Elchalzy y Thomas (1976)	Amiloglucosidasa Tripsina
Furda (1977)	Amilasa de <i>B. subtilis</i> Proteasa
Schweizer y Würsh (1979)	Pepsina Pancreatina
Asp y Johanson (1981)	Pepsina Pancreatina
Asp y Johanson (1983)	Termamyl Pepsina Pancreatina
Meuser y col. (1983)	Amiloglucosidasa Pancreatina/Tripsina
Prosky y col. (1984)	Termamyl Proteasa de <i>B. Subtilis</i> Amiloglucosidasa

pepsina o tripsina (diastasa). Thomas, incluye pancreatina y otra amilasa. Hellendoorn (1975), pepsina y pancreatina, lo cual constituye un potente tratamiento enzimático, sirviendo este método de modelo para otros. Elchalzy y Thomas emplean el tratamiento de la muestra en autoclave para gelatinizar el almidón y asegurar su hidrólisis óptima con amiloglucosidasa (Asp y Johansson, 1984).

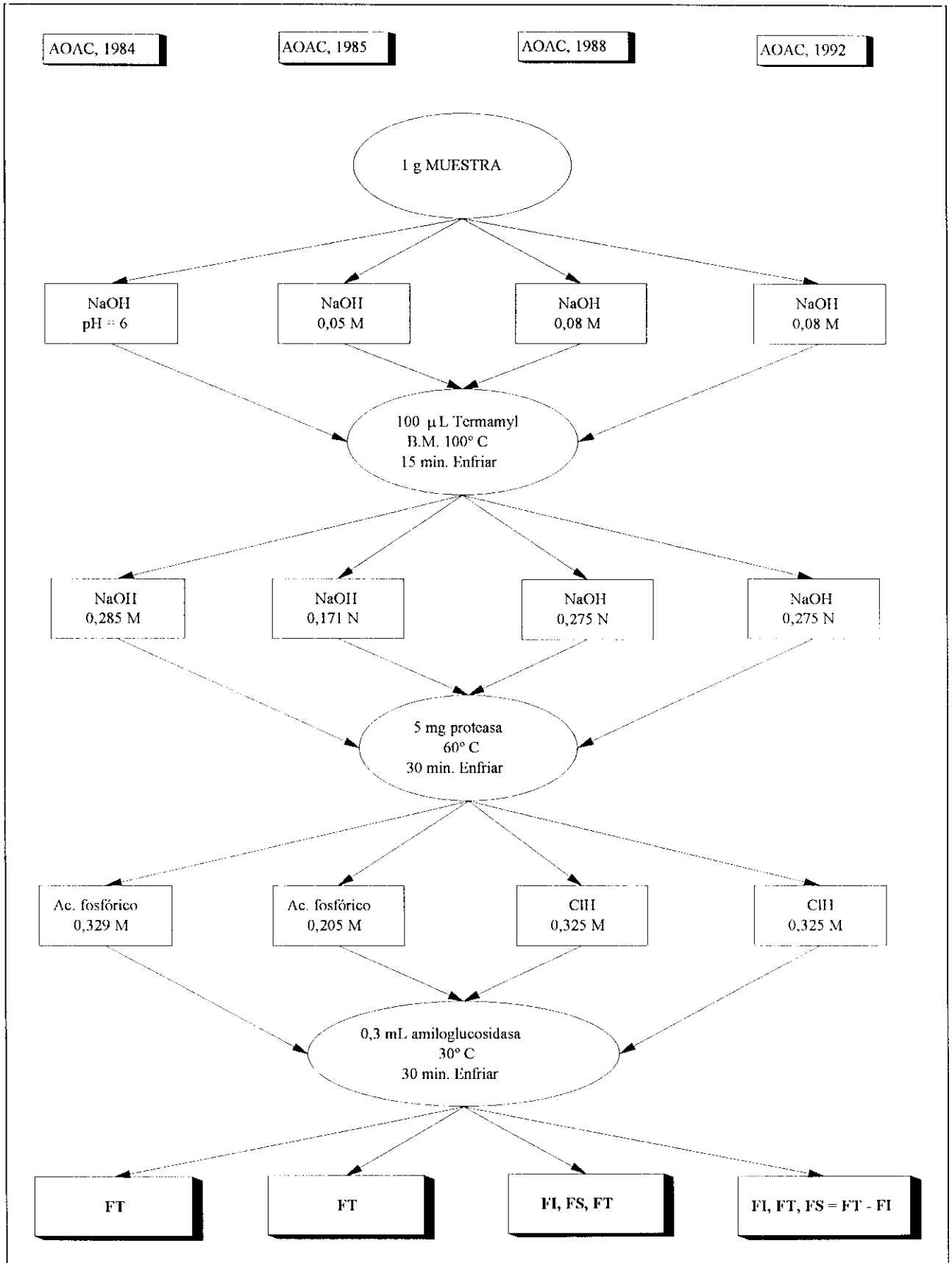
Un avance en el desarrollo de los métodos enzimático-gravimétricos lo constituye el fraccionamiento en fibra insoluble y fibra soluble. Esto se logra tratando la muestra con enzimas, que varían según los métodos, y precipitando con etanol el filtrado que se obtiene al recoger el residuo de fibra insoluble (Furda, 1977; Schweizer y Würsch, 1979).

Asp en 1981 propone ciertas modificaciones a los métodos enzimático-gravimétricos, tales como la corrección debida a proteínas y cenizas que pueden falsear los resultados obtenidos para fibra alimentaria. Asimismo sugieren el hervido de la muestra antes de la incubación enzimática, para mejorar la digestión. Posteriormente, en 1983, introduce en el método anterior una potente  $\alpha$ -amilasa termoestable que consigue la eficaz eliminación del almidón.

Existen otros métodos enzimáticos recogidos en la bibliografía tales como el método de Furda (1981) y Meuser y col. (1983) (Asp y Johansson, 1984).

En 1984 (Prosky y col., 1984) se propone el primero de los métodos de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). La evolución seguida por el método ha sido semejante a la de otros. Son métodos que surgen para responder a una necesidad analítica y, que después de estudios interlaboratorio, se van modificando en función de las dificultades encontradas y de las fuentes de error que se aprecien.

En el esquema n<sup>o</sup>1 figuran las condiciones para el tratamiento enzimático que se han propuesto para el método de la AOAC desde el primer momento hasta la actualidad. A continuación se hará una breve descripción de sus orígenes y los cambios que ha ido sufriendo.



Esquema n° 1. Principales modificaciones en el método de la AOAC.

En 1981 se concluyó, en una de las reuniones de la AOAC, que se deberían desarrollar dos métodos para el análisis de fibra: un método rápido y otro más completo que pudiera ofrecer una información detallada acerca de los componentes de fibra alimentaria. Un grupo de investigadores organizados por Prosky (Prosky y col., 1984) desarrolló un método enzimático-gravimétrico para responder a la necesidad de un método rápido. Este método se basa en los de Asp y col. (1983), Schweizer y Würsh (1979), Furda y col. (1979) pretende optimizar los tipos de enzimas y las concentraciones de las mismas para una serie de muestras, del grupo de los cereales, algunas de las cuales contienen una elevada proporción de almidón y otras de proteína. Además, otro de los objetivos perseguidos fue establecer como definición de fibra alimentaria, con fines nutricionales, aquella fracción de los alimentos que no es digestible bajo las condiciones del método que se va a someter al estudio interlaboratorio.

El método (Prosky y col., 1984) utiliza una amilasa termoestable (termamyl), amiloglucosidasa y proteasa en condiciones óptimas, sin embargo, después de haberse fijado los objetivos anteriores y de detallar con exactitud algunos de los pasos, como son las concentraciones exactas de las soluciones con las que se deben ajustar los valores de pH, el estudio interlaboratorio reveló ciertas dificultades que se reflejan en la gran variabilidad en los resultados obtenidos por los diferentes participantes para una misma muestra. Esto hace que alguno de los datos no pudiera ser utilizado para el estudio y que algunos laboratorios no remitieran los datos correspondientes a algunas de las muestras.

Los principales problemas encontrados fueron:

-Dificultad en la filtración, a lo que se atribuyó la falta de reproducibilidad entre laboratorios.

-La falta de homogeneidad muy exagerada en los resultados obtenidos en muestras con bajo contenido de fibra, (ej. patata).

-La hidrólisis enzimática del almidón fue conflictiva. En el caso del arroz la degradación incompleta se vió que provenía de una incorrecta preparación de la muestra que dificultaba el acceso de los enzimas a los gránulos. También se señala la posibilidad, para el resto de los alimentos, de una inactivación enzimática parcial o total durante el transporte.

-El análisis de alimentos procesados presentó dificultades debido a la formación de

nuevos compuestos como proteínas modificadas y productos de la reacción de Maillard.

-Carencia de un patrón de fibra. Se utilizaron como valores de referencia los datos por las casas comerciales de las que obtuvieron los productos analizados.

Los resultados fueron concordantes con los obtenidos por el método de Asp y col., (1983) y con el de Schweizer y Würsch (1979), sin embargo fueron inferiores a los obtenidos por Englyst y col., 1982. Este método fue aceptado oficialmente en 1984 (Prosky, 1992).

En 1985 (Prosky y col., 1985) se proponen modificaciones al método, con lo que se pretende conseguir los siguientes objetivos:

-Determinar a qué niveles no es reproducible el método.

-Evaluar el alcance de la degradación del almidón porque su eliminación incompleta interferirá en la determinación de fibra alimentaria.

-Evaluar el tamaño de poro del crisol adecuado en la determinación de fibra total (FT).

-Mejorar los valores de los coeficientes de variación para la determinación de FT.

Para asegurarse de que las enzimas que se iban a utilizar eran adecuadas para digerir los almidones que se encuentran de forma natural en los alimentos, se estableció un procedimiento para valorar la eficacia del tratamiento enzimático. Esta valoración consistió en analizar varios almidones y confirmar la ausencia de un residuo significativo.

Se comprobó que, tanto en la patata como en la harina blanca con contenidos elevados de almidón, la hidrólisis fue completa.

Los coeficientes de variación se redujeron sustancialmente con respecto al estudio anterior, aunque las muestras con contenidos bajos de fibra siguieron presentando valores elevados.

Finalmente fue aceptado oficialmente por la AOAC (ref. 985.29) (AOAC, 1990).

En 1988 (Prosky y col., 1988) se organiza un nuevo estudio interlaboratorio que introduce la determinación de fibra insoluble (FI) y fibra soluble (FS) independientemente. En esta

ocasión el método incluye un cambio en las concentraciones de las soluciones tampones necesarias para acondicionar las enzimas. Estos cambios han sido introducidos para aumentar la capacidad tamponante sin aumentar la concentración final de fosfato. Además esto evita reajustes de pH cuando se utilizan productos ácidos. Para ajustar el pH se sustituyó el ácido fosfórico por ácido clorhídrico para evitar un aumento concomitante de la concentración final de fosfato que había dado origen a la coprecipitación de la sal.

Se indica la determinación de fibra insoluble (FI) y de fibra soluble (FS) de forma independiente.

La precisión del método para las fracciones aisladas, fundamentalmente FS, todavía no es satisfactoria. Se señala asimismo la necesidad de más estudios con frutas, verduras y semillas de leguminosas.

Cuando la FT se determina por análisis independiente y se compara con la suma de FI y FS, los resultados son muy semejantes, a excepción de la soja en la que la FI fue superior a la FT debido a la coprecipitación de otras sustancias aparte de la fibra. Este método se acepta oficialmente por la AOAC en 1990 (991.42 y 991.43) (Prosky, 1992).

En 1992 (Prosky y col., 1992) se lleva a cabo un nuevo estudio para valorar el método de 1988. Se trata de aplicar el mismo método (Proky y col., 1984) que fue aceptado oficialmente con las modificaciones en la concentración del tampón, de la base y sustitución de ácido fosfórico por ácido clorhídrico. Se analizan además de cereales, frutas y verduras con un mayor contenido que aquellos en fibra soluble.

En general, los valores encontrados para FS fueron superiores a los de FI. Una razón importante para esto parecen ser los problemas en la filtración que se pueden resolver analizando una menor cantidad de muestra: entre 0,50 g y 0,25 g para materiales con elevado contenido de fibra. El método para la determinación de FS necesita más estudios.

En estudios anteriores (Prosky y col., 1984; Proky y col., 1985; Prosky y col., 1988) no se publicaron los valores correspondientes a los blancos, a las proteínas y a las cenizas; sin

embargo, en esta publicación (1992) se da cuenta de los resultados obtenidos en estas determinaciones tanto en FI como en FS.

En lo que al residuo FI se refiere, algunos investigadores que participaron en el estudio obtuvieron valores negativos para el blanco, valores próximos a cero para las proteínas y valores negativos de cenizas.

Para el residuo FS también se han encontrado valores próximos a cero para proteínas y valores negativos para cenizas.

Estos hechos hacen pensar, por una parte, en la necesidad de revisar el método Kjeldahl para la determinación de proteína en este caso y, por otro lado, en las pérdidas de celite que tienen lugar a través del filtro. La calidad tanto de los crisoles como del celite deberían ser revisadas cuando esas pérdidas exceden de 5 mg.

Se recomienda (Prosky y col., 1992) que el método de fibra insoluble sea adoptado oficialmente. Este método se puede utilizar paralelamente al método de la determinación de fibra total para obtener fibra soluble por diferencia, hasta que se desarrolle un método adecuado.

También aconsejan que las muestras con elevado contenido de azúcares sean extraídas con 3 volúmenes de metanol al 85% para evitar interferencias en la determinación de fibra.

Se aconseja que se acepte el método de FT y el de FI (Prosky y col., 1988) y que se calcule FS por diferencia.

De todas estas publicaciones sorprenden fundamentalmente dos hechos:

-Por un lado la poca importancia que se da a la determinación exacta de fibra alimentaria en los alimentos con bajo contenido de fibra.

-El hecho de ver publicados los valores correspondientes a los duplicados y las diferencias existentes entre ellos (Prosky y col., 1992).

En la actualidad este método ha recibido numerosas críticas atacando fundamentalmente al criterio de rapidez que motivó su diseño. Además, el valor absoluto de fibra estimado según el método de la AOAC puede no corresponder exactamente con los valores de los métodos cromatográficos a la hora de analizar los polisacáridos no almidón. En este sentido este método "rápido" no tiene hoy día ninguno alternativo que ofrezca mayor información del contenido de fibra alimentaria, a no ser el propio análisis detallado de los residuos insolubles obtenidos.

El método ha sido modificado por Lee y col. (1992). Esta modificación consiste en la introducción de un tampón MES-TRIS en lugar del tampón fosfato, eliminación del ajuste de pH para la proteasa, y reducción del volumen total de muestra y del volumen de filtración.

El método de la AOAC ha sido adaptado por Li y Cardozo (1992) para alimentos con bajo contenido en almidón y proteína. Suprimen en este método el uso de enzimas, dado que han observado que la extracción con hexano y alcohol diluido en frutas y hortalizas da pesos de residuo comparables a los obtenidos después del tratamiento enzimático. El método consiste en incubar las muestras en agua a 37°C, 90 min. A continuación se precipita con etanol y el residuo de fibra total (FT) se corrige restando proteínas y cenizas.

En realidad, este método propuesto por Li y Cardozo es un paso más después del que propusieron en 1988 Li y Andrews, en el que incluían una única enzima, amiloglucosidasa, para hidrólisis de almidón. En este método no se hidroliza la proteína presente en la muestra aunque sí se procede a la hidrólisis de la que está presente en el residuo. La aplicación de este método a diferentes tipos de hortalizas llevó a la conclusión de que se podía evitar el uso de enzimas en el análisis de fibra en muestras con bajo contenido de almidón y proteína.

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio interlaboratorio en el que se comparan los resultados obtenidos por este método con los obtenidos por el de la AOAC para las mismas muestras (manzanas, albaricoques, repollo, zanahorias, cebolla y fibra de soja). Los resultados del estudio aún no han sido publicados (Li y Cardozo, 1993).

Métodos sin enzimas habían sido ya propuestos por McCance (1936) que realizaba la extracción con etanol al 80% para dar una fracción cuyo contenido en almidón, proteína y cenizas, se determinaba por separado y se restaba del peso del residuo. Autores como Siddiqui (1989) han sugerido que el contenido total de fibra alimentaria puede ser evaluado determinando el contenido de agua, almidón, proteína y cenizas y restándolos del residuo insoluble en alcohol.

La comprensión del significado de los métodos enzimático-gravimétricos es importante dado que el tratamiento enzimático está presente también en los métodos que se agrupan bajo la clasificación de cromatográficos.

## **6.4. METODOS DE FRACCIONAMIENTO**

### **6.4.1. Método de Southgate**

Este método (Southgate, 1969) permite un fraccionamiento de diferentes compuestos admitidos como fibra alimentaria. Este fraccionamiento específico no se había logrado hasta ese momento y va a ser la base conceptual de los métodos cromatográficos. El método permite el fraccionamiento en: polisacáridos solubles en agua, hemicelulosas, celulosa y lignina. Cada una de estas fracciones se cuantifica mediante colorimetría. El esquema es técnicamente simple puesto que sólo emplea aparatos sencillos. Es un método largo ya que requiere varios días para completarlo. Permite un grado limitado de fraccionamiento que deberá ser seguido por un análisis cuantitativo con métodos razonablemente específicos. Los resultados sugieren que las diferentes colorimetrías dan un análisis virtualmente completo para los carbohidratos no disponibles que tienen algún significado nutricional y en el campo de la química de los polisacáridos. Estos resultados están de acuerdo con estudios más detallados de paredes celulares de las plantas.

Southgate utiliza takadiastasa para la eliminación de almidón. Esta enzima es una potente amilasa que desapareció del mercado cuando dejó de utilizarse con fines industriales. Realiza la hidrólisis de celulosa con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (p/v), a 0-4°C durante 24 h, y la hidrólisis de

hemicelulosas con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (p/v) a  $100^\circ\text{C}$ . Las determinaciones colorimétricas presentan el problema de las interferencias. Las hexosas interfieren en el método de pentosas y el método de ácidos urónicos es poco específico.

Southgate señala además un hecho que muy pocos autores indican y es que las pruebas de recuperación tal como se entienden convencionalmente, no pueden ser aplicadas en la determinación de carbohidratos no disponibles. Es imposible simular las condiciones de la pared celular cuando se añaden polisacáridos purificados a una muestra base.

#### **6.4.2. Otros métodos de fraccionamiento**

Se incluyen dentro de este apartado los métodos de Anderson y Clydesdale (1980a) y de Monte y Maga (1980). Cada uno de estos métodos resulta de una combinación y/o modificación de métodos anteriores que permitan obtener valores separados para biopolímeros solubles en agua fría y caliente así como de sustancias pécticas totales, hemicelulosas, celulosa y lignina.

Para la hidrólisis de almidón y proteína el primero de estos métodos utiliza pepsina y pancreatina, mientras que el segundo utiliza amiloglucosidasa y tripsina. Este último método permite obtener hasta trece fracciones diferentes dentro de la fibra alimentaria.

### **6.5. METODOS CROMATOGRAFICOS**

En primer lugar se describirán las características generales comunes a todos ellos y después se hará una descripción más detallada de métodos propuestos por diferentes investigadores teniendo en cuenta las distintas variantes de cada uno de ellos.

Estos métodos constan fundamentalmente de cuatro pasos:

-Tratamiento enzimático para la eliminación del almidón.

- Hidrólisis ácida de polisacáridos.
- Identificación
- Cuantificación de los monosacáridos, bien por Cromatografía de Gas-Líquido (GLC) ó bien por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Las técnicas que se aplican al análisis de fibra permiten la identificación de diferentes monosacáridos procedentes de los polisacáridos, componentes mayoritarios de la pared celular. Asimismo, existe la posibilidad de aproximarse al conocimiento de la disposición de los enlaces entre dichos polisacáridos. Ahora bien, no suministran ninguna información más. El desarrollo de estos métodos va parejo a dos problemas que ya surgieron con anterioridad:

- La utilización de métodos eficaces para la eliminación de almidón y la reproducción de las condiciones fisiológicas.
- El debate sobre la definición de fibra.

Además incorporan, lógicamente, nuevas dificultades analíticas típicas de la metodología:

- Hidrólisis de polisacáridos a monosacáridos.
- Formación de derivados volátiles de dichos monosacáridos que puedan ser analizados por GLC o neutralización del hidrolizado obtenido para su análisis por HPLC si las características de la columna lo exigen.

Todos estos problemas son abordados por diferentes investigadores aunque de una forma paulatina. Establecer un orden cronológico de autores y fechas es muy difícil dado que las investigaciones sobre los distintos aspectos se desarrollan de forma paralela e independiente lo cual hace que ciertas mejoras introducidas por unos tarden un tiempo en ser incorporadas por otros.

### **6.5.1. Cromatografía de gas-líquido: GLC**

En este apartado de la memoria figuran aquellos autores que han dado lugar al desarrollo de

diferentes métodos para GLC, en los cuales han ido introduciendo modificaciones a lo largo del tiempo y, que, en algunos casos son fruto de interesantes estudios interlaboratorio. En este sentido cabe destacar la importancia de los siguientes grupos de investigación:

- Theander y colaboradores.
- Englyst y colaboradores.
- Selvendran y colaboradores.

Entre estos investigadores, Theander ha estudiado más a fondo al problema de la hidrólisis enzimática del almidón, Englyst se ha dedicado fundamentalmente al proceso de derivatización y Selvendran destaca por considerar la fibra alimentaria dentro del contexto de la pared celular y, además, en sus trabajos se incluyen muy frecuentemente detalles sobre la estructura de las paredes relativos a los tipos de enlaces entre polímeros y disposición estructural de los mismos.

Estos autores no han incidido particularmente sobre el estudio de las condiciones de hidrólisis de los polisacáridos no almidón.

-Grupo de Theander y col. (Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Suecia)

Destacan por sus estudios acerca de la hidrólisis enzimática de almidón necesaria para la determinación de fibra alimentaria. Este grupo de trabajo considera el almidón resistente como parte de la fibra alimentaria, así como la lignina Klason. Fraccionan la fibra en insoluble y soluble, haciendo especial hincapié en la problemática de extracción de la fracción soluble. La hidrólisis de almidón la realizan siempre incorporando como enzimas  $\alpha$ -amilasa termoestable (termamyl) y amiloglucosidasa. La enzima termamyl es una amilasa bacteriana que al actuar sobre el almidón de patata a 85°C durante 45 minutos lo degrada completamente a sacáridos dializables. No libera cantidades detectables de azúcares al actuar sobre un  $\beta$ -glucano purificado de semilla de cebada o sobre un arabinóxilano de cebada ó sobre celulosa de algodón (Theander y Åman, 1979a).

Proponen realizar la hidrólisis de almidón en diferentes momentos durante el análisis de fibra

(Theander y Åman, 1979b). Indican dos variantes para un mismo método: A y B. En la variante A realizan la hidrólisis de almidón antes del fraccionamiento en fibra insoluble y soluble, mientras que en la B se determina un residuo insoluble previamente a la determinación de almidón. Esta se realiza independientemente y se resta del valor del residuo obtenido. Esta modificación puede dar lugar a error en muestras con elevada proporción de almidón y baja proporción de fibra por eso se sustituyó el B por un esquema de fraccionamiento C en el que el almidón se elimina antes del aislamiento del residuo de fibra. La fibra soluble se precipita con etanol y la fibra que se obtiene es la total (Theander, 1983).

Con el tiempo, Theander y Westerlund (1986) modifican las condiciones de hidrólisis con termamyl para alimentos procesados, y trabajan a 96°C ya que observan que en muestras como harina procesada por extrusión puede quedar aproximadamente un 1% de almidón. Esta enzima la utilizó Asp en condiciones semejantes, pero de forma independiente en 1983. Estas condiciones dieron resultados de gran precisión para cereales en grano. Aunque esta enzima fue también utilizada por Neilson y Marlett en 1983, estos autores incluían el tratamiento con ultrasonidos comprobando que se reduce la eficacia. Se observa que hay una buena correlación entre los métodos A y C, y entre B y C cuando la muestra no tiene mucho almidón.

En el denominado método de Uppsala, Theander y col. (1990) incluyen dicha enzima junto con amiloglucosidasa aconsejando estudiar la actividad degradativa de la fibra que presentan las enzimas que hidrolizan el almidón. En general, el tratamiento enzimático que se propone en el método de Uppsala consume más tiempo que el que necesitan los tratamientos enzimáticos del método de la Association of Official Analytical Chemists (Prosky y col., 1988) y el de Englyst (1991). Estos dos métodos incorporan también termamyl, el de la AOAC desde los primeros estudios y el de Englyst por primera vez. Recientemente se ha llevado a cabo un estudio interlaboratorio del método de Uppsala y los resultados están siendo evaluados en el momento presente por la AOAC (The Referee, AOAC 1992).

Las muestras utilizadas por el equipo de Theander son fundamentalmente cereales y derivados y hortalizas con elevado contenido en almidón (patata y guisante).

Otros aspectos de la problemática de la determinación de fibra alimentaria, considerados por este grupo, se señalan a continuación.

En relación con la fibra soluble se observa que, el tipo de solución empleada en la extracción condiciona el valor obtenido, no sólo cualitativamente sino también cuantitativamente. Asimismo, en el líquido que queda después de la precipitación de la fibra se observa un porcentaje importante de la misma sobre todo en alimentos procesados. La determinación de lignina se realiza por filtración y posterior gravimetría.

Analizan también ácido acético y cinámico señalando que están formando ésteres con los componentes poliméricos de la fibra. Se observan porcentajes importantes de estos ácidos en algunas de las muestras estudiadas: maíz y remolacha azucarera.

En lo referente a la comparación fresco-procesado sí detectan modificaciones que son obviadas por Englyst (1991).

En cuanto a las condiciones de hidrólisis, estos autores utilizan  $H_2SO_4$  muy diluido ( 0.4-0.1 M) para las hidrólisis secundarias, y en cuanto a las condiciones de derivatización siguen el método de Sawardeker (1965) de formación de acetatos de alditol y el de Sweely (1963) de formación de derivados de trimetilsilano. En 1986, incorporan las modificaciones propuestas por Englyst y Cummings (1984) y que se detallarán a continuación en el apartado dedicado a este autor. Como característica peculiar de Theander y col. se puede destacar el análisis de ácidos urónicos por descarboxilación.

-Grupo de Englyst y col. (Dunn Clinical Nutrition Centre. Cambridge. Reino Unido).

Este grupo investigador, en el que destaca H. Englyst, se dedica desde hace años al estudio de la determinación de fibra alimentaria por métodos cromatográficos previa hidrólisis. Sus estudios se han centrado principalmente en el paso de la derivatización.

Según el método publicado en 1982 (Englyst y col., 1982) digieren el almidón con  $\alpha$ -amilasa y pululanasa. Se hicieron ensayos con otras enzimas comprobándose que su capacidad de

hidrólisis no era suficiente y que en algunos casos tenían actividad hemicelulásica.

Observan que el procesado de los alimentos puede dar lugar a retrogradación del almidón gelatinizado y este fenómeno lo haría resistente a la hidrólisis con  $\alpha$ -amilasa. Este almidón puede ser solubilizado con una solución de hidróxido potásico 2M, hidrolizado con amiloglucosidasa y determinado como almidón resistente. Se intentó la dispersión con cloruro de litio que en principio se mostró eficaz pero que ha de ser eliminado antes de adicionar enzimas. Para acelerar el proceso se necesitan elevadas temperaturas y ello da lugar a pérdidas.

Neutralizan con carbonato de bario, comprobándose que este paso conlleva una cierta dificultad. La reducción y acetilación son procesos lentos y tediosos. La reducción implica el tratamiento con una solución de tetraborato sódico en amoníaco, mezclar y dejar 2 horas, añadir metanol al residuo y evaporar a sequedad. La acetilación se realiza añadiendo anhídrido acético y calentando durante dos horas a 120°C. Dividen el método en tres procedimientos que permiten obtener diferentes tipos de fraccionamiento.

Un nuevo diseño del método data de 1984 (Englyst y Cummings, 1984). Dispersan el almidón con dimetilsulfóxido (DMSO) que es un agente eficaz en la rotura de enlaces de hidrógeno intermoleculares. Se facilita la reacción de acetilación añadiendo N-metilimidazol como catalizador que acelera la reacción y utiliza  $\text{NH}_4\text{OH}$  para neutralizar. Modifican el resto del procedimiento añadiendo octan-2-ol, a continuación una solución de borohidruro sódico en amoníaco 3M dejando 1h a 40°C. Posteriormente se añade ácido acético glacial y a una parte alícuota de la solución acidificada se le añade N-metilimidazol seguido de anhídrido acético. A partir de aquí se pueden seguir dos procedimientos:

- a) Añadir agua y diclorometano (Englyst y Cummings, 1984).
- b) Añadir etanol y mezclar, a continuación añadir agua, KOH 7,5 M y mezclar, repetir la adición de KOH 7,5 M y mezclar. Dejar reposar hasta que se separen las dos fases (Englyst y Cummings, 1984; Englyst y Cummings, 1987 y Englyst y Cummings, 1988).

Después de un estudio interlaboratorio llevado a cabo por Englyst y col. en 1987 (Englyst y

col., 1987; Englyst y col., 1987) se suprime definitivamente la utilización de carbonato de bario como agente neutralizante.

En todos estos métodos se mantienen constantes las condiciones de hidrólisis. La solubilización e hidrólisis de celulosa se realiza con ácido sulfúrico 12 M a 35°C 1h seguido de ácido sulfúrico 1 M 2 h.

Este método permite como alternativa la determinación colorimétrica del hidrolizado utilizando ácido dinitrosalicílico en caliente (Englyst y Hudson, 1987).

Existe muy buena correlación entre los resultados obtenidos para el método por cromatografía de gases y los resultados obtenidos por colorimetría en un elevado número de alimentos pertenecientes a diferentes grupos: cereales, hortalizas, frutas y frutos secos (Englyst y col. 1988).

La evolución de estos métodos ha permitido pues el establecimiento de las condiciones óptimas para la determinación de polisacáridos no almidón (NSP) en alimentos frescos y procesados.

En 1992 Englyst y col. proponen una nueva modificación de su método. Se observa una tendencia a la disminución del tiempo global que dura el método, mediante una reducción en los tiempos de cada etapa. Destaca entre todas las modificaciones la introducción de termamyl y pancreatina, enzimas que ya utilizaban Asp y col. en 1983, y la modificación en las condiciones de hidrólisis. La hidrólisis primaria se realiza con una mayor cantidad de ácido sulfúrico.

Señala, además, que no hay necesidad de dividir los NSP en fracciones soluble e insoluble, luego se puede omitir el paso necesario para dicha división.

-Grupo de Selvendran y colaboradores.(AFRC Institute of Food Research. Norwich. Reino Unido).

Los trabajos de Selvendran y col. se caracterizan fundamentalmente por hacer referencia, continuamente, al tipo de tejido en el que se encuentran localizadas las paredes celulares que constituyen el marco de la fibra alimentaria. Este grupo realiza numerosos estudios monográficos dedicados a este tema (Selvendran 1984; Selvendran y col., 1987; Selvendran y Verne 1990). Han propuesto un método en el que poco a poco van introduciendo variantes que le permiten adaptarse a todo tipo de alimentos evitando así las limitaciones típicas de otros métodos.

La novedad principal introducida por Selvendran y col. consiste en aislar lo que llaman "material de la pared celular" antes de proceder al análisis de fibra y es lo que otros autores denominan residuo de fibra alimentaria. Para ello utilizan el siguiente tratamiento: el tejido húmedo se somete a la acción de un molino de bolas y después se trata secuencialmente con deoxicolato sódico acuoso al 1% (p/v), fenol/ácido acético/agua y dimetilsulfóxido (DMSO) al 90% en agua (v/v). Los efectos de coprecipitación se minimizan aislando el material de la pared celular bajo condiciones en las que la tendencia a asociarse con moléculas citoplasmáticas, especialmente enlaces de hidrógeno, es mínima (Selvendran y col., 1979b).

Los efectos disolventes del deoxicolato sódico se deben a que interacciona con regiones hidrofílicas y lipofílicas de proteínas.

El fenol/ácido acético/agua extrae proteínas residuales, el deoxicolato sódico adsorbido y lípidos, en virtud de una fuerte acción disociativa del fenol y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno.

Se estudió el sistema de homogeneización utilizado observando, mediante examen microscópico, que la utilización del triturador y el modelo de tejido húmedo fueron necesarios para desintegrar la estructura celular. El tejido molido húmedo es homogéneo y tiene la ventaja de ser fácilmente aislado por centrifugación. Favorece asimismo la eliminación absoluta de almidón mediante métodos químicos o enzimáticos. Para cereales se obtuvo un

tamaño de partícula en el material de la pared celular de 50 a 150  $\mu\text{m}$  de longitud y de 15 a 25  $\mu\text{m}$  de anchura. Tamaños más grandes se obtuvieron para tejidos lignificados (Selvendran y Dupont, 1980).

Se comprobó que no se producía degradación en los polisacáridos en un ensayo realizado en muestras de almidón de patata y lisozima. Los resultados sugieren que los polímeros de la pared celular no se degradan bajo estas condiciones. Sin embargo el molido del material seco durante 48 horas redujo el tamaño total de partícula a 5-15  $\mu\text{m}$  y puede causar, por tanto, algo de degradación de los polímeros de la pared celular (Selvendran y Dupont, 1980).

El material así obtenido está virtualmente libre de almidón, proteínas y otros compuestos interferentes. Para alimentos con elevada proporción de almidón combina el tratamiento anterior con un ataque enzimático con  $\alpha$ -amilasa y pululanasa, evitando el uso de amiloglucosidasa por su actividad hemicelulásica.

Selvendran y col. (1979b) prueban diferentes tipos de hidrólisis y métodos de acetilación para el estudio de la composición monomérica del material de la pared celular, llegando a la conclusión de que la hidrólisis de Saeman ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% p/p 3 h a 20°C y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N 2 h a 100°C) es la que da mayor liberación de azúcares frente a la utilización de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N durante 5 horas y ácido trifluoroacético.

El análisis de composición monomérica incluye también las sustancias pécticas que no se pueden extraer totalmente del material de la pared celular con solventes acuosos inorgánicos y los polímeros aislados que no se pueden solubilizar con ácido mineral diluido. Para facilitar la solubilidad recomiendan un tratamiento preliminar con pectinasa. Comprueban que el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% promueve una rápida solubilización de los polisacáridos de la pared celular, incluidas las sustancias pécticas. La descarboxilación de los residuos de ácidos urónicos de las sustancias pécticas que se produce durante el tratamiento con ácidos minerales diluidos es mínima.

Dentro de la fase de derivatización, en la acetilación utilizan la reducción con borohidruro sódico y como catalizador piridina.

También realizan el análisis de metilación según el método de Hakomori (1964) separando en fracciones solubles e insolubles en cloroformo/metanol. Este estudio reveló la naturaleza de los principales enlaces glucosídicos presentes en el material de la pared celular. La hidrólisis ácida gradual de dicho material hizo posible evaluar la fuerza relativa de algunos enlaces glicosídicos.

El material de la pared celular puede ser utilizado también para realizar una extracción secuencial, con diferentes tratamientos, en función del tipo de tejido que se esté analizando:

-para tejidos parenquimatosos:

- agua caliente
- oxalato acuoso en caliente
- KOH 1N y 4N

-para tejidos lignificados: realiza un tratamiento de deslignificación que permite la obtención de la holocelulosa a la cual aplica extracción secuencial con

- agua caliente
- DMSO
- KOH 1N y 4N

En los tejidos parenquimatosos se vió que, en el material de la pared celular, las sustancias pécticas solubilizadas por agua caliente eran más esterificadas que los polímeros solubles en oxalato. Los polímeros solubles en álcali contenían xiloglucanos y otros polisacáridos y una pequeña cantidad de sustancias pécticas y el residuo final ( $\alpha$ -celulosa) contenía además de celulosa, algunas glicoproteínas y pequeñas cantidades de sustancias pécticas.

A partir de estas observaciones desarrollan estudios detallados de fraccionamiento de glicoproteínas, encontrando que una gran proporción de glicoproteína rica en hidroxiprolina estaba asociada a la fracción de  $\alpha$ -celulosa y que la mayor parte de ella podía liberarse por tratamiento con cloruro sódico y ácido acético.

Por sus estudios indican que, en tejidos parenquimatosos, se puede partir del residuo insoluble en alcohol, haciendo la determinación de proteínas. Para tejidos ricos en almidón es más

adecuado utilizar el material de la pared celular.

En 1990 Selvendran publica ciertas conclusiones en relación con el enfoque que ha de darse a los métodos de fibra alimentaria. Al desarrollar métodos para el fraccionamiento de la pared celular se ha puesto de manifiesto que el tracto gastrointestinal puede estar implicado activamente en el fraccionamiento de la fibra alimentaria durante el tránsito intestinal y, por lo tanto, puede ser más ventajoso investigar la química de la fibra alimentaria en línea con este aparente fraccionamiento, en lugar de insistir en la correlación de los efectos fisiológicos únicamente con la ingesta cuantitativa como fibra total ó erróneamente como fibra soluble mediante análisis químico.

Esto se puede hacer extensivo para no considerar el que todas las fibras de cereales constituyen una fuente de fibra diferente y, de forma semejante, todas las fibras de las frutas y verduras son otra fuente distinta puesto que dentro de los cereales como, de hecho, dentro de las frutas y hortalizas, existen diferencias estructurales y composicionales. Estas diferencias pueden ser responsables de los efectos más que las diferencias generalmente asumidas como debidas a los individuos.

Existen otros autores que parten del residuo insoluble en alcohol para el estudio de fibra alimentaria. Bittner y col. (1982) lo utilizan fundamentalmente para verduras pobres en almidón y proteína, maíz, guisante y patata. Realizan la determinación de almidón en el residuo insoluble en alcohol, aunque no analizan proteína y pretenden resolver con este método las dificultades de los métodos gravimétricos. Señalan que los resultados obtenidos para patatas son comparables con los obtenidos por otros autores.

Bittner y Street (1983) aplican también este método al estudio de forrajes.

Dentro de los estudios de análisis de metilación destacan los de Brillouet (1982) y Brillouet y Carré (1983) en el campo de las leguminosas.

### **6.5.2. Cromatografía líquida de alta eficacia: HPLC**

Si en el caso de la aplicación de la cromatografía de gases al estudio de fibra alimentaria se han llevado a cabo numerosos estudios, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha sido muy poco experimentada en este campo.

Aunque el análisis de hidrolizados de pared por HPLC aparece relativamente pronto en la bibliografía, (Conrad y Palmer, 1976), no se aplicará a la fibra como tal hasta un tiempo después. El primer estudio en este sentido se debe a Barton y col. en 1982 y va referido al análisis del residuo neutro detergente de forrajes. La resolución que obtienen para la muestra de patrones es satisfactoria, sin embargo, en el análisis de las muestras, la proporción de azúcares presentes sólo permite separar xilosa, arabinosa y glucosa. La galactosa no se separa de la glucosa, quedando como un hombro en la pendiente descendente de ésta y la ramnosa no es detectada. En alimentos para el ser humano lo aplican por primera vez Slavin y Marlett en 1983. Estos investigadores analizan el residuo neutro detergente de una dieta baja en fibra así como del residuo fecal obtenido después de la ingesta de la misma.

Como puede verse por las fechas, la incorporación a alimentos destinados al ser humano es bastante tardía y los trabajos encontrados analizan un número reducido de alimentos. Además es curioso que en estos trabajos, escasos en número, aparezcan dos: Slavin y Marlett (1983) y Quigley y Englyst (1992), que en su concepción obedecen a un doble objetivo, por un lado el estudio de las posibilidades que ofrece esta técnica y, por otro el estudio de materiales biológicos, como heces. Este último hecho es muy poco frecuente en investigación sobre metodología de fibra alimentaria.

Slavin y Marlett (1983) comparan las posibilidades que ofrecen dos tipos de columnas, una de sílice (Microbondapack Carbohydrate, Waters Assoc.) y otra de intercambio iónico (Aminex HPX-85 Carbohydrate column, BioRad).

Cuando los residuos FND del alimento y de las heces se analizaron en la columna de sílice se detectaron ramnosa, arabinosa, xilosa y glucosa. Dado que en las muestras predomina la glucosa, siendo algo superior al 75% de los azúcares totales encontrados, no pudo detectarse

ni manosa ni galactosa que eluyen a ambos lados de la glucosa respectivamente. La columna Microbondapack no detectó celobiosa. En la columna de metal pesado, utilizada por estos mismos autores, galactosa y ramnosa coeluyen. La separación de todos los azúcares se completó en 25 min. Fueron analizados celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa, manosa y galactosa/ramnosa.

Estos autores comprueban que no hay variación importante en la cuantificación realizada en los azúcares al utilizar ambas columnas, lo que es una evidencia indirecta de la exactitud del método. Slavin y Marlett se decantan en esta ocasión por el método que lleva la columna de intercambio iónico debido a una serie de razones, además de su capacidad para separar más azúcares.

Neilson y Marlett (1983) utilizan la columna de intercambio iónico HPX-87P (BioRad). Señalan los aspectos positivos de sencillez y rapidez en el análisis, aunque la columna tiene ciertas limitaciones:

- No se separa ramnosa de galactosa.

- La sensibilidad del detector de índice de refracción es menor que la del detector de ionización de llama (FID) empleado en cromatografía gaseosa.

A finales de los 80 se incorpora a la tecnología de HPLC un nuevo detector, el de impulso amperométrico (PAD). Este detector será utilizado por Garleb y col. (1989) y por Quigley y Englyst (1992).

Es de señalar que Garleb y col. aplican esta técnica al análisis de monosacáridos que se encuentran en materiales fibrosos pero nunca a residuos de fibra previamente aislados.

El paso de neutralización se resuelve muy ventajosamente frente a los procedimientos utilizados en trabajos anteriores ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y  $\text{CO}_4\text{Ba}$ ). Utiliza una resina de intercambio iónico BioRad AG4-X4 que neutraliza el hidrolizado ácido.

El método de Quigley y Englyst (1992) resuelve el problema de la neutralización utilizando una precolumna que precede a las columnas analíticas, lo cual facilita enormemente la

práctica de laboratorio. Además, el método descrito por estos autores permite la separación de monosacáridos y hexosaminas.

En ambos casos se indica que los métodos son muy exactos, precisos y con gran resolución aparte de su sencillez y rapidez.

*En el momento presente, en el seno de la Comunidad Económica Europea (Bureau Communitaire de Référence: metrología aplicada y análisis químicos) se están llevando a cabo estudios interlaboratorio que permitan certificar el contenido de fibra alimentaria en materiales de referencia.*

Los métodos empleados son AOAC (Proky y col., 1988), Englyst y col. (1992), Quigley y Englyst (1992) y Uppsala (Theander y col., 1990). Las muestras objeto de estudio son: pan blanco, pan integral, mezcla de pan blanco e integral y cereales para el desayuno. El objetivo de estos trabajos es llegar a conseguir una buena reproducibilidad y repetitividad de resultados para un mismo método, sin entrar en la discusión de las diferencias cuantitativas que puedan presentarse entre ellos ni en la discusión del concepto de fibra alimentaria.

Estos estudios se caracterizan por las numerosas modificaciones a que están siendo sometidos los protocolos propuestos inicialmente hasta llegar a unas condiciones analíticas que permitan lograr el objetivo propuesto.

## **7. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS SOBRE LA FIBRA ALIMENTARIA.**

Desde un punto de vista general, el procesado de alimentos tiene gran importancia en la actualidad y ello por diferentes razones. Varela (1984) destaca las siguientes:

-El cocinado es una característica típica del comportamiento humano con una base claramente evolutiva que diferencia al hombre de otros animales.

-Las técnicas culinarias constituyen una herencia socio-cultural.

-El interés por la gastronomía y el placer de comer han ido creciendo de forma importante en el mundo desarrollado en los últimos tiempos.

Existe numerosa bibliografía dedicada al estudio de las modificaciones experimentadas por los componentes de los alimentos (Tressler, 1961; Boltman, 1978; Holdsworth, 1979).

Para el caso de la fibra alimentaria el examen bibliográfico revela que se afronta el tema desde diferentes puntos de vista. Por un lado se analizan las modificaciones cuantitativas. En este caso, cada método de análisis da lugar a unos resultados diferentes para una misma muestra y un mismo procesado tiene diferentes efectos sobre distintas muestras. Ahora bien, aunque la consideración más ampliamente difundida es sólo cuantitativa, es interesante conocer lo que sucede en esta fracción y sus potenciales componentes, dada la posible trascendencia fisiológica de una variación no sólo cuantitativa sino también cualitativa (Pilnik y Voragen, 1984; Amado, 1992).

Existen, asimismo, importantes estudios dedicados a la explicación de los mecanismos mediante los cuales se justifican los dos tipos de variaciones.

A continuación se pasará a exponer un breve resumen de los hallazgos en estos dos campos:

-Modificación cuantitativa.

-Modificación cualitativa y relación entre la textura y las modificaciones experimentadas por los componentes fibrosos: explicación de mecanismos.

Un aspecto importante a considerar es el hecho de que estos estudios van a tener, en ciertos casos, utilidad para la industria (Todd y col., 1989; Artz y col., 1990). También se pueden aplicar para el aprovechamiento de ciertos residuos en agricultura (Barl y col., 1986).

## **7.1. MODIFICACIONES CUANTITATIVAS**

Las tablas de composición de alimentos reflejan los componentes de ciertos alimentos procesados. Así las tablas Souci-Fachmann-Kraut (1986/87) incluyen los datos de fibra alimentaria para algunos alimentos procesados. El método utilizado es el enzimático-gravimétrico de Schweizer y Würsch (1979). En Estados Unidos se han elaborado unas tablas, con propósitos únicamente de investigación, sobre el contenido de fibra alimentaria de algunos alimentos procesados incluyendo productos de panadería, pastelería y cereales de desayuno, cereales y derivados, frutas y verduras y preparados comerciales que las contienen, y legumbres y frutos secos (United States Ministry Of Agriculture, HNIS/PT 106). En este caso, utilizan el método enzimático-gravimétrico de la AOAC. Se considera en ambos casos diferentes procesados, pero sólo se aportan datos expresados como g/100 g de sustancia fresca y nada se comenta acerca de posibles variaciones.

En 1988 Englyst y col. (1988) y Englyst y col. (1989) publican una serie de trabajos dedicados al estudio de la influencia de distintos procesados en diferentes grupos de alimentos. Utiliza el método diseñado por su equipo (Englyst y col., 1988) y concluye que *no existen diferencias significativas en ninguno de los casos estudiados.*

Estas tres fuentes de información proporcionan datos de fibra alimentaria para un producto fresco y su correspondiente procesado, sin embargo presentan una cierta anarquía en cuanto a dos hechos:

- No profundizan en cada tipo de procesado.

- No dan cuenta de los cálculos que se han seguido para determinar los contenidos en fresco y en el correspondiente procesado, ni en las condiciones en que ambos datos son comparados. Esto hace que sea muy difícil hacer un análisis de los resultados.

Estos dos hechos se observan reiteradamente a lo largo de la bibliografía. El primero de ellos es en cierto modo lógico dado que la investigación de cada autor se va a centrar en un número limitado de muestras y de tratamientos. Sin embargo, el segundo es más difícil de entender. Son muy pocos los autores que explican la forma en que se han hecho los cálculos que permiten establecer una comparación lógica (Bomben y Hudson, 1977; Carroad y col., 1980; Zyren y col., 1983; Reistad, 1984; Nyman, 1984; Nyman y col., 1987; Nyman, 1990).

A continuación se expondrán brevemente los resultados de diferentes investigadores para cada tipo de procesado en diferentes muestras.

A la hora de establecer una clasificación de los resultados obtenidos por diferentes autores se pueden seguir varios criterios:

- Según el método de análisis empleado.
- Según el tipo de procesado.
- Según el tipo de alimento.

Dado que en la bibliografía el criterio que predomina a la hora de elegir uno u otro método se basa en consideraciones particulares de cada investigador y que es muy difícil aunarlos se opta por elegir una clasificación en función del tipo de alimento.

Para cada muestra se han estudiado diferentes procesados, evaluando sus efectos por distintos métodos según los autores.

Se han desarrollado numerosos experimentos en hortalizas. En la mayoría de ellos se estudian los tratamientos por cocción en el seno de agua. Destaca el número de alimentos estudiados por Herranz y col. (1981, 1983) y Vidal-Valverde y col. (1983), entre los cuales se encuentran algunos con mayor contenido en proteína y almidón. En estas muestras se procede a la cocción y se determinan Fibra Neutro Detergente (FND) y Fibra Acido Detergente (FAD), celulosa, hemicelulosas, lignina y sustancias pécticas. Los resultados expresados como g/100 g de materia seca indican generalmente un aumento de FND y FAD y celulosa y un descenso de sustancias pécticas.

En la patata la cocción da lugar a un aumento de fibra insoluble (Varo y col. 1983), un descenso de FND y un aumento de celulosa.

El tratamiento de cocción a presión (Varo y col. 1984) a distintas temperaturas 100°C, 120°C y 130°C da un aumento significativo de celulosa, en los polisacáridos no celulósicos solubles en agua se produce un aumento de galactosa y hay descenso en ácidos urónicos, más acusadamente a 130°C. Para los polisacáridos no celulósicos insolubles en agua hay un aumento de glucosa y un descenso de galactosa.

Varo y col., (1984) observan en el tratamiento por microondas un aumento en el contenido de fibra total de forma menos importante que en el tratamiento por autoclave. En los polisacáridos no celulósicos insolubles en agua no hay grandes cambios en glucosa y galactosa.

Durante el horneado se produce un aumento en el contenido de fibra total y de celulosa (Varo y col. 1984) cuando se aplica el método de Englyst (1981) modificado por Varo.

La fritura da un aumento de fibra alimentaria y de celulosa, y descenso del valor de la fibra neutro detergente (Varo y col. 1983).

En tomates se estudia la cocción a presión en distintas condiciones de temperatura 100°C, 120°C y 130°C (Varo y col, 1984). Los polisacáridos no celulósicos solubles en agua aumentan a 100°C y descienden a 120° y 130°. Lignina y celulosa disminuyen a 130°C siendo los cambios significativos. El tratamiento en autoclave con acidificación del medio produjo los mismos efectos que en el caso de la patata. El tratamiento por microondas produce un aumento en los valores de polisacáridos no celulósicos insolubles en agua, no hay grandes cambios en glucosa y galactosa pero sí en los valores de polisacáridos no celulósicos. El horneado produjo un aumento de lignina y celulosa de todos los constituyentes.

En judías verdes el cocinado a presión produce un descenso en los valores de FND, FAD, celulosa y lignina (Vidal-Valverde y Frías, 1991), y el blanqueado y el enlatado no tienen ningún efecto (Nyman y col., 1987). En judías verdes en puré se produce un descenso en

sustancias pécticas durante el hervido en los primeros momentos de la cocción para pasar, a medida que esta prosigue, a una destrucción total de las mismas (Anderson y Clydesdale, 1980).

El escaldado de espárragos (96°C 4 min) se estudia mediante los valores de FAD y Fibra Insoluble (FI), determinada por el método de Asp (Heredia y col., 1992). En la fracción de FAD no hay modificaciones aunque se detecta un aumento de celulosa, posiblemente debido a productos de condensación tales como fenoles, proteínas y azúcares, originados como consecuencia del tratamiento térmico. Hubo aumento de proteínas y pérdida de una gran cantidad de hemicelulosas que fueron evaluadas como la diferencia entre FI y FAD una vez corregida por cenizas y proteínas.

En guisantes hay un descenso en los valores de FND, FAD, celulosa y lignina (Vidal-Valverde y Frías, 1991) durante el cocinado a presión. El blanqueado y el enlatado no producen ningún efecto (Nyman y col., 1987).

Reddy y Sistrunk (1980) observan en batatas que al cocinarlas en horno tradicional y en horno microondas tienen un contenido más elevado de sólidos totales, que puede ser responsable de parte de las diferencias halladas.

Las batatas cocinadas en horno tradicional tienen mayor cantidad de sustancias pécticas que las cocinadas por otros métodos.

Al cocinar en horno microondas obtienen mayor cantidad de hemicelulosas y celulosa. El hervido y la cocción al vapor da lugar a una cantidad de celulosa superior en el caso del segundo tratamiento.

Las batatas procedentes de distintos cultivares no reaccionan de igual forma a los diferentes métodos de cocinado: la pectina soluble en agua y la hemicelulosa se asociaron a estas diferencias entre cultivares.

En legumbres Vidal-Valverde y col. (1992) observan que el cocinado de las lentejas

previamente humedecidas redujo la cantidad de fibra alimentaria debido a una pérdida drástica de hemicelulosas, aunque celulosa y lignina aumentaron.

En lentejas, se ha estudiado, aparte de la variación cuantitativa de la fibra alimentaria que se produce al procesar los alimentos, también los posibles factores de la pared celular que pueden influir en la mejor o peor cocción de diferentes tipos de lenteja (Bhatty, 1990).

El salvado de trigo durante el hervido experimenta un descenso en la fracción soluble en agua y en la fracción acídica de hemicelulosas siendo este último muy importante. Asimismo se señala un aumento de lignina. El horneado produce un aumento en el contenido de lignina (Anderson y Clydesdale, 1980b).

Hasta aquí se ha hablado de alimentos analizados individualmente. Sin embargo, la mayor parte de los alimentos que consumimos han sufrido un proceso mucho más complejo, dado que previamente se han mezclado con otros para dar como resultado "alimentos elaborados o platos complejos".

En este sentido existen trabajos dedicados al pan (Barber y col. 1984) y algunos a platos elaborados típicos de la cocina española (Redondo y Villanueva, 1987 ; Díez y Villanueva, 1988).

Barber y col. (1984) analizan los cambios producidos en el contenido de fibra alimentaria durante el proceso de fermentación en la elaboración del pan. Determinan fibra bruta, FAD y FND, lignina y celulosa.

En la fermentación de la masa base a pH 6, el contenido de FND aumenta, apenas varía en la de la masa final, y disminuye ligeramente en la de la masa panaria, aunque esta disminución es estadísticamente no significativa.

El contenido de FAD se mantiene prácticamente constante en todas las masas de pH inicial 6. Lo mismo sucede con la celulosa; la lignina no cambia.

En la fermentación a pH 4,6 el comportamiento es similar excepto el de la masa base cuyo contenido de FAD disminuye un 10%.

En el proceso directo, el contenido de fibra neutro detergente (FND) aumenta un 10% en las dos primeras horas de fermentación, después se mantiene prácticamente constante. El contenido de fibra ácida detergente (FAD), celulosa y lignina no varía durante todo el proceso. El incremento de FND durante la primera etapa de la fermentación se debe, probablemente, a las hemicelulosas, ya que el FAD permanece constante; la pérdida simultánea de otros constituyentes de la masa, tales como CO<sub>2</sub> y etanol no llega a justificar aquél.

Redondo y Villanueva (1987) aplican el método de fibra bruta y los métodos detergentes ácido y neutro a seis platos de la cocina española: puré de hortalizas, paella valenciana, pisto manchego, judías verdes rehogadas, revuelto de habas y coliflor al natural. Comparan los valores obtenidos en el plato sin cocinar y cocinado. A partir de los resultados obtenidos se observa que en la fibra bruta, determinada por el método de Sharrer-Kruschner, sólo se aprecian diferencias significativas entre fresco y procesado en las judías verdes rehogadas y en el revuelto de habas, que se traducen, atendiendo al tanto por ciento de retención, en un descenso de 27% (R = 73%) y del 12 % (R = 88%).

En la fibra ácido detergente (FAD) las diferencias significativas corresponden, además de a los mismos platos que en el caso anterior con pérdidas de 19% (R = 81%) y 13% (R = 87%) respectivamente, al pisto manchego que desciende su contenido en un 15 % (R = 85%).

La fibra neutro detergente sufre pérdidas estadísticamente significativas únicamente en paella valenciana, un 19% (R = 81%) y en el pisto manchego 1% (R = 99%).

## **7.2. MODIFICACIONES CUALITATIVAS**

El segundo punto a considerar es la modificación estructural que experimenta la fibra alimentaria durante el procesado.

Este hecho se viene constatando desde hace tiempo (Mattheé y Appeldorf, 1978). Indican que las hortalizas procesadas muestran una mayor desintegración en el estómago que las hortalizas frescas. Wyman y col. (1976) encuentran que el salvado cocinado tiene menor efecto que el fresco en el peso de las heces. McConell y col. (1974) observan que el cocinado no tiene efecto en la capacidad de retención de agua de los vegetales, pero sí en la capacidad de intercambio catiónico. Hellendoorn y col. (1975), utilizando un método enzimático para la determinación de fibra, así como el método de la AOAC para fibra bruta, no detectan ninguna diferencia en el contenido de fibra de alimentos para el consumo humano después de cocinar e indica que la mejora en la digestibilidad es más de naturaleza física que química.

El procesado puede alterar las propiedades físico-químicas de la fibra y, por tanto, también sus efectos fisiológicos. Los hallazgos en este terreno pueden aportar una valiosa información, hoy día necesaria, para aclarar el significado del concepto de fibra alimentaria y cuáles son los componentes que la integran.

Dentro de este campo hay relativamente pocos trabajos. Destacan los de Pilnik y Voragen (1984) por sus estudios de las modificaciones en las propiedades físicas de las sustancias pécticas, en los que proponen la utilización de técnicas adecuadas que permitan la evaluación de las modificaciones sufridas por las sustancias pécticas en el caso particular de la elaboración de zumos.

Nyman (1992) estudia la influencia de diferentes procesados (congelado, blanqueado, cocinado y enlatado) en la distribución de pesos moleculares y la viscosidad de la fibra soluble, además estudia la fermentabilidad y la capacidad de hinchamiento de la fibra alimentaria en guisantes y zanahorias. Observa que se produce una despolimerización de la fibra soluble en zanahorias y judías verdes después del tratamiento por microondas, hervido o enlatado. También observan correlación entre el grado de polimerización y la viscosidad. Esto puede ser importante para el metabolismo de carbohidratos, donde la viscosidad tiene gran importancia.

Estudia muestras de zanahorias pertenecientes a dos cosechas diferentes. En una de ellas la fermentabilidad se vió muy afectada por el procesado. La fibra en productos que son

blanqueados antes de la congelación son más resistentes a la fermentación que las que son congeladas crudas o cocinadas. Estas diferencias en la fermentabilidad se reflejan en la capacidad de hinchamiento fecal. En la otra cosecha de zanahorias y en los guisantes la fermentabilidad es similar después de todos los procesos.

Lintas y col. (1992) estudian los efectos del cocinado tradicional y del procesado industrial sobre los polisacáridos en diferentes legumbres. La variación más importante se produce en el almidón. El almidón resistente y las fracciones lentamente digestibles predominan en las legumbres crudas. Después del cocinado, la cantidad de almidón resistente es altamente reducida y es digestible un porcentaje más elevado de almidón.

Champ y col. (1990) investigan la influencia del cocido a presión en las propiedades físico-químicas de la fibra de la pulpa de remolacha azucarera, en la que observan que no hay modificación sobre las propiedades fisiológicas de la fibra soluble y de la insoluble tras el tratamiento con autoclave.

Muchos de los cambios de las características de textura de los vegetales se han relacionado con cambios en los constituyentes fibrosos. Así pues es importante relacionar estos cambios de textura con los que experimenta la fibra alimentaria. Brandt y col. (1984), en un estudio realizado con judías, coliflor, patatas, guisantes y maíz cocidos en soluciones de diferentes pH, observan que las hortalizas procesadas son más firmes a pH 4 y más blandas a pH 10. Las hortalizas que están más influidas por él son las que tienen más modificaciones en los componentes de la fibra. Asocian este hecho con los componentes solubles encontrados en el medio de cocción que son los que reflejan los cambios de la textura.

En realidad el fenómeno más estudiado es el mecanismo por el cual se modifican las sustancias pécticas durante el proceso de cocción.

Waldron y Selvendran (1990) realizan un estudio en el que señalan que los cambios de textura, anteriormente mencionados, ocurren como consecuencia de la extracción de calcio de la región de la lámina media por agentes quelantes adecuados ej. citrato, y también debido al proceso de  $\beta$ -eliminación de degradación de pectinas. Estos dos procesos favorecen la

separación de las células. La degradación de pectina de manzana por  $\beta$ -eliminación ha sido estudiada durante el calentamiento en tampón fosfato a pH 7, y estas condiciones son semejantes a las que se dan en las hortalizas durante el hervido.

Estos resultados muestran que hay una descomposición de las pectinas que se puede producir durante el hervido de las hortalizas. Para poder predecir los efectos de la degradación  $\beta$ -eliminativa de los polisacáridos de la fibra alimentaria se compararon los efectos experimentados por el material de la pared celular purificado cuando se trata con agua caliente y con oxalato en caliente y con ácido diamino ciclohexano tetraacético (CDTA) a 20°C.

Los resultados muestran que los polisacáridos liberados con CDTA son ricos en ácidos urónicos con algo de arabinosa y galactosa. Por el contrario los polisacáridos liberados tanto por agua caliente como por oxalato caliente contienen cantidades considerables de galactosa.

Se comparan también los residuos de  $\alpha$ -celulosa que permanecen después de la extracción subsiguiente no degradativa con álcali. Mientras que la  $\alpha$ -celulosa de las paredes celulares extraídas con CDTA es rica en galactosa, este monosacárido se encuentra en poca cantidad en la  $\alpha$ -celulosa extraída con oxalato. Se puede concluir, según estos autores (Waldron y Selvendran, 1990), que la liberación de galactosa por el calor se debe a una depolimerización, mientras que en condiciones no degradativas permanece en la fracción de  $\alpha$ -celulosa.

Otros fenómenos que se han analizado como responsables del cambio de textura son los cambios en la cristalinidad de la celulosa en zanahorias. Holdsworth (1979) recoge los estudios realizados por Schrupf y Charley sobre las modificaciones de textura de zanahorias cocinadas al microondas. Estos autores indican una pérdida de peso de un 34,2% utilizando el microondas, comparándolo con un 15,7% en el método tradicional de cocción. El cocinado al microondas también causa algo de deshidratación del tejido, aumentando la cristalinidad de los geles de los carbohidratos de la pared celular originándose un aumento de la resistencia. En batatas el cocinado al microondas produce una textura más grosera que se asocia a una unión más fuerte entre los polisacáridos después de la cocción.

## **II PARTE EXPERIMENTAL**

# **1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

## **1.1. PLANTEAMIENTO**

El objetivo fundamental de este trabajo es el conocimiento de las modificaciones que puede experimentar la fibra alimentaria y los azúcares solubles de algunas hortalizas de consumo frecuente en España sometidas a la acción de un proceso térmico. Se hace especial hincapié en la fibra alimentaria por su interés y actualidad científica.

Una vez revisados los conocimientos que actualmente existen en torno a la fibra alimentaria se pueden deducir las siguientes consideraciones:

- No existe uniformidad de criterios en cuanto al concepto de fibra alimentaria y su determinación analítica.

- Los resultados obtenidos en alimentos sometidos a tratamientos térmicos son diferentes según el método analítico empleado.

- Entre la gran variedad de métodos existentes, los que proporcionan mayor información sobre la composición monomérica de los polímeros que constituyen la fibra alimentaria son las técnicas cromatográficas.

Teniendo en cuenta el estado actual del tema, la planificación del trabajo se ha realizado de la siguiente forma:

- Elección de tres hortalizas de consumo frecuente en España: zanahoria, remolacha y nabo.

- Puesta a punto de la metodología apropiada para el análisis de fibra alimentaria y de la fracción de azúcares solubles.

-Estudio de las variaciones que se producen en la fibra alimentaria y azúcares solubles de las muestras seleccionadas una vez sometidas a proceso de cocción.

-Análisis estadístico de los resultados y valoración de los mismos.

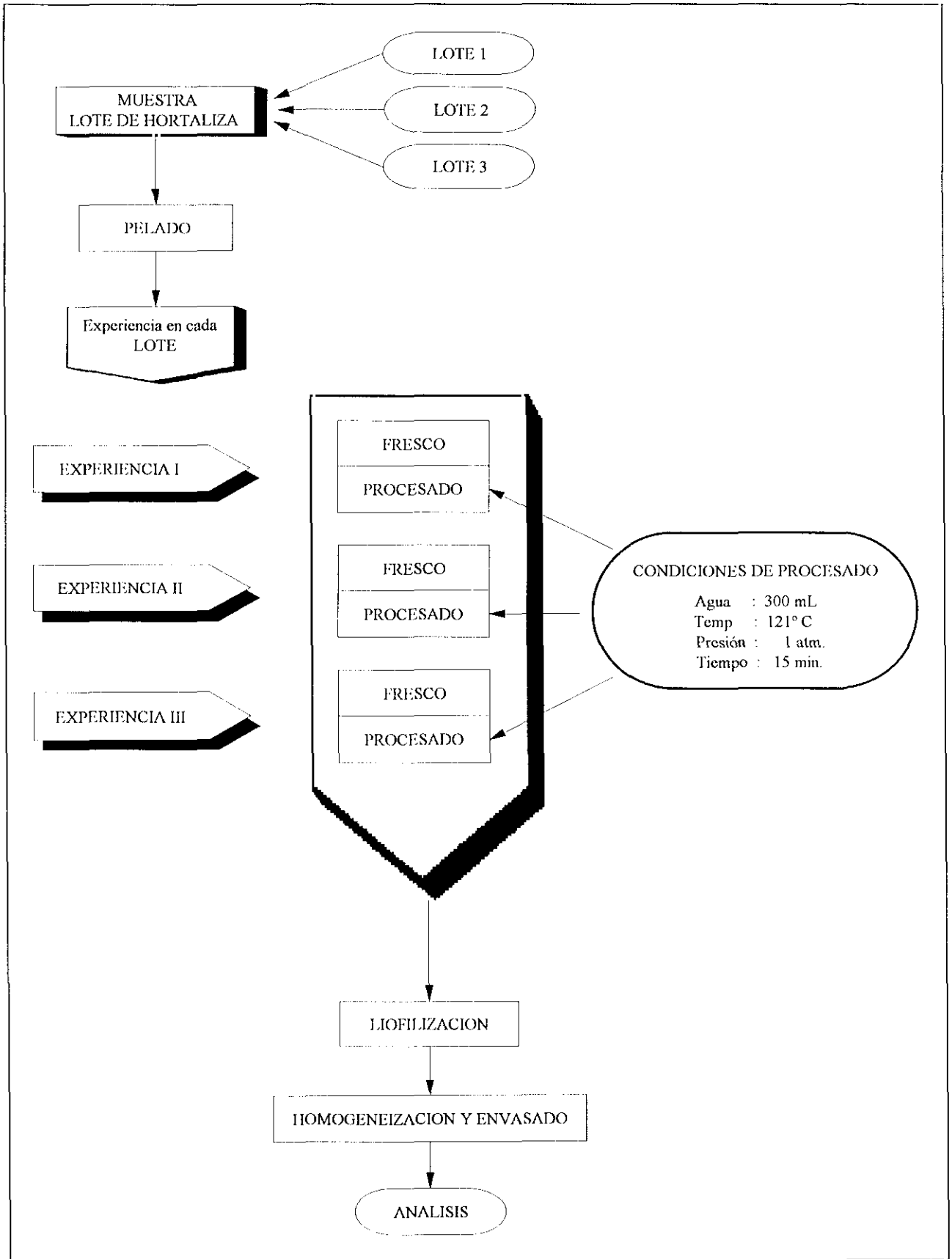
## 1.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se han seleccionado las siguientes hortalizas en función de su consumo frecuente y de su similitud botánica:

- Zanahoria: (*Daucus carota* L. var. *sativa*)
- Remolacha: (*Beta vulgaris* L. var. *cruenta*)
- Nabo: (*Brassica napus* L. var. *sculenta*).

Las hortalizas objeto de estudio se han adquirido en mercados minoristas de Madrid en cantidad suficiente para llevar a cabo el esquema experimental diseñado. Una vez en el laboratorio se elimina la piel y la parte comestible se trocea en piezas de peso homogéneo, distribuyéndolas después en tres grupos: I, II y III. Cada grupo se divide en dos partes iguales, una de las cuales se reserva en fresco y la otra, procedente de cada uno de los grupos se procesa en distintos momentos. Las condiciones de procesado utilizadas son: autoclave a 121°C de temperatura y 1 atmósfera de presión durante 15 minutos, añadiendo 300 mL de agua (Esquema nº 2). Después del tratamiento térmico se separa la muestra cocida del líquido de cocción.

Tanto las porciones sin procesar (fresco), como las procesadas, se liofilizan en un liofilizador Terruzzi-Mevilsa mod. TP-3, con superficie de carga de 0,3 m<sup>2</sup>, dotado de equipo de registro, dispositivo de termovació y programador. Las temperaturas alcanzadas en el proceso de liofilización han oscilado entre -3°C en la fase de congelación y 20°C en la fase de desecación, de tal forma que las modificaciones estructurales sean mínimas. A continuación se homogeneizan y se conservan en frascos de vidrio herméticamente cerrados, a una



Esquema nº 2. Preparación de la muestra.

temperatura de 5°C y en ausencia de la luz.

Se han estudiado tres lotes diferentes de cada hortaliza y, como se ha indicado, cada lote se divide en tres grupos. Los lotes se adquirieron en días distintos entre los meses de abril y junio.

## **2. METODOS ANALITICOS**

Las determinaciones analíticas se han llevado a cabo mediante los métodos que figuran en el esquema n° 3 y que se detallan a continuación. Los reactivos empleados en cada caso se encuentran en el Apéndice de Reactivos.

### **2.1. HUMEDAD**

Se evalúa por la pérdida de peso que experimenta el material liofilizado respecto al fresco. Se determina en partes alícuotas contenidas en viales que se liofilizan al mismo tiempo que el total de la muestra.

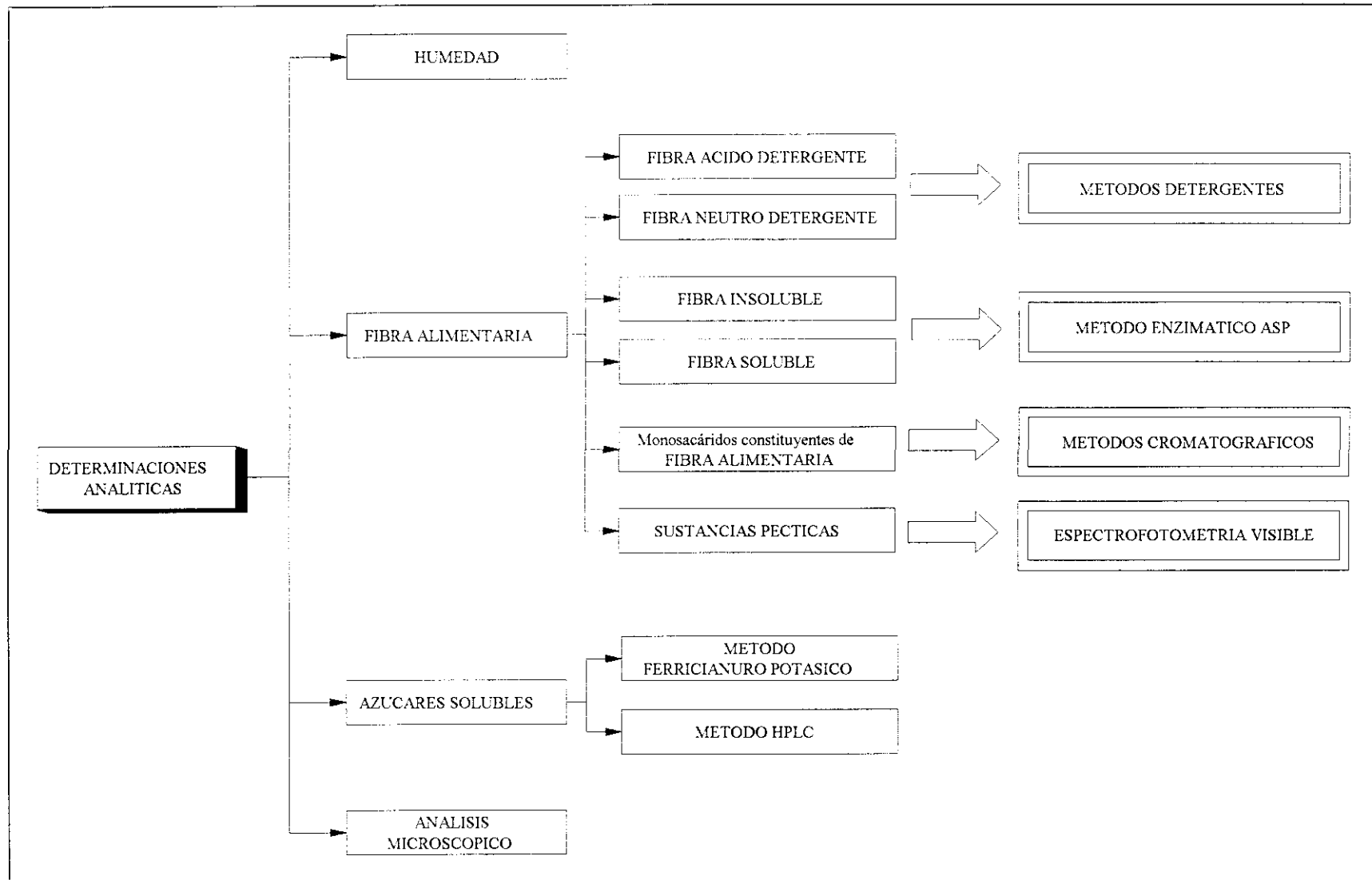
Los cálculos se realizan de la siguiente forma:

$$\text{Humedad (g/100 g)} = \frac{100 \cdot X}{P}$$

donde:

X = diferencia de peso entre la muestra fresca y la liofilizada.

P = peso de muestra contenido en el vial.



Esquema nº 3. Determinaciones analíticas realizadas.

## **2.2. FIBRA ALIMENTARIA**

Entre la gran cantidad de métodos existentes para el análisis de fibra alimentaria, en el presente trabajo se han seleccionado los que se especifican a continuación.

### **2.2.1. Métodos gravimétricos**

#### **2.2.1.1. Métodos detergentes**

Se fundamentan en el tratamiento de la muestra con soluciones detergentes en caliente para obtener la fibra alimentaria expresada como fibra neutro detergente (FND) y fibra ácido detergente (FAD) (Van Soest y Wine, 1967; Van Soest, 1963b) (Esquema n<sup>o</sup> 4).

##### **a) Método detergente ácido**

Según las indicaciones de Van Soest (1963b) se pesa una cantidad de muestra entre 0,5 y 1,0g y se lleva a un matraz de fondo redondo de 500 mL de capacidad y esmerilado. Se añaden tres o cuatro perlas de vidrio, para regular la ebullición, y 100 mL de la solución detergente de bromuro de cetil trimetil amonio a pH 1,5. A continuación el matraz se lleva a una placa calefactora y se calienta a reflujo; una vez alcanzado el punto de ebullición se mantiene durante 1 hora. El contenido del matraz se filtra a través de un crisol de vidrio de placa filtrante (n<sup>o</sup> 2), previamente calcinado y tarado, con ayuda de vacío. El crisol lleva una capa de lana de vidrio para facilitar la filtración.

El matraz se lava con agua destilada caliente (90-100°C) y los líquidos de loción se filtran por el crisol. Finalmente el residuo se lava dos veces con acetona. El crisol junto con el residuo se deseca en estufa (100°C) durante toda la noche. Se enfría en desecador y se pesa. Posteriormente se calcina en horno mufla a 500°C (3 horas). Se enfría en desecador y se pesa. De esta determinación se obtiene el valor de las cenizas.

Cálculos:

$$\text{FAD (g/100 g)} = \frac{100 (X-X')}{P}$$

donde:

X = Peso del crisol con residuo desecado.

X' = Peso del crisol con residuo incinerado.

P = Peso de la muestra.

el residuo FAD está constituido, fundamentalmente, por celulosa y lignina.

### **b) Método detergente neutro**

El fundamento es el mismo que en el caso anterior (Van Soest y Wine, 1967). La solución empleada tiene lauril sulfato sódico como detergente y el procedimiento señala tomar un peso de muestra comprendido entre 0,5 y 1 g, añadir 100 mL de la solución detergente, cuyo pH debe estar comprendido entre 6,9 y 7,1 y mantener en ebullición regular durante 60 minutos.

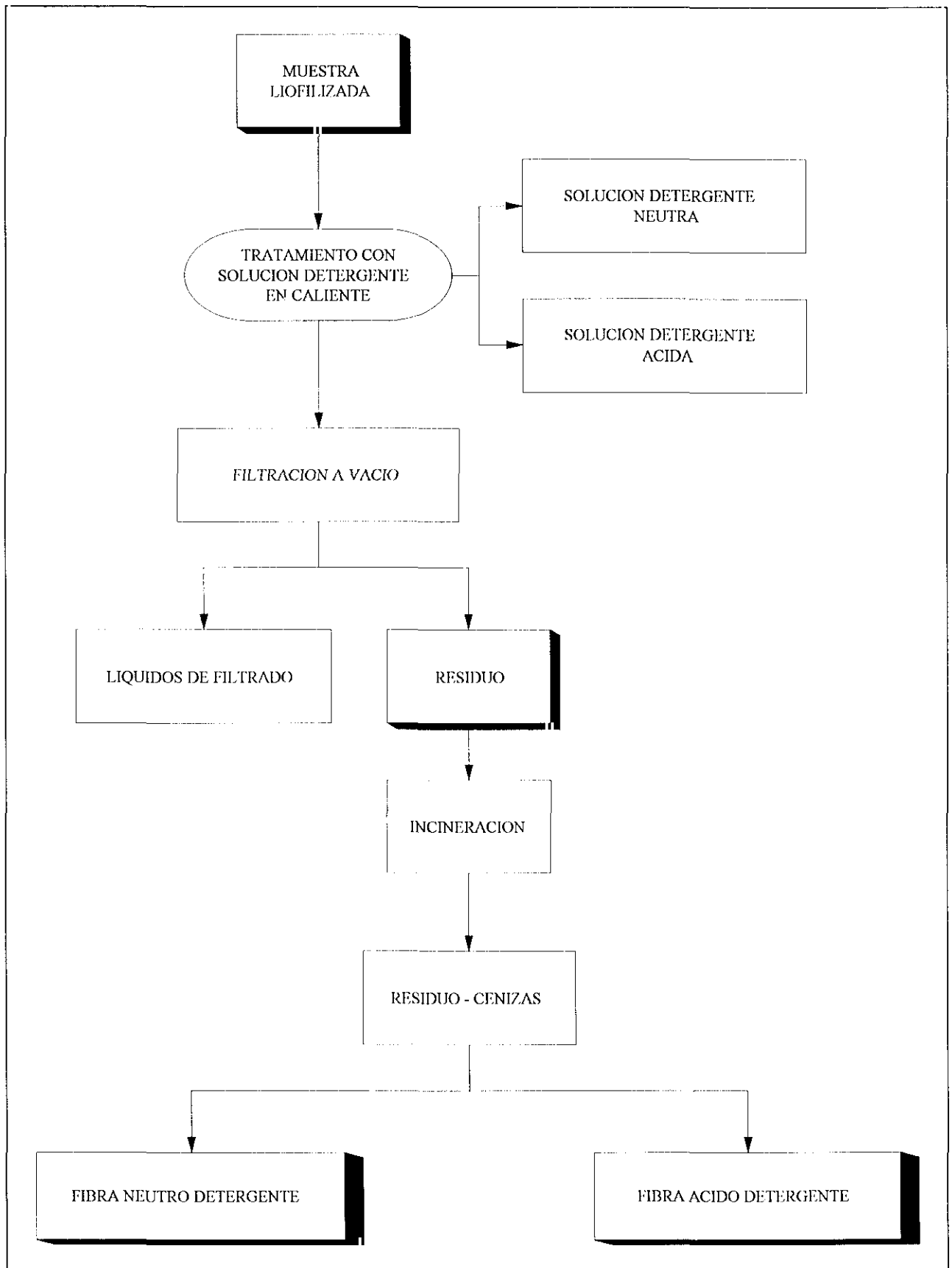
Permite la determinación de un residuo sólido denominado fibra neutro detergente (FND) formado por celulosa, hemicelulosas y lignina.

#### **2.2.1.2. Método enzimático-gravimétrico: Método de Asp**

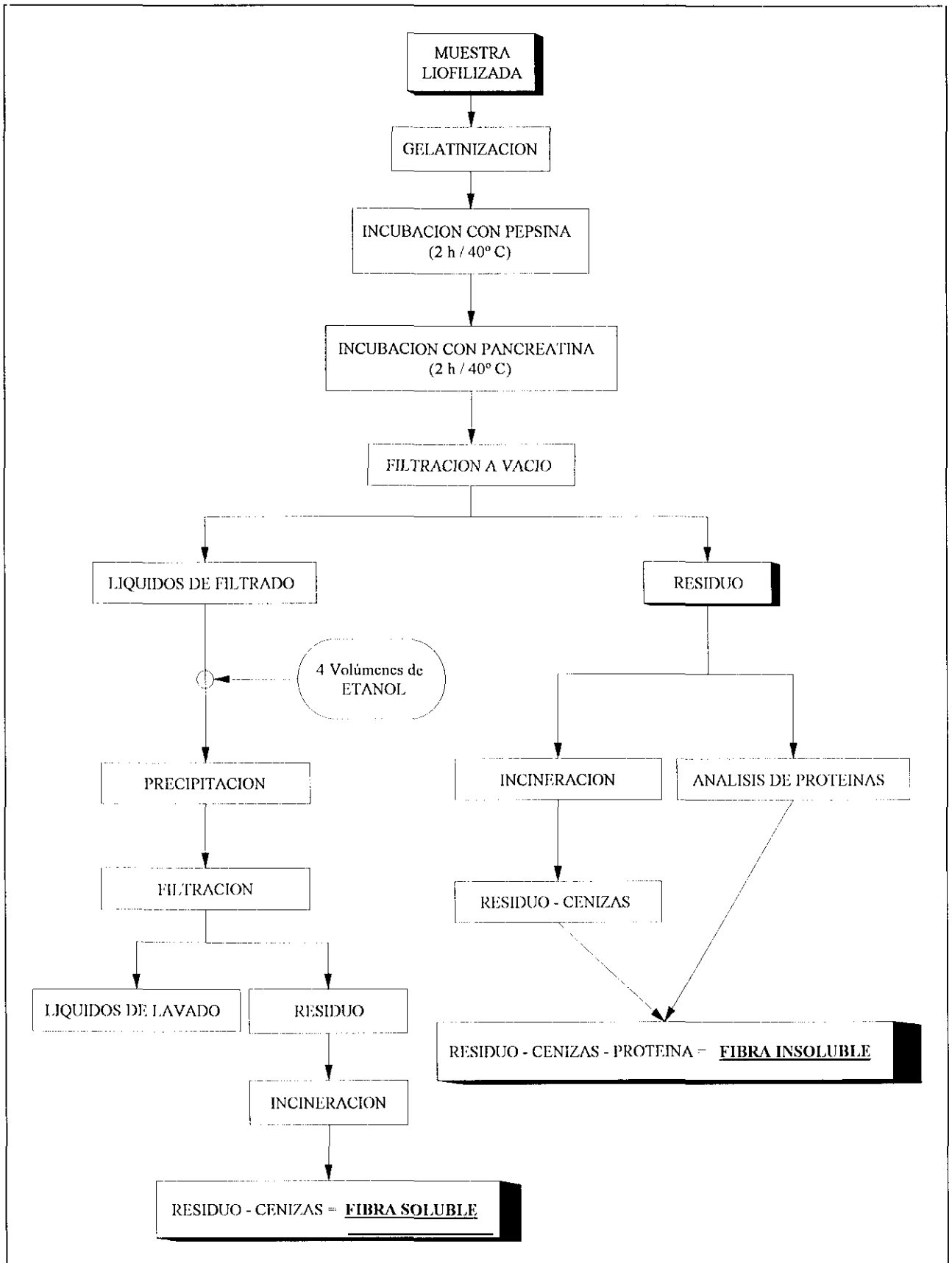
Se fundamenta en el aislamiento del residuo de fibra alimentaria mediante el tratamiento de la muestra con dos enzimas: pepsina y pancreatina. El residuo así obtenido se evalúa por *gravimetría* (Asp y col., 1983). Dentro de los métodos gravimétricos, presenta la peculiaridad de analizar tanto fibra insoluble como soluble (Esquema n° 5).

Se toman 0,4 g de muestra, se añaden 20 mL de agua y se somete a la acción del calor en un baño de agua hirviente durante 20 minutos para proceder a la gelatinización del almidón.

A continuación se enfría a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 1,5. Se añaden 15 mg de pepsina y se lleva a incubación con agitación a 40°C durante 2 horas.



Esquema nº 4. Métodos detergentes.



Esquema nº 5. Método de Asp.

Transcurrido este período de tiempo se ajusta el pH a 6,8 y se añaden 25 mg de pancreatina. Se incuba en las mismas condiciones que en el caso anterior y posteriormente se ajusta el pH a 4,5. Para ajustar el pH se utilizan soluciones de ácido clorhídrico e hidróxido sódico.

Ajustado el pH a 4,5 se filtra sobre un crisol de vidrio de placa filtrante (nº 2), previamente incinerado y tarado, con ayuda de vacío. Se obtiene así un líquido filtrado y un residuo sólido.

Al líquido filtrado se le añaden cuatro volúmenes de etanol para precipitar la fracción soluble y se deja en reposo durante 1 hora. A continuación se filtra sobre otro crisol de vidrio de placa filtrante (nº 2), previamente incinerado y pesado, y se lava con etanol dos veces y con acetona. Se lleva el crisol a estufa (100°C) durante toda la noche. El crisol con el residuo se enfría en desecador y se pesa. A continuación se incinera en mufla a 500°C durante 3 horas, se enfría y se pesa. El residuo seco al que se resta el peso de las cenizas, se corresponde con la fibra soluble (FS), formada fundamentalmente por sustancias pécticas.

Cálculos:

$$FS \text{ (g/100 g)} = \frac{100(X-X')}{P}$$

donde:

X = peso del crisol con residuo desecado.

X' = peso del crisol con residuo incinerado.

P = peso de la muestra.

El crisol con el residuo obtenido tras la primera filtración se lleva a estufa (100°C) durante toda la noche. Se enfría en desecador y se pesa. A continuación se incinera en mufla (500°C), y se vuelve a enfriar y pesar. El residuo sólido, libre de cenizas y de proteínas, se corresponde con la fibra insoluble (FI), formada fundamentalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina.

Cálculos:

$$FI (g/100 g) = \frac{100(Y-Y')}{P}$$

donde:

Y = Peso crisol con residuo desecado.

Y' = Peso crisol con residuo incinerado.

P = Peso de muestra.

En los residuos FAD, FND y FI se lleva a cabo la determinación de las proteínas que no son solubilizadas y que permanecen en los residuos después del correspondiente tratamiento. En el caso de los detergentes esta determinación no está indicada en el método pero se ha realizado para conocer, al igual que en el método enzimático, la eficacia del tratamiento respecto a la eliminación de proteínas. La determinación en los residuos de fibra, así como en las muestras, se realiza según el método Kjeldahl (AOAC, 1990a). Se obvia la descripción del método por no ser objeto de este estudio sino meramente un complemento de los métodos descritos y estudiados. De la misma forma que en el caso de las proteínas, en las muestras también se determina el contenido de cenizas (AOAC, 1990b) para poder calcular la eficacia de eliminación de las mismas por parte de los métodos detergentes y del enzimático-gravimétrico. Por las razones indicadas anteriormente se omite la descripción del método.

### **2.2.2. Métodos cromatográficos**

Los métodos cromatográficos para el análisis de fibra alimentaria se fundamentan en el análisis de los monosacáridos obtenidos tras la hidrólisis de los polisacáridos que la forman. Los monosacáridos son separados, cuantificados y a partir de ellos se obtienen los valores correspondientes a los polisacáridos. El análisis implica tres etapas :

- Aislamiento de la fibra alimentaria.
- Hidrólisis de los polisacáridos.
- Separación y cuantificación de monosacáridos utilizando el sistema cromatográfico adecuado.

**a) Aislamiento del residuo de fibra alimentaria (Englyst y Cummings, 1988)**

Se introduce, en un tubo de capacidad aproximada de 60 mL, una cantidad de muestra comprendida entre 100 y 200 mg. Se añaden 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se cierra el tubo e inmediatamente se mezclan los contenidos utilizando un agitador vibrador. Es esencial que toda la muestra se humedezca y que el material no se adhiera a las paredes del tubo. Se agita durante un período de cinco minutos. Se colocan los tubos en un recipiente con agua hirviente situado sobre un agitador magnético durante 1 hora.

A continuación se sacan los tubos uno a uno, se abren e inmediatamente se adicionan 8 mL de tampón acetato ajustado a 50°C. Se ponen los tubos en un baño de agua a 42°C durante dos o tres minutos. Se añaden 0,5 mL de solución de  $\alpha$ -amilasa y 0,1 mL de la solución de pululanasa y se mezclan en un agitador. Se incuba durante 16 horas con agitación.

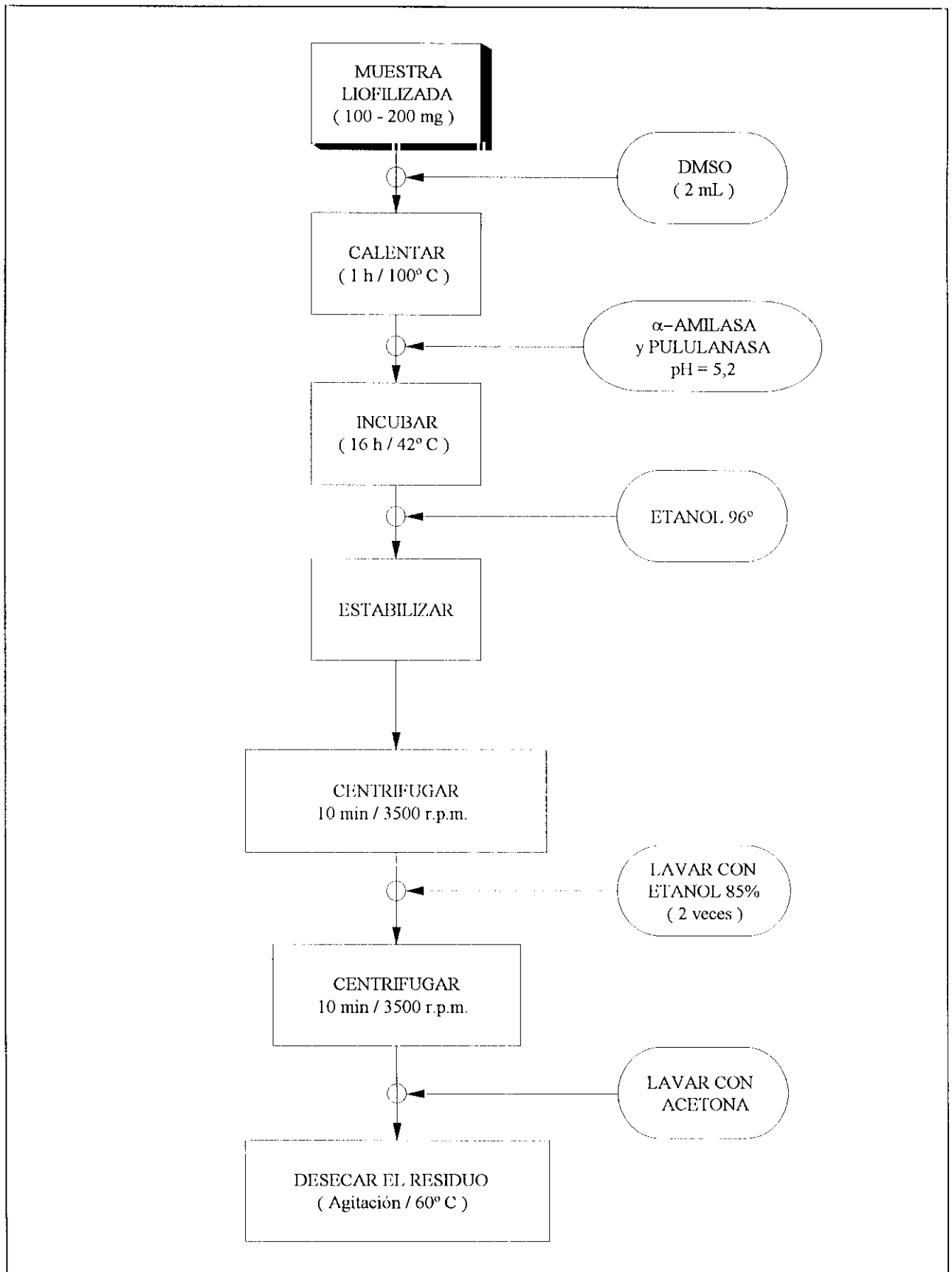
Se sacan los tubos del baño y se añaden 40 mL de etanol absoluto. Se mezclan bien y se dejan durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se centrifugan a 3500 r.p.m. durante 10 minutos.

Se elimina el sobrenadante con una pipeta utilizando vacío y se lava el precipitado de la siguiente manera: se añade metanol al 85%, se agita para formar una suspensión con el residuo, se centrifuga y se elimina el sobrenadante líquido igual que antes. Se lava una vez con acetona y se elimina el sobrenadante.

En un baño de agua a 60-65°C el residuo se calienta mientras se agita en un agitador magnético y se aplica una ligera corriente de aire. Este paso concluye una vez que está totalmente seco (Esquema n° 6).

**b) Hidrólisis de los polisacáridos que constituyen el residuo de fibra alimentaria.**

Esta fase de la hidrólisis se realiza mediante la acción de ácidos fuertes. En la bibliografía se describen diferentes posibilidades (Sloneker, 1971; Selvendran y col., 1979a; Barton y col., 1982; Reistad, 1983; Petersen y col., 1984; Faulks y Timms, 1985; Englyst y Cummings,



Esquema nº 6. Determinación de fibra alimentaria por HPLC. Aislamiento del residuo.

1988; Grahan y col., 1988; Marlett y Navis, 1988; Siddiqui, 1989), si bien se pueden reducir en dos grandes bloques:

- Hidrólisis con ácido sulfúrico.
- Hidrólisis con ácido trifluoroacético.

b.1) Hidrólisis con ácido sulfúrico (Englyst y Cummings, 1988)

El tratamiento con este agente hidrolítico se realiza en dos etapas:

- hidrólisis primaria con ácido concentrado,
- hidrólisis secundaria con ácido diluido.

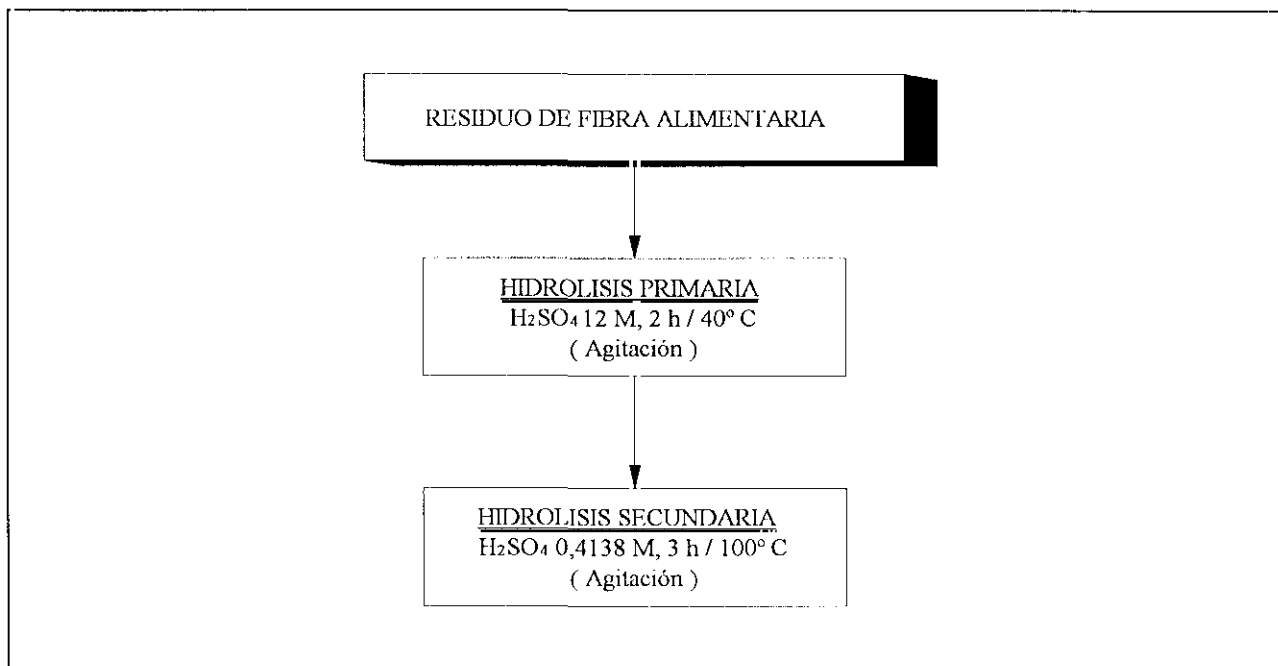
Se añaden 0,3 mL de  $H_2SO_4$  12 M al residuo de fibra alimentaria aislado anteriormente. Se calienta a  $40^\circ C$  durante 2 horas con agitación. Se añaden 8,4 mL de agua para obtener  $H_2SO_4$  0,4138 M y se mantiene durante 3 horas a  $100^\circ C$  en un baño de agua hirviendo mientras se agita.

Durante la hidrólisis primaria se forman ésteres sulfato con la celulosa, especialmente en  $C_6$  y se rompen los puentes de hidrógeno entre las microfibrillas. El paso de la hidrólisis secundaria rompe los ésteres formados en la hidrólisis primaria y regenera el monosacárido libre. El resto de los polisacáridos se ven afectados de igual forma por la acción del ácido concentrado.

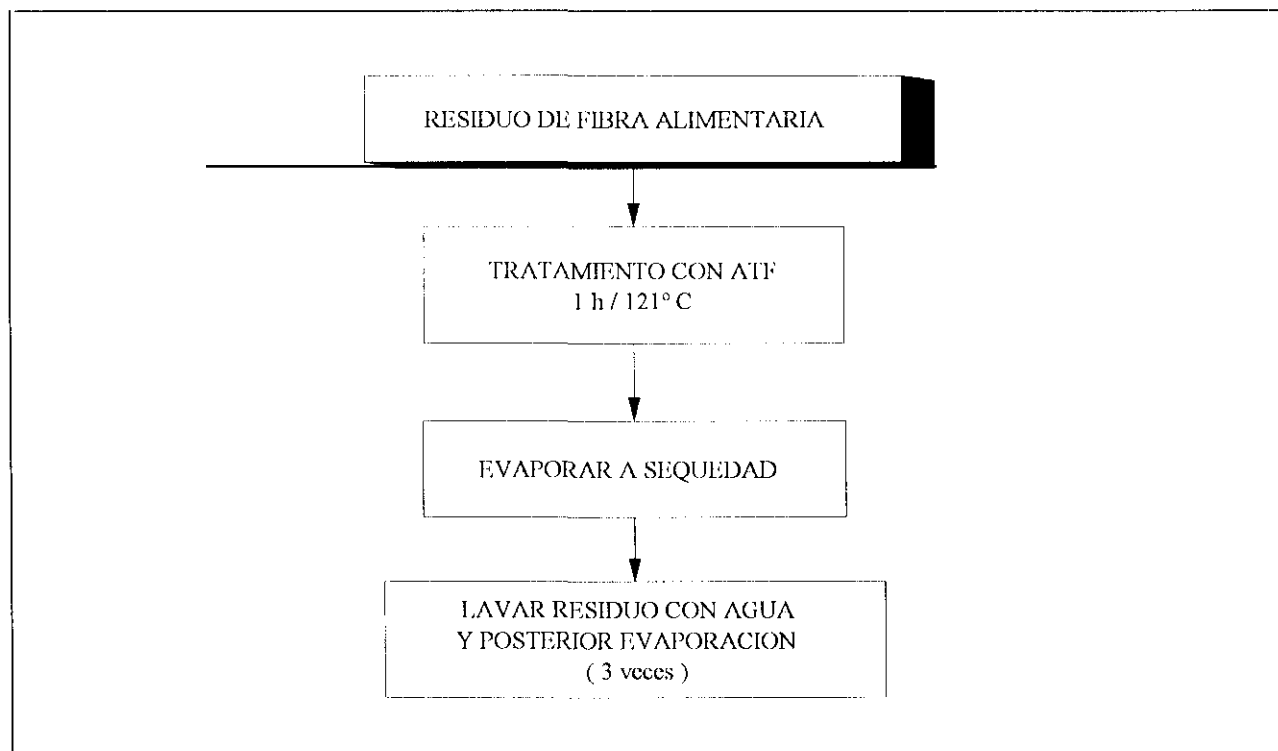
Después se enfría a temperatura ambiente. El hidrolizado se puede conservar durante 24 horas a  $5^\circ C$  (Esquema n° 7a).

b.2) Hidrólisis con ácido trifluoroacético (Barton y col., 1982)

El residuo de fibra alimentaria se pone en un tubo de ensayo y se añaden 20 mL de ácido trifluoroacético (ATF). Se calienta durante 1 hora en un bloque calefactor a  $121^\circ C$ . Finalizado el calentamiento se deja enfriar el tubo a temperatura ambiente y se procede a la evaporación hasta sequedad en un rotavapor.



**a) Condiciones de hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**



**b) Condiciones de hidrólisis con ATF.**

**Esquema nº 7. Determinación de fibra alimentaria por HPLC. Hidrólisis del residuo.**

A continuación se añaden 150 mL de agua y se evapora a sequedad de nuevo. Este lavado se repite dos veces más para asegurar una completa eliminación de ATF. El concentrado final se redisuelve con 5 mL de agua (Esquema n° 7b).

### **c) Preparación del hidrolizado para el análisis cromatográfico**

Se utilizan diferentes tipos de sistemas cromatográficos, fundamentalmente:

-Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) que, como ya se ha indicado, es utilizada en escaso número de trabajos.

-Cromatografía de Gases (GLC), ampliamente difundida.

#### **c.1) Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)**

##### **c.1.1) Hidrolizado con ácido sulfúrico**

Antes de realizar el análisis cromatográfico es preciso neutralizar el hidrolizado (apartado b.1.). Para ello existen diversos procedimientos descritos en la bibliografía: neutralización con hidróxido bórico (Slavin y Marlett, 1983), con carbonato bórico (Neilson y Marlett, 1983) y utilización de la resina de intercambio iónico BioRad AG 4-X4 (Garleb y col., 1989). Todos ellos han sido estudiados como se podrá comprobar en el apartado titulado "Estudio de los métodos de análisis" que figura más adelante.

En el caso del tratamiento con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , se añade  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  2 M hasta que el pH alcance un valor de 3,5 aproximadamente y, a continuación, se añade  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  0,25 M hasta que el pH quede comprendido entre 6 y 7. Se deja estabilizar durante 1 hora y al cabo de este tiempo se vuelve a medir el pH, reajustándolo en caso de que sea necesario.

Cuando se utiliza  $\text{BaCO}_3$ , se añaden 11 g de dicho producto a 10 mL del hidrolizado. Se mide el pH, se comprueba que está comprendido entre 6 y 7, y se deja estabilizar.

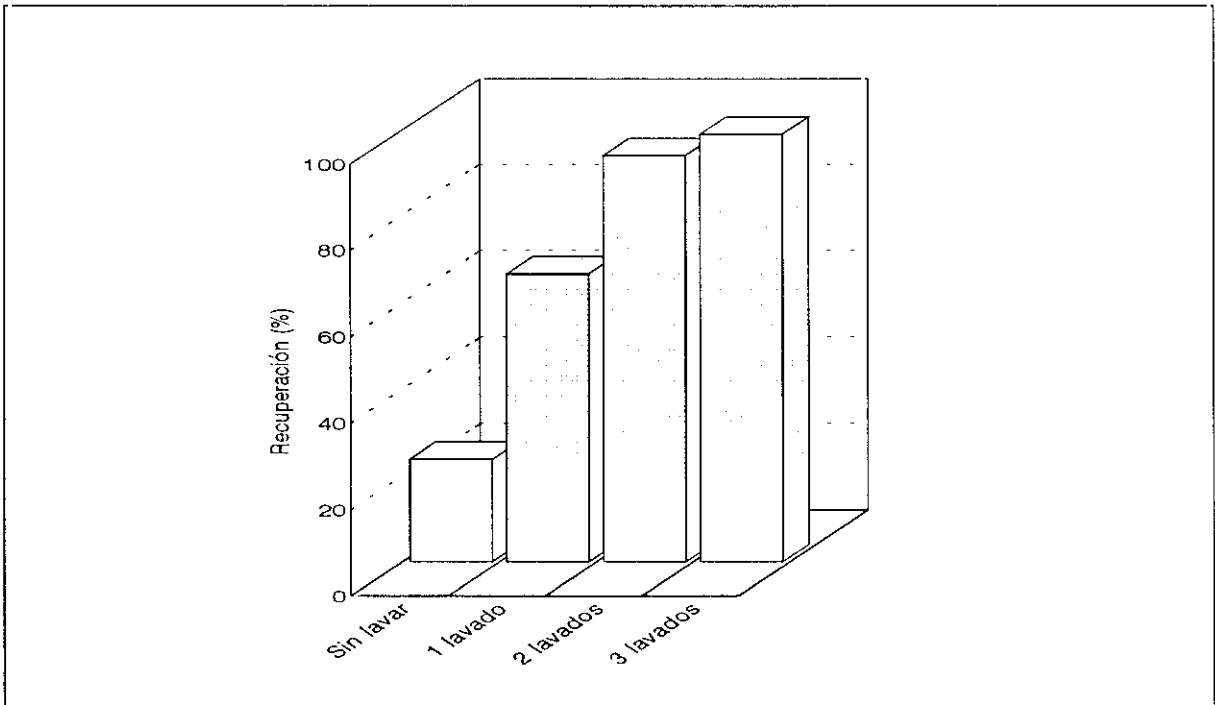
En ambos casos,  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  o  $\text{BaCO}_3$  se forma un precipitado de  $\text{BaSO}_4$ . Se centrifuga a 3500

r.p.m. durante 10 minutos y se extrae el sobrenadante. Se lava el precipitado, habiéndose comprobado en este estudio que se necesitan 3 lavados con 25 mL de agua para lograr unos porcentajes de recuperación óptimos (Gráfico n°1).

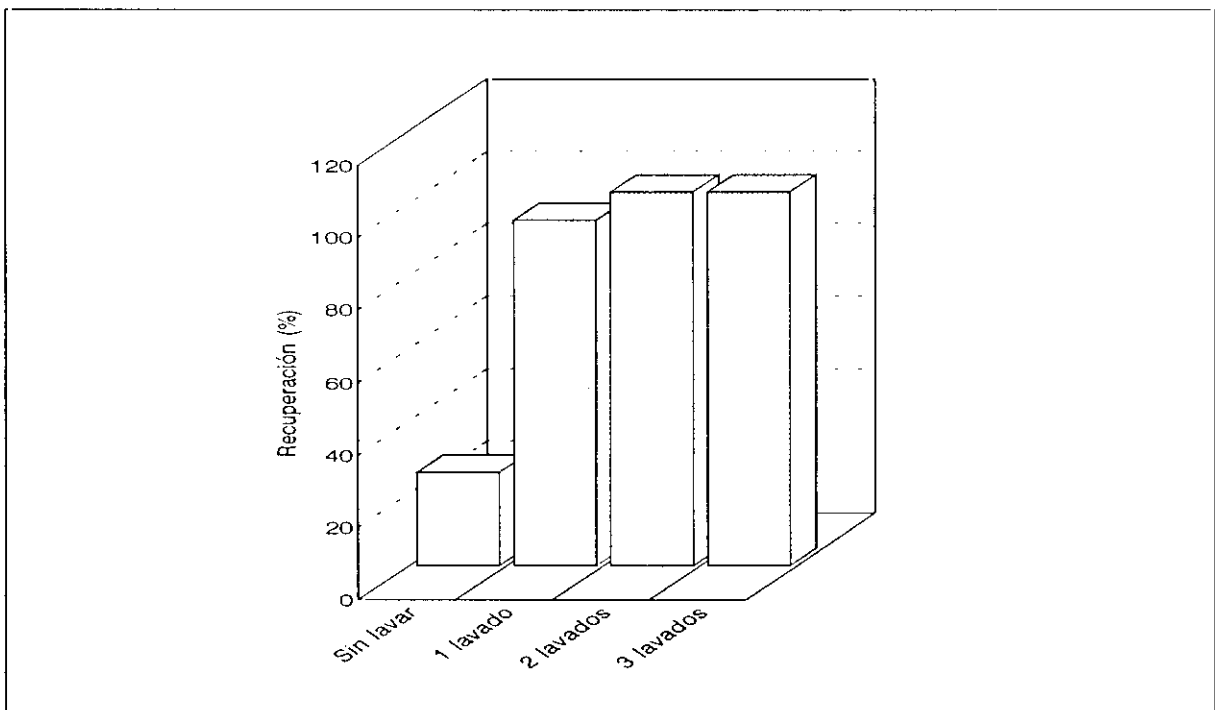
Se mezclan los sobrenadantes obtenidos después de las diferentes centrifugaciones y se filtran por filtro de 0,45  $\mu$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (HAWPO47000), y a continuación se pasa por la resina de intercambio iónico para la eliminación de iones bario. Se utiliza la resina AG 50W-X8 (BioRad 142-1451) de una capacidad total de 5,1 meq/g seco. Se ha comprobado en este trabajo que es necesario lavar la resina tres veces para lograr una recuperación óptima de los monosacáridos.

El líquido eluido de la columna de resina se concentra en un rotavapor hasta sequedad, se redissuelve en 5 mL de agua, se pasa por filtro de 0,45  $\mu$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (HAWPO47000), y a continuación se pasa por un cartucho Sep-Pack Plus C<sub>18</sub> de Millipore Waters Associates. Se deposita en un vial y se inyecta en el cromatógrafo (Esquema n° 8).

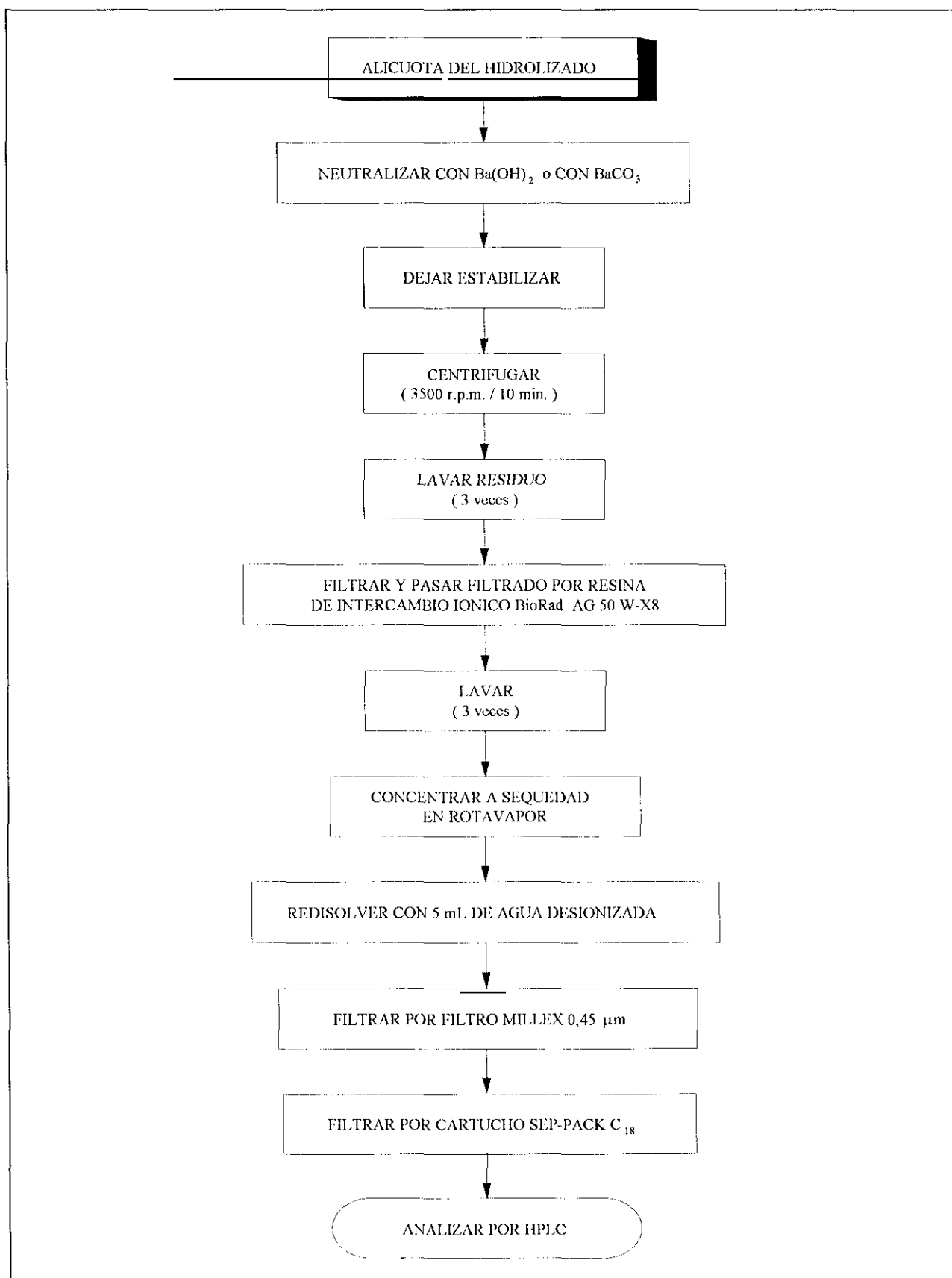
Por su comodidad y rapidez se optó por el método de neutralización que implica la utilización de la resina de intercambio aniónico AG 4-X4 (BioRad 140-4341), de una capacidad total de 2,8 meq/g seco. Para ello se emplea una columna preparada con 5,7 g de la mencionada resina. Se pasan 5 mL del hidrolizado y se lava dicha columna tres veces con agua desionizada, comprobándose que así se obtiene la máxima recuperación (Gráfico n° 2). Se toma una parte alícuota, se filtra por filtro de 0,45  $\mu$  de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (HAWPO47000 Millipore, S.A.). A continuación se pasa por un cartucho Sep-pack C<sub>18</sub>, se deposita en un vial y, se inyecta en el equipo cromatográfico (Esquema n° 9).



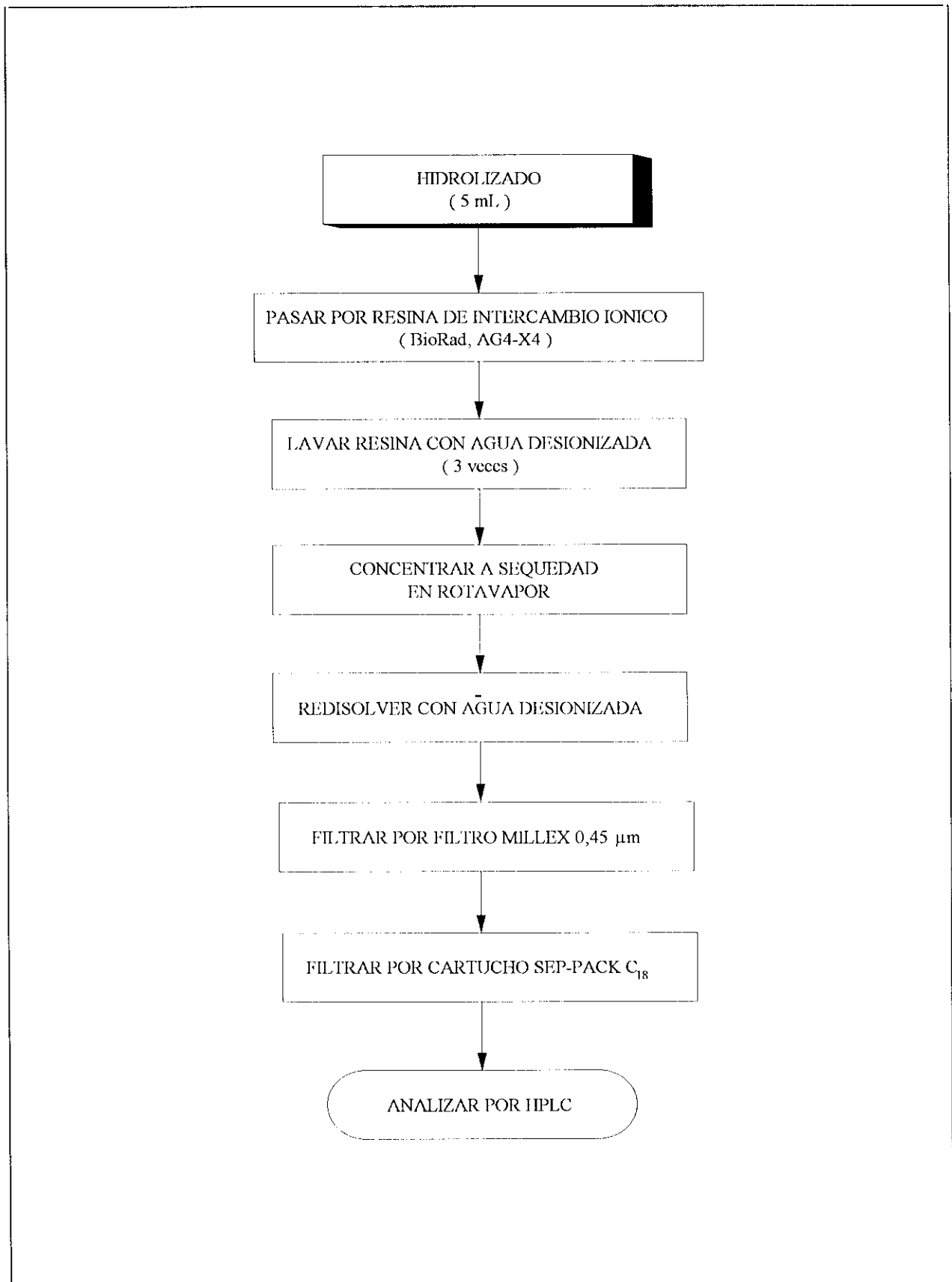
**Gráfico nº I. Eficacia de los lavados del precipitado de sulfato de bario.**



**Gráfico nº II. Eficacia de los lavados de la resina AG4-X4 (BioRad).**



**Esquema n° 8. Determinación de fibra alimentaria por HPLC: a) Neutralización y purificación del hidrolizado.**



**Esquema nº 9. Determinación de fibra alimentaria por HPLC: b) Neutralización y purificación del hidrolizado.**

Las condiciones cromatográficas son:

- Columna: Aminex HPX-87P, 300 x 7,8 mm (BioRad).
- Precolumna: 125-029 (BioRad).
- Bomba: Mod. 6000 A (Waters).
- Detector: ERC-7522 (Erma). Sensibilidad 4x.
- Integrador: Data Module Mod. 701 (Waters).
- Termostato: Haake Mod. D<sub>8</sub> (Haake).
- Baño de agua: Mod. WH9 (Haake).
- Fase móvil: agua desionizada a 85°C.
- Flujo: 0,5 mL/min.

Cálculos:

El integrador utilizado mide áreas que transforma en concentraciones aplicando un factor de respuesta calculado durante la calibración del integrador.

$$\text{Monosacárido (g/100 g)} = \frac{\text{C. Factor de dilución} \cdot 100}{\text{P}}$$

C = concentración expresada en gramos

P = peso de muestra

$$\text{Factor de dilución} = \frac{V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4}$$

V<sub>1</sub> = volumen total de hidrolizado (mL)

V<sub>2</sub> = volumen de hidrolizado tomado para hacer el análisis (mL)

V<sub>3</sub> = volumen final del hidrolizado analizado (μl)

V<sub>4</sub> = volumen de inyección (μl)

c.1.2.) Hidrolizado con ácido trifluoroacético (Barton y col., 1982)

El hidrolizado (apartado b.2) una vez preparado, se pasa por cartucho Sep-Pack C<sub>18</sub>, se filtra por filtro Millex y se inyecta en el cromatógrafo.

Las condiciones cromatográficas son:

- Columna: Polyosil 60-5NH<sub>2</sub>.
- Bomba: Mod. 6000 A (Waters).
- Detector: Milton Roy Refractomonitor IV .
- Integrador: Mod. CR1A (Beckman).
- Fase móvil: acetonitrilo: agua 75/25.
- Flujo 0,9 mL/min.

Cálculos:

$$\text{Monosacárido (g/100 g)} = \frac{\text{Hs} \cdot \text{C} \cdot 100}{\text{Hp} \cdot \text{P}}$$

donde:

- Hs: altura del pico de azúcar en la muestra problema.
- C : concentración de azúcar en la solución patrón.
- P : peso de la muestra expresado en g.
- Hp: altura del pico del patrón interno.

c.2.) Cromatografía de Gases (GLC) (Método de Englyst y Cummings, 1988)

Se toman 3 mL del hidrolizado obtenido con ácido sulfúrico (apartado b.1) y se añaden 0,5 mL de solución de mio-inositol utilizado como patrón interno, que contienen la cantidad adecuada del mismo, y a continuación 0,6 mL de hidróxido amónico 12 M. Se mezclan y se comprueba si la solución es alcalina.

Seguidamente se añaden 0,4 mL de una solución 3 M de hidróxido amónico que contenga 50 mg/mL de borohidruro sódico y aproximadamente 5 μl de octan-2-ol como surfactante. Se mezcla y se deja en reposo durante 1 hora a 40°C.

Al cabo de este tiempo se añaden 0,3 mL de ácido acético glacial y se mezcla. Se toman 0,5mL de la solución acidificada, se añaden 0,5 mL de 1-metilimidazol y 5 mL de anhídrido

acético. Se mezclan y se deja estabilizar 10 minutos.

A continuación se añaden 0,6 mL de etanol y se deja estabilizar durante 5 minutos. Se añaden 5 mL de agua, se mezcla y se vuelve a dejar en reposo 5 minutos.

Se ponen los tubos en un baño de agua fría y se añaden 5 mL de hidróxido potásico 7,5 M. Al cabo de unos minutos se adicionan 5 mL más del mismo hidróxido.

Se añaden 0,5 mL de acetato de etilo, se tapan los tubos y se mezcla su contenido por inversión. Se deja hasta que la separación en dos fases sea completa. La parte superior se transfiere a un vial para su almacenamiento a 5°C. Este paso se repite dos veces habiéndose comprobado que así se logra prácticamente el 100% de recuperación (Cromatograma nº 1).

Se inyecta en el cromatógrafo de gases. Las condiciones cromatográficas utilizadas son:

- Columna: 30 mm x 0,32 mm de sílice fundida cubierta con Durabond.
- Temperatura del inyector: 250°C.
- Temperatura de la columna: 150°C (5) 4°/min -> 250°C (5).
- Temperatura del detector: 275°C.
- Gas portador: Helio 85 Kpa.

Cálculos:

$$\text{Monosacárido (g/100 g)} = \frac{\text{HT} \cdot \text{WI} \cdot 100 \cdot \text{FR} \cdot 8}{\text{HI} \cdot \text{WT}}$$

donde:

HT y HI = alturas de los picos de la muestra problema y del patrón interno respectivamente.

WT y WI = peso de muestra problema y del patrón interno respectivamente.

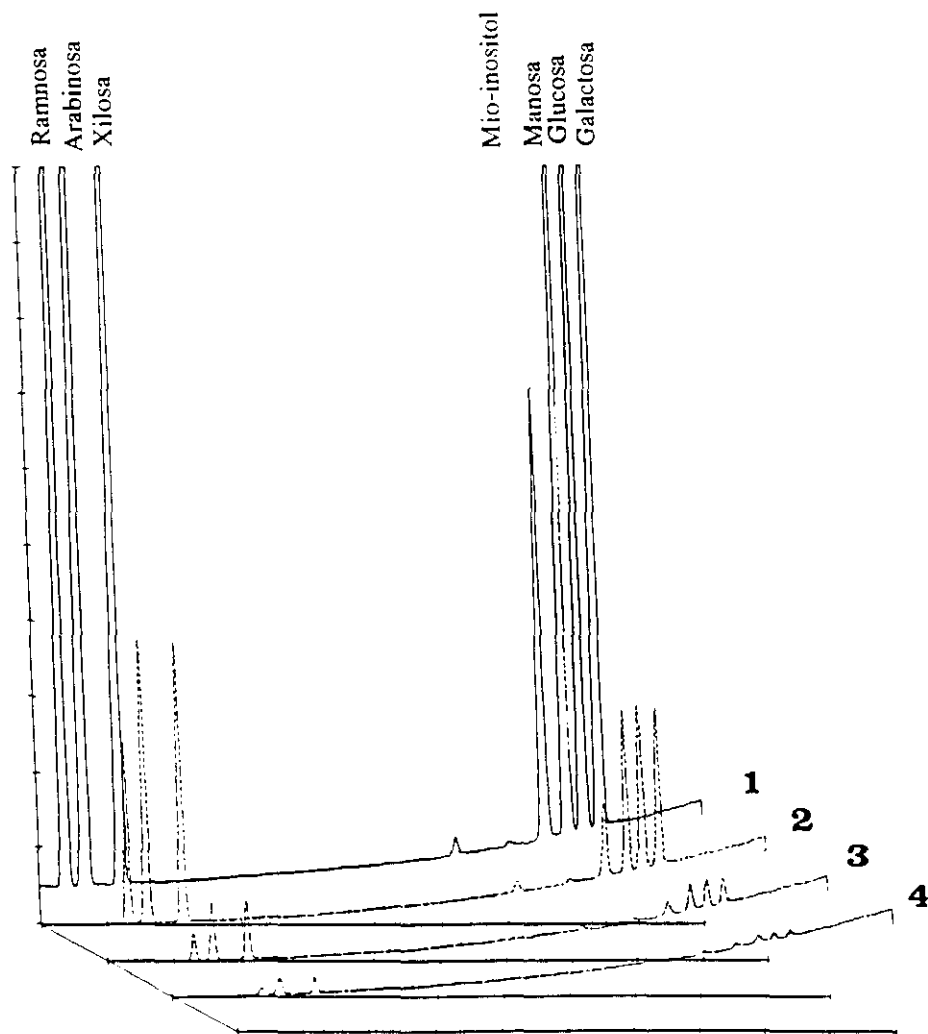
FR = factor de respuesta para cada uno de los azúcares, obtenido a partir de la calibración con una muestra patrón de azúcares analizada en paralelo con la muestra. Se calcula de la siguiente forma:

$$FR = \frac{Hp \cdot Pa}{Ha \cdot Pp}$$

donde:

Hp y Ha = altura del pico del patrón interno y del azúcar correspondiente en la solución patrón.

Pa y Pp = peso del azúcar correspondiente y del patrón interno en la solución patrón.



Cromatograma nº1. Eficacia de las extracciones con acetato de etilo. Cromatograma obtenido para los monosacáridos después de:

1. Primera extracción.
2. Segunda extracción.
3. Tercera extracción.
4. Cuarta extracción.

### **2.2.3. Método espectrofotométrico: determinación de sustancias pécticas.**

Se ha seguido el método de Scott (Scott, 1979), adaptado en este trabajo. El método se fundamenta en la formación de un complejo coloreado al reaccionar el 3,5-dimetilfenol con los ácidos urónicos que forman parte de la estructura fundamental de las sustancias pécticas. El color desarrollado se mide espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 450 nm, cuantificando los ácidos urónicos y a partir de ellos, las sustancias pécticas.

Este método consta de dos partes que figuran en los esquemas 10 y 11:

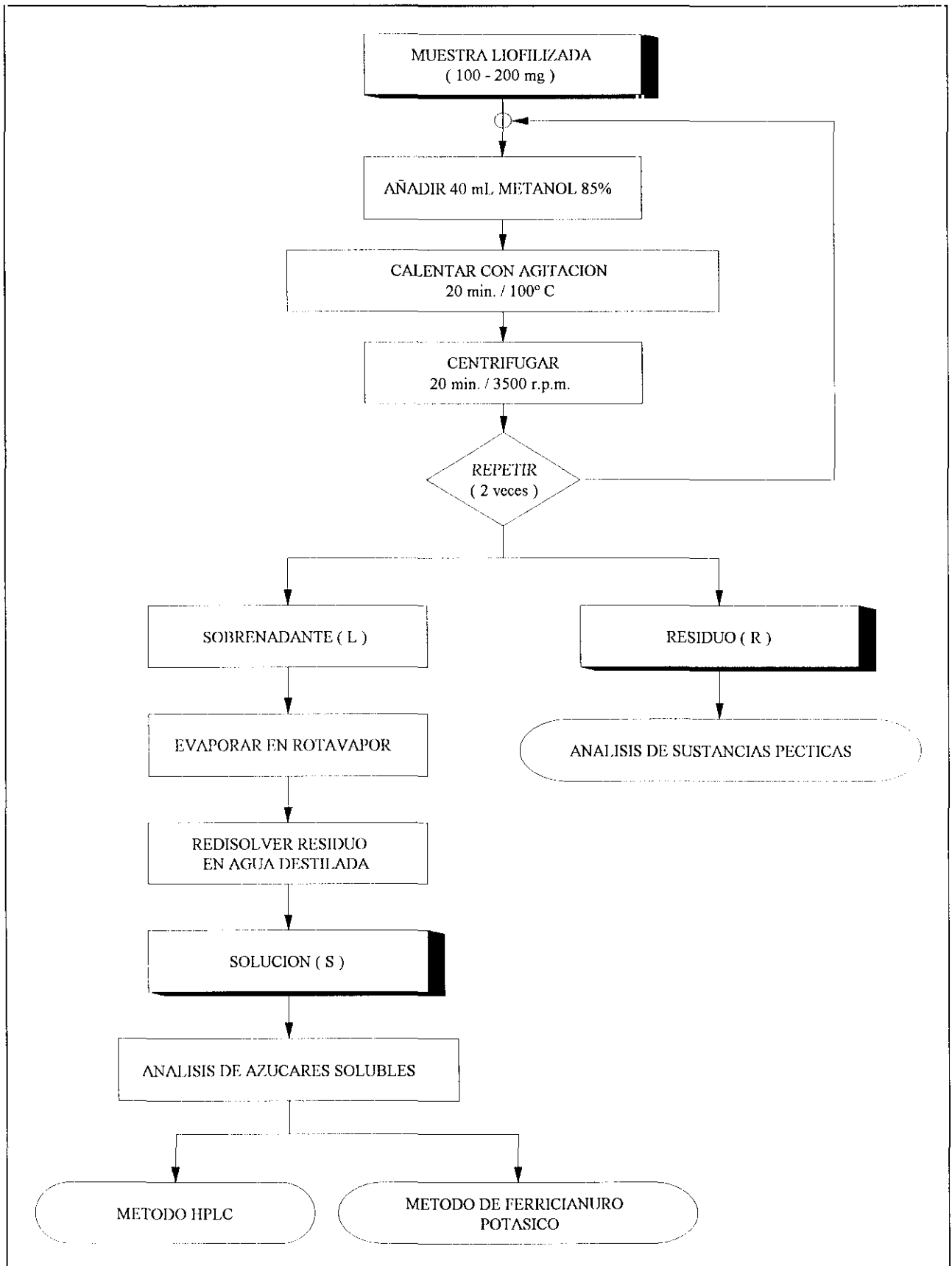
- Solubilización y extracción de las sustancias pécticas.
- Análisis cuantitativo por espectrofotometría.

En el capítulo correspondiente al estudio de los métodos se detallará el estudio de la especificidad del reactivo del 3,5-dimetilfenol frente a otro fenol ampliamente utilizado, m-fenilfenol.

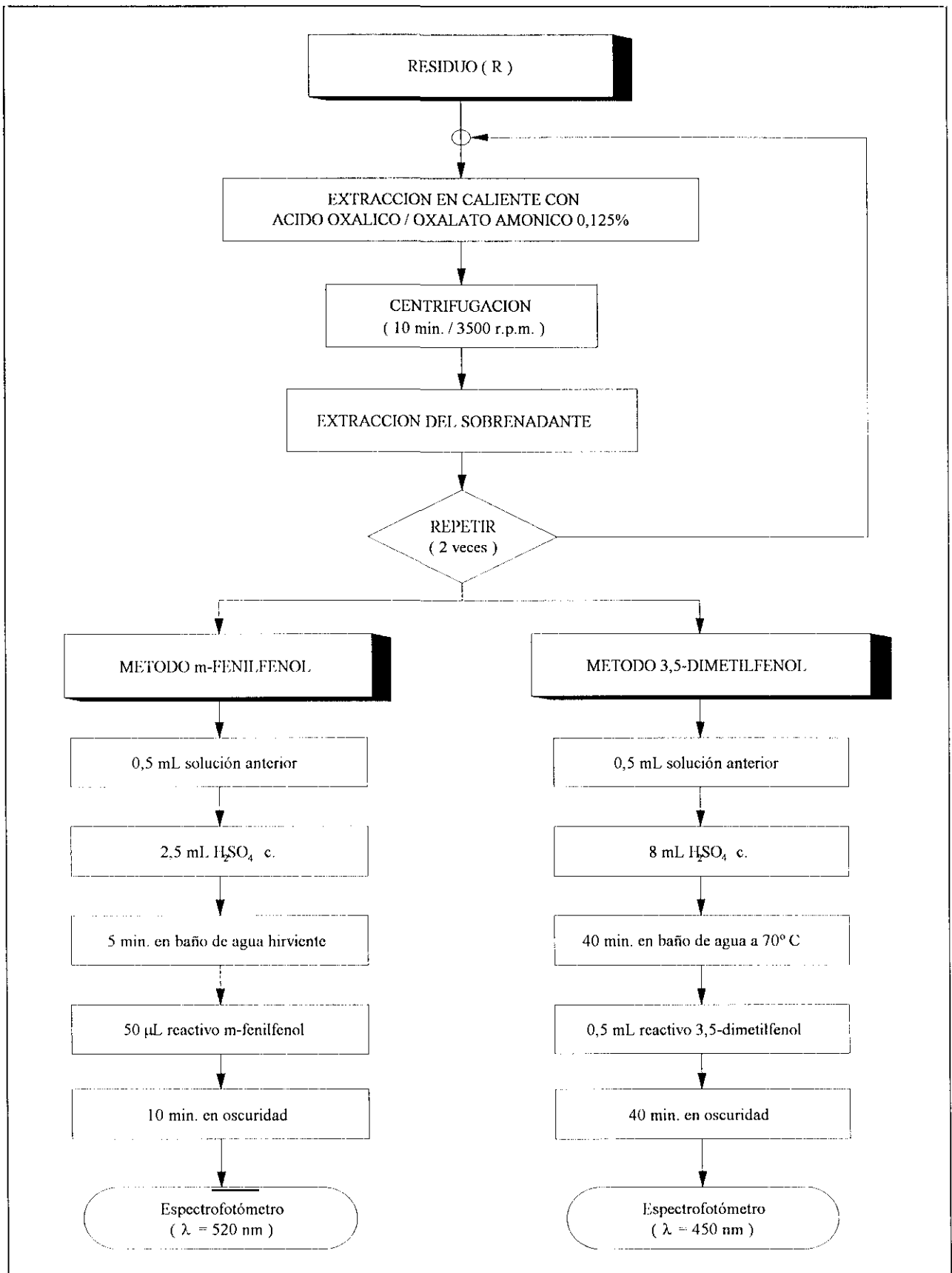
Se pesan 0,100 g de muestra que se introducen en un tubo de centrífuga y se añaden 40 mL de metanol al 85%. A continuación se lleva a un agitador magnético con aplicación de calor (100°C), durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 minutos. El proceso de extracción se repite dos veces. A partir de este extracto es donde se realiza posteriormente el análisis de azúcares solubles (DeVries y col., 1979; Wilson y col., 1981; Salvo y col., 1984) (apartado 2.3 de la Parte Experimental).

Al residuo, exento de azúcares solubles, se le añaden 30 mL de una solución caliente de ácido oxálico/oxalato amónico 0,125% (pH=4,0). Se agita en caliente durante 10 minutos y después se centrifuga a 3500 r.p.m. 10 minutos. Se extrae el sobrenadante. Se repite la operación tres veces y se enrasa a 100 mL con la solución extractiva.

El método colorimétrico utilizado, como ya se ha indicado, es una modificación del descrito por Scott en 1979. Se toman 0,5 mL del extracto de sustancias pécticas de la muestra en un



**Esquema nº 10. Extracción de azúcares solubles y aislamiento de sustancias pécticas.**



Esquema nº 11. Extracción y cuantificación de sustancias pécticas.

tubo de ensayo que se lleva a un baño de hielo y se añaden 8 mL de ácido sulfúrico concentrado, para hidrolizar el polisacárido. Se agita el contenido del tubo y se lleva a un baño a 70°C durante 40 minutos. Se saca del baño, se enfría rápidamente y se añaden 0,5 mL de solución de 3,5-dimetilfenol (0,1% en acético glacial). Se mantiene durante 40 minutos en oscuridad y se lee el color desarrollado a 450 nm en un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer, mod. Coleman 55.

Cálculos:

Se utiliza la siguiente fórmula correspondiente a la ecuación deducida de la recta de calibración:

$$Y = 0,0139779 X - 0,002178$$

donde:

X = concentración expresada en  $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ .

Y = valor de absorbancia obtenido en el espectrofotómetro.

$$\text{ácido galacturónico (g/100 g)} = \frac{C \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 100}{P}$$

donde:

C = concentración expresada en g.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{100}{0,5}$$

P = peso de la muestra.

## 2.3. AZUCARES SOLUBLES

### 2.3.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Para esta determinación analítica se siguen las indicaciones de Wilson y col. (1981). Los azúcares solubles se extraen de la muestra con metanol al 85% a una temperatura de 100°C y agitando durante 20 minutos. A continuación se centrifuga (3500 r.p.m./10 minutos) y se separa el sobrenadante del residuo. El residuo se emplea para la determinación de sustancias pécticas, como se ha indicado anteriormente (apartado 2.2.3. de la Parte Experimental), y el sobrenadante que contiene los azúcares solubles, se concentra en rotavapor y se redissuelve con agua destilada (solución S) (Esquema nº10).

Se toma una parte alícuota de la solución S y se filtra a través de un cartucho Sep-Pack C<sub>18</sub>. Se toman 2,5 mL del filtrado anterior y se llevan a 10 mL con acetonitrilo. Se desgasifica utilizando un sistema de ultrasonidos, se filtra una parte alícuota por filtro de 0,45 μ de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (HAWPO47000 Millipore, S.A.) y a continuación se pasa por un cartucho Sep-pack C<sub>18</sub> y se cuantifica mediante HPLC (Esquema nº 12).

Las condiciones cromatográficas seleccionadas son:

- Columna: μBondapack Carbohydrate Analysis 300 x 3,9 mm (Waters).
- Bomba: Mod. 6000 A (Waters).
- Detector: Refractive Index Mod. 401 (Waters). Sensibilidad (4x).
- Integrador: Data Module Mod. 701 (Waters).
- Fase móvil: acetonitrilo agua 75/25.
- Flujo: 0,9 mL/min.

Cálculos:

$$\text{Monosacárido (g/100 g)} = \frac{\text{C . Factor de dilución . 100}}{\text{P}}$$

donde:

C = concentración expresada en g

P = peso de muestra

$$\text{Factor de dilución} = \frac{V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4}$$

$V_1$  = volumen de extracto total (mL)

$V_2$  = volumen de extracto tomado para el análisis (mL)

$V_3$  = volumen de mezcla tomado para el análisis ( $\mu$ l)

$V_4$  = volumen de inyección ( $\mu$ l)

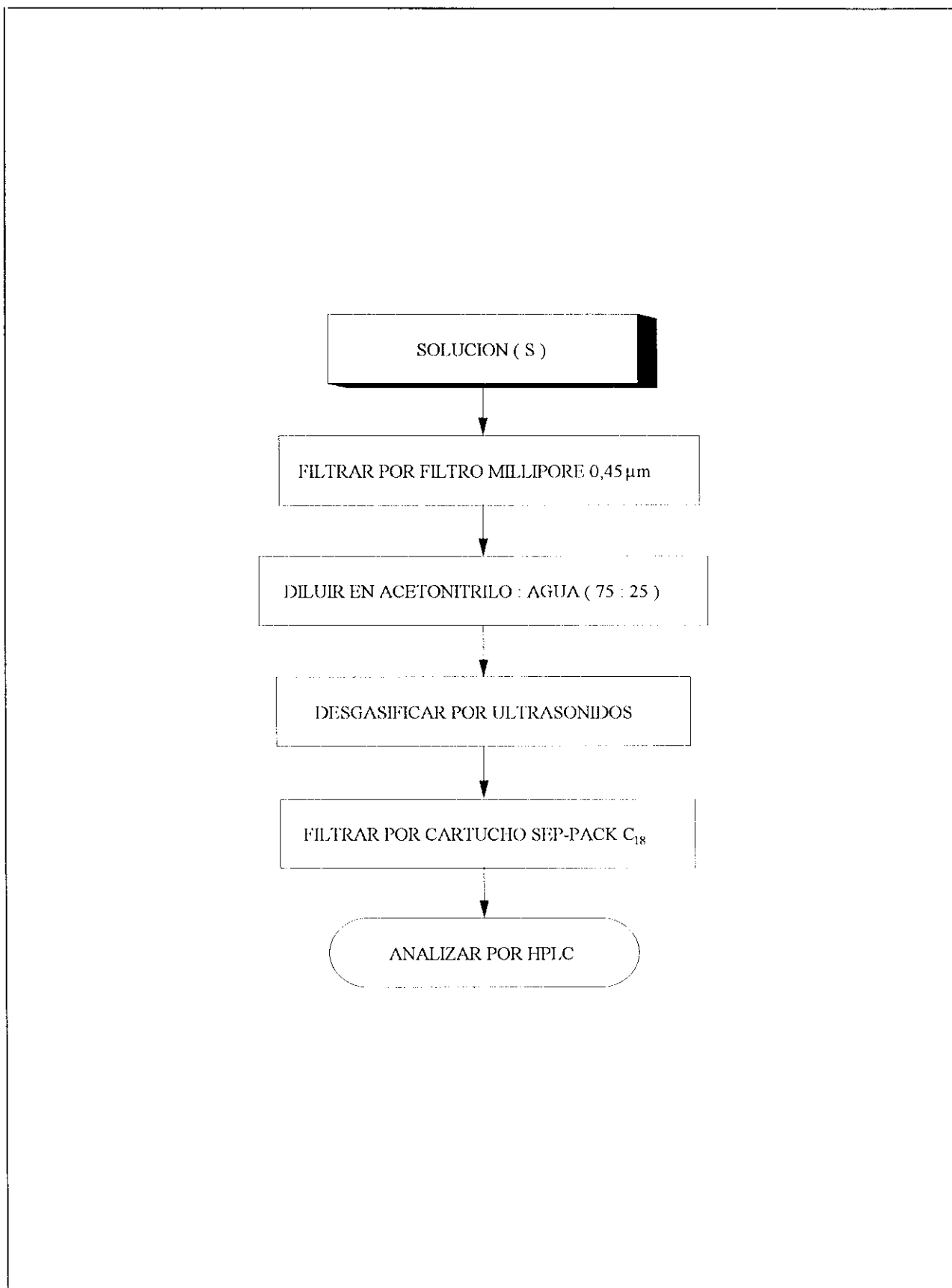
### **2.3.2. Espectrofotometría visible**

Este método (Gaines, 1973) es una colorimetría basada en la reacción de oxidación-reducción entre el ferricianuro potásico y los azúcares reductores. La determinación de azúcares totales se basa en la hidrólisis de azúcares no reductores a azúcares reductores, mediante hidrólisis cuantitativa, utilizando ácido clorhídrico 1 N. De esta forma el contenido de azúcares totales puede ser determinado por análisis de azúcares reductores después de la hidrólisis.

La extracción de los azúcares se hace con metanol. Se trata del primer paso descrito para la extracción de sustancias pécticas (Esquema n° 10), y dicho extracto es utilizado también para el análisis de azúcares solubles por HPLC.

Para el análisis de azúcares totales, se toman 10 mL de la solución acuosa (S) (apartado 2.3.1. de la Parte Experimental) preparada anteriormente, se añaden 15 mL de ácido clorhídrico 1N y 10 mL de agua destilada. Se hierve la solución durante 2 minutos.

Después de enfriar se neutraliza, mediante adición de una solución de hidróxido sódico 10% utilizando como indicador fenolftaleína. La solución neutralizada se diluye convenientemente con agua y se utiliza para el análisis de azúcares totales.



**Esquema nº 12. Determinación de azúcares solubles por HPLC**

Se toman 2 mL de dicha solución diluida, se añaden 8 mL del reactivo de ferricianuro potásico recién preparado y se lleva a 10 mL con agua destilada. Se mezcla bien la solución y se hierve en un baño de agua durante 15 minutos exactamente. Se enfrían los tubos en un baño de hielo y se mezcla de nuevo. Se mide inmediatamente la absorbancia de las muestras a 380 nm (Esquema n° 13) utilizando un blanco de agua.

En el momento de analizar la muestra ha de realizarse una recta de calibración con glucosa patrón. Los valores de absorbancia obtenidos para la muestra según la recta realizada darán un valor de concentración correspondiente a azúcares totales (% de glucosa) en la muestra original. Se utiliza la recta obtenida en cada caso que proporciona la concentración de azúcares expresada en  $\mu\text{g/mL}$ .

Cálculos:

$$Y = -0,00207 X + 1,483505$$

Y = absorbancia obtenida experimentalmente.

X = concentración de azúcares solubles expresada en  $\mu\text{g/mL}$ .

$$\text{Azúcares (g/100 g) expresados en glucosa} = \frac{C \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 100}{P}$$

donde:

C = concentración expresada en g.

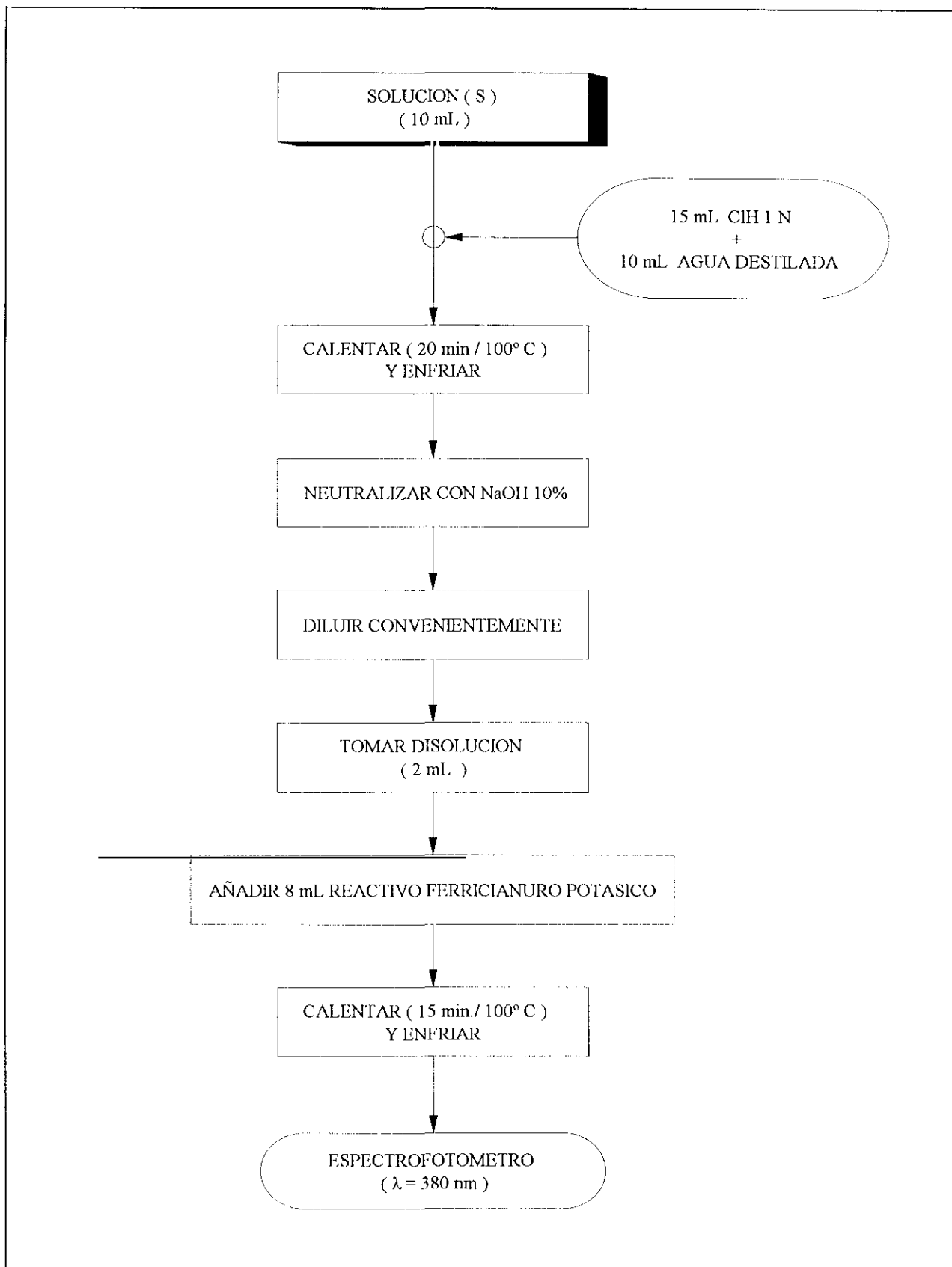
P = peso de la muestra.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{V_1 \cdot V_3}{V_2}$$

$V_1$  = volumen total de extracto (mL).

$V_2$  = volumen de extracto tomado para hacer el análisis (mL).

$V_3$  = volumen de dilución del extracto (mL).



Esquema nº 13. Determinación de azúcares solubles por el método del ferricianuro potásico.

## **2.4. ESTUDIO HISTOLOGICO Y CITOLOGICO POR MICROSCOPIA**

Se pretende con ello comprobar la presencia de los componentes cuantificados y observar las posibles diferencias, desde el punto de vista anatómico, que existen entre el material fresco y el procesado.

Se procede al estudio de las muestras frescas y procesadas sin fijar, tras el tratamiento correspondiente, para ser vistas al microscopio y también se realiza el análisis microscópico de las muestras frescas y procesadas incluidas en parafina.

### **2.4.1. Preparación de las muestras para su observación directa al microscopio**

Se realizan cortes de diferentes zonas de cada una de las raíces en material fresco y en el material procesado utilizando un microtomo de mesa.

La observación microscópica se realiza a 100 y 400 aumentos mediante un microscopio Reichet-Yung Microstar 110 American Optical con cámara fotográfica incorporada. Se utiliza el material en fresco tras tratamiento con hipoclorito sódico al 50%, o bien después de realizar alguna tinción específica de las que se detallan en el correspondiente apartado.

### **2.4.2. Preparación de las muestras para inclusión en parafina**

#### **a) Fijación de la muestra.**

En este proceso se trata de producir la muerte de las células sin alterar sus estructuras. El fijador elegido ha sido la mezcla formol-ácido acético-alcohol (FAA), uno de los fijadores más utilizados en microscopía óptica (Johansen, 1940).

Se corta la muestra en trozos de varios milímetros de diámetro o de espesor y se coloca en frascos de cristal que permitan un cerrado hermético, añadiendo una cantidad de reactivo de

fijación que permita cubrir con holgura dicha muestra.

Se mantiene como mínimo durante 24 horas. La muestra puede permanecer así durante un período de tiempo indefinido, cerrando herméticamente los recipientes y manteniéndolos en nevera.

### **b) Deshidratación**

Esta fase es necesaria porque la parafina, que es el medio de inclusión elegido, no es miscible con el agua, y, por tanto, hay que reemplazar el agua presente en el material por solventes orgánicos.

Se realiza utilizando diferentes mezclas de agua:etanol:alcohol terbutílico (ATB) de diferentes concentraciones. Las proporciones de cada componente de la mezcla van variando enriqueciéndose paulatinamente la proporción de alcohol terbutílico y disminuyendo las de agua y etanol (Jensen, 1962).

La muestra que había sido previamente fijada, en frascos de cierre hermético, se somete a tratamiento con cada una de las soluciones de agua:etanol:ATB. Cada una de estas soluciones se denomina con el nombre de "serie del alcohol terbutílico" acompañada de un número que indica la proporción total de alcohol de la solución. Dichas series son las siguientes:

<u>Serie</u>	<u>H<sub>2</sub>O (mL)</u>	<u>Etanol 95% (mL)</u>	<u>ATB (mL)</u>
50	50	40	10
70	30	50	20
85	15	50	35
95	--	45	55
100	--	25	75
ATB	--	--	100

El tejido ha de permanecer en cada una de estas soluciones un mínimo de 2-4 horas, siendo 8 horas aproximadamente el tiempo más frecuentemente utilizado, excepto en la serie de 100% de ATB que ha de permanecer durante 24 horas, renovándose el ATB cada 8 horas.

### **c) Inclusión de la muestra en parafina**

El material deshidratado se infiltra en parafina fundida, que luego se deja solidificar y se utiliza para realizar cortes con microtomo rotatorio tipo Minot.

Se utilizan diferentes mezclas de toluol-parafina. Se emplea toluol porque el ATB no es miscible con la parafina, y el toluol es miscible con el ATB y con la parafina. Jensen (1962), no utiliza toluol sino que pasa directamente del ATB a la parafina.

Para realizar la infiltración se puede utilizar parafina líquida o parafina sólida (pf= 50-55°C). En caso de utilizar parafina sólida es conveniente trabajar en una cápsula de porcelana añadiendo la mezcla correspondiente de toluol-parafina en cantidad suficiente para que cubra la muestra. La cápsula con el material se lleva a una estufa cuya temperatura exceda en 5°C de la temperatura de fusión de la parafina utilizada. Para realizar las mezclas de toluol-parafina, conviene guardar la parafina en estufa a 60°C aproximadamente para que esté líquida.

En este caso se ha utilizado parafina líquida. En un frasco de vidrio, o en una cápsula de porcelana, se pone la solución de toluol:parafina, a continuación el material, y suficiente cantidad de alcohol terbutílico para que lo cubra. Se deja un tiempo entre 6 y 24 horas. Posteriormente se va pasando el material a las sucesivas soluciones de toluol:parafina, dejándolo en cada una un tiempo similar, siempre comprendido entre 6 y 24 horas.

Las mezclas de toluol: parafina son las siguientes:

<u>Mecla</u>	<u>Toluol (mL)</u>	<u>Parafina (mL)</u>
1	75	25
2	50	50
3	25	75
4	--	100

A continuación se procede a realizar la verdadera inclusión en parafina, utilizando parafina sólida licuada. Puede realizarse directamente en las cápsulas anteriores, o bien en moldes de papel de aluminio previamente parafinados. En el fondo de la cápsula o molde se pone una fina capa de vaselina o glicerina que facilita el posterior desprendimiento de la parafina.

En cada molde se ponen 4 ó 5 trozos de cada una de las muestras y a continuación se añadirá la cantidad suficiente de parafina en estado líquido. Se mantiene en estufa a 60°C durante 24 horas, después se saca de la misma y se repite el proceso con parafina nueva (Jensen, 1962; Gahan, 1984).

El enfriamiento de la parafina ha de ser lento para que no se resquebraje y pueda solidificar en un bloque. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se introduce en un baño de hielo. En éste, la parafina se contrae y se desprende del recipiente.

El bloque obtenido se puede guardar durante años. Se envuelve en papel de aluminio y varios bloques se pueden guardar juntos en una bolsa de plástico en la nevera.

#### **2.4.3. Microtomía: realización y recogida de los cortes**

Se utiliza un microtomo rotatorio tipo Minot 1212 Leitz. El bloque de parafina solidificado que contiene el material, se divide en tantos trozos como fragmentos de muestra incluye.

Cada uno de estos nuevos bloques se pega con ayuda de una pequeña cantidad de parafina, a una pieza de madera que actuará de soporte en el microtomo. El bloque de parafina se talla de manera que las caras de parafina sean paralelas a las caras de la muestra. La pieza así montada se coloca en el microtomo; el filo de la cuchilla del mismo debe ser paralelo a la superficie del corte. Los cortes se hacen de un espesor entre 16-20  $\mu$ . Para obtener buenos cortes es necesario que tanto la cuchilla del microtomo como el bloque estén lo más fríos posible.

Una vez realizados los cortes se recogen en un portaobjetos previamente desengrasado (mezcla toluol-éter) preparado con una fina capa de adhesivo de Haupt's y agua. Los portaobjetos con los cortes bien estirados se dejan 48 horas en la estufa a 40°C y se pueden guardar de forma indefinida (Jensen, 1962; Gahan, 1984).

#### **2.4.4. Desparafinado, hidratación y montaje de las preparaciones**

El proceso siguiente a la recogida de los cortes es el desparafinado e hidratación de las muestras. Para ello los portaobjetos con las muestras se van introduciendo, de forma sucesiva, en recipientes con las siguientes soluciones y tiempos:

<b>Solución</b>	<b>Tiempo (min.)</b>
Xilol	10
Xilol: etanol	5
Alcohol 95%	5-10
Alcohol 70%	5-10
Alcohol 50%	5-10
Alcohol 30%	5-10

A continuación se añade agua y por último, el reactivo de tinción. Si este último es una solución alcohólica, se puede poner en contacto con la muestra después del alcohol de 50%.

#### **2.4.5. Tinciones utilizadas**

En el estudio de la pared celular se han utilizado los siguientes reactivos de tinción:

- Rojo de rutenio para identificar las sustancias pécticas.
- Cloruro de zinc yodado en el reconocimiento de hemicelulosas y celulosa.
- Floroglucina clorhídrica y Verde yodo como reactivos específicos de la lignina.

### **3. ESTUDIO DE LOS METODOS DE ANALISIS**

Para estudiar los métodos de análisis elegidos se han realizado los siguientes ensayos.

#### **3.1. ESTUDIO DE LOS METODOS DE ANALISIS DE FIBRA ALIMENTARIA**

##### **3.1.1. Ensayos de los métodos gravimétricos**

Para los métodos detergentes se llevan a cabo ensayos de precisión utilizando salvado por ser un material formado básicamente por fibra insoluble que se puede utilizar como referencia para otros tipos de materiales. En el caso del método enzimático-gravimétrico, se emplea una mezcla de salvado y de pectina, el primero como representante de la fibra insoluble y la segunda de la soluble. Los ensayos de exactitud no se pueden realizar por no existir un patrón de fibra alimentaria.

##### **3.1.1.1. Ensayo de precisión**

Para estudiar la precisión de estos métodos se procede a realizar el análisis en igualdad de condiciones a lo largo de diferentes días.

###### **a) Métodos detergentes**

Se han realizado ensayos de precisión tanto para el método detergente neutro como para el detergente ácido.

Se ha utilizado como muestra de referencia salvado, aplicando el tratamiento con los respectivos detergentes a diez fracciones distintas del mismo material (1g) y en días diferentes. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla I. Ensayo de precisión para los métodos detergentes.**

	<b>FAD (g/100 g)</b>	<b>FND (g/100 g)</b>
n	10	10
X	10,94	37,56
SD	0,36	1,83
CV	3,30	4,88

X = valor medio; SD= desviación estándar; CV = coeficiente de variación

Por los coeficientes de variación calculados se observa que la precisión es buena en ambos métodos.

**b) Método enzimático-gravimétrico: Método de Asp.**

Se pesan 0,4 g de salvado y 0,1 g de pectina y se aplica el método enzimático de Asp y col. (1983) en igualdad de condiciones diez veces en días diferentes.

Los resultados del ensayo de precisión se recogen en las dos tablas siguientes. En la primera de ellas figuran los porcentajes de FI y FS calculados de forma independiente para salvado y pectina respectivamente. En la segunda se calcula el porcentaje de FI, FS y FT respecto al peso total de salvado y pectina.

**Tabla II. Ensayo de precisión para el método de Asp: FI y FS.**

	<b>FI (g/100 g)</b>	<b>FS (g/100 g)</b>
n	10	10
X	42,03	117,10
SD	3,95	11,40
CV	9,40	9,74

X = valor medio; SD= desviación estándar; CV = coeficiente de variación

**Tabla III. Ensayo de precisión para el método de Asp: FI, FS y FT.**

	<b>FI (g/100 g)</b>	<b>FS (g/100 g)</b>	<b>FT (g/100 g)</b>
n	10	10	10
X	33,62	23,42	57,04
SD	3,16	2,28	5,09
CV	9,40	9,74	8,93

X = valor medio; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

Por los resultados obtenidos se deduce que la precisión es aceptable. La mayor variabilidad que se observa respecto a los métodos detergentes se puede justificar por el uso de enzimas que aumenta la dificultad del análisis.

### **3.1.2. Ensayos de los métodos cromatográficos**

#### **3.1.2.1. Análisis de fibra alimentaria por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia HPLC**

Los ensayos abarcarán los siguientes puntos:

- a) Estudio de la hidrólisis de polisacáridos: celulosa y xilano.
- b) Separación de monosacáridos.
- c) Estudio de la recuperación de monosacáridos.

##### **a) Estudio de la hidrólisis de polisacáridos: celulosa y xilano.**

En este ensayo se estudian la hidrólisis de polisacáridos con dos agentes hidrolíticos diferentes:

- ácido sulfúrico  $H_2SO_4$ ,
- ácido trifluoroacético (ATF).

a.1) Estudio de la recuperación de polisacáridos utilizando como agente hidrolítico ácido sulfúrico

El ácido sulfúrico es utilizado por Slavin y Marlett (1983) y por Englyst y Cummings (1988). Estas dos metodologías se diferencian en la forma de llevar a cabo el aislamiento del residuo de fibra alimentaria. Mientras que en el primer caso se analiza el residuo obtenido tras el tratamiento de la muestra con solución detergente neutra, en el segundo el residuo se obtiene después de eliminar el almidón con DMSO y aislar la fibra alimentaria con un tratamiento enzimático.

Respecto a la hidrólisis de polisacáridos descrita en el apartado 2.2.2. de la Parte Experimental, que posteriormente requiere un tratamiento de neutralización, se han realizado una serie de ensayos modificando las condiciones de temperatura y tiempo, concentración del agente hidrolítico y agente neutralizante.

a.1.1.) Hidrólisis de celulosa

-Ensayo 1º: en primer lugar se estudiaron, las condiciones de Slavin y Marlett (1983) que se especifican a continuación: hidrólisis primaria ( $H_2SO_4$  72% 3 horas y  $T^a$  ambiente), hidrólisis secundaria ( $H_2SO_4$  1 M 2 horas ebullición a reflujo) y neutralización con  $Ba(OH)_2$ . Se emplea celulosa Avicel (50 mg) y los valores medios procedentes de 5 ensayos se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla IV. Hidrólisis de celulosa con ácido sulfúrico. Ensayo 1º.**

RECUPERACION (%)		
	X $\pm$ SD	CV
Celulosa Avicel	38,53 $\pm$ 4,15	10,77

X  $\pm$  SD= valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV= coeficiente de variación

-Ensayo 2º: al observar en la bibliografía que el Ba(OH)<sub>2</sub> era reemplazado por BaCO<sub>3</sub>, y al comprobar que existían condiciones de hidrólisis diferentes (Englyst y Cummings, 1988), se introdujeron los cambios pertinentes en estos dos aspectos. Por tanto, en este ensayo se realiza la hidrólisis primaria durante 1 hora a 35°C y la secundaria durante 2 horas a 100°C (Englyst y Cummings, 1988) y se utiliza como agente neutralizante BaCO<sub>3</sub> por un lado, y también Ba(OH)<sub>2</sub>, por otro, para comprobar la influencia del cambio de agente neutralizante. La celulosa utilizada fue la misma que en el ensayo 1º. Los valores medios de cinco ensayos figuran en la siguiente tabla:

**Tabla V. Hidrólisis de celulosa con ácido sulfúrico. Ensayo 2º.**

RECUPERACION (%)				
	BaCO <sub>3</sub>		Ba (OH) <sub>2</sub>	
	X ± SD	CV	X ± SD	CV
Celulosa Avicel	44,89 ± 3,18	7,08	44,92 ± 3,68	8,19

X ± SD = valor medio ± desviación estándar; CV = coeficiente de variación

-Ensayo 3º: ante la baja recuperación de la celulosa utilizada se procede a utilizar un nuevo tipo (Sigmacell type 20) y se le aplican las mismas condiciones en cinco ensayos. Con estas condiciones seleccionadas (hidrólisis según método de Englyst y Cummings (1988) y neutralización con BaCO<sub>3</sub>) se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla VI. Hidrólisis de celulosa con ácido sulfúrico. Ensayo 3º.**

RECUPERACION (%)		
	X ± SD	CV
Celulosa Sigmacell	92,99 ± 2,69	2,89

X ± SD = valor medio ± desviación estándar; CV = coeficiente de variación

- Ensayo 4º: al comprobar que las condiciones de hidrólisis no daban resultados óptimos en las muestras respecto a la celulosa, se optó por modificarlas de la siguiente forma:

hidrólisis primaria, 2 horas a 40°C e hidrólisis secundaria, 3 horas a 100°C. Debido a las dificultades de trabajo que supone el uso de BaCO<sub>3</sub> y a la experiencia de Garleb y col., (1989), se sustituyó el agente neutralizante por una resina de intercambio iónico (AG 4-X4 BioRad) y se comprueba el número de lavados necesarios para obtener una buena recuperación de los monosacáridos (Gráfico nº2, del Apartado 2.2. de la Parte Experimental). Esta metodología es la que se emplea en las muestras objeto de estudio. Los resultados del ensayo con celulosa (Sigmacell type 20) se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla VII. Hidrólisis de celulosa con ácido sulfúrico. Ensayo 4º.**

RECUPERACION (%)		
	X ± SD	CV
Celulosa Sigmacell	91,88 ± 2,50	2,72

X ± SD = valor medio ± desviación estándar; CV = coeficiente de variación

a.1.2.) Hidrólisis de xilano.

-Ensayo 1º: Se ha utilizado xilano (50 mg) correspondiente a dos marcas comerciales diferentes, Fluka Biochemika y Sigma, y se les ha aplicado las mismas condiciones de hidrólisis que en el ensayo 3º, la neutralización se realiza con la resina AG4-X4. Los resultados obtenidos de cinco ensayos figuran en la Tabla VIII:

**Tabla VIII. Hidrólisis de xilano con ácido sulfúrico. Ensayo 1º.**

RECUPERACION (%)		
	X ± SD	CV
Xilano Fluka	81,09 ± 2,38	2,93
Xilano Sigma	61,12 ± 0,83	1,35

X ± SD= valor medio ± desviación estándar; CV= coeficiente de variación

- Ensayo 2º: se estudia la hidrólisis de xilano en las condiciones hidrolíticas seleccionadas para las muestras: hidrólisis primaria, 2 horas a 40°C, e hidrólisis secundaria, 3 horas a 100°C, y la neutralización con la resina AG4-X4. Los resultados obtenidos figuran en la siguiente tabla:

**Tabla IX. Hidrólisis de xilano con ácido sulfúrico. Ensayo 2º.**

RECUPERACION (%)		
	X ± SD	CV
Xilano Fluka	81,25 ± 2,20	2,67

X ± SD= valor medio ± desviación estándar; CV= coeficiente de variación

a.2) Estudio de la recuperación de polisacáridos utilizando como agente hidrolítico ácido trifluoroacético

En este ensayo los polisacáridos utilizados han sido celulosa microcristalina utilizada en la preparación de dietas en investigación animal (50 mg) y xilano de la marca Fluka BiochemiKa (50 mg). Se ha llevado a cabo en el centro CIVO-TNO de Zeist (Holanda). La hidrólisis se realiza durante 1 hora a 121°C en autoclave (Barton y col., 1982). Como puede observarse por los resultados obtenidos, el ácido trifluoroacético hidroliza fundamentalmente polisacáridos no celulósicos. En la tabla X se indican los resultados obtenidos de cinco ensayos:

**Tabla X. Hidrólisis de celulosa y xilano con ácido trifluoroacético.**

RECUPERACION (%)		
	X ± SD	CV
Celulosa Avicel	2,85 ± 0,03	0,91
Xilano (Fluka BiochemiKa)	80,00 ± 5,21	6,51

X ± SD= valor medio ± desviación estándar; CV= coeficiente de variación

Los diferentes ensayos realizados indican que, de los agentes hidrolíticos que más se emplean según los trabajos publicados para la hidrólisis de los polisacáridos que forman la fibra alimentaria, el ácido sulfúrico es el que da lugar a mejores resultados, tanto respecto a los polisacáridos celulósicos como a los no celulósicos. Se ha comprobado que con diferentes tipos de celulosa se obtienen resultados distintos y este hecho coincide con el estudiado por otros autores (Garleb y col., 1989). Los estudios realizados por Englyst y col., (1982) y Marlett y Navis (1988) confirman los resultados aquí expuestos sobre el empleo de la celulosa Sigmacell type 20 como patrón de hidrólisis. El empleo del ácido trifluoroacético como agente hidrolítico, según los resultados obtenidos, sólo se justifica para el estudio de polisacáridos no celulósicos.

Los ensayos realizados revelan que se debería utilizar como agente neutralizante del hidrolizado una resina de intercambio iónico como la AG4-X4 (BioRad), por los buenos resultados obtenidos y por su facilidad de empleo frente a compuestos de bario que dificultan mucho la práctica de laboratorio.

#### **b) Separación de monosacáridos**

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas para la hidrólisis de los polisacáridos se estudia la separación de los mismos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

Se sabe que los monosacáridos presentes en los polisacáridos que forman la fibra alimentaria son fundamentalmente: glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y ramnosa.

Así pues, el primer paso necesario para llevar a cabo el estudio del comportamiento de los monosacáridos es disponer de una columna que permita la adecuada separación de los mismos. Existen diferentes alternativas para la separación de estos monosacáridos en lo que a columnas se refiere. Se puede trabajar en combinación con un detector de impulso amperométrico (Weber y Long, 1988; Garleb y col., 1989; Quigley y Englyst, 1992), o bien con detector de índice de refracción (Mercier, 1984; Vidal-Valverde y col, 1985). Este trabajo se centra en el análisis cromatográfico utilizando este último tipo de detector, habiéndose seleccionado tres columnas diferentes: dos de ellas incluyen sílice-amino como

relleno y la tercera una resina de intercambio iónico. De las diferentes columnas que se emplean para el análisis de los monosacáridos procedentes de la fibra alimentaria, se han seleccionado una serie de ellas compatibles con el equipo cromatográfico del se dispone. A continuación se indican las columnas estudiadas, junto con las condiciones cromatográficas, el orden de elución de los azúcares y las concentraciones de los mismos que permiten una resolución satisfactoria según el tipo de columna. Estos datos, así como los cromatogramas presentados, corresponden a soluciones patrón de azúcares.

b.1) Columna  $\mu$ Bondapak Carbohydrate Analysis 300 x 3,9 mm (Waters)

Bomba : Mod. 6000 A (Waters).

Detector: Refraction Index mod. 401 (Waters). Sensibilidad 4x.

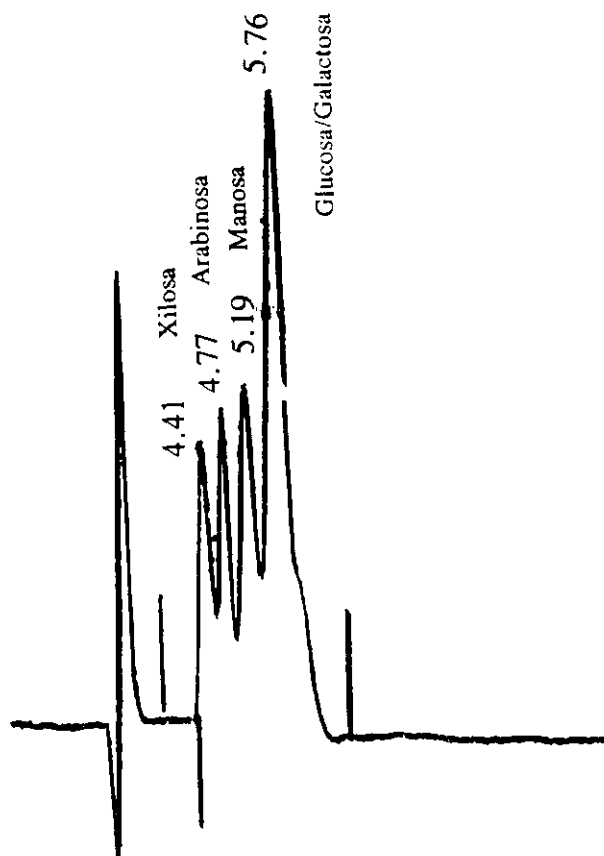
Integrador: Data Module Mod. 701 (Waters).

Fase móvil: Acetonitrilo/agua 75/25.

Flujo : 0,9 mL/min.

Orden de elución de los azúcares: xilosa, arabinosa, manosa y glucosa/galactosa.

Para las siguientes concentraciones, de cada uno de los azúcares, xilosa, 0,43 mg/mL; arabinosa, 0,74 mg/mL; manosa, 0,39 mg/mL, galactosa 0,44 mg/mL se obtuvo el cromatograma n°2:



Cromatograma n°2. Separación de una mezcla de monosacáridos patrón con la columna Carbohydrate Analysis (Waters).

b.2) Columna: Polygosil 60-5 NH<sub>2</sub>, 250 x 4,6 mm. El ensayo descrito en este apartado corresponden a un estudio que se realizó durante la estancia en el centro CIVO-TNO de Zeist (Holanda).

Bomba: Mod. 6000 A (Waters).

Detector: Refractomonitor IV, rango 0.05R x 10 RI (Milton Roy).

Integrador: Mod. C1RA (Beckman).

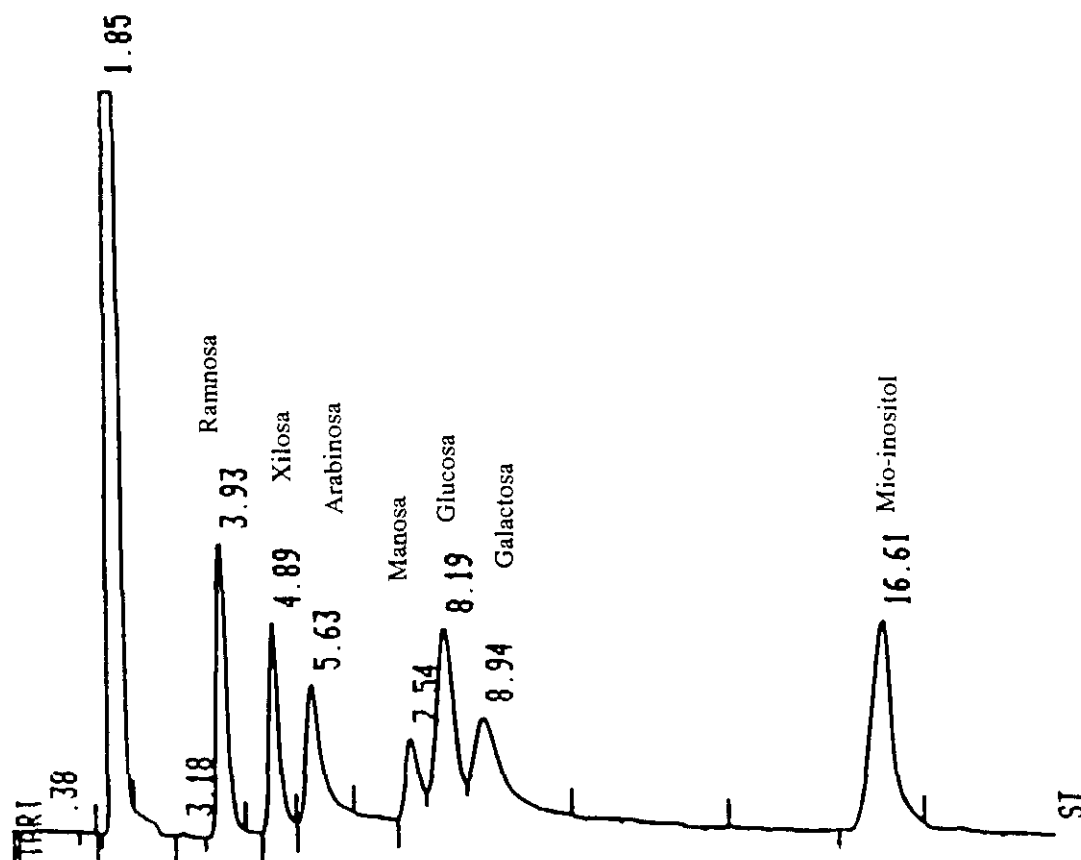
Fase móvil: acetonitrilo/agua 75/25.

Flujo: 2 mL/min.

Orden de elución de los azúcares: ramnosa, xilosa, arabinosa, manosa, glucosa y galactosa.

Se emplea como patrón interno mio-inositol.

Para una concentración de azúcares de 2,9 mg/mL para cada uno de ellos se obtiene el cromatograma n°3.



Cromatograma n°3. Separación de una mezcla de monosacáridos patrón en la columna

Polygosil 60-5 NH<sub>2</sub>

b.3) Columna: Aminex HPX-87P 300 x 7,8 mm (BioRad)

Bomba: Mod. 6000 A (Waters).

Detector: Refraction Index mod. 401. Sensibilidad 4x. (Waters).

Integrador: Data Module Mod. 701. (Waters).

Termostato: Mod. D<sub>8</sub> (Haake).

Baño de agua: Mod. WH9 (Haake).

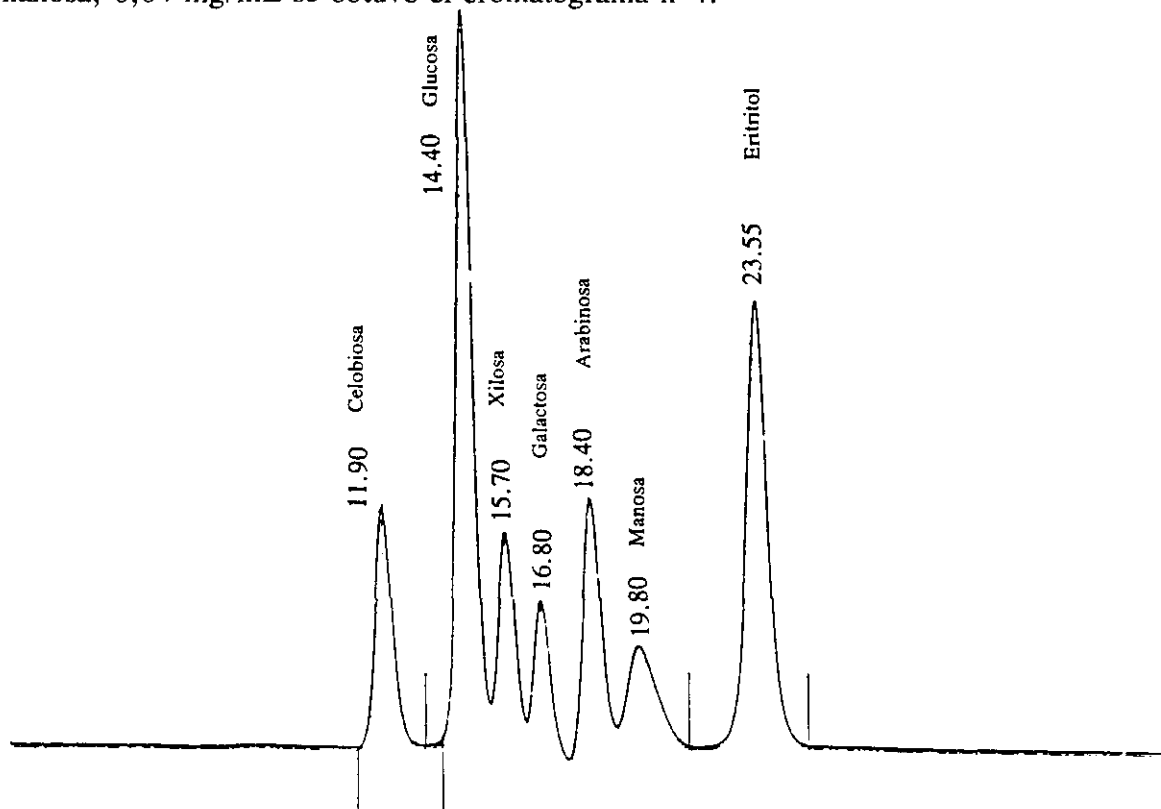
Fase móvil: Agua desionizada a 85°C.

Flujo: 0,5 mL/min.

Orden de elución de los azúcares: celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa.

Se utiliza eritritol como patrón interno.

Para las siguientes concentraciones de cada uno de los azúcares celobiosa, 0,04 mg/mL; glucosa, 0,06 mg/mL; xilosa, 0,02 mg/mL; galactosa, 0,02 mg/mL; arabinosa, 0,02 mg/mL y manosa, 0,04 mg/mL se obtuvo el cromatograma n<sup>o</sup>4.



Cromatograma n<sup>o</sup>4. Separación de una mezcla de monosacáridos patrón en la columna HPX-87P (BioRad).

Por los ensayos realizados sobre la separación cromatográfica de monosacáridos característicos de la fibra alimentaria, se deduce que la columna más adecuada es la de intercambio iónico HPX-87P (BioRad) por la resolución que se obtiene y por sus características de uso.

### c) Estudio de la recuperación de monosacáridos

En este apartado se estudia la recuperación de los monosacáridos después de la acción del ácido sulfúrico en las condiciones de hidrólisis fijadas en este trabajo (2 h. a 40°C y 3 h. a 100°C). El hidrolizado se neutraliza por medio de la resina AG4-X4. La columna utilizada es la HPX-87P (BioRad).

Se prepara una mezcla de patrones formada por 70 mg de cada uno de los siguientes azúcares: celobiosa, glucosa, xilosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y manosa. Los resultados obtenidos después de realizar 5 ensayos figuran en la tabla XI.

**Tabla XI. Estudio de la recuperación de monosacáridos después de la hidrólisis.**

	RECUPERACION (%)	
	X ± SD	CV
Celobiosa	99,89 ± 0,58	0,58
Glucosa	98,12 ± 5,48	5,59
Xilosa	92,94 ± 3,36	3,61
Galactosa/ramnosa	95,24 ± 4,50	4,72
Arabinosa	90,51 ± 3,55	3,92
Manosa	102,28 ± 4,03	3,94

X ± SD= valor medio ± desviación estándar; CV= coeficiente de variación

Como puede observarse por los resultados obtenidos la recuperación es óptima en todos los casos, no observándose degradaciones importantes en los monosacáridos.

En el centro CIVO-TNO de Zeist (Holanda) se llevó a cabo este mismo estudio con la

columna Polygosil-Amino. Los resultados son semejantes a los obtenidos cuando se emplea la columna de intercambio iónico (HPX-87P, BioRad) que se acaban de comentar: glucosa,  $97,09 \pm 2,13$ ; xilosa,  $84,88 \pm 2,63$ ; galactosa,  $97,63 \pm 1,45$ ; ramnosa,  $98,79 \pm 2,43$ ; arabinosa,  $87,00 \pm 2,62$  y manosa  $102,58 \pm 3,22$ .

### 3.1.2.2. Análisis de fibra alimentaria por Cromatografía de Gases (GLC)

Este estudio se ha realizado durante la estancia en el centro CIVO-TNO de Zeist (Holanda). Se incluyen en este apartado los mismos puntos que en el correspondiente al análisis de fibra alimentaria por HPLC:

- Estudio de la hidrólisis de polisacáridos (celulosa y xilano).
- Estudio de la separación cromatográfica.
- Estudio de la recuperación de monosacáridos después de la hidrólisis.

#### a) Estudio de la hidrólisis de polisacáridos: celulosa y xilano

Se utiliza el método descrito por Englyst y Cummings (1988) sin modificar ninguna de sus condiciones.

Los patrones analizados son:

- Celulosa utilizada para dietas en experimentación animal (TNO).
- Xilano de la marca comercial Fluka Biochemika.

**Tabla XII. Hidrólisis de celulosa y xilano (GLC).**

RECUPERACION (%)		
	X $\pm$ SD	CV
Celulosa	85,75 $\pm$ 1,12	1,31
Xilano	97,15 $\pm$ 1,94	2,00

X  $\pm$  SD= valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV= coeficiente de variación

Los resultados obtenidos indican una buena recuperación de los polisacáridos ensayados celulosa y xilano.

#### **b) Separación de monosacáridos**

Para el estudio de la resolución de monosacáridos se ha utilizado un único equipo cromatográfico: Cromatógrafo Carlo Erba Mega Series equipado con detector de ionización de llama y autoinyector.

Se ha estudiado el poder resolutivo de dos columnas de diferente longitud, para cada una de las cuales han sido utilizadas las condiciones que se indican a continuación.

b.1) Columna: 25 m x 0.32 mm de sílice fundida cubierta con Durabond

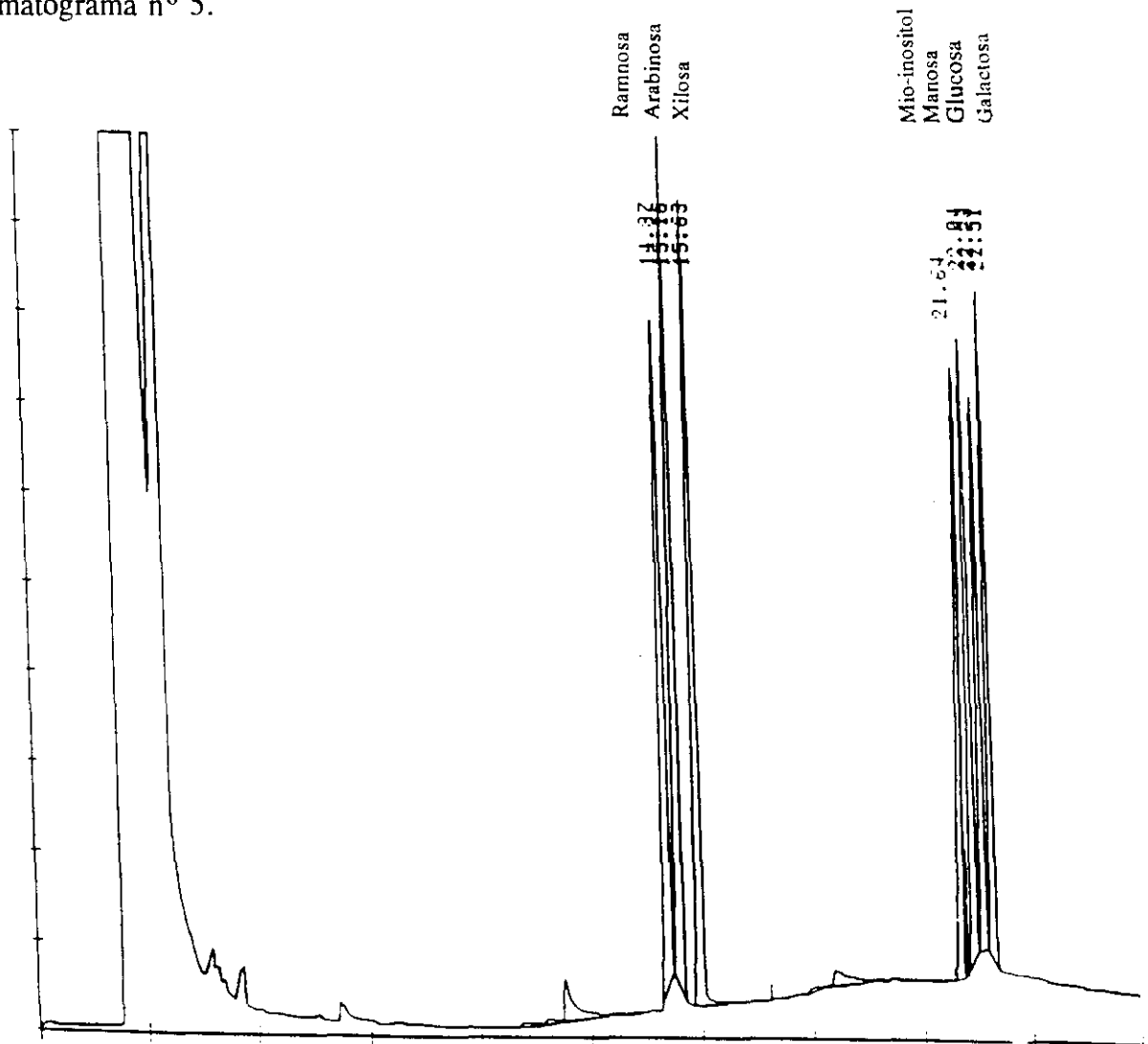
Temperatura del inyector: 250°C

Temperatura de la columna: 200°C (10 min) 4°/min → 250°C (10 min)

Temperatura del detector: 275°C

Gas portador: Helio 85 kPa

El orden de elución de los azúcares es: ramnosa, arabinosa, xilosa, mio-inositol, glucosa y galactosa. Para una concentración de 0.58 mg/mL de cada azúcar se obtiene el siguiente cromatograma n° 5.



Cromatograma n°5. Separación de una mezcla de monosacáridos patrón por cromatografía de gases (columna: 25 m x 0,32 mm de sílice fundido cubierta con durabond).

b.2) Columna: 30 m x 0.32 mm de sílice fundida cubierta con Durabond.

Temperatura de inyector: 250°C

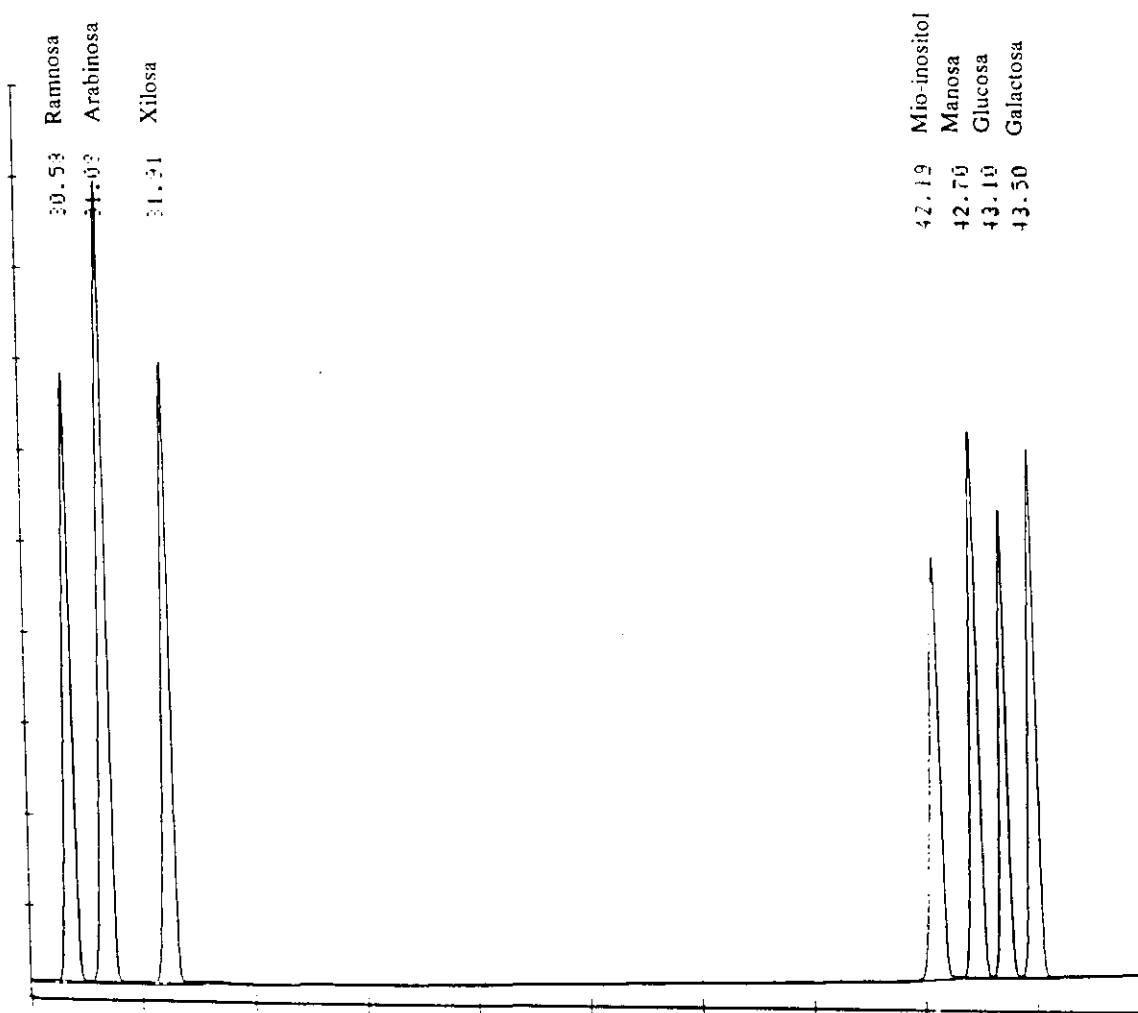
Temperatura de la columna: 150°C (5) 4°/min → 250°C (5)

Temperatura del detector: 275°C

Gas transportador : Helio 85kPa

El orden de elución de los azúcares es el mismo que en la columna anterior: ramnosa, arabinosa, xilosa, mio-inositol, manosa, glucosa y galactosa.

Para una concentración igual a la utilizada en el caso anterior, 0,58 mg/mL para cada azúcar, se obtiene el cromatograma n° 6.



Cromatograma n° 6. Separación de una mezcla de monosacáridos patrón por cromatografía de gases (columna: 30 m x 0,32 mm de sílice fundida cubierta con durabond).

### c) Estudio de la recuperación de monosacáridos

Puesto que la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia aparece escasamente en la bibliografía hasta este momento, se ha pretendido comparar los porcentajes de recuperación obtenidos por dicho método con los porcentajes obtenidos por un método más ampliamente utilizado, la Cromatografía de Gases.

Se utiliza el método de Englyst y Cummings (1988) tanto para la hidrólisis de polisacáridos como para la derivatización de los monosacáridos obtenidos.

Se hace el experimento con tres cantidades diferentes de cada monosacárido (ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, glucosa y galactosa): 35, 70 y 140 mg de cada azúcar.

Una vez que los azúcares han sido sometidos a las condiciones de hidrólisis (1 hora a 35°C; 2 horas a 100°C), se toma una alícuota de 5 mL y se diluye a 10 mL. De esta dilución se toman 0,3 mL para el análisis por GLC. Los resultados obtenidos son los siguientes;

**Tabla XIII. Ensayo de recuperación de monosacáridos por Cromatografía de Gases (GLC).**

RECUPERACION (%)						
	35 mg		70 mg		140 mg	
	X ± SD	CV	X ± SD	CV	X ± SD	CV
Ramnosa	110,76 ± 5,86	5,29	110,79 ± 5,86	5,29	110,19 ± 3,39	3,08
Arabinosa	87,46 ± 2,01	2,30	88,23 ± 4,39	4,97	90,71 ± 2,38	2,62
Xilosa	90,05 ± 2,61	2,90	91,36 ± 4,06	4,44	89,90 ± 3,70	4,12
Manosa	90,12 ± 6,04	6,70	89,49 ± 2,93	3,28	93,19 ± 3,49	3,74
Glucosa	108,98 ± 2,62	2,40	108,93 ± 2,28	2,09	92,30 ± 2,81	3,04
Galactosa	92,15 ± 4,52	4,90	91,36 ± 1,01	1,11	92,60 ± 2,93	3,16

X ± SD= valor medio ± desviación estándar; CV= coeficiente de variación

Los ensayos de recuperación realizados por el método de Englyst y Cummings (1988) aplicado a la Cromatografía de Gases indican resultados óptimos independientemente de la cantidad de mezcla patrón de monosacáridos empleada. Los resultados obtenidos por Englyst (Englyst y Cummings, 1988) para este método son muy similares a los obtenidos en este trabajo: ramnosa, 85,60%; arabinosa, 93,30%; xilosa, 87,70%; manosa, 90,70%; glucosa, 92,90% y galactosa, 93,90%.

### **3.1.2.3. Resumen comparativo de los ensayos realizados a los métodos cromatográficos**

Los ensayos realizados indican que los resultados obtenidos tanto al emplear la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) como la Cromatografía de Gases (GLC), en cuanto a la cuantificación de monosacáridos se refiere, son semejantes, y, por tanto, que las dos técnicas son adecuadas para realizar el estudio de los monosacáridos de la fibra alimentaria.

La aplicación de la cromatografía de gases incluye, como fase preparatoria, la derivatización de los azúcares y la cromatografía líquida de alta eficacia, la neutralización del hidrolizado. El uso de la resina del intercambio iónico (AG4-X4) simplifica mucho la neutralización de forma que resulta más sencilla y rápida que la derivatización que exige la cromatografía de gases.

El método de cromatografía líquida estudiado presenta una buena resolución de los monosacáridos excepto de galactosa y ramnosa que coeluyen, pero no hay que olvidar que este último azúcar es minoritario en la composición de los polisacáridos que constituyen la fibra alimentaria. Esta técnica permite obtener, a diferencia de la cromatografía gaseosa, información a cerca de oligosacáridos.

A partir de los estudios realizados en este trabajo, se podría concluir señalando que las dos técnicas cromatográficas (HPLC, GLC) son apropiadas para el estudio de la composición de la fibra alimentaria, y que la elección de una u otra puede estar condicionada por los objetivos concretos que se pretendan y por las características de cada laboratorio.

### **3.1.3. Métodos espectrofotométricos**

La espectrofotometría visible ha sido la técnica seleccionada para la determinación de sustancias pécticas en las muestras estudiadas.

#### **3.1.3.1. Extracción de sustancias pécticas**

En el análisis de las muestras se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la eficacia de diferentes tratamientos para la extracción de sustancias pécticas:

-Extracción secuencial con un único disolvente: solución de ácido oxálico/oxalato amónico al 0,125 %, en caliente, en tres etapas.

-Extracción secuencial en tres etapas con agua caliente, ácido oxálico/oxalato amónico al 0,125 % caliente e hidróxido sódico 0,05N.

La falta de especificidad de los distintos solventes por las sustancias pécticas en el segundo caso así como la posible interferencia de ácidos urónicos procedentes de hemicelulosas extraídos por hidróxido sódico 0,05N fueron las principales causas para descartar esta extracción secuencial.

En su lugar se optó por realizar la extracción con una solución de ácido oxálico/oxalato amónico al 0,125 % comprobando que dos extracciones son suficientes.

#### **3.1.3.2. Cuantificación de sustancias pécticas por el método del 3,5-dimetilfenol**

Entre los métodos citados en la bibliografía para el análisis de sustancias pécticas, se ha elegido el método de Scott (1979) modificado en este trabajo (Esquema nº11). Las modificaciones recaen sobre el volumen de líquido extractivo utilizado en el desarrollo de la

reacción colorimétrica, las cantidades de muestra, las cantidades de reactivos y los tiempos de reacción. Se han realizado diversas pruebas comprobándose que las mayores absorbancias se obtienen con 40 minutos de calentamiento y 40 minutos de permanencia en la oscuridad.

Se estudia la exactitud, la precisión y la recta de regresión del método del 3,5-dimetilfenol. En recientes publicaciones se ha comparado este método con otros que utilizan como reactivo de color m-fenilfenol y carbazol (Villanueva y col., 1990 y Rodríguez y col., 1992).

**a) Ensayo de exactitud.**

Se ha realizado el ensayo adicionando distintas cantidades de ácido péctico patrón (25, 50 y 75 mg) a la muestra que, tras realizar las diluciones oportunas, dan lugar a diferentes concentraciones: 10, 20, y 30  $\mu\text{g/mL}$ , a partir de las cuales se realizan diez veces los métodos señalados.

**Tabla XIV. Ensayo de exactitud del método 3,5-dimetilfenol.**

<b>Ensayo de exactitud</b>		
<b>Ac. Péctico</b>	<b>M. 3,5-dimetilfenol</b>	
$\mu\text{g/mL}$	$X \pm SD$	CV
10	$95.23 \pm 3.17$	3.33
20	$94.94 \pm 3.34$	3.52
30	$94.26 \pm 3.33$	3.53

$X \pm SD$ = valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV= coeficiente de variación

La comparación de estos resultados con los publicados por Villanueva y col., 1990 y Rodríguez y col., 1992 indica que la recuperación del método del 3,5-dimetilfenol es semejante a la del m-fenilfenol, mientras que la del carbazol ha resultado inferior.

**b) Ensayo de precisión.**

Para comprobar la precisión del método se procede a aplicar diez veces sobre diferentes

fracciones del mismo material a lo largo de diez días sucesivos, las tres colorimetrías.

**Tabla XV. Ensayo de precisión del método 3,5-dimetilfenol.**

	<b>M. 3,5-dimetilfenol</b>
X	0,220
SD	0,007
CV	3,18

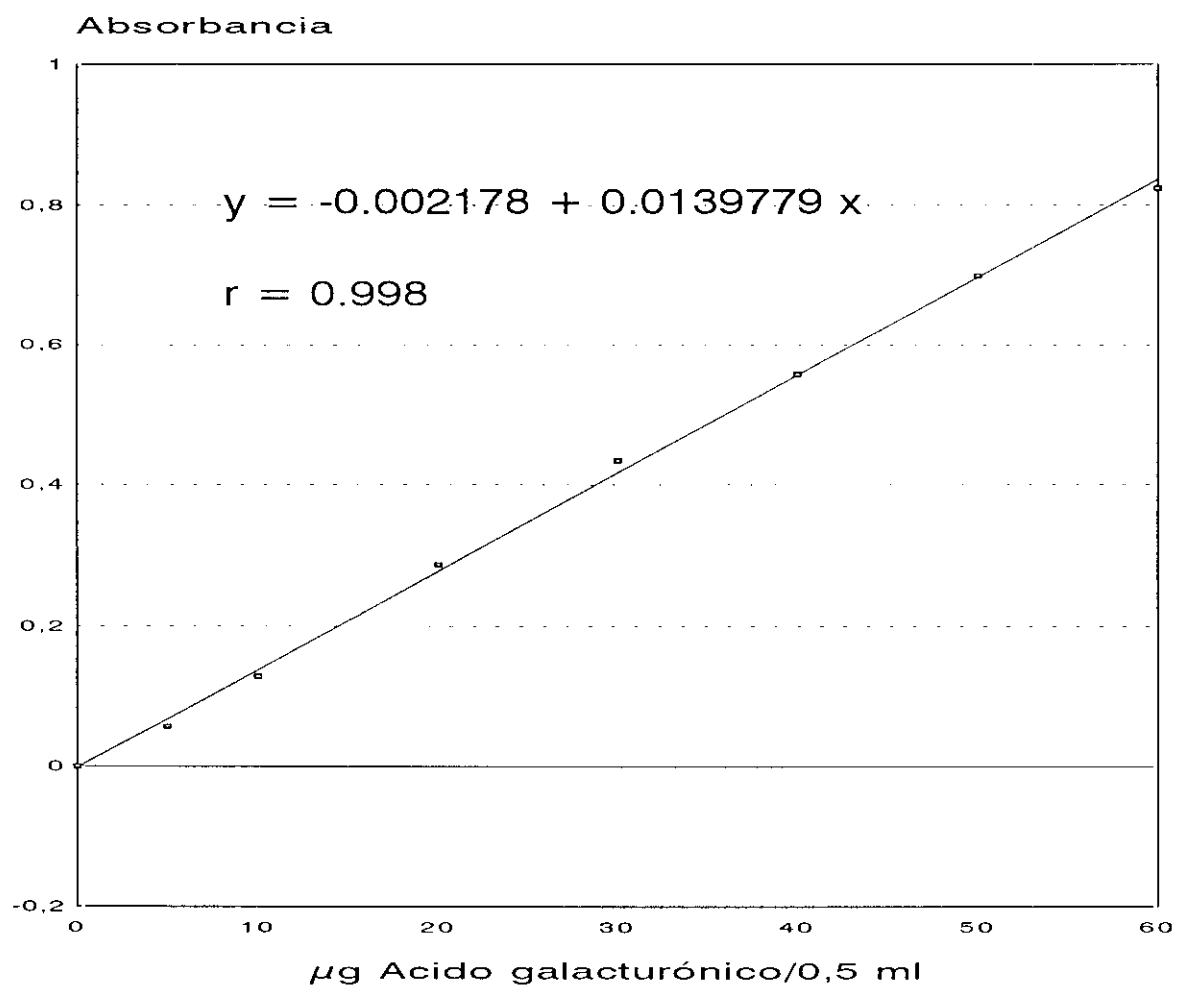
X = valor medio; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

El coeficiente de variación obtenido está dentro de los límites aceptables. Al realizar la comparación de los datos obtenidos por Villanueva y col., 1990 y Rodríguez y Col., 1992 se observa que es inferior al del carbazol (CV = 4,29) y ligeramente superior al del m-fenilfenol (CV = 1,69).

#### **c) Recta de regresión y coeficiente de correlación**

Se ha realizado la recta de regresión necesaria para la cuantificación de sustancias pécticas, por el método del 3,5-dimetilfenol, comprobando el intervalo de concentraciones (0-60  $\mu\text{g}/0.5$  mL), preparadas a partir de ácido galacturónico en el que se cumple la ley de Beer.

La recta de regresión correspondiente a la concentración de las soluciones patrón de ácido galacturónico y las absorbancias leídas en el espectrofotómetro quedan reflejadas en el gráfico n° III y se define mediante la ecuación que se indica.



**Gráfico nº III. Recta de regresión para el método de 3,5-dimetilfenol.**

**d) Ensayo de las interferencias originadas por los azúcares neutros**

Se hace un estudio de las interferencias originadas por azúcares neutros en los métodos de m-fenilfenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) y 3,5-dimetilfenol (Scott, 1979). Para ello se prepara una solución de fucosa, ramnosa, arabinosa, glucosa, galactosa y xilosa al 0,2% a partir de la cual se realizan las dos colorimetrías, repitiendo diez veces cada una de ellas. El método del 3,5-dimetilfenol no detectó los azúcares en ningún análisis, mientras que el m-fenilfenol dió ligera coloración.

En la siguiente tabla figura el porcentaje de recuperación obtenido para la mezcla de los azúcares para cada uno de los métodos.

**Tabla XVI. Ensayo de las interferencias con azúcares neutros.**

	<b>M. m-fenilfenol (%)</b>	<b>M. 3,5-dimetilfenol (%)</b>
n	10	10
X	4,10	0,72
SD	0,44	0,10
CV	10,73	13,89

X = valor medio; SD = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

Los resultados obtenidos indican que el reactivo m-fenilfenol interfiere con los azúcares neutros ensayados y que, por el contrario, el 3,5-dimetilfenol no presenta interferencias, lo que hace que este último reactivo sea mucho más apropiado para la cuantificación de sustancias pécticas.

## 3.2. ESTUDIO DE LOS METODOS DE ANALISIS DE AZUCARES SOLUBLES

### 3.2.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Para evaluar el método (Wilson y col., 1981) se ha sometido a ensayos de exactitud y precisión, así como al estudio de la resolución que se obtiene.

#### a) Ensayo de exactitud

Para realizarlo se ha establecido el contenido cuali- y cuantitativo de azúcares en las hortalizas objeto de estudio. Se ha comprobado la presencia de fructosa, glucosa y sacarosa. Con arreglo a las proporciones observadas en cada hortaliza se han adicionado a la muestra diferentes cantidades de la solución de azúcares patrón. Tras realizar las diluciones adecuadas se ha realizado diez veces la determinación para cada mezcla de patrones.

- Fructosa:25 mg, Glucosa:25 mg, Sacarosa:50 mg, en 25 mL.

correspondiente a zanahoria y remolacha que representa una relación de F:G:S (0.5:0.5:1)

- Fructosa: 25 mg, Glucosa: 50 mg, Sacarosa: 5mg, en 25 mL, correspondiente a nabo que representa una relación de F:G:S (0.5:1:0.1).

Los resultados obtenidos son:

**Tabla XVII. Ensayo de exactitud del método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la determinación de azúcares solubles.**

Monosacáridos	$\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$	$X \pm SD$	CV (%)
Fructosa	25	$103,72 \pm 3,16$	3,05
Glucosa	25	$100,25 \pm 4,04$	4,03
Sacarosa	50	$102,49 \pm 0,30$	0,29
Fructosa	25	$100,20 \pm 0,28$	0,28
Glucosa	50	$104,08 \pm 0,26$	0,25
Sacarosa	5	$94,00 \pm 1,00$	1,06

$X \pm SD$  = valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV (%) = coeficiente de variación

Los porcentajes de recuperación son óptimos en todos los casos, aunque se puede indicar que cuando la sacarosa se encuentra en pequeña proporción dicha recuperación es algo inferior.

#### **b) Ensayo de precisión**

Se aplica el método diez veces sobre diferentes fracciones del mismo material. Los resultados obtenidos son los siguientes:

**Tabla XVIII. Ensayo de precisión del método de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la determinación de azúcares solubles.**

	$X \pm SD$	CV (%)
Fructosa	$0,575 \pm 0,028$	4,87
Glucosa	$0,627 \pm 0,019$	3,03
Sacarosa	$1,750 \pm 0,05$	2,86

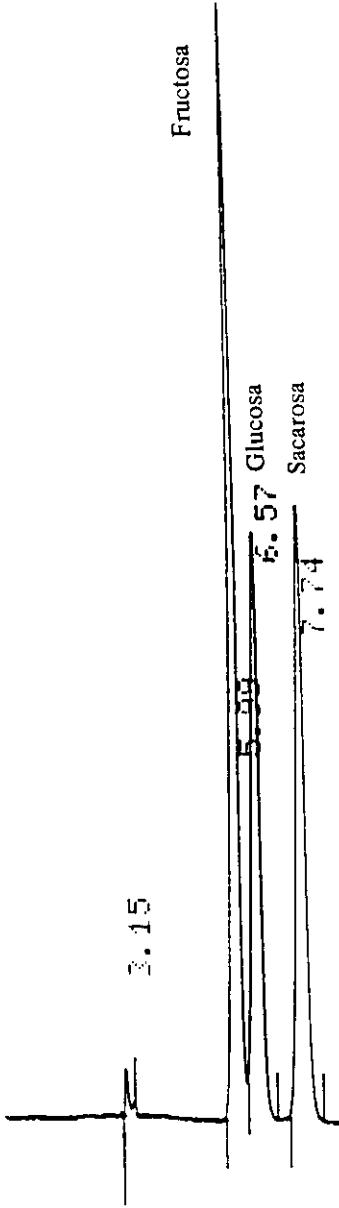
$X \pm SD$  = valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV (%) = coeficiente de variación

Los coeficientes de variación de los resultados obtenidos en las diferentes determinaciones indican que la precisión del método es adecuada.

#### **c) Resolución de la columna $\mu$ Bondapack Carbohydrate Analysis**

El estudio de la separación de los azúcares se ha llevado a cabo con una mezcla de fructosa, glucosa y sacarosa. Se emplea la columna  $\mu$ Bondapack Carbohydrate Analysis de Waters como se indica en el apartado 2.3 de la Parte Experimental.

El cromatograma obtenido presenta el siguiente perfil:



Cromatograma nº7. Separación de fructosa, glucosa y sacarosa en una mezcla de patrones

### 3.2.2. Espectrofotometría visible: método de ferricianuro potásico

Se han realizado ensayos, al igual que en el caso anterior, de la exactitud y precisión, y el estudio de la recta de regresión del método de Gaines (1973).

#### a) Ensayo de exactitud

Se lleva a cabo adicionando al material de partida 0,3, 0,4 y 0,5 g de sacarosa, obteniéndose así los siguientes resultados:

**Tabla XIX. Ensayo de exactitud del método del ferricianuro potásico.**

Sacarosa (mg/mL)	X $\pm$ SD	CV (%)
0,3	101,17 $\pm$ 2,71	2,68
0,4	97,58 $\pm$ 6,52	6,68
0,5	97,03 $\pm$ 1,23	1,27

X  $\pm$  SD = valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV (%) = coeficiente de variación

Las recuperaciones obtenidas en los tres casos revelan que la exactitud se encuentra entre límites aceptables.

#### b) Ensayo de precisión

Para comprobar el grado de concordancia al repetir el método sucesivas veces se lleva a cabo la prueba de precisión aplicando dicho método a un mismo material en diez días sucesivos. Se han obtenido los siguientes resultados:

**Tabla XX. Ensayo de precisión del método del ferricianuro potásico.**

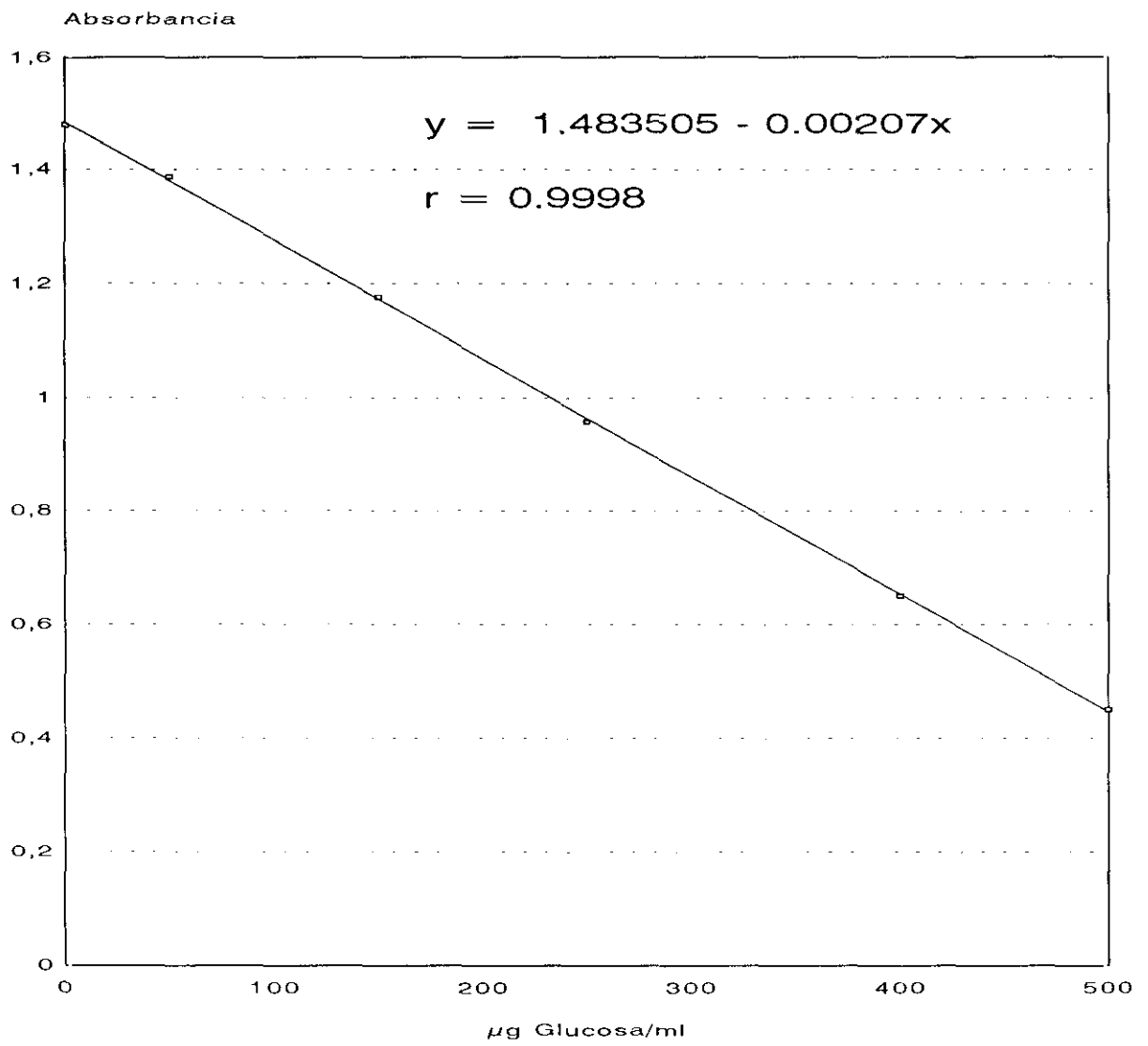
n	10
X	4,36
SD	0,06
CV	1,35

$X \pm SD$  = valor medio  $\pm$  desviación estándar; CV (%) = coeficiente de variación

Los resultados obtenidos en los ensayos indican una pequeña variación de los mismos en las distintas determinaciones, por lo que se puede señalar una buena precisión del método.

**c) Recta de regresión y coeficiente de correlación**

Se ha comprobado que en el intervalo 0-500  $\mu\text{g}$  glucosa/mL se cumple la ley de Beer obteniéndose la recta de calibración que figura en el gráfico n<sup>o</sup>4.



**Gráfico nº IV. Recta de regresión para el método del ferricianuro potásico.**

## APENDICE DE REACTIVOS

- $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1.) Boehringer Mannheim.
- Acetato sódico. Merck. Solución tampón 0,1 M pH=5.2. Disolver 0,6 g de acetato sódico trihidrato, y llevar a un litro con agua. Ajustar a pH 5,2 con ácido acético 0,1M. Para estabilizar y activar los enzimas, añadir 4 mL de una solución 1 M de cloruro cálcico a 1 litro de solución tampón.
- Acetona. Panreac.
- Acetonitrilo. Carlo Erba.
- Acido acético glacial. Panreac.
- Acido benzoico. AnalaR. Solución saturada al 50 %. Disolver en 1 litro de agua 1,45 g de ácido benzoico o 1,70 g de benzoato sódico.
- Acido oxálico/oxalato amónico. Panreac. Solución al 0,125% respecto a cada uno de los componentes.
- Anhídrido acético. Merck.
- Azul de Bromofenol. Merck. Solución al 0,4 % p/v.
- Borohidruro sódico. Merck. Solución de 50 mg/mL en hidróxido amónico 3 M. Se preparará inmediatamente antes de su uso.
- Cloruro sódico/ácido bórico. Panreac. Disolver 2 g de cloruro sódico y 3 g de ácido bórico en 100 mL de agua.
- Detergente Acido. Disolver 20 g de Cetil Trimetil Amonio (Merck) en 1 litro de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N.
- Detergente Neutro. Disolver, en 1 litro de agua destilada, 30 g de Lauril Sulfato Sódico; 6,81 g de Bórax ; 4,56 g de Fosfato Disódico; 18,61 g de Edetato Disódico; 10 mL de Etilenglicol. Se comprueba que el pH esté comprendido entre 6,9 y 7,1.
- 3,5-Dimetilfenol. Merck. Solución al 0,1 %. Disolver 0.1 g de 3,5-Dimetilfenol en 100 mL de ácido acético glacial.
- Dimetilsulfóxido (DMSO). Merck.
- Etanol absoluto.
- Etanol al 85 % v/v.

- m-Fenilfenol. Solución al 0,15 % en NaOH al 0,5 %.
- Ferricianuro Potásico. Merck. Disolver 1,25 g de ferricianuro potásico y 1,00 g de carbonato sódico en 25 mL de agua. Disolver 8,75 g de carbonato sódico en 100 mL de agua. Llevar ambas disoluciones a 1 litro con agua.
- Hidróxido amónico. Merck. Solución 12 M.
- Hidróxido potásico. Merck. Solución 7,5 M.
- 1-Metilimidazol. Fluka Biochemika.
- Octan-2-ol. Merck.
- Pepsina (EC 3.4.23.1). Sigma.
- Pancreatina. Sigma.

#### **Reactivos utilizados en el estudio microscópico:**

- Adhesivo de Haupt's. Se pesa 1 g de gelatina (Probus) y se lleva a 100 mL de agua a 90°C, se enfría a 30°C, se añaden 15 mL de glicerina y se agita, se filtra y se guarda en la nevera.
- Agua acética. Se prepara una solución de ácido acético al 10%.
- Cloruro de Zinc yodado. Se pesan 50 g de  $\text{Cl}_2\text{Zn}$ , 16 g de IK y un exceso de  $\text{I}_2$ . Se disuelve en 17 mL de agua.
- Etanol 95%, 70%, 50% y 30%.
- Floroglucina alcohólica. Se prepara una solución al 8% de floroglucina (Merck) en metanol.
- Hipoclorito sódico (Fine chemicals) al 50%.
- Lugol. Se pesan 0,2 g, 2 g de IK (Panreac) y se lleva a 100 mL con agua.
- Reactivo de fijación: Formaldehído: Acido acético: alcohol (FAA). 5 mL de ácido acético glacial, 5 mL de formaldehído al 40% y 90 mL de etanol al 50%.
- Rojo de Rutenio.
- Verde yodo. Se pesa 1 g de verde yodo y se disuelve en 100 mL de agua.
- Xilol (Panreac). Etanol 96°. Se mezclan en proporción 50:50.

### **III RESULTADOS Y DISCUSION**

# 1. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio realizado se exponen en este capítulo agrupados en un total de 80 tablas y 39 gráficos.

## 1.1. TABLAS

Las tablas que recogen los resultados obtenidos se han estructurado de la siguiente forma:

- Tabla 1: Valores de humedad en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 2 y 3: Valores medios de fibra obtenidos según los métodos detergentes en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 4 y 5: Estadísticos generales calculados para los valores obtenidos por métodos detergentes en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 6 y 7: Eficacia de los métodos detergentes en la eliminación de cenizas y proteínas en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 8 y 9: Valores medios de fibra obtenidos según el método de Asp en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 10 y 11: Estadísticos generales calculados para los valores obtenidos por el método de Asp en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 12 y 13: Eficacia del método de Asp en la eliminación de cenizas y proteínas en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 14 y 15: Valores medios de monosacáridos neutros productos de fibra obtenidos por HPLC en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 16 y 17: Valores medios de monosacáridos neutros totales procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 18 y 19: Estadísticos generales calculados para los valores de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras frescas y procesadas.
- Tablas 20 y 21: Estadísticos generales calculados para los valores de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por GLC en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 22 y 23: Valores medios de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y totales obtenidos por HPLC en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 24 y 25: Estadísticos generales calculados para los valores de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y totales en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 26 y 27: Valores medios de sustancias pécticas obtenidas según el método del 3,5-dimetilfenol en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 28 y 29: Estadísticos generales calculados para los valores de sustancias pécticas en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 30 y 31: Valores medios de fibra total según diferentes métodos en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 32 y 33: Estadísticos generales calculados para los valores de fibra total en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 34 y 35: Valores medios de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 36 y 37: Estadísticos generales calculados para los valores de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 38 y 39: Valores medios de azúcares solubles obtenidos según el método del ferricianuro potásico en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 40 y 41: Estadísticos generales calculados para los valores de azúcares solubles obtenidos por el método del ferricianuro potásico en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 42, 43 y 44: Contenido de fibra alimentaria obtenido por métodos detergentes en cada una de las muestras frescas y procesadas respectivamente.

-Tablas 45a y 45b: Valores medios de cenizas y proteínas en los residuos FAD y FND y en los residuos FI y FS en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 46, 47 y 48: Contenido de fibra alimentaria obtenido por el método de Asp en las muestras frescas y procesadas.

-Tabla 49: Porcentaje de fibra insoluble y de fibra soluble en la fibra alimentaria total de las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 50, 51 y 52: Contenido de monosacáridos neutros en la fibra alimentaria de las muestras frescas y procesadas.

-Tabla 53: Contenido de monosacáridos neutros totales en la fibra alimentaria de las muestras frescas y procesadas.

-Tabla 54: Porcentaje de cada uno de los monosacáridos neutros en el valor total de éstos en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 55, 56 y 57: Contenido de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en las muestras frescas y procesadas.

-Tabla 58: Porcentaje de celobiosa y glucosa en el total de polisacáridos celulósicos en las muestras frescas y procesadas.

-Tabla 59: Porcentaje de cada uno de los monosacáridos neutros en el total de polisacáridos no celulósicos en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 60, 61 y 62: Contenido de sustancias pécticas, expresado en ácido galacturónico, en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 63, 64 y 65: Contenido de polisacáridos no almidón (NSP) en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 66, 67 y 68: Contenido de fibra alimentaria total calculada por distintos métodos en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 69, 70 y 71: Contenido de azúcares solubles obtenido por HPLC en las muestras frescas y procesadas.

-Tablas 72, 73 y 74: Contenido de azúcares solubles obtenido por el método de ferricianuro potásico y por HPLC en las muestras frescas y procesadas.

-Tabla 75: Retenciones calculadas para los resultados de fibra obtenidos por métodos gravimétricos y para sustancias pécticas en las tres hortalizas.

-Tabla 76: Retenciones calculadas para monosacáridos correspondientes a fibra alimentaria en las tres hortalizas.

-Tabla 77: Retenciones calculadas para polisacáridos correspondientes a fibra alimentaria de las tres muestras.

-Tabla 78: Retenciones calculadas para los valores de fibra total de las tres hortalizas.

-Tabla 79: Retenciones calculadas para azúcares solubles totales de las tres hortalizas.

-Tabla 80: Retenciones calculadas para azúcares solubles en las tres hortalizas.

En las tablas de la 1 a la 41 los resultados están organizados para el estudio de la caracterización de la fibra alimentaria y azúcares solubles de las muestras frescas y procesadas. En las tablas de la 42 a la 74, dedicadas al estudio de la influencia del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra alimentaria y azúcares solubles en las hortalizas estudiadas, los resultados del procesado, como se indicará en la segunda parte de la discusión, están multiplicados por los correspondientes factores de corrección para que la comparación sea correcta. Las últimas tablas (75 a 80) reflejan las retenciones calculadas para las hortalizas procesadas; el concepto de la retención se comentará en el lugar correspondiente de la discusión de los resultados.

## **1.2 GRAFICOS**

Los resultados obtenidos y recogidos en las tablas indicadas anteriormente se representan en treinta y nueve gráficos que se han clasificado de la siguiente forma:

-Gráficos del 1 al 6: Comparación de los valores de fibra alimentaria, obtenidos por distintos métodos, en las tres hortalizas.

-Gráficos del 7 al 18: Estudio de los polisacáridos celulósicos y no celulósicos en las tres hortalizas.

-Gráficos 19 y 20: Comparación de los valores de fibra alimentaria total en las tres hortalizas.

-Gráficos del 21 al 24: Comparación de los valores de azúcares solubles, obtenidos por distintos métodos, en las tres hortalizas.

-Gráficos del 25 al 33: Comparación de los valores de fibra alimentaria en las hortalizas frescas y procesadas.

-Gráficos del 34 al 36: Comparación de los valores de ácido galacturónico en las hortalizas frescas y procesadas.

-Gráficos del 37 al 39: Distribución de los azúcares totales en las hortalizas frescas y procesadas.

### 1.3. ESTUDIO ESTADISTICO

El estudio estadístico de los resultados se ha realizado aplicando el paquete de programas estadístico BMDP (Biomedical Program) para obtener una valoración más objetiva de los resultados experimentales.

*En la primera parte de la Discusión de los Resultados (apartado 2.1) que plantea el estudio comparativo de los métodos analíticos utilizados, se ha aplicado el test de la t-Student para establecer si existen diferencias significativas o no entre los resultados obtenidos para una misma muestra por diferentes métodos. Se pretende comprobar en aquellas variables medidas por dos métodos distintos que no hay diferencias entre ambos; para ello se crea una variable que es la diferencia entre los valores de la variable obtenidos por los dos métodos aplicados. Se realiza el contraste de hipótesis, cuya hipótesis nula es que la media sea igual a cero o lo que es lo mismo que la media de las variables medidas mediante los dos métodos sean iguales.*

La interpretación del test se realiza de la siguiente forma, se fija un nivel de significación ( $\alpha = 0,05$ ) y para cada variable el test proporciona un "p-value" (nivel de significación del test) que se compara con el nivel de significación  $\alpha$  para rechazar o no la hipótesis nula. Los resultados del estudio estadístico se recogen en el Anexo I.

De forma análoga, en la segunda parte de la Discusión de los Resultados (apartado 2.2) que pretende evaluar la posible influencia del tratamiento térmico sobre los componentes estudiados se ha aplicado el análisis de la varianza (ANOVA) que permite determinar si existen diferencias entre las medias de los valores obtenidos en las muestras frescas y sometidas a proceso de cocción a presión.

*El análisis de varianza para las hortalizas agrupadas en frescas y procesadas consiste en un contraste de hipótesis en el que la hipótesis nula (hipótesis a contrastar) es que la media de la variable en cuestión para el grupo fresco es igual a la media de la misma variable para el grupo procesado. La interpretación es igual que en el caso anterior; se establece el mismo*

nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , de forma que si los valores de "p-value" son superiores a 0,05 se deduce que las variaciones obtenidas no son estadísticamente significativas. Los resultados se muestran en el Anexo II.

**Tabla n° 1. Valores medios de humedad en las muestras frescas y procesadas (g/100g).**

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	89,777 ± 0,040	91,511 ± 0,539
	2	90,522 ± 0,020	92,119 ± 0,190
	3	87,963 ± 0,020	92,277 ± 0,180
<b>REMOLACHA</b>	1	87,948 ± 0,010	87,950 ± 0,442
	2	84,570 ± 0,040	91,280 ± 0,020
	3	87,611 ± 0,070	91,750 ± 0,130
<b>NABO</b>	1	90,370 ± 0,020	92,984 ± 0,528
	2	92,690 ± 0,010	93,570 ± 0,179
	3	88,400 ± 0,020	93,405 ± 0,197

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 2. Valores medios de fibra obtenidos según los métodos detergentes en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).**

MUESTRA	N° Lote	FAD + cen.	FAD	FAD-prot.	FND + cen.	FND	FND-prot.
ZANAHORIA	1	1,386 ± 0,015	1,386 ± 0,015	1,366 ± 0,015	1,804 ± 0,118	1,804 ± 0,118	1,771 ± 0,115
	2	1,566 ± 0,076	1,566 ± 0,076	1,544 ± 0,075	1,916 ± 0,014	1,916 ± 0,014	1,867 ± 0,014
	3	1,581 ± 0,123	1,581 ± 0,123	1,559 ± 0,122	2,202 ± 0,130	2,202 ± 0,130	2,167 ± 0,128
REMOLACHA	1	1,518 ± 0,055	1,518 ± 0,055	1,448 ± 0,053	2,049 ± 0,028	2,019 ± 0,028	1,886 ± 0,026
	2	1,672 ± 0,132	1,672 ± 0,132	1,561 ± 0,123	2,778 ± 0,056	2,737 ± 0,055	2,554 ± 0,052
	3	1,172 ± 0,040	1,172 ± 0,040	1,103 ± 0,037	2,164 ± 0,015	2,134 ± 0,015	1,987 ± 0,014
NABO	1	2,000 ± 0,068	2,000 ± 0,068	1,981 ± 0,067	1,821 ± 0,018	1,812 ± 0,018	1,809 ± 0,018
	2	1,377 ± 0,057	1,377 ± 0,057	1,354 ± 0,056	1,421 ± 0,038	1,412 ± 0,038	1,406 ± 0,047
	3	1,841 ± 0,073	1,841 ± 0,073	1,817 ± 0,072	1,894 ± 0,042	1,885 ± 0,041	1,879 ± 0,038

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla nº 3.** Valores medios de fibra obtenidos según los métodos detergentes en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	Nº Lote	FAD + cen.	FAD	FAD-prot.	FND + cen.	FND	FND-prot.
ZANAHORIA	1	1,654 ± 0,184	1,654 ± 0,184	1,638 ± 0,182	1,636 ± 0,116	1,636 ± 0,116	1,609 ± 0,125
	2	1,683 ± 0,105	1,683 ± 0,105	1,674 ± 0,105	1,709 ± 0,030	1,709 ± 0,030	1,684 ± 0,030
	3	1,341 ± 0,102	1,341 ± 0,102	1,323 ± 0,100	1,715 ± 0,044	1,715 ± 0,044	1,693 ± 0,043
REMOLACHA	1	1,305 ± 0,036	1,305 ± 0,036	1,255 ± 0,035	2,493 ± 0,252	2,474 ± 0,250	2,313 ± 0,235
	2	1,153 ± 0,048	1,153 ± 0,048	1,094 ± 0,046	1,972 ± 0,014	1,949 ± 0,014	1,830 ± 0,013
	3	1,038 ± 0,007	1,038 ± 0,007	0,993 ± 0,006	1,613 ± 0,042	1,589 ± 0,030	1,519 ± 0,039
NABO	1	1,914 ± 0,026	1,914 ± 0,026	1,890 ± 0,026	1,998 ± 0,054	1,990 ± 0,053	1,983 ± 0,054
	2	1,615 ± 0,044	1,615 ± 0,044	1,597 ± 0,043	1,853 ± 0,083	1,844 ± 0,082	1,838 ± 0,082
	3	1,360 ± 0,027	1,360 ± 0,027	1,348 ± 0,027	1,329 ± 0,033	1,323 ± 0,033	1,318 ± 0,033

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 4.** Estadísticos generales calculados para los valores obtenidos por métodos detergentes en las muestras frescas.

MUESTRA	FAD	FND
<b>ZANAHORIA</b>		
X	1,511	1,974
SD	0,108	0,205
SE	0,062	0,119
RSD	0,072	0,104
<b>REMOLACHA</b>		
X	1,454	2,297
SD	0,256	0,386
SE	0,148	0,223
RSD	0,176	0,168
<b>NABO</b>		
X	1,739	1,703
SD	0,324	0,254
SE	0,187	0,147
RSD	0,186	0,149

X = valor medio (g/100 g materia húmeda) ; SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 5.** Estadísticos generales calculados para los valores obtenidos por métodos detergentes en las muestras procesadas.

<b>MUESTRA</b>	<b>FAD</b>	<b>FND</b>
<b>ZANAHORIA</b>		
X	1,559	1,687
SD	0,190	0,044
SE	0,109	0,026
RSD	0,122	0,026
<b>REMOLACHA</b>		
X	1,165	2,004
SD	0,134	0,445
SE	0,077	0,257
RSD	0,115	0,222
<b>NABO</b>		
X	1,630	1,719
SD	0,278	0,351
SE	0,160	0,203
RSD	0,170	0,204

X = valor medio (g/100g materia húmeda) ; SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla nº 6. Eficacia de los métodos detergentes en la eliminación de cenizas y proteínas en las muestras frescas.**

CENIZAS							PROTEINAS				
MUESTRA	Nº Lote	% en MUESTRA	% en RESIDUO		% ELIMINACION		% en MUESTRA	% en RESIDUO		% ELIMINACION	
			FAD	FND	FAD	FND		FAD	FND	FAD	FND
ZANAHORIA	1	0,774	-	-	100	100	2,604	1,014	1,829	99,462	98,733
	2	0,710	-	-	100	100	2,500	1,152	2,557	99,280	98,040
	3	0,718	-	-	100	100	2,486	1,392	1,589	99,115	98,411
REMOLACHA	1	0,676	-	1,464	100	95,562	1,484	4,611	6,587	95,283	91,038
	2	0,626	-	1,477	100	93,450	1,404	6,639	6,686	92,094	86,966
	3	0,578	-	1,386	100	94,810	1,142	5,887	6,888	93,958	87,128
NABO	1	0,828	-	0,494	100	98,913	1,294	0,950	0,166	98,532	99,768
	2	0,908	-	0,633	100	99,010	1,324	1,673	0,425	98,263	99,547
	3	0,688	-	0,475	100	98,692	1,882	1,304	0,318	98,725	99,681

**Tabla n° 7. Eficacia de los métodos detergentes en la eliminación de cenizas y proteínas en las muestras procesadas.**

CENIZAS							PROTEINAS				
MUESTRA	N° Lote	% en MUESTRA	% en RESIDUO		% ELIMINACION		% en MUESTRA	% en RESIDUO		% ELIMINACION	
			FAD	FND	FAD	FND		FAD	FND	FAD	FND
ZANAHORIA	1	0,552	-	-	100	100	1,480	0,967	1,650	98,919	98,176
	2	0,543	-	-	100	100	1,430	0,535	1,463	99,371	98,252
	3	0,580	-	-	100	100	1,370	1,342	1,458	99,686	98,394
REMOLACHA	1	0,533	-	0,762	100	95,931	0,675	3,831	6,508	92,597	76,148
	2	0,546	-	1,166	100	95,788	0,659	5,117	6,106	91,047	81,942
	3	0,561	-	0,750	100	97,861	1,485	4,335	4,405	96,970	95,286
NABO	1	0,467	-	0,350	100	98,501	1,440	1,254	0,352	98,333	99,514
	2	0,442	-	0,486	100	97,963	1,560	1,115	0,325	98,846	99,615
	3	0,489	-	0,451	100	98,773	1,000	0,882	0,378	98,800	99,500

**Tabla n° 8. Valores medios de fibra obtenidos según el método de Asp en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).**

MUESTRA	N° Lote	FI + prot. + cen.	FI + prot.	FI	FS + cen.	FS	FT + prot. + cen.	FT
ZANAHORIA	1	2,213 ± 0,073	2,148 ± 0,073	1,243 ± 0,026	0,674 ± 0,026	0,578 ± 0,026	2,887 ± 0,075	1,821 ± 0,075
	2	2,266 ± 0,088	2,198 ± 0,088	1,301 ± 0,089	0,648 ± 0,064	0,582 ± 0,064	2,913 ± 0,046	1,884 ± 0,046
	3	2,448 ± 0,074	2,339 ± 0,074	1,214 ± 0,074	1,242 ± 0,045	1,163 ± 0,045	3,690 ± 0,065	2,377 ± 0,065
REMOLACHA	1	2,411 ± 0,060	2,318 ± 0,060	2,206 ± 0,060	1,023 ± 0,036	0,899 ± 0,035	3,435 ± 0,046	3,105 ± 0,046
	2	3,115 ± 0,033	2,990 ± 0,033	2,822 ± 0,033	1,017 ± 0,060	0,924 ± 0,060	4,132 ± 0,091	3,746 ± 0,091
	3	2,379 ± 0,054	2,304 ± 0,054	2,211 ± 0,054	1,106 ± 0,023	1,000 ± 0,023	3,486 ± 0,044	3,211 ± 0,044
NABO	1	1,990 ± 0,004	1,918 ± 0,004	1,525 ± 0,004	0,817 ± 0,028	0,718 ± 0,028	2,807 ± 0,025	2,243 ± 0,025
	2	1,613 ± 0,071	1,577 ± 0,071	1,212 ± 0,071	0,500 ± 0,019	0,450 ± 0,019	2,113 ± 0,059	1,662 ± 0,059
	3	2,447 ± 0,026	2,356 ± 0,026	1,597 ± 0,026	0,644 ± 0,017	0,566 ± 0,017	3,091 ± 0,014	2,163 ± 0,014

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 9. Valores medios de fibra obtenidos según el método de Asp en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).**

MUESTRA	N° Lote	FI + prot. + cen.	FI + prot.	FI	FS + cen.	FS	FT + prot. + cen.	FT
ZANAHORIA	1	2,113 ± 0,072	2,064 ± 0,072	1,438 ± 0,072	1,330 ± 0,055	1,225 ± 0,055	3,443 ± 0,116	2,663 ± 0,116
	2	1,951 ± 0,054	1,914 ± 0,054	1,177 ± 0,055	1,356 ± 0,066	1,257 ± 0,066	3,306 ± 0,013	2,434 ± 0,013
	3	2,006 ± 0,057	1,960 ± 0,057	1,423 ± 0,057	1,445 ± 0,095	1,358 ± 0,095	3,451 ± 0,127	2,781 ± 0,127
REMOLACHA	1	2,953 ± 0,087	2,900 ± 0,087	2,752 ± 0,087	1,646 ± 0,076	1,541 ± 0,076	4,599 ± 0,122	4,293 ± 0,122
	2	2,045 ± 0,054	1,998 ± 0,054	1,890 ± 0,054	1,120 ± 0,047	1,056 ± 0,047	3,165 ± 0,089	2,946 ± 0,089
	3	1,834 ± 0,140	1,810 ± 0,140	1,671 ± 0,140	1,163 ± 0,008	1,125 ± 0,008	2,996 ± 0,147	2,796 ± 0,147
NABO	1	1,914 ± 0,048	1,870 ± 0,048	1,584 ± 0,048	1,046 ± 0,081	1,016 ± 0,081	2,960 ± 0,125	2,600 ± 0,125
	2	1,779 ± 0,062	1,762 ± 0,062	1,365 ± 0,062	0,931 ± 0,047	0,858 ± 0,047	2,709 ± 0,109	2,223 ± 0,109
	3	1,676 ± 0,023	1,621 ± 0,023	1,272 ± 0,023	0,825 ± 0,031	0,723 ± 0,031	2,501 ± 0,031	1,994 ± 0,031

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 10.** Estadísticos generales calculados para los valores obtenidos por el método de Asp en las muestras frescas.

<b>MUESTRA</b>	<b>FI</b>	<b>FS</b>	<b>FT</b>
<b>ZANAHORIA</b>			
X	1,253	0,774	2,027
SD	0,045	0,336	0,304
SE	0,026	0,194	0,176
RSD	0,036	0,434	0,150
<b>REMOLACHA</b>			
X	2,413	0,941	3,354
SD	0,354	0,053	0,343
SE	0,204	0,030	0,198
RSD	0,147	0,056	0,102
<b>NABO</b>			
X	1,445	0,578	2,023
SD	0,205	0,134	0,315
SE	0,118	0,078	0,182
RSD	0,142	0,232	0,156

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 11.** Estadísticos generales calculados para los valores obtenidos por el método de Asp en las muestras procesadas.

<b>MUESTRA</b>	<b>FI</b>	<b>FS</b>	<b>FT</b>
<b>ZANAHORIA</b>			
X	1,346	1,280	2,626
SD	0,147	0,069	0,176
SE	0,085	0,040	0,102
RSD	0,109	0,054	0,067
<b>REMOLACHA</b>			
X	2,104	1,241	3,345
SD	0,571	0,262	0,824
SE	0,330	0,152	0,476
RSD	0,272	0,212	0,246
<b>NABO</b>			
X	1,407	0,866	2,273
SD	0,160	0,147	0,306
SE	0,093	0,085	0,177
RSD	0,114	0,170	0,135

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 12. Eficacia del método de Asp en la eliminación de cenizas y proteínas en las muestras frescas.**

MUESTRA	N° Lote	CENIZAS					PROTEINAS		
		% en MUESTRA	% en RESIDUO		% ELIMINACION		% en MUESTRA	% en RESIDUO	
			FI	FS	FI	FS		FI	FI
ZANAHORIA	1	0,774	2,937	14,243	91,602	87,597	2,604	40,895	65,246
	2	0,710	3,001	10,185	90,423	40,704	2,500	39,585	64,120
	3	0,718	4,453	6,361	84,819	88,997	2,486	45,956	54,747
REMOLACHA	1	0,676	3,857	12,121	86,243	81,657	1,484	4,645	92,453
	2	0,626	4,013	9,145	80,032	85,144	1,404	5,393	88,034
	3	0,578	3,153	9,584	87,024	81,661	1,142	3,909	91,856
NABO	1	0,828	3,618	12,118	91,304	88,043	1,294	19,749	69,629
	2	0,908	2,232	10,000	96,035	94,493	1,324	22,629	72,432
	3	0,688	3,719	12,112	86,773	88,663	1,882	31,018	59,671

**Tabla n° 13. Eficacia del método de Asp en la eliminación de cenizas y proteínas en las muestras procesadas.**

MUESTRA	N° Lote	CENIZAS					PROTEINAS		
		% en MUESTRA	% en RESIDUO		% ELIMINACION		% en MUESTRA	% en RESIDUO	% ELIMINACION
			FI	FS	FI	FS		FI	FI
ZANAHORIA	1	0,552	2,319	7,895	91,123	80,978	1,480	29,626	57,703
	2	0,543	1,896	7,301	93,186	81,768	1,430	37,776	48,462
	3	0,580	2,293	6,021	92,070	85,000	1,370	26,770	60,803
REMOLACHA	1	0,533	1,795	6,379	90,056	80,300	0,675	5,012	78,074
	2	0,546	2,298	5,714	91,392	88,278	0,659	5,281	83,612
	3	0,561	1,309	3,267	95,722	93,226	1,485	5,579	90,640
NABO	1	0,467	2,299	2,868	90,578	93,576	1,440	14,943	80,140
	2	0,442	0,956	7,841	96,154	83,484	1,560	22,316	74,551
	3	0,489	3,281	12,364	88,753	79,141	1,000	20,823	65,100

**Tabla nº 14.** Valores medios de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	Nº Lote	CELOBIOSA	GLUCOSA	XILOSA	GAL/RAM	ARABINOSA	MANOSA
ZANAHORIA	1	0,037 ± 0,001	0,450 ± 0,023	0,044 ± 0,004	0,248 ± 0,003	0,168 ± 0,012	0,033 ± 0,003
	2	0,039 ± 0,001	0,286 ± 0,012	0,039 ± 0,001	0,178 ± 0,007	0,113 ± 0,009	0,033 ± 0,002
	3	0,108 ± 0,016	0,531 ± 0,008	0,049 ± 0,001	0,286 ± 0,032	0,248 ± 0,028	0,047 ± 0,001
REMOLACHA	1	0,064 ± 0,003	0,430 ± 0,043	0,037 ± 0,003	0,118 ± 0,018	0,428 ± 0,020	0,039 ± 0,003
	2	0,077 ± 0,004	0,717 ± 0,038	0,040 ± 0,001	0,270 ± 0,024	0,716 ± 0,027	0,043 ± 0,001
	3	0,040 ± 0,006	0,531 ± 0,013	0,033 ± 0,002	0,158 ± 0,015	0,485 ± 0,021	0,045 ± 0,005
NABO	1	0,063 ± 0,005	0,721 ± 0,025	0,084 ± 0,007	0,156 ± 0,014	0,167 ± 0,009	0,062 ± 0,002
	2	0,056 ± 0,001	0,549 ± 0,006	0,089 ± 0,007	0,111 ± 0,031	0,172 ± 0,009	0,060 ± 0,004
	3	0,084 ± 0,001	0,883 ± 0,021	0,103 ± 0,001	0,207 ± 0,006	0,217 ± 0,013	0,072 ± 0,004

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 15.** Valores medios de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	CELOBIOSA	GLUCOSA	XILOSA	GAL/RAM	ARABINOSA	MANOSA
ZANAHORIA	1	0,049 ± 0,005	0,467 ± 0,043	0,028 ± 0,003	0,236 ± 0,002	0,243 ± 0,021	0,041 ± 0,002
	2	0,067 ± 0,010	0,417 ± 0,026	0,032 ± 0,002	0,304 ± 0,027	0,221 ± 0,022	0,031 ± 0,003
	3	0,077 ± 0,020	0,391 ± 0,022	0,068 ± 0,006	0,398 ± 0,037	0,347 ± 0,028	0,029 ± 0,003
REMOLACHA	1	0,091 ± 0,006	0,776 ± 0,102	0,071 ± 0,016	0,152 ± 0,029	0,596 ± 0,026	0,051 ± 0,004
	2	0,094 ± 0,003	0,671 ± 0,024	0,049 ± 0,010	0,214 ± 0,022	0,694 ± 0,012	0,067 ± 0,003
	3	0,055 ± 0,004	0,480 ± 0,005	0,025 ± 0,002	0,200 ± 0,011	0,443 ± 0,033	0,065 ± 0,004
NABO	1	0,064 ± 0,010	0,877 ± 0,021	0,105 ± 0,017	0,138 ± 0,011	0,164 ± 0,004	0,048 ± 0,005
	2	0,081 ± 0,017	0,815 ± 0,016	0,177 ± 0,008	0,134 ± 0,002	0,167 ± 0,014	0,050 ± 0,015
	3	0,094 ± 0,092	0,835 ± 0,009	0,085 ± 0,006	0,154 ± 0,027	0,170 ± 0,008	0,085 ± 0,014

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 16.** Valores medios de monosacáridos neutros totales procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras frescas (g/100g materia húmeda).

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>MONOSACARIDOS TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	0,979 ± 0,024
	2	0,689 ± 0,009
	3	1,271 ± 0,066
<b>REMOLACHA</b>	1	1,116 ± 0,066
	2	1,863 ± 0,090
	3	1,290 ± 0,009
<b>NABO</b>	1	1,255 ± 0,031
	2	1,037 ± 0,010
	3	1,565 ± 0,032

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 17.** Valores medios de monosacáridos neutros totales procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras procesadas (g/100g materia húmeda).

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>MONOSACARIDOS TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	1,064 ± 0,041
	2	1,072 ± 0,073
	3	1,310 ± 0,114
<b>REMOLACHA</b>	1	1,738 ± 0,098
	2	1,790 ± 0,023
	3	1,268 ± 0,044
<b>NABO</b>	1	1,396 ± 0,018
	2	1,424 ± 0,028
	3	1,423 ± 0,057

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 18.** Estadísticos generales calculados para los valores de monosacáridos neutros procedentes de fibra alimentaria obtenidos por HPLC en las muestras frescas.

MUESTRA	CELOBIOSA	GLUCOSA	XILOSA	GAL/RAM	ARABINOSA	MANOSA	TOTAL
<b>ZANAHORIA</b>							
X	0,061	0,422	0,044	0,237	0,177	0,038	0,979
SD	0,040	0,125	0,005	0,055	0,068	0,008	0,291
SE	0,023	0,072	0,003	0,032	0,039	0,005	0,168
RSD	0,657	0,295	0,112	0,231	0,385	0,220	0,297
<b>REMOLACHA</b>							
X	0,060	0,559	0,037	0,182	0,543	0,042	1,423
SD	0,019	0,145	0,004	0,079	0,152	0,003	0,391
SE	0,011	0,084	0,002	0,046	0,088	0,002	0,226
RSD	0,317	0,260	0,104	0,434	0,281	0,071	0,275
<b>NABO</b>							
X	0,068	0,718	0,092	0,158	0,185	0,064	1,285
SD	0,015	0,167	0,009	0,048	0,027	0,006	0,265
SE	0,009	0,097	0,005	0,028	0,016	0,004	0,153
RSD	0,221	0,233	0,098	0,305	0,148	0,096	0,206

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 19.** Estadísticos generales calculados para los valores de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por HPLC en las muestras procesadas.

MUESTRA	CELOBIOSA	GLUCOSA	XILOSA	GAL/RAM	ARABINOSA	MANOSA	TOTAL
<b>ZANAHORIA</b>							
X	0,064	0,425	0,043	0,313	0,270	0,034	1,149
SD	0,014	0,039	0,022	0,081	0,067	0,006	0,140
SE	0,008	0,023	0,013	0,047	0,039	0,003	0,081
RSD	0,219	0,092	0,512	0,259	0,248	0,176	0,122
<b>REMOLACHA</b>							
X	0,080	0,643	0,048	0,189	0,578	0,061	1,599
SD	0,022	0,150	0,023	0,032	0,127	0,009	0,288
SE	0,013	0,087	0,013	0,019	0,073	0,005	0,166
RSD	0,272	0,233	0,479	0,171	0,219	0,148	0,180
<b>NABO</b>							
X	0,079	0,842	0,122	0,142	0,167	0,061	1,413
SD	0,014	0,032	0,048	0,011	0,003	0,025	0,023
SE	0,008	0,018	0,075	0,006	0,002	0,014	0,013
RSD	0,176	0,032	0,393	0,074	0,019	0,391	0,017

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 20.** Estadísticos generales calculados para los valores de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por GLC en las muestras frescas.

MUESTRA	RAMNOSA	ARABINOSA	XILOSA	MANOSA	GLUCOSA	GALACTOSA	TOTAL
<b>ZANAHORIA</b>							
X	0,031	0,240	0,060	0,059	0,595	0,281	1,266
SD	0,003	0,017	0,003	0,010	0,023	0,016	0,072
SE	0,002	0,010	0,006	0,006	0,013	0,009	0,042
RSD	0,097	0,071	0,050	0,169	0,039	0,057	0,057
<b>REMOLACHA</b>							
X	0,042	0,757	0,036	0,060	0,744	0,178	1,817
SD	0,002	0,023	0,001	0,002	0,032	0,004	0,056
SE	0,001	0,013	0,001	0,001	0,018	0,002	0,032
RSD	0,048	0,030	0,028	0,033	0,043	0,022	0,031
<b>NABO</b>							
X	0,022	0,142	0,079	0,062	0,559	0,101	0,965
SD	0,001	0,005	0,001	0,002	0,025	0,005	0,018
SE	0,001	0,003	0,001	0,001	0,014	0,003	0,010
RSD	0,045	0,035	0,013	0,032	0,045	0,050	0,019

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 21.** Estadísticos generales calculados para los valores de monosacáridos neutros procedentes de fibra obtenidos por GLC en las muestras procesadas.

MUESTRA	RAMNOSA	ARABINOSA	XILOSA	MANOSA	GLUCOSA	GALACTOSA	TOTAL
<b>ZANAHORIA</b>							
X	0,034	0,269	0,075	0,064	0,622	0,318	1,383
SD	0,002	0,012	0,002	0,002	0,031	0,017	0,057
SE	0,001	0,007	0,001	0,001	0,018	0,010	0,033
RSD	0,059	0,045	0,027	0,031	0,050	0,053	0,041
<b>REMOLACHA</b>							
X	0,041	0,689	0,048	0,060	0,699	0,210	1,748
SD	0,002	0,009	0,003	0,002	0,017	0,013	0,035
SE	0,001	0,005	0,002	0,001	0,010	0,008	0,020
RSD	0,049	0,013	0,063	0,033	0,024	0,062	0,020
<b>NABO</b>							
X	0,019	0,129	0,088	0,050	0,474	0,116	0,876
SD	0,001	0,006	0,005	0,005	0,016	0,010	0,040
SE	0,001	0,003	0,003	0,003	0,009	0,006	0,023
RSD	0,053	0,047	0,057	0,100	0,034	0,086	0,046

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 22.** Valores medios de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y totales obtenidos por HPLC en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	POLISACARIDOS CELULOSICOS	POLISACARIDOS NO CELULOSICOS	POLISACARIDOS TOTALES
ZANAHORIA	1	0,439 ± 0,021	0,439 ± 0,003	0,878 ± 0,022
	2	0,295 ± 0,011	0,324 ± 0,003	0,619 ± 0,008
	3	0,580 ± 0,009	0,563 ± 0,051	1,143 ± 0,059
REMOLACHA	1	0,449 ± 0,041	0,550 ± 0,018	0,999 ± 0,034
	2	0,719 ± 0,037	0,947 ± 0,045	1,666 ± 0,080
	3	0,515 ± 0,009	0,638 ± 0,007	1,153 ± 0,009
NABO	1	0,708 ± 0,027	0,418 ± 0,011	1,126 ± 0,025
	2	0,548 ± 0,005	0,383 ± 0,013	0,931 ± 0,009
	3	0,875 ± 0,019	0,532 ± 0,011	1,407 ± 0,029

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 23.** Valores medios de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y totales obtenidos por HPLC en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>POLISACARIDOS CELULOSICOS</b>	<b>POLISACARIDOS NO CELULOSICOS</b>	<b>POLISACARIDOS TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	0,467 ± 0,042	0,487 ± 0,012	0,954 ± 0,064
	2	0,440 ± 0,033	0,524 ± 0,038	0,963 ± 0,066
	3	0,425 ± 0,039	0,731 ± 0,066	1,157 ± 0,104
<b>REMOLACHA</b>	1	0,784 ± 0,087	0,771 ± 0,030	1,555 ± 0,088
	2	0,694 ± 0,021	0,911 ± 0,017	1,605 ± 0,019
	3	0,484 ± 0,008	0,650 ± 0,039	1,135 ± 0,032
<b>NABO</b>	1	0,850 ± 0,028	0,404 ± 0,014	1,254 ± 0,017
	2	0,810 ± 0,030	0,408 ± 0,016	1,219 ± 0,026
	3	0,846 ± 0,015	0,440 ± 0,041	1,286 ± 0,050

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 24.** Estadísticos generales calculados para los valores de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y totales en las muestras frescas.

<b>MUESTRA</b>	<b>POLISACARIDOS CELULOSICOS</b>	<b>POLISACARIDOS NO CELULOSICOS</b>	<b>POLISACARIDOS TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>			
X	0,438	0,442	0,880
SD	0,143	0,119	0,262
SE	0,083	0,069	0,151
RSD	0,326	0,270	0,300
<b>REMOLACHA</b>			
X	0,561	0,712	1,273
SD	0,141	0,209	0,349
SE	0,081	0,121	0,201
RSD	0,251	0,294	0,274
<b>NABO</b>			
X	0,710	0,444	1,154
SD	0,164	0,078	0,239
SE	0,095	0,045	0,138
RSD	0,230	0,175	0,207

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 25.** Estadísticos generales calculados para los valores de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y totales en las muestras procesadas.

MUESTRA	POLISACARIDOS CELULOSICOS	POLISACARIDOS NO CELULOSICOS	POLISACARIDOS TOTALES
<b>ZANAHORIA</b>			
X	0,444	0,581	1,025
SD	0,021	0,132	0,115
SE	0,012	0,076	0,066
RSD	0,047	0,227	0,112
<b>REMOLACHA</b>			
X	0,654	0,777	1,431
SD	0,154	0,130	0,258
SE	0,089	0,075	0,149
RSD	0,235	0,167	0,182
<b>NABO</b>			
X	0,835	0,417	1,252
SD	0,022	0,020	0,034
SE	0,013	0,012	0,020
RSD	0,026	0,048	0,027

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 26.** Valores medios de sustancias pécticas obtenidas según el método de 3,5-dimetilfenol en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	SUSTANCIAS PECTICAS	
		Ac. Galacturónico	Ac. Poligalacturónico
ZANAHORIA	1	0,551 ± 0,014	0,496 ± 0,013
	2	0,514 ± 0,023	0,463 ± 0,020
	3	0,571 ± 0,025	0,513 ± 0,023
REMOLACHA	1	0,375 ± 0,016	0,338 ± 0,014
	2	0,495 ± 0,002	0,446 ± 0,002
	3	0,331 ± 0,016	0,299 ± 0,014
NABO	1	0,359 ± 0,008	0,323 ± 0,008
	2	0,317 ± 0,006	0,286 ± 0,005
	3	0,342 ± 0,010	0,308 ± 0,009

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 27.** Valores medios de sustancias pécticas obtenidas según el método de 3,5-dimetilfenol en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	SUSTANCIAS PECTICAS	
		Ac. Galacturónico	Ac. Poligalacturónico
ZANAHORIA	1	0,534 ± 0,011	0,481 ± 0,010
	2	0,484 ± 0,009	0,436 ± 0,008
	3	0,391 ± 0,023	0,352 ± 0,021
REMOLACHA	1	0,338 ± 0,013	0,304 ± 0,011
	2	0,329 ± 0,021	0,296 ± 0,019
	3	0,268 ± 0,024	0,241 ± 0,021
NABO	1	0,273 ± 0,018	0,246 ± 0,017
	2	0,268 ± 0,009	0,242 ± 0,008
	3	0,217 ± 0,009	0,196 ± 0,009

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 28. Estadísticos generales calculados para los valores de sustancias pécticas en las muestras frescas.**

MUESTRA	SUSTANCIAS PECTICAS	
	Ac. Galacturónico	Ac. Poligalacturónico
<b>ZANAHORIA</b>		
X	0,545	0,491
SD	0,029	0,025
SE	0,017	0,014
RSD	0,053	0,051
<b>REMOLACHA</b>		
X	0,400	0,361
SD	0,085	0,076
SE	0,049	0,044
RSD	0,213	0,211
<b>NABO</b>		
X	0,339	0,306
SD	0,021	0,019
SE	0,012	0,011
RSD	0,062	0,062

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 29.** Estadísticos generales calculados para los valores de sustancias pécticas en las muestras procesadas.

MUESTRA	SUSTANCIAS PECTICAS	
	Ac. Galacturónico	Ac. Poligalacturónico
<b>ZANAHORIA</b>		
X	0,470	0,423
SD	0,073	0,065
SE	0,042	0,037
RSD	0,155	0,150
<b>REMOLACHA</b>		
X	0,312	0,280
SD	0,038	0,034
SE	0,022	0,017
RSD	0,122	0,121
<b>NABO</b>		
X	0,253	0,228
SD	0,031	0,028
SE	0,018	0,016
RSD	0,123	0,123

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 30. Valores medios de fibra total obtenidos según diferentes métodos en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).**

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>FND + SP</b>	<b>FI + FS</b>	<b>NSP</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	2,300 ± 0,125	1,821 ± 0,076	1,374 ± 0,028
	2	2,379 ± 0,032	1,884 ± 0,046	1,082 ± 0,016
	3	2,715 ± 0,108	2,377 ± 0,065	1,657 ± 0,057
<b>REMOLACHA</b>	1	2,357 ± 0,026	3,105 ± 0,046	1,337 ± 0,044
	2	3,183 ± 0,055	3,746 ± 0,091	2,111 ± 0,080
	3	2,432 ± 0,018	3,211 ± 0,044	1,451 ± 0,021
<b>NABO</b>	1	2,134 ± 0,014	2,243 ± 0,025	1,449 ± 0,030
	2	1,698 ± 0,036	1,662 ± 0,059	1,217 ± 0,014
	3	2,192 ± 0,046	2,163 ± 0,014	1,715 ± 0,025

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 31.** Valores medios de fibra total obtenidos según diferentes métodos en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	FND + SP	FI + FS	NSP
ZANAHORIA	1	2,117 ± 0,123	1,438 ± 0,072	1,436 ± 0,037
	2	2,145 ± 0,022	1,177 ± 0,055	1,399 ± 0,061
	3	2,067 ± 0,051	1,423 ± 0,057	1,509 ± 0,100
REMOLACHA	1	2,778 ± 0,256	4,293 ± 0,122	1,922 ± 0,094
	2	2,245 ± 0,022	2,946 ± 0,089	1,901 ± 0,038
	3	1,830 ± 0,047	2,796 ± 0,147	1,377 ± 0,034
NABO	1	2,236 ± 0,066	2,600 ± 0,125	1,500 ± 0,030
	2	2,086 ± 0,084	2,223 ± 0,109	1,461 ± 0,025
	3	1,518 ± 0,030	1,994 ± 0,031	1,481 ± 0,049

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 32. Estadísticos generales calculados para los valores de fibra total en las muestras frescas.**

<b>MUESTRA</b>	<b>FND + SP</b>	<b>FI + FS</b>	<b>NSP</b>
<b>ZANAHORIA</b>			
X	2,465	2,027	1,371
SD	0,221	0,304	0,287
SE	0,128	0,176	0,166
RSD	0,090	0,150	0,210
<b>REMOLACHA</b>			
X	2,657	3,354	1,633
SD	0,457	0,343	0,418
SE	0,264	0,198	0,241
RSD	0,172	0,102	0,256
<b>NABO</b>			
X	2,008	2,023	1,460
SD	0,270	0,315	0,249
SE	0,156	0,182	0,144
RSD	0,135	0,156	0,171

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 33. Estadísticos generales calculados para los valores de fibra total en las muestras procesadas.**

<b>MUESTRA</b>	<b>FND + SP</b>	<b>FI + FS</b>	<b>NSP</b>
<b>ZANAHORIA</b>			
X	2,110	2,626	1,448
SD	0,039	0,176	0,056
SE	0,023	0,102	0,032
RSD	0,019	0,067	0,039
<b>REMOLACHA</b>			
X	2,284	3,345	1,733
SD	0,475	0,824	0,309
SE	0,274	0,476	0,178
RSD	0,208	0,246	0,178
<b>NABO</b>			
X	1,947	2,273	1,481
SD	0,379	0,306	0,020
SE	0,219	0,177	0,012
RSD	0,195	0,135	0,014

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n°34. Valores medios de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).**

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>FRUCTOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	0,660 ± 0,017	0,982 ± 0,034	2,900 ± 0,118	4,542 ± 0,158
	2	0,989 ± 0,050	1,253 ± 0,067	2,477 ± 0,040	4,719 ± 0,113
	3	1,108 ± 0,040	1,436 ± 0,045	3,112 ± 0,027	5,656 ± 0,101
<b>REMOLACHA</b>	1	0,173 ± 0,012	0,345 ± 0,039	5,064 ± 0,202	5,582 ± 0,183
	2	0,134 ± 0,011	0,666 ± 0,043	8,298 ± 0,262	9,098 ± 0,278
	3	0,074 ± 0,043	0,453 ± 0,006	6,676 ± 0,211	7,203 ± 0,226
<b>NABO</b>	1	1,580 ± 0,059	1,440 ± 0,025	0,255 ± 0,022	3,275 ± 0,021
	2	0,914 ± 0,012	1,296 ± 0,005	0,167 ± 0,006	2,377 ± 0,009
	3	0,818 ± 0,013	1,496 ± 0,043	0,194 ± 0,004	2,508 ± 0,054

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n°35. Valores medios de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).**

<b>MUESTRA</b>	<b>N° Lote</b>	<b>FRUCTOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>ZANAHORIA</b>	1	0,539 ± 0,025	0,720 ± 0,063	2,232 ± 0,155	3,491 ± 0,077
	2	0,719 ± 0,061	0,862 ± 0,085	1,858 ± 0,079	3,439 ± 0,152
	3	0,551 ± 0,098	0,763 ± 0,078	1,844 ± 0,069	3,158 ± 0,106
<b>REMOLACHA</b>	1	0,131 ± 0,015	0,275 ± 0,033	4,478 ± 0,073	4,883 ± 0,064
	2	0,074 ± 0,005	0,275 ± 0,048	4,313 ± 0,113	4,662 ± 0,073
	3	0,049 ± 0,009	0,252 ± 0,026	4,218 ± 0,100	4,519 ± 0,117
<b>NABO</b>	1	0,981 ± 0,031	1,150 ± 0,110	0,080 ± 0,007	2,211 ± 0,135
	2	0,522 ± 0,004	0,742 ± 0,037	0,107 ± 0,013	1,372 ± 0,024
	3	0,580 ± 0,042	1,082 ± 0,038	0,086 ± 0,004	1,748 ± 0,078

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 36. Estadísticos generales calculados para los valores de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las muestras frescas.**

<b>MUESTRA</b>	<b>FRUCTOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>ZANAHORIA</b>				
X	0,919	1,224	2,830	4,972
SD	0,232	0,228	0,323	0,599
SE	0,134	0,132	0,187	0,346
RSD	0,252	0,187	0,114	0,120
<b>REMOLACHA</b>				
X	0,127	0,488	6,679	7,295
SD	0,050	0,163	1,617	1,760
SE	0,029	0,094	0,934	1,016
RSD	0,394	0,335	0,242	0,241
<b>NABO</b>				
X	1,104	1,411	0,206	2,720
SD	0,415	0,103	0,045	0,485
SE	0,240	0,060	0,026	0,280
RSD	0,376	0,073	0,219	0,178

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 37. Estadísticos generales calculados para los valores de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las muestras procesadas.**

<b>MUESTRA</b>	<b>FRUCTOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>ZANAHORIA</b>				
X	0,603	0,782	1,978	3,362
SD	0,101	0,072	0,220	0,179
SE	0,058	0,042	0,127	0,103
RSD	0,167	0,093	0,111	0,053
<b>REMOLACHA</b>				
X	0,085	0,267	4,336	4,688
SD	0,042	0,013	0,131	0,183
SE	0,024	0,008	0,076	0,106
RSD	0,494	0,049	0,030	0,039
<b>NABO</b>				
X	0,695	0,991	0,091	1,777
SD	0,250	0,219	0,014	0,420
SE	0,144	0,126	0,008	0,243
RSD	0,360	0,220	0,159	0,236

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 38.** Valores medios de azúcares solubles obtenidos según el método del ferricianuro potásico en las muestras frescas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	AZUCARES SOLUBLES TOTALES
ZANAHORIA	1	5,074 ± 0,063
	2	4,370 ± 0,017
	3	5,209 ± 0,018
REMOLACHA	1	5,232 ± 0,092
	2	9,011 ± 0,175
	3	7,186 ± 0,063
NABO	1	3,406 ± 0,049
	2	2,107 ± 0,032
	3	2,431 ± 0,111

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 39.** Valores medios de azúcares solubles obtenidos según el método del ferricianuro potásico en las muestras procesadas (g/100 g materia húmeda).

MUESTRA	N° Lote	AZUCARES SOLUBLES TOTALES
ZANAHORIA	1	4,017 ± 0,091
	2	3,227 ± 0,041
	3	3,047 ± 0,022
REMOLACHA	1	4,861 ± 0,176
	2	4,204 ± 0,086
	3	5,088 ± 0,714
NABO	1	2,341 ± 0,155
	2	1,328 ± 0,061
	3	1,746 ± 0,305

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 40.** Estadísticos generales calculados para los valores de azúcares solubles obtenidos por el método del ferricianuro potásico en las muestras frescas.

<b>MUESTRA</b>	<b>AZUCARES SOLUBLES TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>	
X	4,885
SD	0,450
SE	0,260
RSD	0,092
<b>REMOLACHA</b>	
X	7,143
SD	1,890
SE	1,091
RSD	0,265
<b>NABO</b>	
X	2,648
SD	0,680
SE	0,391
RSD	0,256

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 41.** Estadísticos generales calculados para los valores de azúcares solubles obtenidos por el método del ferricianuro potásico en las muestras procesadas.

<b>MUESTRA</b>	<b>AZUCARES SOLUBLES TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>	
X	3,430
SD	0,516
SE	0,298
RSD	0,150
<b>REMOLACHA</b>	
X	4,718
SD	0,459
SE	0,265
RSD	0,097
<b>NABO</b>	
X	1,746
SD	0,529
SE	0,305
RSD	0,303

X = valor medio (g/100 g materia húmeda); SD = desviación estándar; SE = error estándar; RSD = desviación estándar relativa

**Tabla n° 42.** Comparación del contenido de fibra alimentaria obtenido por métodos detergentes en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FAD		FND	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	1,399	1,781	1,680	1,617
	II	1,404	1,294	1,692	1,440
	III	1,357	1,295	2,039	1,263
	X ± SE	1,386 ± 0,015	1,457 ± 0,162	1,804 ± 0,118	1,440 ± 0,102
2	I	1,566	1,643	1,943	1,455
	II	1,433	1,468	1,907	1,547
	III	1,698	1,323	1,897	1,501
	X ± SE	1,566 ± 0,076	1,478 ± 0,093	1,916 ± 0,014	1,501 ± 0,026
3	I	1,481	1,362	1,982	1,576
	II	1,826	1,055	2,433	1,544
	III	1,435	1,154	2,191	1,447
	X ± SE	1,581 ± 0,123	1,190 ± 0,090	2,202 ± 0,130	1,523 ± 0,039

X ± SE = Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 43.** Comparación del contenido de fibra alimentaria obtenido por métodos detergentes en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FAD		FND	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	1,459	1,212	1,992	2,150
	II	1,628	1,323	1,992	2,124
	III	1,466	1,226	2,074	2,857
	X ± SE	X= 1,518 ± 0,055	1,254 ± 0,035	2,019 ± 0,028	2,377 ± 0,240
2	I	1,426	1,102	2,685	1,852
	II	1,713	1,147	2,678	1,806
	III	1,878	0,993	2,847	1,825
	X ± SE	X= 1,672 ± 0,132	1,081 ± 0,046	2,737 ± 0,055	1,827 ± 0,013
3	I	1,236	1,074	2,160	1,682
	II	1,182	1,052	2,108	1,577
	III	1,099	1,055	2,132	1,608
	X ± SE	X=1,172 ± 0,040	1,060 ± 0,007	2,134 ± 0,015	1,622 ± 0,031

X ± SE = Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla nº 44.** Comparación del contenido de fibra alimentaria obtenido por métodos detergentes en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

Nº Lote	TRAT. TERMICO	FAD		FND	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	2,131	1,807	1,777	1,859
	II	1,905	1,740	1,838	1,773
	III	1,964	1,819	1,820	1,947
	X ± SE	2,000 ± 0,068	1,788 ± 0,025	1,812 ± 0,018	1,859 ± 0,050
2	I	1,442	1,463	1,488	1,918
	II	1,264	1,605	1,368	1,693
	III	1,425	1,557	1,379	1,673
	X ± SE	1,377 ± 0,057	1,542 ± 0,042	1,412 ± 0,038	1,761 ± 0,077
3	I	1,763	1,444	1,943	1,384
	II	1,774	1,539	1,804	1,507
	III	1,987	1,461	1,906	1,433
	X ± SE	1,841 ± 0,073	1,481 ± 0,029	1,885 ± 0,041	1,441 ± 0,036

X ± SE = Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 45 a. Comparación del contenido de cenizas y proteínas en los residuos de FAD y FND en las tres hortalizas frescas y procesadas (g/100g materia húmeda).**

MUESTRA	N° Lote	CENIZAS				PROTEINAS			
		FAD		FND		FAD		FND	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
ZANAHORIA	1	-	-	-	-	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,033 ± 0,002	0,024 ± 0,002
	2	-	-	-	-	0,018 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,049 ± 0,001	0,021 ± 0,001
	3	-	-	-	-	0,022 ± 0,002	0,016 ± 0,001	0,035 ± 0,002	0,020 ± 0,001
REMOLACHA	1	-	-	0,031 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,070 ± 0,003	0,048 ± 0,001	0,133 ± 0,002	0,155 ± 0,014
	2	-	-	0,041 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,111 ± 0,009	0,055 ± 0,002	0,183 ± 0,004	0,111 ± 0,001
	3	-	-	0,030 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,070 ± 0,002	0,046 ± 0,003	0,147 ± 0,001	0,083 ± 0,002
NABO	1	-	-	0,009 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,019 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,007 ± 0,001
	2	-	-	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,006 ± 0,001
	3	-	-	0,010 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 45 b. Comparación del contenido de cenizas en los residuos de FI y FS y de proteínas en FI en las tres hortalizas frescas y procesadas (g/100g materia húmeda).**

MUESTRA	N° Lote	CENIZAS				PROTEINAS	
		FI		FS		FI	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
ZANAHORIA	1	0,065 ± 0,001	0,043 ± 0,001	0,096 ± 0,001	0,092 ± 0,001	0,905 ± 0,002	0,552 ± 0,001
	2	0,068 ± 0,001	0,033 ± 0,001	0,065 ± 0,001	0,087 ± 0,001	0,896 ± 0,001	0,647 ± 0,003
	3	0,108 ± 0,002	0,041 ± 0,002	0,079 ± 0,001	0,078 ± 0,001	1,125 ± 0,003	0,477 ± 0,001
REMOLACHA	1	0,094 ± 0,001	0,050 ± 0,001	0,125 ± 0,002	0,101 ± 0,001	0,111 ± 0,001	0,143 ± 0,002
	2	0,127 ± 0,002	0,044 ± 0,001	0,093 ± 0,001	0,060 ± 0,001	0,166 ± 0,001	0,101 ± 0,001
	3	0,075 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,106 ± 0,002	0,039 ± 0,001	0,093 ± 0,001	0,142 ± 0,002
NABO	1	0,072 ± 0,001	0,041 ± 0,003	0,099 ± 0,003	0,028 ± 0,001	0,393 ± 0,004	0,267 ± 0,001
	2	0,037 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,050 ± 0,002	0,070 ± 0,002	0,365 ± 0,003	0,379 ± 0,001
	3	0,091 ± 0,001	0,060 ± 0,001	0,078 ± 0,002	0,111 ± 0,001	0,758 ± 0,001	0,381 ± 0,001

Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 46.** Comparación del contenido de fibra alimentaria obtenido por el método de Asp en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FI		FS		FT	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	1,347	1,313	0,610	1,036	1,958	2,349
	II	1,102	1,141	0,596	1,025	1,697	2,166
	III	1,280	1,345	0,527	1,176	1,807	2,521
	X ± SE	1,243 ± 0,073	1,266 ± 0,063	0,578 ± 0,026	1,079 ± 0,049	1,821 ± 0,075	2,345 ± 0,103
2	I	1,185	0,940	0,609	1,219	1,793	2,159
	II	1,476	1,098	0,461	1,036	1,936	2,134
	III	1,245	1,063	0,678	1,057	1,923	2,120
	X ± SE	1,301 ± 0,089	1,033 ± 0,048	0,582 ± 0,064	1,104 ± 0,058	1,884 ± 0,046	2,137 ± 0,011
3	I	1,272	1,174	1,073	1,230	2,345	2,404
	II	1,067	1,265	1,216	1,049	2,283	2,315
	III	1,303	1,350	1,199	1,338	2,503	2,688
	X ± SE	1,214 ± 0,074	1,263 ± 0,051	1,163 ± 0,045	1,206 ± 0,084	2,377 ± 0,065	2,469 ± 0,112

X ± SE = Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 47.** Comparación del contenido de fibra alimentaria obtenido por el método de Asp en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FI		FS		FT	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	2,318	2,642	0,837	1,336	3,155	3,978
	II	2,112	2,501	0,901	1,538	3,013	4,039
	III	2,189	2,790	0,960	1,568	3,148	4,357
	X ± SE	2,206 ± 0,600	2,644 ± 0,083	0,899 ± 0,035	1,481 ± 0,073	3,105 ± 0,046	4,124 ± 0,118
2	I	2,762	1,870	0,804	1,014	3,566	2,882
	II	2,828	1,751	0,981	1,051	3,809	2,803
	III	2,877	1,700	0,986	0,906	3,863	2,603
	X ± SE	2,822 ± 0,033	1,773 ± 0,051	0,924 ± 0,060	0,990 ± 0,044	3,746 ± 0,091	2,763 ± 0,083
3	I	2,201	1,563	1,039	1,137	3,240	2,700
	II	2,311	1,565	0,958	1,144	3,269	2,709
	III	2,123	1,992	1,003	1,165	3,126	3,156
	X ± SE	2,211 ± 0,054	1,706 ± 0,143	0,999 ± 0,023	1,149 ± 0,008	3,211 ± 0,044	2,855 ± 0,151

X ± SE = Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla nº 48.** Comparación del contenido de la fibra alimentaria obtenido por el método de Asp en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

Nº Lote	TRAT. TERMICO	FI		FS		FT	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	1,533	1,545	0,668	1,094	2,201	2,639
	II	1,521	1,500	0,719	0,912	2,240	2,412
	III	1,522	1,394	0,766	0,842	2,288	2,236
	X ± SE	1,525 ± 0,004	1,480 ± 0,045	0,718 ± 0,028	0,949 ± 0,075	2,243 ± 0,025	2,429 ± 0,117
2	I	1,331	1,240	0,414	0,762	1,745	2,002
	II	1,085	1,249	0,462	0,787	1,547	2,037
	III	1,220	1,423	0,474	0,908	1,694	2,331
	X ± SE	1,212 ± 0,071	1,304 ± 0,059	0,450 ± 0,019	0,819 ± 0,045	1,662 ± 0,059	2,123 ± 0,104
3	I	1,546	1,354	0,597	0,756	2,143	2,111
	II	1,619	1,368	0,537	0,856	2,157	2,224
	III	1,627	1,435	0,564	0,750	2,190	2,185
	X ± SE	1,597 ± 0,026	1,386 ± 0,025	0,566 ± 0,017	0,788 ± 0,034	2,163 ± 0,014	2,173 ± 0,033

X ± SE = Valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 49.** Comparación de la distribución de fibra insoluble y de fibra soluble en la fibra alimentaria total de las hortalizas frescas y procesadas.

MUESTRA	N° Lote	FI		FS	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
ZANAHORIA	1	68,259	53,987	31,741	46,013
	2	69,055	48,339	30,892	51,661
	3	51,073	51,154	48,927	48,846
REMOLACHA	1	71,047	64,113	28,953	35,912
	2	75,334	64,169	24,666	35,831
	3	68,857	59,755	31,112	40,245
NABO	1	67,989	60,930	32,011	39,070
	2	72,924	61,423	27,076	38,577
	3	73,833	63,783	26,167	36,263

Tabla n°50. Comparación del contenido de monosacáridos neutros en la fibra alimentaria de zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	CELOBIOSA		GLUCOSA		XILOSA		GAL/RAM		ARABINOSA		MANOSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,035	0,038	0,434	0,411	0,036	0,020	0,240	0,205	0,191	0,246	0,031	0,033
	II	0,037	0,051	0,494	0,477	0,049	0,029	0,250	0,211	0,153	0,182	0,039	0,039
	III	0,040	0,041	0,418	0,346	0,047	0,025	0,250	0,208	0,159	0,214	0,030	0,035
	X ± SE	0,037 ± 0,002	0,043 ± 0,004	0,449 ± 0,023	0,411 ± 0,038	0,044 ± 0,004	0,025 ± 0,003	0,248 ± 0,003	0,208 ± 0,002	0,168 ± 0,019	0,214 ± 0,019	0,033 ± 0,002	0,036 ± 0,002
2	I	0,038	0,050	0,265	0,351	0,040	0,025	0,169	0,296	0,126	0,202	0,035	0,025
	II	0,040	0,078	0,290	0,411	0,041	0,029	0,174	0,285	0,118	0,223	0,030	0,023
	III	0,039	0,050	0,304	0,336	0,037	0,031	0,192	0,219	0,097	0,158	0,034	0,033
	X ± SE	0,039 ± 0,001	0,059 ± 0,009	0,286 ± 0,012	0,366 ± 0,023	0,039 ± 0,001	0,028 ± 0,002	0,178 ± 0,007	0,267 ± 0,024	0,113 ± 0,009	0,194 ± 0,019	0,033 ± 0,002	0,027 ± 0,003
3	I	0,096	0,038	0,533	0,309	0,050	0,056	0,225	0,229	0,211	0,264	0,047	0,020
	II	0,087	0,070	0,544	0,354	0,047	0,054	0,302	0,349	0,232	0,311	0,048	0,029
	III	0,141	0,099	0,516	0,377	0,051	0,072	0,332	0,412	0,303	0,349	0,047	0,028
	X ± SE	0,108 ± 0,017	0,069 ± 0,018	0,531 ± 0,008	0,347 ± 0,020	0,049 ± 0,001	0,061 ± 0,006	0,287 ± 0,032	0,353 ± 0,033	0,248 ± 0,028	0,308 ± 0,024	0,047 ± 0,010	0,026 ± 0,003

Tabla n°51. Comparación del contenido de monosacáridos neutros en la fibra alimentaria de remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	CELOBIOSA		GLUCOSA		XILOSA		GAL/RAM		ARABINOSA		MANOSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,069	0,096	0,453	0,647	0,042	0,058	0,095	0,108	0,467	0,562	0,044	0,056
	II	0,064	0,088	0,491	0,648	0,037	0,098	0,106	0,131	0,406	0,620	0,033	0,049
	III	0,060	0,077	0,346	0,942	0,033	0,049	0,153	0,201	0,410	0,536	0,040	0,043
	X ± SE	0,064 ± 0,003	0,087 ± 0,006	0,430 ± 0,043	0,746 ± 0,098	0,037 ± 0,003	0,069 ± 0,015	0,118 ± 0,018	0,146 ± 0,028	0,428 ± 0,020	0,573 ± 0,025	0,039 ± 0,003	0,049 ± 0,004
2	I	0,078	0,087	0,728	0,585	0,042	0,046	0,255	0,237	0,699	0,651	0,042	0,060
	II	0,071	0,084	0,646	0,644	0,038	0,061	0,237	0,167	0,680	0,632	0,044	0,061
	III	0,084	0,094	0,775	0,660	0,040	0,030	0,317	0,199	0,768	0,671	0,043	0,069
	X ± SE	0,077 ± 0,004	0,088 ± 0,003	0,716 ± 0,038	0,630 ± 0,023	0,040 ± 0,001	0,046 ± 0,090	0,270 ± 0,024	0,201 ± 0,020	0,716 ± 0,027	0,651 ± 0,011	0,043 ± 0,006	0,063 ± 0,003
3	I	0,029	0,048	0,555	0,498	0,037	0,027	0,178	0,182	0,449	0,389	0,041	0,064
	II	0,038	0,059	0,513	0,493	0,032	0,028	0,166	0,214	0,486	0,465	0,040	0,060
	III	0,051	0,061	0,525	0,481	0,029	0,023	0,129	0,216	0,520	0,502	0,054	0,074
	X ± SE	0,040 ± 0,006	0,056 ± 0,004	0,531 ± 0,013	0,491 ± 0,005	0,033 ± 0,002	0,026 ± 0,002	0,158 ± 0,015	0,204 ± 0,011	0,485 ± 0,021	0,452 ± 0,033	0,045 ± 0,005	0,066 ± 0,004

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6)

Tabla n°52. Comparación del contenido de monosacáridos neutros en la fibra alimentaria de nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	CELOBIOSA		GLUCOSA		XILOSA		GAL/RAM		ARABINOSA		MANOSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,073	0,078	0,770	0,849	0,075	0,069	0,175	0,147	0,160	0,152	0,063	0,047
	II	0,060	0,056	0,706	0,828	0,081	0,103	0,129	0,110	0,185	0,160	0,059	0,037
	III	0,058	0,046	0,687	0,782	0,099	0,122	0,165	0,130	0,156	0,147	0,063	0,054
	X ± SE	0,063 ± 0,005	0,060 ± 0,009	0,721 ± 0,025	0,820 ± 0,020	0,084 ± 0,007	0,098 ± 0,016	0,156 ± 0,014	0,129 ± 0,011	0,167 ± 0,009	0,153 ± 0,004	0,062 ± 0,002	0,045 ± 0,005
2	I	0,056	0,109	0,560	0,808	0,076	0,127	0,111	0,128	0,157	0,144	0,059	0,027
	II	0,056	0,060	0,540	0,759	0,094	0,106	0,105	0,131	0,189	0,186	0,053	0,051
	III	0,057	0,062	0,547	0,767	0,097	0,102	0,116	0,125	0,170	0,148	0,068	0,043
	X ± SE	0,056 ± 0,001	0,077 ± 0,016	0,549 ± 0,006	0,778 ± 0,015	0,089 ± 0,007	0,112 ± 0,008	0,111 ± 0,003	0,128 ± 0,002	0,172 ± 0,009	0,159 ± 0,013	0,060 ± 0,004	0,040 ± 0,007
3	I	0,087	0,123	0,875	0,926	0,103	0,099	0,211	0,173	0,191	0,170	0,079	0,101
	II	0,082	0,099	0,851	0,891	0,101	0,081	0,195	0,114	0,227	0,187	0,065	0,069
	III	0,084	0,088	0,923	0,914	0,105	0,100	0,214	0,216	0,232	0,199	0,071	0,109
	X ± SE	0,084 ± 0,001	0,103 ± 0,010	0,883 ± 0,021	0,910 ± 0,010	0,103 ± 0,001	0,093 ± 0,006	0,207 ± 0,006	0,168 ± 0,030	0,217 ± 0,013	0,185 ± 0,009	0,072 ± 0,004	0,093 ± 0,012

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 53.** Comparación del contenido de monosacáridos neutros totales en la fibra alimentaria en las tres hortalizas frescas y procesadas (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	ZANAHORIA		REMOLACHA		NABO	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,967	0,953	1,170	1,527	1,316	1,337
	II	1,025	0,989	1,137	1,634	1,220	1,293
	III	0,944	0,869	1,042	1,848	1,228	1,281
	X ± SE	0,979 ± 0,024	0,937 ± 0,036	1,116 ± 0,066	1,670 ± 0,094	1,255 ± 0,031	1,304 ± 0,017
2	I	0,672	0,948	1,846	1,666	1,019	1,343
	II	0,693	1,049	1,717	1,649	1,037	1,293
	III	0,702	0,827	2,027	1,723	1,056	1,248
	X ± SE	0,689 ± 0,009	0,941 ± 0,064	1,863 ± 0,090	1,679 ± 0,022	1,037 ± 0,010	1,295 ± 0,027
3	I	1,162	0,986	1,289	1,208	1,547	1,491
	II	1,261	1,167	1,275	1,319	1,521	1,441
	III	1,389	1,335	1,308	1,357	1,629	1,540
	X ± SE	1,271 ± 0,066	1,163 ± 0,101	1,290 ± 0,009	1,295 ± 0,045	1,565 ± 0,032	1,491 ± 0,029

Tabla n° 54. Comparación de la distribución de los monosacáridos neutros en las hortalizas frescas y procesadas.

MUESTRA	N° Lote	CELOBIOSA		GLUCOSA		XILOSA		GAL/RAM		ARABINOSA		MANOSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
ZANAHORIA	1	3,779	4,568	45,863	43,661	4,494	2,656	25,332	22,096	17,160	22,733	3,371	3,824
	2	5,669	6,260	41,570	38,835	5,669	2,970	25,872	28,330	16,424	20,585	4,797	2,865
	3	8,504	5,922	41,811	29,782	3,858	5,235	22,598	30,297	19,528	26,435	3,701	2,231
REMOLACHA	1	5,735	5,223	38,530	44,787	3,315	4,143	10,573	8,765	38,351	34,400	3,495	2,942
	2	4,133	5,244	38,433	37,536	2,147	2,741	14,493	11,976	38,433	38,788	2,308	3,754
	3	3,098	4,338	41,131	38,033	2,556	2,014	12,239	15,802	37,568	35,012	3,486	5,112
NABO	1	5,020	4,494	57,450	59,540	6,693	7,340	12,430	11,552	13,307	11,460	4,940	3,371
	2	5,400	5,940	52,941	60,019	8,582	8,640	10,704	9,874	16,586	12,266	5,786	3,086
	3	5,361	6,573	56,350	58,073	6,573	5,935	13,210	10,721	13,848	11,810	4,595	5,935

**Tabla n° 55.** Comparación del contenido de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	POLISACARIDOS CELULOSICOS		POLISACARIDOS NO CELULOSICOS		POLISACARIDOS TOTALES	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,424	0,406	0,444	0,448	0,868	0,854
	II	0,480	0,478	0,440	0,410	0,920	0,888
	III	0,414	0,350	0,434	0,429	0,847	0,779
	X ± SE	0,439 ± 0,021	0,411 ± 0,037	0,439 ± 0,003	0,429 ± 0,011	0,878 ± 0,022	0,840 ± 0,056
2	I	0,274	0,364	0,329	0,488	0,604	0,851
	II	0,299	0,444	0,323	0,499	0,622	0,943
	III	0,311	0,349	0,320	0,394	0,631	0,743
	X ± SE	0,295 ± 0,011	0,386 ± 0,029	0,324 ± 0,003	0,460 ± 0,033	0,619 ± 0,008	0,846 ± 0,058
3	I	0,571	0,314	0,474	0,568	1,045	0,882
	II	0,573	0,385	0,561	0,615	1,134	1,000
	III	0,598	0,433	0,652	0,765	1,250	1,199
	X ± SE	0,580 ± 0,009	0,378 ± 0,034	0,563 ± 0,051	0,649 ± 0,059	1,143 ± 0,059	1,027 ± 0,092

X ± SE = valor medio ± error estándar, (n=6)

**Tabla n° 56.** Comparación del contenido de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	POLISACARIDOS CELULOSICOS		POLISACARIDOS NO CELULOSICOS		POLISACARIDOS TOTALES	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,474	0,673	0,573	0,693	1,047	1,366
	II	0,503	0,667	0,514	0,794	1,017	1,461
	III	0,369	0,921	0,564	0,735	0,933	1,656
	X ± SE	0,449 ± 0,041	0,754 ± 0,084	0,550 ± 0,018	0,741 ± 0,029	0,999 ± 0,034	1,494 ± 0,085
2	I	0,730	0,609	0,921	0,880	1,650	1,489
	II	0,650	0,660	0,885	0,824	1,535	1,484
	III	0,778	0,683	1,034	0,858	1,812	1,541
	X ± SE	0,719 ± 0,037	0,651 ± 0,022	0,947 ± 0,045	0,854 ± 0,016	1,666 ± 0,080	1,505 ± 0,018
3	I	0,527	0,506	0,624	0,588	1,152	1,094
	II	0,498	0,500	0,641	0,681	1,139	1,181
	III	0,520	0,479	0,648	0,724	1,168	1,203
	X ± SE	0,515 ± 0,009	0,495 ± 0,008	0,638 ± 0,007	0,664 ± 0,040	1,153 ± 0,008	1,159 ± 0,033

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 57. Comparación del contenido de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).**

N° Lote	TRAT. TERMICO	POLISACARIDOS CELULOSICOS		POLISACARIDOS NO CELULOSICOS		POLISACARIDOS TOTALES	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,762	0,837	0,412	0,365	1,174	1,203
	II	0,689	0,798	0,403	0,363	1,092	1,162
	III	0,674	0,748	0,439	0,402	1,113	1,150
	X ± SE	0,708 ± 0,027	0,795 ± 0,026	0,418 ± 0,011	0,377 ± 0,013	1,126 ± 0,025	1,171 ± 0,016
2	I	0,557	0,831	0,359	0,378	0,916	1,209
	II	0,539	0,741	0,391	0,420	0,930	1,161
	III	0,547	0,749	0,400	0,372	0,947	1,121
	X ± SE	0,548 ± 0,005	0,774 ± 0,029	0,383 ± 0,013	0,390 ± 0,015	0,931 ± 0,009	1,164 ± 0,025
3	I	0,870	0,951	0,520	0,483	1,390	1,433
	II	0,844	0,896	0,522	0,399	1,367	1,295
	III	0,910	0,918	0,553	0,556	1,463	1,474
	X ± SE	0,875 ± 0,019	0,922 ± 0,016	0,532 ± 0,011	0,480 ± 0,045	1,407 ± 0,029	1,400 ± 0,054

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 58.** Comparación de la distribución de celobiosa y glucosa en el total de polisacáridos celulósicos en las tres hortalizas frescas y procesadas.

MUESTRA	N° Lote	CELOBIOSA		GLUCOSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
ZANAHORIA	1	7,973	9,993	92,023	90,182
	2	12,576	14,617	87,424	85,875
	3	17,586	17,339	82,414	82,841
REMOLACHA	1	13,586	11,051	86,414	89,666
	2	11,184	12,854	88,816	86,821
	3	7,282	10,746	92,718	89,258
NABO	1	8,505	7,130	91,495	92,640
	2	9,745	9,500	90,255	90,752
	3	9,131	10,676	90,869	89,965

Tabla n° 59. Comparación de la distribución de los monosacáridos neutros en el total de polisacáridos no celulósicos en las hortalizas frescas y procesadas.

MUESTRA	N° Lote	XILOSA		GAL/RAM		ARABINOSA		MANOSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
ZANAHORIA	1	8,815	5,042	50,800	43,450	33,713	43,682	6,834	7,435
	2	10,710	5,401	49,383	51,852	30,864	36,945	6,834	5,833
	3	7,738	7,982	45,907	47,531	38,970	40,506	7,651	3,438
REMOLACHA	1	6,022	8,143	19,343	17,827	68,613	68,058	6,387	5,941
	2	3,696	4,882	25,660	18,215	66,526	69,583	4,118	6,922
	3	4,545	3,461	22,257	27,686	66,928	59,887	6,270	8,577
NABO	1	17,986	22,685	33,813	30,600	35,252	35,611	13,189	10,551
	2	20,365	25,075	26,110	29,425	39,426	35,822	14,099	9,212
	3	17,105	17,110	34,962	31,505	35,902	34,009	12,030	17,526

Factor de transformación de monosacáridos en polisacáridos: Pentosas - 0,88; Hexosas - 0,90,

**Tabla n° 60.** Comparación del contenido de sustancias pécticas, expresado en ácido galacturónico, en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,522	0,489
	II	0,565	0,457
	III	0,566	0,466
	X ± SE	0,551 ± 0,015	0,471 ± 0,010
2	I	0,555	0,438
	II	0,477	0,410
	III	0,512	0,428
	X ± SE	0,514 ± 0,022	0,425 ± 0,008
3	I	0,610	0,381
	II	0,523	0,310
	III	0,579	0,351
	X ± SE	0,571 ± 0,026	0,347 ± 0,020

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 61.** Comparación del contenido de sustancias pécticas, expresado en ácido galacturónico, en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,406	0,337
	II	0,355	0,301
	III	0,365	0,338
	X ± SE	0,375 ± 0,016	0,325 ± 0,012
2	I	0,492	0,288
	II	0,498	0,290
	III	0,495	0,348
	X ± SE	0,495 ± 0,002	0,309 ± 0,020
3	I	0,311	0,295
	II	0,322	0,226
	III	0,362	0,301
	X ± SE	0,332 ± 0,015	0,274 ± 0,024

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 62.** Comparación del contenido de sustancias pécticas, expresado en ácido galacturónico, en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,366	0,282
	II	0,342	0,223
	III	0,368	0,262
	X ± SE	0,359 ± 0,008	0,256 ± 0,017
2	I	0,311	0,260
	II	0,312	0,240
	III	0,329	0,270
	X ± SE	0,317 ± 0,006	0,257 ± 0,009
3	I	0,360	0,254
	II	0,338	0,237
	III	0,327	0,220
	X ± SE	0,342 ± 0,010	0,237 ± 0,010

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 63.** Comparación del contenido de polisacáridos no almidón (NSP) en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	NSP	
		FRESCO	PROCESADO
1	I	1,338	1,294
	II	1,429	1,299
	III	1,357	1,198
	X ± SE	1,374 ± 0,028	1,264 ± 0,033
2	I	1,103	1,246
	II	1,051	1,312
	III	1,092	1,128
	X ± SE	1,082 ± 0,016	1,229 ± 0,054
3	I	1,595	1,225
	II	1,604	1,279
	III	1,771	1,515
	X ± SE	1,657 ± 0,057	1,340 ± 0,089

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 64.** Comparación del contenido de polisacáridos no almidón (NSP) en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	NSP	
		FRESCO	PROCESADO
1	I	1,413	1,669
	II	1,336	1,912
	III	1,261	1,960
	X ± SE	1,337 ± 0,044	1,847 ± 0,090
2	I	2,093	1,748
	II	1,983	1,745
	III	2,258	1,855
	X ± SE	2,111 ± 0,080	1,783 ± 0,036
3	I	1,432	1,359
	II	1,430	1,384
	III	1,494	1,474
	X ± SE	1,452 ± 0,021	1,406 ± 0,035

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 65.** Comparación del contenido de polisacáridos no almidón (NSP) en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	NSP	
		FRESCO	PROCESADO
1	I	1,503	1,456
	II	1,400	1,362
	III	1,444	1,386
	X ± SE	1,449 ± 0,030	1,401 ± 0,028
2	I	1,196	1,443
	II	1,211	1,377
	III	1,244	1,364
	X ± SE	1,217 ± 0,014	1,395 ± 0,024
3	I	1,715	1,662
	II	1,671	1,508
	III	1,758	1,672
	X ± SE	1,715 ± 0,025	1,614 ± 0,053

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6)

**Tabla n° 66.** Comparación del contenido de fibra alimentaria total calculada por distintos métodos en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FND + SP		FI + SP		FI + FS	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	2,150	2,057	1,819	1,753	1,958	2,349
	II	2,200	1,852	1,610	1,552	1,697	2,166
	III	2,548	1,682	1,789	1,764	1,807	2,521
	X ± SE	2,300 ± 0,125	1,864 ± 0,108	1,739 ± 0,065	1,689 ± 0,069	1,821 ± 0,075	2,345 ± 0,103
2	I	2,442	1,849	1,684	1,334	1,793	2,159
	II	2,336	1,916	1,905	1,467	1,936	2,134
	III	2,358	1,886	1,706	1,448	1,923	2,120
	X ± SE	2,379 ± 0,032	1,884 ± 0,019	1,765 ± 0,070	1,416 ± 0,04	1,884 ± 0,046	2,137 ± 0,011
3	I	2,531	1,919	1,821	1,517	2,345	2,404
	II	2,903	1,824	1,538	1,545	2,283	2,315
	III	2,712	1,763	1,824	1,666	2,503	2,688
	X ± SE	2,715 ± 0,108	1,835 ± 0,045	1,728 ± 0,095	1,576 ± 0,046	2,377 ± 0,065	2,469 ± 0,112

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6).

**Tabla nº 67.** Comparación del contenido de fibra alimentaria total calculada por distintos métodos en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

Nº Lote	TRAT. TERMICO	FND + SP		FI + SP		FI + FS	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	2,357	2,453	2,684	2,945	3,155	3,978
	II	2,311	2,394	2,432	2,771	3,013	4,039
	III	2,402	3,161	2,517	3,093	3,148	4,357
	X ± SE	2,357 ± 0,026	2,669 ± 0,246	2,544 ± 0,074	2,936 ± 0,093	3,105 ± 0,046	4,125 ± 0,118
2	I	3,128	2,111	3,205	2,128	3,566	2,882
	II	3,127	2,066	3,277	2,012	3,809	2,803
	III	3,293	2,138	3,323	2,011	3,862	2,603
	X ± SE	3,183 ± 0,055	2,105 ± 0,021	3,268 ± 0,034	2,050 ± 0,039	3,746 ± 0,091	2,763 ± 0,083
3	I	2,440	1,947	2,481	1,828	3,239	2,700
	II	2,398	1,781	2,600	1,768	3,269	2,709
	III	2,458	1,879	2,448	2,262	3,126	3,156
	X ± SE	2,432 ± 0,018	1,869 ± 0,048	2,510 ± 0,046	1,953 ± 0,156	3,211 ± 0,044	2,855 ± 0,151

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6).

**Tabla n° 68.** Comparación del contenido de fibra alimentaria total calculada por distintos métodos en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FND + SP		FI + SP		FI + FS	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	2,106	2,112	1,862	1,798	2,201	2,639
	II	2,145	1,973	1,829	1,700	2,240	2,412
	III	2,151	2,182	1,853	1,630	2,288	2,236
	X ± SE	2,134 ± 0,014	2,089 ± 0,062	1,848 ± 0,009	1,709 ± 0,049	2,243 ± 0,025	2,429 ± 0,117
2	I	1,768	2,152	1,611	1,474	1,745	2,002
	II	1,649	1,908	1,366	1,465	1,547	2,037
	III	1,676	1,915	1,516	1,665	1,694	2,331
	X ± SE	1,698 ± 0,036	1,992 ± 0,080	1,498 ± 0,071	1,535 ± 0,065	1,662 ± 0,059	2,123 ± 0,014
3	I	2,267	1,613	1,871	1,583	2,143	2,111
	II	2,109	1,720	1,924	1,581	2,157	2,224
	III	2,201	1,630	1,921	1,633	2,190	2,185
	X ± SE	2,192 ± 0,046	1,654 ± 0,033	1,905 ± 0,017	1,599 ± 0,017	2,163 ± 0,014	2,173 ± 0,033

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6).

**Tabla n° 69.** Comparación del contenido de azúcares solubles obtenido por HPLC en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FRUCTOSA		GLUCOSA		SACAROSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,631	0,518	0,933	0,709	2,665	1,805
	II	0,689	0,444	0,967	0,525	3,006	1,237
	III	0,661	0,461	1,046	0,669	3,029	1,854
	X ± SE	0,661 ± 0,017	0,474 ± 0,023	0,982 ± 0,033	0,634 ± 0,056	2,900 ± 0,118	1,965 ± 0,136
2	I	0,923	0,574	1,122	0,628	2,524	1,737
	II	0,954	0,738	1,295	0,886	2,397	1,656
	III	1,087	0,583	1,342	0,757	2,511	1,500
	X ± SE	0,998 ± 0,050	0,632 ± 0,053	1,253 ± 0,067	0,757 ± 0,075	2,477 ± 0,040	1,631 ± 0,070
3	I	1,120	0,421	1,400	0,679	3,147	1,685
	II	1,170	0,383	1,525	0,557	3,131	1,711
	III	1,034	0,663	1,383	0,798	3,059	1,515
	X ± SE	1,108 ± 0,040	0,489 ± 0,087	1,436 ± 0,045	0,678 ± 0,070	3,112 ± 0,027	1,637 ± 0,061

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla nº 70.** Comparación del contenido de azúcares solubles obtenido por HPLC en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

Nº Lote	TRAT. TERMICO	FRUCTOSA		GLUCOSA		SACAROSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	0,169	0,098	0,414	0,328	4,759	4,205
	II	0,155	0,133	0,342	0,233	5,445	4,264
	III	0,200	0,146	0,280	0,231	4,988	4,438
	X ± SE	0,173 ± 0,012	0,126 ± 0,014	0,345 ± 0,039	0,264 ± 0,032	5,064 ± 0,202	4,302 ± 0,070
2	I	0,114	0,062	0,585	0,172	8,296	4,190
	II	0,139	0,069	0,731	0,279	8,754	4,108
	III	0,151	0,077	0,682	0,323	7,845	3,838
	X ± SE	0,134 ± 0,011	0,069 ± 0,005	0,666 ± 0,043	0,258 ± 0,045	8,298 ± 0,262	4,045 ± 0,106
3	I	0,077	0,061	0,453	0,243	6,700	4,375
	II	0,089	0,057	0,463	0,221	7,028	4,107
	III	0,057	0,033	0,442	0,308	6,300	4,441
	X ± SE	0,075 ± 0,010	0,050 ± 0,009	0,453 ± 0,006	0,257 ± 0,026	6,676 ± 0,211	4,307 ± 0,102

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla nº 71.** Comparación del contenido de azúcares solubles obtenido por HPLC en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

Nº Lote	TRAT. TERMICO	FRUCTOSA		GLUCOSA		SACAROSA	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	1,560	0,860	1,424	0,870	0,289	0,087
	II	1,488	0,943	1,488	1,153	0,264	0,066
	III	1,691	0,947	1,407	1,200	0,213	0,072
	X ± SE	1,580 ± 0,059	0,916 ± 0,028	1,440 ± 0,025	1,074 ± 0,103	0,255 ± 0,022	0,075 ± 0,006
2	I	0,937	0,491	1,289	0,769	0,157	0,079
	II	0,902	0,503	1,307	0,710	0,179	0,113
	III	0,901	0,502	1,293	0,647	0,166	0,116
	X ± SE	0,914 ± 0,012	0,499 ± 0,004	1,296 ± 0,005	0,709 ± 0,035	0,167 ± 0,006	0,103 ± 0,012
3	I	0,810	0,580	1,525	1,155	0,186	0,086
	II	0,801	0,594	1,411	1,123	0,196	0,103
	III	0,843	0,722	1,551	1,260	0,201	0,092
	X ± SE	0,818 ± 0,013	0,632 ± 0,045	1,496 ± 0,043	1,179 ± 0,042	0,194 ± 0,004	0,094 ± 0,005

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6),

**Tabla n° 72.** Comparación del contenido de azúcares solubles obtenido por el método de ferricianuro potásico y por HPLC en zanahoria fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FERRICIANURO POTASICO		HPLC	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	4,999	3,393	4,229	3,032
	II	5,199	3,546	4,662	3,205
	III	5,024	3,671	4,736	2,983
	X ± SE	5,074 ± 0,063	3,537 ± 0,081	4,542 ± 0,158	3,073 ± 0,067
2	I	4,402	2,766	4,569	2,939
	II	4,365	2,887	4,646	3,281
	III	4,344	2,850	4,940	2,840
	X ± SE	4,370 ± 0,017	2,834 ± 0,036	4,719 ± 0,113	3,020 ± 0,133
3	I	5,179	2,743	5,666	2,785
	II	5,240	2,677	5,825	2,651
	III	5,209	2,696	5,476	2,975
	X ± SE	5,209 ± 0,018	2,705 ± 0,020	5,656 ± 0,101	2,804 ± 0,094

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6).

**Tabla n° 73.** Comparación del contenido de azúcares solubles obtenido por el método de ferricianuro potásico y por HPLC en remolacha fresca y procesada (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FERRICIANURO POTASICO		HPLC	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	5,402	5,008	5,342	4,631
	II	5,084	4,514	5,942	4,631
	III	5,210	4,491	5,464	4,814
	X ± SE	5,232 ± 0,092	4,671 ± 0,170	5,582 ± 0,183	4,692 ± 0,061
2	I	9,290	4,104	8,994	4,423
	II	8,688	3,874	9,623	4,456
	III	9,055	3,851	8,678	4,238
	X ± SE	9,011 ± 0,175	3,943 ± 0,081	9,098 ± 0,278	4,372 ± 0,068
3	I	7,275	6,653	7,230	4,679
	II	7,219	4,510	7,580	4,384
	III	7,066	4,424	6,799	4,782
	X ± SE	7,186 ± 0,063	5,196 ± 0,729	7,203 ± 0,226	4,615 ± 0,119

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6).

**Tabla n° 74.** Comparación del contenido de azúcares solubles obtenido por el método de ferricianuro potásico y por HPLC en nabo fresco y procesado (g/100 g materia húmeda).

N° Lote	TRAT. TERMICO	FERRICIANURO POTASICO		HPLC	
		FRESCO	PROCESADO	FRESCO	PROCESADO
1	I	3,309	2,477	3,273	1,816
	II	3,460	2,027	3,240	2,162
	III	3,450	2,057	3,311	2,218
	X ± SE	3,406 ± 0,049	2,187 ± 0,145	3,275 ± 0,021	2,065 ± 0,126
2	I	2,087	1,218	2,383	1,339
	II	2,170	1,384	2,388	1,326
	III	2,063	1,202	2,360	1,265
	X ± SE	2,107 ± 0,032	1,268 ± 0,058	2,377 ± 0,009	1,310 ± 0,023
3	I	2,395	1,484	2,521	1,822
	II	2,259	1,980	2,408	1,820
	III	2,268	1,664	2,595	2,074
	X ± SE	2,431 ± 0,111	1,709 ± 0,145	2,508 ± 0,054	1,905 ± 0,085

X ± SE = valor medio ± error estándar (n=6).

**Tabla n° 75. Retenciones calculadas para los resultados obtenidos por métodos gravimétricos y para sustancias pécticas de las tres hortalizas.**

		<b>FAD</b>	<b>FND</b>	<b>FI</b>	<b>FS</b>	<b>SP</b>
<b>ZANAHORIA</b>	X	92,259	76,380	95,517	162,027	76,411
	SE	8,276	3,447	7,949	28,972	7,857
	CV	15,538	7,816	14,414	30,972	17,810
<b>REMOLACHA</b>	X	79,662	86,769	86,790	129,307	77,297
	SE	7,351	15,561	17,108	17,724	7,560
	CV	15,983	31,064	34,143	23,742	16,941
<b>NABO</b>	X	94,293	101,332	97,293	151,723	73,777
	SE	9,488	13,876	6,277	15,237	3,581
	CV	17,430	23,718	11,176	17,395	8,406

X = valor medio; SE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

**Tabla n° 76. Retenciones calculadas para monosacáridos correspondientes a fibra alimentaria de las tres hortalizas.**

		<b>CELOBIOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>XILOSA</b>	<b>GAL/RAM</b>	<b>ARABINOSA</b>	<b>MANOSA</b>
<b>ZANAHORIA</b>	X	110,441	94,983	83,667	119,840	140,987	81,202
	SE	25,623	18,236	20,075	19,423	14,891	15,453
	CV	40,185	33,255	41,560	27,990	18,295	32,963
<b>REMOLACHA</b>	X	131,903	121,077	124,957	110,380	106,232	140,927
	SE	9,616	30,658	30,773	17,731	14,191	6,589
	CV	12,627	43,859	42,656	27,823	23,138	8,100
<b>NABO</b>	X	115,813	119,553	110,997	93,033	90,009	89,933
	SE	12,638	11,484	11,029	11,476	2,149	19,648
	CV	18,901	16,638	17,211	21,367	4,135	37,843

X = valor medio; SE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

**Tabla n° 77. Retenciones calculadas para polisacáridos correspondientes a fibra alimentaria de las tres hortalizas.**

		<b>POLISACARIDOS CELULOSICOS</b>	<b>POLISACARIDOS NO CELULOSICOS</b>	<b>POLISACARIDOS TOTALES</b>
<b>ZANAHORIA</b>	X	96,433	118,423	107,293
	SE	19,213	12,875	14,834
	CV	34,510	18,831	23,948
<b>REMOLACHA</b>	X	120,610	109,953	114,152
	SE	27,098	13,232	18,767
	CV	38,916	20,844	28,477
<b>NABO</b>	X	119,520	93,977	109,553
	SE	10,999	3,962	7,868
	CV	15,940	7,302	12,441

X = valor medio; SE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

**Tabla nº 78. Retenciones calculadas para los valores de fibra total de las tres hortalizas.**

		<b>FND + SP</b>	<b>FI + SP</b>	<b>FI + FS</b>	<b>NSP</b>
<b>ZANAHORIA</b>	X	76,362	89,731	115,480	95,452
	SE	4,308	4,936	7,353	9,687
	CV	9,772	9,527	11,029	17,578
<b>REMOLACHA</b>	X	85,363	84,437	98,617	106,743
	SE	14,202	15,668	17,664	16,455
	CV	28,817	32,141	31,025	26,702
<b>NABO</b>	X	96,907	93,093	112,298	101,823
	SE	12,030	5,473	8,181	6,467
	CV	21,503	10,182	12,619	11,001

X = valor medio; SE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

**Tabla n° 79. Retenciones calculadas para los azúcares solubles de las tres hortalizas.**

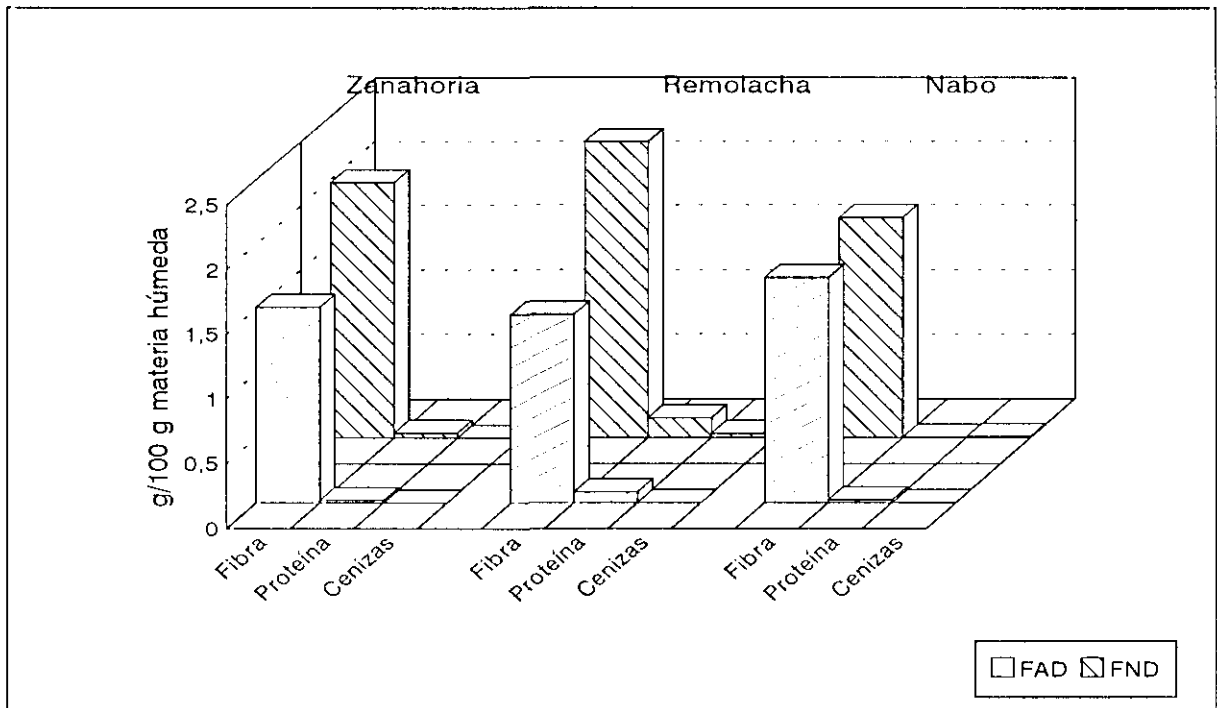
		<b>FRUCTOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>SACAROSA</b>
<b>ZANAHORIA</b>	X	60,433	57,529	58,383
	SE	8,117	5,145	3,933
	CV	23,264	15,490	11,669
<b>REMOLACHA</b>	X	63,663	57,317	66,247
	SE	6,183	11,060	10,540
	CV	16,821	33,423	27,560
<b>NABO</b>	X	63,313	69,387	46,312
	SE	6,988	7,459	9,134
	CV	19,118	18,619	34,162

X = valor medio; SE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación

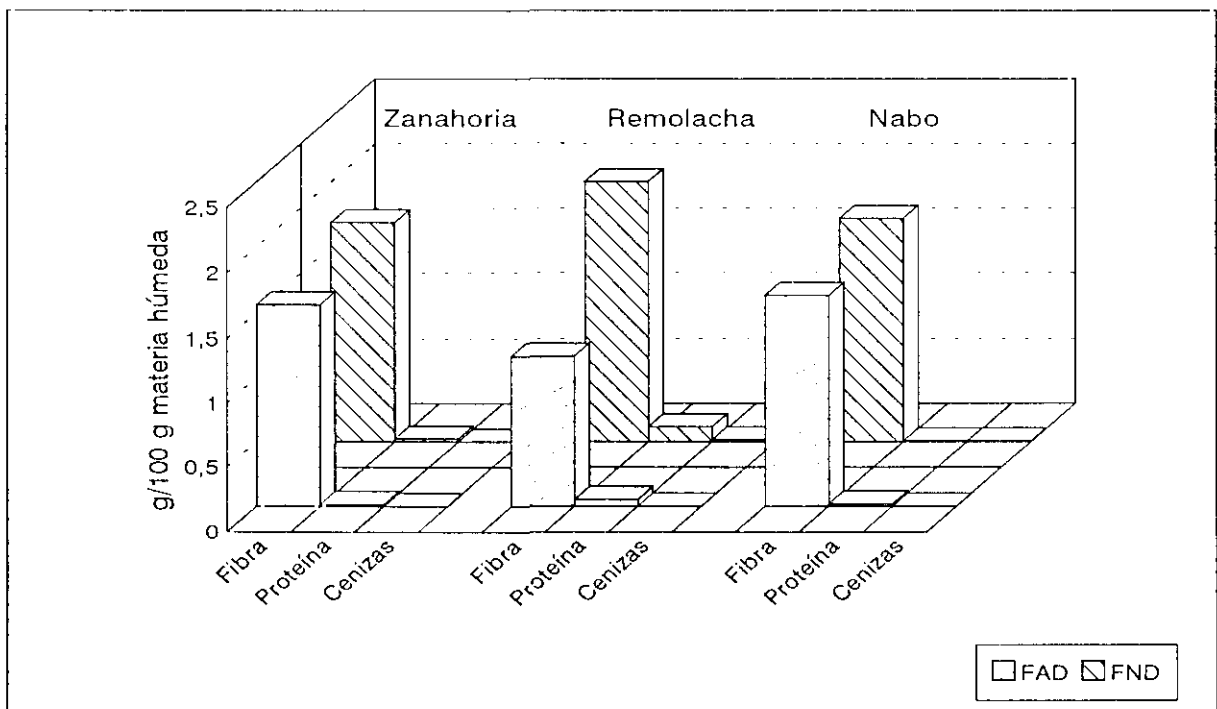
**Tabla n° 80. Retenciones calculadas para azúcares solubles totales de las tres hortalizas.**

		<b>AZUCARES SOLUBLES TOTALES (Ferricianuro potásico)</b>	<b>AZUCARES SOLUBLES TOTALES (HPLC)</b>
<b>ZANAHORIA</b>	X	62,173	60,537
	SE	5,305	5,541
	CV	14,780	15,851
<b>REMOLACHA</b>	X	68,393	65,551
	SE	13,258	10,449
	CV	33,578	27,611
<b>NABO</b>	X	66,271	64,703
	SE	4,210	6,065
	CV	11,003	16,237

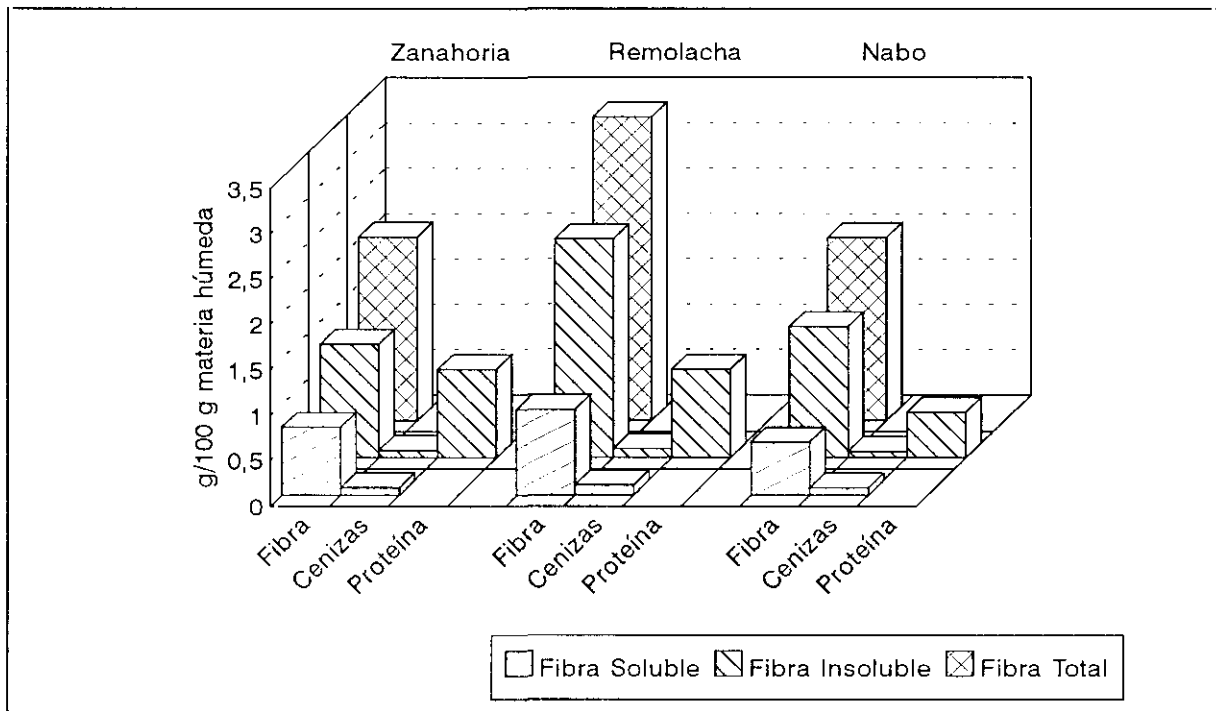
X = valor medio; SE = desviación estándar; CV = coeficiente de variación



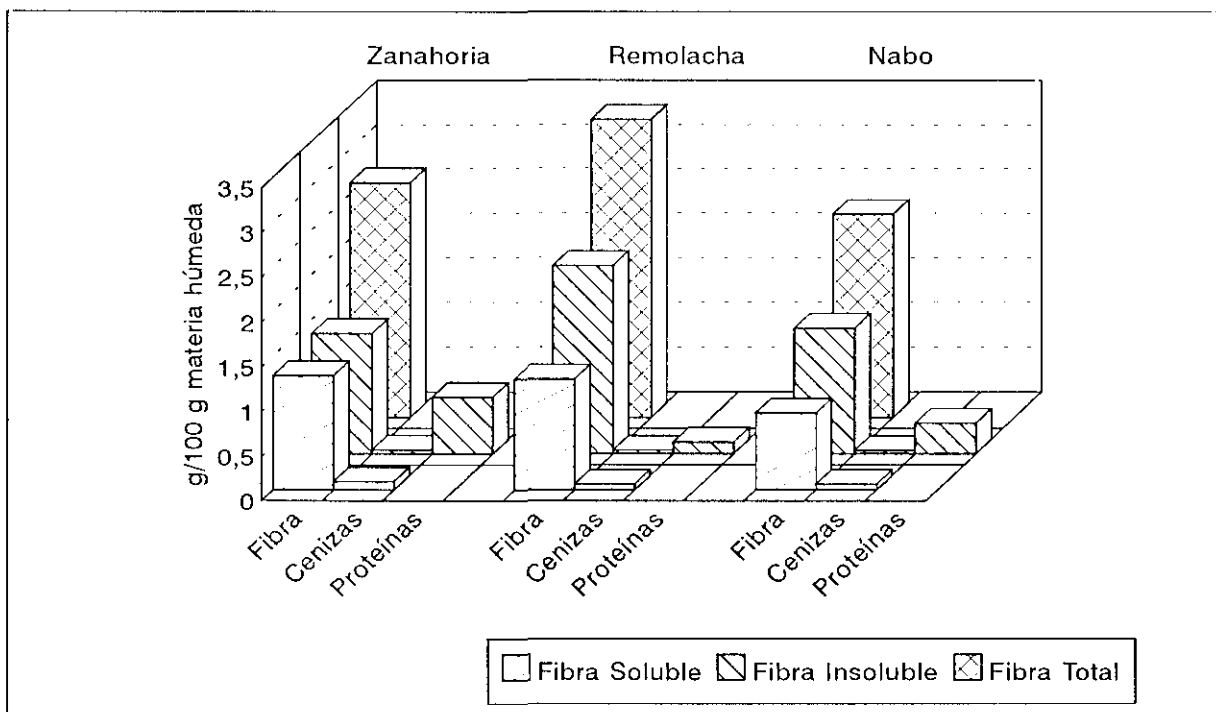
**Gráfico n° 1. Comparación de los valores obtenidos según los métodos detergentes en las tres hortalizas frescas.**



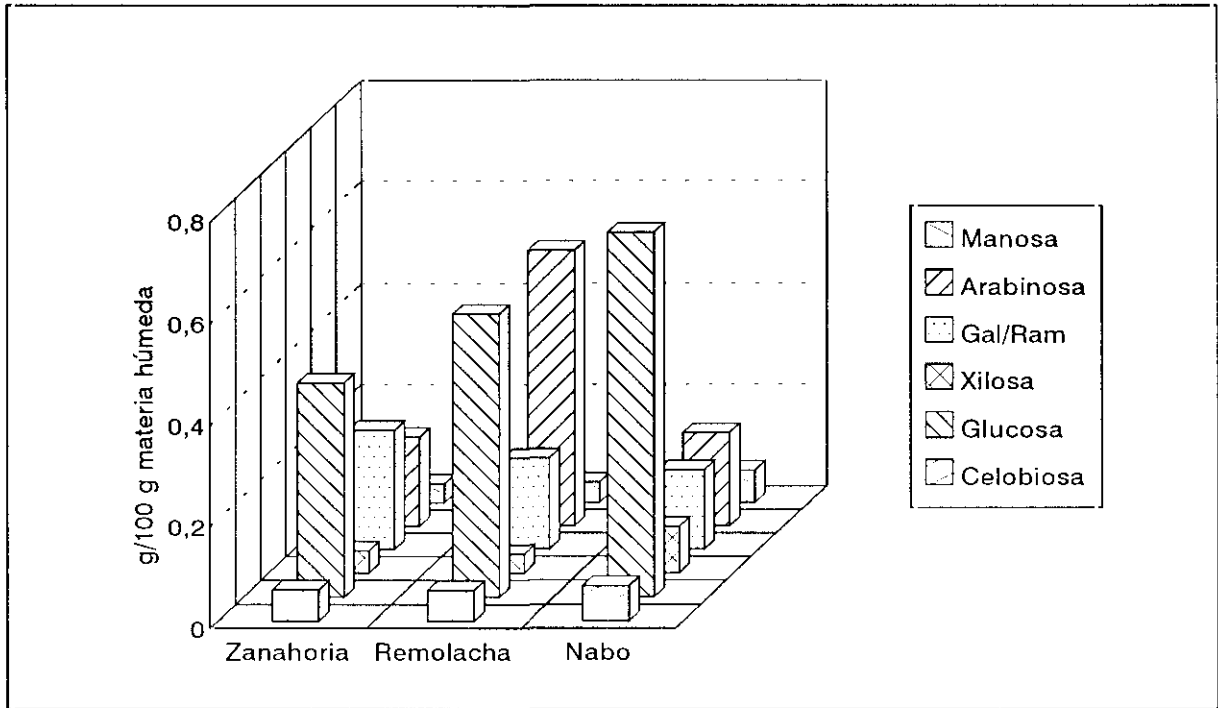
**Gráfico n° 2. Comparación de los valores obtenidos según los métodos detergentes en las tres hortalizas procesadas.**



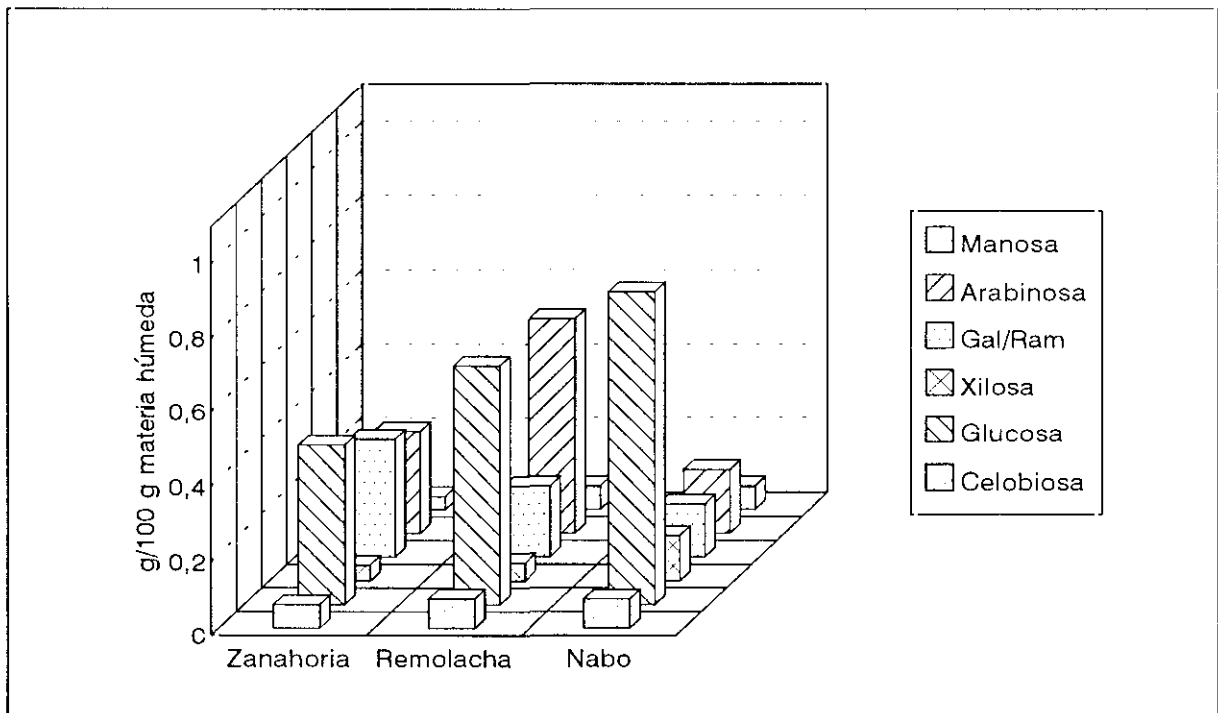
**Gráfico n° 3. Comparación de los valores obtenidos según el método de Asp en las tres hortalizas frescas.**



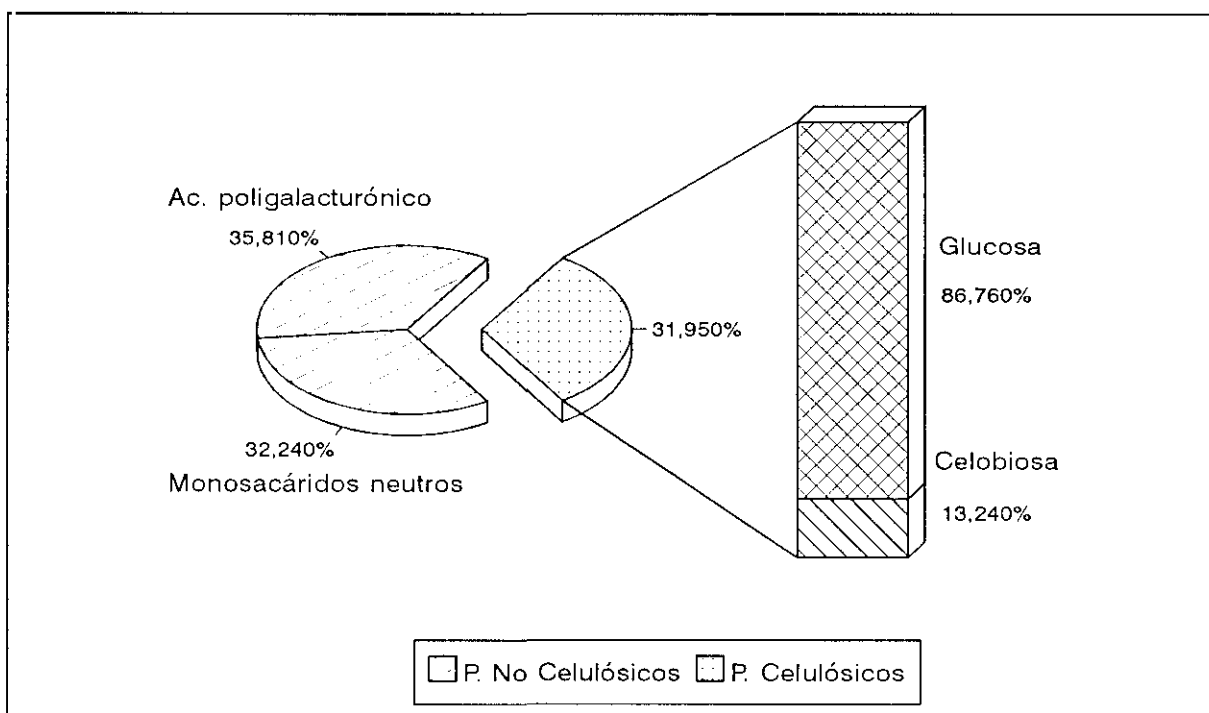
**Gráfico n° 4. Comparación de los valores obtenidos según el método de Asp en las tres hortalizas procesadas.**



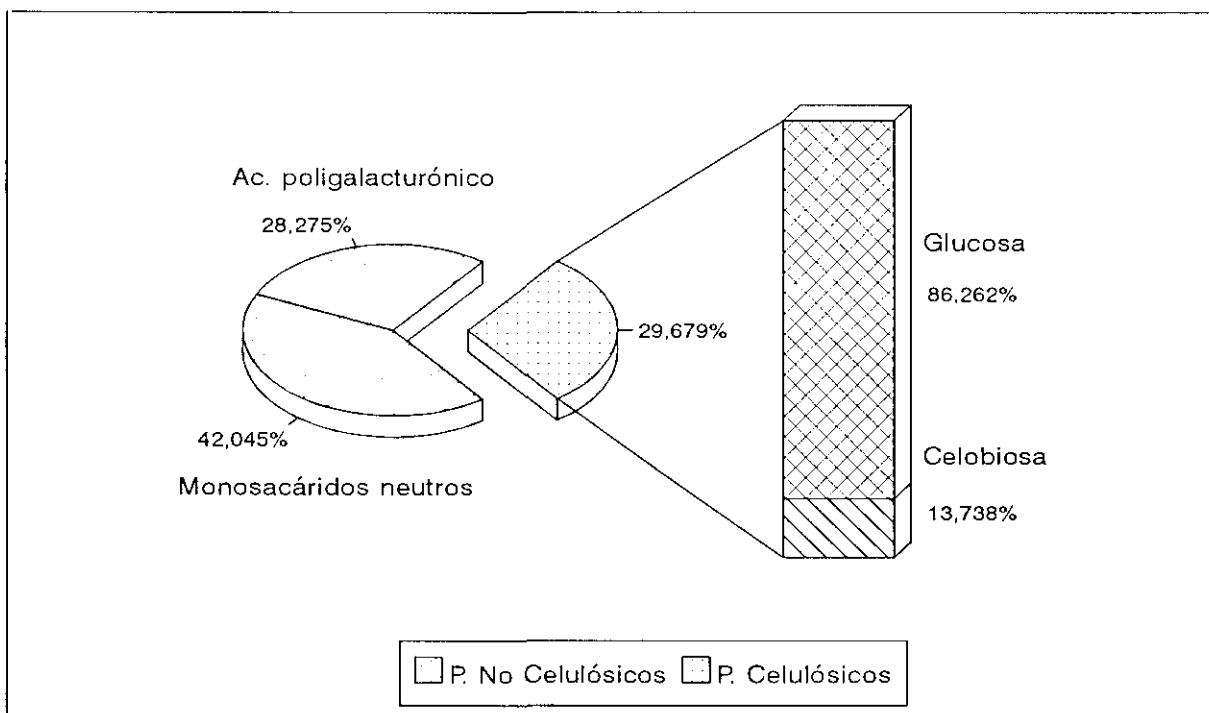
**Gráfico nº 5. Comparación de los monosacáridos procedentes de la fibra alimentaria en las tres hortalizas frescas.**



**Gráfico nº 6. Comparación de monosacáridos procedentes de la fibra alimentaria en las tres hortalizas procesadas.**



**Gráfico nº 7. Proporción de polisacáridos no celulósicos y celulósicos en zanahoria fresca. Composición porcentual de p. celulósicos.**



**Gráfico nº 8. Proporción de polisacáridos no celulósicos y celulósicos en zanahoria procesada. Composición porcentual de p. celulósicos.**

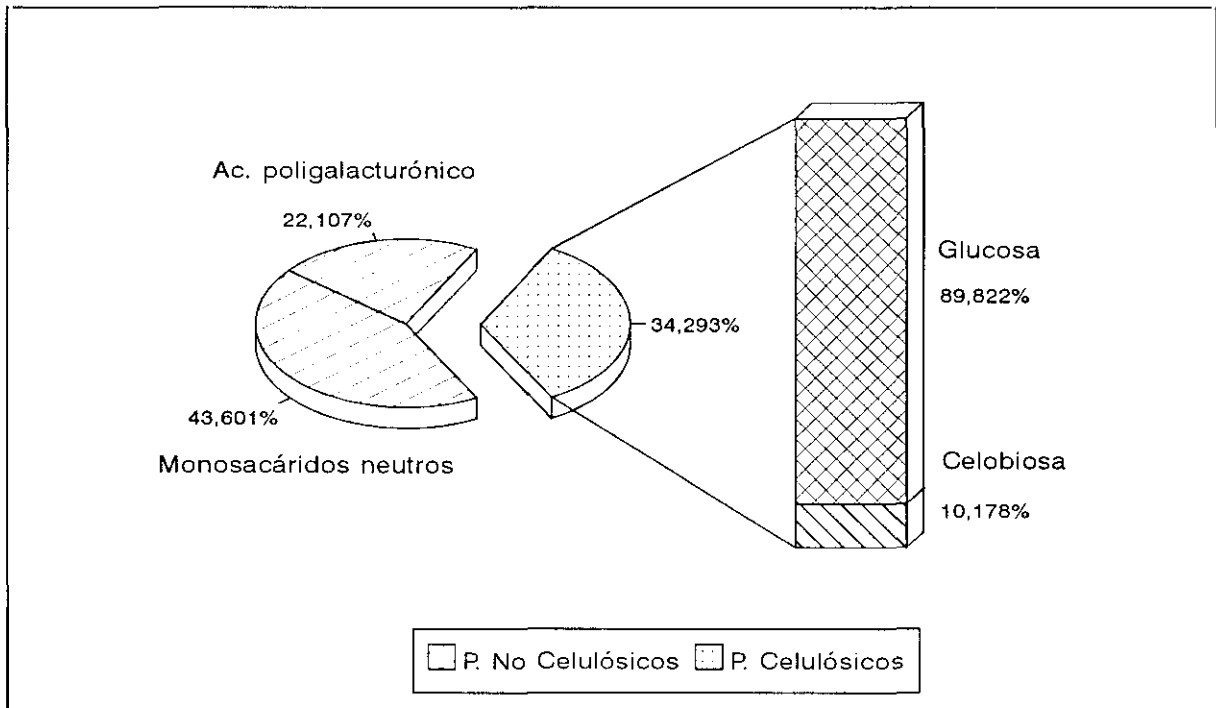


Gráfico n° 9. Proporción de polisacáridos no celulósicos y celulósicos en remolacha fresca. Composición porcentual de p. celulósicos.

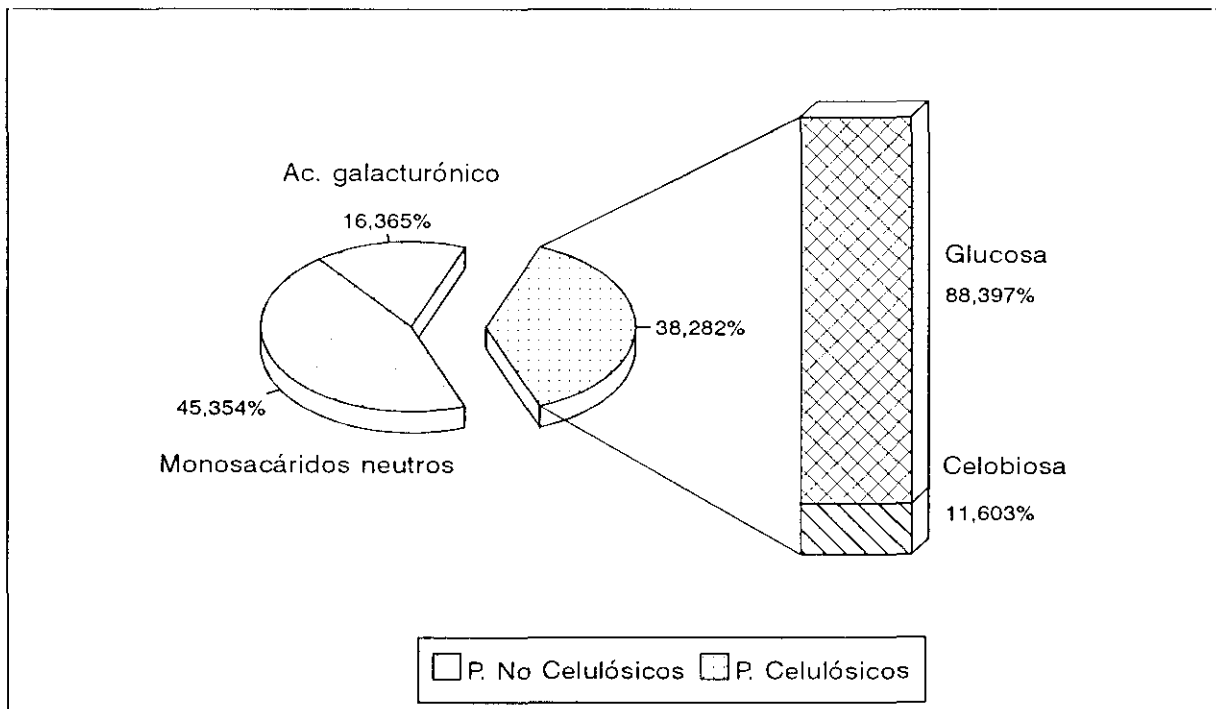
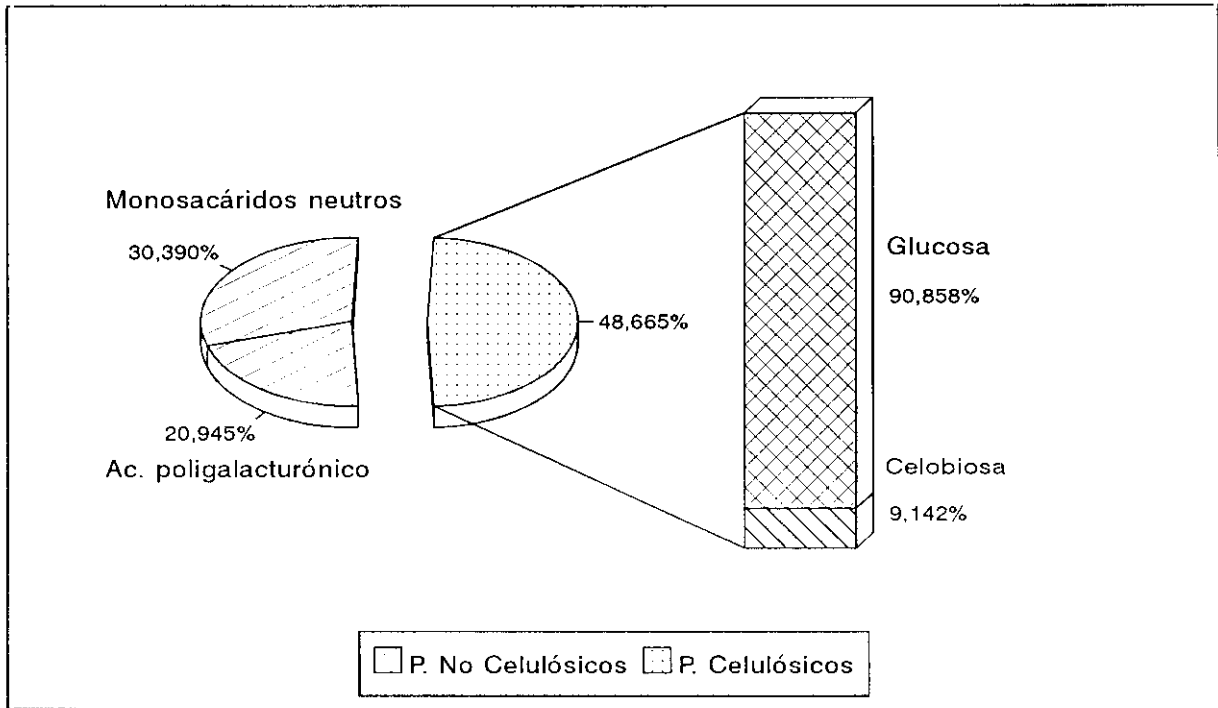
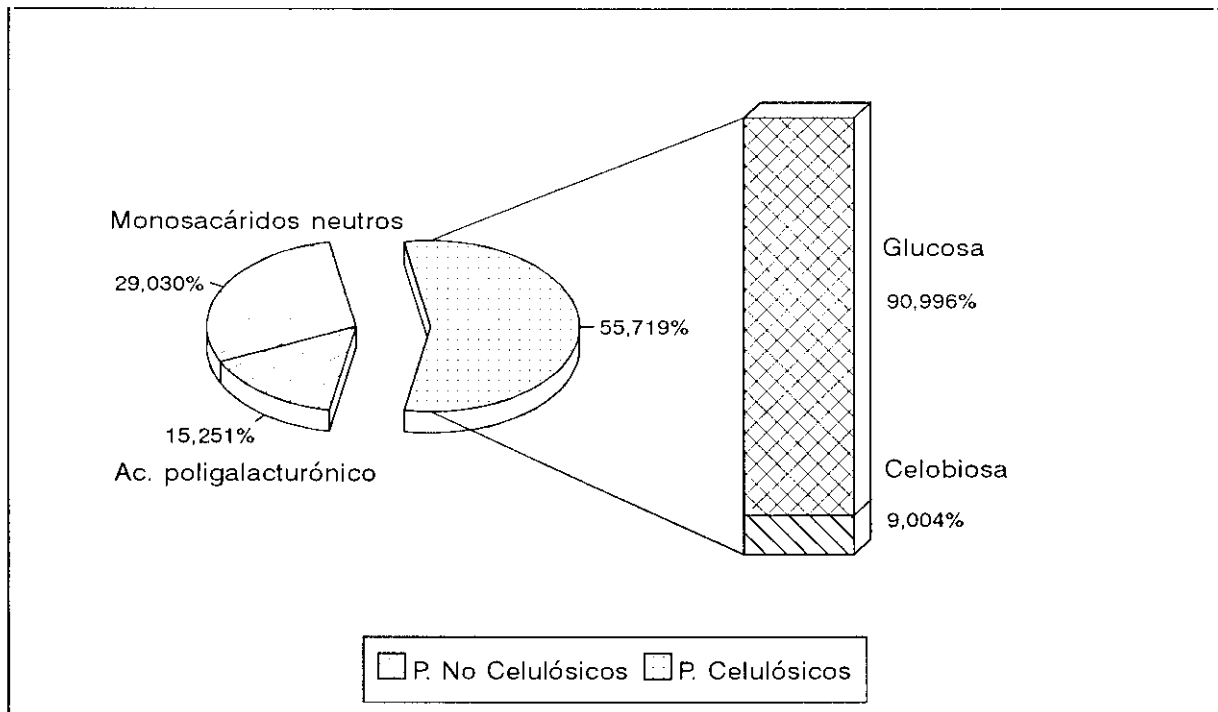


Gráfico n° 10. Proporción de polisacáridos no celulósicos y celulósicos en remolacha procesada. Composición porcentual de p. celulósicos.



**Gráfico nº 11. Proporción de polisacáridos no celulósicos y celulósicos en nabo fresco. Composición porcentual de p. celulósicos.**



**Gráfico nº 12. Proporción de polisacáridos no celulósicos y celulósicos en nabo procesado. Composición porcentual de p. celulósicos.**

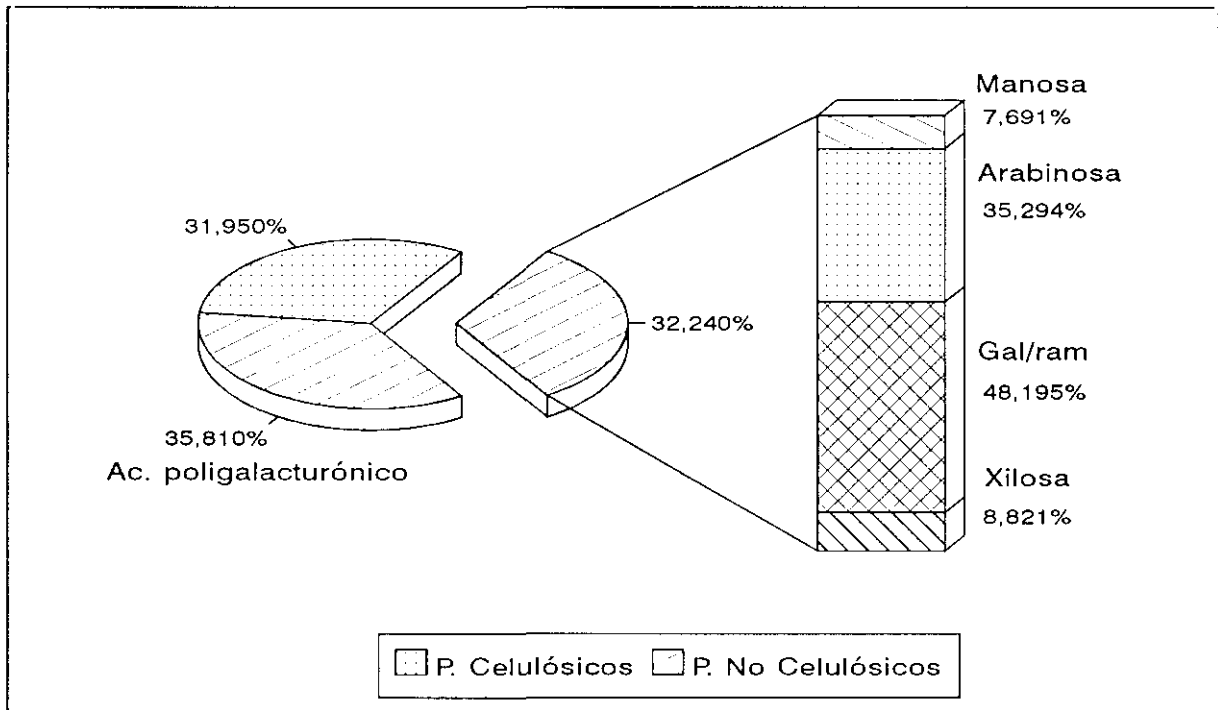


Gráfico nº 13. Proporción de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en zanahoria fresca. Composición porcentual de p. no celulósicos.

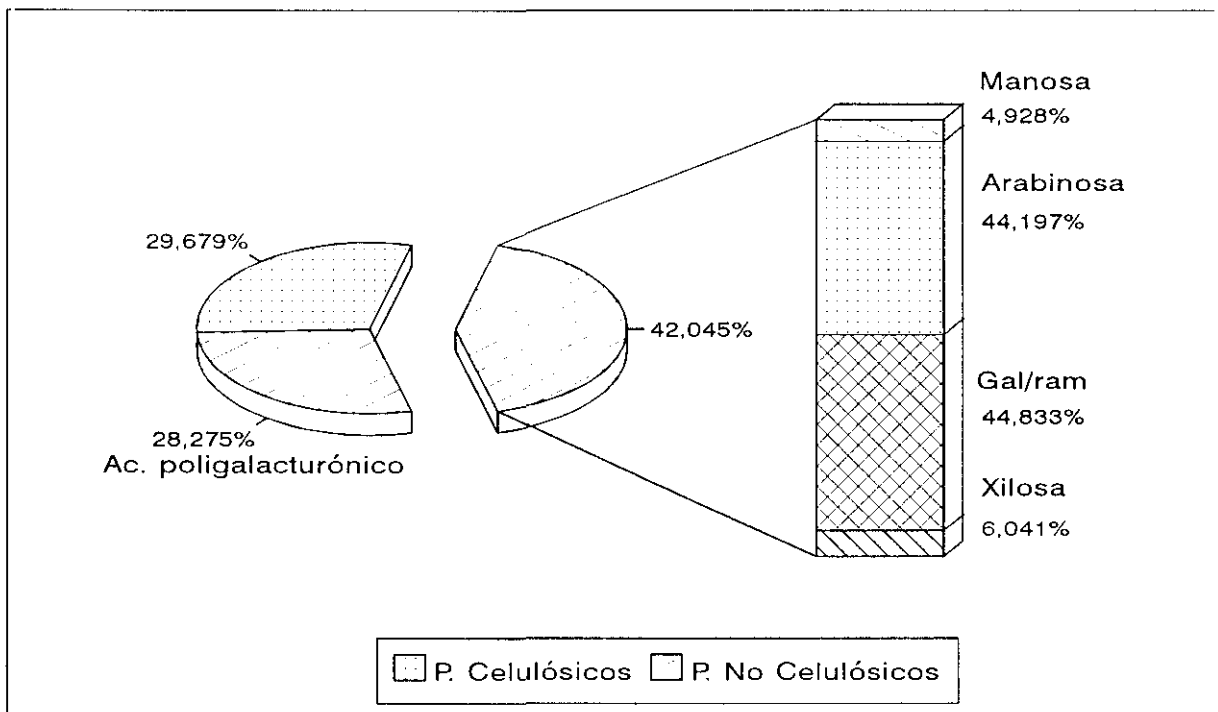


Gráfico nº 14. Proporción de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en zanahoria procesada. Composición porcentual de p. no celulósicos.

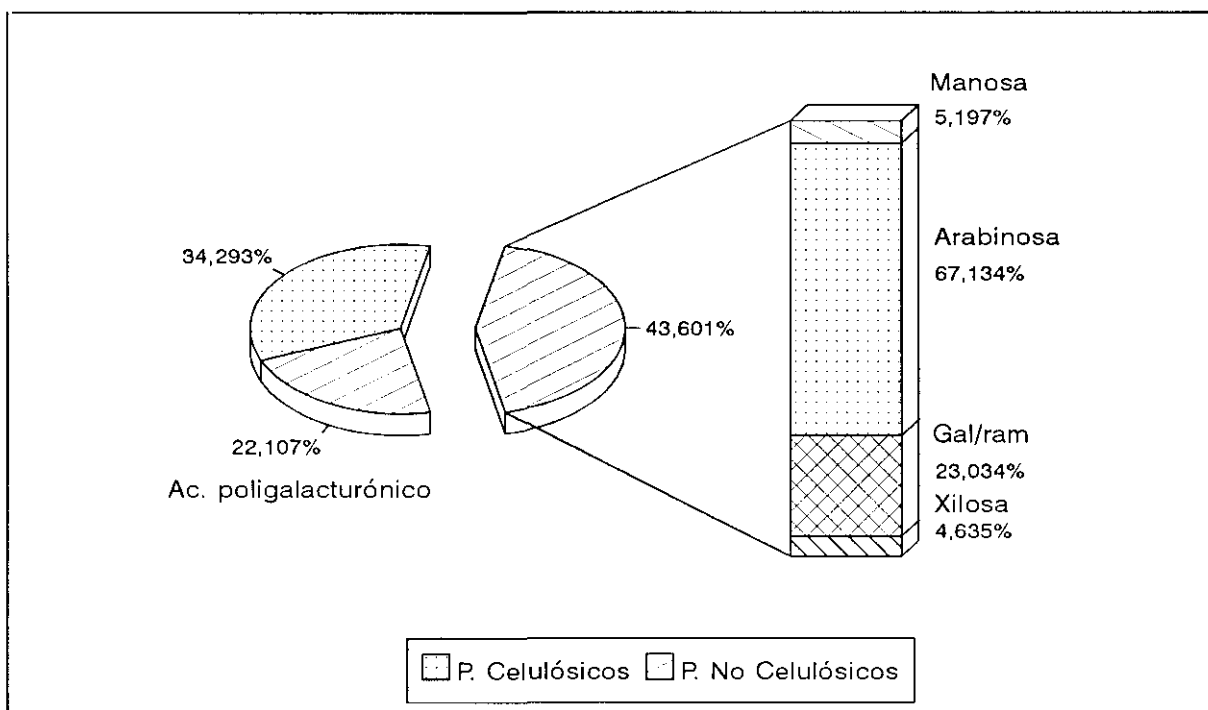


Gráfico n° 15. Proporción de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en remolacha fresca. Composición porcentual de p. no celulósicos.

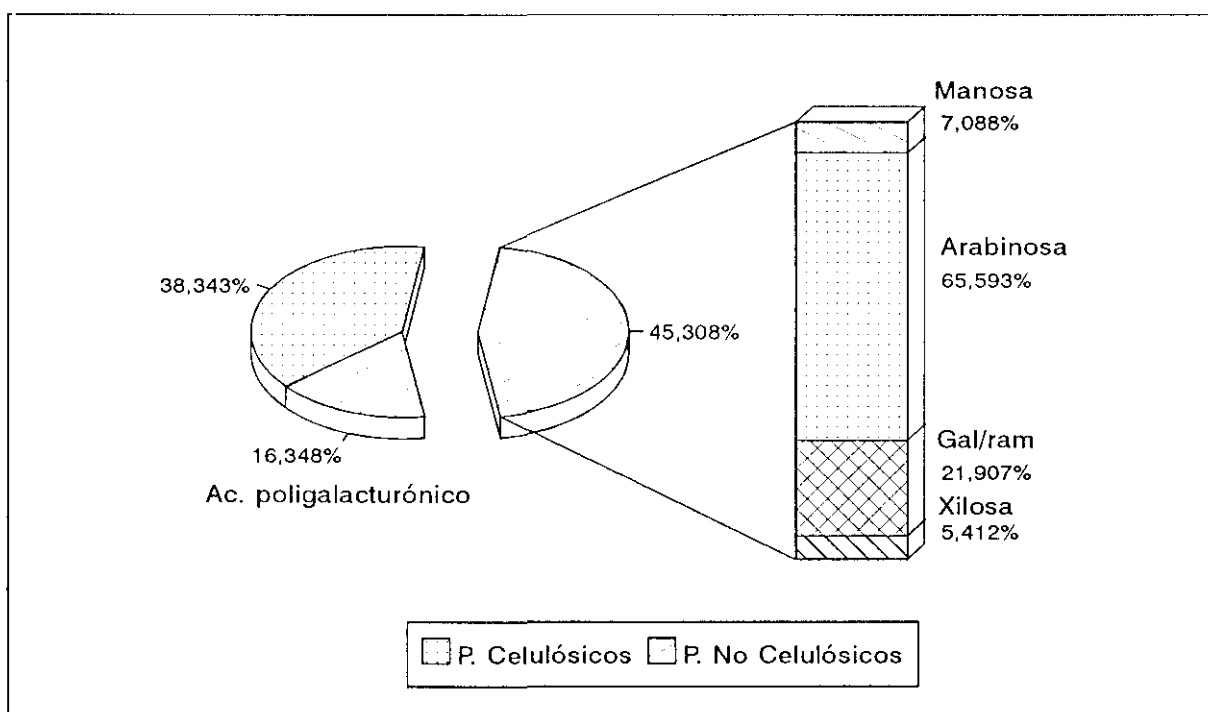
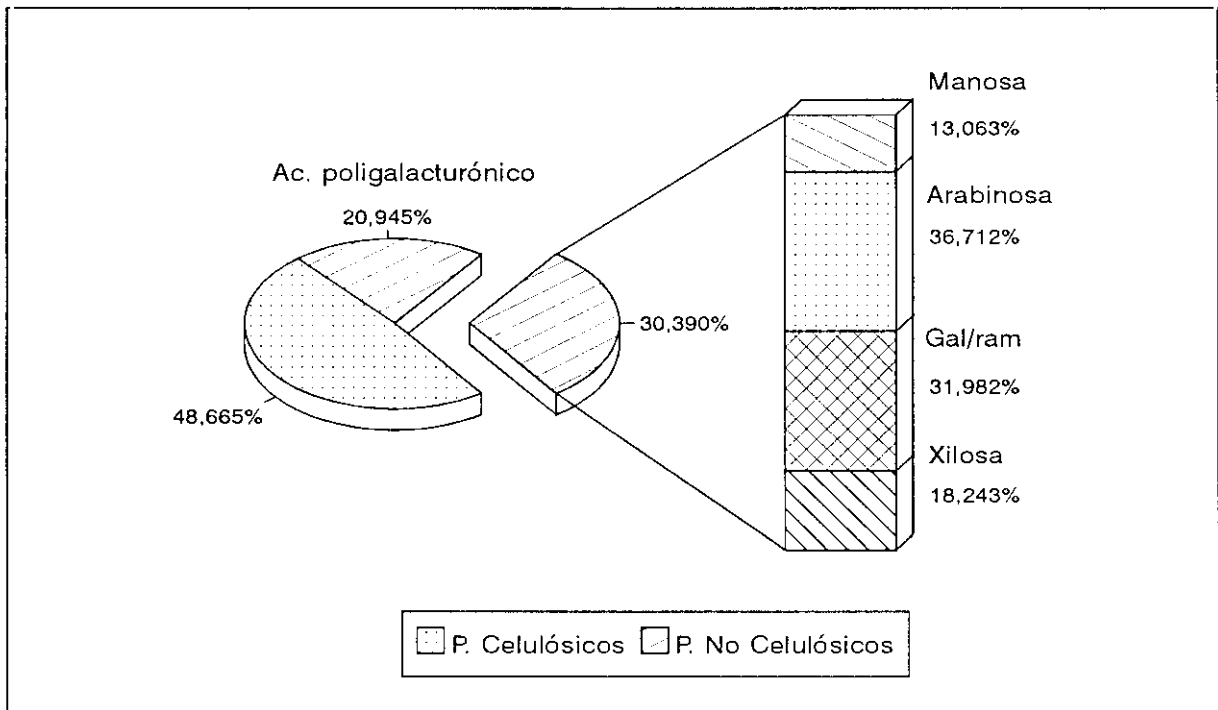
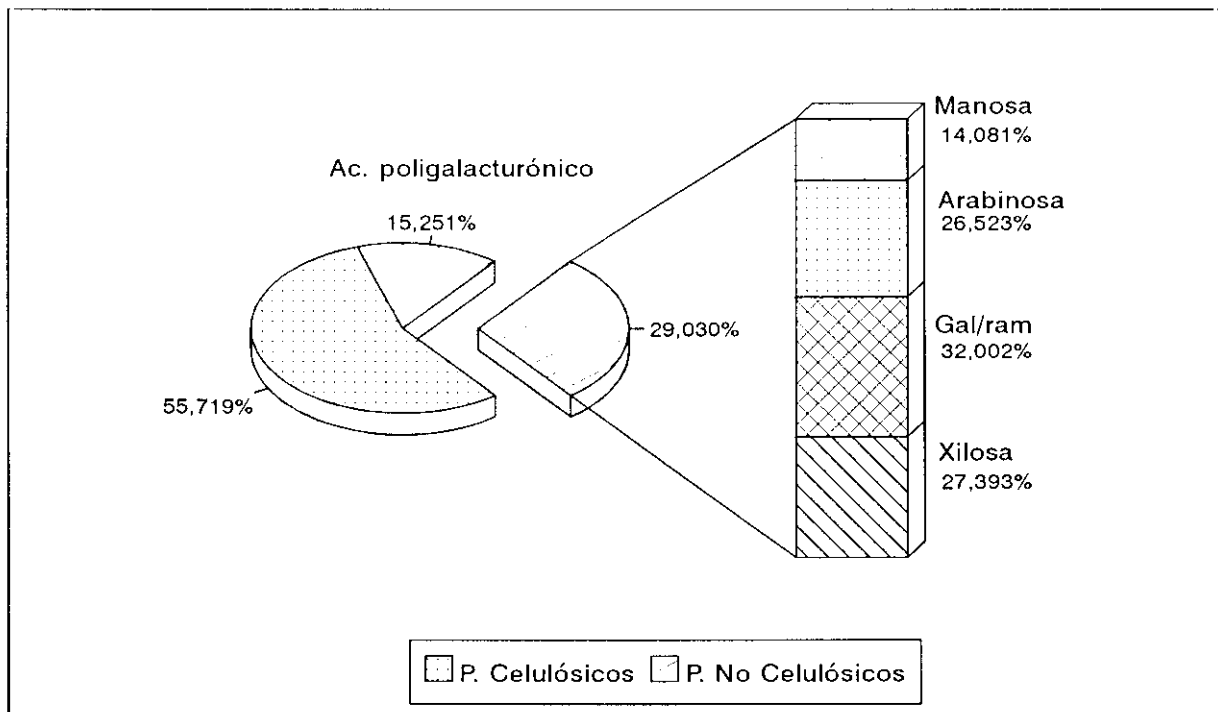


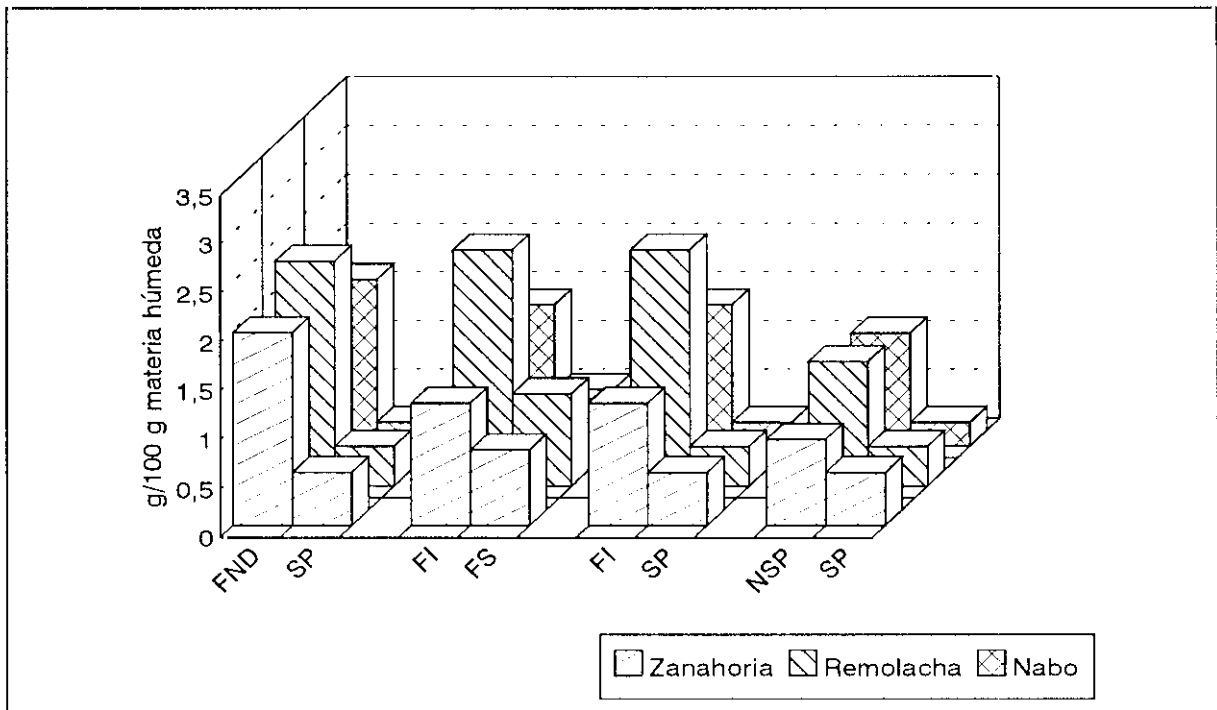
Gráfico n° 16. Proporción de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en remolacha procesada. Composición porcentual de p. no celulósicos.



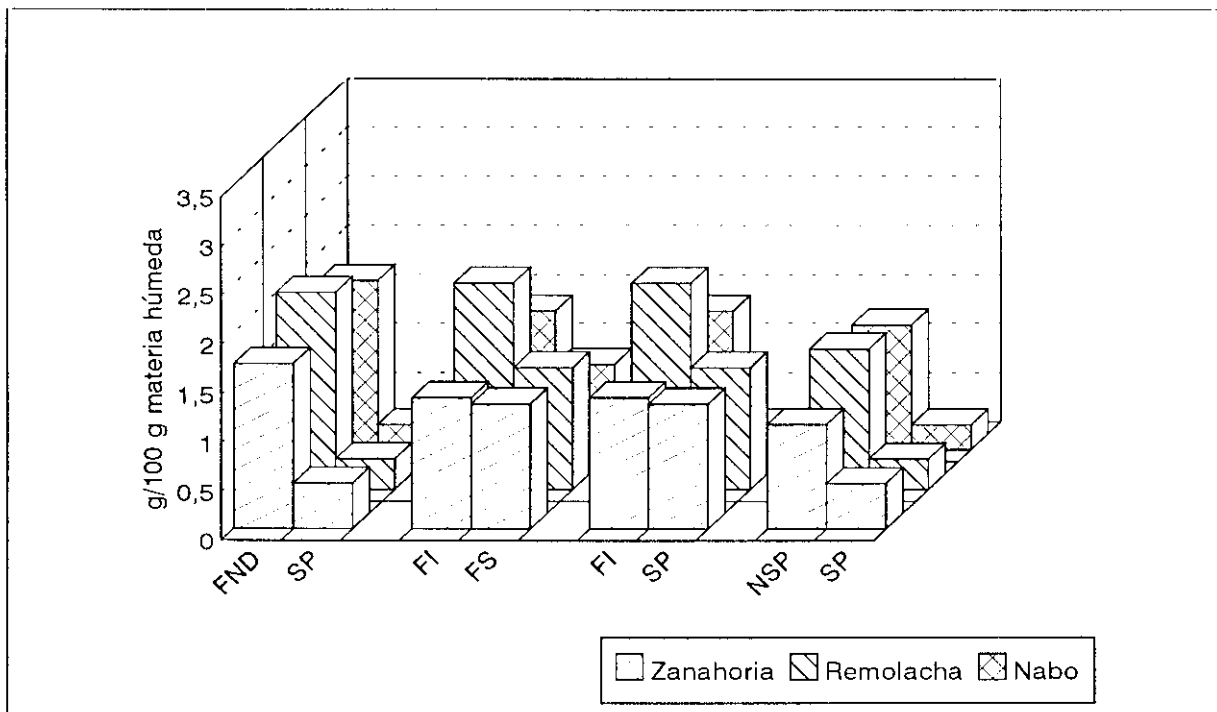
**Gráfico n° 17. Proporción de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en nabo fresco. Composición porcentual de p. no celulósicos.**



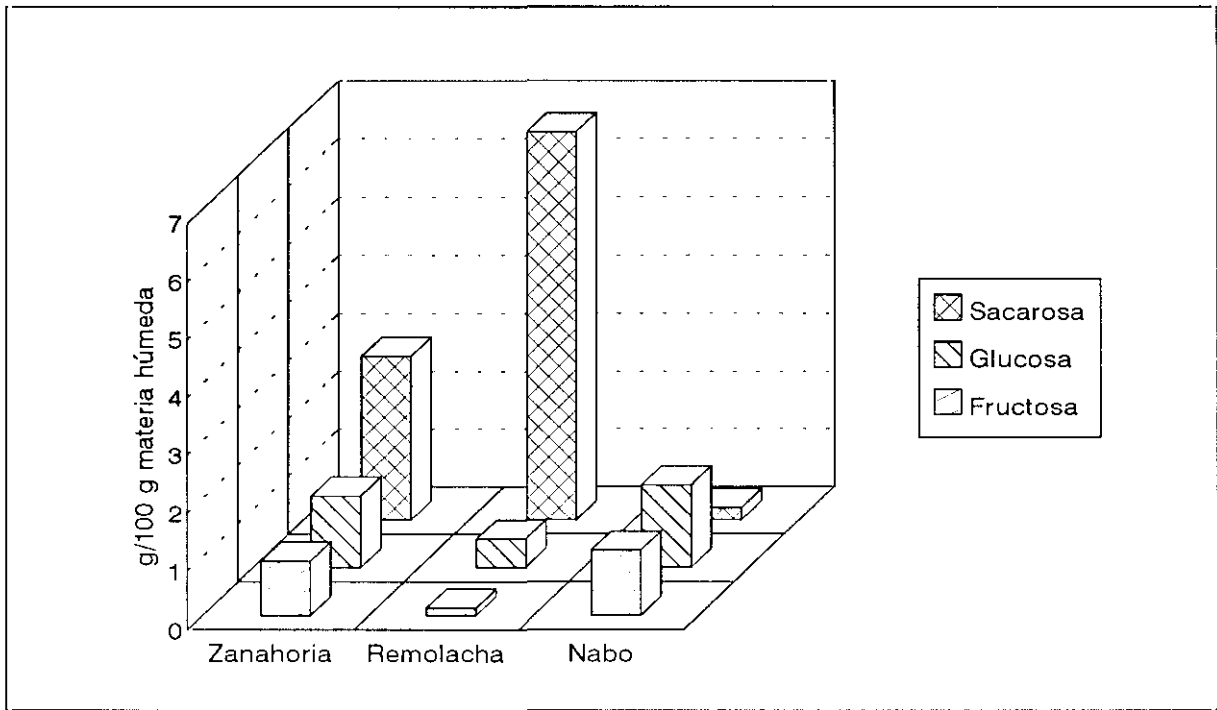
**Gráfico n° 18. Proporción de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en nabo procesado. Composición porcentual de p. no celulósicos.**



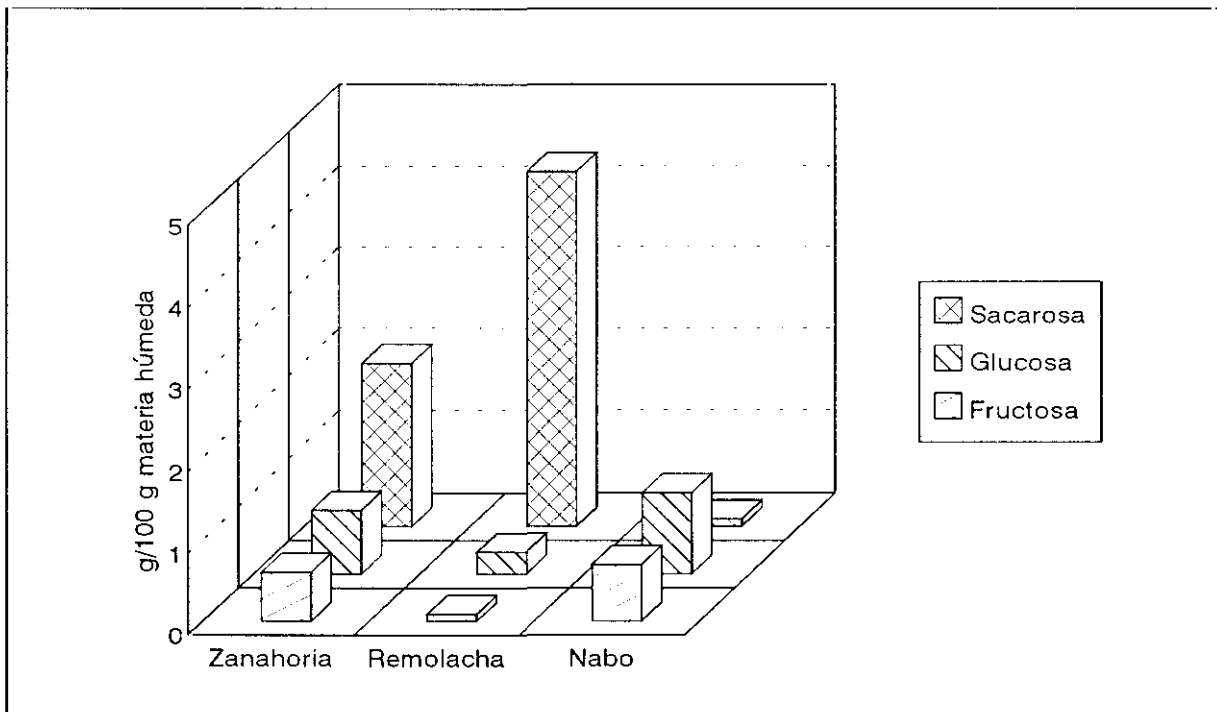
**Gráfico nº 19. Comparación de los valores de Fibra Total obtenidos según distintos métodos en las tres hortalizas frescas.**



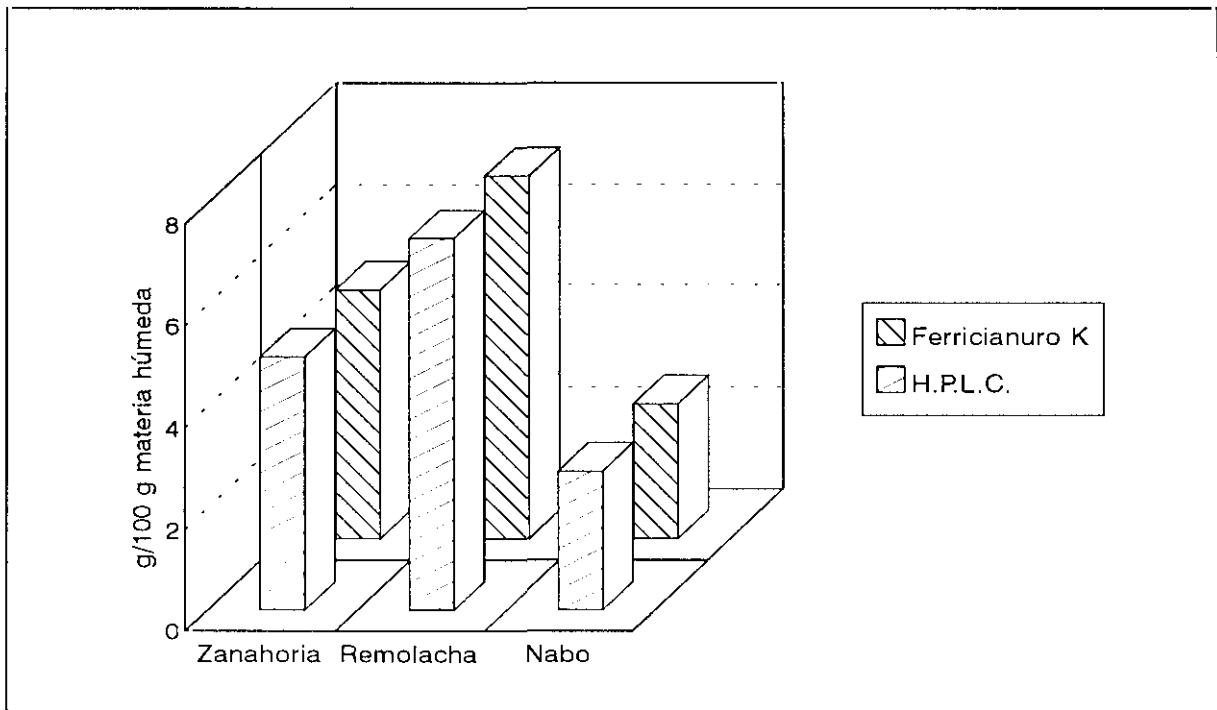
**Gráfico nº 20. Comparación de los valores de Fibra Total obtenidos según distintos métodos en las tres hortalizas procesadas.**



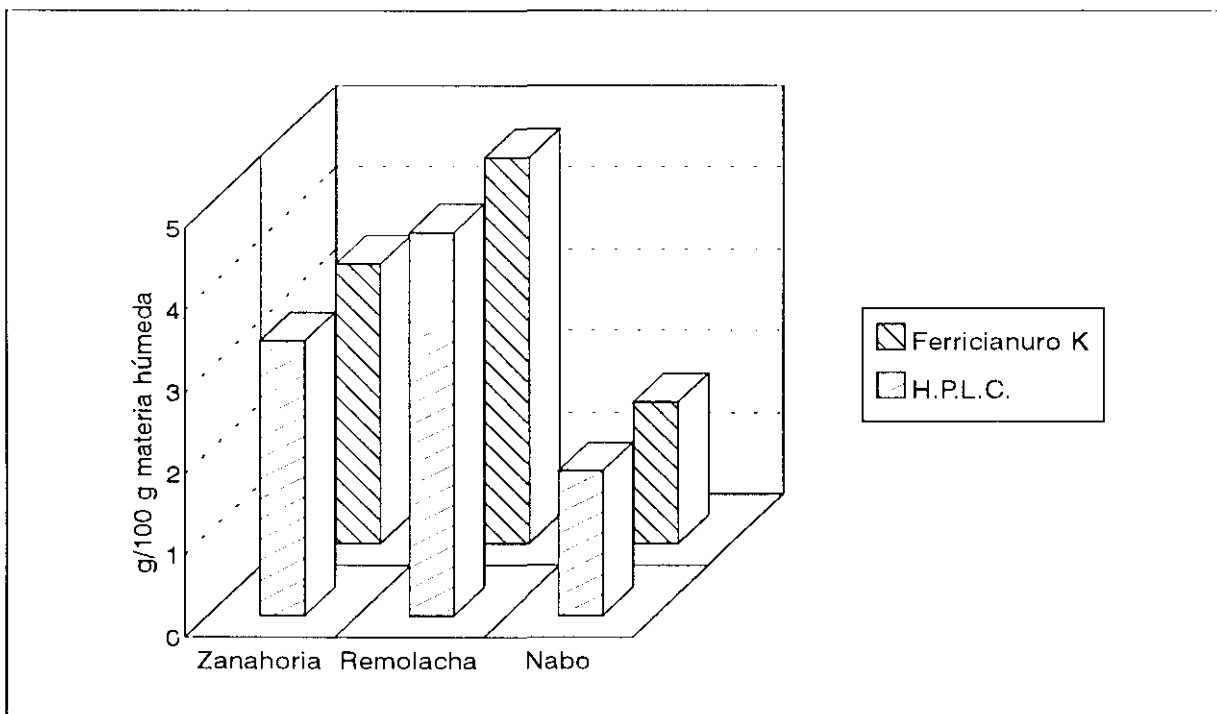
**Gráfico nº 21. Comparación de los valores de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las tres hortalizas frescas.**



**Gráfico nº 22. Comparación de los valores de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las tres hortalizas procesadas.**



**Gráfico nº 23. Comparación de los valores de azúcares solubles totales en las tres hortalizas frescas.**



**Gráfico nº 24. Comparación de los valores de azúcares solubles totales en las tres hortalizas procesadas.**

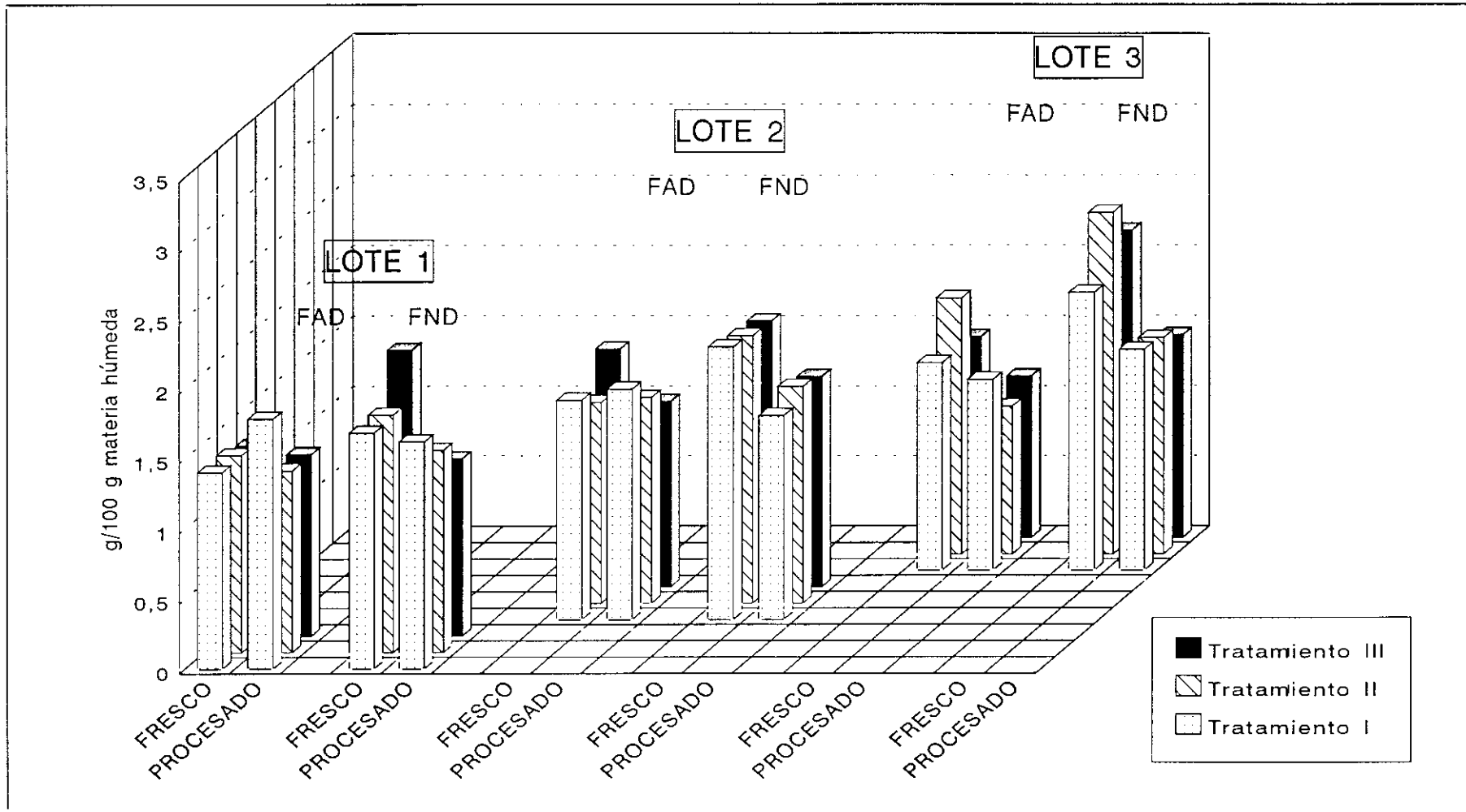


Gráfico nº 25. Comparación de los valores obtenidos de FAD y FND en fresco y procesado para cada uno de los lotes de zanahoria.

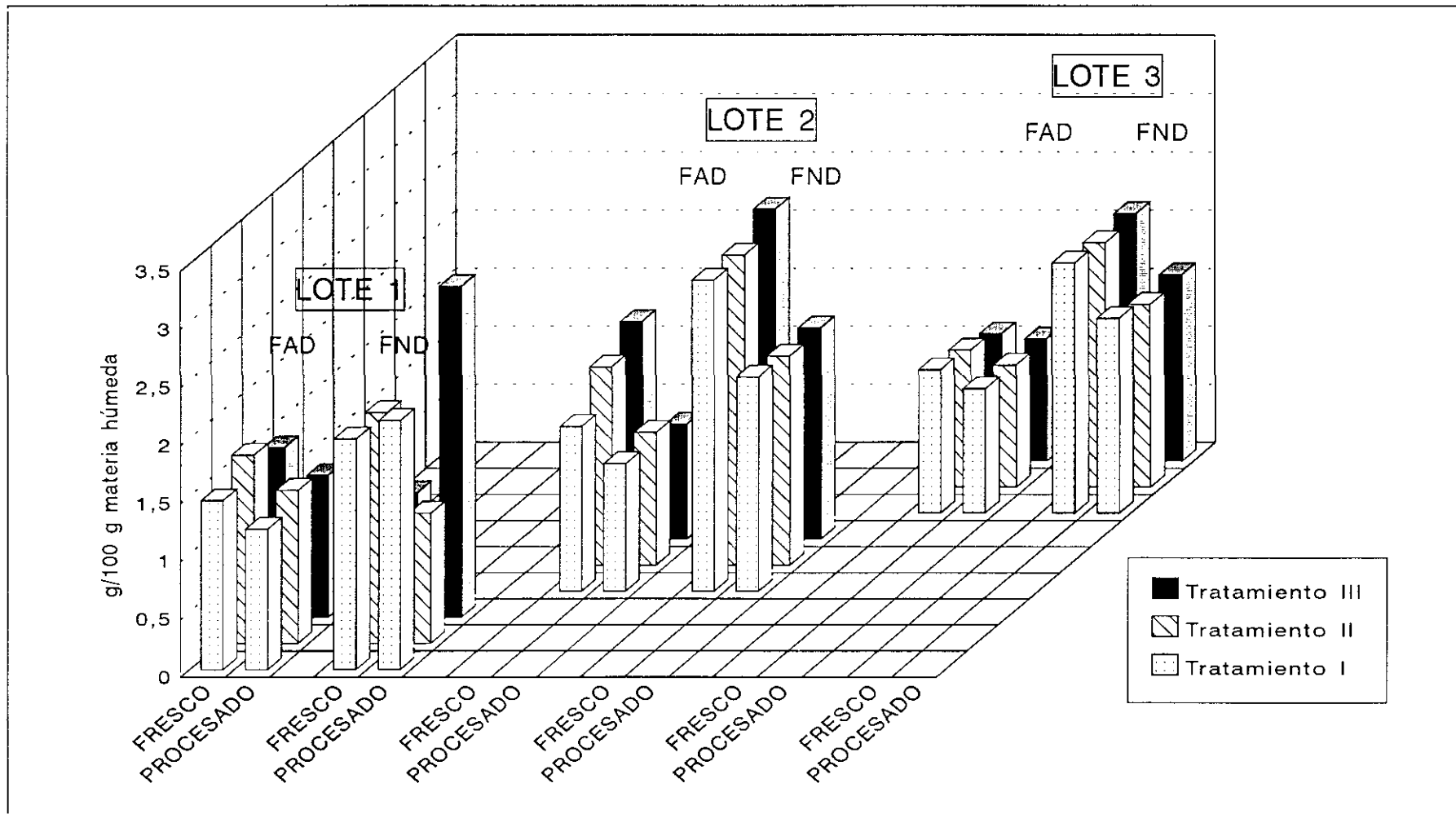


Gráfico nº 26. Comparación de los valores obtenidos de FAD y FND en fresco y procesado para cada uno de los lotes de remolacha.

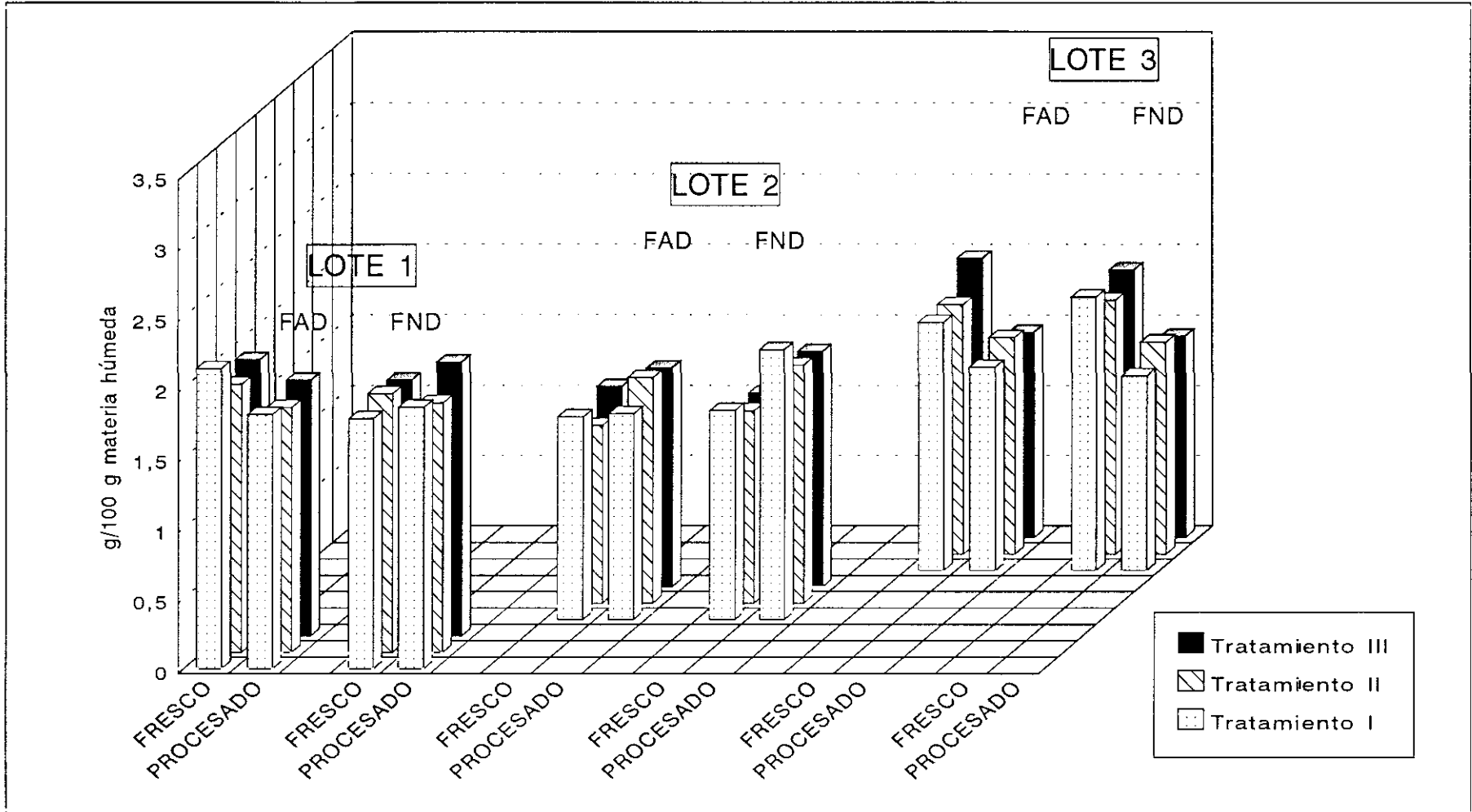


Gráfico nº 27. Comparación de los valores obtenidos de FAD y FND en fresco y procesado para cada uno de los lotes de nabo.

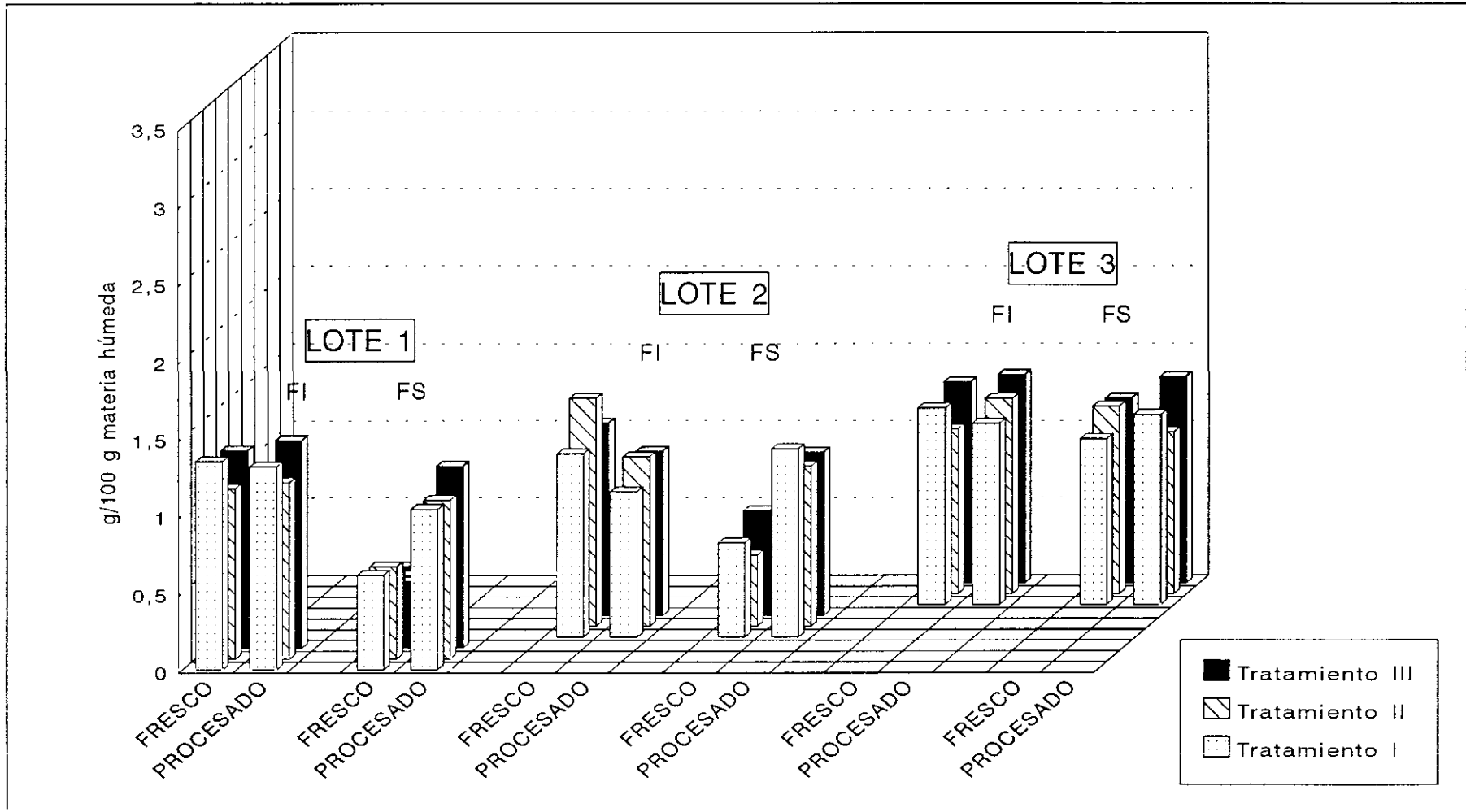


Gráfico nº 28. Comparación de los valores obtenidos de FI y FS en fresco y procesado para cada uno de los lotes de zanahoria.

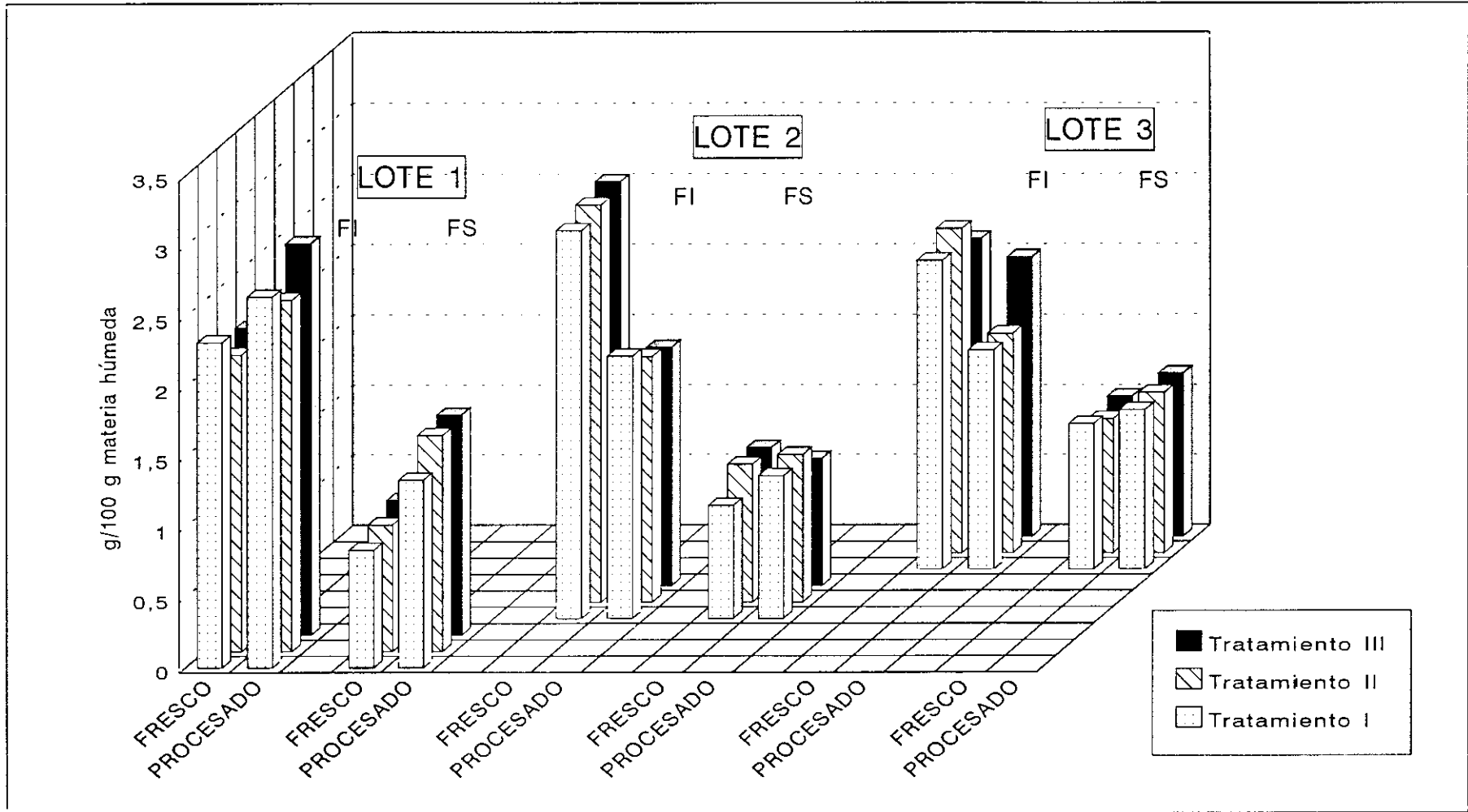


Gráfico nº 29. Comparación de los valores obtenidos de FI y FS en fresco y procesado para cada uno de los lotes de remolacha.

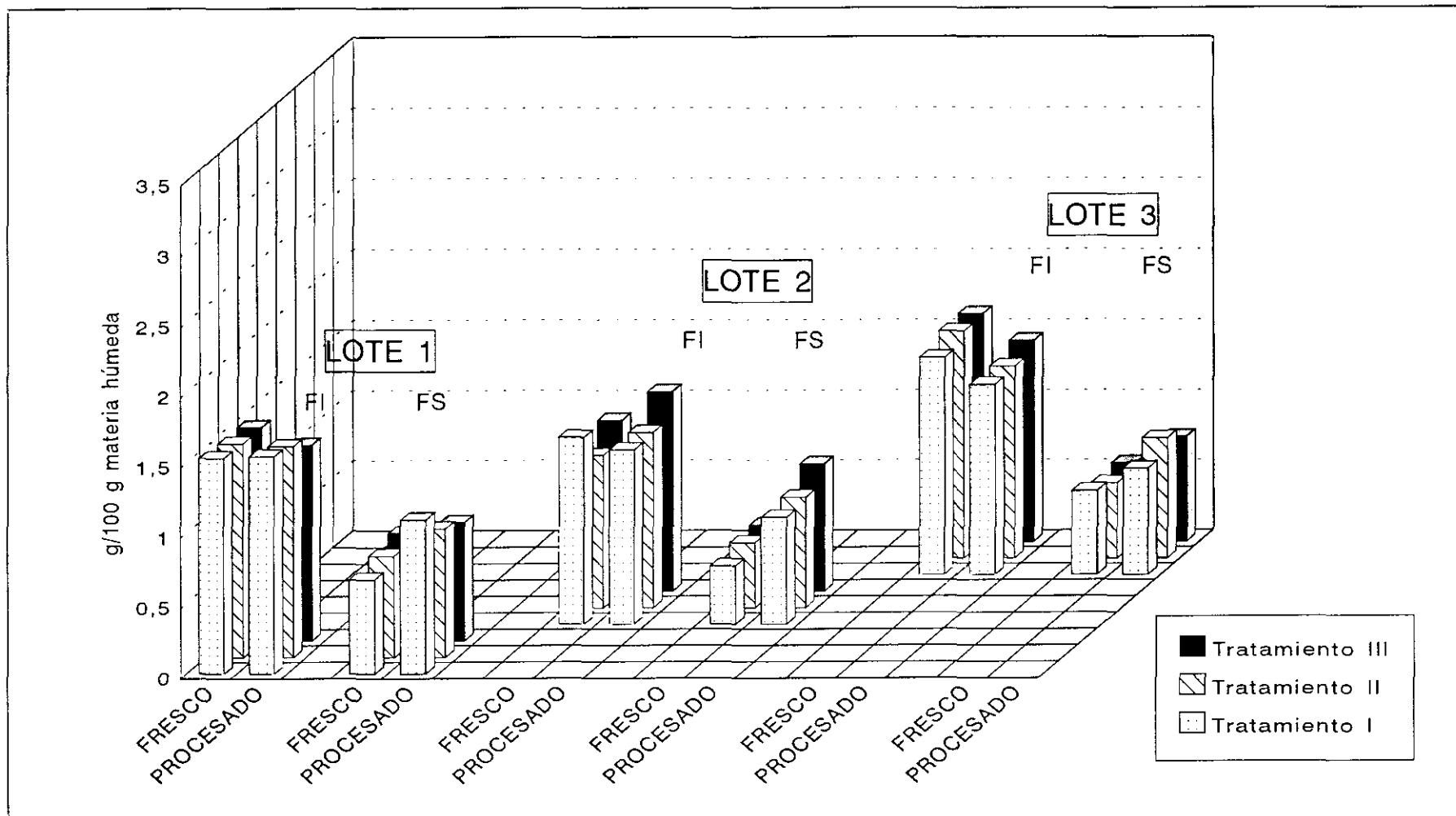


Gráfico nº 30. Comparación de los valores obtenidos de FI y FS en fresco y procesado para cada uno de los lotes de nabo.

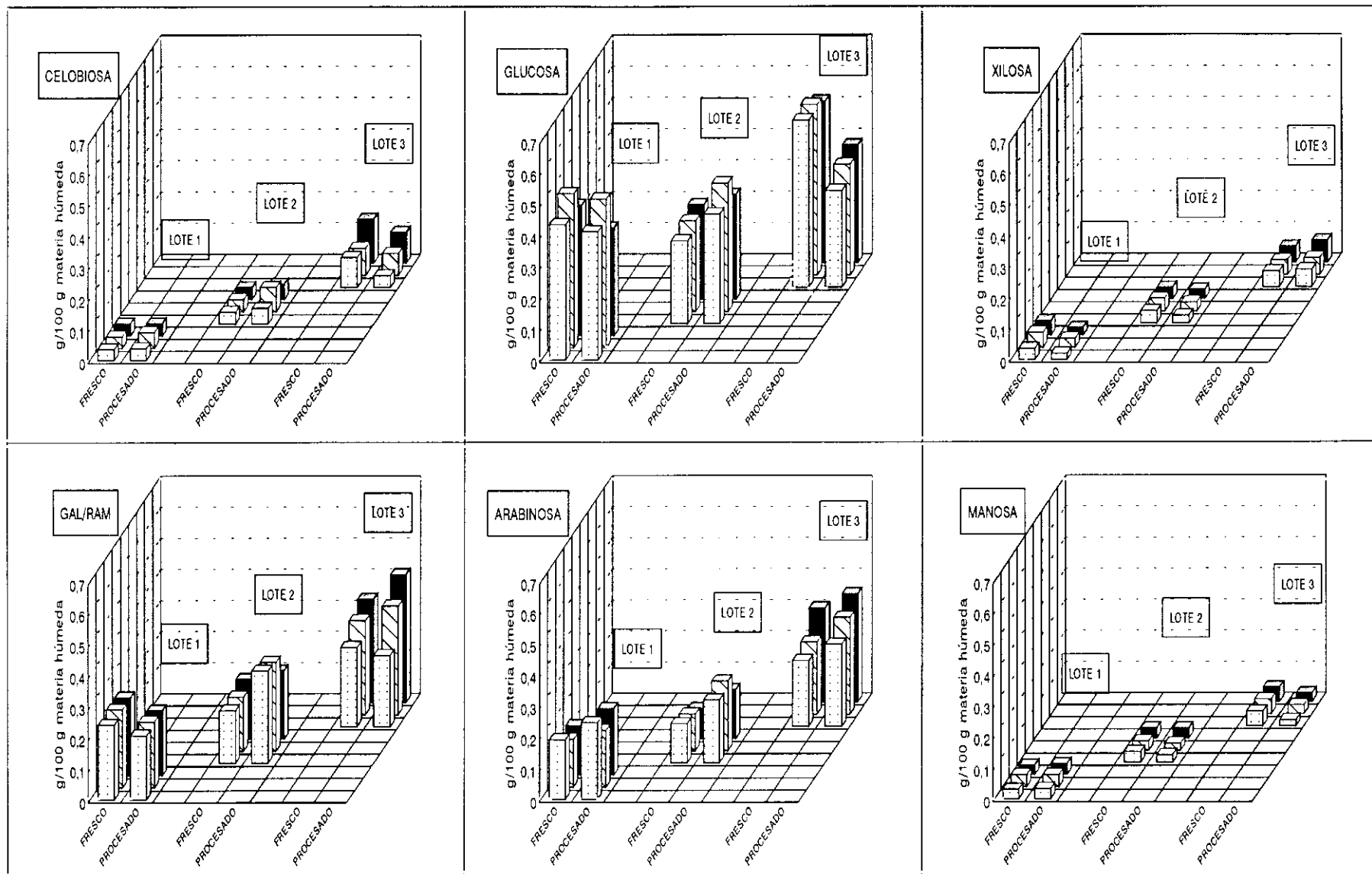
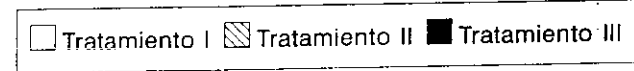


Gráfico nº 31. Comparación de los valores de monosacáridos constituyentes de fibra alimentaria obtenidos por HPLC en zanahoria fresca y procesada.



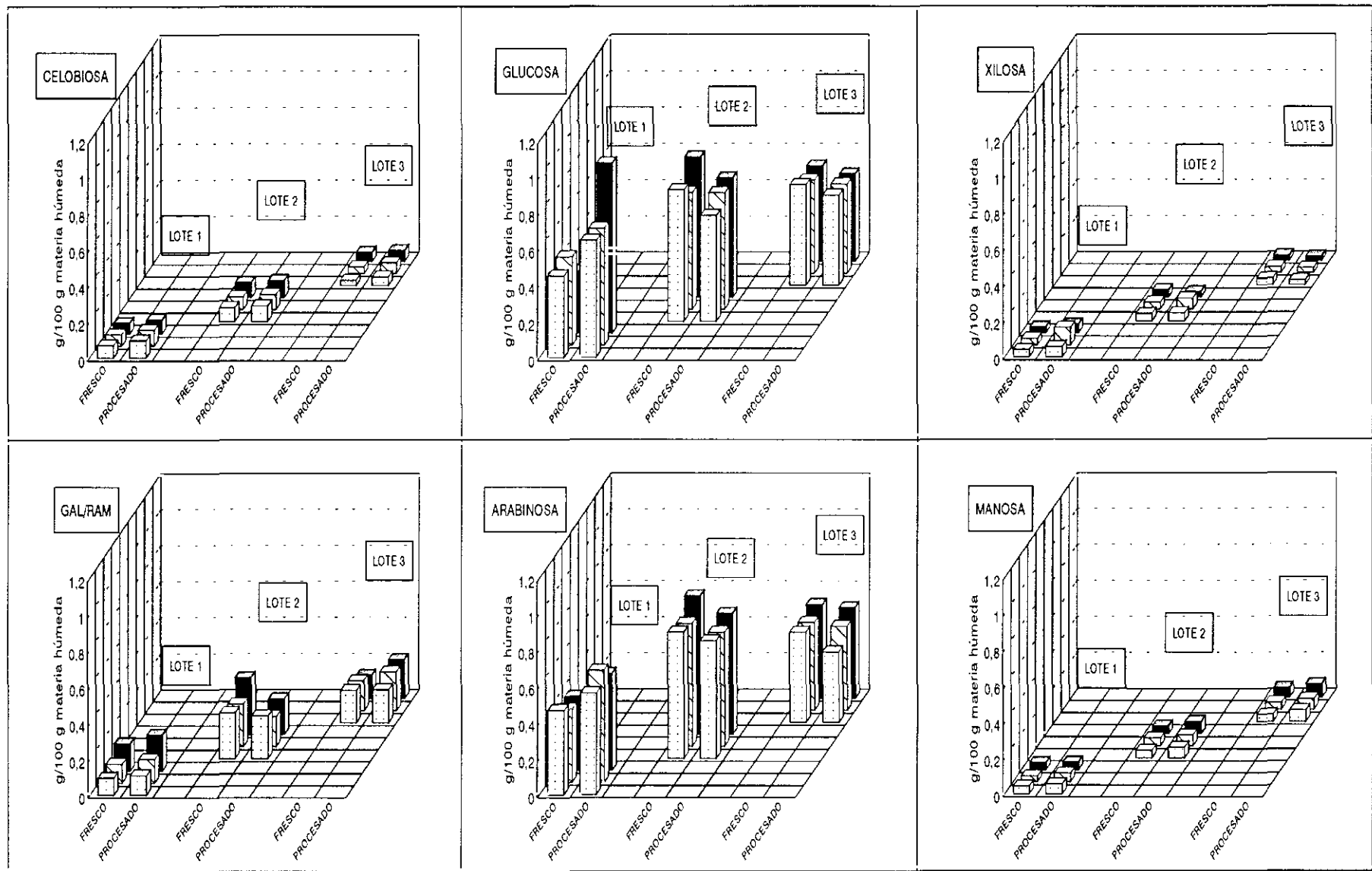
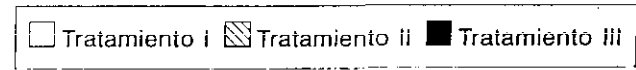


Gráfico nº 32. Comparación de los valores de monosacáridos constituyentes de fibra alimentaria obtenidos por HPLC en remolacha fresca y procesada.



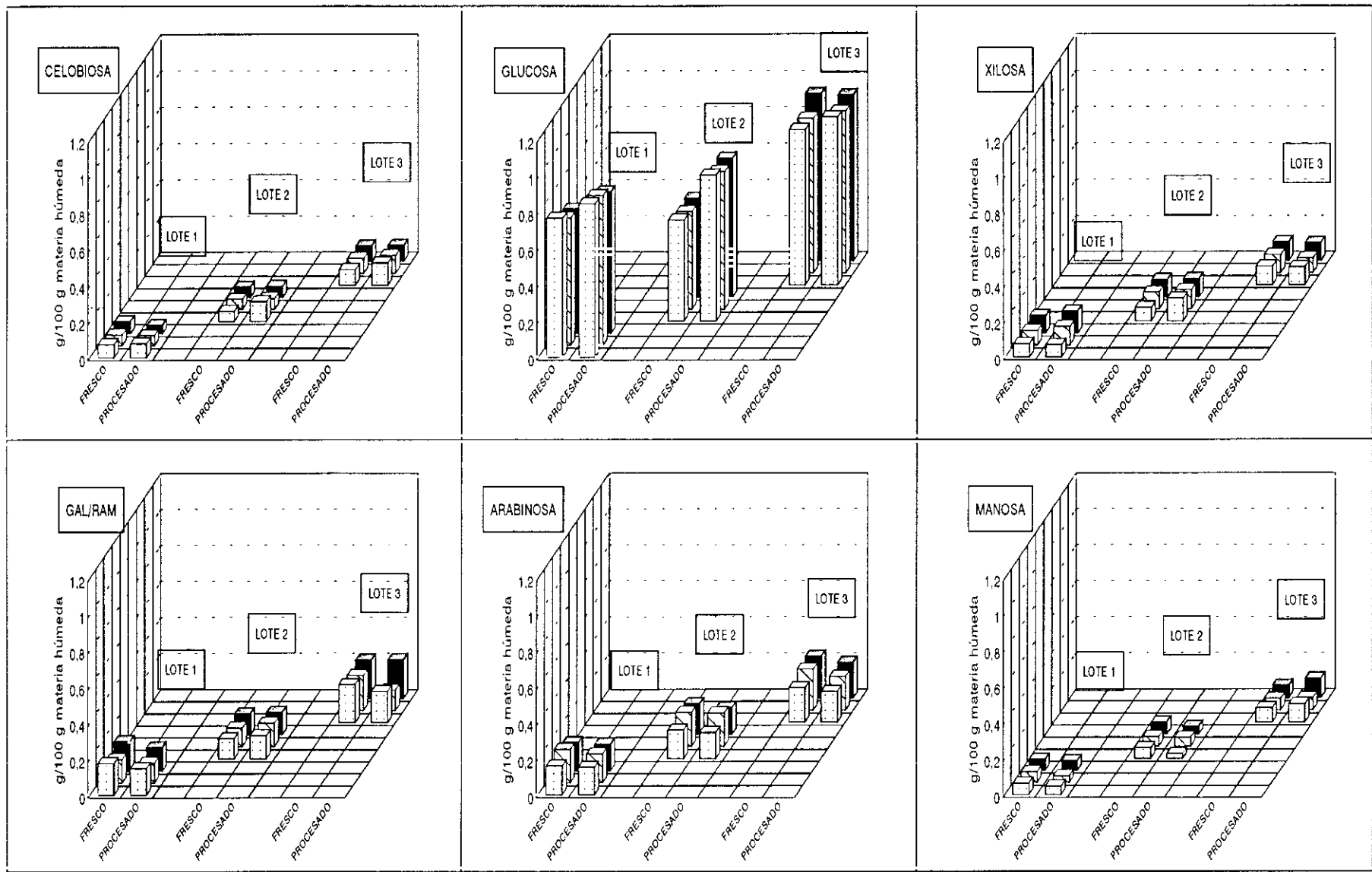
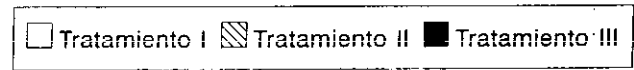


Gráfico nº 33. Comparación de los valores de monosacáridos constituyentes de fibra alimentaria obtenidos por HPLC en nabo fresco y procesado.



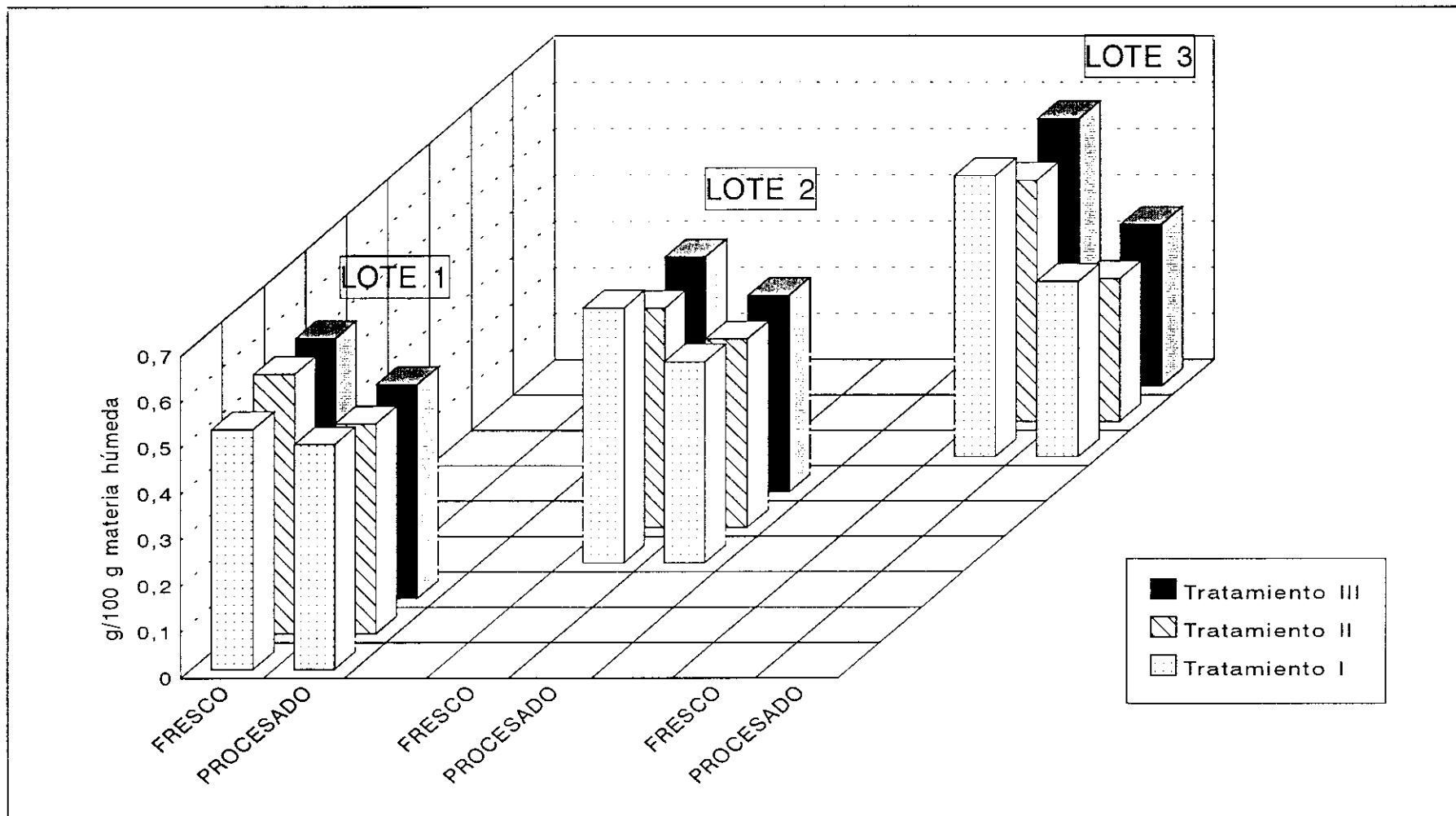
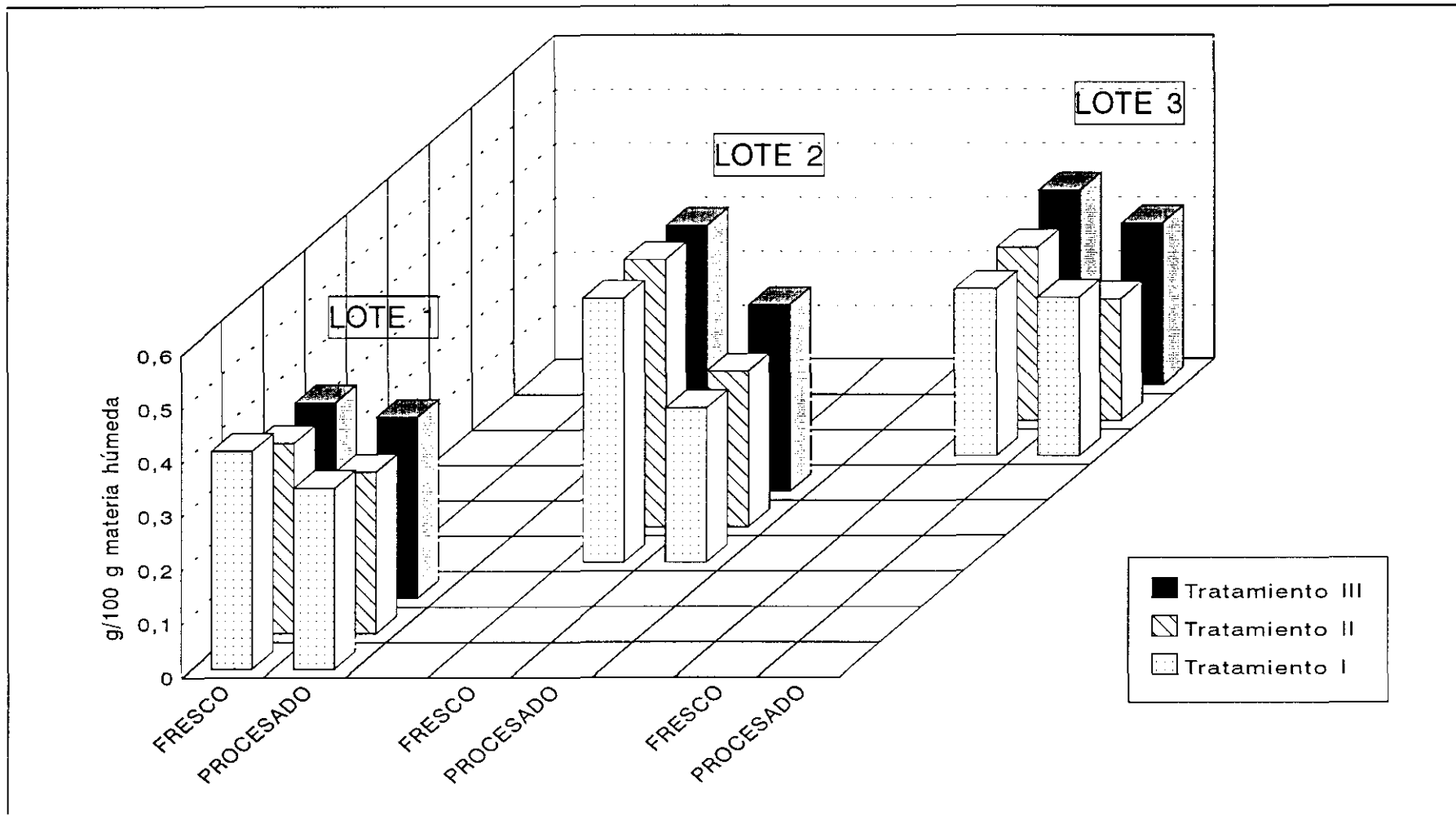
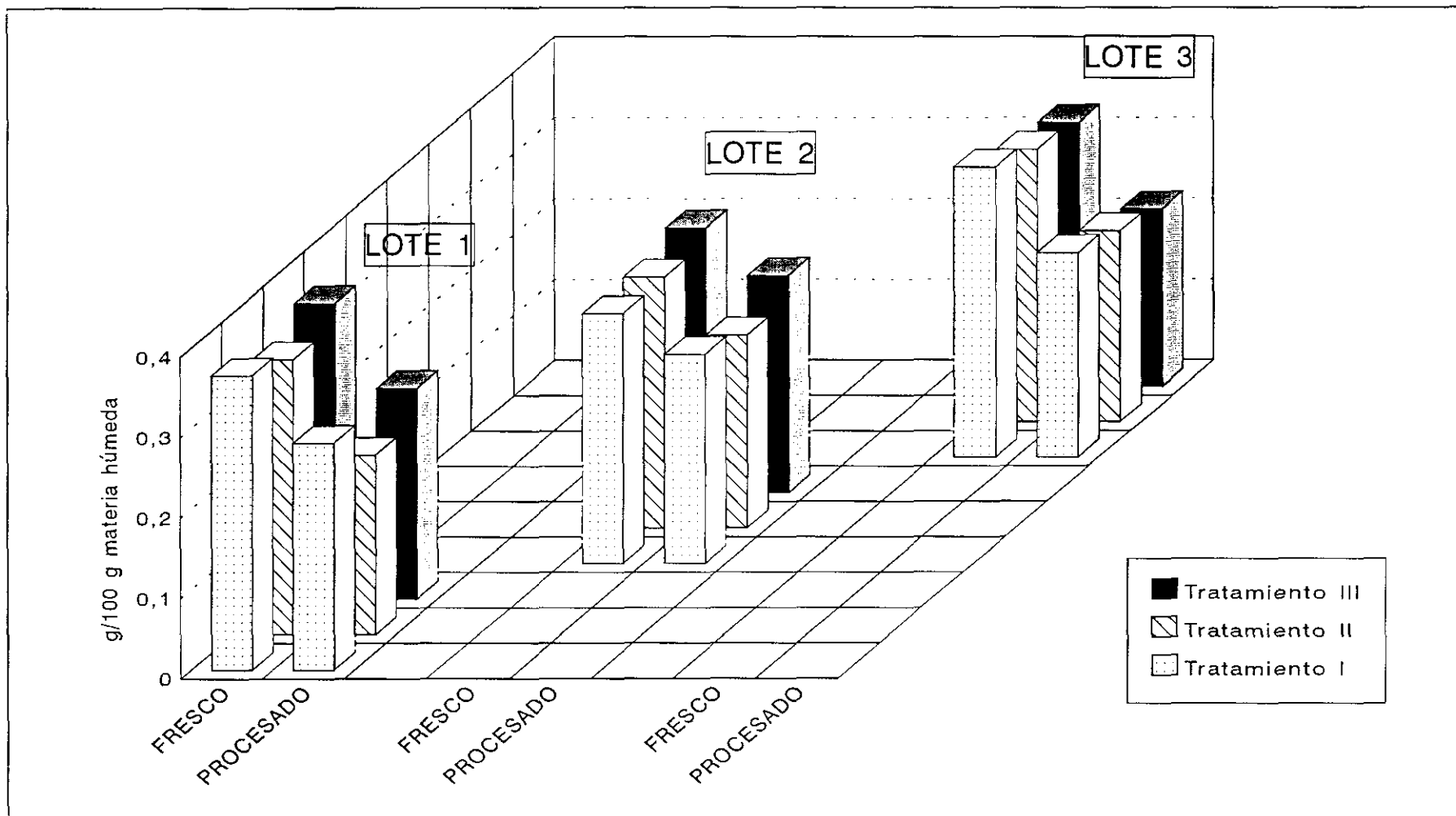


Gráfico nº 34. Comparación de los valores de ácido galacturónico obtenidos para fresco y procesado en zanahoria.



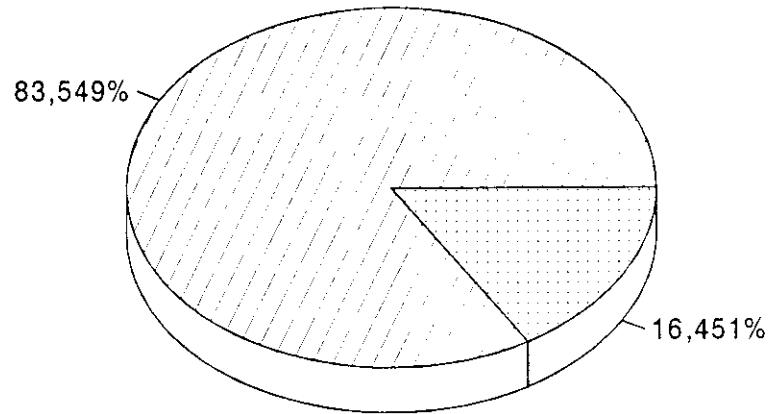
**Gráfico nº 35. Comparación de los valores de ácido galacturónico obtenidos para fresco y procesado en remolacha.**



**Gráfico nº 36. Comparación de los valores de ácido galacturónico obtenidos para fresco y procesado en nabo.**

## Zanahoria

### Material fresco



### Material procesado

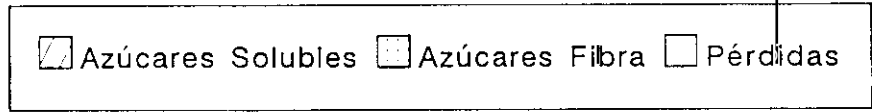
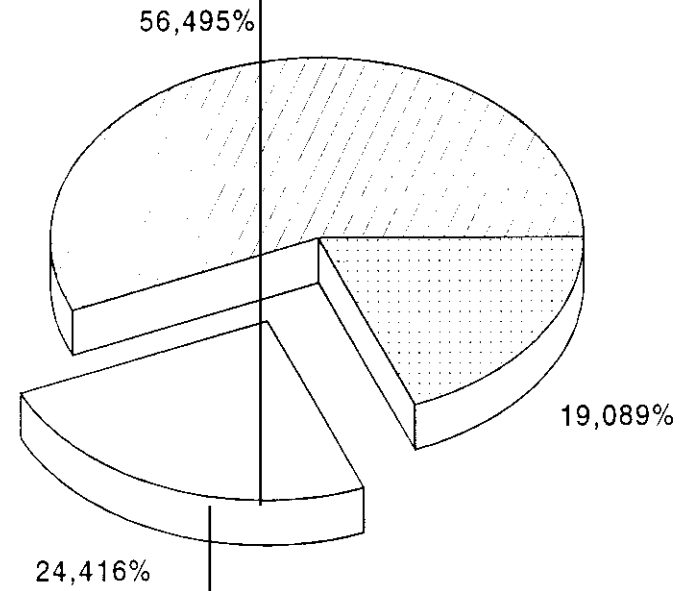


Gráfico nº 37. Distribución de azúcares totales en zanahoria fresca y procesada.

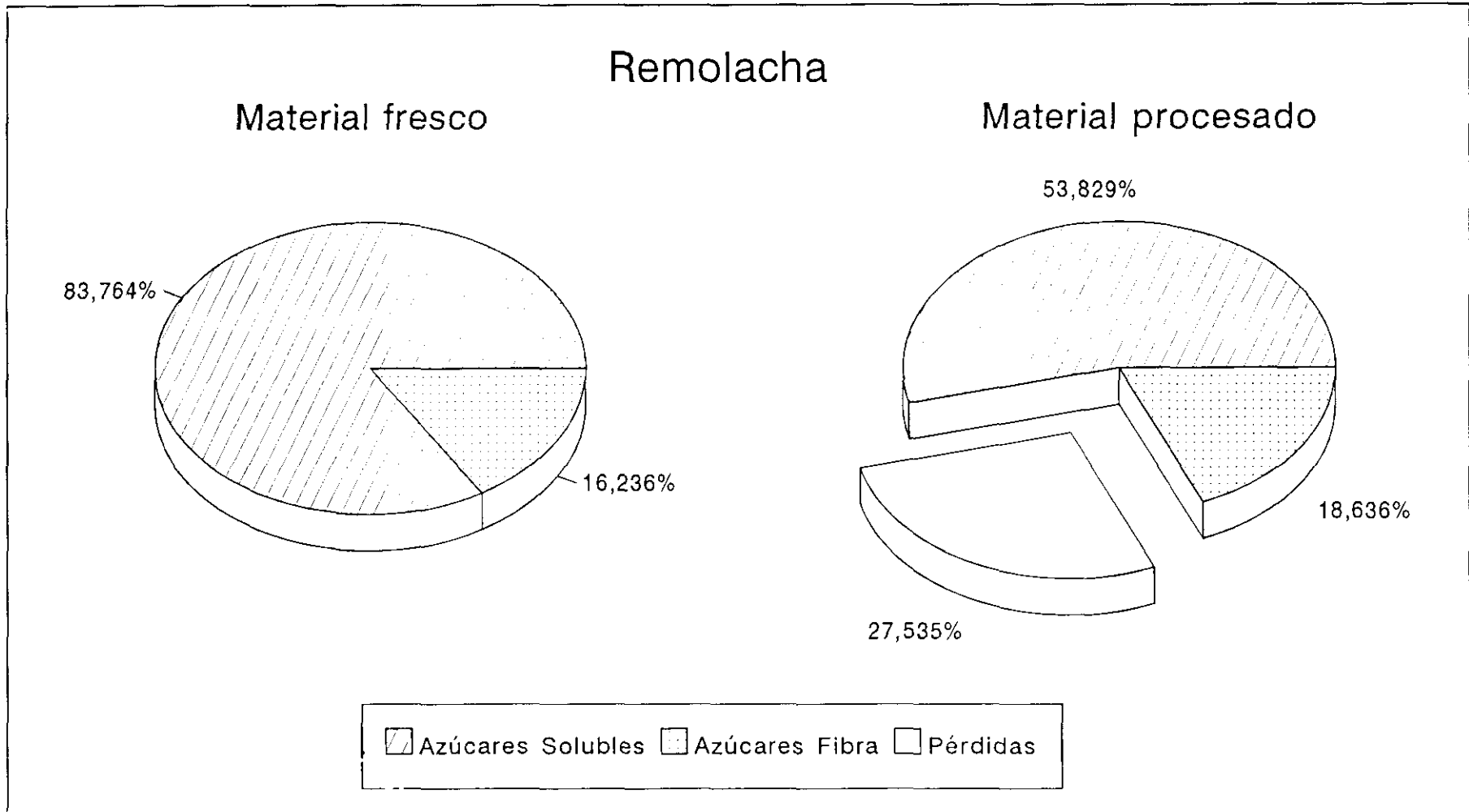


Gráfico nº 38. Distribución de azúcares totales en remolacha fresca y procesada.

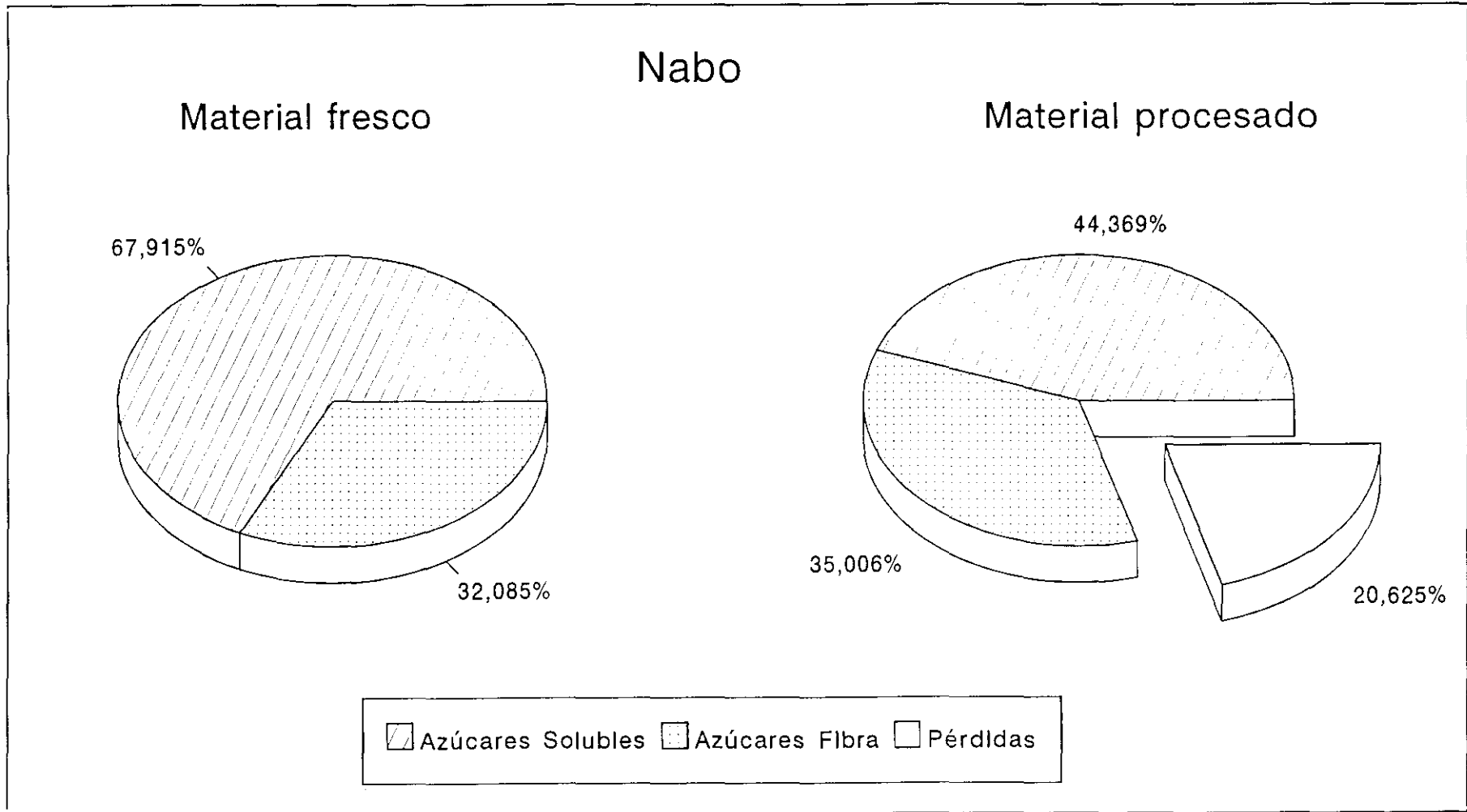


Gráfico nº 39. Distribución de azúcares totales en nabo fresco y procesado.

**Anexo I. Estadísticos correspondientes a la comparación de métodos (Test t-student, nivel de significación  $\alpha = 0,05$ ).**

<b>FAD-FND (con proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0296	0,4137
Remolacha	0,0397	0,0430
Nabo	0,6765	0,3657

<b>FAD-FND (sin proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0344	0,3995
Remolacha	0,0450	0,0378
Nabo	0,8257	0,3242

<b>PROT<sub>FAD</sub>-PROT<sub>FND</sub></b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0560	0,0790
Remolacha	0,0033	0,0847
Nabo	0,0012	0,0500

<b>FI-FND (con proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0330	0,0758
Remolacha	0,0804	0,4116
Nabo	0,0123	0,1421

**Anexo I. Continuación**

<b>FI-FND (sin proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,03740	0,0707
Remolacha	0,0102	0,1976
Nabo	0,0134	0,1455

<b>FI-FAD (con proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0658	0,3665
Remolacha	0,0198	0,0606
Nabo	0,1024	0,0945

<b>FI-FAD (sin proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0658	0,3665
Remolacha	0,0198	0,0606
Nabo	0,1024	0,0945

<b>CEN<sub>FT</sub>-CEN<sub>FS</sub></b>		
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,9960	0,0122
Remolacha	0,7053	0,1517
Nabo	0,5087	0,3165

CEN = Cenizas

Anexo I. Continuación

<b>CEN<sub>FI</sub>-CEN<sub>FND</sub></b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0295	0,0060
Remolacha	0,0321	0,0731
Nabo	0,0694	0,1269

<b>PROT<sub>FI</sub>-PROT<sub>FAD</sub></b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0057	0,0093
Remolacha	0,0086	0,0363
Nabo	0,0614	0,0108

<b>PROT<sub>FI</sub>-PROT<sub>FND</sub></b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0048	0,0048
Remolacha	0,0093	0,0470
Nabo	0,0584	0,0124

<b>FND-Pol. cel. + Pol. no cel. (con proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0097	0,0102
Remolacha	0,0006	0,0785
Nabo	0,0153	0,1733

CEN = Cenizas; PROT = Proteínas; Pol.cel. = Polisacáridos celulósicos; Pol. no cel. = Polisacáridos no celulósicos

**Anexo I. Continuación**

	<b>FND- Pol. cel. + Pol. no cel. (sin proteína)</b>	
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0096	0,0111
Remolacha	0,0008	0,0973
Nabo	0,0161	0,1759

	<b>HEMICELULOSAS FND-FAD--HPLC (con proteína)</b>	
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0296	0,2211
Remolacha	0,0397	0,0430
Nabo	0,1949	0,2703

	<b>HEMICELULOSAS FND-FAD-HPLC (sin proteína)</b>	
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,9007	0,2211
Remolacha	0,0397	0,0430
Nabo	0,1949	0,2703

	<b>FI-Pol. cel. + Pol. no cel.</b>	
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,1692	0,0572
Remolacha	0,0021	0,1293
Nabo	0,0405	0,2918

Pol.cel. = Polisacáridos celulósicos; Pol. no cel. = Polisacáridos no celulósicos

## Anexo I. Continuación

	<b>FS-SP</b>	
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,3355	0,0100
Remolacha	0,0163	0,0226
Nabo	0,0684	0,0126

	<b>FT - FND + SP</b> (con proteína)	
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0126	0,0527
Remolacha	0,0092	0,0474
Nabo	0,0786	0,0821

	<b>FT - FND + SP</b> (sin proteína)	
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0139	0,0480
Remolacha	0,0040	0,0445
Nabo	0,7165	0,0791

	<b>FT-FAD (con proteína)</b>	
	<b>FRESCO</b> p-value	<b>PROCESADO</b> p-value
Zanahoria	0,0696	0,0337
Remolacha	0,0067	0,0327
Nabo	0,0065	0,0012

Pol.cel. = Polisacáridos celulósicos; Pol.no cel. = Polisacáridos no celulósicos

**Anexo I. Continuación**

<b>FT-FAD (sin proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0650	0,0336
Remolacha	0,0068	0,0312
Nabo	0,0064	0,0015

<b>FT-FND (con proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,4822	0,0129
Remolacha	0,0005	0,0322
Nabo	0,0296	0,0249

<b>FT-FND (sin proteína)</b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,2618	0,0116
Remolacha	0,0001	0,0316
Nabo	0,0276	0,0243

<b>FT-NSP</b>		
	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
	<b>p-value</b>	<b>p-value</b>
Zanahoria	0,0259	0,0026
Remolacha	0,0009	0,0572
Nabo	0,0397	0,0459

## Anexo I. Continuación

	<b>FI + SP - NSP</b>	
	FRESCO p-value	PROCESADO p-value
Zanahoria	0,1692	0,0567
Remolacha	0,0021	0,1293
Nabo	0,0405	0,2917

	<b>FND + SP - NSP</b>	
	FRESCO p-value	PROCESADO p-value
Zanahoria	0,0096	0,0107
Remolacha	0,0008	0,0973
Nabo	0,0161	0,1759

	<b>AZ<sub>HPLC</sub> - AZ<sub>Fer</sub></b>	
	FRESCO p-value	PROCESADO p-value
Zanahoria	0,8047	0,7963
Remolacha	0,2745	0,9298
Nabo	0,5978	0,7601

AZ<sub>HPLC</sub> = Azúcares solubles por método HPLC

AZ<sub>Fer</sub> = Azúcares solubles por método Ferricianuro potásico

**Anexo II. Estadísticos correspondientes a la comparación fresco-procesado (Análisis de varianza) (nivel de significación  $\alpha = 0,05$ ).**

Variable	Zanahoria	Remolacha	Nabo
Humedad	0,0324	0,0873	0,0863
FAD (con proteína)	0,2899	0,1141	0,5524
FAD (sin proteína)	0,3538	0,1290	0,5651
FND (con proteína)	0,0160	0,3259	0,9405
FND (sin proteína)	0,0187	0,3418	0,9354
CEN <sub>FND</sub>	---	0,0188	0,0358
PROT <sub>FAD</sub>	0,1837	0,0745	0,2227
PROT <sub>FND</sub>	0,0281	0,2125	0,3879
FI	0,4660	0,3651	0,6912
FS	0,1473	0,1463	0,0407
FT	0,2220	0,8356	0,3455
CEN <sub>FI</sub>	0,0445	0,0256	0,2516
CEN <sub>FS</sub>	0,6435	0,1120	0,8340
PROT <sub>FI</sub>	0,0096	0,0004	0,2843
CELOBIOSA	0,8405	0,2701	0,3759
GLUCOSA <sub>(Fibra)</sub>	0,4984	0,6044	0,3037
XILOSA	0,6148	0,4655	0,2017
GAL./RAM.	0,5045	0,9665	0,6219
ARABINOSA	0,3040	0,8876	0,3598
MANOSA	0,1653	0,0084	0,7979
M. NEUTROS	0,9115	0,5888	0,5732
P. CELULÓSICOS	0,5427	0,5345	0,3117
P. NO CELULOSICOS	0,4987	0,6645	0,6644
SP	0,0295	0,1276	0,0027
FND + SP (con proteína)	0,0092	0,2802	0,6620
FND + SP (sin proteína)	0,0110	0,2893	0,6579
FI + SP	0,0836	0,3122	0,3781
FI + FS	0,2220	0,8356	0,3455
NSP	0,5524	0,8575	0,9199
AZUC <sub>FER</sub>	0,0068	0,0510	0,0580
AZUC <sub>HPLC</sub>	0,0048	0,0552	0,0569
FRUCTOSA	0,0170	0,0720	0,0580
GLUCOSA	0,0174	0,0727	0,0520
SACAROSA	0,0075	0,0585	0,0134

CEN = Cenizas

PROT = Proteínas

GAL./RAM. = Galactosa/Ramnosa

M. NEUTROS = Monosacáridos Neutros

P. CELULÓSICOS = Polisacáridos Celulósicos

P. NO CELULOSICOS = Polisacáridos No Celulósicos

AZUC<sub>FER</sub> = Azúcares solubles por método Ferricianuro Potásico

AZUC<sub>HPLC</sub> = Azúcares solubles por método HPLC

## **2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS**

### **2.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS ANALITICOS EMPLEADOS**

Los resultados obtenidos se analizan estadísticamente según el test de la t-Student, fijando en todos los casos un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ . Los valores de p-value encontrados en cada caso figuran en el anexo I.

#### **2.1.1 Estudio de los resultados obtenidos para la fibra alimentaria**

##### **2.1.1.1. Métodos detergentes**

Se han estudiado los métodos ácido y neutro detergente (Van Soest, 1963b; Van Soest y Wine, 1967). Se han seguido para estos métodos las indicaciones de Van Soest, corrigiendo los valores obtenidos tras el tratamiento con el contenido de cenizas determinado en cada residuo.

Se ha realizado, aunque el método no lo indica, la determinación de proteínas en los residuos de fibra ácido detergente (FAD) y fibra neutro detergente (FND), lo que permite comprobar la eficacia de estos tratamientos en la eliminación de proteínas.

En las tablas 2 y 3 figura el contenido de FAD y FND para las tres hortalizas, expresado en g/100g de materia húmeda, para las muestras frescas y procesadas respectivamente.

Para cada hortaliza se dan los valores correspondientes a cada lote (Lote 1, Lote 2, Lote 3) que proceden de la media de seis determinaciones de una misma muestra, realizadas por duplicado en tres momentos diferentes, según se explica en el apartado 1.2 de la Parte Experimental. Esta forma de agrupar los datos en las tablas se mantendrá a lo largo de todo el apartado destinado al estudio comparativo de métodos.

Los residuos FAD y FND se estudian de forma que se obtienen tres tipos de resultados. El valor de "residuo+cenizas" es el que se obtiene tras el tratamiento con el correspondiente detergente, el dato de "residuo" es el obtenido una vez eliminadas las cenizas según especifica el método y el de "residuo-proteínas" es el valor del residuo una vez eliminadas las cenizas y las proteínas.

a) Estudio de los resultados obtenidos en las muestras analizadas

Para realizar el estudio de las fracciones de FAD y FND se toman los valores que se obtienen después de restar las cenizas residuales; los residuos+cenizas y los residuos-proteínas se emplearán para el estudio de la eficacia de eliminación de cenizas y proteínas por parte de las soluciones detergentes.

Se hace referencia a los valores medios totales (g/100g materia húmeda) y errores estándar obtenidos para cada hortaliza, recogidos en las tablas 4 y 5 junto con otros estadísticos generales (desviación estándar y desviación estándar relativa).

El método neutro detergente permite la obtención de un residuo teóricamente formado por celulosa, hemicelulosas y lignina, mientras que la aplicación del método ácido detergente consigue un residuo formado, en teoría también, por lignina y celulosa. Así pues, la diferencia entre ambos métodos puede ser estimada como hemicelulosas y, por tanto, cabe esperar que el valor de FND sea superior al de FAD.

En las hortalizas frescas, el nabo presenta los valores más elevados de FAD ( $1,739 \pm 0,187$ ), la remolacha proporciona el porcentaje más bajo ( $1,454 \pm 0,148$ ), mientras que la zanahoria tiene un contenido intermedio ( $1,511 \pm 0,062$ ). Las hortalizas procesadas mantienen esta misma secuencia cuantitativa en los resultados: nabo ( $1,630 \pm 0,160$ ), zanahoria ( $1,559 \pm 0,109$ ) y remolacha ( $1,165 \pm 0,077$ ).

Respecto a los datos obtenidos de FND, en los productos frescos la remolacha es la que posee el mayor contenido ( $2,297 \pm 0,223$ ), seguida de la zanahoria ( $1,974 \pm 0,119$ ) y, por último, el menor porcentaje corresponde al nabo ( $1,703 \pm 0,147$ ). En los procesados este orden se

altera ligeramente ya que si la remolacha presenta nuevamente el máximo valor ( $2,004 \pm 0,257$ ), la zanahoria tiene el contenido más pequeño ( $1,687 \pm 0,026$ ) y el nabo un valor intermedio ( $1,719 \pm 0,203$ ).

Las diferencias observadas entre FND y FAD pueden ser estimadas, teóricamente, como hemicelulosas. Esta cuantificación tiene que ser interpretada con precaución porque, al ser una valoración indirecta, se están sumando los errores del método neutro detergente y del ácido detergente. Este aspecto se comentará con mayor detalle al estudiar las hemicelulosas.

En el caso de las muestras estudiadas, la remolacha con el máximo valor de FND y el mínimo de FAD, presentaría el porcentaje más elevado de hemicelulosas. La superioridad de FND sobre FAD no siempre es cierta, en el nabo tanto fresco como procesado ambos valores son próximos.

Se comparan estadísticamente los valores medios de FND y FAD obtenidos para cada muestra (nivel de significación  $\alpha = 0,05$ ). En el caso de los materiales frescos se observa lo siguiente: los valores de FND en zanahoria ( $1,974 \pm 0,119$ ) y remolacha ( $2,297 \pm 0,223$ ) son superiores a los de FAD ( $1,511 \pm 0,062$  y  $1,454 \pm 0,148$ ), siendo las diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en el nabo no se han encontrado diferencias entre los valores de FND ( $1,703 \pm 0,147$ ) y FAD ( $1,739 \pm 0,187$ ) para el mismo nivel de significación.

En el caso de los materiales procesados, los resultados de FND son próximos en la zanahoria ( $1,687 \pm 0,026$ ) y en el nabo ( $1,719 \pm 0,203$ ) a los de FAD ( $1,559 \pm 0,109$  y  $1,630 \pm 0,160$ ) y las diferencias no son significativas. Mientras que en la remolacha FND ( $2,004 \pm 0,257$ ) y FAD ( $1,165 \pm 0,077$ ) son estadísticamente distintos.

La eliminación de proteína residual no es una premisa de estos métodos, cuyo fundamento supone una total eliminación de la misma. Por tanto, si se comparan estadísticamente los valores de FAD y FND obtenidos después de proceder analíticamente a su eliminación en los residuos, se observa que todos los comentarios realizados anteriormente son aplicables a los nuevos datos, si bien estos son, lógicamente, algo inferiores.

### b) Estudio de las cenizas residuales en FAD y FND

En las tablas 6 y 7 se refleja la eficacia de la eliminación de cenizas por las soluciones detergentes en las muestras frescas y procesadas respectivamente. Dicha eficacia se ha calculado teniendo en cuenta los valores de cenizas presentes tanto en las muestras (g/100 g materia húmeda) como en los residuos detergentes (g/100 g de residuo).

En los residuos FAD, tanto en las muestras frescas como procesadas, se observa que la eliminación de cenizas es total; sin embargo, en los residuos FND, tanto de fresco como de procesado, dichas cenizas están presentes en todos los casos excepto en la zanahoria.

La capacidad de retención de elementos minerales está relacionada con la presencia de grupos carboxilo libres correspondientes a las moléculas de azúcares de los polisacáridos no celulósicos y también de la lignina (McConnell y col., 1974; Olds, 1978). La FND presenta ambos tipos de componentes mientras que en la FAD no cabe esperar la presencia de hemicelulosas. Podría suceder que la naturaleza de la FND como tal, presente mayor capacidad de retención que FAD, o bien que la solución ácido detergente solubilice más elementos minerales que la neutro detergente.

Entre los residuos de FND el que presenta mayor proporción de elementos minerales es la remolacha (fresca: 1,457% y procesada: 0,925%), a continuación nabo (fresco: 0,562% y procesado: 0,432%) y en el caso de la zanahoria no se han encontrado cenizas.

Para ver la eficacia en la eliminación de elementos minerales por parte de la solución neutro detergente se ha determinado la concentración inicial de cenizas en las tres hortalizas. Los valores medios de cenizas en los materiales frescos oscilan entre 0,626% para remolacha y 0,808% para nabo, presentando la zanahoria un valor intermedio de 0,734%. Los valores obtenidos en el procesado, son 0,466% para nabo y 0,559% para zanahoria presentando la remolacha un valor intermedio de 0,547%.

El porcentaje de eliminación calculado ha sido del 100% para la zanahoria (fresca y procesada), considerablemente elevado para el nabo (fresco = 98,87%; procesado = 98,41%)

y ligeramente inferior para la remolacha (fresca= 94,57%; procesada= 96,57%) (Tablas 6 y 7).

Se deduce que el porcentaje de eliminación de cenizas es siempre inferior en el caso de FND comparado con FAD, puesto que en este caso es total.

### c) Estudio de las proteínas residuales en FAD y FND

En las tablas 6 y 7 se refleja la eficacia de la eliminación de proteínas en los métodos detergentes, en las muestras frescas y procesadas respectivamente. Dicha eficacia se calcula teniendo en cuenta los valores de proteínas presentes tanto en las muestras (g/100 g materia húmeda) como en los residuos detergentes (g/100 g de residuo)

Algunos autores (Cummings, 1981 y Saura-Calixto y col. 1983) señalan como inconveniente de estos métodos la retención parcial de proteínas. Para comprobar lo que sucede en el caso particular de las muestras aquí estudiadas se determina la presencia de proteínas en los residuos FAD y FND.

Las tres hortalizas se comportan de forma diferente respecto a la cantidad de proteínas que no es solubilizada por los detergentes. La remolacha es la muestra que presenta mayor proporción en el residuo de FAD (fresca: 5,722% y procesada: 4,428%), sin embargo en zanahoria (fresca: 1,185% y procesada: 0,943%) y nabo (fresco: 1,321% y procesado: 1,073%) se obtienen contenidos muy similares. Los porcentajes de proteínas residuales en la FND de la remolacha (fresca: 6,619% y procesada: 5,839%) son, de nuevo, superiores a los de las otras dos hortalizas; dichos niveles de proteínas en zanahoria (fresca: 1,985% y procesada: 1,456%) son a su vez diferentes a los de nabo (fresco: 0,279% y procesado: 0,345%).

Las diferencias encontradas entre las proteínas residuales de ambos métodos detergentes son significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en gran parte de los casos.

Para poder calcular la eficacia en cuanto a la eliminación proteica de las soluciones

detergentes se requiere conocer los valores de proteínas totales en las muestras frescas, que oscilan entre 1,343% en remolacha y 2,530% en zanahoria, y en las procesadas entre 0.940% en remolacha y 1,427% en zanahoria. El nabo presenta valores intermedios en fresco (1,500%) y en procesado (1,333%).

Destaca el menor porcentaje de eliminación de proteínas en la remolacha, tanto en FAD (fresca = 93,75% y procesada = 93,54%) como en FND (fresca = 88,38% y procesada = 84,22%) respecto a las demás hortalizas que superan el 98% de eliminación para ambos métodos detergentes. Por tanto, se puede indicar que la eficacia de eliminación es elevada, y ligeramente superior en el método ácido detergente respecto al neutro detergente, excepto en el caso del nabo. Dicha eficacia depende no sólo del método empleado sino también de la muestra de que se trate en cada caso.

Con frecuencia no se le da importancia a la presencia de proteínas en los residuos detergentes debido a su baja proporción (Marlett y Lee, 1980). Es escaso el número de trabajos en los que se determina el contenido de proteínas en los residuos detergentes procedentes del análisis de alimentos.

La presencia de proteínas, se puede atribuir a razones de disposición estructural (Selvendran y Robertson, 1990), o a que el tratamiento detergente la modifique impidiendo su total solubilización.

Los valores de FAD y FND, así como los correspondientes a cenizas y proteínas, se encuentran representados en el gráfico 1 para las hortalizas frescas y en el gráfico 2 para las procesadas.

#### **2.1.1.2. Método enzimático-gravimétrico de Asp**

Recordando lo expuesto en la Parte General, este método data de 1983 y fue diseñado por Asp y col. que consideran como fibra alimentaria todos aquellos compuestos que resisten el

tratamiento enzimático con pepsina y pancreatina. Esta metodología permite separar estos compuestos en dos grandes grupos:

- Insolubles en agua = Fibra Insoluble (FI)
- Solubles en agua = Fibra Soluble (FS)

de manera que la suma de FI y FS da el valor de Fibra Total (FT).

En la tabla 8 figuran los valores obtenidos para fibra insoluble, soluble y total en las hortalizas frescas, y en la tabla 9 en las procesadas, expresados en g/100 g de materia húmeda. En las tablas 10 y 11 figuran los estadísticos generales para dichas muestras.

Los valores de FI se obtienen restando, al valor del residuo de fibra, la cantidad de cenizas y proteínas que permanecen después del tratamiento. El residuo soluble se corrige sustrayendo el valor de cenizas residuales.

Los análisis se hacen por cuadruplicado, destinando dos residuos de FI al análisis de proteínas y dos al análisis de cenizas. En los cuatro residuos de FS obtenidos se realiza la determinación de cenizas.

Este método permite una primera aproximación al estudio cualitativo de los componentes de la fibra alimentaria: FI es la suma de celulosa, hemicelulosas y lignina, y FS está constituido, principalmente, por los polisacáridos pécticos.

Durante un tiempo se pensó que los valores de FI y FS permitían predecir, con cierta aproximación, cual iba a ser el efecto fisiológico predominante originado por los componentes presentes en el residuo de la fibra alimentaria. Sin embargo, en la actualidad, aunque esta idea se mantiene en líneas generales, se insiste en la necesidad de comprobar con mayor exactitud la repercusión fisiológica de cada uno de los componentes de la fibra alimentaria (Eastwood, 1992).

#### a) Estudio de los resultados de fibra insoluble (FI) en las muestras analizadas

Al comparar los valores medios obtenidos para FI (g/100 g materia húmeda) en las tres

hortalizas frescas y procesadas (Tablas 10 y 11) se observa que los valores más elevados de FI los presenta la remolacha tanto fresca,  $2,413 \pm 0,204$ , como procesada,  $2,104 \pm 0,330$ . Los valores más bajos de FI son los que corresponden a zanahoria,  $1,253 \pm 0,026$  y  $1,346 \pm 0,085$ . El nabo presenta un valor intermedio próximo a zanahoria,  $1,445 \pm 0,118$  en el fresco y  $1,407 \pm 0,093$  en el procesado.

Es interesante comparar los resultados de fibra insoluble obtenidos al emplear el método enzimático y los métodos detergentes, por esta razón en primer lugar se comentará lo referente al estudio FI-FND y posteriormente FI-FAD (Tablas 4, 5, 10 y 11). La significación de las diferencias se establece para  $\alpha = 0,05$ .

En el caso de los materiales frescos, si se comparan los datos obtenidos por ambos métodos, las diferencias encontradas son estadísticamente significativas en zanahoria (FI =  $1,253 \pm 0,026$ , FND =  $1,974 \pm 0,119$ ) y nabo (FI =  $1,445 \pm 0,118$ , FND =  $1,703 \pm 0,147$ ), destacando además el hecho de que los valores de FND son superiores a los de FI en ambos casos. En remolacha ambos valores son semejantes (FI =  $2,413 \pm 0,204$  y FND =  $2,297 \pm 0,223$ ).

Para los materiales procesados no existen diferencias significativas, entre los valores alcanzados por ambos procedimientos, en ninguno de los casos: zanahoria (FI =  $1,346 \pm 0,085$  y FND =  $1,687 \pm 0,026$ ), remolacha (FI =  $2,104 \pm 0,330$  y FND =  $2,004 \pm 0,257$ ) y, finalmente, nabo (FI =  $1,407 \pm 0,093$  y FND =  $1,719 \pm 0,203$ ).

Si para la comparación se utilizan los valores de FND sin proteínas (Tablas 2 y 3) se observa que existen diferencias significativas en los tres materiales frescos y no se dan tales diferencias en ninguno de los materiales procesados. Así pues, la remolacha fresca es el único material cuya comparación entre FND y FI varía en función de la consideración o no del valor de proteína residual.

En la bibliografía estudiada pocas veces se realiza la comparación entre estos términos, pues lo que se ha venido realizando hasta el momento es la comparación de FND con FT, que se

expondrá más adelante. En el caso del espárrago los valores de FI son inferiores a los de FND en la parte apical y en la parte media del turión, mientras que en la zona basal es más elevada FI que FND (Redondo y col. 1990).

La aplicación de una metodología u otra origina diferencias significativas en los resultados y la bibliografía señala la presencia de otros componentes que pueden interferir. En el caso de los residuos de FND se indica la posible presencia de almidón (Morrison, 1980) y en los de FI la interferencia de taninos (Saura-Calixto 1987 y 1988) y se propone la corrección de taninos cuando se aplica el método de la AOAC a muestras especialmente ricas en este componente, ej. vainas de algarrobo y esparceta.

En el caso de los materiales procesados las enzimas utilizadas en el método FI serían tan eficaces como la solución neutro detergente para eliminar los compuestos que interfieren en zanahoria y nabo. En los materiales frescos, ni las enzimas del método de Asp ni la solución detergente pueden eliminar esos compuestos, de ahí las diferencias encontradas. En remolacha, ambos métodos FND y FI eliminan esas interferencias con la misma facilidad, tanto en fresco como en procesado.

En lo que se refiere a la comparación entre FI y FAD, se observa en las muestras frescas como zanahoria ( $FI = 1,253 \pm 0,026$ ,  $FAD = 1,511 \pm 0,062$ ) y nabo ( $FI = 1,445 \pm 0,118$ ,  $FAD = 1,739 \pm 0,187$ ) que no existen diferencias estadísticamente significativas, mientras que en remolacha sí se aprecian ( $FI = \underline{2,413 \pm 0,204}$ ,  $FAD = \underline{1,454 \pm 0,148}$ ).

Para el caso de las procesadas los resultados de FI y FAD son cuantitativamente semejantes en los tres casos, zanahoria ( $FI = 1,346 \pm 0,085$ ,  $FAD = 1,559 \pm 0,109$ ), remolacha ( $FI = 2,104 \pm 0,330$ ,  $FAD = 1,165 \pm 0,077$ ) y nabo ( $FI = 1,407 \pm 0,093$ ,  $FAD = 1,630 \pm 0,160$ ).

Si se utilizan para la comparación los datos de FAD una vez eliminadas las proteínas existentes en dichos residuos, se observan los mismos hechos que para el caso de FAD con proteína tanto en los materiales frescos como en los procesados de las tres hortalizas.

Al igual que sucede con la comparación FI-FND, pocas veces se encuentra en la bibliografía la comparación FI-FAD. En espárrago los valores de FI son claramente superiores a los de FAD (Redondo y col. 1990).

Como ya se indicaba en la Parte General, los compuestos encontrados con mayor frecuencia como contaminantes del residuo FAD son restos de polímeros hemicelulósicos y sustancias pécticas (Marlett y Lee, 1980; Morrison, 1980).

Los métodos detergentes y el método enzimático de Asp tienen diferentes fundamentos y fueron concebidos con diferentes fines. Los métodos detergentes para el análisis de alimentos para animales (forrajes) y los enzimático-gravimétricos para el análisis de alimentos para el hombre. Además, el método de Asp lleva implícita la consideración de la fibra alimentaria como una entidad con acción fisiológica en el organismo humano.

Por esto es muy útil comprobar si la determinación de fibra alimentaria por ambas metodologías da resultados próximos. Del análisis de los resultados obtenidos en este trabajo se comprueba que en el análisis cuantitativo de los materiales procesados, ambos métodos aportan resultados semejantes y, por tanto, cualquiera de dichos métodos podría resultar válido, mientras que en los frescos, en la mayoría de los casos, los resultados difieren en función de la metodología utilizada y por tanto la especificación del método seguido sería un factor importante a señalar.

b) Estudio de los resultados de fibra soluble (FS) en las muestras analizadas

Al comparar los valores obtenidos para FS (g/100 g materia húmeda) en las tres hortalizas (Tablas 8, 9, 10 y 11) se observa que el valor más elevado en las muestras frescas corresponde a remolacha ( $0,941 \pm 0,030$ ), a continuación zanahoria ( $0,774 \pm 0,194$ ) y, por último, al nabo ( $0,578 \pm 0,078$ ). En cuanto a las procesadas el orden se modifica, zanahoria ( $1,280 \pm 0,040$ ), remolacha ( $1,241 \pm 0,152$ ) y nabo ( $0,866 \pm 0,085$ ).

En principio, el componente mayoritario presente en estos residuos son las sustancias pécticas aunque puede haber otros componentes, fundamentalmente proteínas.

Para comparar el valor de fibra soluble con el obtenido para sustancias pécticas por métodos espectrofotométricos se ha realizado la determinación por medio del método del 3,5-dimetilfenol (Scott, 1979), que determina exclusivamente ácido galacturónico después de la hidrólisis de los polisacáridos pécticos y que se estudiará posteriormente.

### c) Estudio de las cenizas residuales en FI y FS

Se determina el contenido de cenizas en el residuo FI y en el FS. A partir de estos valores (g/100 g residuo) se calcula el porcentaje de cenizas de la muestra que permanece en el residuo y la eficacia del método de Asp (Tablas 12 y 13).

En los productos frescos el porcentaje de cenizas hallado en FI es inferior al encontrado en FS en los tres casos: remolacha (FI = 3,705%, FS = 10,308%), zanahoria (FI = 3,447%, FS = 10,258%) y nabo (FI = 3,193%, FS = 11,424%). Como puede apreciarse, el residuo FI de las tres muestras contiene una proporción similar de cenizas mientras que dentro del FS el valor más elevado corresponde a nabo, remolacha y zanahoria presentan valores semejantes y ligeramente más bajos. Por tanto, en dichas muestras FI y FS se comportan de diferente forma frente a la retención de elementos minerales.

Asímismo, en los procesados el porcentaje de cenizas residuales es más bajo en FI que en FS, obteniéndose diferencias importantes entre la cantidad de cenizas presente en dichos residuos: zanahoria (FI = 2,154%, FS = 7,052%), remolacha (FI = 1,775%, FS = 5,102%) y nabo (FI = 2,178%, FS = 7,664%).

Desde un punto de vista estadístico ( $\alpha = 0,05$ ), las cenizas residuales presentes en FI y FS son diferentes en la mayoría de los casos, si bien los porcentajes de FS son muy superiores porque la fibra soluble es menor que la insoluble y el tanto por ciento de cenizas es proporcionalmente mayor.

Si se expone lo anterior en términos de eficacia de eliminación de cenizas por el método enzimático de Asp para las fracciones FI y FS (Tabla 12) se observa que en los materiales frescos es muy similar para ambas: zanahoria (FI = 89,001% y FS = 89,096%), remolacha

(FI = 84,294% y FS = 82,783% ) y nabo (FI = 91,369% y FS = 90,376% ). En los procesados (Tabla 13) la eliminación es más elevada para FI que para FS, siendo la diferencia de un 9% para zanahoria, 5% para remolacha y 6% para nabo.

La comparación de los contenidos de cenizas en FI y en FND podría indicar si la capacidad que tienen celulosa, hemicelulosas y lignina para retener elementos minerales depende o no del tratamiento químico que están sufriendo dichos componentes (Tablas 6, 7, 12 y 13). De los resultados se deduce que la eliminación de cenizas por parte de estos tratamientos, químico y enzimático, es diferente en el caso de zanahoria (fresca y procesada) y de remolacha fresca mientras que ambos tratamientos tienen la misma eficacia remolacha procesada y en nabo (fresco y procesado).

#### d) Estudio de las proteínas residuales en FI

Las proteínas están presentes en el residuo FI, y para dar un valor correcto de dicho residuo, el método indica que hay que restarlas del peso total. Esto implica que el tratamiento enzimático no es suficiente para eliminar toda la proteína. La presencia de dicha proteína en el residuo tiene hoy día un papel controvertido en la definición de fibra alimentaria.

El contenido de proteínas (g/100 g de residuo) representa un porcentaje del residuo de FI muy variable dependiendo de la muestra de que se trate (Tablas 12 y 13). En el caso de las hortalizas frescas oscila desde un 42,142% en zanahoria hasta un 4,614% en remolacha, pasando por un valor intermedio de 24,460% en nabo. En los procesados hay un margen también bastante amplio, desde 32,088% en zanahoria hasta un 6,077% en remolacha, siendo del 19,797% en nabo.

La eficacia de la digestión proteica para las diferentes hortalizas, frescas y procesadas, es muy semejante en zanahoria y nabo, con unos porcentajes de eliminación de: zanahoria (fresca= 61,378% y procesada= 55,641%) y nabo (fresco= 67,247% y procesado= 73,226%), y bastante superiores en remolacha (fresca= 90,852% y procesada= 84,066%).

Las publicaciones en las que se detallan los valores de proteína presentes en los residuos son

escasas. En el espárrago, los valores de proteínas en la fibra insoluble obtenida por el método de Asp son semejantes a los presentes en el residuo FAD, y superiores en ambos casos a los obtenidos por el método FND (Redondo y col. 1990).

Cuando se comparan estadísticamente ( $\alpha = 0,05$ ) los valores de proteínas residuales encontrados en FI con los hallados en FAD y FND, se observan diferencias significativas en prácticamente todos los casos. Así pues, en todos los materiales la eficacia de los métodos detergentes en la eliminación de proteínas es superior a la del método enzimático-gravimétrico de Asp (Tablas 6, 7, 12 y 13).

La proteína es pues uno de los componentes en los que el diferente fundamento de cada método tiene mayor influencia. El tratamiento químico elimina gran cantidad de proteínas, mientras que el tratamiento enzimático deja una mayor proporción. La presencia de proteínas en el residuo FI puede ser debida a que no ha sido digerida por las enzimas utilizadas según las condiciones del método, es decir, es resistente a la hidrólisis, y ese hecho se utiliza para definirla como proteína resistente.

La interpretación de la presencia de proteína en los residuos de fibra alimentaria es controvertida. Como ya se explica en el apartado dedicado a la definición de fibra alimentaria, algunos autores (Asp, 1987) son partidarios de incluirla como componente de la fibra alimentaria mientras que otros se oponen a esto (Englyst y Cummings, 1988).

Los valores de fibra insoluble (FI) y de fibra soluble (FS) obtenidos por el método de Asp se representan en los gráficos 3 y 4 para las hortalizas frescas y procesadas respectivamente.

#### **2.1.1.3. Método cromatográfico (HPLC)**

Como ya se indicó en la parte general, Englyst define la fibra alimentaria como polisacáridos no almidón (NSP). El método por él diseñado en 1982, y modificado en los años 1984 y 1988, ha sido utilizado en alimentos para el hombre, aplicándolo al análisis de un gran

número de alimentos, dentro de los cuales se incluyen cereales, hortalizas, frutas y frutos secos.

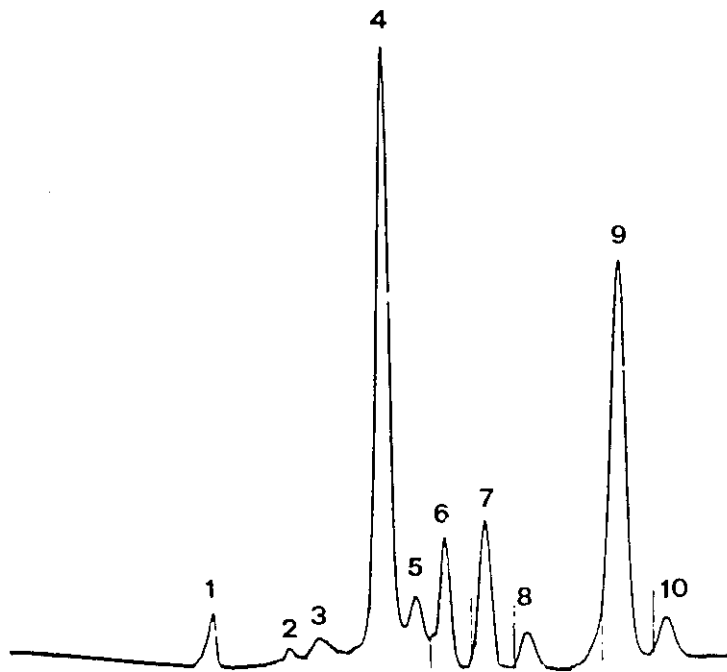
Este método permite identificar y cuantificar por cromatografía los monosacáridos que forman los polisacáridos no almidón que constituyen la fibra alimentaria. Se complementa con la determinación de las sustancias pécticas por espectrofotometría como se detalla en la Parte Experimental.

Las condiciones analíticas empleadas permiten la obtención de un cromatograma cuyo perfil es semejante en todas las muestras de hortalizas frescas y procesadas objeto de este trabajo (Cromatogramas del 8 al 13).

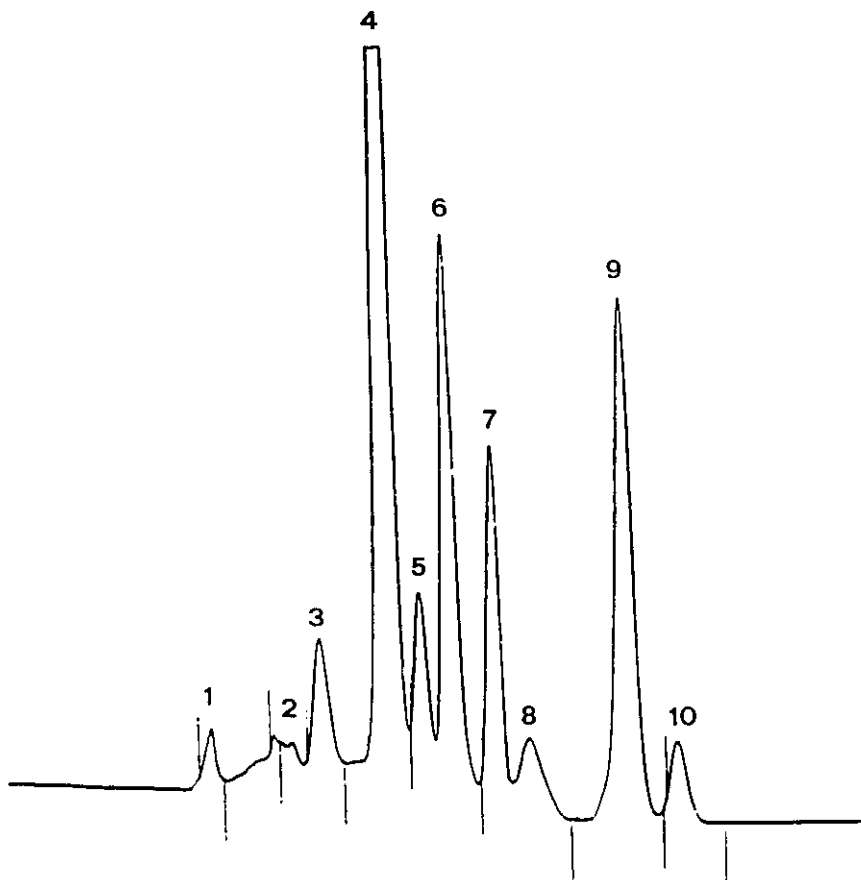
La columna utilizada, HPX-87P de BioRad, eluye en primer lugar oligosacáridos, a continuación monosacáridos y finalmente polialcoholes. En total se han detectado diez picos, de los cuales en la región correspondiente a oligosacáridos se presentan tres: 1, 2 y 3, en la zona de los monosacáridos neutros se identifican cinco: 4, 5, 6, 7 y 8, y dentro de los polialcoholes aparecen dos: 9 y 10.

De los trabajos encontrados en la bibliografía que utilizan un equipo de HPLC con las mismas condiciones aquí empleadas, Neilson y Marlett (1988) analizan manzana, salvado de trigo, guisante y un plato elaborado. El perfil cromatográfico que obtienen estos autores para sus muestras presenta tres picos antes de la glucosa, semejantes a los del presente estudio, que identifican como: celobiosa, celotriosa y productos de degradación de monosacáridos.

Cromatogramas obtenidos para los monosacáridos constituyentes  
de fibra alimentaria de zanahoria por HPLC

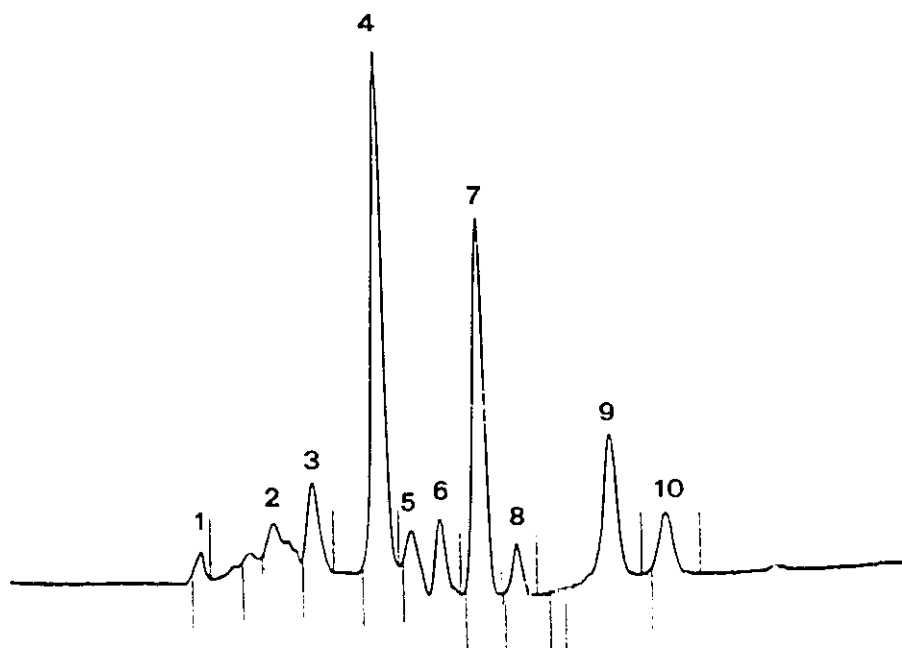


Cromatograma n°8. Zanahoria fresca

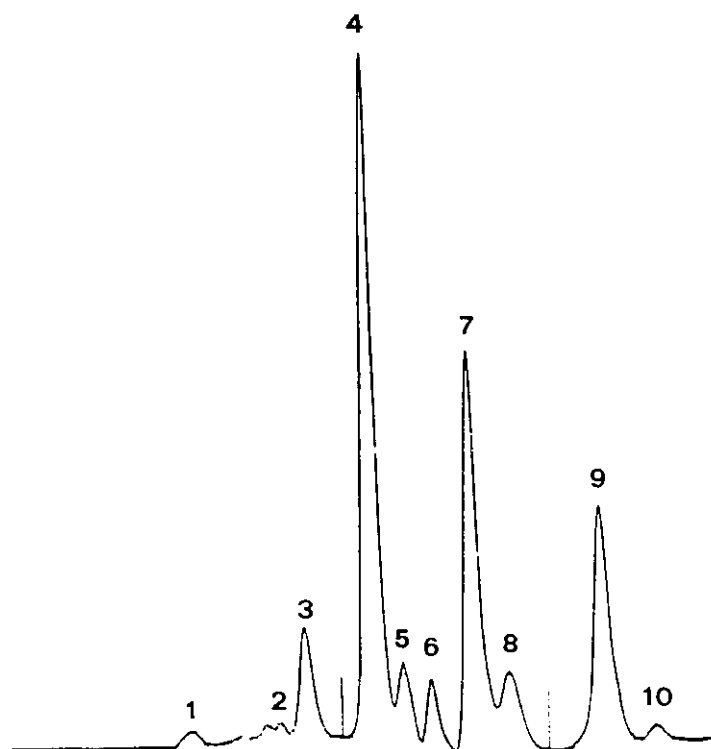


Cromatograma n°9. Zanahoria procesada

Cromatogramas obtenidos para los monosacáridos constituyentes de fibra alimentaria de remolacha por HPLC

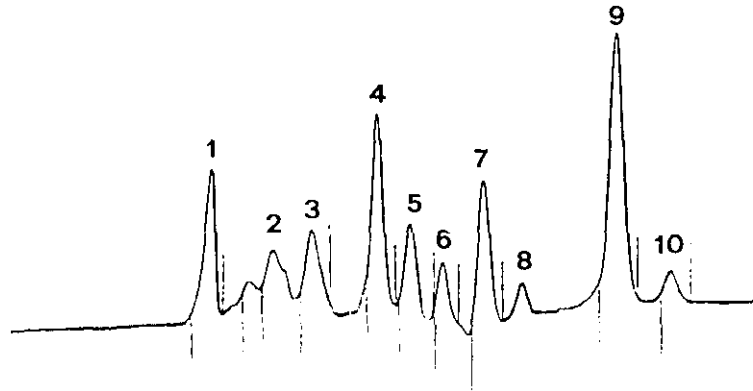


Cromatograma n°10. Remolacha fresca

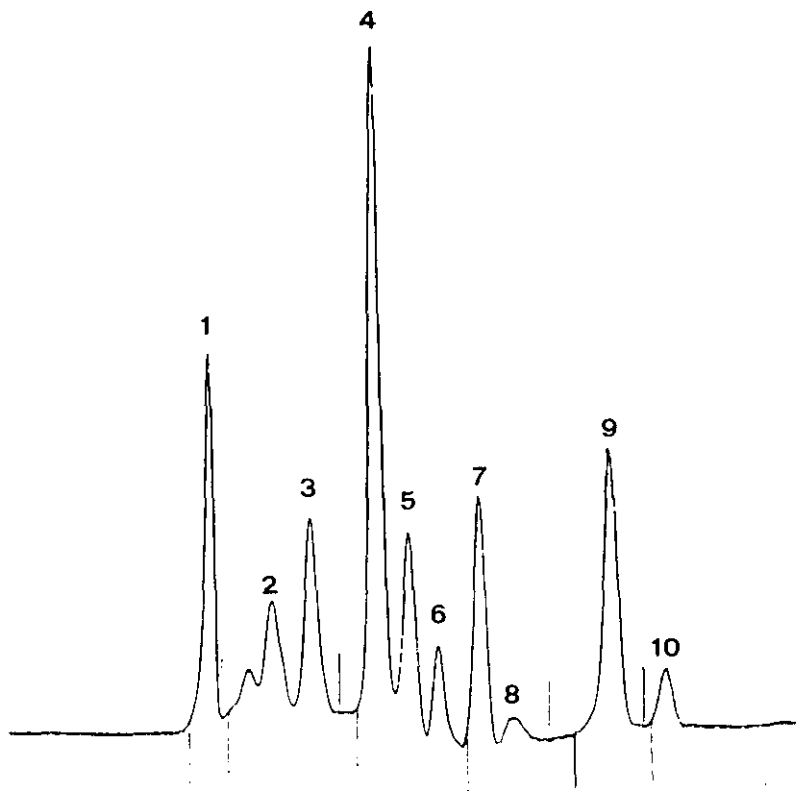


Cromatograma n°11. Remolacha procesada

Cromatogramas obtenidos para los monosacáridos constituyentes de fibra alimentaria de nabo por HPLC



Cromatograma n°12. Nabo fresco



Cromatograma n°13. Nabo procesado

Se ha confirmado la identificación de celobiosa (pico n° 3) y su presencia puede ser debida a una hidrólisis incompleta de celulosa que podría estar originada por la presencia de regiones más cristalinas en la molécula. El pico n° 2, aunque eluye al mismo tiempo que en el estudio de Neilson y Marlett, no ha podido ser identificado, dado que no existe patrón de celotriosa. Respecto al pico n° 1, estos autores piensan que puede tratarse de productos de degradación de monosacáridos que coeluyen al principio del cromatograma. En este trabajo se ha comprobado que aparece también en los cromatogramas correspondientes a la hidrólisis de patrones de polisacáridos (celulosa y xilano) y en los correspondientes a la mezcla de monosacáridos patrón sometidos a las mismas condiciones de hidrólisis que las muestras.

Se puede señalar que la forma que presenta el pico n° 1 es muy característica, ya que carece de pendiente de descenso, presentándose en su lugar una línea vertical. Este hecho se mantiene desde el primer momento que se empieza a utilizar la columna hasta que, avanzado el muestreo, la pérdida de resolución de la misma empieza a ser notoria.

A continuación se identifican los monosacáridos: glucosa (pico n° 4), xilosa (pico n° 5), galactosa/ramnosa (pico n°6), arabinosa (pico n° 7) y manosa (pico n° 8).

Después de los monosacáridos, en la región correspondiente a los polialcoholes, el primer pico que aparece es el eritritol que ha sido utilizado como patrón interno (pico n° 9). Más tarde se encuentra un pico (n° 10) que no figura en los cromatogramas presentados por Neilson y Marlett (1983). Está a continuación del eritritol pero no ha podido ser identificado.

La celobiosa y la glucosa proceden de los polisacáridos celulósicos, si bien una pequeña proporción de glucosa puede corresponder a polisacáridos no celulósicos. El resto de los monosacáridos proceden de polisacáridos no celulósicos: hemicelulosas y sustancias pécticas. La suma de todos éstos da un valor de polisacáridos no almidón (NSP), propuesto por Englyst como definición de fibra alimentaria.

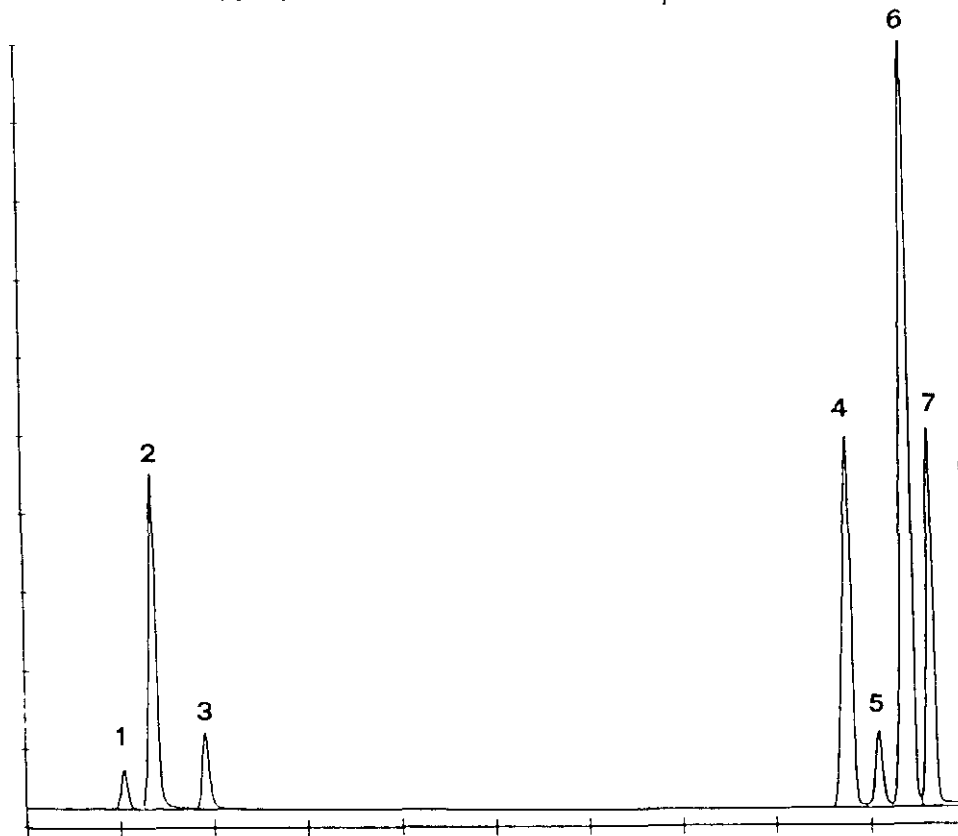
Con el fin de completar la investigación es interesante comentar los estudios correspondientes a cromatografía de gases (GLC) que se han realizado en el centro CIVO-TNO de Zeist

(Holanda). Se han analizado tanto las muestras frescas como las procesadas y se han obtenido los cromatogramas correspondientes (Cromatogramas del 14 al 19).

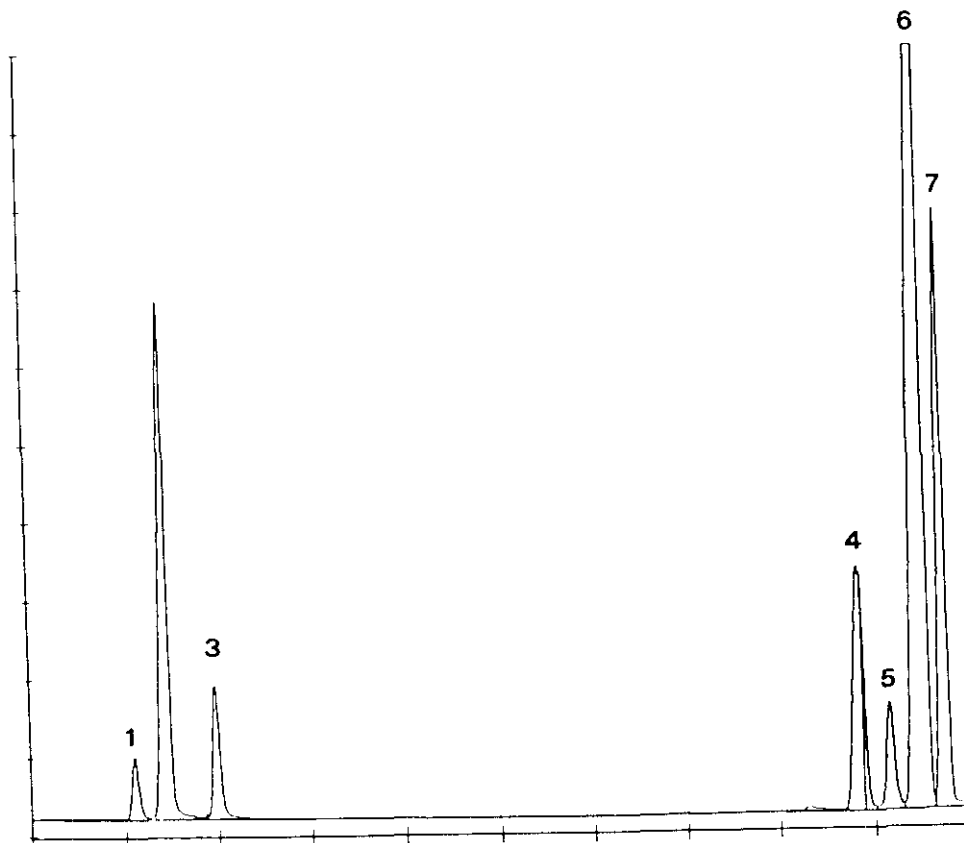
En esta técnica sólo se detectan los picos correspondientes a monosacáridos. El orden de elución, como ya se dijo en la parte experimental, es: ramnosa, arabinosa, xilosa, mio-inositol, manosa, glucosa y galactosa.

Se observa que la resolución es muy buena, separándose la ramnosa correctamente. El tiempo del cromatograma es largo, transcurriendo un periodo importante desde que aparece la xilosa hasta el m-inositol. La fucosa, que aparece en algunos vegetales (Englyst y Cummings, 1988), no se detecta con este sistema cromatográfico para las hortalizas objeto de este estudio. De estos cromatogramas no se puede obtener información adicional sobre celobiosa.

Cromatogramas obtenidos para los monosacáridos constituyentes  
de fibra alimentaria de zanahoria por GLC

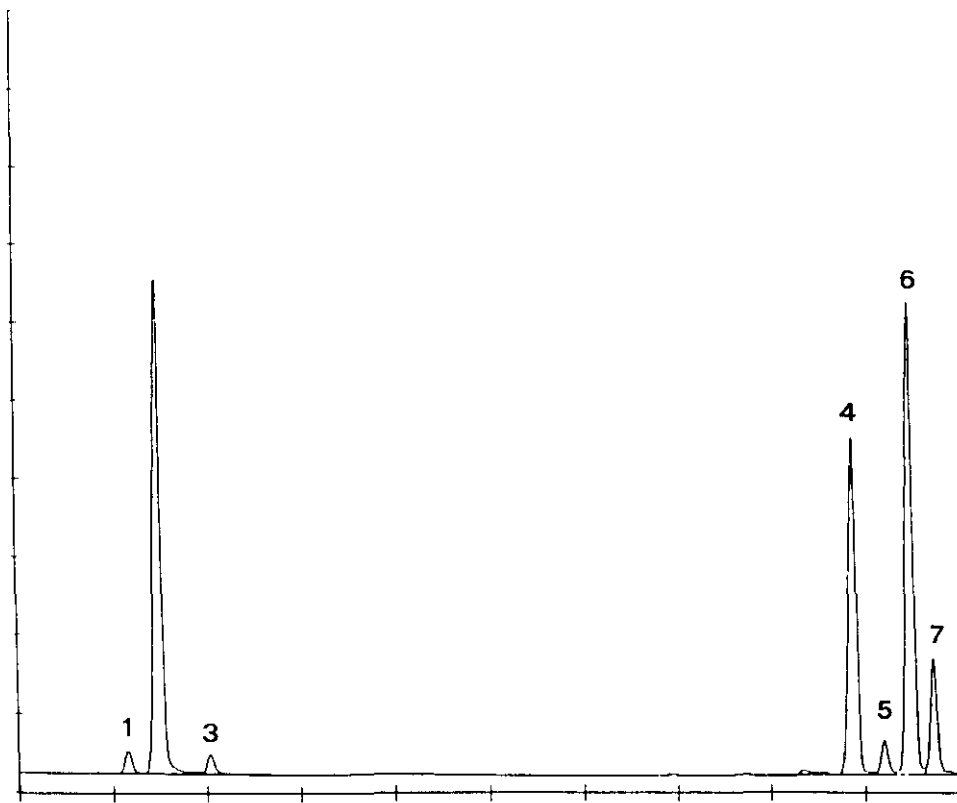


Cromatograma nº14. Zanahoria fresca

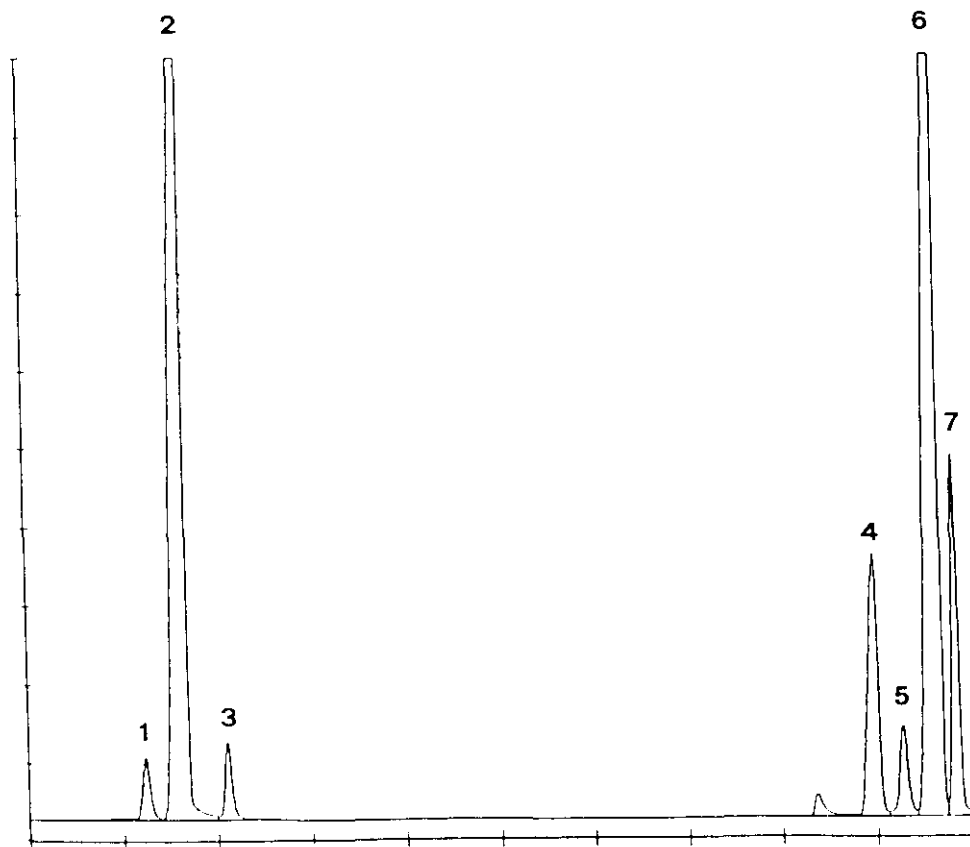


Cromatograma nº15. Zanahoria procesada

Cromatogramas obtenidos para los monosacáridos constituyentes  
de fibra alimentaria de remolacha por GLC

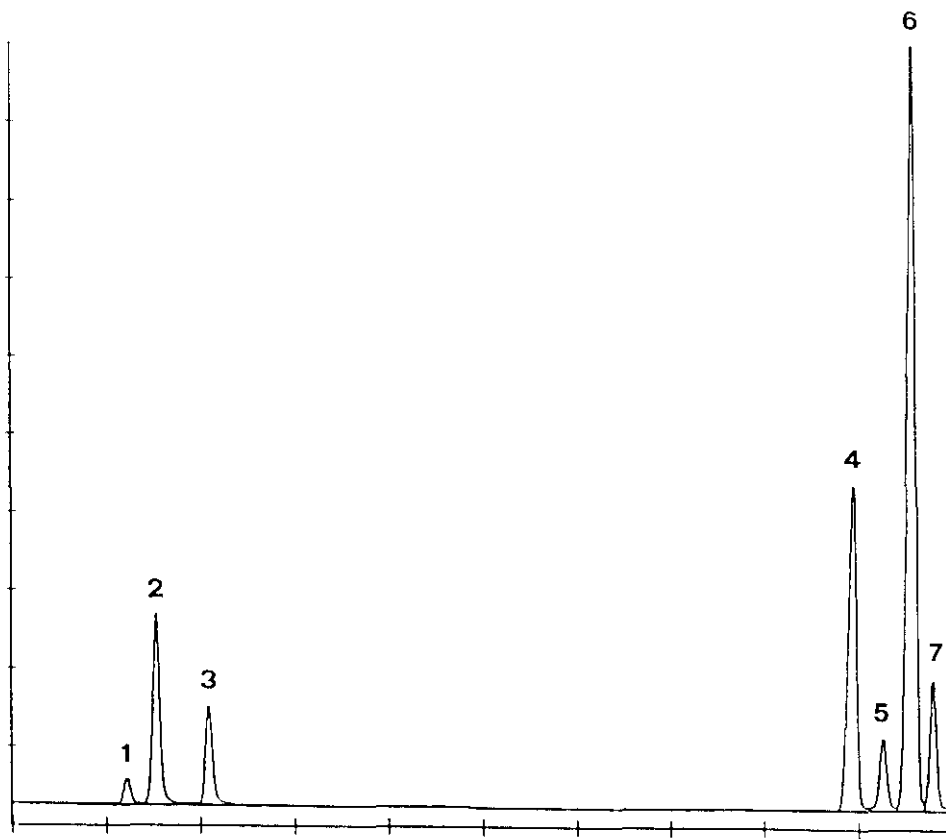


Cromatograma nº16. Remolacha fresca

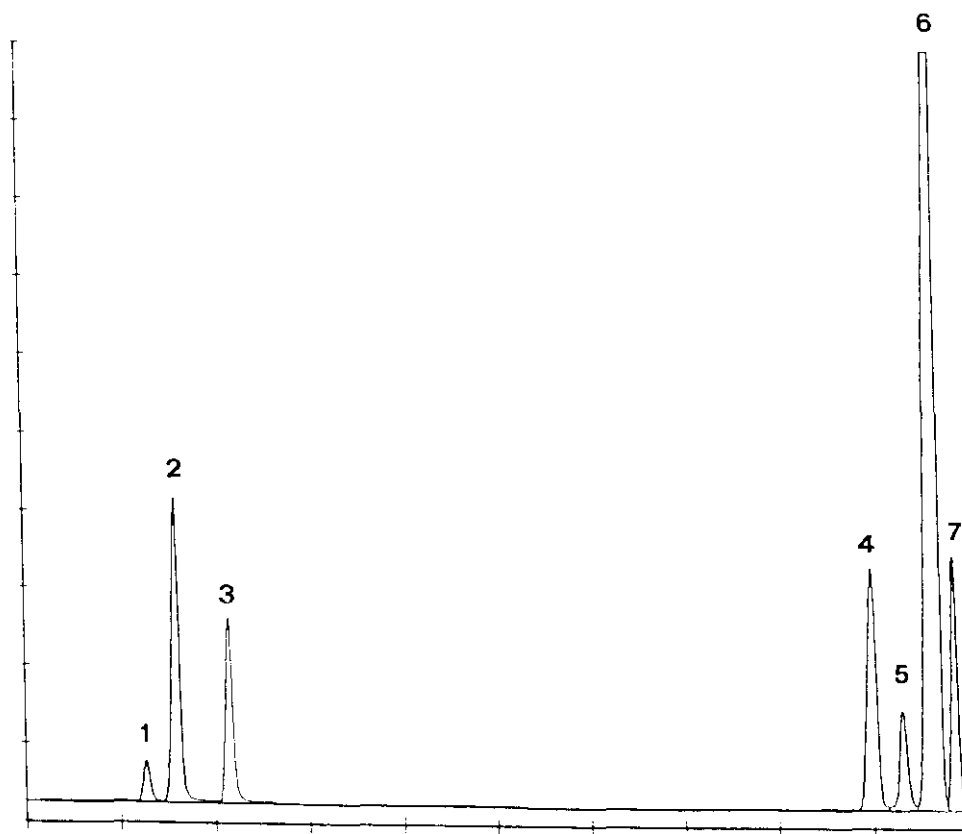


Cromatograma nº17. Remolacha procesada

Cromatogramas obtenidos para los monosacáridos constituyentes  
de fibra alimentaria de nabo por GLC



Cromatograma n°18. Nabo fresco



Cromatograma n°19. Nabo procesado

a) Estudio de monosacáridos

Los resultados obtenidos, expresados en g/100 g de materia húmeda, para cada monosacárido figuran en las tablas 14 y 15, y la suma total de los mismos en la tablas 16, 17, correspondientes a las muestras frescas y procesadas. Se han corregido las pérdidas sufridas durante la hidrólisis, y para ello, se ha multiplicado el valor obtenido para cada monosacárido por un factor calculado a partir del tanto por ciento de recuperación de cada uno de los patrones después de la hidrólisis ácida.

En las tablas 16 y 17 se hace referencia a los valores medios y otros estadísticos generales de la suma total de azúcares neutros para las tres hortalizas, frescas y procesadas, respectivamente. En los materiales frescos la remolacha presenta el contenido medio más elevado,  $1,422 \pm 0,226$ , a continuación el nabo,  $1,285 \pm 0,153$  y, por último la zanahoria con los valores medios más bajos  $0,979 \pm 0,168$ . En los productos procesados se mantiene la misma secuencia, obteniéndose los siguientes valores medios, remolacha  $1,599 \pm 0,166$ , nabo  $1,413 \pm 0,013$  y zanahoria  $1,149 \pm 0,081$ .

Si se refieren las concentraciones obtenidas de cada monosacárido al valor total de los mismos, la distribución, expresada en porcentaje, de cada monómero figura en los siguientes cuadros. En las hortalizas frescas:

**Cuadro n° 1. Distribución de monosacáridos en las hortalizas frescas (%).**

	ZANAHORIA	REMOLACHA	NABO
<b>Celobiosa</b>	6,231	4,216	5,288
<b>Glucosa</b>	43,104	39,283	55,832
<b>Xilosa</b>	4,494	2,600	7,154
<b>Gal/Ram</b>	24,208	12,790	12,286
<b>Arabinosa</b>	18,080	38,158	14,386
<b>Manosa</b>	3,882	2,881	4,977

Como puede apreciarse por los datos reflejados en este cuadro, la zanahoria tiene como azúcar mayoritario la glucosa, seguido de galactosa/ramnosa y arabinosa, y proporciones

inferiores de celobiosa, xilosa y manosa.

En la remolacha predominan glucosa y arabinosa que alcanzan porcentajes similares; en cantidades más bajas se encuentran la galactosa/ramnosa y, finalmente, celobiosa, manosa y xilosa con contenidos más próximos.

Los resultados obtenidos en el nabo indican un elevado contenido de glucosa con respecto a los demás azúcares; concentraciones muy similares y sensiblemente inferiores de arabinosa y galactosa/ramnosa, y en proporciones más escasas aparecen xilosa, celobiosa y manosa.

En las hortalizas procesadas los porcentajes son:

**Cuadro n° 2. Distribución de monosacáridos en las hortalizas procesadas (%).**

	ZANAHORIA	REMOLACHA	NABO
<b>Celobiosa</b>	5,570	5,000	5,635
<b>Glucosa</b>	36,989	40,188	60,057
<b>Xilosa</b>	3,742	3,000	7,418
<b>Gal/Ram</b>	27,241	11,813	10,128
<b>Arabinosa</b>	23,499	36,125	11,912
<b>Manosa</b>	2,959	3,813	4,280

Aparece una situación muy semejante a la observada en las muestras frescas, si bien las proporciones se modifican, se mantiene exactamente el mismo orden de participación de los azúcares en las tres hortalizas.

Los resultados obtenidos para cada uno de los monosacáridos se representan en los gráficos 5 y 6 para las hortalizas frescas y procesadas, respectivamente.

**b) Estudio de los polisacáridos**

Para expresar los monosacáridos en forma de polisacáridos se multiplican por un factor que corrige la pérdida de agua y cuyo valor es de 0,90 para hexosas y 0,88 para pentosas.

Los valores medios de polisacáridos celulósicos, no celulósicos y la suma de ambos obtenidos en cada hortaliza, tanto frescas como procesadas, figuran en las tablas 22 y 23, respectivamente, y los estadísticos generales en las tablas 24 y 25.

Considerando el valor total se puede conocer qué tanto por ciento representan los polisacáridos celulósicos y los no celulósicos. Para los materiales frescos se obtienen los siguientes porcentajes:

**Cuadro n° 3. Distribución de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en las hortalizas frescas (%)**

	ZANAHORIA	REMOLACHA	NABO
<b>Polisacáridos celulósicos</b>	49,773	44,025	61,558
<b>Polisacáridos no celulósicos</b>	50,227	55,975	38,442

Se observa que cada hortaliza presenta una relación diferente entre los polisacáridos celulósicos y no celulósicos. El nabo, que tiene histológicamente un crecimiento secundario normal, presenta una mayor proporción de polisacáridos celulósicos, prácticamente el doble de los polisacáridos no celulósicos. A estos resultados contribuye la gran proporción de glucosa, y la escasa cantidad de arabinosa en relación con la remolacha y de galactosa/ramnosa en relación con zanahoria.

En zanahoria y remolacha, de crecimiento secundario anómalo, se presenta una situación diferente a la anterior, predominan los polisacáridos no celulósicos frente a los celulósicos; mientras que en la zanahoria no hay gran diferencia entre ambas fracciones, en remolacha es más importante la proporción de polisacáridos no celulósicos respecto a los celulósicos.

En los materiales procesados los porcentajes calculados son los siguientes figuran en el siguiente cuadro:

**Cuadro n° 4. Distribución de polisacáridos celulósicos y no celulósicos en las hortalizas procesadas (%).**

	<b>ZANAHORIA</b>	<b>REMOLACHA</b>	<b>NABO</b>
<b>Polisacáridos celulósicos</b>	41,380	45,772	65,747
<b>Polisacáridos no celulósicos</b>	58,620	54,228	34,254

Se deduce que las proporciones entre estos componentes se mantienen con respecto al caso anterior. En el nabo predomina el porcentaje de polisacáridos celulósicos sobre los no celulósicos, y en el caso de la remolacha y la zanahoria la proporción de polisacáridos no celulósicos es superior a la de celulósicos.

Como ya se señalaba anteriormente, los polisacáridos celulósicos pueden ser evaluados como la suma de celobiosa y glucosa. Si se admite el total de polisacáridos celulósicos de esta forma se puede determinar en qué tanto por ciento se encuentran la celobiosa y la glucosa dentro del total. Para las hortalizas frescas:

**Cuadro n° 5. Distribución de celobiosa y glucosa en los polisacáridos celulósicos de las hortalizas frescas (%).**

	<b>ZANAHORIA</b>	<b>REMOLACHA</b>	<b>NABO</b>
<b>Celobiosa</b>	13,242	10,178	9,142
<b>Glucosa</b>	86,758	89,822	90,858

En general, las proporciones son similares para las tres hortalizas, si bien el mayor porcentaje de celobiosa dentro de los polisacáridos celulósicos lo presenta la zanahoria, a continuación remolacha y, por último, nabo.

Para las hortalizas procesadas:

**Cuadro n° 6: Distribución de celobiosa y glucosa en los polisacáridos celulósicos de las hortalizas procesadas (%).**

	ZANAHORIA	REMOLACHA	NABO
<b>Celobiosa</b>	13,740	11,603	9,004
<b>Glucosa</b>	86,260	88,397	90,996

Las proporciones son semejantes a las muestras frescas, oscilando el porcentaje de celobiosa de entre un 9 y un 14% del total de los polisacáridos celulósicos.

La distribución de polisacáridos celulósicos y no celulósicos, indicando la composición de los primeros, se representan en los gráficos 7 y 8 para la zanahoria fresca y procesada, 9 y 10 para la remolacha fresca y procesada, y 11 y 12 para nabo fresco y procesado. En los gráficos del 13 al 18 se refleja la misma distribución pero mostrando, en este caso, la composición de los polisacáridos no celulósicos.

Dentro de los polisacáridos no celulósicos se consideran los siguientes monosacáridos neutros: xilosa, galactosa/ramnosa, arabinosa y manosa. La proporción de cada uno de ellos respecto al total, en las muestras frescas es:

**Cuadro n° 7. Distribución de monosacáridos en los polisacáridos no celulósicos de las hortalizas frescas (%).**

	ZANAHORIA	REMOLACHA	NABO
<b>Xilosa</b>	8,824	4,635	18,243
<b>Gal/Ram</b>	48,190	23,034	31,982
<b>Arabinosa</b>	35,294	67,135	36,712
<b>Manosa</b>	7,692	5,197	13,063

Los monosacáridos que se encuentran en proporciones más elevadas en los diferentes materiales son galactosa/ramnosa y arabinosa. En zanahoria el porcentaje de galactosa/ramnosa es superior al de arabinosa. En remolacha y nabo es mayoritaria la arabinosa, invirtiéndose las proporciones con respecto a la zanahoria, siendo los porcentajes

de participación más distantes en el caso de remolacha.

Por la bibliografía se conoce que los monosacáridos ramnosa y galactosa proceden fundamentalmente de sustancias pécticas, y si se considera el porcentaje de dichas sustancias, expresado en ácido galacturónico, que figura en las tablas 26, 27, 28 y 29, se observa que la zanahoria es la muestra que presenta un valor más alto.

Con respecto a la relación galactosa/ramnosa, si se tienen en cuenta los datos de cromatografía gaseosa (Tablas 20 y 21) la proporción de galactosa representa un 90,064% dentro de la mezcla de galactosa/ramnosa y la ramnosa un 9,935% en la zanahoria; en la remolacha, 80,909% y 19,091% y en nabo 82,114% y 17,886%.

La xilosa y la manosa son azúcares minoritarios, sobre todo en remolacha y en zanahoria, estando en el nabo la proporción más equilibrada con respecto al resto de los monosacáridos. No obstante, la manosa está en proporción inferior a la xilosa en zanahoria y nabo, y en la remolacha ligeramente superior.

En lo que a los procesados se refiere, los porcentajes calculados son:

**Cuadro n° 8. Distribución de monosacáridos en los polisacáridos no celulósicos de las hortalizas procesadas (%).**

	ZANAHORIA	REMOLACHA	NABO
<b>Xilosa</b>	6,040	5,412	24,654
<b>Gal/Ram</b>	44,831	21,907	28,802
<b>Arabinosa</b>	44,190	65,593	33,871
<b>Manosa</b>	4,930	7,088	12,673

En zanahoria, los porcentajes de galactosa/ramnosa y de arabinosa son muy semejantes entre sí y muy elevados respecto a xilosa y manosa. En remolacha destaca la superioridad de la arabinosa, en menor proporción galactosa/ramnosa, y las diferencias de contribución de la xilosa y manosa respecto a la arabinosa son bastante importantes. En nabo, la participación

de arabinosa, galactosa/ramnosa y xilosa es bastante parecida, siendo la manosa la que más se distancia, si bien las diferencias no son tan acusadas como en las muestras anteriores.

Según los datos obtenidos por cromatografía de gases (Tablas 20 y 21), el porcentaje que galactosa y ramnosa representan dentro de la mezcla de estos dos azúcares es el siguiente: zanahoria, 90,341% y 9,659%; remolacha, 83,665% y 16,335%, y nabo, 85,926% y 14,074%.

El valor que Englyst considera de fibra alimentaria es el que corresponde a la suma de celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas que forman los polisacáridos no almidón (NSP) y que se discutirá en el apartado correspondiente a fibra total.

c) Comparación de los resultados obtenidos de fibra alimentaria por cromatografía y métodos gravimétricos

Puesto que el método neutro detergente no indica la determinación de sustancias pécticas, para comparar los valores obtenidos con los correspondientes al método de HPLC se considera en este caso la suma de polisacáridos celulósicos y polisacáridos no celulósicos. El nivel de significación establecido para las diferencias encontradas es de  $\alpha = 0,05$ .

Al comparar FND con la suma de polisacáridos, se observa que en el caso de los materiales frescos, las diferencias son estadísticamente significativas. Sin embargo, en el caso de los procesados hay diferencias estadísticamente significativas en la zanahoria, pero en la remolacha y el nabo no se han encontrado diferencias entre los valores correspondientes a cada una de ellas.

Las diferencias, en los casos en que se presentan, son lógicas dado que en el FND se incluye, en principio, lignina. Se podría indicar una mayor proporción de lignina en los materiales frescos que en los materiales procesados así como la presencia de determinados compuestos retenidos por el residuo FND: sustancias pécticas (Redondo y col., 1990; Wolters y col., 1992), almidón (Wolters y col., 1992) y proteína (Redondo y col., 1990). Además es importante tener en cuenta que HPLC es un método directo que permite la cuantificación

individual de componentes, mientras que FND es una gravimetría.

En los casos en que se presenta igualdad se podría comentar la existencia de una menor proporción de lignina en el FND y una menor presencia de otros componentes que contaminan el FND.

Al realizar la comparación entre los valores de hemicelulosas obtenidos como diferencia entre FND y FAD y los obtenidos por HPLC se observa que, en los materiales frescos no hay diferencia estadísticamente significativa para zanahoria y remolacha, siendo diferentes los valores de ambas metodologías para el nabo. En los procesados la comparación da los mismos resultados.

Con respecto a la comparación de los resultados obtenidos por HPLC y por el método enzimático para FI se observa que, a pesar de la controversia existente entre los dos métodos en cuanto a las sustancias cuantificadas por cada uno de ellos, los resultados obtenidos no dan diferencias estadísticamente significativas para los materiales de zanahoria fresca y de las tres hortalizas procesadas. En remolacha y nabo fresco no hay evidencia de que los resultados obtenidos por ambas metodologías sean iguales. Las diferencias podrían justificarse en función de la presencia de determinados compuestos en el residuo FI.

Ahora bien, no sólo cabe hablar en términos de dificultades para eliminar determinados compuestos interferentes, también se puede pensar, aunque esto no parece que sea probable, en una cierta actividad hemicelulásica de las enzimas empleadas en el método de Asp (Theander, 1990), y de una cierta solubilización de compuestos como la lignina por parte de la solución detergente neutra. Estos fenómenos, sobre todo el último, de magnitud desconocida en las muestras estudiadas, puede tener alguna importancia a la hora de hacer la comparación.

#### 2.1.1.4. Método espectrofotométrico para sustancias pécticas: 3,5-dimetilfenol

Como ya se indicó en la parte experimental, se ha realizado una modificación del método propuesto por Scott en 1979.

En una solución ácida fuerte los carbohidratos sufren reacciones de condensación con gran número de sustancias dando productos coloreados que se pueden medir espectrofotométricamente. El 3,5-dimetilfenol es un reactivo altamente selectivo para el compuesto que se forma al tratar el ácido urónico con ácido sulfúrico: 5-formil-2-furancarboxialdehído (5FF), en presencia de los productos de reacción de hexosas y pentosas. Este fenol presenta además de elevada selectividad una buena sensibilidad.

Los valores de ácido galacturónico (g/100 g materia húmeda) obtenidos para las hortalizas frescas figuran en las tablas 26 y 28, y los obtenidos para las procesadas figuran en las tablas 27 y 29.

El análisis de las hortalizas frescas ofrece unos valores medios muy próximos entre sí. La zanahoria presenta los más altos,  $0,545 \pm 0,017$ , seguida de remolacha,  $0,400 \pm 0,049$ , y nabo,  $0,339 \pm 0,012$ . En el caso de las hortalizas procesadas las cifras medias obtenidas han sido: zanahoria,  $0,470 \pm 0,042$ ; remolacha,  $0,312 \pm 0,022$  y nabo:  $0,253 \pm 0,018$ .

Si se comparan estadísticamente estos resultados con los obtenidos para FS se observa que en zanahoria y nabo frescos ambos valores son iguales mientras que, en remolacha fresca y en los tres procesados difieren significativamente.

En los casos en que hay diferencias siempre la fibra soluble (FS) es superior al valor de sustancias pécticas determinado espectrofotométricamente (SP). El resultado de SP representa un porcentaje variable del valor de FS que figura en el siguiente cuadro:

**Cuadro n° 9. Porcentaje de SP en SF en las hortalizas frescas y procesadas.**

	<b>FRESCO</b>	<b>PROCESADO</b>
<b>Zanahoria</b>	70,413	36,637
<b>Remolacha</b>	42,614	25,041
<b>Nabo</b>	58,651	29,225

La superioridad de FS sobre SP se debe a la presencia de otros compuestos distintos de las sustancias pécticas, como proteínas, que precipitan con etanol y se valoran como fibra soluble.

#### **2.1.1.5. Estudio de los valores de fibra total**

Los resultados obtenidos para la discusión de este apartado, expresados en g/100 g de materia húmeda, para las muestras frescas y procesadas, se recogen en las tablas 30, 31, 32 y 33.

##### **a) Estudio de los valores de FND + SP**

Los métodos detergentes no suponen la determinación de fibra total y para suplir este inconveniente se han sumado los valores de FND y los de sustancias pécticas (SP).

En las hortalizas frescas los resultados son muy próximos entre sí, correspondiendo a la remolacha los valores más elevados:  $2,657 \pm 0,264$ , seguida de zanahoria:  $2,465 \pm 0,128$  y, por último nabo:  $2,008 \pm 0,156$ . En las hortalizas procesadas, nuevamente la remolacha presenta los resultados más altos:  $2,284 \pm 0,274$ , a continuación el nabo:  $1,947 \pm 0,219$  y, por último la zanahoria:  $2,110 \pm 0,023$ .

El porcentaje de sustancias pécticas dentro del valor total de fibra considerado como FND+SP representa en los materiales frescos el 20,305% en zanahoria, 15,368% en nabo y 14,388% en remolacha. En el caso de los procesados los porcentajes son: 20,184% para zanahoria, 16,305% para remolacha y 15,309% para nabo.

De las proporciones anteriormente comentadas se observa que la mayor contribución de sustancias pécticas al valor de fibra total corresponde a la muestra cuyo valor de SP es más elevado y el menor a la muestra cuyo valor de SP es el más bajo para el caso de los materiales frescos. En el caso de los procesados ocurre lo mismo.

b) Estudio de los valores de FT

Los valores de FT se obtienen mediante la suma de FI y FS. Por lo dicho hasta el momento se puede deducir que el valor más elevado de FT lo presenta remolacha (fresco =  $3,354 \pm 0,198$ , procesado =  $3,345 \pm 0,476$ ), a continuación zanahoria (fresco =  $2,027 \pm 0,176$ , procesado =  $2,626 \pm 0,102$ ) y nabo (fresco =  $2,023 \pm 0,182$ , procesado =  $2,273 \pm 0,177$ ).

c) Comparación de los valores de FT con FND+SP

Cuando se comparan los valores de FT con FND+SP para un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$  se observa que las diferencias entre dichas metodologías están en función de la muestra que se analice. En la zanahoria, los valores de FND+SP obtenidos en las muestras frescas son significativamente superiores a los FT, mientras que en las procesadas las diferencias no son significativas; en la remolacha, ocurre lo contrario, ya que los valores de FND+SP son significativamente inferiores a los de FT, tanto en las muestras frescas como procesadas. Finalmente, en el nabo se obtiene igualdad de medias entre los valores calculados por ambos métodos, tanto en el material fresco como procesado.

d) Comparación de los valores de FT con FAD

De la valoración de los resultados obtenidos por ambos métodos se observa, como es lógico, que hay diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en todos los casos, excepto en la zanahoria fresca.

e) Comparación de los valores de FT con FND

Algunos autores comparan los valores de FT con los valores de FND para evaluar el comportamiento de estas dos metodologías. En el estudio presente la comparación señala diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en todas las muestras excepto en la zanahoria fresca en

la que se ha encontrado igualdad de medias.

Visser y Gurnsay (1986) analizan numerosas hortalizas y frutas por el método de la AOAC (TDF) y por el método neutro detergente obteniendo resultados poco concluyentes. Así, en algunas muestras (melocotón, nectarina, albaricoque y cereza) los valores de TDF son superiores a FND, mientras que en otras (manzanas de diferentes variedades, tamarindo, feijoa, kiwi, guisante, judía verde, maíz y cebolla) se observa lo contrario.

Redondo y col. (1987) estudian el contenido de fibra alimentaria en berenjena y calabacín por el método de Asp y por el método neutro detergente. En ambas muestras el valor de FT es superior al valor de FND.

#### f) Comparación de los valores de FT y NSP

Para hacer esta comparación, se suman a los valores de los polisacáridos celulósicos y no celulósicos, obtenidos por HPLC, y los de sustancias pécticas para obtener NSP. Los valores de FT son siempre superiores a los de NSP. Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ) para todos los casos, excepto en remolacha procesada.

Las diferencias, aparte de todos los comentarios anteriores, se pueden atribuir a la gran variación que existe en el valor de sustancias pécticas determinadas por el método de Asp (FS) y por el método espectrofotométrico (SP).

La comparación de los valores de fibra total, obtenidos por distintos métodos, se representa en el gráfico 19 para las hortalizas frescas y en el 20 para las procesadas.

Finalmente, al comparar los estadísticos RSD (Tablas 32 y 33), expresados en coeficientes de variación (CV), obtenidos en la determinación de fibra alimentaria total por los diferentes procedimientos anteriormente mencionados en las distintas hortalizas, se comprueba que en los materiales frescos la metodología que ha supuesto mayor variabilidad ha sido la cromatografía líquida de alta eficacia: zanahoria, CV = 21,00%; remolacha, CV = 25,60%; nabo, CV = 17,10%, frente a los otros dos procedimientos en donde los valores oscilan en

un intervalo de coeficientes de variación comprendido entre 9,00 y 17,20%. Sin embargo en los procesados la menor dispersión procede del mismo método de análisis: zanahoria, CV= 3,90%; remolacha, CV= 1,78%; nabo, CV= 1,40%, frente a las otras determinaciones en las que los intervalos de variabilidad alcanzan valores del 24.60%.

## **2.1.2. Estudio de los resultados obtenidos para azúcares solubles**

### **2.1.2.1. Método cromatográfico (HPLC)**

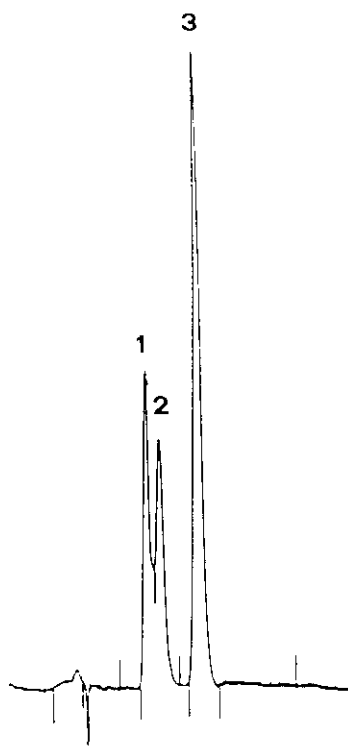
El método de HPLC, a diferencia del método colorimétrico que se verá a continuación, permite la separación de los azúcares solubles presentes en las muestras. Las hortalizas estudiadas se caracterizan por presentar en todos los casos fructosa, glucosa y sacarosa.

Las condiciones cromatográficas utilizadas permiten obtener un perfil cromatográfico para cada una de las muestras estudiadas que figura en los cromatogramas n°20 al 25.

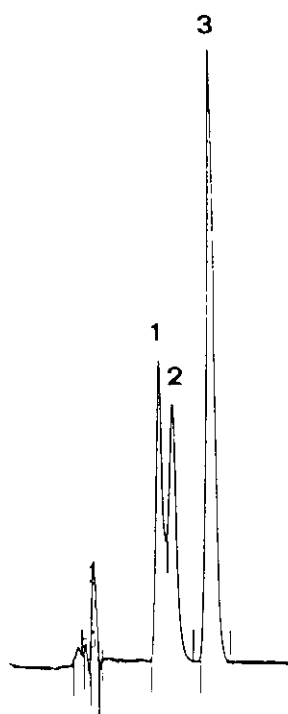
En las tablas 34 y 35 figuran los valores obtenidos para estos azúcares (g/100 g materia húmeda) así como el valor total en las hortalizas frescas y procesadas, respectivamente. En las tablas 36 y 37 se representan los estadísticos de dichos valores.

Los valores totales obtenidos mediante la suma de azúcares, son diferentes en cada hortaliza.

Cromatogramas obtenidos para azúcares solubles de zanahoria por HPLC

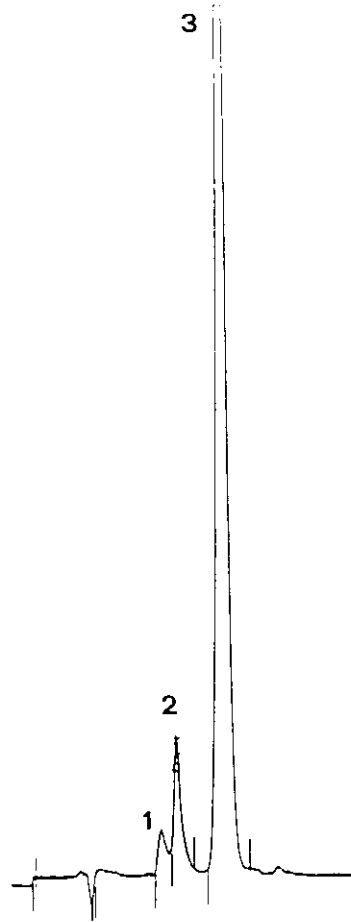


Cromatograma nº20. Zanahoria fresca

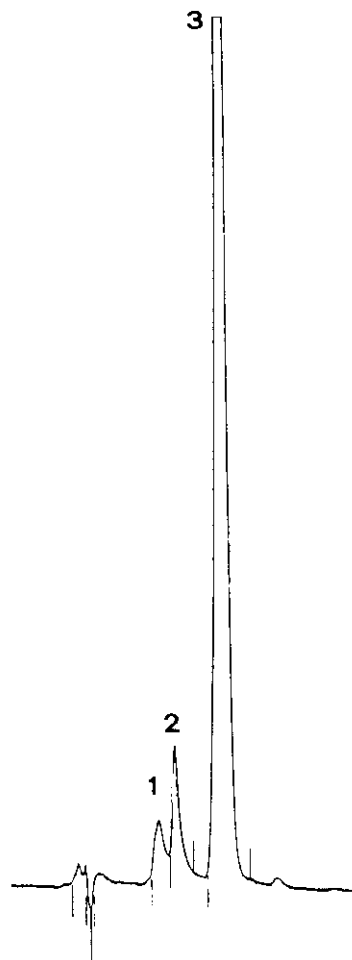


Cromatograma nº21. Zanahoria procesada

Cromatogramas obtenidos para azúcares solubles de remolacha por HPLC



Cromatograma n°22. Remolacha fresca

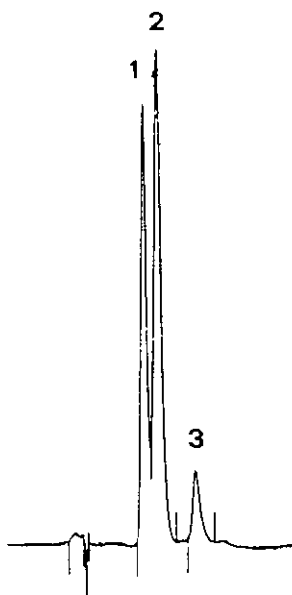


Cromatograma n°23. Remolacha procesada

Cromatogramas obtenidos para azúcares solubles de nabo por HPLC



Cromatograma nº24. Nabo fresco



Cromatograma nº25. Nabo procesado

En los materiales frescos el valor más elevado lo presenta la remolacha:  $7,295 \pm 1,016$ , a continuación la zanahoria:  $2,972 \pm 0,346$  y, por último el nabo:  $2,720 \pm 0,280$ . En los procesados las diferencias entre las muestras son menores, pero cuantitativamente se sigue el mismo orden, remolacha:  $4,688 \pm 0,106$ , zanahoria:  $3,362 \pm 0,103$  y nabo:  $1,777 \pm 0,243$ .

El estudio de las cantidades de cada uno de los monosacáridos presentes en el valor total de azúcares manifiesta una distribución característica para cada hortaliza. En las hortalizas frescas los porcentajes de contribución figuran en el siguiente cuadro:

**Cuadro n° 10. Distribución de azúcares solubles en las hortalizas frescas (%).**

	<b>FRUCTOSA</b>	<b>GLUCOSA</b>	<b>SACAROSA</b>
<b>Zanahoria</b>	18,200	24,680	57,120
<b>Remolacha</b>	1,867	6,597	91,537
<b>Nabo</b>	39,771	52,484	7,516

Los monosacáridos fructosa y glucosa se encuentran en proporción más próxima en las tres hortalizas respecto a la cantidad de sacarosa que siempre está distanciada. En zanahoria, la sacarosa es el azúcar predominante, seguido de glucosa y fructosa. En la remolacha la fracción de monosacáridos solubles está prácticamente representada por sacarosa, mientras que la glucosa y la fructosa se encuentran escasamente representadas. Finalmente el nabo ofrece un contenido mayoritario de glucosa y fructosa, frente a la contribución minoritaria de la sacarosa.

Es de destacar el hecho de que remolacha y nabo representan situaciones exactamente contrapuestas. Para remolacha la sacarosa se encuentra en un 91,536% mientras que la suma de fructosa y glucosa representa un 8,464%. Para el nabo la sacarosa representa un 7,516% y la suma de fructosa y glucosa un 92,255%.

La zanahoria tiene una situación intermedia entre ambos al encontrarse más equilibrada en la distribución mencionada de los azúcares (sacarosa, 57,120% y la suma de glucosa y fructosa, 42,880%).

Con respecto a la relación (r) entre glucosa y fructosa, expresada como cociente entre glucosa/fructosa, cabe señalar que la primera ofrece valores superiores a la segunda y por tanto (r) será superior a 1. En cada hortaliza se obtiene una relación distinta, elevada en la remolacha (r = 3,54) y muy parecida en la zanahoria y el nabo (r = 1,35 y r = 1,32).

En las hortalizas procesadas la distribución de los diferentes azúcares en el contenido total, expresado en tanto por ciento, figura en el siguiente cuadro:

**Cuadro nº 11. Distribución de azúcares solubles en las hortalizas procesadas (%).**

	FRUCTOSA	GLUCOSA	SACAROSA
Zanahoria	17,936	23,260	58,834
Remolacha	1,813	5,695	92,492
Nabo	39,111	55,768	5,121

En este caso, los porcentajes de contribución obtenidos reflejan una situación semejante a la de los materiales frescos. La sacarosa alcanza una representatividad máxima en la remolacha y muy escasa en nabo, mientras que fructosa y glucosa contribuyen con proporciones más elevadas en el nabo e inferiores en la remolacha. Por último, en la zanahoria la distribución de los azúcares es más equitativa.

La comparación de los valores de azúcares solubles obtenidos por HPLC en las tres hortalizas frescas se representan en el gráfico 21 y en las tres hortalizas procesadas en el 22.

#### **2.1.2.2. Método espectrofotométrico: ferricianuro potásico**

Este método (Gaines, 1973) permite obtener un único valor, que corresponde a la suma de los azúcares libres. Los valores obtenidos (g/100 g materia húmeda) para zanahoria, remolacha y nabo se reflejan en las tablas 38 y 39, para producto fresco y procesado respectivamente, y los estadísticos generales en las tablas 40 y 41.

En los materiales frescos, la cuantificación de azúcares por este método da como resultado un contenido máximo en remolacha  $7,143 \pm 1,091$ , a continuación zanahoria  $4,884 \pm 0,260$  y, por último, nabo  $2,648 \pm 0,391$ . En los procesados se sigue el mismo orden: remolacha  $4,718 \pm 0,265$ ; zanahoria  $3,430 \pm 0,298$  y nabo  $1,746 \pm 0,305$ .

### **2.1.2.3. Comparación de los resultados obtenidos para azúcares solubles por el método de HPLC y por el método del ferricianuro potásico**

Cuando se comparan estos valores se observa que no hay evidencia para rechazar la hipótesis de igualdad de medias de los resultados obtenidos por los dos métodos en todas las muestras tanto frescas como procesadas. Es decir, la determinación de azúcares solubles totales por cualquiera de estos métodos ofrece resultados semejantes para un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ .

Las desviaciones estándar relativas, expresadas en tanto por ciento (CV), obtenidas para las medias de los tres lotes de cada hortaliza, según los dos métodos empleados (HPLC y m. ferricianuro potásico) son en los materiales frescos, zanahoria: 12,00% y 9,20%, en remolacha: 24,10% y 26,50%, y en nabo: 17,80% y 25,60%. En los materiales procesados, zanahoria: 5,30% y 15,00%, remolacha: 3,90% y 9,70%, y nabo: 23,60% y 30,30%. Como puede observarse la variación es menor, en general, en el caso del método cromatográfico.

Los resultados de los azúcares solubles en las tres hortalizas frescas y procesadas se representan en los gráficos 23 y 24.

## 2.2. COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS HORTALIZAS FRESCAS Y EN LAS PROCESADAS

El estudio estadístico de los resultados obtenidos en las hortalizas frescas y en las procesadas se lleva a cabo aplicando el análisis de la varianza (ANOVA), estableciendo un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ . Los valores de p-value encontrados figuran en el anexo II, de los resultados.

### 2.2.1. Expresión de los resultados

La comparación de los resultados obtenidos para fresco y procesado se puede hacer considerando dichos resultados expresados en g/100 g de materia seca o en g/100 g de materia húmeda.

En cualquiera de los dos casos se ha de tener en cuenta que fresco y procesado son dos materiales diferentes aunque procedan de la misma muestra. En el procesado, aparte de las modificaciones ya señaladas en el capítulo correspondiente, se observa que tiene lugar una solubilización de ciertos componentes y variaciones cuantitativas de la humedad respecto al material fresco.

A continuación se pueden observar las pérdidas de algunos componentes en las hortalizas procesadas respecto a las frescas, considerando la media de los tres lotes:

**Cuadro nº 12. Porcentaje de pérdidas de distintos componentes en las muestras procesadas**

	<b>Cenizas</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Azúc. Solubles</b>	<b>S. Pécicas</b>
<b>Zanahoria</b>	24 %	43 %	32 %	14 %
<b>Remolacha</b>	13 %	30 %	36 %	22 %
<b>Nabo</b>	42 %	11 %	35 %	25 %

Una misma cantidad de cualquier componente que no ha sufrido pérdidas por solubilización aumenta, proporcionalmente a la pérdida total de sólidos, en la muestra procesada y se origina un incremento de su concentración respecto a la muestra fresca. Si la concentración de los componentes se modifica no se pueden evaluar las variaciones de una forma correcta si no se consideran las pérdidas de sólidos que sufre la muestra procesada.

Es necesario, por lo tanto, aplicar un factor a los resultados obtenidos en los procesados que corrija el incremento aparente de algunos compuestos debido a la pérdida de sólidos en el agua de cocción.

#### **2.2.1.1. Cálculo del factor de corrección**

Para realizar la corrección se multiplican los datos obtenidos en el procesado (expresados en g/100 g de materia seca) por un factor correspondiente a la pérdida de sólidos solubles y que se calcula como se indica a continuación.

Se parte de cantidades iguales de muestra para el fresco y para el procesado. Sin embargo, después del tratamiento se observa que hay una modificación en el peso así como en la humedad del procesado con respecto al fresco. Utilizando los pesos del material fresco ( $PT_f$ ) y del material procesado ( $PT_p$ ), así como las humedades de cada uno de ellos ( $H_f$  y  $H_p$ ), se puede conocer la cantidad de materia seca que les corresponde, respectivamente.

Se observa que la cantidad de sustancia seca presente en el peso total de la muestra procesada es siempre inferior a la cantidad existente en el fresco, referidos ambos al mismo peso inicial. Esto indica la solubilización de algunos componentes en el agua de cocción durante el tratamiento.

Conociendo la materia seca del fresco y del procesado se puede calcular la relación que existe entre ellos y el factor por el que hay que multiplicar los resultados obtenidos en el procesado para que sean comparables con los del fresco. El factor de corrección (F) se calcula

atendiendo a la siguiente fórmula:

$$F = \frac{PT_p \cdot (100 - H_p)}{PT_f \cdot (100 - H_f)}$$

donde:

$PT_p$  = Peso total del procesado

$PT_f$  = Peso total del fresco

$H_p$  = Humedad del procesado (g/100 g)

$H_f$  = Humedad del fresco (g/100 g)

Para comprobar experimentalmente los valores de los factores de corrección así calculados se determina el residuo sólido presente en los líquidos de cocción. Esta determinación permite obtener el peso de los sólidos solubles cedidos por la muestra procesada durante la cocción. Si este peso se suma al total del procesado y se refieren los cálculos a este nuevo valor, los resultados obtenidos son iguales a los que se alcanzan después de utilizar el factor de corrección. En el cuadro número 13 se muestran algunos ejemplos de datos del procesado en relación al fresco sin corregir y una vez multiplicados por el factor de corrección. Los valores de los factores de corrección aplicados oscilan en un intervalo de 0,57 a 0,73 para zanahoria, 0,53 a 0,96 para remolacha y 0,62 a 0,68 para nabo.

Finalmente, para expresar los resultados sobre materia húmeda se considera la humedad determinada en el producto antes de ser sometido al tratamiento térmico. Así se evitan las diferencias debidas a la mayor o menor presencia de agua en las muestras. La expresión de los resultados derivada de los cálculos mencionados permite establecer una comparación real entre los componentes del producto fresco y los del correspondiente procesado.

A continuación se muestran algunos ejemplos de datos del procesado en relación al fresco sin corregir y una vez multiplicados por el factor de corrección:

**Cuadro n° 13. Porcentaje de FND, FT y NSP expresado en materia seca en las hortalizas frescas y en las procesadas antes y después de aplicar el factor de corrección.**

	Fresco	Procesado	
		No Corregido	Corregido
<b>FND g/100 g m. seca</b>			
Zanahoria	18,328	20,742	14,036
Remolacha	16,076	19,531	14,024
Nabo	20,060	25,616	20,062
<b>FT g/100 g m. seca</b>			
Zanahoria	19,132	32,743	21,984
Remolacha	24,784	34,433	25,050
Nabo	23,845	37,668	26,632
<b>NSP g/100 g m. seca</b>			
Zanahoria	10,587	18,063	12,145
Remolacha	12,159	18,147	12,739
Nabo	15,493	22,186	15,848

FND = Fibra Neutro Detergente; FT = Fibra Total (método de Asp);  
NSP = Polisacáridos No Almidón (método de Englyst)

### **2.2.2. Comparación de los valores de humedad obtenidos en fresco y en procesado**

Los valores correspondientes a la humedad, expresados en g/100 g, se encuentran en la tabla 1. El análisis de varianza demuestra que no existen diferencias entre las muestras frescas y procesadas, para el nivel de significación establecido ( $\alpha = 0,05$ ), en remolacha (fresca =  $86,710 \pm 1,074$ , procesada =  $90,327 \pm 1,196$ ) y nabo (fresco =  $90,487 \pm 1,240$ , procesado =  $93,320 \pm 0,174$ ). En el caso de la zanahoria (fresca =  $89,421 \pm 0,760$ , procesada =  $91,969 \pm 0,233$ ), las diferencias sí son significativas.

El ligero incremento que se observa en las muestras procesadas se debe, lógicamente, al tratamiento térmico en el seno de agua.

### **2.2.3. Comparación de los valores de fibra alimentaria en las muestras frescas y en las procesadas obtenidos por diferentes métodos**

Para estudiar las diferencias fresco-procesado los datos se agrupan una vez más en función de los métodos analíticos:

- Métodos detergentes
- Método enzimático-gravimétrico de Asp
- Método cromatográfico (HPLC)
- Método espectrofotométrico para la determinación de sustancias pécticas: 3,5-dimetilfenol.

La división por metodologías se ha preferido a la clasificación por los componentes que se determinan en cada caso porque los resultados difieren en función del fundamento de los distintos métodos analíticos.

Para estudiar la influencia del tratamiento, y poder establecer la variabilidad de comportamiento de las diferentes muestras, se utiliza el parámetro "Retención". La retención (R), expresada en tanto por ciento, refleja la pérdida o ganancia de cada componente del material procesado respecto al fresco, al que se le atribuye el valor 100%, de tal forma que un porcentaje inferior a 100 indica pérdidas y un valor superior a dicha cifra incrementos después del tratamiento térmico.

Este parámetro se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$R (\%) = \frac{\% \text{ Procesado}}{\% \text{ Fresco}} \cdot 100$$

g/100 g m. húmeda

### 2.2.3.1. Métodos detergentes

Los resultados se pueden comparar teniendo en cuenta los residuos FAD y FND obtenidos al aplicar las correspondientes metodologías o bien después de eliminar la proteína residual, FAD-proteína y FND-proteína. Por afinidad con el apartado anterior de la discusión se comparan los valores correspondientes a los residuos con la proteína que queda en ellos, según indican los métodos. Los resultados se expresan en g/100 g de materia húmeda (Tablas 42, 43 y 44).

#### a) Comparación de los resultados para FAD

En general, los valores obtenidos para FAD en las hortalizas procesadas son inferiores a los que se obtienen en las frescas, excepto en el lote 1 de zanahoria y en el lote 2 de nabo, donde se produce un ligero incremento (Gráficos 29,30 y 31).

Se comprueba la homogeneidad con que los tratamientos térmicos (I, II y III) inciden en cada uno de los lotes de remolacha y nabo al calcularse coeficientes de variación inferiores al 10%, si bien, en la zanahoria, la variabilidad de los resultados es superior a las hortalizas anteriores:

**Cuadro nº 14. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	1,867	19,289	6,298	4,826	5,856	2,378
<b>Lote 2</b>	8,420	10,816	13,709	7,359	7,142	4,675
<b>Lote 3</b>	13,534	13,106	5,866	1,095	6,879	3,440

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

Las pérdidas debidas al procesado en la fracción FAD de las distintas hortalizas (Tabla 75), considerando el valor medio total, quedan reflejadas en las siguientes retenciones: nabo,  $94,293 \pm 9,488$ , zanahoria,  $92,259 \pm 8,276$ , y remolacha,  $79,662 \pm 7,351$ . En la remolacha la

retención es sensiblemente inferior a la calculada para nabo y zanahoria, lo que indica que el tratamiento térmico ha sido más agresivo en este caso. Para el nivel de significación establecido ( $\alpha = 0,05$ ), las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.

Una retención inferior a 100% se puede justificar en base a la solubilización, durante el procesado, de ciertos componentes que pudieran encontrarse asociados al FAD, como sustancias pécticas, proteínas y hemicelulosas. Esto permitiría hablar con mayor propiedad de un residuo FAD más estrictamente formado por celulosa y lignina en el caso de los materiales procesados. Se puede indicar que la remolacha, que es la hortaliza que sufre mayores pérdidas, es la que presenta un contenido superior de hemicelulosas.

El tratamiento puede afectar a la celulosa de manera que se altere la distribución y proporción de las regiones amorfas de la molécula y que éstas sean solubilizadas por el ataque detergente ácido.

Se comprueba que la variabilidad de comportamiento que experimenta la fracción FAD por la cocción es muy similar en todos los materiales, como se deduce de los coeficientes de variación calculados para las retenciones: zanahoria,  $CV = 15,538\%$ , remolacha,  $CV = 15,983\%$ , y nabo,  $CV = 17,430\%$  (Tabla 75).

Al estudiar, en los trabajos publicados por diferentes autores, cómo se modifica el valor de FAD por la cocción a presión, se observa que, por un lado, son muy escasos y, por otro, no se detalla la forma en que se realizan los cálculos lo que hace aún más difícil la comparación y el estudio de los resultados. Este último hecho se repite a lo largo de todas las metodologías que van a ser comparadas. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los de diferentes autores para estas mismas hortalizas (Herranz y col., 1981; Herranz y col., 1983).

#### b) Comparación de los resultados obtenidos para FND

Los valores obtenidos en las hortalizas procesadas son más bajos que los de las frescas, excepto en el lote 1 de la remolacha y en los lotes 1 y 2 del nabo (Gráficos 29,30 y 31).

De igual forma que en el caso de FAD, destaca la homogeneidad con que los diferentes lotes de cada hortaliza responden a la aplicación de los distintos tratamientos térmicos en función de los bajos coeficientes de variación, inferiores al 10%, salvo en el lote 1 de remolacha y de zanahoria en los que se aprecia una mayor dispersión:

**Cuadro n° 15. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	11,293	12,256	2,359	17,597	1,714	4,684
<b>Lote 2</b>	1,275	3,070	3,504	1,265	4,694	7,749
<b>Lote 3</b>	10,245	4,431	1,233	4,507	3,805	4,293

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

Según las retenciones calculadas (Tabla 75), se observan pérdidas de esta fracción en remolacha ( $86,769 \pm 15,561$ ), y más acusadas en zanahoria ( $76,380 \pm 3,447$ ), mientras que el nabo ( $101,332 \pm 13,876$ ) experimenta un ligero incremento. Únicamente en el caso de la zanahoria el descenso es significativo ( $\alpha = 0,05$ ).

De nuevo se pueden justificar las retenciones inferiores al 100% en función de la solubilización de sustancias pécticas y de otros posibles compuestos asociados a la fracción FND. Las muestras de zanahoria tienen contenido más alto de sustancias pécticas, el mayor porcentaje de proteínas en FND se observa en remolacha y, por el contrario, las muestras de nabo presentan los valores más bajos de sustancias pécticas y de proteínas residuales en FND. La solubilización o pérdida de estos compuestos podría estar favorecida por el tratamiento térmico aplicado, lo que explicaría, en parte, los descensos de FND más acusados en zanahoria y remolacha que en las muestras de nabo.

Asimismo, los posibles cambios experimentados por los polisacáridos celulósicos y los no celulósicos a lo largo del procesado podrían contribuir también a las variaciones observadas.

La influencia del tratamiento sobre las distintas hortalizas, en función de la variación de las retenciones, es más dispersa en remolacha (CV=31,064%) y nabo (CV= 23,718%) que en zanahoria (CV=7,816%).

c) Estudio de las cenizas residuales en FAD y en FND

El contenido de cenizas, junto con el de proteínas, en los residuos FAD y FND, expresados en g/100 g de materia húmeda, para cada hortaliza fresca y procesada figura en la tabla 45.a.

En los residuos FAD no se detectan cenizas en ninguna de las muestras analizadas ni en las frescas ni en las procesadas.

En cuanto a las cenizas de los residuos FND en remolacha y en nabo existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre fresco y procesado. El valor de cenizas que se obtiene es inferior después del tratamiento. En el caso de la zanahoria no hay cenizas residuales ni en el fresco ni en el procesado.

En estos residuos la presencia de cantidades diferentes de cenizas en procesado y en fresco se puede interpretar en base a dos fenómenos:

- posible solubilización de elementos minerales durante el proceso de cocción;
- posible alteración de la estructura de los polisacáridos responsables de la retención de elementos minerales.

d) Estudio de las proteínas residuales en FAD y en FND

Los resultados correspondientes a las proteínas de los residuos detergentes FAD y FND figuran en tabla 45a.

En el residuo FAD todos los valores de proteínas son más elevados en el fresco que en el procesado, excepto en el lote 1 de zanahoria y en el lote 1 de nabo. El análisis de varianza ( $\alpha = 0,05$ ) indica que estas diferencias no son significativas.

En el caso del FND, en la zanahoria las proteínas del fresco son más elevadas que las del

procesado. En el nabo prácticamente no hay diferencias, excepto en el lote 1 en el que los valores son más elevados en el procesado que en el fresco. Los residuos FND de la remolacha fresca retienen más proteínas que los del procesado, excepto en el lote 1. Según se indicaba anteriormente, las diferencias son significativas ( $\alpha = 0,05$ ) solo en el caso de la zanahoria.

Como ya se ha comentado en el apartado correspondiente a la comparación de métodos analíticos, la proteína es un componente cuya presencia no cabe ser esperada en los residuos.

Valores más elevados en el fresco que en el procesado indican la solubilización durante el tratamiento de cocción, hecho que se comprueba además al estudiar el contenido de proteínas en las hortalizas frescas y en las procesadas.

#### **2.2.3.2. Método enzimático-gravimétrico de Asp**

Los valores de fibra insoluble (FI), fibra soluble (FS) y fibra total (FT) para el fresco y el procesado, expresados en g/100 g de materia húmeda, de cada una de las hortalizas estudiadas se encuentran en las tablas 46, 47 y 48, y las retenciones en la 75.

Los valores de FI en el material fresco son superiores a los del procesado en el lote 2 de la zanahoria, en el 2 y 3 de la remolacha, y en el 1 y 3 del nabo. En el caso de los lotes 1 y 3 de la zanahoria, del lote 1 de la remolacha y del lote 2 del nabo se producen incrementos tras el procesado (Gráficos 32,33 y 34).

Se aprecia que la influencia de los tratamientos térmicos (I,II y III) sobre FI aplicados a cada lote de las hortalizas estudiadas producen efectos similares, salvo en el lote 3 de la remolacha en el que se observa una mayor heterogeneidad de comportamiento:

**Cuadro n° 16. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	10,217	8,689	4,714	5,446	0,422	5,203
<b>Lote 2</b>	11,751	8,025	2,048	4,944	10,149	7,899
<b>Lote 3</b>	10,544	6,960	4,265	14,478	2,786	3,124

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

La incidencia del tratamiento sobre la fibra insoluble (FI) es más acusada en remolacha, con un valor de retención de  $86,790 \pm 17,108$ . En zanahoria y en nabo el procesado no origina modificaciones importantes, como se observa por las siguientes retenciones: zanahoria,  $95,517 \pm 7,949$ , y nabo,  $97,293 \pm 6,277$ . El análisis de varianza ( $\alpha = 0,05$ ) indica que las diferencias no son significativas en ningún caso.

De los coeficientes de variación de las retenciones se deduce que la influencia de la cocción es más homogénea en nabo (CV = 11,176%) y zanahoria (CV = 14,414%) que en remolacha (CV = 34,143%).

En cuanto a la fibra soluble (FS) se observa que en todos los casos, en los tres lotes de las tres hortalizas, el contenido del material procesado siempre es superior al del fresco (Gráficos 32, 33 y 34).

El comportamiento de los tratamientos térmicos sobre dicha fracción en los tres lotes de cada muestra es bastante homogéneo como se deduce de los coeficientes de variación calculados para los datos de fresco y procesado:

**Cuadro n° 17. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	7,682	7,794	6,841	8,508	6,852	13,699
<b>Lote 2</b>	19,072	9,049	11,147	7,646	7,133	9,573
<b>Lote 3</b>	6,733	12,106	4,030	1,236	5,257	7,487

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

Las retenciones calculadas son superiores al 100%, así: zanahoria,  $162,027 \pm 28,972$ , nabo,  $151,723 \pm 15,237$ , y remolacha,  $129,307 \pm 17,724$ , lo que indica, en líneas generales, la presencia de otros componentes aparte de los polisacáridos pécticos en el residuo. Estadísticamente las diferencias encontradas no son significativas, para el nivel de significación fijado ( $\alpha = 0,05$ ), en zanahoria y remolacha pero sí en el nabo.

La fracción soluble de la fibra se comporta de forma distinta en cada hortaliza. Se observan variaciones mayores de las retenciones en zanahoria (CV = 30,972%) que en remolacha (CV = 23,742%) y nabo (CV = 17,395%).

Durante el proceso de cocción ciertos componentes de la fibra insoluble pueden solubilizarse y pasar a formar parte de la soluble. Si se estudia el porcentaje de FI y de FS en el valor total de FT (Tabla 49) se observa claramente que hay una redistribución de componentes entre FI y FS en todas las muestras. Así en el fresco la proporción de FI es superior a la de FS y en el procesado sucede lo contrario.

#### a) Estudio de las cenizas residuales en FI y en FS

El tratamiento térmico en el seno de agua da lugar a que las cenizas residuales en FI sean inferiores (Tabla 45b). Las diferencias entre fresco y procesado son significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en zanahoria y remolacha, pero no en el nabo. El descenso de las cenizas en los residuos de los materiales procesados se puede justificar de la misma forma que en el caso de los métodos detergentes: solubilizaciones durante el proceso de cocción y posible alteración de la

estructura de los polisacáridos.

Al estudiar los residuos FS, se aprecia que el contenido de cenizas experimenta aumentos en zanahoria y nabo procesados, y se producen descensos en remolacha, sin que en ningún caso las diferencias sean significativas ( $\alpha = 0,05$ ).

#### b) Estudio de las proteínas residuales en FI

Las proteínas residuales en FI (Tabla 45b) son menores en zanahoria y nabo procesados, mientras que en la remolacha son ligeramente superiores al fresco. Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en el contenido de proteínas del residuo FI en zanahoria y remolacha, sin embargo no las hay en el nabo.

Al comienzo del apartado 2.2 de la Discusión de Resultados, al indicar las pérdidas experimentadas por las distintas hortalizas tras el proceso de cocción, se podía comprobar claramente cómo, precisamente, el nabo es la muestra que sufre menores pérdidas en la fracción proteica (11%) a diferencia de la zanahoria (43%) y de la remolacha (30%).

#### **2.2.3.3. Método cromatográfico (HPLC)**

Se estudia el efecto del tratamiento de cocción a presión sobre los monosacáridos procedentes de la hidrólisis de la fibra alimentaria y los polisacáridos celulósicos y no celulósicos que constituyen.

Los resultados referentes a cada uno de los monosacáridos, expresados en g/100 g de materia húmeda, figuran en las tablas 50, 51 y 52, para zanahoria, remolacha y nabo respectivamente. En la tabla 53 se refleja el contenido total de monosacáridos para las tres hortalizas.

Al estudiar la suma total de monosacáridos en cada hortaliza se observan, según el lote, ligeros descensos o incrementos después del procesado sin que en ningún caso las diferencias encontradas sean significativas ( $\alpha = 0,05$ ).

Los coeficientes de variación calculados para los resultados de monosacáridos totales señalan la homogeneidad de los tratamientos en cada uno de los lotes de remolacha y nabo, siendo mayor la variabilidad de los resultados en la zanahoria:

**Cuadro n° 18. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	4,241	6,874	6,756	10,110	5,136	2,247
<b>Lote 2</b>	2,222	17,705	8,889	0,357	1,745	3,769
<b>Lote 3</b>	8,965	13,331	1,271	5,216	3,590	4,119

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

Si se considera el porcentaje que cada monosacárido representa dentro del valor total (Tabla 54), se puede señalar que en el caso de la zanahoria procesada hay un descenso en glucosa, xilosa y manosa, sin embargo, celobiosa, galactosa/ramnosa y arabinosa aumentan. En la remolacha las proporciones aumentan respecto a celobiosa, xilosa y manosa y hay un descenso de glucosa, galactosa/ramnosa y arabinosa. En el nabo se producen incrementos en celobiosa, glucosa y manosa, y descienden los demás.

El cálculo del parámetro retención para estos azúcares procedentes de la fibra alimentaria (Tabla 76) refleja que en la zanahoria las variaciones más importantes se producen en arabinosa ( $140,987 \pm 14,891$ ), galactosa/ramnosa ( $119,840 \pm 19,423$ ), manosa ( $81,202 \pm 15,453$ ) y xilosa ( $83,667 \pm 20,075$ ), y las menores en glucosa ( $94,983 \pm 18,236$ ) y celobiosa ( $110,441 \pm 25,623$ ). En la remolacha las mayores modificaciones se refieren a manosa ( $140,927 \pm 6,589$ ) y celobiosa ( $131,903 \pm 9,616$ ), seguidas de xilosa ( $124,957 \pm 30,773$ ) y glucosa ( $121,077 \pm 30,658$ ), y de menos importancia en galactosa/ramnosa ( $110,380 \pm 17,731$ ) y arabinosa ( $106,232 \pm 14,191$ ). En el nabo, celobiosa, glucosa y xilosa presentan retenciones similares ( $115,813 \pm 12,638$ ,  $119,553 \pm 11,484$ ,  $110,997 \pm 11,029$ ), superiores al 100%, de la misma forma que en galactosa/ramnosa, arabinosa y manosa ( $93,033 \pm 11,476$ ,  $90,009 \pm 2,149$ ,  $89,933 \pm 19,648$ ) son inferiores a dicho 100%.

La redistribución de celobiosa y glucosa en la celulosa de zanahoria y remolacha puede ser debida a que son muestras en las que no existe una diferencia tan importante como la observada en el nabo, en lo que se refiere a la proporción en la que están presentes los polisacáridos celulósicos y los no celulósicos, por lo que pequeñas modificaciones pueden tener gran trascendencia. En el nabo predominan los polisacáridos celulósicos, mientras que en zanahoria y remolacha hay mayor igualdad.

Al estudiar el porcentaje de cada monosacárido en el total de polisacáridos no celulósicos (Tabla 59) cabe señalar un descenso de xilosa y de manosa y un aumento de galactosa/ramnosa y arabinosa en la zanahoria procesada respecto a la fresca, y que en la remolacha hay un aumento de xilosa y de manosa frente a descensos de galactosa/ramnosa y arabinosa. En el nabo solo aumenta la xilosa, los demás monosacáridos disminuyen.

El valor medio de las retenciones de los monosacáridos neutros totales indica valores superiores al 100% en las tres hortalizas (zanahoria:  $107,293 \pm 14,834$ ; remolacha:  $114,152 \pm 18,767$ ; nabo:  $109,553 \pm 7,868$ ). En la zanahoria el aumento es debido, fundamentalmente, a la contribución de arabinosa y de galactosa/ramnosa, en remolacha a la práctica totalidad de los monosacáridos y en nabo a celobiosa, glucosa y xilosa.

Las retenciones superiores al 100% podrían ser indicativas de una mayor eficacia de la hidrólisis ácida en los materiales procesados que en los frescos. El procesado daría origen a una disposición estructural que permitiría una mayor eficacia del ataque ácido o bien facilitaría la acción hidrolítica al disolverse ciertos componentes.

#### **2.2.3.4. Método espectrofotométrico para sustancias pécticas: 3,5-dimetilfenol**

Los valores correspondientes a las sustancias pécticas, expresados en gramos de ácido galacturónico por 100 gramos de materia húmeda, figuran en las tablas 60, 61 y 62, para cada una de las hortalizas. Las retenciones se muestran en la tabla 75.

El estudio estadístico revela que esta fracción presenta una mayor modificación que las que se han estudiado hasta el momento, dado que las diferencias son significativas en zanahoria y nabo, aunque no se detectan en el caso de la remolacha para el nivel de significación establecido ( $\alpha = 0,05$ ). Los resultados obtenidos son siempre inferiores en los procesados que en los frescos (Gráficos 39, 38 y 40).

La zanahoria es la muestra que presenta mayor regularidad en el descenso del contenido de sustancias pécticas, como lo demuestran los coeficientes de variación de los resultados siempre inferiores al 10%. En el nabo el procesado del lote 1 tienen una variación ligeramente superior, así como los lotes 2 y 3 de la remolacha. El efecto del tratamiento da lugar a modificaciones muy semejantes en las hortalizas estudiadas, destacando el caso de la zanahoria.

**Cuadro n° 19. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	4,554	3,519	7,280	6,493	4,044	11,80
<b>Lote 2</b>	7,582	3,292	0,626	11,165	3,154	5,89
<b>Lote 3</b>	7,815	10,201	8,133	15,219	4,912	7,32

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

El descenso en el contenido en sustancias pécticas es muy similar en todas las muestras, como puede observarse por las retenciones calculadas: zanahoria =  $76,411 \pm 7,857$ ; remolacha =  $77,297 \pm 7,560$ ; nabo =  $73,777 \pm 3,581$ . Como se ha indicado anteriormente las diferencias son significativas solo para zanahoria y nabo. El comportamiento de las muestras es muy uniforme en el nabo (CV = 8,406%) y más disperso en remolacha (CV = 16,941%) y en zanahoria (CV = 17,810%).

La cocción se acompaña normalmente de un ablandamiento de los tejidos y de cambios en la textura. Esto sucede como consecuencia de la extracción de calcio de la región de la lámina

media por medio de agentes quelantes adecuados, ej. citrato, y también debido al proceso degradativo de  $\beta$ -eliminación de pectinas. Se ha comprobado la degradación de las pectinas de manzana por  $\beta$ -eliminación durante el calentamiento con tampón fosfato a pH = 7, y estas condiciones son semejantes a las que ocurren en los vegetales durante la cocción (Waldron y Selvendran, 1990).

Para comprobar la presencia de ácido galacturónico en los líquidos de cocción se ha llevado a cabo el método espectrofotométrico en dichos líquidos, obteniéndose valores se corresponden con los porcentajes de pérdidas observados a partir de las retenciones, por tanto se puede afirmar que el fenómeno que tiene lugar es fundamentalmente una solubilización.

El método espectrofotométrico del 3,5-dimetilfenol (Scott, 1979) y el enzimático-gravimétrico de Asp para la fracción soluble de la fibra (Asp y col., 1983), determinan en teoría los mismos componentes: sustancias pécticas. El primero de ellos cuantifica específicamente el ácido galacturónico procedente de la hidrólisis de las pectinas y el segundo determina de una forma mucho más grosera, por medio de precipitación y gravimetría, los mismos compuestos. El comportamiento de la fracción soluble frente al procesado es muy distinto según la metodología aplicada para su determinación. La fibra soluble (FS) experimenta aumentos en las hortalizas procesadas mientras que las sustancias pécticas (SP) sufren pérdidas. La diferencia de comportamiento observada se debe al distinto fundamento de los métodos analíticos empleados e indica la presencia de otros compuestos, además de las sustancias pécticas, en FS.

#### **2.2.3.5. Comparación de los valores de fibra alimentaria total**

Se pueden sumar los resultados de sustancias pécticas (SP) a los de FND, FI y polisacáridos celulósicos y no celulósicos para obtener valores de fibra total. Del mismo modo el conjunto de FI y de FS representa también un dato de fibra alimentaria total.

a) FND+SP

Los valores correspondientes a cada hortaliza, expresados en g/100 g de materia húmeda, figuran en las tablas 66, 67 y 68, y las retenciones en la 78.

Los resultados obtenidos en las hortalizas procesadas son inferiores a los de las frescas, excepto en el lote 1 de la remolacha y en el 2 del nabo.

En el siguiente cuadro se pueden apreciar los porcentajes que representan FND y SP dentro del valor de fibra total. Ninguno de los dos componentes modifica su contribución a la fibra debido al tratamiento.

**Cuadro n° 20. Porcentaje de FND y SP en FND + SP.**

	FND		SP	
	Fresco	Procesado	Fresco	Procesado
Zanahoria	80,081	79,682	19,919	19,974
Remolacha	86,451	87,708	13,587	12,330
Nabo	84,810	88,215	15,239	11,765

FND = Fibra Neutro Detergente; SP = Sustancias pécticas

Al considerar la fibra de esta manera, se observa que en el procesado se producen pérdidas semejantes a las de FND porque este valor es el que más contribuye al de fibra total. En la zanahoria la retención es de  $76,362 \pm 4,308$ , en la remolacha de  $85,363 \pm 14,202$  y en el nabo  $96,907 \pm 12,031$ . En las tres hortalizas se aprecia alguna modificación y de forma más acusada en la zanahoria.

El estudio estadístico indica que remolacha y nabo no han sufrido modificaciones cuantitativas significativas ( $\alpha = 0,05$ ), pero sí la zanahoria en la que existen diferencias tanto en FND como en SP.

b) FI+SP

Según los datos que figuran en las tablas 66, 67 y 68 se puede apreciar que el valor de

FI+SP es inferior en las hortalizas procesadas que en las frescas, excepto en el lote 1 de la remolacha y en el lote 2 del nabo. No existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en ninguno de los casos. Aunque sí hay diferencias respecto a sustancias pécticas, el valor mucho más elevado de FI hace que la fibra total no difiera.

Los tantos por ciento de FI y de SP en el valor total se resumen a continuación:

**Cuadro n° 21. Porcentaje de FI y SP en FI + SP.**

	FI		SP	
	Fresco	Procesado	Fresco	Procesado
<b>Zanahoria</b>	71,846	76,229	28,154	23,955
<b>Remolacha</b>	86,986	78,291	13,014	11,809
<b>Nabo</b>	82,514	85,782	17,486	13,886

FI = Fibra Insoluble (método de Asp); SP = Sustancias pécticas

La proporción en que se encuentran FI y SP en el resultado total sólo presenta ligeras variaciones en zanahoria y nabo, donde el material procesado presenta un mayor porcentaje de FI en la suma total, hecho lógico si se tiene en cuenta el descenso experimentado por las sustancias pécticas.

En la remolacha el tratamiento da lugar a modificaciones cuantitativas del mismo orden que en el caso de FND+SP para cuantificar la fibra total como indica la retención calculada ( $84,437 \pm 15,668$ ). En el nabo la incidencia es mayor en este caso ( $93,093 \pm 5,473$ ) y en la zanahoria menor ( $89,731 \pm 4,936$ ) (Tabla 78).

c) FI+FS

Esta fracción no sufre modificaciones como consecuencia del tratamiento como se deduce del análisis de varianza aplicado ( $\alpha = 0,05$ ). Los resultados figuran en las tablas 66, 67, 68 y 78.

A pesar de no existir diferencias significativas si se estudia la proporción de FI y de FS en el valor FT se observa claramente que hay una redistribución de componentes en todas las

muestras. Así, en el procesado la proporción de FI disminuye y la de FS aumenta, como se indica en el siguiente cuadro:

**Cuadro n° 22. Porcentaje de FI y FS en FT.**

	FI		FS	
	Fresco	Procesado	Fresco	Procesado
<b>Zanahoria</b>	61,815	50,946	38,185	48,500
<b>Remolacha</b>	71,944	62,679	28,056	37,067
<b>Nabo</b>	71,379	61,838	28,621	37,904

FI = Fibra Insoluble (método de Asp); FS = Fibra Soluble (método de Asp)

Este hecho se puede justificar, por un lado por el aumento que experimenta FS y que hace que FI disminuya proporcionalmente, y por otro por la posible redistribución de componentes entre FI y FS.

Al comparar el comportamiento de las tres hortalizas se aprecia que zanahoria y nabo experimentan una ganancia a la que contribuyen fundamentalmente los valores de FS del procesado, como se vió en el apartado correspondiente. Las retenciones calculadas son para zanahoria,  $115,48 \pm 7,353$ , y para el nabo,  $112,298 \pm 8,181$ . En el caso de la remolacha la fracción FT es menos sensible que las dos anteriores, siendo la retención de  $98,617 \pm 17,664$ .

#### d) NSP

Los resultados correspondientes a esta fracción, que se obtienen por la suma de polisacáridos celulósicos, polisacáridos no celulósicos y sustancias pécticas, expresados en g/100 g de materia húmeda, figuran en las tablas 63, 64 y 65, y las retenciones en la 78.

La comparación entre fresco y procesado revela que no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre ellos. Sin embargo, cada muestra presenta un comportamiento peculiar en relación a lo observado en los casos anteriores. En el nabo el comportamiento es semejante al observado para FI+FS, con una retención de  $101,823 \pm 6,467$ , mientras que en la zanahoria la tendencia a experimentar pérdida es similar a la de FND+SP y FI+FS, siendo la retención

de  $94,452 \pm 9,687$ . Sin embargo, la remolacha en esta fracción tiene un comportamiento diferente a los otros tres casos (FND+SP, FI+SP y FI+FS), presentando retenciones superiores al 100% ( $106,743 \pm 16,455$ ).

Todos los procedimientos para evaluar la fibra alimentaria total reflejan gran homogeneidad en la respuesta al tratamiento térmico. Tanto para FND+SP, como para FI+SP, FI+FS y NSP se observan valores de coeficientes de variación comprendidos dentro de unos límites aceptables. Solamente el procesado del lote 1 de la remolacha para FND+SP, y en el procesado del lote 3 para FI+SP se observa una mayor heterogeneidad.

**Cuadro n° 23. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

FND+SP	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
Lote 1	9,396	10,059	1,933	15,984	1,130	5,091
Lote 2	2,386	1,767	2,984	1,790	3,676	6,999
Lote 3	6,826	4,290	1,304	5,428	3,626	3,457

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

**Cuadro n° 24. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

FI+SP	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
Lote 1	6,440	7,046	5,031	5,484	0,931	4,927
Lote 2	6,856	5,071	1,821	3,283	8,211	7,362
Lote 3	9,549	5,032	3,191	13,825	1,575	1,832

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

**Cuadro n° 25. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

<b>FI+FS</b>	<b>ZANAHORIA (CV)</b>		<b>REMOLACHA (CV)</b>		<b>NABO (CV)</b>	
	<b>Fresca</b>	<b>Procesada</b>	<b>Fresca</b>	<b>Procesada</b>	<b>Fresca</b>	<b>Procesada</b>
<b>Lote 1</b>	7,194	7,591	2,580	4,945	1,957	8,316
<b>Lote 2</b>	4,188	0,903	4,218	5,212	6,197	8,526
<b>Lote 3</b>	4,754	7,898	2,354	9,142	1,133	2,646

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

**Cuadro n° 26. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

<b>NSP</b>	<b>ZANAHORIA (CV)</b>		<b>REMOLACHA (CV)</b>		<b>NABO (CV)</b>	
	<b>Fresca</b>	<b>Procesada</b>	<b>Fresca</b>	<b>Procesada</b>	<b>Fresca</b>	<b>Procesada</b>
<b>Lote 1</b>	3,486	3,094	6,158	8,738	4,279	3,498
<b>Lote 2</b>	2,504	10,636	6,988	2,988	2,021	2,841
<b>Lote 3</b>	6,000	12,102	2,543	2,693	2,525	5,700

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

#### **2.2.4. Estudio del contenido en azúcares solubles en las hortalizas frescas y procesadas**

##### **2.2.4.1. Método cromatográfico (HPLC)**

El contenido en azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) de cada una de las hortalizas figuran en las tablas 69, 70 y 71. Al estudiar los resultados de las muestras procesadas se observan descensos respecto a las frescas en todos los casos. El análisis estadístico de los mismos indica que no todos los azúcares se comportan de igual forma durante el tratamiento térmico. Se observan variaciones significativas ( $\alpha = 0,05$ ) en fructosa, glucosa y sacarosa en la zanahoria, y también en la sacarosa en el caso del nabo.

Los coeficientes de variación calculados para los resultados de cada lote indican gran homogeneidad en todos ellos.

**Cuadro n° 27. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	6,033	3,807	5,679	2,259	1,084	10,557
<b>Lote 2</b>	4,153	7,649	5,287	2,699	0,627	3,031
<b>Lote 3</b>	3,094	5,813	5,442	4,464	3,756	7,664

<sup>1</sup>estadístico obtenido a partir de los resultados de los tratamientos I,II y III de cada lote

En cuanto a las retenciones (Tabla 80), la fructosa presenta un valor semejante en las tres hortalizas: zanahoria,  $60,433 \pm 8,117$ , remolacha,  $63,663 \pm 6,183$ , y nabo,  $63,313 \pm 6,988$ . La glucosa tiene un comportamiento semejante en zanahoria y remolacha ( $57,529 \pm 5,145$  y  $57,317 \pm 11,060$ ), mientras que el nabo tiene una retención superior ( $69,387 \pm 7,459$ ). La sacarosa es el azúcar que tiene un comportamiento más peculiar dentro de cada hortaliza. Así, el mayor descenso lo experimenta el nabo ( $46,312 \pm 9,134$ ), a continuación la zanahoria ( $58,383 \pm 3,933$ ) y por último la remolacha ( $66,247 \pm 10,540$ ).

Los coeficientes de variación de las retenciones indican una escasa dispersión de los resultados en las tres hortalizas, sobre todo en la zanahoria.

En todos los casos se producen solubilizaciones en el agua de cocción, detectándose en los líquidos proporciones de azúcares semejantes a las pérdidas que experimentan las muestras.

El descenso de los azúcares solubles en las hortalizas procesadas es de distinta magnitud según el azúcar de que se trate y está influido, además de por la cantidad inicial en el material fresco, por la hortaliza de que se trate. Así, por ejemplo, la sacarosa presenta igual valor de retención en zanahoria, remolacha y nabo, aunque en la remolacha se encuentra en mínimas proporciones.

#### 2.2.4.2. Método espectrofotométrico del ferricianuro potásico

Los resultados obtenidos en las hortalizas frescas y procesadas figuran en las tablas 72, 73 y 74 para cada hortaliza. Las retenciones se muestran en la tabla 79.

Los azúcares solubles son sensibles al tratamiento térmico en medio acuoso, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre los contenidos de las muestras antes y después de procesarlas.

Se observa también que no hay variabilidad entre los diferentes lotes de una misma muestra en ningún caso.

**Cuadro n° 28. Coeficientes de variación (%) obtenidos a partir de los resultados de los tratamientos I, II y III aplicados a cada lote.**

	ZANAHORIA (CV)		REMOLACHA (CV)		NABO (CV)	
	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada	Fresca	Procesada
<b>Lote 1</b>	2,144	3,958	3,054	6,262	2,472	11,522
<b>Lote 2</b>	0,675	2,188	3,367	3,550	2,663	7,965
<b>Lote 3</b>	0,584	1,257	1,890	24,307	7,899	14,745

La cocción da lugar a pérdidas semejantes en las tres muestras, como se deduce de los valores de las retenciones calculadas: zanahoria,  $62,173 \pm 5,305$ , remolacha,  $68,393 \pm 13,258$ , y nabo,  $66,271 \pm 4,210$ , La variación de las retenciones calculadas es muy baja en todas las muestras.

Para comprobar la presencia de monosacáridos en los líquidos de cocción, se realiza la colorimetría del ferricianuro potásico en una parte alícuota de dichos líquidos obteniéndose resultados semejantes a las pérdidas experimentadas. La presencia de azúcares solubles en los líquidos indica, igual que en el caso de las sustancias pécticas, solubilizaciones durante el procesado.

### **2.2.4.3. Estudio de la distribución de azúcares solubles y monosacáridos que forman la fibra alimentaria.**

En los gráficos 39, 40 y 41 se aprecia la distribución de los monosacáridos que integran la fibra alimentaria y de los azúcares solubles considerando la suma total de estos dos grupos de azúcares.

Los azúcares correspondientes a la fibra alimentaria presentan porcentajes semejantes en fresco y procesado: zanahoria (fresco = 16,451, procesado = 19,089); remolacha (fresco = 16,236, procesado = 18,636); nabo (fresco = 32,085, procesado = 35,006).

Sin embargo en los azúcares solubles se aprecia un descenso en el porcentaje de participación en los materiales procesados respecto a los frescos: zanahoria (fresco = 83,548, procesado = 56,495); remolacha (fresco = 83,764, procesado = 53,829); nabo (fresco = 67,915, procesado = 44,369). Este descenso se justifica en virtud de la pérdida de azúcares solubles experimentada durante la cocción que ha sido de 24,416% en zanahoria; 27,535% en remolacha y 20,625% en nabo.

### **2.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR MICROSCOPIA OPTICA**

El procesado térmico de productos vegetales origina, como efecto más importante, cambios en la textura de los mismos. Dichas modificaciones de la textura están relacionadas con la organización estructural y composición química de la pared celular.

Se ha estudiado por microscopía óptica diferentes zonas de las raíces antes y después del procesado para observar el aspecto de la pared celular y detectar posibles cambios estructurales, así como confirmar la presencia de los constituyentes de la fibra alimentaria. hortalizas.

#### **2.3.1. Generalidades**

Las tres especies estudiadas son raíces de almacenamiento. Como tales raíces presentan en su anatomía una fuerte asociación entre las células de reserva (parénquima) y las células de los tejidos conductores, que es resultado del crecimiento secundario que sufren.

En la zanahoria se produce un excesivo desarrollo del parénquima (Fotografía nº 1) que determina que el órgano se haga carnoso. En la remolacha, como en el resto de las *Chenopodiaceae*, al activarse diferentes tejidos cambiales se van formando numerosas capas de tejido secundario, los haces vasculares se disponen dispersos en círculos concéntricos intercalados por una gran cantidad de parénquima (Fotografía nº 2). En el nabo se puede apreciar el crecimiento que suele ser típico de otras *Brassicaceae*: el parénquima crece, en él posteriormente se activa el cambium que a su vez originará nuevo parénquima junto con el tejido conductor secundario (Fotografía nº 3).

En el estudio al microscopio óptico, el aspecto de las células del material procesado es distinto al de las células del material fresco (Fotografías nº 4, 5, 6, 7, 8 y 9). Este diferente aspecto podría deberse a un incremento de la humedad en las células de las muestras

procesadas, incremento que ha sido comprobado en el análisis químico de zanahoria, remolacha y nabo. Pero también otras variaciones que se producen en el contenido celular pueden estar relacionadas, por ejemplo:

-La modificación que el almidón sufre durante el procesado, que se puede observar por diferencias obtenidas en el tratamiento de las muestras con la solución de lugol, reactivo de identificación del almidón.

-La pérdida de sólidos solubles que, de acuerdo con el análisis químico, se produce durante el procesado también podría afectar a la distinta apariencia presentada por las células al microscopio.

-En la remolacha se produce una salida de antocianos desde las vacuolas (Fotografía n° 2), que además de afectar al color de la preparación puede influir en la apariencia de las células que se observan.

-En la zanahoria se detectan también ciertos cambios en la presencia de los cromoplastos que contienen los carotenoides típicos de esta raíz (Fotografía n° 5).

Por último se pueden señalar las alteraciones en la estructura que según Waldron y Selvendran (1990) se producen en los pectatos cálcicos de la pared celular durante el cocinado, que podrían contribuir a la observación de una superficie celular con apariencia distinta.

### **2.3.2. Celulosa y hemicelulosas**

Las celulosas son uno de los principales polisacáridos de la pared celular primaria y también se presentan en la pared secundaria. En ésta el componente mayoritario es la celulosa.

En el reconocimiento de la celulosa y las hemicelulosas se ha utilizado la reacción del cloruro

de zinc yodado. Este reactivo identifica a celulosa y hemicelulosas originando un color azul (Jensen, 1962). En ocasiones este color azul se observa algo diferente en el material fresco que, en el procesado (más violeta-rojizo) (Fotografías n° 10, 11, 12 y 13). La diferencia de tonalidad podría deberse a una posible alteración de la estructura molecular, sobre todo de las hemicelulosas, como consecuencia del proceso térmico al que se somete el material, de forma similar a lo que la bibliografía indica que ocurre en la reacción del almidón con la solución de yodo-yoduro potásico que da tono de color diferente según la proporción de dextrinas que se presenten (Jensen 1962; Johansen, 1940).

### **2.3.3. Sustancias pécticas**

En la célula vegetal, las sustancias pécticas suelen encontrarse en forma de pectatos, como componentes mayoritarios de la lámina media de la pared celular. Uno de sus reactivos de identificación más utilizados en microscopía óptica es el rojo de rutenio.

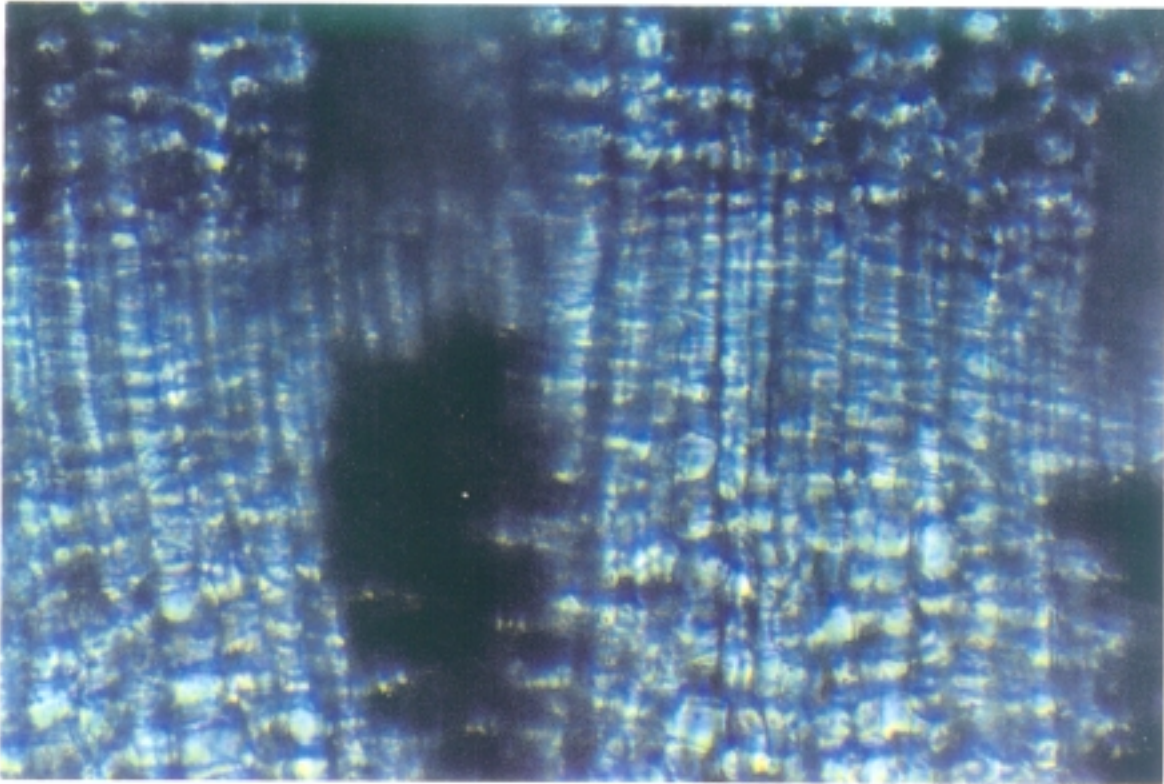
El estudio microscópico utilizando la reacción de rojo de rutenio, no revela diferencias significativas en el contenido de pectatos de la lámina media entre el material fresco y el procesado. Esta observación puede generalizarse para la totalidad de la estructura radicular (corteza y cilindro vascular) en zanahoria (Fotografías n° 14 y 15), remolacha (Fotografías n° 16 y 17) y nabo (Fotografía n° 18 y 19).

### **2.3.4. Lignina**

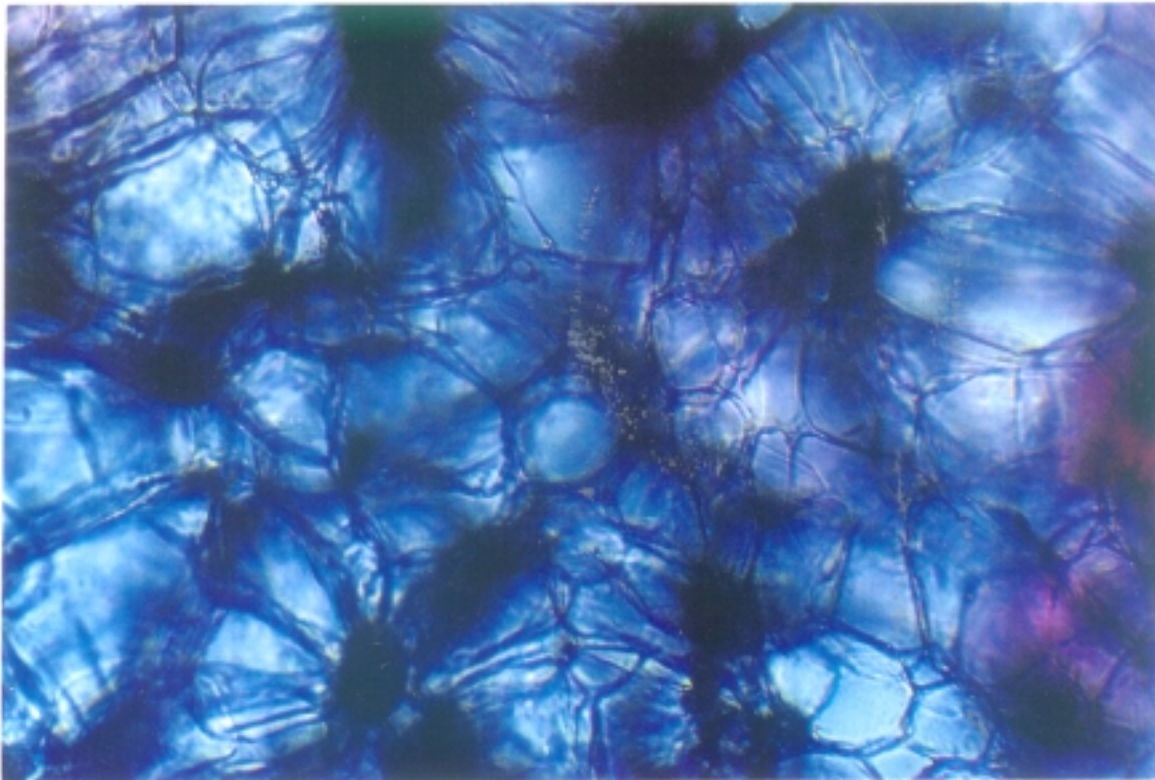
En la estructura de las raíces estudiadas las células lignificadas se limitan a los vasos del xilema (Selvendran, 1992). En el estado de madurez en que zanahoria, remolacha y nabo son aptos para el consumo, el xilema está relativamente poco desarrollado, lo que hace que la contribución del contenido de lignina en el contenido total de fibra no sea muy significativo comparado, por ejemplo, con el de pectinas o el de celulosa.

El estudio de los tejidos lignificados se ha realizado mediante la reacción de la floroglucina clorhídrica que tiñe las células lignificadas de color rojo-rosa (Fotografías nº 20 y 21) y el método de la doble tinción que utiliza el verde yodo como reactivo específico de la lignina (Fotografía nº 22). En ambos casos no se observan diferencias en la presencia de lignina entre el material fresco y el procesado lo que induce a pensar que las condiciones de este tipo de procesado no son suficientes para alterar la estructura de la lignina situada en las paredes de los vasos del xilema.

## RAICES DE ALMACENAMIENTO. CRECIMIENTO SECUNDARIO ANOMALO

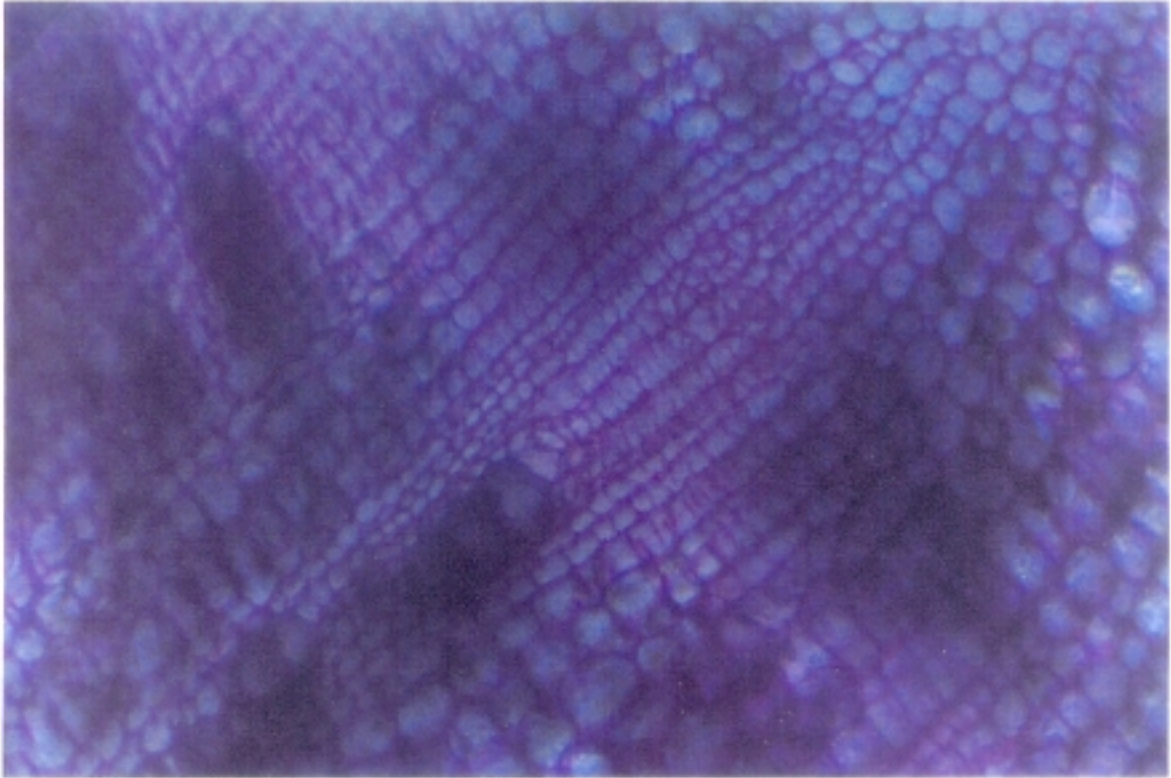


Fotografía n°1.- Zanahoria: abundancia de parénquima entre el tejido conductor.



Fotografía n°2.- Remolacha: disposición concéntrica de los haces conductores dispersos formados a partir del cambium supernumerario.

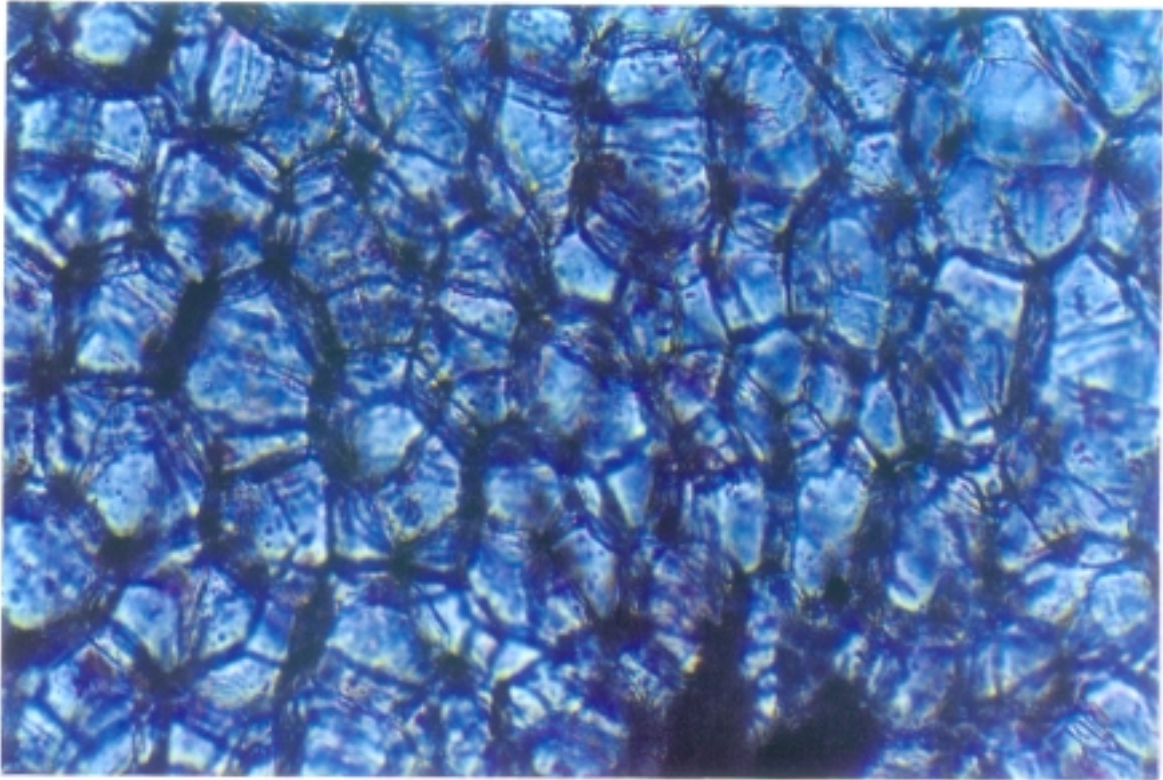
## RAICES DE ALMACENAMIENTO. CRECIMIENTO SECUNDARIO ANOMALO



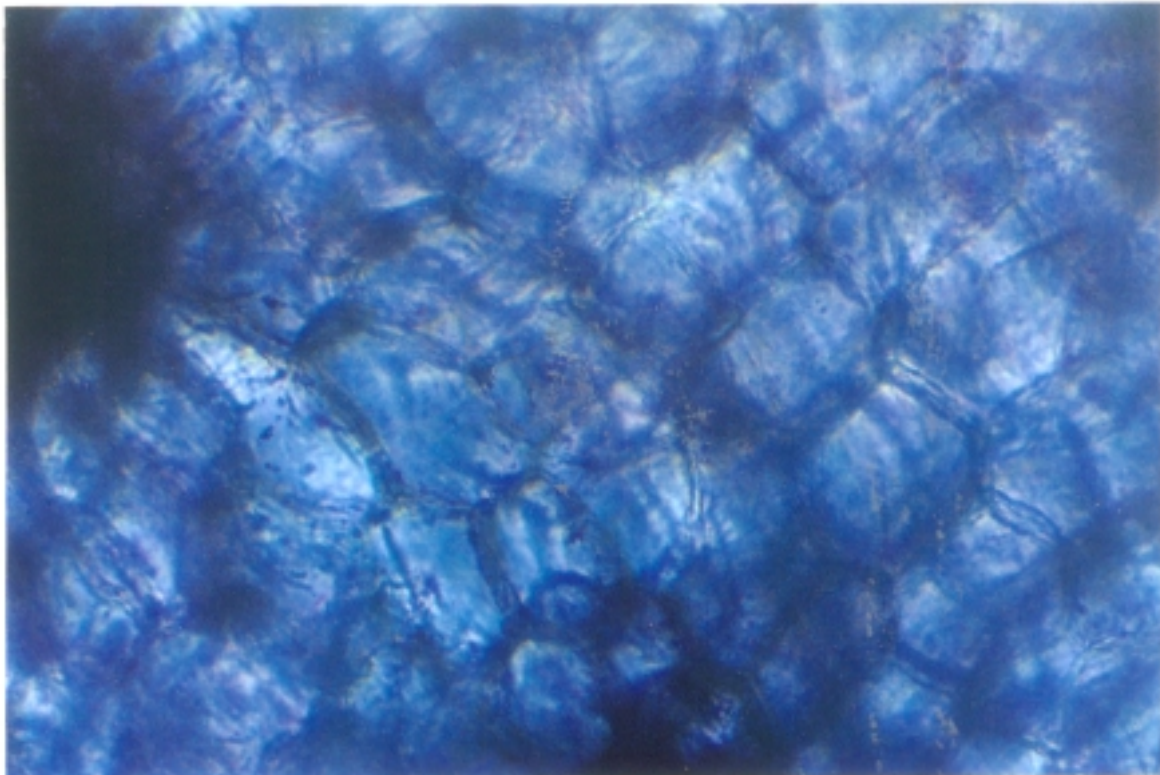
Fotografía n°3.- Nabo: zona de crecimiento secundario; tejido conductor (xilema) y parénquima. Las células presentan la lámina media teñida por la reacción de rojo de rutenio con los pectatos (500 X).

## CELULAS DE LA RAIZ DE ZANAHORIA

Material sin fijar montado en agua destilada (500 X)  
Parénquima cortical próximo al cilindro vascular.



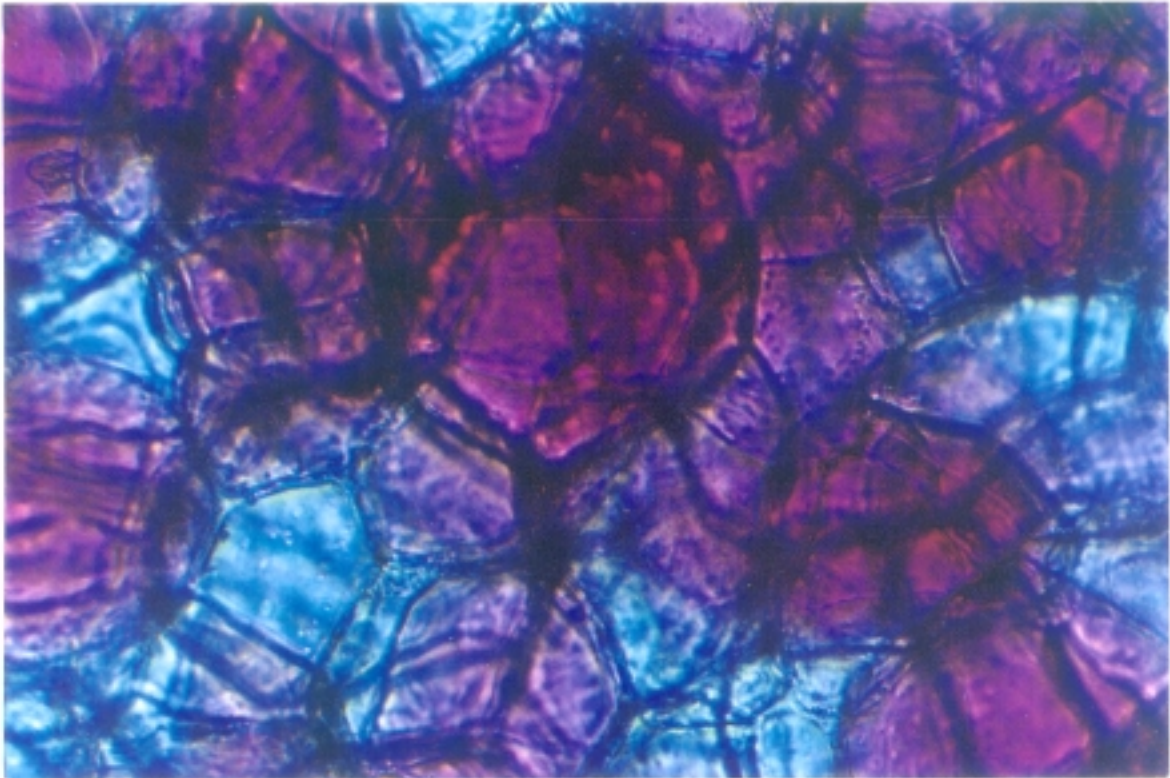
Fotografía n°4.- Zanahoria fresca. Se puede observar la presencia de algunos cromoplastos



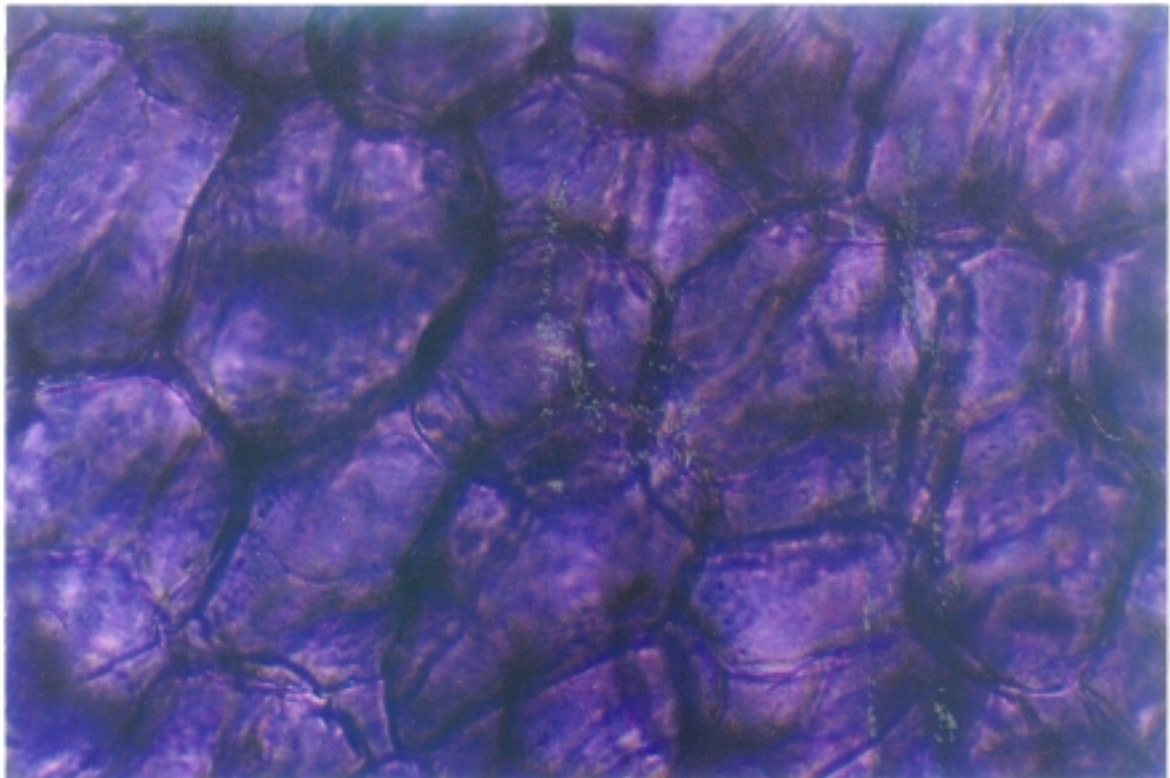
Fotografía n°5.- Zanahoria procesada.

## CELULAS DE LA RAIZ DE REMOLACHA

Material sin fijar montado en agua destilada (500 X)  
Parénquima cortical externo



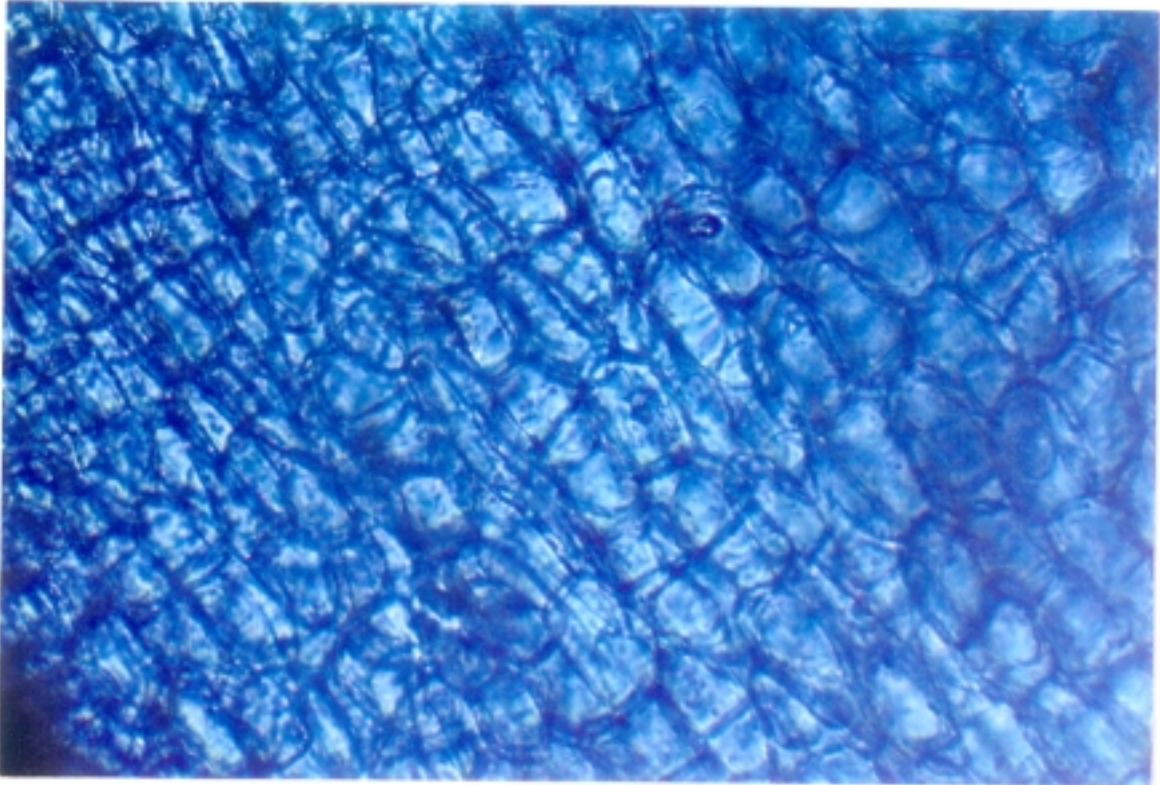
Fotografía n°6.- Remolacha fresca: algunas células con antocianos en sus vacuolas.



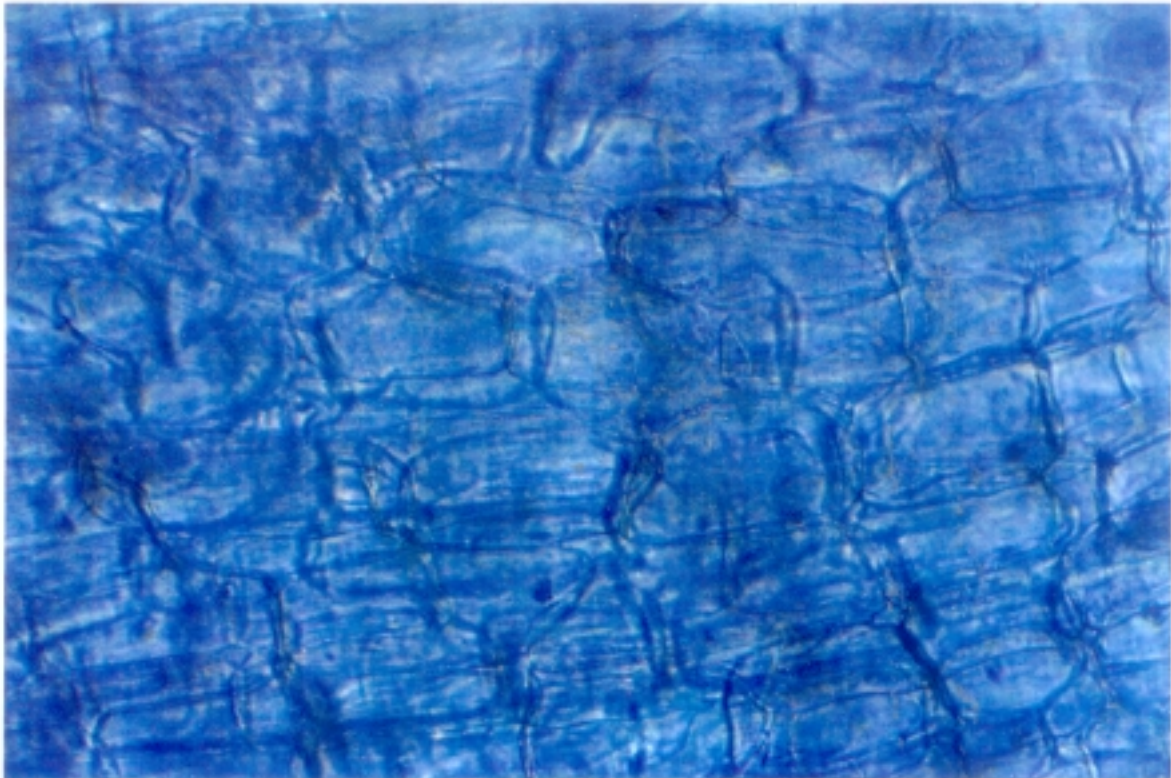
Fotografía n°7.- Remolacha procesada: se observa el cambio de coloración por la salida de antocianos de las células.

## CELULAS DE LA RAIZ DE NABO

Material sin fijar montado en agua destilada (500 X)



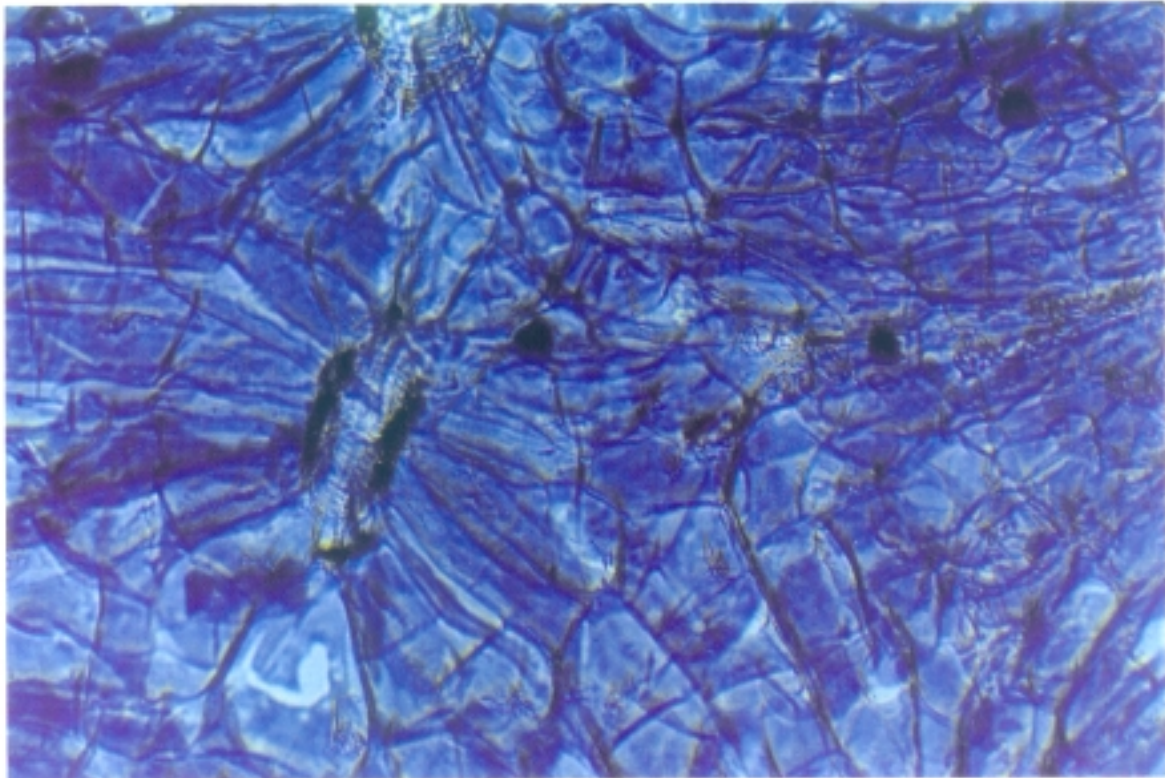
Fotografía n°8.- Nabo fresco.



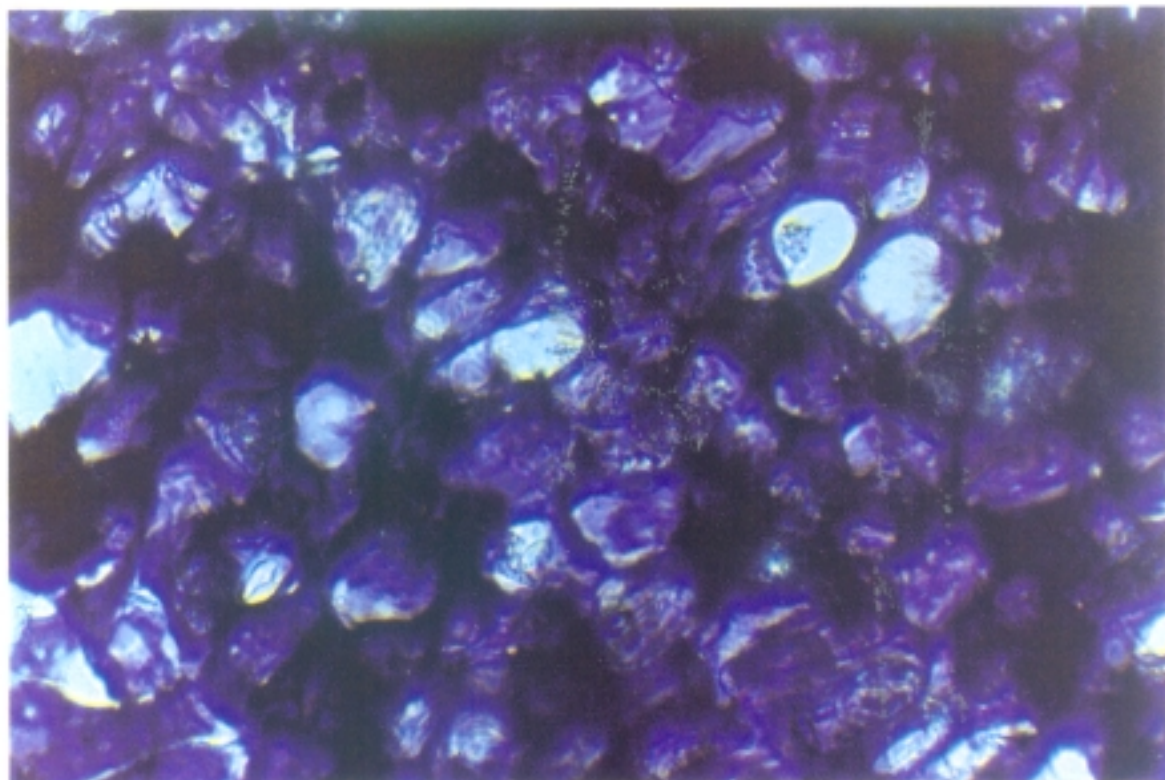
Fotografía n°9.- Nabo procesado.

## IDENTIFICACION DE CELULOSA Y HEMICELULOSAS EN LA RAIZ DE ZANAHORIA

Material incluido en parafina y seccionado con microtomo rotatorio tipo Minot



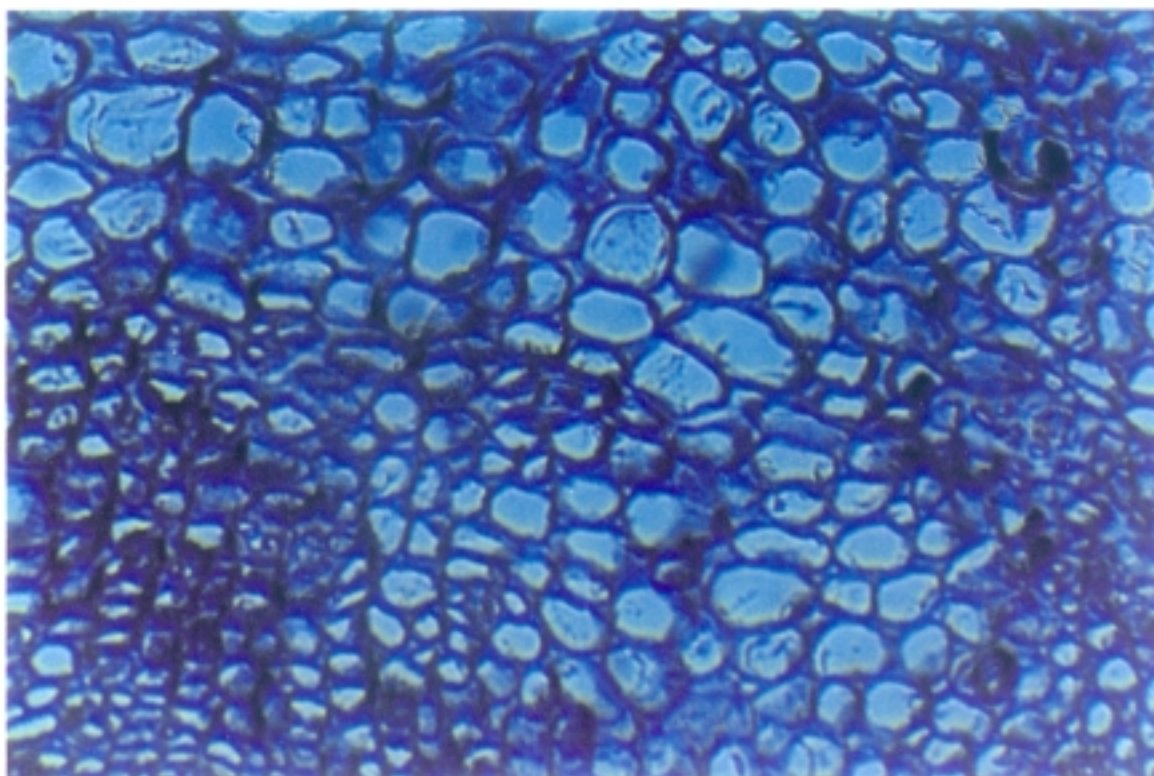
Fotografía n°10.- Zanahoria fresca tratada con  $Cl_2Zn$  (500 X).



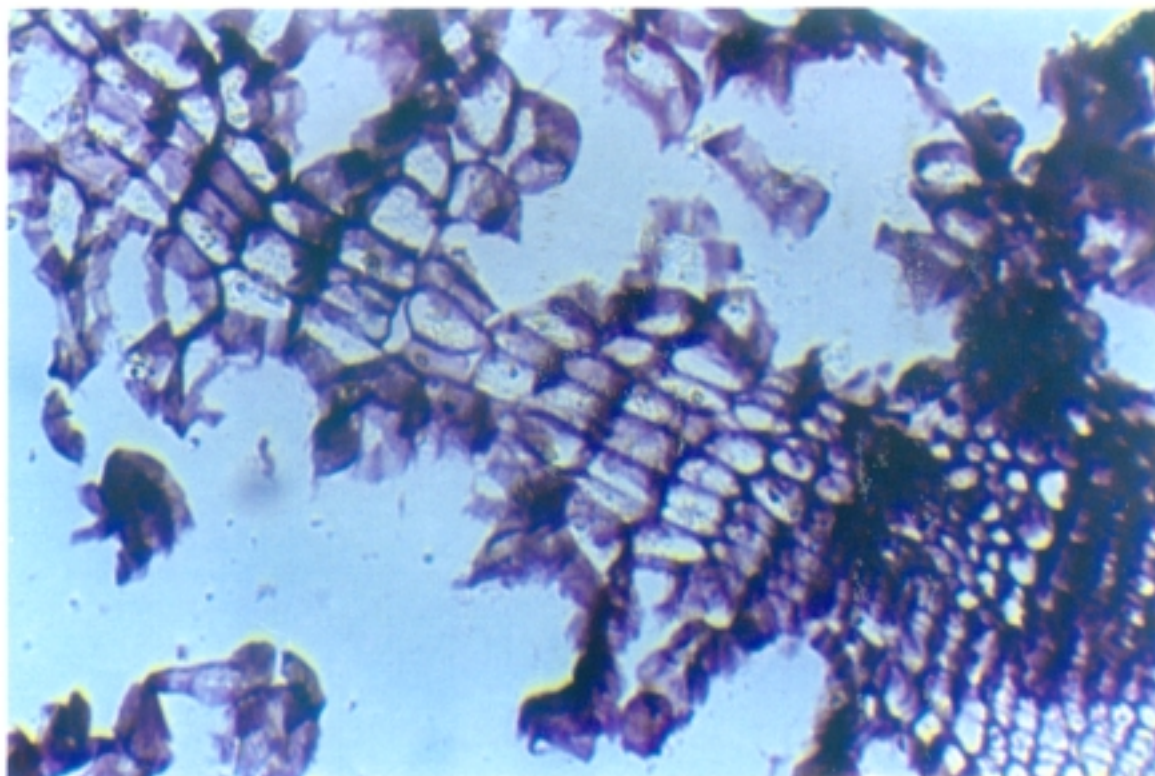
Fotografía n°11.- Zanahoria procesada tratada con  $Cl_2Zn$  (500 X).

## IDENTIFICACION DE CELULOSA Y HEMICELULOSAS EN LA RAIZ DE NABO

Material incluido en parafina y seccionado con microtomo rotatorio tipo Minot



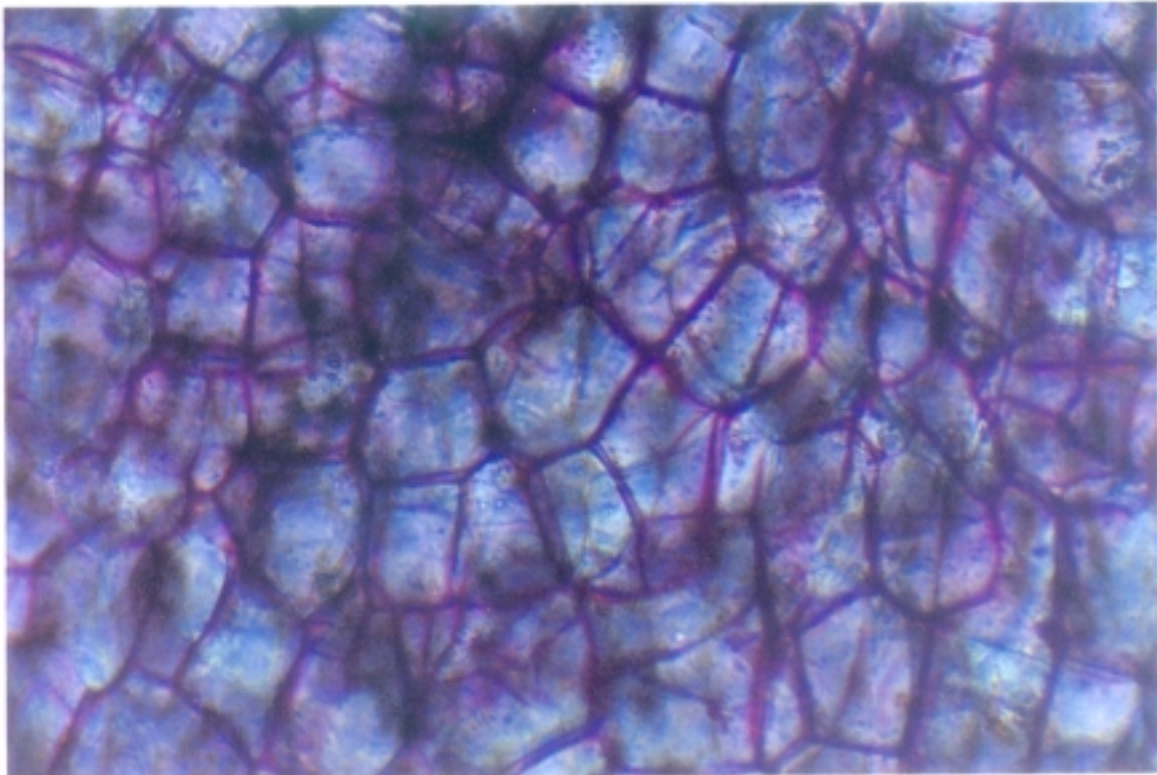
Fotografía n°12.- Nabo fresco (500 X).



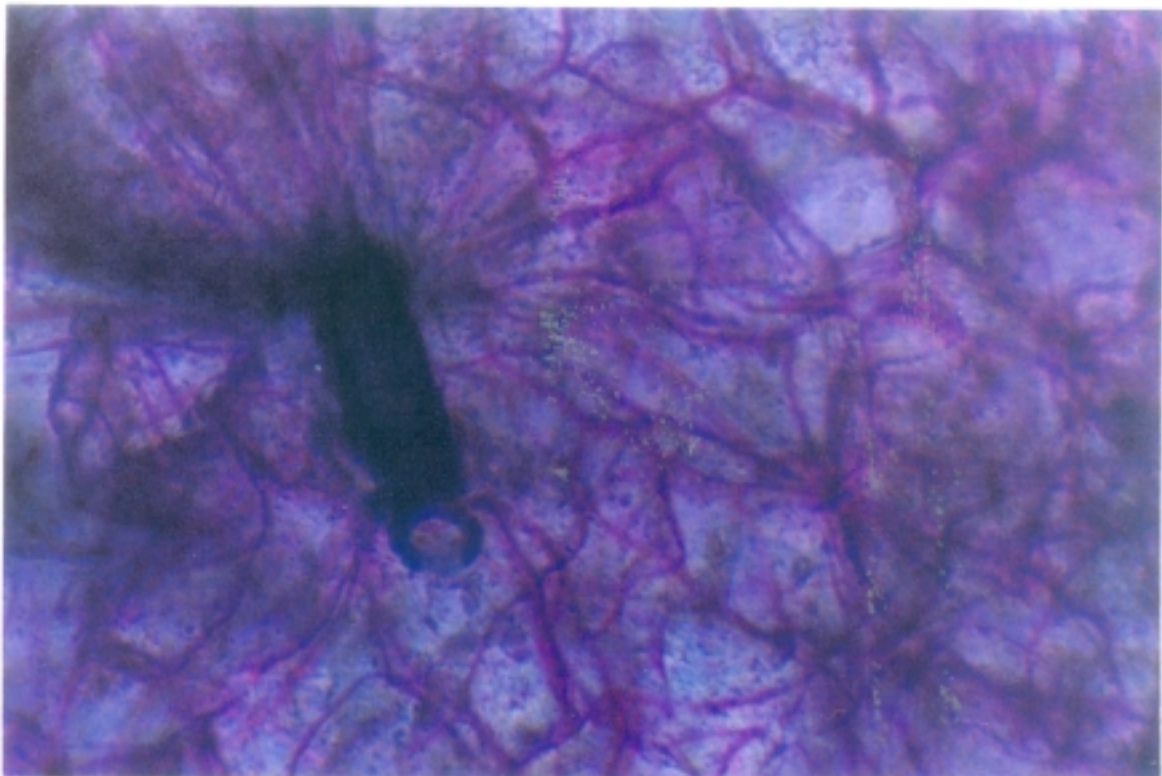
Fotografía n°13.- Nabo procesado (500 X).

## IDENTIFICACION DE SUSTANCIAS PECTICAS EN LA RAIZ DE ZANAHORIA

Material sin fijar seccionado con microtomo de mesa



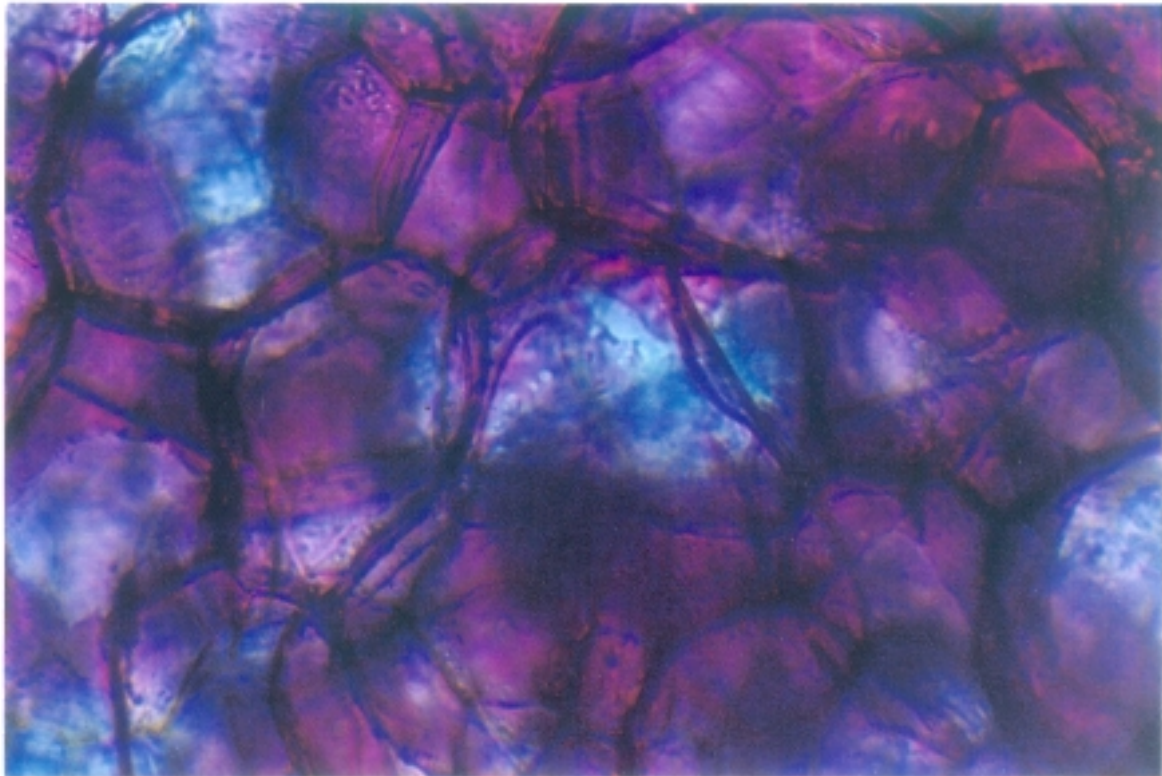
Fotografía n°14.- Zanahoria fresca tratada con rojo de rutenio (500 X)



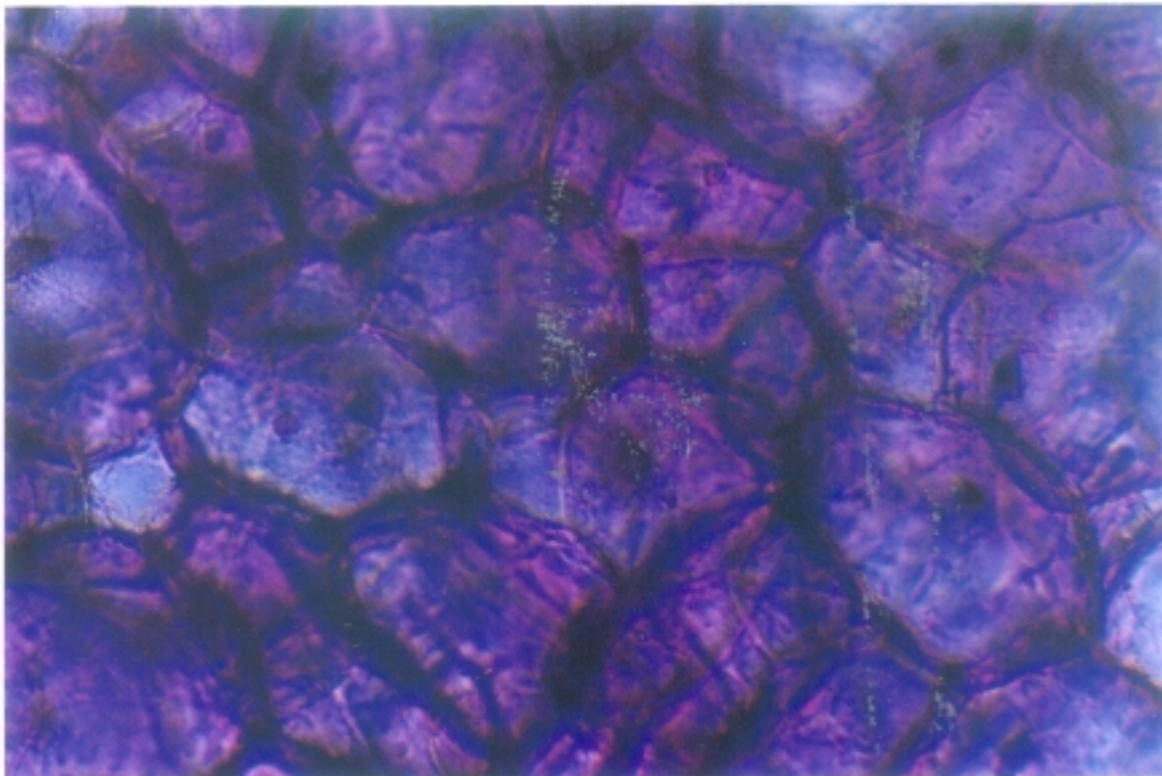
Fotografía n°15.- Zanahoria procesada tratada con rojo de rutenio (500 X)

## IDENTIFICACION DE SUSTANCIAS PECTICAS EN LA RAIZ DE REMOLACHA

Material sin fijar seccionado con microtomo de mesa



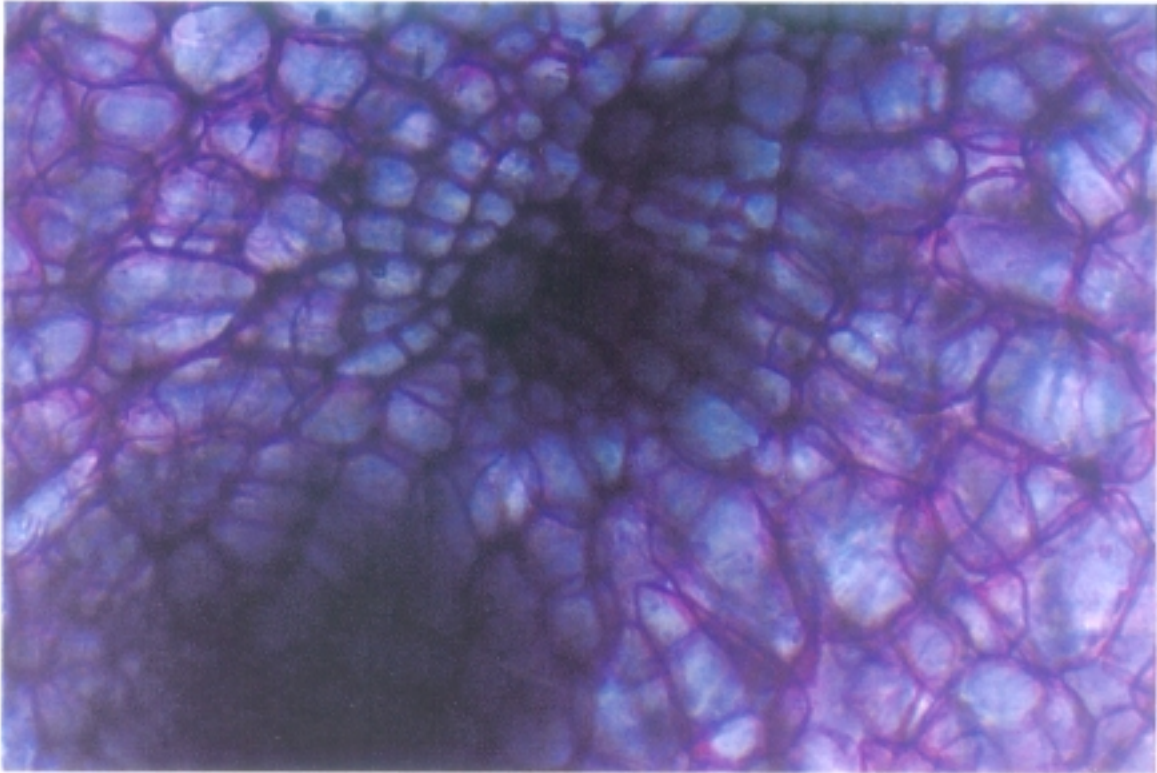
Fotografía n°16.- Remolacha fresca tratada con rojo de rutenio (500 X).



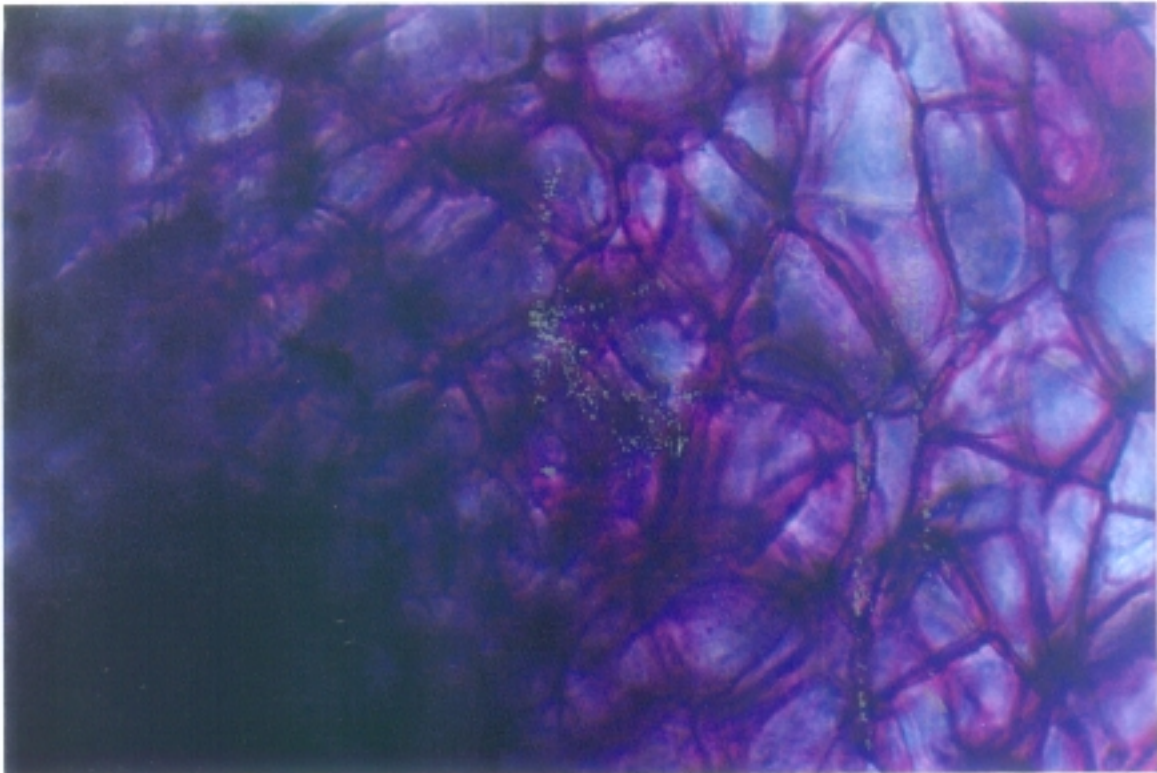
Fotografía n°17.- Remolacha procesada tratada con rojo de rutenio (500 X).

## IDENTIFICACION DE SUSTANCIAS PECTICAS EN LA RAIZ DE NABO

Material sin fijar seccionado con microtomo de mesa



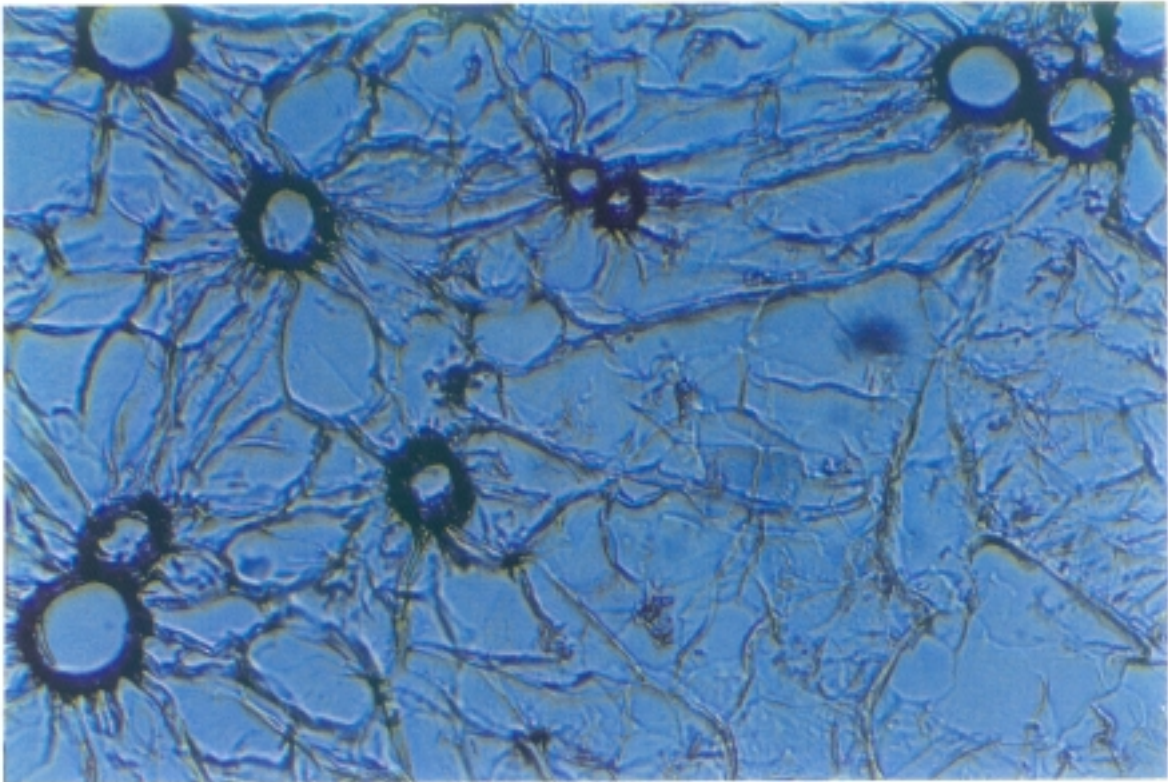
Fotografía n°18.- Nabo fresco tratado con rojo de rutenio (500 X).



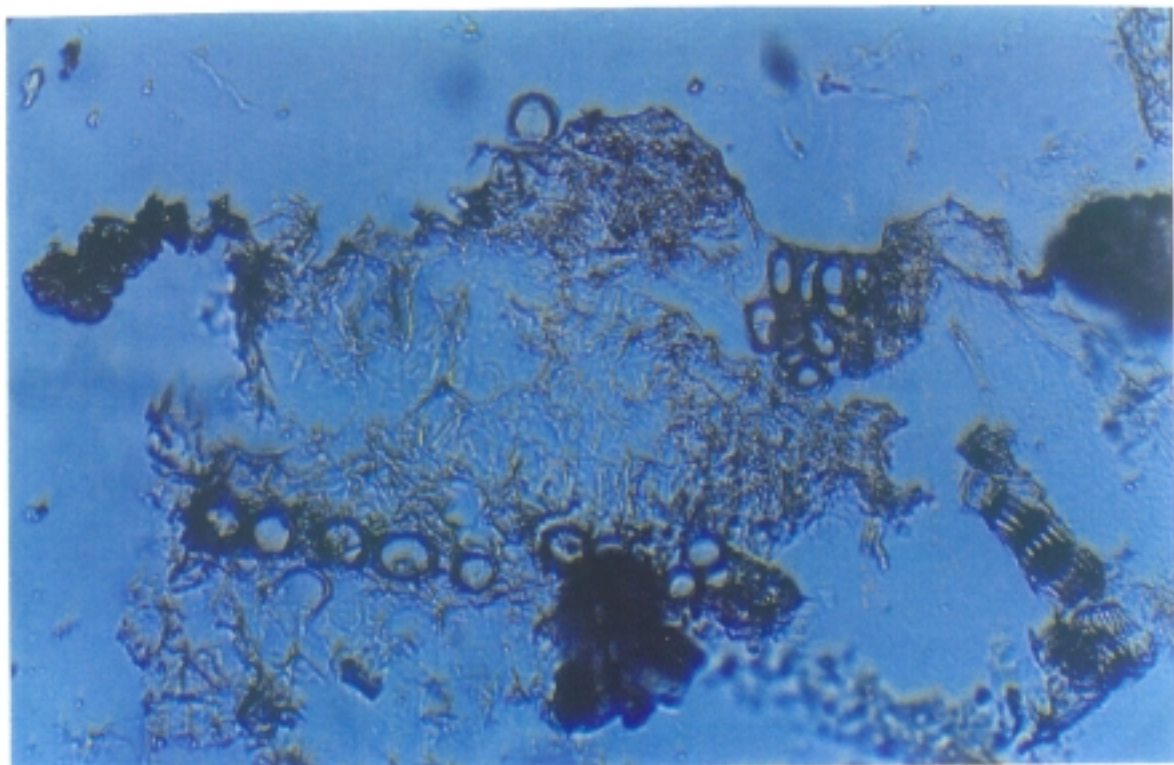
Fotografía n°19.- Nabo procesado tratado con rojo de rutenio (500 X).

## IDENTIFICACION DE LIGNINA

Material incluido en parafina y seccionado con un microtomo rotatorio tipo Minot



Fotografía n°20.- Zanahoria fresca tratada con floroglucina clorhídrica (500 X)



Fotografía n°21.- Zanahoria procesada tratada con floroglucina clorhídrica (500 X)

## IDENTIFICACION DE LIGNINA

Material incluido en parafina y seccionado con un microtomo rotatorio tipo Minot



Fotografía n°22.- Zanahoria procesada tratada con verde-yodo. Sección longitudinal de los vasos (500 X).

## **IV CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Del estudio realizado y de los resultados obtenidos en el mismo, se pueden deducir las siguientes conclusiones respecto a:

### **I.- Métodos analíticos empleados:**

1) Los métodos gravimétricos (químicos y enzimáticos), precisos, sencillos y económicos, requieren, según su fundamento, correcciones relativas a las cenizas y proteínas que pueden contaminar el residuo de fibra. Los resultados experimentales confirman la presencia de estos compuestos mayoritariamente en los residuos procedentes del método enzimático. La mayor o menor presencia de otros compuestos distintos a los polisacáridos no almidón está directamente relacionada con el alimento que se analiza.

2) Los métodos cromatográficos, Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y Cromatografía de Gases, proporcionan más información que los métodos gravimétricos acerca de los monómeros que constituyen la fibra alimentaria, aunque requieren más tiempo y equipo instrumental específico. Se obtiene una buena recuperación y separación de los monosacáridos, y en el caso de la cromatografía líquida, se propone, por los resultados obtenidos, el empleo de una resina de intercambio aniónico para la neutralización del hidrolizado y una columna con un relleno de resina en forma iónica para la separación de los azúcares neutros.

3) De los métodos cromatográficos empleados, la cromatografía líquida de alta eficacia ofrece mayor información que la cromatografía gaseosa sobre los posibles oligosacáridos presentes (celobiosa, celotriosa), pero en este último caso la resolución de los monosacáridos es mejor al conseguir separar galactosa y ramnosa.

4) La determinación de polisacáridos pécticos requiere más estudios para llegar a conseguir una metodología más adecuada. La cuantificación por el método de Asp da lugar a errores por exceso al incluir en la fracción soluble otros compuestos distintos de las sustancias

pécticas y en el caso de los métodos espectrofotométricos, como el de Scott, solo se valora el ácido galacturónico y no los constituyentes monosacáridos de las mismas. El último método, utilizado en este trabajo, es el más adecuado dentro de los espectrofotométricos por no presentar interferencias con hexosas y pentosas.

5) Del estudio realizado sobre distintos métodos para la determinación de fibra alimentaria se deduce que se deben utilizar en función de los objetivos que se pretendan y del tipo de alimento que se vaya a analizar. Los métodos gravimétricos son útiles en análisis de rutina y los cromatográficos para caracterizar los distintos componentes de la fibra. Independientemente del método elegido, es necesario especificarlo en orden a una utilización más correcta de los resultados obtenidos y a su posible comparación, si bien es deseable establecer un método aceptado por todos los investigadores de forma unánime.

6) Respecto a la determinación de la fracción de azúcares solubles se puede indicar que los métodos cromatográficos proporcionan más información que los espectrofotométricos acerca de los distintos monómeros; sin embargo, de cara a una cuantificación global, los resultados que se obtienen son similares en ambos métodos: cromatográfico y espectrofotométrico; ambos presentan una exactitud y precisión óptimas.

## **II.- Caracterización de la fibra alimentaria y azúcares solubles de las hortalizas estudiadas:**

7) De las hortalizas estudiadas, la remolacha presenta el máximo contenido de fibra alimentaria, expresada como FT= 3,35g/100 g m.h. o como NSP= 1,63g/100 g m.h.. De los resultados obtenidos se puede deducir una presencia importante de hemicelulosas, calculadas por la diferencia entre FND y FAD. Este hecho coincide con la mayor presencia de polisacáridos no celulósicos (0,71g/100 g m.h.) respecto a los celulósicos( 0,56g/100 m.h.), determinados por cromatografía líquida de alta eficacia, y el bajo contenido en ácido galacturónico (0,40g/100 g m.h.).

8) La zanahoria destaca por proporcionar el mínimo aporte de fibra (FT= 2,03g/100 g m.h.; NSP= 1,37g/100 g m.h.), así como por contener la máxima cantidad de sustancias pécticas (SP= 0,55g ácido galacturónico/100 g m.h.), hecho que coincide con la presencia de una concentración alta de galactosa y ramnosa, constituyentes importantes de las sustancias pécticas, entre los monosacáridos procedentes de la fibra. Dentro de los polisacáridos no almidón destaca la semejanza entre los celulósicos (0,44g/100 g m.h.) y los no celulósicos (0,44g/100 g m.h.).

9) El nabo ofrece un contenido de fibra alimentaria (FT= 2,02g/100 g m.h.; NSP= 1,46g/100 g m.h.) semejante a la zanahoria e inferior a la remolacha. Al analizar cromatográficamente los monosacáridos que se obtienen por hidrólisis de la fibra se observa que la glucosa es el azúcar mayoritario, con mucha diferencia respecto a los demás, lo que coincide con una mayor presencia de polisacáridos celulósicos (0,71g/100 g m.h.) respecto a los no celulósicos (0,44g/100 g m.h.).

10) De las hortalizas estudiadas, la remolacha, igual que ocurre con la fibra alimentaria, es la que presenta un contenido más alto de azúcares solubles (7,30g/100 g m.h.), a diferencia de la zanahoria (2,97g/100 g m.h.) y del nabo (2,72g/100 g m.h.). En la remolacha, la sacarosa es el azúcar predominante seguido de glucosa y de fructosa. En la zanahoria también predomina el disacárido, pero glucosa y fructosa está más equilibradas. Destaca el caso del nabo por contener una proporción muy elevada de glucosa, a continuación fructosa y la sacarosa en cantidad muy pequeña. La proporción de cada azúcar, en el total de esta fracción es, característica de cada tipo de hortaliza.

11) El estudio por microscopía óptica confirma la presencia, en la pared celular de las hortalizas estudiadas, de los componentes principales de la fibra alimentaria: celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas.

### **III.- Efecto de la cocción en la fibra alimentaria y azúcares solubles de las hortalizas estudiadas:**

12) A la hora de comparar los resultados obtenidos en las hortalizas frescas y en las procesadas es necesario tener en cuenta, no sólo la diferencia de humedad entre ellas, sino también, y principalmente, la pérdida de sólidos por solubilización en el agua de cocción que da lugar a aparentes aumentos en los procesados, que se deben únicamente a incrementos proporcionales a la pérdida de sólidos. Se propone la aplicación de un factor de corrección a los resultados procedentes de las muestras procesadas.

13) La fibra ácido detergente experimenta pérdidas no significativas en el procesado. Se podría hablar de un residuo más estrictamente formado por celulosa y lignina después del tratamiento térmico al solubilizarse en el agua de cocción compuestos, como hemicelulosas y proteínas, que contaminan la FAD.

14) El residuo FND experimenta, igual que en el caso del FAD, pérdidas tras el tratamiento de cocción que son significativas únicamente en el caso de la zanahoria. Las sustancias pécticas pueden contaminar el residuo neutro detergente y, precisamente, en la zanahoria que presenta un contenido más alto en esta fracción es donde la diferencia FAD/FND es significativa.

15) La fibra insoluble determinada por el método enzimático-gravimétrico de Asp sufre pequeñas oscilaciones en distinto sentido, según el lote de que se trate, que no son significativos en ningún caso. Las diferencias más acusadas se observan en la remolacha que es la hortaliza con un contenido más elevado en polisacáridos no celulósicos.

16) La fibra soluble determinada por el método de Asp da resultados más elevados en los procesados que en los frescos, siendo las diferencias significativas en la zanahoria y en la remolacha, pero no en el nabo. El aumento de la fibra soluble se puede atribuir a la presencia de otros compuestos distintos de las sustancias pécticas.

17) Al estudiar comparativamente los resultados de fibra insoluble y de fibra soluble en las muestras frescas y procesadas se puede indicar que se produce una redistribución de las dos fracciones después del tratamiento. En los procesados se produce un descenso de la fibra insoluble y un incremento de la soluble.

18) Los resultados obtenidos aplicando el método de cromatografía líquida de alta eficacia indican que no se producen modificaciones significativas de los distintos monosacáridos que constituyen la fibra alimentaria.

19) La mayor modificación de la fibra alimentaria de las hortalizas estudiadas se observa en las sustancias pécticas, determinadas espectrofotométricamente como ácido galacturónico. Se producen pérdidas por solubilización (zanahoria=24%; remolacha ≈ 23%; nabo = 26%).

20) Los azúcares solubles sufren pérdidas importantes por solubilización en el agua de cocción que dependen del azúcar de que se trate y de la hortaliza estudiada.

21) El estudio microscópico revela que el aspecto de las células del material procesado es diferente que el de las células del material fresco, debido a modificaciones del contenido en humedad, a alteraciones de la estructura de los pectatos cálcicos y hemicelulosas en la pared celular durante el proceso de cocción.

22) El estudio actual de las investigaciones sobre la fibra alimentaria indica que quedan aún muchas cuestiones por elucidar y que falta acuerdo entre los científicos. El presente trabajo contribuye al conocimiento de diferentes aspectos de la fibra alimentaria por el estudio de los métodos analíticos más importantes, por la puesta a punto de una técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y por el estudio realizado sobre materiales frescos y procesados, principalmente respecto a la forma de realizar la comparación entre ellos y el factor de corrección que se debe aplicar a los resultados obtenidos en las muestras procesadas.

## **V BIBLIOGRAFIA**

- AACC COMMITTEE ON DIETARY FIBER (1981). Collaborative study of an analytical method for insoluble dietary fiber in cereals. *Cereal Foods Wld.*, **26**, 6, 295-297.
- AKANJI, A.O.; CHARLES-DAVIS, M.A.; EZENWAKA, C.; ABBIYESUKU, F.A. y OSOTIMEHIN, B.O. (1989). Dietary salt and the glycaemic response to meals of different fibre content. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **43**, 10, 699-703.
- ALBERSHEIM, P. (1975). Walls of growing plant cells. *Sci. Am.*, **232**, 81-95.
- ALBERSHEIM, P. (1978). Concerning the structure and biosynthesis of primary cell walls of plants. *Int. Rev. Biochem.*, **16**, 127-150.
- AMADO, R. (1992). Influence of technological treatment on the physico chemical properties of dietary fibre sources. *Topics in Dietary Fibre Research* (Symposium). Roma-Viterbo, 5-7 May.
- ANDERSON, J.W. y BEARDALL, J. (1991). *Molecular Activities of Plant Cells*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- ANDERSON, N.E. y CLYDESDALE, F.M. (1980a). An analysis of the dietary fiber content of a standard wheat bran. *J. Food Sci.* **45**, 336-340.
- ANDERSON, N.E. y CLYDESDALE, F.M. (1980b). Effects of processing on the dietary fiber content of wheat bran, pureed green beans, and carrots. *J. Food Sci.*, **45**, 1533-1537.
- ANDERSON, J.W. y GUSTAFSON, N.J. (1988). Hypocholesterolemic effects of oat and bean products. *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 749-753.
- ANDERSON, J.W.; GUSTAFSON, N.J.; SPENCER, D.B.; TIETYEN, J. y BRYANT, C.A. (1990). Serum lipid response of hypercholesterolemic men to single and divided doses of canned beans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **51**, 6, 1013-1019.
- ANUARIO DE ESTADISTICA AGRARIA (1990). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Madrid.
- AOAC (1990). Nitrogen (Total) in fertilizers. Modified comprehensive nitrogen method (978.02). En: *AOAC Official Methods of Analysis*, 15th ed. K. Helrich (Ed.). AOAC, Inc., Arlington (USA). pp. 18-19.
- AOAC (1990). Ash of fruits and fruit products (940.26). En: *AOAC Official Methods of Analysis*, 15th ed., K. Helrich (Ed.). AOAC, Inc., Arlington (USA). pp. 915.
- AOAC (1990). Total dietary fiber in foods (985,29). En: *AOAC Official Methods of Analysis*, 15th ed. K. Helrich (Ed.). AOAC, Inc., Arlington (USA), pp 1105-1106.

- ARTS, C.J.; GOVERS, C.A.; Van der BERG, H.; WOLTERS, M.G. y Van LEEUWEN, P. (1991). In vitro binding of strogens by dietary fiber and the in vivo apparent digestibility tested in pigs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 5, 621-628.
- ARTZ, W.E.; WARREN, C.C.; MOHRING, A.E. y VILLOTA, R. (1990). Incorporation of corn fiber into sugar snap cookies. *Cereal Chem.*, **67**, 3, 303-305.
- ASP, N-G. (1987). Dietary fibre. Definition, chemistry and analytical determination. *Molec. Aspects Med.*, **9**, 17-29.
- ASP, N-G. y JOHANSSON C-G. (1984). Dietary fibre analysis. *Nutrit. Abs. Rev. Clin. Nutr.*, **54**, 9, 735-752.
- ASP, N-G.; JOHANSSON, C-G.; HALLMER, H. y SILJESTRÖM, M. (1983). Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J. Agric. Food chem.*, **31**, 476-482.
- AUDIOTOMRE, J.; EASTWOOD, M.A.; EDWARDS, C.A. y GORDON BRYDON, W. (1990). Dietary fiber: in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **52**, 128-134.
- BAKER, D. (1981). Notes on the neutral detergent fiber method. En: *The Analysis of Dietary fiber in Food*. W.P.T. James, and O. Theander (Eds.). Marcel Dekker, New York.
- BANTLE, J.P. (1988). The dietary treatment of diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.*, **72**, 6, 1285-1299.
- BARBER, S.; BENEDITO DE BARBER, C. y LLACER, M.D. (1984). Chemical changes during bread dough fermentation. II. Dietary fiber fractions. *Proc. M.O.C.C.A.*, I pp. 209-215.
- BARCELO, J.; NICOLAS, G.; SABATER, B. y SANCHEZ, R. (1985). Pared celular vegetal. En : *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide, Barcelona. pp. 35-73.
- BARCELO, J.; NICOLAS, G.; SABATER, B. y SANCHEZ, R. (1992). Pared celular vegetal. En: *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide. Barcelona. pp. 41-56.
- BARL, B.; BILIADERIS, C.G. y MURRAY, E.D. (1986). Effect of chemical pretreatments on the thermal degradation of corn husk lignocellulosics. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 1019-1024.
- BARTON, F.E.; WINDHAM, W.R. y HIMMELSBACH, D.S. (1982). Analysis of neutral sugar hydrolysates of forage cell walls by high pressure liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1119-1123.

- BELO, P.S. Jr. y LUMEN, B.O. de (1981). Pectic substance content of detergent extracted fibers. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 370-373.
- BEN-GHEDALIA, D., RUBINSTEIN, A. y DROR, Y. (1989). Effect of ozone and sodium hydroxide treatments on the composition and in vitro digestion of screened manure fiber from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1275-1278.
- BENITO, E.; STIGGELBOUT, A.; BOSCH, F.X.; OBRADOR, A.; KALDOR, J.; MULET, M. y MUÑOZ, N. (1991). Nutritional factors in colorectal cancer risk: a case-control study in Majorca. *Int. J. Cancer*, **49**, 2, 161-167.
- BERKALOFF, A.; BOURGUET; FAVARD y LACROIX (1982). *Biología y Fisiología Celular 4 Tomos*. Ed. Omega, Barcelona.
- BHATTY, R.S. (1990). Cooking quality of lentils: the role of structure and composition of cell walls. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 376-383.
- BIERMAN, C.J. (1988). Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. En: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. R.S. Tipson and D. Horton (Eds.). Academic press, London. pp. 251-271.
- BITTNER, A.S. y STREET, J.C. (1983). Monosaccharide composition of alcohol and detergent insoluble residues in maturing reed canarygrass leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 7-10.
- BITTNER, A.S.; HARRIS, L.E. y CAMPBELL, W.F. (1980). Rapid N-Methylimidazole catalyzed acetylation of plant cell wall sugars. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1242-1245.
- BITTNER, A.S.; BURRITT, E.A.; MOSER, J. y STREET, J.C. (1982). Composition of dietary fiber: neutral and acidic sugar composition of the alcohol insoluble residue from human foods. *J. Food Sci.*, **47**, 1469-1472.
- BLUMENKRANTZ, N. y ASBOE-HANSEN, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489.
- BOLTMAN, B. (1978). *Cook-freeze Catering Systems*. Applied Sci. Publ., London.
- BOMBEN, J.L. y HUDSON, J.S. (1977). Cooked weight and solids loss of air-cooled and water cooled frozen vegetables. *J. Food Sci.*, **42**, 4, 1128-1131.
- BRETT, C.T. and HILLMAN, J.R. (1985). *Biochemistry of Plant Cell Walls*. C.T. Brett and J.R. Hillman (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge.
- BRANDT, L.M.; JELTEMA, M.A.; ZABIK, M.E. y JELTEMA, B.D. (1984). Effects of cooking in solutions of varying pH on the dietary fiber components of vegetables. *J. Food Sci.*, **45**, 900-905.

- BRILLOUET, J.M. (1982). Nonstarchy polysaccharides of legume seeds from the *Papilionoideae* sub-family. *Sci. Aliments*, **2**, II, 135-162.
- BRILLOUET, J.M. y CARRE, B. (1983). Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum sativum*, *Vicia faba*, and *Glycine max*. *Phytochemistry*, **22**, 841-847.
- BRIDGES, S. R.; ANDERSON, J.W.; DEAKINS, D.A.; DILLON, D.W. y WOOD, C.L. (1992). Oat bran increases serum acetate of hypercholesterolemic men. *Am. J. Clin. Nutr.*, **52**, 2, 455-459.
- BROSIO, E. (1992). Physical properties of polysaccharides in food. En: *Topics in Dietary Fibre Research* (Symposium). Roma-Viterbo, 5-7 May.
- BRUNE, M.; ROSSANDER-HULTEN, L., HALLBERG, L.; GLEERUP, A. y SANDBERG, A.S. (1992). Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.*, **122**, 3, 442-449.
- BURDASPAL, P.A.; VELEZ, F.; LEGARDA, M.I. y PINILLA, I. (1980). Expresión del contenido en fibra de los alimentos: fibra bruta y fibra *Alimentaria*. *Alimentaria*, 118, 45-51.
- BURKITT, D.P. (1978). Colonic-rectal cancer: fiber and other dietary factors. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 558-564.
- BURKITT, T.F. y TROWELL, H.C. (1975). (Eds.) *Refined Carbohydrates Food and Disease. Some implications of Dietary Fiber*. Academic Press, London.
- BURKITT, D.P.; WALKER, A.R.P. y PAINTER, N.S. (1972). Effect of dietary fibre on stools and transit-times, and its role in the causation of disease. *Lancet*, **2**, 1408-1412.
- BURKITT, D.P.; WALKER, A.R.P. y PAINTER, N.S. (1974). Dietary fiber and disease. *J. Am. Med. Assoc.*, **229**, 1068-1074.
- CARBONELL, E.; COSTELL, E. y DURAN, L. (1989). Evaluation of various methods for measurement of pectin content in jam. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 4, 689-693.
- CARPITA, N.C. (1990). The chemical structure of the cell walls of higher plants. En: *Dietary Fiber: Chemistry, Physiology and Health Effects*. D. Kritchevsky, C. Bonfield and J. W. Anderson (Eds.). Plenum Press, New York. pp. 15-30.
- CARRA, M.; MESCHI, F.; BOGNETTI, E.; BALZANO, E.; SANTOLLI, S. y SILVA, E. (1990). Blood sugar response to administration of bran or guar added to pasta in children with type I diabetes. *Minerva Pediatr.*, **42**, 9, 333-336.

- CARROAD, P.A.; SCHWARTZ, J.B. y BOMBEN, J.L. (1980). Yields and solid loss in water and steam blanching, water and air cooling, freezing and cooking of broccoli spears. *J. Food Sci.*, **45**, 1408-1410.
- CHAMP, M.; GUILLON, F. y GOURGUE, C. (1990). Influence of autoclaving on physicochemical properties of the beet pulp fibres and on several of their physiological effects. En: *Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects*. D.A.T. Southgate, K. Waldron, I.T. Johnson and G.R. Fenwick (Eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 80-85.
- CLIFFORD, M.N. (1980). Phenol-protein interactions and their possible significance for astringency. En: *Interactions of Food Components*. C.G. Birch and M.G. Lindley (Eds.). Elsevier Applied Science Publishers.
- CLYDESDALE, (1988). Minerals: their chemistry and fate in food. En: *Trace Minerals in Food*. K.T. Smith (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- COBIAC, L.; McARTHUR, R. y NESTEL, P.J. (1990). Can eating baked beans lower plasma cholesterol?. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **44**, 11, 819-822.
- COLMEY, J.C. (1978). High-fiber foods in the american diet. *Food Technol.* March, 42-47.
- CONRAD, E.C. y PALMER, J.K. (1976). Rapid analysis of carbohydrates by high-pressure liquid chromatography. *Food Technol.*, October. 84-92.
- CORTES, F. (1990). Cuadernos de Histología Vegetal. Ed. Marban. Madrid.
- CUMMINGS, J. (1981). Dietary fibre. *Br. Med. Bull.*, **37**, 1, 65-70.
- CUMMINGS, J.H.; ENGLYST, H.N. y WOOD, R. (1985). Determination of dietary fibre in cereals and cereal products - Collaborative trials. Part I: initial trial. *J. Assoc. Publ. Analysts*, **23**, 1-35.
- CUMMINGS, J.H.; BRANCH, W.; JENKINGS, D.J.A.; SOUTHGATE, D.A.T.; HOUSTON, H. y JAMES, W.P.T. (1978). Colonic response to dietary fiber from carrot, cabbage, apple, bran and guar gum. *Lancet* **1**, 5-8.
- DECRETO DE PRESIDENCIA DE GOBIERNO 2257/1972, de 21 de Julio, por el que regula la normalización de productos agrícolas en el mercado interior. B.O.E. nº 205, 26-8-1972. pp. 15717-15718.
- DEKKER, R.F.H. y RICHARDS, G.N. (1972). Determination of pectic substances in plant material. *J. Sci. Fd. Agric.* **23**, 475-483.

- DEVRIES, J.W.; HEROFF, J.C. y EGBERG, D.C. (1979). High pressure liquid chromatographic determination of carbohydrates in food products: evaluation of method. *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, **62**, 6, 1292-1296.
- DIAZ MARQUINA, A. y VILLANUEVA SUAREZ, M<sup>a</sup> J. (1988). Influencia de los procesos culinarios en la fracción hidrocarbonada de platos de origen vegetal de la cocina española. *Anal. Bromatol.*
- DREHER, M.L. (1987). Dietary fiber methodology. En: *Handbook of Dietary Fibre. An Applied Approach*. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.
- DUDEK, J.A.; BERMAN, S.C.; JOHNSON, D.; ELKINS, E.R. Jr. y HAGEN, R.E. (1985). Investigation of total dietary fiber methodology in the characterization of the carbohydrate fraction of canned pears. *J. Food Sci.*, **50**, 851-852.
- EASTWOOD, M.A.; BRYDON, W.G. y BAIRD, J.D. (1984). Faecal weight and composition of serum lipids and diet among subjects aged 18-80 years not seeking health care. *Am. J. Clin. Nutr.*, **46**, 628-634.
- EASTWOOD, M.A. (1992). The physiological effect of dietary fiber: an update. *Annu. Rev. Nutr.*, **12**, 19-35.
- EASTWOOD, M.A. y BRYDON, W.G. (1985). Physiological effects of dietary fiber on the alimentary tract. En: H. Trowell; D. Burkitt and K. Heaton (Eds.). *Dietary Fiber, fiber depleted foods and disease*. Academic Press, London. pp. 105-132.
- EASTWOOD, M.A.; BRYDON, W.G. y ANDERSON, D.M.W. (1986). The effect of the polysaccharide composition and structure of dietary fibers on cecal fermentation and fecal excretion. *Am. J. Cl. Nutr.*, **44**, 51-55.
- EASTWOOD, M.A. y MORRIS, E.R. (1992). Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, **55**, 436-442.
- EDWARDS, C.A. (1990). Physiological effects of fiber. En: *Dietary Fiber: Chemistry, Physiology, and Health Effects*. D. Kritchevsky, C. Bonfield, and J.W. Anderson (Eds.). Plenum Press, New York and London. pp. 167-178.
- EMONS, A.M.C.; DERKSEN, J. y SASSEN, M.M.A. (1992). Do microtubules orient plant cell wall microfibrils?. *Physiol. Plant.*, **84**, 486-493.
- ENGLYST, H.N. (1981). Determination of carbohydrate and its composition in plant materials. En: *The Analysis of Dietary Fiber in Foods*, W.T.P. James and O. Theander (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 71-93.

- ENGLYST, H.N. y CUMMINGS, J. H. (1984). Simplified methods for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, **109**, 937-942.
- ENGLYST, H.N. y CUMMINGS, J.H. (1985). Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **42**, 778-787.
- ENGLYST, H.N. y CUMMINGS, J.H. (1986). Digestion of the carbohydrates of banana (*Musa paradisiaca sapientum*) in the human small intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **44**, 42-50.
- ENGLYST, H.N. y CUMMINGS, J.H. (1987). Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**, 423-431.
- ENGLYST, H.N. y CUMMINGS, J.H. (1988). Improved methods for the measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J. Assoc. Off. Chem.* 71, 4, 808-814.
- ENGLYST, H.N. y HUDSON, G.J.(1987). Colorimetric method for the routine measurement of dietary fibre as non-starch polysaccharides. A comparison with gas-liquid chromatography. *Food Chem.*, **24**, 63-76.
- ENGLYST, H.N.; CUMMINGS, J. y WOOD, R. (1987a). Determination of dietary fibre in cereals and cereal products - collaborative trials part II: study of a modified Englyst procedure. *J. Assoc. Publ. Analysts*, **25**, 3, 59-71.
- ENGLYST, H.N.; CUMMINGS J.H. y WOOD, R. (1987b). Determination of dietary fibre in cereals and cereal products-collaborative trials part III: study of further simplified procedures. *J. Assoc. Publ. Analysts*, **25**, 3, 73-110.
- ENGLYST, H.N.; WIGGINS, H.S. y CUMMINGS, J.H. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, **107**, 307-318.
- ENGLYST, H.N.; QUIGLEY, M.E.; HUDSON, G.J. y CUMMINGS, J.H. (1992). Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Analyst*, **117**, 1707-1714.
- ENGLYST, H.N.; BINGHAM, S.; RUNSWICK, S.; COLLINSON, E. y CUMMINGS, J.H. (1988). Dietary fibre (non-starch polysaccharides) in fruit, vegetables and nuts. *J. Hum. Nutr. Dietet.* **1**, 247-286.
- ENGLYST, H.N.; BINGHAM, S.A.; RUNSWICK, S.A.; COLLINSON, E. y CUMMINGS, J.H. (1989). Dietary fibre (non-starch polysaccharides) in cereal products. *J. Hum. Nutr. Dietet.*, **2**, 253-271.

- ESAU, K. (1976). Anatomía Vegetal. Ed. Omega, Barcelona.
- ESAU, K. (1982). Pared celular. En: *Anatomía de las Plantas con Semilla*. Ed. Hemisferio sur. pp. 41-57.
- FAHN, A. (1985). Anatomía Vegetal. Ed. Pirámide, Madrid.
- FAULKS, R.S. y TIMMS, S.B. (1985). A rapid method for determining the carbohydrate component of dietary fibre. *Food Chem.*, **17**, 273-287.
- FETZER, S.G.; KIES, C. y FOX, H.M. (1979). Gastric disappearance of dietary fiber by adolescent boys. *Cereal Chem.*, **56**, 1, 34-37.
- FISHER, N.; BERRY, C.S.; FEARN, T.; GREGORY, J.A. y HARDY, J. (1985). Cereal dietary fiber consumption and diverticular disease: a lifespan study in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, **42**, 788-804.
- FURDA, I. (1977). Fractionation and examination of biopolymers from dietary fiber. *Cereal Foods World*, **22**, 252-254.
- FURDA, I. (1981). Simultaneous determination of soluble and insoluble fiber. En: *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. W.P.T. James and O. Theander (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 163-172.
- FURDA, I.; GENGLER, S.C.; JOHNSON, R.R.; MAGNUSON, J.S. y SMITH, D.E. (1979). 93rd Annual Meeting of the AOAC, Washington, D.C. Oct. 15-18 (Abstr. 87).
- FRY, S.C. (1989). The structure and functions of xylogucan. *Journal of Experimental Botany*, **40**, 210, 1-11.
- GAHAN, P.B. (1984). Plant Histochemistry and Citochemistry an Introduction. J.F. Sutcliffe and J. Cronshaw (Eds.). Academic Press, London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sidney, Tokyo.
- GAINES, T.P. (1973). Automated determination of reducing sugars, total sugars, and starch in plant tissue from one weighed sample. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 6, 1419-1424.
- GARCIA-LOPEZ, J.S. y LEE, K. (1985). Iron binding by fiber is influenced by competing minerals. *J. Food Sci.*, **50**, 424-425.
- GARLEB, K.A.; BOURQUIN, L.D. y FAHEY, G.C. Jr. (1989). Neutral monosaccharide composition of various fibrous substrates: a comparison of hydrolytic procedures and use of anion exchange high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection of monosaccharides. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1287-1293.

- GEAR, J.; WARE, S-S.; MANN, J.I.; NOLAN, D.J. y BRODRIBB, A.J.M. (1979). "Symptomless diverticular disease and intake of dietary fibre". *Lancet* **1**, 511-514.
- GENEVES, L. (1962). *Manipulations de Botanique*. Ed. Dunod, París.
- GOLDING, E.J. ; CARTER, M.F. y MOORE, J.E. (1985). Modification of the neutral detergent fiber procedure for hays. *J. Dairy Sci.*, **68**, 2732-2736.
- GRAHAM, H.; RYDBERG, M-B. G. y AMAN, P. (1988). Extraction of soluble dietary fiber. *J. Agric Food Chem.*, **36**, 494-497.
- GREENWOOD, C.T. y MILNE, E.A. (1968). Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. En: *Advances in Carbohydrate Chemistry*. M.L. Wolfrom & R.S. Tipson (Eds.). Academic Press, New York and London. pp. 281-366.
- GUILLEN, R.; HEREDIA, A.; FELIZON, B.; JIMENEZ, A. y FDEZ-BOLAÑOS, J. (1991). Preparación y caracterización de fracciones de fibra en aceitunas (variedad hojiblanca). *Grasas y aceites*, **42**, 5, 334-338.
- GUARDIOLA, J.L.B. y GARCIA, L.A. (1990). La pared celular. En: *Fisiología Vegetal I: Nutrición y Transporte*. Ed. Síntesis, Madrid. pp. 27-63.
- HAKOMORI, S. (1964). Rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides catalysed by methylsulphinyl carbanion in dimethyl sulphoxide. *J. Biochem (Tokyo)*., **55**, 205-208.
- HALVARSON, H. y ALSTIN, F. (1984). Dietary fiber determination methods. *Cereal Foods Wld.*, **29**, 9, 571-574.
- HARVEY, R.F.; HEATON, K.W. y POMARE, E.W. (1973). Effects of increased dietary fiber on intestinal transit. *Lancet* **1**, 1278-1280.
- HAYASHI, T. (1989). Xiloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **40**, 139-168.
- HAZELL, T. (1988). Relating food composition data to iron availability from plant foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, **42**, 509-512.
- HEATON, K.W. (1990). Concepts of dietary fibre: chemical and biological aspects. En: *Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects*. D.A.T. Southgate, K. Waldron, I.T. Johnson & G.R. Fenwick (Eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 109-112.
- HEATON, K.W. y POMARE, E.W. (1974). Effects of bran on blood lipids and calcium. *Lancet* **1**, 49-50.

- HECKMAN, M.M. y LANE, S.A. (1981). Comparison of dietary fiber methods for foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 6, 1339-1343.
- HELLENDORRN, E.W. (1973). Physiological importance of indigestible carbohydrates in human nutrition. *Voeding*, **34**, 618-636.
- HELLENDORRN, E.W. (1981). Dietary fiber or indigestible residue?. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 1437-1438.
- HELLENDORRN, E.W.; NOORDHOFF, M.G. y SLAGMAN, J. (1975). Enzymatic determination of the indigestible residue (dietary fibre) content of human food. *J. Sci. Fd Agric.*, **26**, 1461-1468.
- HELLER, S.N.; RIVERS, J.M. y HACKLER, L.R. (1977). Dietary fiber: the effect of particle size and pH on its measurement. *J. Food Sci.*, **42**, 2, 436-439.
- HENNING, A.; ZANDER, R. y GRUHN, K. (1986). On the digestibility and utilization of labelled protein of feeds and food rich in dietary fibres. *Nahrung*, **30**, 2, 213-215.
- HEREDIA, A. (1979). Composición de fibra. I. Métodos de determinación de lignina y celulosa. *Grasas y aceites*, **30**, 2, 106-111.
- HEREDIA, A. (1980). Composición de fibra. III. Fibra dietaria. *Grasas y aceites*, **31**, 2, 121-126.
- HEREDIA, A. (1980). Composición de fibra. IV. Una comparación de métodos en aceitunas. *Grasas y aceites*, **31**, 4, 251-254.
- HEREDIA, A.; SANCHEZ, C.; JIMENEZ, A. y FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. (1992). Effects of processing on dietary fibre content of asparagus. En: *Topics in Dietary Fibre Research* (Symposium). Roma (Viterbo). 5-7 May.
- HERRANZ, J.; VIDAL-VALVERDE, C. y ROJAS-HIDALGO, E. (1981). Cellulose, hemicellulose and lignin content of raw and cooked spanish vegetables. *J. Food Sci.*, **46**, 1927-1933.
- HERRANZ, J.; VIDAL-VALVERDE, C. y ROJAS-HIDALGO, E. (1983). Cellulose, hemicellulose and lignin content of raw and cooked processed vegetables. *J. Food Sci.*, **48**, 274-275.
- HOAGLAND, P.D. (1989). Binding of dietary anions to vegetable fiber. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 5, 1343-1347.
- HOLLANDER, E. y SZEKELY, A. (1989). The effect of a fiber-rich diet on the postprandial blood sugar level in diabetics. *Orv Hetil.*, **130**, 1209-1214.

- HOLDSWORTH, S.D. (1979). Vegetables. En: *Effects of Heating on Foodstuffs*. R.J. Priestley (Ed.). Applied Sci. Publ., London.
- HOLDSWORTH, S.D. (1988). Conservación de Frutas y Hortalizas. Ed. Acribia S.A. Zaragoza
- JENKINS, D.J.A.; LEEDS, A.R.; GASSULL, M.A.; COCHET, B. y ALBERTI, M.M.G. (1977). Postprandial and glucose concentrations by guar gum and pectin. *Ann. Intern. Med.*, **86**, 20-23.
- JENSEN, W.A. (1962). Botanical Histochemistry. G. W. Beadle, R. Emersos y D.M. Whitaker (Eds.). W. H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- JOHANSEN, D.A. (1940). Plant Microtechnique. MacGraw-Hill book company, New York and London.
- JUDD, P.A. y TRUSWELL, A.S. (1981). The effect of rolled oats on blood lipids and fecal excretion in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 2061-2067.
- KATAN, M.B. y VAN DE BOVEMKAMP, P. (1982). Analyse van het totale voedingsvezelgehalte en van het pectine-aandeel hierin in nederlandse voedingsmiddelen. *Voeding*, **43**, 5, 153-160.
- KEEGSTRA, K.; TALMADGE, K.W.; BAUER, W.D. y ALBERSHEIM, P. (1973). The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol.*, **51**, 188-196.
- KIES, C. y FOX, H.M. (1977). Dietary hemicellulose interactions influencing serum lipid patterns and protein nutritional status of adult men. *J. Food Sci.*, **42**, 2, 440-443.
- KIES, C.; SANCHEZ, V.E. y FOX, H.M. (1984). Cellulose supplementation of a nutritionally complete, liquid formula diet: effect on gastrointestinal tract function of humans and fecal fiber recovery. *J. Food Sci.*, **49**, 815-823.
- KIRSTEN, R.; NELSON, K.; STORK, J.; HUBNER-STEINER, U. y SPECK, U. (1991). Influence of two guar preparations on glucose and insulin levels during a glucose tolerance test in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **29**, 1, 19-22.
- KLOPFENSTEIN, C.F. (1990). Nutritional properties of coarse and fine sugar beet fiber and hard red wheat bran. I. Effects on rat serum cholesterol and triglycerides and on fecal characteristics. *Cereal Chem.*, **67**, 6, 538-541.
- KOHN, I.R.; RIBEIRO, L.G.T. (1991). Papel del colesterol en la arterosclerosis y su tratamiento potencial con fibra alimentaria. *Arq. Bras. Cardiol.* **56**, 3, 173-184.

- LEE, S.C.; PROSKY, L. y DEVRIES, J.W. (1992). Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods- Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **75**, 3, 395-416.
- LEVEILLE, G.A. y SAUBERLICH, H. (1966). Mechanism of the cholesterol-depressing effect of pectin in the cholesterol-fed rat. *J. Nutr.*, **88**, 66, 209-213.
- LEWIS, N.G. y YAMAMOTO, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **41**, 455-496.
- LI, B.W. y ANDREWS, k.W. (1988). Simplified method for determination of total dietary fiber in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1063-1064.
- LI, B.W. y CARDOZO, M.S. (1992). Nonenzymatic-gravimetric determination of total dietary fiber in fruits and vegetables. *J. AOAC Int.*, **45**, 2, 372-374.
- LI, B.W. y CARDOZO, M.S. (1993). Total dietary fiber in foods and products with little or no starch, nonenzymatic-gravimetric method. *The Referee*, **17**, 3, 4.
- LIBBY, R.A. (1970). Direct starch analysis using DMSO solubilization and glucoamylase. *Cereal Chem.*, **47**, 273-281.
- LIBRENTI, M.C.; COCCHI, M.; ORSI, E.; POZZA, G. y MICOSSI, P. (1992). Effect of soya and cellulose fiber on post prandial glycemic response in type II diabetic patients. *Diabetes Care*, **15**, 1, 111-113.
- LINDQUIST, B. (1976). Fifth Annual Marabou Symposium on food and fibre. pp. 69. *Nutr. Rev.*, **35**, 3, 1-71.
- LINTAS, C.; CAPPELONI, M.; MONTALBANO, S. y GAMBELLI, L. (1992). Dietary fibre in legumes: effects of processing. En: *Topics in Dietary Fibre Research* (Symposium). Roma (Viterbo). 5-7 May.
- LUND, E.D. y SMOOT, J. (1982). Dietary fiber content of some tropical fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 6, 1123-1127.
- McCONNELL, A.A.; EASTWOOD, M.A. and MITCHELL, W.D. (1974). Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could influence the bowell function. *J. Sci. Fd. Agric.*, **25**, 1457-1464.
- MacLENNAN (1978). Diet, transit time, stool weight and colon cancer in two scandinavian populations. *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 239-242.
- MALMLOF, K.; NUNES, C.S. y ASKBRANT, S. (1989). Effects of guar gum on plasma urea, insulin and glucose in the growing pig. *Br. J. Nutr.*, **61**, 1, 67-73.

- McQUEEN, R.E. y NICHOLSON, J.W.G. (1979). Modification of the neutral detergent fiber procedure for cereals and vegetables by using  $\alpha$ -amilasa. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 3, 676-680.
- MARLETT, J.A. y LEE, S.C. (1980). Hemicellulose contents of selected foods determined by modified and unmodified Van Soest procedures. *J. Food Sci.*, **45**, 1688-1693.
- MARLETT, J.A. y NAVIS, D. (1988). Comparison of gravimetric and chemical analyses of total dietary fiber in human foods. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 311-315.
- MAROTO BORREGO, J.V. (1989). Horticultura herbácea especial. Mundiprensa, Madrid
- MAROTO BORREGO, J.V. (1990). Elementos de horticultura general especialmente aplicada al cultivo de plantas de consistencia herbacea. Mundiprensa, Madrid.
- MARTINEZ PARA, M.C. y TORIJA ISASA, M.E. (1980). La fibra alimentaria. *Alimentaria*, **117**, 47-56.
- MATTHEE, V. y APPLIEDORF, H. (1978). Effect of cooking on vegetable fiber. *J. Food Sci.*, **43**, 1344-1345.
- MELFORD, J.A. and PRAKASH, D.M. (1986). Postharvest changes in fruit cell wall. *Adv. Food Res.*, **30**, 139-193.
- MERCIER, C. (1984). Advances methodology for the identification and quantitation of mono-, oligosaccharides and starch in cereals and their derivatives. *Proc. M.O.C.C.A.*, II, 21-23.
- MEUSER, F.; SUCKOW, P. y KULIKOWSKI, W. (1983). Analytische bestimmung von ballaststoffen in brot. obst und gemüse. *Getreide, Mehl und Brot.*, **37**, 380-383.
- MONGUEAU, R. y BRASSARD, R. (1986). A rapid method for the determination of soluble and insoluble dietary fiber procedure and Englyst's method. *J. Food Sci.*, **51**, 5, 1333-1336.
- MONGEAU, R.; SIDDIQUI, I.R.; EMERY, J. y BRASSARD, R. (1990). Effect of dietary fiber concentrated from celery, parsnip and rutabaga on intestinal function, serum cholesterol, and blood glucose response in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 195-200.
- MONTE, W.C. y MAGA, J.A. (1980). Extraction and isolation of soluble and insoluble fibre fractions from the pinto bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1169-1174.
- MONTE, W.C. y VAUGHAM, L.A. (1982). An outline of "fiber" analysis techniques. *J. Appl. Nutr.*, **34**, 1, 45-65.

- MORRISON, I.M. (1980). Hemicellulosic contamination of acid detergent residues and their replacement by cellulosic residues in cell wall analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 639-645.
- NEILSON, M.J. y MARLETT, J.A. (1983). A comparison between detergent and nondetergent analysis of dietary fiber in human foodstuffs, using high performance liquid chromatography to measure neutral sugar composition. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1342-1347.
- NYMAN, M.; SILJESTRÖM, M.; PEDERSEN, B.; BACHKNUDSEN, K-E; ASP, N-G; JOHANSSON, C-G and EGGUM, B.O. (1984). Dietary fibre content and composition in six cereals at different extraction rates. P. Zeuten; J.C. Cheftel; C. Eriksson; M. Jul; H. Leniger, P. Linko, G. Varela, G. Vos (Eds.). Elsevier Applied Science Publishers. pp. 475-476.
- NYMAN, M.; PALSSON, K-E. and ASP, N-G. (1987). Effects of processing on dietary fibre in vegetables. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **20**, 29-36.
- NYMAN, M. (1992). Effects of processing on dietary fibre in vegetables. *Topics in Dietary Fibre Research* (Symposium). Roma-Viterbo, 5-7 May.
- NYMAN, M.; PALSSON, K-E y ASP, N-G. (1987). Effects of processing on dietary fibre in vegetables. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **20**, 29-36.
- OLDS, B. (1978). Effect of plant fiber on lipase, trypsin and chymotrypsin activity. *J. Food Sci.*, **43**, 634-635.
- O'NEILL, I.K.; BINGHAM, S.; POVEY, A.C.; BROUET, I. y BEREZIAT, J.C. (1990a). Modulating effects in human diets of dietary fiber and beef, and of time and dose on the reactive microcapsule trapping of benzo (a) pyrene metabolites in the rat gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*, **11**, 4, 599-607.
- O'NEILL, I.K.; POVEY, A.C.; BINGHAM, S. y CARDIS, E. (1990b). Systematic modulation of human diet levels of dietary fibre and beef on metabolism and disposition of benzo (a) pyrene in the gastrointestinal tract of Fischer F344 rats. *Carcinogenesis*, **11**, 4, 609-616.
- ORDEN DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACION de 2 de Julio de 1985, por la que se aprueba la Norma de Calidad para zanahorias con destino al mercado interior. B.O.E. nº162. 8-7-1985, pp. 21468-21470.
- PENNER, M.H. y KIM, S. (1991). Nonstarch polysaccharide fractions of raw, processed and cooked carrots. *J. Food Sci.*, **56**, 6, 1593-1599.

- PETERSEN, R.C.; SCHWANDT, V.H. y EFFLAND, M.J. (1984). An analysis of the wood sugar assay using H.P.L.C.: a comparison with paper chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 478-484.
- PETERSON, C.A. (1987). Exodermal casparian bonds: their significance for ion uptake by roots. *Physiol. Plantarum*, **72**, 204-208.
- PILNIK, W. y VORAGEN, A.G.J. (1984). Modern analysis of polysaccharide changes in fruit and vegetable processing. *Proc. M.O.C.C.A.*, **II**, 34-53.
- PROSKY, L. (1992). AOAC Methods and determination of dietary fiber. Task force on nutrient labelling analyses subgroup on fiber issues report. *The Referee*, **16**, 11, 4.
- PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DeVRIES, J.W. y FURDA, I. (1988). Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 5, 1017-1023.
- PROSKY, L.; ASP, N-G.; SCHWEIZER, T.F.; DeVRIES, J.W. y FURDA, I. (1992). Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal of AOAC Int.*, **75**, 2, 360-367.
- PROSKY, L.; ASP, N-G.; FURDA, I.; DeVRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.F. y HARLAND, B.F. (1984). Determinations of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 6, 1044-1051.
- PROSKY, L.; ASP, N-G.; FURDA, I.; DeVRIES, J.W.; SCHWEIZER, T.F. y HARLAND, B.F. (1985). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 4, 677-679.
- QUIGLEY, M.E. y ENGLYST, H.N. (1992). Determination of neutral sugars and hexosamines by high-pressure liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *Analyst*, **117**, 1715-1717.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R.F. y EICHHORN, S.E. (1991). La célula vegetal. En: *Biología de las Plantas*. Ed. Reverté. pp. 13-42.
- RAVINDRAN, G. y PALMER, J.K. (1990). Comparison of four different methods for the analysis of dietary fiber in winged bean seeds. *J. Food Sci.*, **55**, 1, 137-140.
- REDDY, N.N. y SISTRUNK, W.A. (1980). Effect of cultivar, size, storage and cooking method on carbohydrates and some nutrients of sweet potatoes. *J. Food Sci.*, **45**, 682-684.
- REDONDO, A. y VILLANUEVA, M<sup>a</sup> J. (1987). Influencia de la elaboración culinaria en el contenido de seis platos de la cocina española. *Grasas y aceites*, **38**, 4, 210-214.

- REDONDO, A.; VILLANUEVA, M.J.; RODRIGUEZ, M.D. y RUEDA, A. (1987). Determinación del contenido de fibra alimentaria en berenjena y calabacín. *Grasas y aceites*, **38**, 6, 379-382.
- REDONDO, A.; VILLANUEVA, M<sup>a</sup> J.; HEREDIA, A.; GUILLEN, R. y JIMENEZ, A. (1990). Isolation and characterisation of dietary fibre in white asparagus. En: *Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects*. D.A.T. Southgate, K. Waldron, I.T. Johnson and G.R. Fenwick (Eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 141-145.
- REISTAD, R. (1983). Content and composition of non-starch polysaccharides in some norwegian plant foods. *Food Chem.*, **12**, 45-49.
- REISTAD, R. (1984). Content and composition of dietary fibre in some fresh and cooked norwegian vegetables. *Food Chem.*, **13**, 209-224.
- RERAT, A. (1978). Digestion and absorption of carbohydrates and nitrogenous matters in the hindgut of the omnivorous nonruminant animal. *J. Animal Sci.*, **46**, 6, 1808-1837.
- RICARDI, G. y RIVELLESE, A.A. (1991). Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care*, **14**, 12, 1115-1125.
- RIGAUD, D.; RYTTIG, K.R.; LEEDS, A.R.; BARD, D. y APFELBAUM, M. (1987). Effects of a moderate dietary fibre supplement on hunger rating, energy input and faecal energy output in young, healthy volunteers. *Int. J. Obesity*, **11**, 1, 73-78.
- ROBERT, D. y ROLAND, J.C. (1992). La pared celular. En: *Biologie végétale caractéristiques et stratégie évolutive des plantes*. tome I organisation cellulaire. Doin Éditeurs, Paris.
- ROBERTSON, J.B. y SPILLER, G.A. (1977). The detergent system of fiber analysis. En: *Topics in Dietary Fibre Research*. Plenum Press, New York.
- ROBERTSON, J.B. y VAN SOEST, P.J. (1977). Dietary fiber estimation in concentrate feed-stuffs. *J. Animal Sci.* **45**, 254-265.
- ROBERTSON, J.A. y VAN SOEST, P.J. (1981). The detergent system of analysis and its application to human food. En: *The Analysis of Dietary Fiber in Food*. W.P.T. James and O. Theander (Eds.). Marcel Dekker, New York. pp. 123-158.
- RODRIGUEZ, M<sup>a</sup> D.; REDONDO, A. y VILLANUEVA, M<sup>a</sup> J. (1992a). Study of dietary fibre content in cucumber by gravimetric and spectrophotometric methods. *Food Chem.*, **43**, 295-298.

- RODRIGUEZ, M.D.; REDONDO, A. y VILLANUEVA, M.J. (1992b). Estudio comparativo de los métodos m-hidroxifenilfenol y 3,5-dimetilfenol para determinar sustancias pécticas en nabo (*Brassica napus*). *Alimentaria*, 232, 79-83.
- SALVO, F.; TRIPODO, M.M. y DUGO, G. (1984). Determination of fructose and glucose in *cucurbitaceae* by h.p.l.c. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 212-214.
- SARASWATHI, G.; KANCHANA, S. y SHURPALEKAR, S. (1983). Estimation of dietary fibre of some selected indian foods by different methods. *Indian J. Med. Res.*, 77, 833-838.
- SAURA-CALIXTO, F. (1987). Dietary fibre complex in a sample rich in condensed tannins and uronic acids. *Food Chem.*, 23, 95-103.
- SAURA-CALIXTO, F. (1988). Effects of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carob pods. *J. Food Sci.*, 53, 6, 1769-1771.
- SAURA-CALIXTO, F.; CAÑELLAS, T. y GARCIA RASO, J. (1983). Contents of detergent-extracted dietary fibers and composition of hulls, shells, and teguments of almonds (*Prunus amygdalus*). *J. Agric. Food Chem.*, 31, 6, 1235-1238.
- SAURA-CALIXTO, F., GOÑI, I., MAÑAS, E. y ABIA, R. (1991). Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fiber constituents: determination in grape pomaces. *Food Chem.* 39, 229-309.
- SCHWEIZER, T.F. y WÜRSCH, P. (1979). Analysis of Dietary fiber. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 613-619.
- SCHNEEMAN, B.O. (1986). Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technol.*, 2, 104-110.
- SCHNEEMAN, B.O. (1987). Soluble VS insoluble fiber: Different physiological responses. *Food Technol.*, February, 81-82.
- SCOTT, R.W. (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Anal. chem.*, 51, 7, 936-941.
- SCOTT, A.R.; ATTENBOROUGH, Y.; PEACOCK, I.; FLETCHER, E; JEFFCOATE, W.J. y TATTERSALL, R.B. (1988). Comparison of high fibre diets, basal insulin supplement, and flexible insulin treatment for non insulin dependent (type II) diabetics poorly controlled with sulphonylureas. *Br. Med. J.*, 297, 707-710.
- SELVENDRAN, R.R. (1984). The plant cell wall as a source of dietary fiber: chemistry and structure. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 320-337.

- SELVENDRAN, R.R. y DUPONT, M.S. (1980). An alternative method for the isolation and analysis of cell wall material for cereals. *Cereal Chem.*, **57**, 4, 278-283.
- SELVENDRAN, R.R. y DUPONT, M.S. (1984). Developments in Food Analysis Techniques 3, R.D. King (Ed.). Appl. Sci. Publ., London. pp. 1-68.
- SELVENDRAN, R.R. y ROBERTSON, J.A. (1990). The chemistry of dietary fibre: an holistic view of the cell wall matrix. En: *Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects*. D.A.T. Southgate, K. Waldron, I.T. Johnson and G.R. Fenwick (Eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 27-43.
- SELVENDRAN, R.R. y VERNE, A.V.F.V. (1988). The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber. En: *Dietary Fiber: Chemistry, Physiology and Health Effects*. D. Kritchevsky, C. Bonfield and J.W. Anderson (Eds.). Plenum Press, New York. pp. 1-13.
- SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F. y RING, S.G. (1979a). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Anal. Biochem.*, **96**, 282-292.
- SELVENDRAN, R.R.; RING, S.G. y DUPONT, M.S. (1979b). Assessment of procedure used for analysing dietary fiber and some recent development. *Chem. Ind.* April, 225-230.
- SELVENDRAN, R.R.; STEVENS, B.J.H. y DUPONT, M.S. (1987). Dietary fiber: chemistry, analysis, and properties. *Adv. Food Res.* **31**, 117-209.
- SIDDIQUI, I.R. (1989). Studies on vegetables: fiber content and chemical composition of ethanol-insoluble and soluble residues. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 647-650.
- SLAVIN, J.L. y MARLETT, J.A. (1983). Evaluation of high-performance liquid chromatography for measurement of the neutral saccharides in neutral detergent fiber. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 3, 467-471.
- SLONEKER, J.H. (1971). Determination of cellulose and apparent hemicellulose in plant tissue by gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **43**, 539-546.
- SJÖDING, P.B.; NYMAN, M.E.; NILSSON, L.; ASP, N-G.L. y JAGERSTAD, M.I. (1985). Binding of <sup>14</sup>C-labelled food mutagens (IQ, MeIQ, MeIQx) by dietary fibre in vitro. *J. Food Sci.*, **50**, 1680-1684.
- SOLER, L; CAÑELLAS, J. y SAURA-CALIXTO, F. (1989). Changes in carbohydrate and protein content and composition of developing almond seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 5, 1400-1404.

- SOLUM, T.T.; RYTTIG, K.R.; SOLUM, E. y LARSEN, S. (1987). The influence of a high-fibre diet on body weight, serum lipids and blood pressure in slightly overweight person. *Int. J. Obesity*, **11**, 1, 67-71.
- SOUTHGATE, D.A.T. (1969). Determination of carbohydrates in foods II - Unavailable carbohydrates. *J. Sci. Fd. Agric.*, **20**, 331-335.
- SOUTHGATE, D. (1992). Conservación de frutas y hortalizas. 3ª ed. Acribia S.A., Zaragoza.
- SOUTHGATE, D.A.T.; HUDSON, G.J. y ENGLYST, H.N. (1978). The analysis of dietary fibre - the choices for the analyst. *J. Sci. Food Agric.*, **1**, 28, 979-988.
- SOUCI-FACHMANN-KRAUT (1986/87). Food composition and nutrition tables. Ed. Wissenschaftliche verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- SUNDARAVALLI, O.E.; SHURPALCKAR, K.S. y RAD, M.N. (1971). Effect of dietary cellulose supplements of the body composition and cholesterol metabolism of albino rats. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 116-120.
- SZENDE, B.; JENEY, A. y LAPIS, K. (1990). Methylcellulose prevents the regression of calcium tetrachloride-induced liver fibrosis and cirrhosis in rats. *J. Toxicol. Environ Health*, **29**, 1, 59-63.
- THEANDER, O. (1981). The chemistry of dietary fiber. En: *Fiber in Human Nutrition*. Ed. Apria, París. pp. 27-41.
- THEANDER, O. (1983). Advances in the chemical characterisation and analytical determination of dietary fiber components. En: *Dietary Fibre*. G.C. Birch and K.T. Parker (Eds.). Applied Sci. Pub., London. pp.77-93.
- THEANDER, O. y ÅMAN, P. (1979a). Studies on dietary fibres. 1. Analysis and chemical characterization of water-soluble and water-insoluble dietary fibres. *Swedish J. agric. Res.* **9**, 97-106.
- THEANDER, O. y ÅMAN, P. (1979b). The chemistry, morphology and analysis of dietary fiber components. En: *Dietary Fibers: Chemistry and Nutrition*. G.E. Inglett, S.E. Falkeag (Eds.). Academic Press, New York. pp. 215-244.
- THEANDER, O. y WESTERLUND, E.A. (1986). Studies on dietary fiber.3. Improved procedures for analysis of dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 2, 330-336.
- THEANDER, O.; ÅMAN, P.; WESTERLUND, E. y GRAHAM, H. (1990). The Uppsala method for rapid analysis of total dietary fiber. En: *New Developments in Dietary Fiber*. I. Furda and C.J. Brine (Eds.). Plenum Press, New York. pp. 273-281.

- TODD, S.L.; CUNNINGHAM, F.E.; CLAUS, J.R. y SCHWENKE, J.R. (1989). Effect of dietary fiber on the texture and cooking characteristics of restructured pork. *J. Food Sci.*, **54**, 5, 1198-1192.
- TOMA, R.B. y CURTIS, D.J. (1986). Dietary fiber: effect on mineral bioavailability. *Food Technol.* Feb. 111-116.
- TRESSLER, D.K. y JOSLYN, M.A. (1961). Fruit and vegetable juice processing technology. Avi Publishing Company, Westport, Connecticut.
- TROWELL, H.C. (1973). Dietary fibre, ischaemic heart disease and diabetes mellitus. *Proc. Nutr. Soc.*, **32**, 151-157.
- TROWELL, H.C. (1974). Definitions of fibre. *Lancet*, **1**, 503.
- TROWELL, H. (1988). Dietary fiber definitions. *Am. J. Clin. Nutr.*, **48**, 1079-1080.
- TROWELL, H.; BURKITT, D. y HEATON, K. (1985) (Eds.). Editors of *Dietary Fibre, Fibre- Depleted Foods and Disease*. Academic Press, London.
- TROWELL, H.C., SOUTHGATE, D.A.T., WOLEVER, M.A.; GASSULL y JENKINS, D.J.A. (1976). Dietary fibre re-defined. *Lancet* **1**, 967.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Human Nutrition Information Service. HNIS/PT-106.(1988). Provisional table on the dietary fiber content of selected foods.
- VAN DOKKUM, W.; WEESTRA, A. y SCHIPPERS, F.A. (1982). Physiological effects of fibre-rich types of bread. *Br. J. Nutr.* **47**, 451-460.
- VAN SOEST, P.J. (1963a). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **46**, 5, 825-829.
- VAN SOEST, P.J. (1963b). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **46**, 5, 829-835.
- VAN SOEST, P.J. (1965). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. III. Study of effects of heating and drying on yield of fiber and lignin in forages. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **48**, 4, 785-790.
- VAN SOEST, P.J. (1966). Nonnutritive residues: a system for analysis for the replacement of crude fiber. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49**, 3, 516-520.

- VAN SOEST, P.J. (1973). The uniformity and nutritive availability of cellulose. *Federation Proc.*, **32**, 7, 1804-1806.
- VAN SOEST, P.J. (1984). Some physical characteristics of dietary fibres and their influence on the microbial ecology of the human colon. *Proc. Nutr. Soc.*, **43**, 25-33.
- VAN SOEST, P.J. y McQUEEN, R.W. (1973). The chemistry and estimation of fibre. *Proc. Nutr. Soc.*, **32**, 123-130.
- VAN SOEST, P.J. y WINE, R.H. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **50**, 1, 50-55.
- VARELA, G. (1984). Effects of processing on nutritonal value of foods with special reference to meat and fish proteins. *Proc. M.O.C.C.A.*, I, 13-32.
- VARO, P.; LAINE, R. y KOIVISTOINEN, P. (1983). Effect of heat treatment on dietary fiber: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 4, 933-938.
- VARO, P.; VEIJALAINEN, K. y KOIVISTOINEN, P. (1984). Effect of heat treatment on the dietary fiber contents of potato and tomato. *J. Food Technol.*, **19**, 485-492.
- VIDAL-VALVERDE, C. y FRIAS, J. (1991). Legume processing effects on dietary fiber components. *J. Food Sci.*, **56**, 5, 1350-1352.
- VIDAL-VALVERDE, C.; FRIAS, J. y ESTEBAN, R. (1992). Dietary fiber in processed lentils. *J. Food Sci.*, **57**, 5, 1161-1163.
- VIDAL-VALVERDE, C.; MARTIN-VILLA, C.; OLMEDILLA, B. y BLANCO, I. (1985). High performance liquid chromatography systems to separate and quantify a mixture of nine sugars and four polyols. *J. Liquid Chromatogr.*, **8**, 1, 75-94.
- VIDAL-VALVERDE, C.; PEREZ LOPEZ, M. y ROJAS-HIDALGO, E. (1983). Pectic substances in raw and cooked, fresh or processed spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 949-953.
- VILLANUEVA, M<sup>a</sup> J.; REDONDO, A. y RODRIGUEZ, M<sup>a</sup> D. (1990). Determinación de sustancias pécticas en berenjena y calabacín por dos métodos espectrofotométricos. *Anal. Bromatol.*, XLII-1, 57-64.
- VISSER, R.F. y GURNSEY, C. (1986). Inconsistent differences between neutral detergent fiber and total dietary fiber values of fruits and vegetables. *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, **69**, 4, 565-567.