

**Optimización de la encapsulación de
fitoesteroles de palma africana (*Elaeis
guineensis*), con alginato de sodio como
material encapsulante para su adición en
yogur natural**

Joshué Walberto Cevallos Torres

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Optimización de la encapsulación de
fitoesteroles de palma africana (*Elaeis
guineensis*), con alginato de sodio como
material encapsulante para su adición en
yogur natural**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Joshué Walberto Cevallos Torres

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Optimización de la encapsulación de fitosteroles de palma africana (*Elaeis guineensis*), con alginato de sodio como material encapsulante para su adición en yogur natural

Joshué Walberto Cevallos Torres

Resumen. Una de las tendencias actuales son los alimentos funcionales. La fortificación de matrices alimenticias con compuestos funcionales que ayudan positivamente a la salud ha tomado fuerza en el campo científico. En este estudio se evaluó la optimización de la encapsulación de fitoesteroles mediante el uso de alginato de sodio como material encapsulante. Se realizaron pruebas preliminares, donde se establecieron concentraciones finales de 0.4, 0.5 y 0.6% (p/v) de alginato de sodio en agua destilada. La gelificación se realizó por metodología iónica externa en concentraciones de CaCl_2 de 0.2% (p/v). Las partículas fueron liofilizadas y analizadas por cromatografía de gases para determinar su contenido de fitoesteroles. Se evaluó la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulado mediante la metodología de Superficie de Respuesta. Se determinó un tratamiento óptimo resultado del análisis estadístico para su aplicación en el yogur natural de Zamorano, con concentraciones de 0.69% (p/v) de alginato de sodio y una relación de solventes de 92:8 (fase acuosa/aceite), del cual, se obtuvo una capacidad de carga de fitoesteroles de 11.10 mg/g alginato. Se evaluaron los atributos de viscosidad y acidez titulable para determinar la influencia de su adición en el yogur, en comparación al control entre el día 0 y el día 15, donde no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Se recomienda aumentar la relación fitoesterol-alginato, para obtener cápsulas con cantidades de fitoesteroles considerables.

Palabras clave: Cápsulas de hidrogel, colesterol, fitoquímico, gelificación iónica externa.

Abstract. Functional foods are one of the actual trends. Fortified functional food matrices that helps healthiness in a positive way are becoming strong in the scientific field. The optimization of the encapsulated phytosterols were evaluated through sodium alginate as a material for the encapsulation. Preliminary tests were carried out where final concentrations were established as 0.4, 0.5, and 0.6% (w/v) of sodium alginate on distilled water. Gelation of the particles was performed by ionic external methodology with concentrations of CaCl_2 0.2% (w/v). The particles were lyophilized and analyzed by gas chromatography to determine the amount of phytosterols. Efficiency and loading capacity of the encapsulation were evaluated through the response surface methodology. An optimized treatment was determined based on the results of the statistical analysis for the addition in natural yogurts of Zamorano, with concentrations of 0.69% (w/v) of sodium alginate with a solvent ratio of 92:8 (water/oil phase) the it obtained a load capacity of phytosterols of 11.10 mg/g-algin. Attributes of viscosity and titratable acidity were evaluated to determine the effect of its addition in yogurt. In comparison between day 0 and day 15, there were no significant differences among the treatments. It is recommended to increase the amount of phytoesterols to obtain capsules with important content inside of them.

Key words: Cholesterol, hydrogel beads, ionic external gelation, phytochemical.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4. CONCLUSIONES.....	22
5. RECOMENDACIONES.....	23
6. LITERATURA CITADA	24
7. ANEXOS.....	27

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Niveles codificados de las variables independientes.....	8
2. Tratamientos establecidos por superficie de respuesta con niveles codificadas y variables reales.....	8
3. Tamaños promedios de las partículas en los diferentes tratamientos.....	11
4. Clasificación Duncan de los tamaños promedio de las partículas de los diferentes tratamientos.....	12
5. Separación Duncan de las cápsulas con concentración de 0.5% de alginato.....	12
6. Capacidad de carga final de fitoesteroles recuperados de la cromatografía de gases.....	15
7. Coeficientes de regresión y la probabilidad del modelo de regresión lineal de la capacidad de carga de las partículas.....	17
8. Coeficientes de regresión y la probabilidad del modelo de regresión lineal de la eficiencia de encapsulado de las partículas.....	17
9. Análisis de viscosidad en el yogur sin sabor con los diferentes tratamientos (mpa.s).....	20
10. Análisis de % ATECAL en el yogur sin sabor con los diferentes tratamientos...	21
Figuras	Página
1. Flujo de proceso de elaboración y adición de cápsulas.....	5
2. Extrusión de tratamientos hacia la solución de endurecimiento.....	10
3. Tratamiento homogenizado para encapsular.....	10
4. Captura del tamaño de partícula de tratamiento 0.4% alginato.....	13
5. Captura del tamaño de partícula de tratamiento 0.5% alginato.....	13
6. Captura del tamaño de partícula de tratamiento 0.6% alginato.....	14
7. Agrupación de partículas del tratamiento 0.5% alginato.....	14
8. Efecto del porcentaje de alginato y la relación de solventes sobre la capacidad de carga de la partícula.....	16
9. Efecto del porcentaje de alginato y la relación de solventes sobre la eficiencia de encapsulado de la partícula.....	16
10. Efecto del porcentaje de alginato y retención de solventes sobre la deseabilidad del modelo basado en la capacidad de carga y eficiencia de encapsulado.....	18
11. Comportamiento reológico del tratamiento óptimo a los 15 días.....	19
12. Comportamiento reológico del tratamiento control a los 15 días.....	19
13. Comportamiento reológico del tratamiento central a los 15 días.....	19

Anexos	Página
1. Punto crítico de optimización de tratamiento y sus valores obtenidos.	27
2. Resultado de análisis de medidas repetidas en el tiempo de %ATECAL.....	27
3. Resultado de análisis de medidas repetidas en el tiempo de viscosidad.	28
4. Cromatograma de referencia de fitosteroles de palma africana.	28

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los productos funcionales alrededor del mundo han tomado gran importancia en el consumo masivo que apunta a una dieta más saludable. Por tal motivo, el interés de la industria de alimentos en procesar y desarrollar nuevos productos beneficiosos para la salud, ha conllevado a una significativa inversión monetaria para investigaciones relacionadas. Diversos estudios epidemiológicos demuestran una estrecha correlación entre el consumo de dietas ricas en vegetales y frutas, y la reducción de la incidencia de diversas enfermedades como son el cáncer, cardiovasculares, diabetes, enfermedades crónicas, entre otras (Jacoby y Keller 2006).

Se considera que las frutas y vegetales son importantes para la salud por los nutrientes esenciales que poseen, pero la complejidad por su composición de los fitoquímicos que la conforman, son los que muestran este argumento relevante. De esta manera, el contenido de la dieta diaria debe ser equilibrada, donde gran parte de los carbohidratos, proteínas y vitaminas, provengan de las frutas y vegetales (López 2018). Los fitoquímicos se clasifican en grupos generales tales como fenólicos, alcaloides, componentes que contienen nitrógeno, organosulfurados, fitoesteroles y carotenoides, de los cuales, se extiende una gran cantidad de específicos. Por ende, la elaboración de productos biofortificados con estos fitoquímicos apuesta a brindar productos más saludables y funcionales para el metabolismo.

Uno de los fitoquímicos más estudiados y de mayor importancia en la actualidad para la industria son los esteroides vegetales. Los esteroides vegetales son micro elementos que provienen de las plantas que poseen estructura y función similar a la del colesterol. Se encuentran en la membrana vegetal y dentro de sus funciones en las plantas está la biosíntesis de celulosa y producción de elementos secundarios como alcaloides, entre otros (Palou *et al.* 2005). Estos compuestos difieren del colesterol animal por su estructura, ya que presentan una adición en el carbono 17 de esteroides. En el caso del β -sitosterol que tiene mayor presencia dentro de estos, inhibe el crecimiento del cáncer de colon y próstata, controlando a nivel celular la propiedad cancerígena (Noormazlinah *et al.* 2019).

A nivel mundial existe un alto índice de defunción que se atribuye a las enfermedades cardiovasculares. Por tal motivo, se ha intensificado el estudio para la utilización de fitoquímicos en la fortificación de alimentos. Según la OMS (2017), las enfermedades cardiovasculares son la principal causante con datos estadísticos que indican alrededor del 31% de todas las muertes registradas en el 2015. Dentro de las enfermedades cardiovasculares, el colesterol es el causante principal de enfermedades coronarias, hepáticas y renales, entre otras.

De igual manera, la hipercolesterolemia es una enfermedad genética que radica en concentraciones altas de lipoproteína de baja densidad por sus siglas en inglés LDL, dificultando su eliminación en el plasma sanguíneo (Herrera *et al.* 2016). Este contraste entre la mayor problemática de muertes a nivel mundial, y la actividad biológica de los esteroides dentro del intestino y el plasma sanguíneo, ha surgido con suma importancia de investigación y desarrollo de productos biofortificados. La ingesta de alimentos biofortificados con esteroides puede reducir alrededor de hasta un 10% del colesterol, con cantidades mínimas de 1.5 - 2 g, en un periodo de aproximadamente tres semanas (San Mauro *et al.* 2016). Sin embargo, se pueden evidenciar efectos positivos desde una ingesta mínima de 160-360 mg por día (Vries *et al.* 1997). Los esteroides ingeridos provocan una disminución de la absorción del colesterol en el intestino en un 20 a 80%. De esta manera el hígado busca compensación para aumentar los receptores de LDL, lo que resulta una disminución del mismo sin afectar la lipoproteína de alta densidad presente (San Mauro Martin, 2016).

El aprovechamiento de los esteroides vegetales se da plenamente en las micelas mixtas del intestino delgado, por ende, la ingesta de estos compuestos debe garantizar la llegada y absorción de los mismos. De esta manera, se emplea una técnica de microencapsulación a estos compuestos. La microencapsulación es una técnica que se define como un empaquetamiento que protege al producto de factores externos, manteniendo el producto bioactivo y cuidando su estabilidad. La microencapsulación puede ser de varios materiales, especialmente con la utilización de una membrana polimérica que mantiene ese compuesto bioactivo con sus características iniciales (Parra 2010). Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la gelificación iónica inversa y directa.

Los alginatos son sales que se forman a partir del ácido algínico, con diferentes elementos químicos. El ácido algínico, es un compuesto químico proveniente de la extracción de la pared celular de las algas. Químicamente, estos compuestos son polímeros conformados por monómeros de ácido urónicos, donde en su estructura, el grupo CH_2OH de 6 carbonos, se reemplaza por COOH ; esta modificación da paso a la presencia de un ácido D-manurónico, y el ácido L-gulurónico (Medina y Ledo 2010). Así mismo, interactúan con los cationes divalentes como el Ca^{2+} , donde forman la caja de huevo (“Egg box”) que permite la encapsulación del compuesto.

En esta investigación se establecieron los siguientes objetivos:

- Optimizar la microencapsulación de fitoesteroides, con la utilización de alginato de sodio como material encapsulante.
- Determinar el tamaño y morfología de las cápsulas para ser adicionado a una matriz alimenticia.
- Analizar los cambios en acidez y viscosidad de las partículas adicionadas a través del tiempo en la matriz alimenticia (yogur natural).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El desarrollo de este proyecto se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), utilizando diferentes análisis y pruebas a desarrollar disponibles y permitidas en el laboratorio, garantizando el desarrollo correcto del estudio. El laboratorio se encuentra dentro de las instalaciones de la Universidad Zamorano ubicada en el Km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaré, Municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

Materiales.

Alginato de sodio (TICA-algin HG 400 Powder, Lote:9194) donado como muestra de cortesía por TIC Gums Co. (Belcamp, MD, USA). Cloruro de calcio dihidratado, granular (74-78%) (J.T. Baker UK). Aceite de Canola (4.73 l) (Wesson Chicago, Illinois, USA). Lecitina de soya (1 kg). Agua destilada.

Metodología.

Fase 1. La fase preliminar del estudio, consistió en encontrar la combinación de valores óptimos y permitidos para la elaboración del encapsulado, donde la cantidad de solvente y fitoesteroles en la solución, son utilizados en la mayor cantidad posible por el material encapsulante, y a su vez, no sea fácilmente percibido por el consumidor. De tal manera, se establecieron tres tratamientos para cada variable. Para el material encapsulante alginato, las concentraciones planteadas fueron de 0.4, 0.5 y 0.6%, en relación a la proporción mezclada como solución acuosa. En el caso de la solución final a encapsular, se establecieron tres diferentes relaciones basadas en la emulsión de agua/aceite (w/o). Las relaciones utilizadas fueron de 10/90, 20/80 y 70/30, emulsificadas con lecitina a 1.4% (p/v). Para las proporciones de fitoesteroles, se utilizó una relación de 1:4 tomando como referencia la concentración de alginato en el tratamiento.

En la fase preliminar, se realizaron diferentes pruebas de combinación entre la fase acuosa y el aceite preparado para determinar las proporciones adecuadas. En el caso de la preparación de aceite, se utilizó aceite vegetal de canola como solvente, donde se disolvieron los fitoesteroles. Para la fase acuosa, se preparó con agua destilada y alginato de sodio a diferentes concentraciones antes mencionadas. De esta manera, las proporciones se definieron por la homogeneidad de la solución final para proceder el encapsulado.

Posteriormente, se encapsuló el tratamiento preparado por método de extrusión externa para obtención de cápsulas menos permeables. Utilizando una solución de cloruro de calcio a una concentración de 0.2% (p/v), se realizó el goteo a una velocidad de 12 a 18 gotas por

minuto para la gelificación de los tratamientos. Las partículas resultantes fueron liofilizadas y analizadas para determinar su tamaño, morfología, eficiencia de encapsulado y capacidad de carga de los diferentes tratamientos.

Preparación solución de alginato de sodio. Para la preparación de la solución de alginato, se elaboró la solución a partir de tres diferentes concentraciones antes mencionadas: 0.4, 0.5 y 0.6% (p/v). La preparación de la solución fue en base a 100 mL de agua destilada en vasos de precipitación de 250 mL. Las concentraciones de 0.4, 0.5 y 0.6, fueron determinadas agregando 4, 5 y 6 mg/mL, a los diferentes vasos de precipitación respectivamente. La agitación en la preparación fue constante y a velocidad de 700 rpm debido a su alta viscosidad, realizada con un agitador magnético. La temperatura utilizada para facilitar la mezcla fue entre los 70 - 80 °C por 10 minutos.

Preparación solución de fitoesteroles. La concentración de fitoesteroles fue establecida en relación a la cantidad de alginato utilizado en la solución acuosa. Se utilizó aceite vegetal de canola como solvente para la dilución debido a la naturaleza del compuesto bioactivo, para mantenerlo en solución hasta el encapsulado. La cantidad de fitoesteroles en la preparación de aceite variaba según el tratamiento que iba a ser empleado, pero siendo constante en los tratamientos. La relación de fitoesteroles planteada fue de 40% del total de alginato utilizado en el tratamiento, misma que se mantuvo como relación p/p. Se prepararon 100 mL de cada tratamiento para posteriormente ser encapsulados.

Preparación del tratamiento. La preparación del tratamiento para encapsular se hizo con tres concentraciones diferentes de proporciones entre solución acuosa y aceite con fitoesteroles. Las proporciones definidas fueron de 10/90, 20/80 y 30/70 (w/o) para la preparación de 100 mL de muestra. Adicionalmente, se agregó lecitina de soya como emulsificante en una dosis de 1.4% dentro del volumen total de 100 mL. Se mezcló en vasos de precipitación las cantidades establecidas garantizando una mezcla homogénea.

Elaboración de esferas de alginato. Para la elaboración de las partículas de alginato, se homogenizó constantemente el tratamiento listo para encapsular durante 20 minutos. En un vaso de precipitación de 80 mL con 60 mL de CaCl₂ a 0.2%, se goteó a una velocidad de 12 a 18 gotas por minuto con una jeringa de 10 mL y una aguja de 0.33 mm de diámetro y 12 mm de largo la solución homogenizada. Mediante el método de gelificación externa, se inyectó la muestra homogenizada a una velocidad constante de agitación. En la figura 1 se presenta el flujo de proceso de la elaboración de las cápsulas.

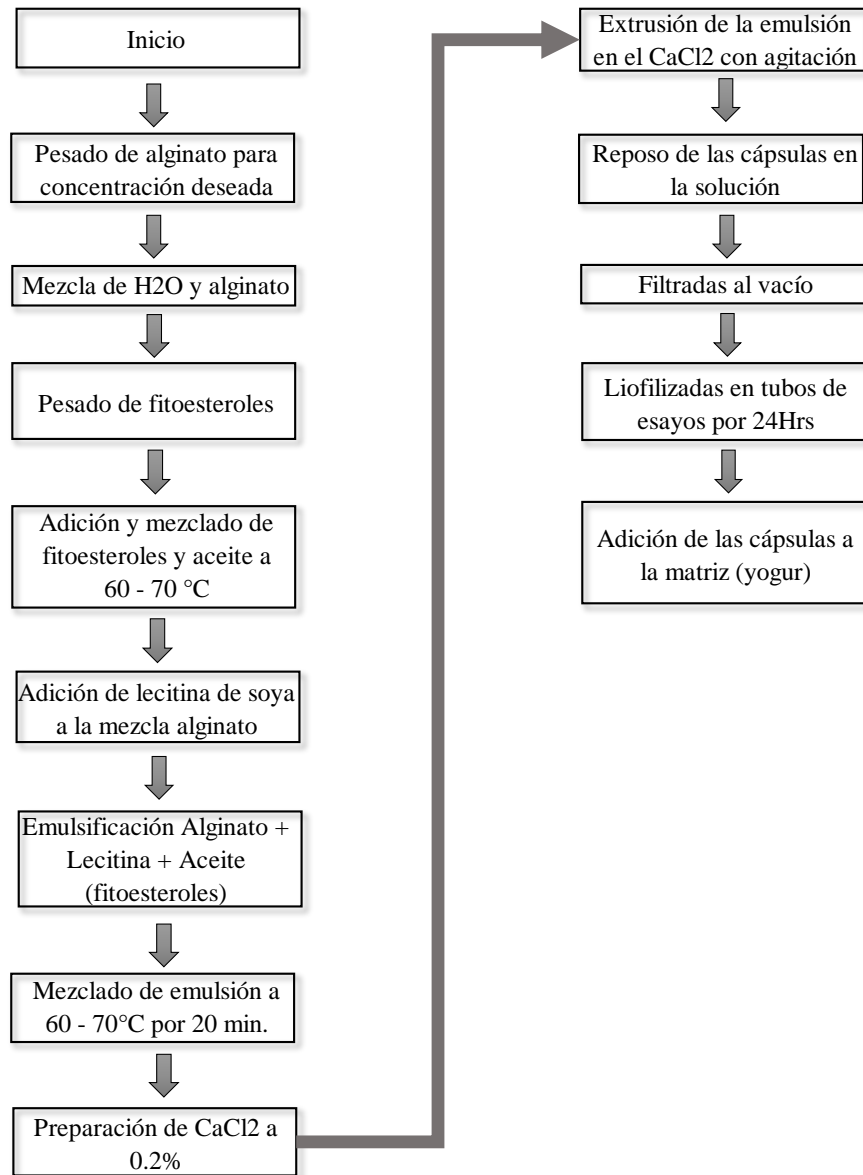


Figura 1. Flujo de proceso de elaboración y adición de cápsulas.

Eficiencia de encapsulación. El análisis de eficiencia del encapsulado se midió a partir de una relación entre la cantidad de fitoesteroles iniciales (peso) añadidos en el aceite preparado, y la cantidad de fitoesteroles resultantes que fueron encapsulados (cuantificación), multiplicados por cien. Este diferencial se determinó por análisis de cromatografía de gases del material encapsulado para cuantificar la cantidad de fitoesteroles recuperados de las partículas elaboradas.

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulado} = (FF/IF) * 100 \quad [1]$$

Donde:

FF = Cantidad final de fitoesteroles

IF = Cantidad inicial de fitoesteroles

Capacidad de carga. La capacidad de carga del encapsulado fue determinada por la cantidad de fitoesteroles recuperados por cromatografía de gases calculada para 1 g. Se multiplicó la cantidad de fitoesteroles obtenidos por 1 g, y se dividió para la cantidad de muestra preparada para cromatografía de gases que fueron 0.5 g.

$$\text{Capacidad de carga} = (\text{FR} * 1\text{gr}) / (\text{CMC}) \quad [2]$$

Donde:

FR = Fitoesteroles recuperados por cromatografía de gases.

CMC = Cantidad de muestra utilizada para cromatografía de gases.

Tamaño de partícula y morfología. El tamaño de partícula fue medido por un valor promedio de 10 partículas por tratamiento para identificar el tamaño de cada uno de ellos. Se utilizó un microscopio invertido de marca Mshot MI11, con un aumento de 400x, al cual se le ubicó una cámara Dino-Eye AM-423X para poder observar las imágenes a la pantalla. Estas imágenes se pudieron observar y medir mediante el programa de Dino Capture 2.0 versión 2.0, a una escala de micrómetros para determinar el tamaño de las partículas y la morfología. Se obtuvieron imágenes de su agrupación mediante el uso de microscopio estereoscopio “Vision Scope” T-2200 de Ken-A-Vision.

Perfil de fitoesteroles. Para medir el perfil de fitoesteroles del material encapsulado, se realizó un análisis de Cromatografía de Gases (CG) mediante el método AOCS Ce 12-16. Se realizó una hidrólisis de las cápsulas para poder derivatizarlas y cuantificar los fitoesteroles recuperados. Se preparó la solución de estándar interno utilizando Epicoprostanol, 5 β colestano-3 α -ol en tolueno como solvente. Seguidamente, para la preparación de cada muestra se pesó 1 g de las cápsulas en un matraz de 50 mL. Posteriormente se adicionó 5 mL del estándar interno y 5 mL de NaOH/MeOH 2.3 N en un nuevo matraz, para someterlo a baño maría a 100 °C por 45 minutos. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, se adicionó 7 mL de HCl a 3 N y 40 mL más de NaCl saturada. Se esperó a la separación de fases e inmediatamente se preparó el vial para el análisis de cromatografía. Se preparó el vial con 0.15 g de sulfato de sodio, 0.3 mL de muestra, 0.5 mL de piridina, 1 mL de BSTFA (N, O-Bis(trifluoroacetamida) y agitación para la mezcla del extracto.

Los tratamientos realizados fueron sometidos a este método para determinar la eficiencia de encapsulado y la capacidad de carga que tenía las diferentes concentraciones. Una vez determinada la mejor combinación por metodología estadística de Superficie de Respuesta, se procedió a realizar los diferentes análisis físicoquímicos al encapsulado final dentro de la matriz alimenticia.

Fase 2

Se midió el impacto que ocasiona la adición de las partículas en la matriz de yogur natural en su estado original. El yogur natural utilizado fue producto Zamorano, en el cual, se adicionó el 1% de cápsulas del volumen total planteado en el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.54:10 (RTCA, 2011), como límite de aditivo de alginato. Se analizaron tres muestras, definidas como el tratamiento control, tratamiento óptimo y tratamiento punto central. Se realizaron los análisis al día 0 y día 15.

%ATECAL. Se midió la acidez titulable expresado como ácido láctico de los tratamientos y el control para determinar el cambio de acidez en la variación de tiempo. Se tomaron 9 g de yogur y se le agregaron tres gotas de Fenolftaleína. Seguidamente, se tituló con NaOH 1 N hasta obtener un color rosado claro en la muestra.

Viscosidad. La viscosidad del yogur con las cápsulas se midió mediante un análisis físico, utilizando el Reómetro de Brookfield LVDV-III Ultra. En este análisis, se midió diferencias entre el yogur en estado original y el yogur con cápsulas para determinar si la viscosidad tuvo algún cambio y en qué cantidades. Se aplicaron velocidades de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 rpm, utilizando un spindle LV6.

Diseño experimental y análisis estadístico. Para la encapsulación liofilizada se utilizó un experimento factorial completo 2^k estadísticamente delineado con la metodología de Superficie de Respuesta, un Diseño de Composición Central Rotacional de segundo orden (DCCR) y una probabilidad de significancia del 5%. Se evaluó el efecto combinado de porcentaje de alginato y proporción de solvente (fase acuosa/aceite). Para generar un entorno experimental más acotado, se delinearon las variables axiales $-\alpha$ y $+\alpha$, este valor depende del número factorial ($F = 2^k$), donde k es el número de variables independientes ($k=2$), los valores son definidos por la ecuación 3.

$$\pm\alpha = (F)^{1/4} = (2^k)^{1/4} = 1.414 \quad [3]$$

El número de unidades experimentales (UE) para esta metodología fue un diseño factorial completo definido por la ecuación 4.

$$n = 2^k + 2k + m \quad [4]$$

Dónde:

2^k = número de puntos factoriales

$2k$ = número de puntos axiales

m = número de réplicas del punto central

En el cuadro 1 se muestran las codificaciones de las concentraciones de alginato y la relación de solventes, incluyendo los puntos axiales calculados para una mayor cobertura del experimento.

Cuadro 1. Niveles codificados de las variables independientes.

Variables independientes	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
% Alginato, X_1	00.36	00.40	00.50	00.60	00.64
Relaciones solventes (Fase Acuosa), X_2	65.86	70.00	80.00	90.00	94.14

X_1 : Variable de estudio dependiente 1.

X_2 : Variable de estudio dependiente 2.

α : Valores axiales de la investigación (1.414).

En el cuadro 2 se detallan los tratamientos definidos para la elaboración de las cápsulas según las codificaciones establecidas.

Cuadro 2. Tratamientos establecidos por superficie de respuesta con niveles codificados y variables reales.

Tratamientos	Niveles Codificados		Niveles reales de variables	
	% Alginato	Relación solventes	% Alginato	Relación solventes
1	-1	-1	0.40	70.00
2	1	-1	0.60	70.00
3	-1	1	0.40	90.00
4	1	1	0.60	90.00
5	-1.414	0	0.36	80.00
6	1.414	0	0.64	80.00
7	0	- 1.414	0.50	65.86
8	0	1.414	0.50	94.14
9 ©	0	0	0.50	80.00
10 ©	0	0	0.50	80.00
11 ©	0	0	0.50	80.00
12 ©	0	0	0.50	80.00
13 ©	0	0	0.50	80.00
14 ©	0	0	0.50	80.00

©: Punto central del experimento.

% Alginato: Concentración de alginato utilizada.

Relación Solventes: Relación de cantidades de agua y aceite.

Se utilizó el programa STATISTICA 7, para el análisis estadístico de la Superficie de Respuesta. Además, se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS, Versión 9.4), en el cuál, se planteó un Análisis de Varianza y una prueba Duncan para determinar la categorización con diferencia significativa de los tamaños de partícula. De igual manera, se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo para determinar la interacción entre tratamientos en el tiempo de la viscosidad y %ATECAL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de las concentraciones cercanas y óptimas para poder obtener el encapsulado esperado, se midió con experimentación a diferentes concentraciones y proporciones en repeticiones. Las primeras pruebas fueron realizadas a concentraciones de alginato de 0.5, 1.0 y 1.5%, con una solución de CaCl_2 al 2% (p/v). Las proporciones de las dos fases también se establecieron como 90:10, 70:30, y 50:50. Las cápsulas obtenidas con la menor concentración eran irregulares, agrupadas y de un tamaño moderado. En la concentración intermedia y alta de alginato, eran bastante uniformes pero el inconveniente radicaba en el tamaño de las partículas de entre los 1.5 mm a 2 mm, y su consistencia era dura al momento de deshacerlas. La extrusión se realizó a una velocidad de 12 a 18 gotas por segundo.

Seguidamente, se reestructuraron las concentraciones y se utilizaron tratamientos de alginato a 0.4, 0.5 y 0.6% (p/v) con las cuales se obtuvieron partículas más pequeñas. Se modificó la concentración de CaCl_2 por la dureza que les otorgaba a las mismas. La concentración de cloruro de calcio final utilizado fue de 0.2% (p/v), y las proporciones fase acuosa y aceite con fitoesteres, se establecieron a 90:10, 80:20 y 70:30 (w/o), para evitar la pérdida de material encapsulado.

Encapsulado de las soluciones. Se encapsularon los tratamientos definidos según los preliminares realizados, manteniendo seis repeticiones en el punto central. Se pudo observar con los datos obtenidos anteriormente, que las concentraciones de material encapsulante debieron ser modificadas debido a su tamaño presentado. En la figura 2 y 3, se muestra la mezcla final del tratamiento y la extrusión que se aplicó a cada uno de ellos, hacia la solución de CaCl_2 para la encapsulación



Figura 2. Extrusión de tratamientos hacia la solución de endurecimiento.



Figura 3. Tratamiento homogenizado para encapsular.

Tamaño de partículas. En el cuadro 3, se muestran los tamaños obtenidos de los tratamientos aplicados. Los resultados indican que el tamaño de partícula dependía directamente de la concentración de alginato en el tratamiento. El mismo incrementaba a medida aumentaba la concentración de alginato, lo cual, se le atribuye a la viscosidad que se obtiene en la preparación del gel (Loftipour *et al.* 2012). De igual manera, el diámetro y la distancia de la aguja hacia la solución de endurecimiento, la velocidad de agitación en el CaCl_2 y el secado, fueron factores determinantes para el tamaño de las partículas (Srnidel *et al.* 2008). Sin embargo, se controlaron estos factores manteniendo la distancia de extrusión de 3 a 6 cm de distancia, el diámetro de aguja de 0.33 mm y la velocidad de agitación no más de 500 rpm para evitar elongación de las partículas.

Cuadro 3. Tamaños promedios de las partículas en los diferentes tratamientos.

Tratamientos		
% Alginato	Proporción de tratamientos	Promedio Tamaños (μm)
0.40 ALG	70.00 : 30.00	612.93 \pm 117.55
0.60 ALG	70.00 : 30.00	755.58 \pm 131.00
0.40 ALG	90.00 : 10.00	552.59 \pm 108.59
0.60 ALG	90.00 : 10.00	769.86 \pm 113.76
0.36 ALG	80.00 : 20.00	452.54 \pm 150.38
0.64 ALG	80.00 : 20.00	814.67 \pm 169.91
0.50 ALG	94.14 : 05.86	611.71 \pm 117.98
0.50 ALG	65.86 : 34.14	586.61 \pm 105.27
0.50 ALG	80.00 : 20.00	562.49 \pm 112.64
0.50 ALG	80.00 : 20.00	544.77 \pm 118.12
0.50 ALG	80.00 : 20.00	498.17 \pm 135.58
0.50 ALG	80.00 : 20.00	574.69 \pm 170.06
0.50 ALG	80.00 : 20.00	603.48 \pm 136.39
0.50 ALG	80.00 : 20.00	582.38 \pm 113.45
\bar{X}		608.75 \pm 103.16
CV		21.31

ALG: Alginato en solución.

\bar{X} : Promedio del tamaño de los tratamientos.

CV: Coeficiente de variación.

Se realizó una separación de medias para determinar las diferencias significativas de los tratamientos. En el cuadro 4, se representan las separaciones de medias Duncan, donde las diferencias de los tratamientos fueron definidas por las variables independientes obteniendo tres clasificaciones. Se puede evidenciar que los tratamientos de 0.36, 0.4 y 0.5% de alginato, no son significativamente diferentes entre sí, sin embargo, son los tratamientos donde la concentración de alginato fue menor. Los tratamientos de 0.6% de alginato, presentaron una clasificación diferente debido a su tamaño. Además, se puede observar que las desviaciones estándares son altas debido a la baja concentración de alginato en los tratamientos. Según Fujiwara (2012), las concentraciones de alginato mayores a 2% (p/v) presentan mayor homogeneidad en las microcápsulas debido a la viscosidad generada que mantiene la estructura más rígida. Mientras que las concentraciones bajas presentan mayor susceptibilidad al ser extruidas.

Cuadro 4. Clasificación Duncan de los tamaños promedio de las partículas de los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Tamaños (μm) + DE	Grupo Duncan	
0.64% Alg. / 70:30 R. solv.	814.67 \pm 169.91	A	
0.60% Alg. / 90:10 R. solv.	769.86 \pm 113.76	A	
0.60% Alg. / 70:30 R. solv.	755.58 \pm 131.00	A	
0.40% Alg. / 70:30 R. solv.	612.93 \pm 117.55	B	
0.50% Alg. / 65.84:24.14 R. solv.	611.71 \pm 117.98	B	
0.50% Alg. / 94.14: 5.86 R. solv.	586.61 \pm 105.27	B	
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	561.00 \pm 131.18	B	C
0.40% Alg. / 90:10 R. solv.	552.59 \pm 108.59	B	C
0.36% Alg. / 80:20 R. solv.	452.54 \pm 150.38	C	
CV (%)		21.31	
R²		0.37	

CV: Coeficiente de variación.

R²: Cuadrado medio del error.

%Alg.: Porcentaje de alginato.

R. solv.: Relación de solventes (agua/aceite).

Los tamaños obtenidos no fueron regulares en las diferentes concentraciones entre 300 y 1200 μm . Los tamaños obtenidos se vieron bastante reducidos por las concentraciones de alginato utilizadas. Estas partículas muestran un menor tamaño en comparación a lo presentado por Défaz y Moreira (2017) de un tamaño de partícula con un promedio de 2.19 μm de diámetro a una concentración del 2% de alginato (p/v). En el cuadro 5 se presenta una separación de medias Duncan para los tratamientos donde la concentración de alginato era de 0.5% (p/v). Las medidas fueron estadísticamente iguales para todos los tratamientos, con lo que, se puede concluir que las partículas mantienen su tamaño en la misma concentración de alginato.

Cuadro 5. Separación Duncan de las cápsulas con concentración de 0.5% de alginato.

Tratamientos	Grupo Duncan
0.50% Alg. / 65.84:24.14 R. solv.	A
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	A
0.50% Alg. 94.14:5.86 R. solv.	A
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	A
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	A
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	A
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	A
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	A
CV (%)	22.38

CV: Coeficiente de variación.

Diámetro de partícula y morfología. Los tamaños de las partículas fueron medidos en una escala de 100 μm . Se logró enfocar las partículas utilizando un lente de 400x en el microscopio invertido, capturando la imagen con el tamaño correspondiente. Como se puede observar en las figuras 4, 5 y 6, las formas de las partículas son irregulares entre redondas y ovaladas, mostrando un color en su interior diferente definido como la solución encapsulada de aceite. Según Rodríguez y colaboradores (2003), el tamaño de las partículas puede ser modificado por la concentración de alginato de sodio y CaCl_2 , brindando mejor estructura y mayor disponibilidad de calcio para compactar la partícula. Sin embargo, difiere a este estudio ya que el tamaño obtenido fue de micrómetros y la interacción del CaCl_2 se veía reflejada en la dureza de la partícula. En la figura 7, se puede evidenciar la agrupación de las partículas en forma de una matriz conjunta, esto debido al proceso de secado donde se aglomeran unas con otras.

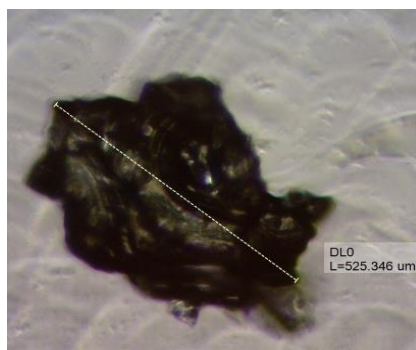


Figura 4. Captura del tamaño de partícula de tratamiento 0.4% alginato.



Figura 5. Captura del tamaño de partícula de tratamiento 0.5% alginato.



Figura 6. Captura del tamaño de partícula de tratamiento 0.6% alginato



Figura 7. Agrupación de partículas del tratamiento 0.5% alginato.

Cuantificación de fitoesteroles: Los tratamientos específicos fueron sometidos al análisis de fitoesteroles AOCS Ce 12-16 de cromatografía de gases. En el cuadro 6 se observan las cantidades encontradas en los diferentes tratamientos una vez analizadas. Según Fujiwara (2012), la cuantificación de fitoesteroles por gramo de óleo fue de 9.97mg/g, en una concentración de 1% de fitoesteroles en el óleo. En el presente estudio, las concentraciones obtenidas fueron entre los 8 y 10.5 mg/g, presentando una similitud entre ellas. Sin embargo, los tratamientos 2, 6, 8, 9 y 11 que mostraron mayor cantidad de fitoesteroles recuperados, tenían mayor concentración de alginato. Se puede corroborar con estudios anteriores, donde la capacidad de carga aumenta proporcionalmente con la concentración de alginato (Mandal *et al.* 2010). Cabe recalcar, que las concentraciones de fitoesteroles en el aceite variaban según la concentración de alginato presentado en la matriz, siendo constante el 40% de la cantidad de material encapsulante.

Cuadro 6. Capacidad de carga final de fitoesteroles recuperados de la cromatografía de gases.

TRT	Fitoesteroles (mg)	Alginato (mg)	Fit. Rec. (mg/500mg)	CCF (mg/g-algin)
1	110.40	276.00	4.53	09.06
2	165.60	414.00	5.15	10.30
3	141.92	354.80	3.57	07.14
4	212.88	532.20	4.99	09.98
5	99.36	248.40	3.73	07.46
6	176.64	441.60	5.42	10.84
7	185.60	464.00	4.05	08.10
8	129.80	324.50	5.17	10.34
9	157.80	394.50	5.07	10.14
10	157.80	394.50	4.90	09.80
11	157.80	394.50	5.12	10.24
12	157.80	394.50	4.79	09.58
13	157.80	394.50	4.96	09.92
14	157.80	394.50	4.93	09.86
\bar{X}				09.48
C.V.(%)				11.92

Fit. Rec.: Fitoesteroles recuperados por cromatografía.

CCF: Capacidad de carga final de fitoesteroles por gramo de alginato.

Optimización por superficie de respuesta. Los resultados de la Superficie de Respuesta para la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulado mostraron niveles diferentes. Como se muestra en la figura 8, la capacidad de carga de la cápsula en relación a contenido de fitoesteroles se ve en aumento cuando la concentración de alginato se acerca a 0.7% (p/v) y la relación de solventes a 95% (fase acuosa/ aceite). Por otro lado, en la figura 9 se muestra el comportamiento de la eficiencia de encapsulado representada en porcentaje, mostrando un incremento cuando la concentración de alginato se acerca a 0.3% (p/v), y la relación de solventes es de 60% (fase acuosa / aceite). Según Gupta y Ghosh (2015), la eficiencia de encapsulación es atribuida al material encapsulante, determinado por las características de flexibilidad, impermeabilidad, no reactividad y fuerza. Por tal motivo, para mejorar la eficiencia de encapsulado es necesario la aplicación de una segunda capa de recubrimiento, especialmente en las concentraciones bajas de alginato, y así, garantizar la protección del material encapsulado (Laurenti y García 2013). Se puede atribuir el valor óptimo determinado por la capacidad de carga, debido a la relación de adición de fitoesteroles en el aceite (p/v) a la que se definieron los tratamientos.

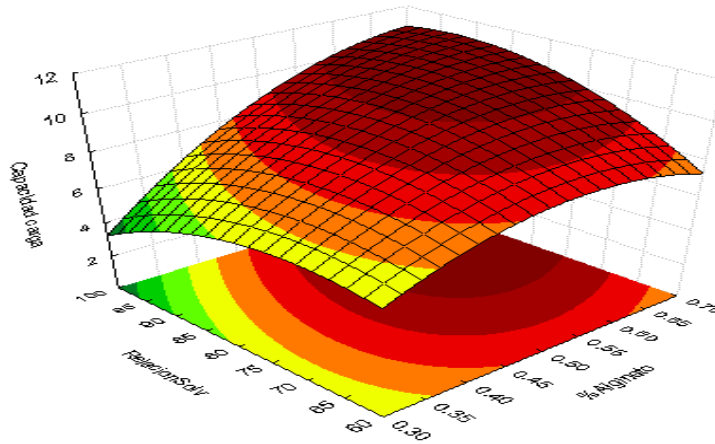


Figura 8. Efecto del porcentaje de alginato y la relación de solventes sobre la capacidad de carga de la partícula.

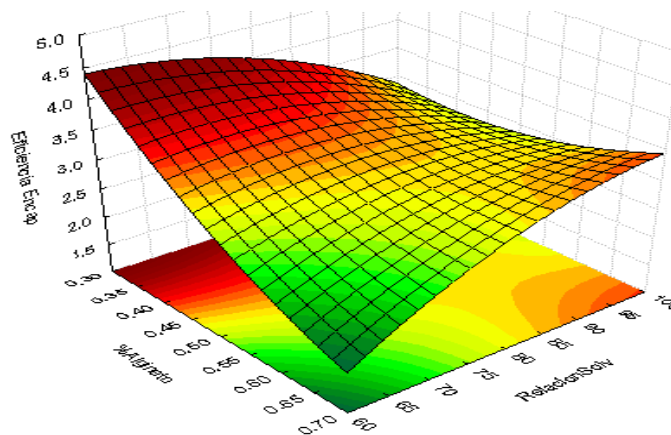


Figura 9. Efecto del porcentaje de alginato y la relación de solventes sobre la eficiencia de encapsulado de la partícula.

De igual manera, en los cuadros 7 y 8 se muestran los coeficientes de regresión del estudio en cuanto a la eficiencia de encapsulado y la capacidad de carga de las partículas. Para considerar que variable dependiente determina el valor óptimo buscado, se toma en cuenta el cuadrado medio del error mayor a 0.7. Como se puede observar, el cuadrado medio del error más alto del modelo pertenece a la capacidad de carga. Debido a la permeabilidad de la partícula presentada en el secado, la fluctuación de material encapsulado hacia el exterior puede presentar cambios específicos en el contenido interno de la misma (Srnđel *et al.* 2008). Según Martins y colaboradores (2017), las partículas gelificadas con concentraciones <45g/L de CaCl₂ (4.5% p/w), muestran membranas externas delgadas y frágiles presentes en la etapa de crecimiento, lo que representa pérdidas en el momento del secado. Sin embargo, en nanopartículas es viable usar concentraciones mayores a las utilizadas debido al tamaño reducido en diámetro que proporciona viabilidad en la industria

de alimentos para no ser percibidas por el consumidor. Por consiguiente, para la adición de compuestos bioactivos encapsulados en alimentos, es imprescindible agregar partículas coloidales de 100-1000 nm de diámetro consideradas nanopartículas (Jitendra, *et al* 2011).

Cuadro 7. Coeficientes de regresión y la probabilidad del modelo de regresión lineal de la capacidad de carga de las partículas.

Variables	Coeficientes de regresión	Probabilidad
Intercepto	-14.167	0.558
X ₁	19.374	0.629
X ₂	-40.299	0.161
X ₂ ²	00.400	0.403
X ₂ X ₂ ²	-00.004	0.196
R ²		0.759

X₁: Concentración de alginato (%m/v)

X₂: Relación de solventes (fase acuosa/aceite)

Cuadro 8. Coeficientes de regresión y la probabilidad del modelo de regresión lineal de la eficiencia de encapsulado de las partículas.

Variables	Coeficientes de regresión	Probabilidad
Intercepto	08.775	0.680
X ₁	-26.735	0.456
X ₁ ²	07.629	0.749
X ₂	00.041	0.922
X ₂ ²	-00.001	0.712
X ₂ X ₂ ²	00.205	0.530
R ²		0.213

X₁: Concentración de alginato (%m/v)

X₂: Relación de solventes (fase acuosa/aceite)

Función de utilidad. Para la determinación de la deseabilidad del experimento mostrado en la figura 10, se maximizó la capacidad de carga de las partículas, y se consideró la concentración del material encapsulante para mantener los diámetros y características. Se buscó reducir los daños mecánicos posibles manejando los niveles de inyección homogéneamente para determinar las diferencias de las cápsulas del tratamiento óptimo y el tratamiento central al ser adicionados a la matriz final. La deseabilidad se centra en el tratamiento central de 0.5% de alginato y una relación de solventes del 80%, lo que nos demuestra que los valores óptimos establecidos experimentalmente fueron acordes con el experimento. De esta manera, la Superficie de Respuesta determinó que el tratamiento óptimo para la elaboración fue de 0.69% (p/v) de material encapsulante y 92:8 (agua : aceite) de relación de solventes basados como punto crítico. Esta deseabilidad nos representa los valores de optimización del estudio donde se maximiza la encapsulación de

fitoesteroles. Sin embargo, se pudo observar anteriormente que el aumento de la concentración de alginato aumenta el tamaño de partícula, por ende, puede ser percibido por el consumidor.

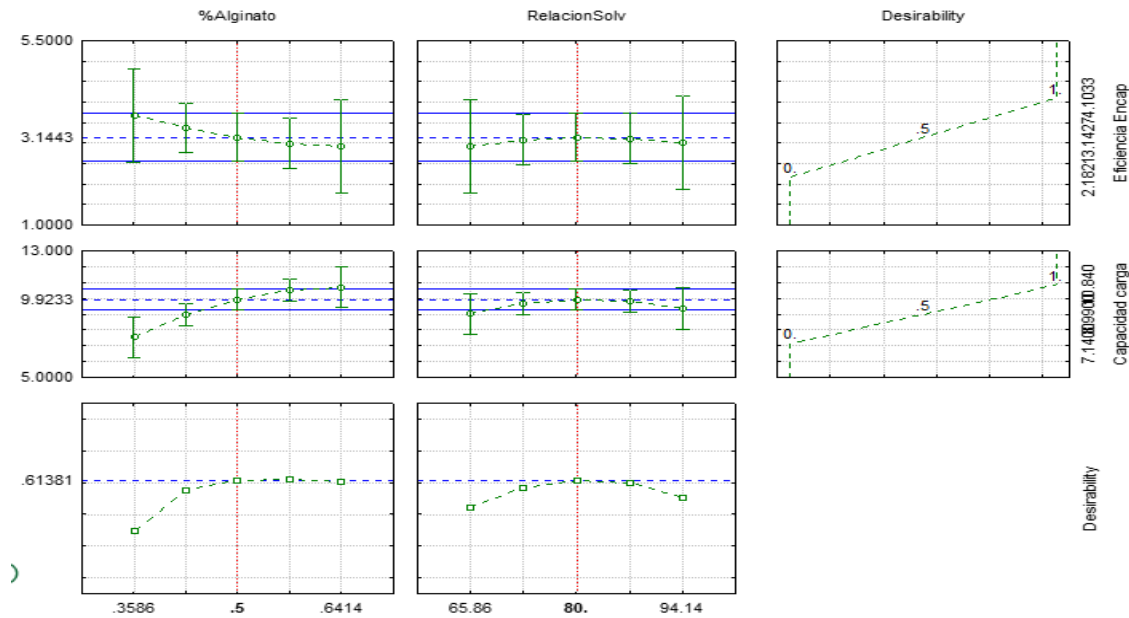


Figura 10. Efecto del porcentaje de alginato y retención de solventes sobre la deseabilidad del modelo basado en la capacidad de carga y eficiencia de encapsulado.

Viscosidad del yogur. El yogur es un tipo de fluido no newtoniano que tiene características inversas entre la relación de la velocidad de corte y el esfuerzo cortante (Oxford, 2014). Por tal motivo, el comportamiento reológico del yogur es determinante para definir su comportamiento a través del tiempo, y como se ve afectado en la adición de compuestos bioactivos. Se adicionó 1.5 g de cápsulas de alginato de sodio en un total de 150 g de yogur, basados en el RTCA 67.04.54:10 (RTCA 2011). Según Liu y colaboradores (2014), la viscosidad de los productos fermentados de la leche depende directamente del pH y el cuajo utilizados para su elaboración. En las figuras 11, 12 y 13 se refleja el comportamiento de los tratamientos control, óptimo y central en el día 15, después de haber sido adicionado las partículas.

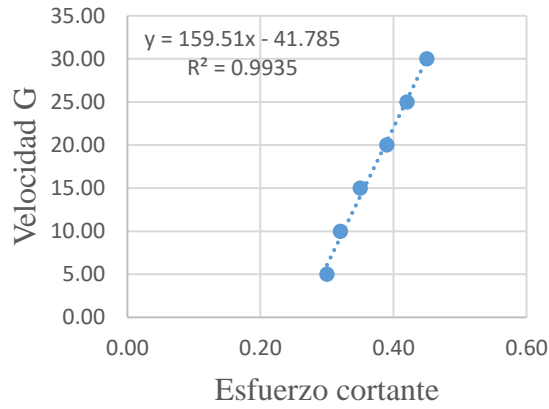


Figura 11. Comportamiento reológico del tratamiento óptimo a los 15 días.

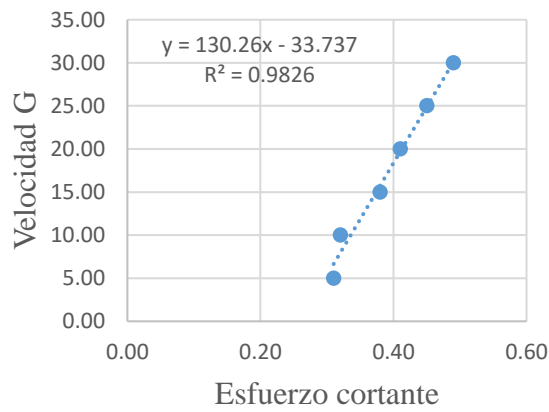


Figura 12. Comportamiento reológico del tratamiento control a los 15 días.

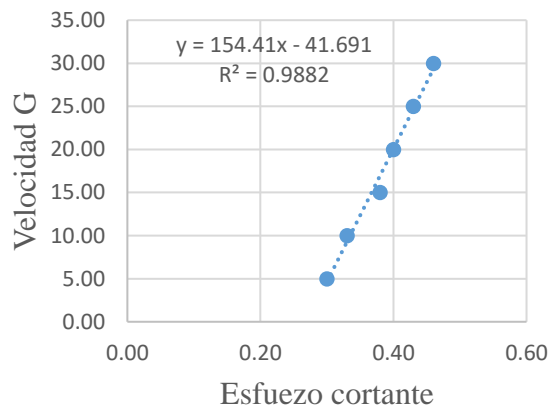


Figura 13. Comportamiento reológico del tratamiento central a los 15 días.

El yogur por ser una leche fermentada concentrada tiene un incremento de proteína a un mínimo de 5.6% la cual forma una matriz que se presenta de manera espesa (Codex, 2003). En el cuadro 9 se puede evidenciar una diferencia mínima de la viscosidad al día 0, viéndose disminuida en las muestras con la adición de cápsulas de tratamiento central y óptimo. Esta diferencia reflejada en el coeficiente de variación se debe a la ruptura de la matriz proteica por el mezclado para la obtención de una distribución homogénea de las partículas. Por el contrario, se ve una reducción en la viscosidad del tratamiento control al día 15, reflejada por una mezcla previa al análisis, para homogenizar la muestra que se encontró en reposo durante los 15 días. Según Reyes y colaboradores (2014), los tratamientos de yogur aumentan con la presencia de microcápsulas de aceite. Este cambio se atribuyó a la fricción que generan las microcápsulas en el esfuerzo cortante. Sin embargo, los tratamientos del presente estudio no presentaron diferencia significativa entre ellos, pero si se observaron diferencias significativas entre los días 0 y 15.

Cuadro 9. Análisis de viscosidad en el yogur sin sabor con los diferentes tratamientos (mpa.s).

Tratamientos	Día 0	Día 15
Control	80.0 ± 10.50 ^{X a}	130.3 ± 10.50 ^{X b}
0.50% Alg. / 80:20 R. solv.	133.1 ± 10.50 ^{X a}	154.4 ± 10.50 ^{X b}
0.70% Alg. / 92:08 R. solv.	118.1 ± 10.50 ^{X a}	159.5 ± 10.50 ^{X b}
C.V (%)		8.20
R²		0.673

C.V(%): Coeficiente de variación.

^{X-Y} Medias en la misma columna con diferente letra representa diferencias significativas entre los tratamientos (P < 0.05).

^{a-b} Medias en la misma fila con diferente letra representa diferencias significativas entre tiempos (P < 0.05).

% Alg.: Porcentaje de alginato

R. solv.: Relación de solventes (fase acuosa: fase hidrofóbica)

Control: Yogur sin partículas adicionadas.

%ATECAL. La acidez titulable de los tratamientos tuvo un aumento en relación al tiempo almacenado, pero no hubo diferencia entre los diferentes tratamientos. El aumento de la acidez a través de los días se debe directamente a la presencia de las bacterias ácido lácticas presentes en el yogur. Estas bacterias forman ácido láctico, el mismo que genera una disminución del pH tanto en el periodo de incubación, como en el de almacenamiento (Rojas *et al.* 2007). En el cuadro 10 se puede observar que la diferencia de la acidez titulable entre los tratamientos de los días 0 y 15 no muestra diferencia alguna. Défaz y Moreira (2017) reportaron que entre los primeros 15 días, no existen diferencias significativas en el cambio de acidez, la misma que aumentaba en los 30 días de almacenamiento. Se puede determinar que la presencia de las cápsulas no afecta en la acidez del yogur, por lo que pueden ser añadidas sin alterar la composición química en cuanto a su acidez.

Cuadro 10. Análisis de % ATECAL en el yogur sin sabor con los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Día 0	Día 15
	Media \pm DE	Media \pm DE
Control	0.787 \pm 0.01 ^{X a}	0.932 \pm 0.01 ^{X b}
0.50 % Alg. / 80:20 R. solv.	0.787 \pm 0.01 ^{X a}	0.937 \pm 0.01 ^{X b}
0.70 % Alg. / 92:08 R. solv.	0.785 \pm 0.01 ^{X a}	0.933 \pm 0.01 ^{X b}
C.V. (%)		25.99
R²		0.999

C.V(%): Coeficiente de variación.

R²: Ajuste lineal del modelo (R cuadrado).

^{X-Y} Medias en la misma columna con diferente letra representa diferencias significativas entre los tratamientos (P < 0.05).

^{a-b} Medias en la misma fila con diferente letra representa diferencias significativas entre tiempos (P < 0.05).

% Alg.: Porcentaje de alginato

R. solv.: Relación de solventes (fase acuosa: fase hidrofóbica)

Control: Yogur sin partículas adicionadas.

4. CONCLUSIONES

- Se encontró el tratamiento óptimo el cual consistió de 0.7% alginato (p/v) y 92:8 (fase acuosa / aceite) relación solvente, que obtuvo la capacidad de carga más alta (11.10 mg/g-alginato).
- Se pudieron obtener las partículas con tamaños menores a 1 mm, lo que resulta bastante viable para la adición a una matriz alimenticia.
- La adición de las partículas al yogur no modificó los aspectos fisicoquímicos mayormente percibidos por el consumidor.

5. RECOMENDACIONES

- La utilización de un compuesto complementario de recubrimiento en la elaboración de las cápsulas para brindar mayor protección externa.
- Realizar un análisis sensorial de aceptación para determinar si el consumidor puede identificar o no la presencia de las partículas.
- Analizar las diferencias de viscosidad y acidez titulable en 30 días, para determinar si la presencia de alginato en forma de cápsulas no muestra alteración alguna en la composición original del yogur.
- Realizar un análisis de cromatografía de gases para determinar la cantidad recuperada real de fitoesteroles en el yogur con las cápsulas.

6. LITERATURA CITADA

- CODEX ALIMENTARIUS. 2011. Norma del Codex para leches fermentadas. Organización Mundial de la Salud. CODEX STAN 243-2003. ISBN: 978-92-5-305837-2
- Defaz A, Moreira J. 2017. Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor. [Tesis] Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 29p.
- Desai G, Park H. 2005. Encapsulation of vitamin C in tripoluphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*. 22 (2): 179-192. doi: 10.1080/02652040400026533.
- Fujiwara, G. 2012. Microencapsulacao de estigmasterol utilizando alginato de sodio, quitosana e amido. [Tesis] Universidade Federal do Paraná. Paraná. 120p.
- Gupta S, Ghosh M. 2015. Synthesis, characterization, stability evaluation and release kinetics of fiber-encapsulated carotene nano-capsules. *International Journal of Fats and Oils*. 66 (4): 1-11. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0226151>.
- Hernández P. 2011. Encapsulación de aceite esencial de clavo para su aplicación en la industria alimentaria. [Tesis]. Facultad de ciencias de la salud de la actividad física y del deporte. Departamento de tecnología de la alimentación y nutrición. Murcia. 276p.
- Herrera A, Soto J, Tamargo T, Bermúdez L. 2016. Caracterización clínica de pacientes con hipercolesterolemia familiar. *Hospital Clinicoquirúrgico. Revista Cubana de Medicina*. 55 (2): 130-140.
- Jacoby E y Keller I. 2006. La promoción del consumo de frutas y verduras en América Latina: buena oportunidad de acción intersectorial por una alimentación saludable. *Revista chilena de nutrición*. 33: 226-231.
- Jitendra G, Prabakaran L, Reena G, Mohan G. 2011. Nanoparticles formulation using counter-ion induced gelification technique: in-vitro chloramphenicol release. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3 (3): 66-70. ISSN 0975-14
- Laurenti E, García S. 2013. Eficiencia de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberacao controlada de probiótico encapsulado. *Brazilian Journal of Food Technology*. 16 (2): 107-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000019>.

- Liu X, Zhang H, Wang F, Luo J, Guo H, Ren F. 2014. Rheological and structural properties of differently acidified and renneted milk gels. American Dairy Science Association. Journal Dairy Science. 97 (6): 3292-3299. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7568>.
- López P, Otero J, Camacho P, Baldeón M, Fornasini M. 2018. Reevaluating nutrition as a risk factor for cardio-metabolic diseases. Revista Colombia médica. 49 (2): 175-181. doi: <http://dx.doi.org/10.25100/cm.v49i2.3840>.
- Lotfipour F, Mirzaeei S, Maryam M. 2012. Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. Revista Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2 (1): 71-78. doi: 10.5681/apb.2012.010.
- Mandal S, Kumar S, Krishnamoorthy B, Kumar S. 2010. Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 46 (4): 785-793.
- Martins E, Renard D, Adiwijaya Z, Emre K, Poncelet D. 2017. Oil encapsulation in core-shell alginate capsules by inverse gelation. I: dripping methodology. Journal of Microencapsulation, Micro and Nano carriers. 34 (1): 89-90. doi: 10.1080/02652048.2017.1284278.
- Medina H, Ledo R. 2010. Alginatos. Propiedades y Uso en la Reducción de Reflujo Gastroesofágico. Revista Informed. Informe médico. 12 (10): 519-523.
- Noormazlinah, Hachim N, Hamid A, Abdul M, Almajano M, Bahirah N. 2019. Extraction of phytosterol concentration in different legume pods by using microwave-assisted hydrodistillation. Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering. University of Malasya Pahang. 19 (3): 796-803. doi: 10.22146/ijc.40865.
- OMS. 2017. Enfermedades Cardiovasculares [internet]. [Consultado el 10 de septiembre de 2019]. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- Oxford. (2014). A dictionary of chemical engineering. Oxford University Press. doi: 10.1093/acref/9780199651450.001.0001.
- Palou A, Picó C, Bonet M, Oliver P, Serra F, Rodríguez A, Ribot J. 2005. El libro blanco de los esteroides vegetales. 2ª Edición. España. ISBN 84-609-5850-7.
- Parra R. 2010. Microencapsulación de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. 63 (2): 5669-5684.
- RTCA (Reglamento técnico centroamericano). 2011. Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. 67.04.50:08. Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano.
- Rodríguez A, Chiappetta D, Széliga M, Fernández A, Bregni C. 2003. Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. Universidad de Buenos Aires. Ars Pharmaceutica. 44 (4): 333-342.

- Reyes C, Vélez-Ruíz J. 2015. Propiedades fisicoquímicas y de flujo de un yogur asentado enriquecido con microcápsulas que contienen ácidos grasos omega 3. Universidad de las Américas Puebla. *Información Tecnológica*. 26 (5): 87-96.
- Rojas W, Villalobos A, Pineda M. (2007). Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabrea. Universidad de Costa Rica. *Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 18 (2): 221-237. ISSN: 10217444.
- San Mauro I, Collado L, Blumenfeld J, Cuadrado M, Calle M, Hernández M, Garicano E, Pérez E, Arce E, Ciudad M. 2016. Efecto de esteroides vegetales en la reducción del colesterol plasmático: ensayo clínico, controlado, aleatorizado, cruzado y doble ciego. *Revista Nutrición hospitalaria*. 33 (3): 685-691. ISSN 0212-1611. doi: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.279>.
- Smrdel P, Bogataj M, Mrhar A. 2008. The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Ionotropic Gelation. *Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft Vienna, Austria*. 76: 77-89. doi: 10.3797/scipharm.0611-07
- Vries J, Jansen A, Kromhout D, Van de Bovenkamp P, Van Staveren W, Mensink R, Katan M. 1997. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged men in seven countries. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10: 115-141.

7. ANEXOS

Anexo 1. Punto crítico de optimización de tratamiento y sus valores obtenidos.

Valores críticos; Variable: Capacidad carga			
Solución máxima			
Valor predicho por la solución: 11.09657			
Variables independientes	Niveles		
	Mínimos	Punto crítico	Máximo
% Alginato, X ₁	0.359	0.699	0.631
Relación solventes (Fase Acuosa), X ₂	65.86	92.39	94.14
Valor Predicho (mg/g)			11.09
Valor Obtenido (mg/g)			11.10

X₁: Variable de estudio dependiente 1

X₂: Variable de estudio dependiente 2

Anexo 2. Resultado de análisis de medidas repetidas en el tiempo de %ATECAL

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	0.10658750	0.03552917	7162.68	<.0001
Error	14	0.00006944	0.00000496		
Corrected Total	17	0.10665694			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ATECAL Mean
0.999349	0.259897	0.002227	0.856944

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	2	0.00001944	0.00000972	1.96	0.1776
Día	1	0.10656806	0.10656806	21484.1	<.0001

Anexo 3. Resultado de análisis de medidas repetidas en el tiempo de viscosidad.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	3	3892.690000	1297.563333	11.76	0.0794
Error	2	220.703333	110.351667		
Corrected Total	5	4113.393333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Viscosidad Mean
0.946345	8.128584	10.50484	129.2333

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRT	2	1764.523333	882.261667	8.00	0.1112
Dia	1	2128.166667	2128.166667	19.29	0.0481

Anexo 4. Cromatograma de referencia de fitoesteroles de palma africana.

