

**Evaluación de la encapsulación de
fitosteroles de palma africana (*Elaeis
guineensis*) utilizando diferentes
concentraciones de gelatina, maltodextrina y
relaciones de acetona: agua**

**Aryeri Stephanie Bardales Castellanos
Javier Alfredo Alemán Martínez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación de la encapsulación de fitoesteroles de palma africana (*Elaeis guineensis*) utilizando diferentes concentraciones de gelatina, maltodextrina y relaciones de acetona: agua

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

Presentado por

Aryeri Stephanie Bardales Castellanos
Javier Alfredo Alemán Martínez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

**Evaluación de la encapsulación de fitoesteroles de palma africana (*Elaeis guineensis*)
utilizando diferentes concentraciones de gelatina, maltodextrina y relaciones de acetona:
agua**

**Aryeri Stephanie Bardales Castellanos
Javier Alfredo Alemán Martínez**

Resumen. La encapsulación de compuestos bioactivos con baja solubilidad acuosa se encuentra en auge. En el caso de los fitoesteroles, se han realizado diversos esfuerzos para mejorar su solubilidad en agua y su bioaccesibilidad. Debido a esto, en el presente estudio se utilizó diferentes concentraciones de maltodextrina (5 y 10%), gelatina (30 y 40 mg/mL) y relaciones acetona: agua (1:1, 1.5:1, y 2:1) para la encapsulación de fitoesteroles. Para ello, se utilizó la técnica de nanoprecipitación o coacervación simple. Los parámetros evaluados fueron, actividad de agua (a_w), porcentaje de solubilidad en agua, eficiencia de encapsulación (E.E.), capacidad de carga (C.C.), tamaño y morfología de las partículas. Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para el análisis de las variables. Se obtuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) para las variables evaluadas, y se encontró que el porcentaje de maltodextrina tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la a_w , C.C. y porcentaje de solubilidad en agua de las microcápsulas. Por otro lado, la concentración de proteína tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre porcentaje de solubilidad y tamaño de partícula. Asimismo, la relación acetona: agua tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre las variables E.E. y tamaño de partícula. Se determinó la presencia de partículas amorfas multipared en el rango de 40-60 μm para todos los tratamientos. Se logró encapsular y mejorar la solubilidad en agua de los fitoesteroles utilizando biopolímeros de grado alimenticio como la gelatina y maltodextrina.

Palabras clave: Capacidad de carga, multipared, nanoprecipitación, solubilidad.

Abstract. The encapsulation of bioactive compounds with low aqueous solubility is in high demand. In the case of phytosterols, various efforts have been made to improve their solubility in water and their bioaccessibility. As a result, in the present study different concentrations of maltodextrin (5 and 10%), gelatin (30 and 40 mg/mL) and acetone: water ratios (1:1, 1.5:1 and 2:1) were used for the encapsulation of phytosterols. The technique of nanoprecipitation or simple coacervation was used. The parameters evaluated were, water activity (a_w), percentage of solubility in water, encapsulation efficiency (E.E.), loading capacity (L.C.), size and morphology of the particles. A Completely Randomized Design (DCA) was used for the analysis of the variables. Significant differences ($P < 0.05$) were found for the evaluated variables, and it was found that the percentage of maltodextrin had a significant effect ($P < 0.05$) on a_w , C.C. and percentage of solubility in water of the microcapsules. On the other hand, protein concentration had a significant effect ($P < 0.05$) on solubility percentage and particle size. Similarly, acetone: water ratio had a significant effect ($P < 0.05$) on the E.E. and particle size. The presence of multi-wall amorphous particles in the range of 40-60 μm was determined for all treatments. It was possible to encapsulate and improve the water solubility of phytosterols using food-grade biopolymers such as gelatin and maltodextrin.

Key words: Loading capacity, multi-wall, nanoprecipitation, solubility.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Índice General	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	19
5. RECOMENDACIONES.....	20
6. LITERATURA CITADA	21
7. ANEXOS	25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Formulación para elaboración de encapsulados, según tratamientos establecidos.	4
2. Condiciones de uso del secador por aspersión.	5
3. Tiempos de retención y concentración en porcentaje (%) de esteroides y estanoles encontrados en la muestra de concentrado utilizado en el presente estudio.	9
4. Actividad de agua de promedio de los diferentes tratamientos y separación Duncan por tratamiento.	10
5. Probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de la actividad de agua de las partículas.	10
6. Porcentaje de solubilidad promedio para los diferentes tratamientos y separación Duncan por tratamiento.	11
7. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para el porcentaje de solubilidad (%) en agua de las partículas.	12
8. Tamaño promedio de partícula (μm) para los diferentes tratamientos y separación Duncan por tratamiento.	14
9. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para el tamaño de partícula (μm) de las partículas.	14
10. Efecto de relación disolvente: agua sobre el tamaño promedio de partícula (μm) de fitoesteroides encapsulados y separación de medias Duncan para relación acetona agua.	15
11. Porcentaje de encapsulación promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias Duncan por tratamiento.	16
12. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación (%) de las partículas.	17
13. Capacidad de carga promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias Duncan por tratamiento.	17
14. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para la capacidad de carga (mg/g) de las partículas.	18
Figuras	Página
1. Flujo de proceso de elaboración de encapsulados con fitoesteroides	4
2. Cromatograma obtenido de la muestra de concentrado de fitoesteroides.	8
3. Imágenes tomadas por microscopio Mshot MI11 óptico invertido, con un aumento de 400X.	9
Anexos	Página
1. Análisis de varianza de actividad de agua.	25
2. Análisis de varianza para porcentaje de solubilidad (%) en agua.	25
3. Análisis de varianza para tamaño de partícula.	26
4. Análisis de varianza para capacidad de carga.	26
5. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación.	26

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los alimentos funcionales están en auge no solo por sus propiedades nutricionales sino también por sus funciones específicas. Las tendencias mundiales en alimentación humana señalan que existe un gran interés por parte de los consumidores hacia algunos alimentos que además de dar un aporte nutritivo brindan otros beneficios a las funciones biológicas y fisiológicas del organismo (Jesch y Carr 2017).

Existe un continuo desarrollo de nuevos productos alimenticios designados como funcionales. Estos tienen efectos benéficos para la salud de los consumidores con problemas de colesterol, hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (ECV). La ingesta de colesterol puede variar desde 250 hasta 500 mg/día aproximadamente, además, el 95-98% del colesterol que se ingiere se encuentra esterificado con ácidos grasos como: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y, en menor proporción, ácido linoleico (Martin-Aragón y Marcos 2008). Esto representa un problema de gran magnitud ya que a nivel mundial los porcentajes más altos de muerte se deben a las enfermedades cardiovasculares (ECV), más del 80% de las muertes se atribuyen en mucha mayor medida a los países de bajos recursos o bajos ingresos esto según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2020).

Algunos de los principales productos buscados son aquellos bajos en grasa debido a los altos índices de obesidad. En el tratamiento de estas afecciones, el control de las dietas y adición de compuestos bioactivos a matrices alimenticias cumple una función de controlar los niveles de colesterol dentro de los cuales se encuentran los fitoesteroles (Jesch y Carr 2017). Los fitoesteroles son compuestos con estructura y funcionalidad similares al colesterol, conforman una parte esencial de las membranas de la pared celular de las plantas. Estos compuestos análogos del colesterol son derivados exclusivamente de plantas. Definidos como Generalmente Aceptados como Seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) son conocidos como lípidos funcionales que aportan beneficios a la salud (Di Battista *et al.* 2018).

La encapsulación de compuestos consiste en cubrir partículas de interés a través del uso de una capa protectora que permita que el material encapsulado sea gradualmente disuelto bajo condiciones controladas (Calvo *et al.* 2010). Esta capa protectora actúa como una barrera entre el compuesto de interés y la matriz alimentaria. En este sentido, la capa permite que cualidades del compuesto como su textura arenosa e insolubilidad en agua sean oprimidas (Izadi *et al.* 2012). Debido a esto, el tipo de barrera a utilizar influye en la solubilidad del compuesto en agua, el cual se relaciona directamente con su biodisponibilidad en la administración oral (Hecq *et al.* 2005).

Un ejemplo de esto es el uso de proteínas, estas otorgan una capacidad emulsificante debido a su naturaleza anfifílica. Por otro lado, polisacáridos como maltodextrina funcionan como un compuesto hidrofílico y biodegradable que permite una encapsulación como segunda capa de la proteína (Germershaus *et al.* 2015). Al final, ambos compuestos permiten que los fitoesteroles se vuelvan biodisponibles debido a su solubilidad en agua.

Existen diferentes parámetros que afectan la encapsulación de compuestos. Una técnica muy utilizada es la nanoprecipitación. Esta técnica permite que, compuestos como la acetona, se

mezclen con fitoesteroles los cuales son solubles constituyendo así la fase orgánica. Por otro lado, la proteína es capaz de diluirse en agua comprendiendo de esta forma la fase acuosa. Al mezclar ambas fases la proteína es incapaz de estabilizarse en el no disolvente el cual lo conforma la fase orgánica precipitándose y formando así las nanopartículas (Sadeghi *et al.* 2014). La relación de ambas fases puede afectar parámetros como forma y tamaño de partícula de los compuestos encapsulados (Sadeghi *et al.* 2014).

Estudios preliminares recomiendan hacer uso de solventes orgánicos con el propósito de aumentar la solubilidad de los fitoesteroles en agua, las técnicas de encapsulación revelan que se han utilizado diferentes solventes (como metanol, etanol, isopropanol o n-butanol) (Di Battista *et al.* 2018). Es por eso que la investigación tiene como propósito encontrar la relación ideal de acetona y agua para encapsular los fitoesteroles siendo una alternativa para mejorar su solubilidad.

La composición del material de cobertura, en este caso la proteína, mejora la dispersión del agua y bio-accesibilidad de los fitoesteroles a través de un método de emulsificación. Las gelatinas poseen propiedades superiores que las hacen un buen material encapsulante (Meng y Cloutier 2014).

Basado en lo anterior se establecieron los siguientes objetivos del estudio:

- Evaluar el cambio en el perfil de fitoesteroles encapsulados con respecto al perfil inicial.
- Establecer el efecto de diferentes concentraciones de maltodextrina, cantidad de gelatina y acetona sobre actividad de agua, porcentaje de solubilidad y tamaño de partícula.
- Determinar la influencia de la concentración de maltodextrina y relación acetona: agua sobre la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las partículas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), en el cual se realizaron los análisis fisicoquímicos y preparación de muestras. El secado de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones de la Planta de Innovación de Alimentos (PIA). La evaluación de tamaños de partículas y morfología del producto encapsulado se efectuó en el laboratorio de reproducción animal de la carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Las instalaciones mencionadas anteriormente se encuentran en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, localizada en el km. 30, carretera de Tegucigalpa hacia Danlí, Valle del Yeguaré, Municipio de San Antonio de Oriente, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

Materiales

Acetona RA ACS (J.T Barker pureza de 99.5%), Gelatina bovina 250 Bloom malla 30 y Maltodextrina en polvo (DE:10-35). Mezcla de Fitoesteroles de Palma africana (*Elaeis guineensis*) composición (Campesterol, Stigmasterol y β -sitosterol, BIOSA®, Honduras) y agua desionizada. Se utilizó agua desionizada para todos experimentos, la cual fue obtenida de un sistema de purificación de agua “Barnstead™” “Nanopure™” (“Thermo Scientific”, Waltham, MA, EE. UU.).

Pruebas preliminares

Para poder definir las relaciones de los tratamientos para encapsulado, se realizó una serie de pruebas preliminares. El proceso consistió en prueba y error evaluando diferentes relaciones de solvente: no-solvente y concentraciones de proteína y maltodextrina a usar como materiales encapsulantes. La fase orgánica fue usada como solvente, en donde fueron disueltos los fitoesteroles. Para la fase acuosa, se preparó agua destilada y gelatina a diferentes concentraciones como se mencionó antes. Ambas fases fueron mezcladas, agregando de forma directa la fase orgánica a acuosa. Las proporciones fueron definidas evaluando la homogeneidad, estabilidad y observando que no se formara precipitado en la solución final.

Para el disolvente (fase inorgánica) se establecieron tres proporciones, las cuales fueron 2:1, 1:1.5, 1:1 en relación con la mezcla de la solución acuosa (agua). Para el material encapsulante gelatina, las concentraciones establecidas fueron 30 y 40 mg/mL, en relación con la cantidad de agua. Los porcentajes usados para maltodextrina fueron de 5 y 10%, tomando en cuenta la cantidad de agua a utilizar.

Se realizó una doble encapsulación agregando directamente la maltodextrina en polvo a la mezcla entre fase acuosa y orgánica, la cual ya contenía los fitoesteroles encapsulados. Antes de agregar la maltodextrina, el solvente orgánico se evaporó haciendo uso de un rotavapor® R-100 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Las partículas encapsuladas fueron secadas mediante secado por aspersión, “LabPlant SD-Basic” (“Keison Products”, Reino Unido) y fueron analizadas para determinar su tamaño, morfología, actividad de agua, solubilidad, eficiencia de encapsulado y capacidad de carga de los diferentes tratamientos. La elaboración de los tratamientos siguió las

formulaciones según el Cuadro 1 y el orden establecido en la Figura 1, en la cual se estableció la preparación de la solución acuosa: orgánica, roto evaporación y secado de las muestras.

Cuadro 1. Formulación para elaboración de encapsulados, según tratamientos establecidos.

Tratamiento	Gelatina (mg/mL)	%Maltodextrina (p/v)	Relación acetona: agua
1	30	5	2:1
2	40	5	2:1
3	30	10	2:1
4	40	10	2:1
5	30	5	1.5:1
6	40	5	1.5:1
7	30	10	1.5:1
8	40	10	1.5:1
9	30	5	1:1
10	40	5	1:1
11	30	10	1:1
12	40	10	1:1

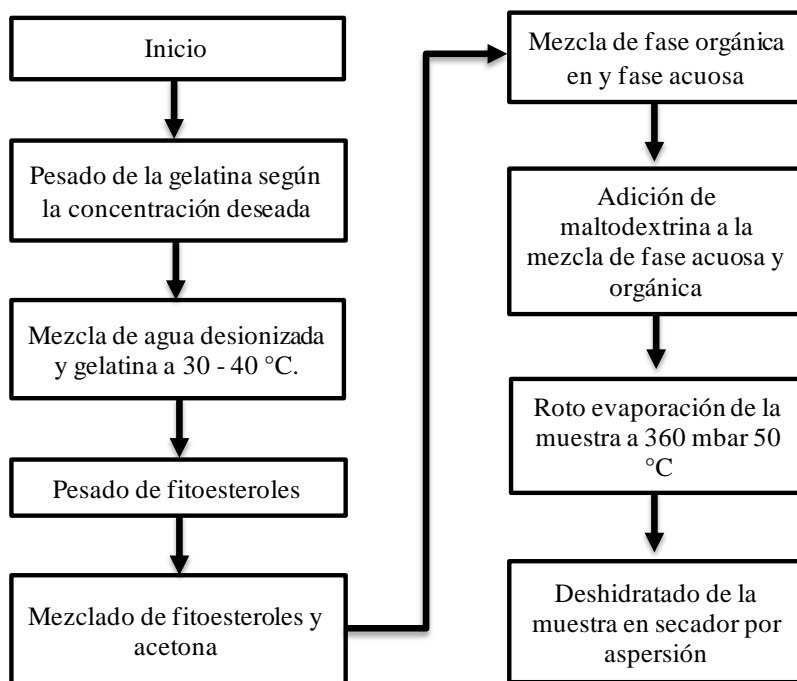


Figura 1. Flujo de proceso de elaboración de encapsulados con fitoesteroles.

Preparación de la solución acuosa. La solución acuosa se preparó a partir de dos concentraciones de gelatina: 30 y 40 mg/mL. La preparación de cada solución fue en base a las relaciones de agua

desionizada 2:1, 1:1.5 y 1:1, respectivamente. El agua fue colocada en un beaker de 1000 mL, luego se agregó la proteína y se calentó en una plancha agitadora. La temperatura utilizada para facilitar la dilución de la proteína en el agua fue entre 30-40 °C. Se mantuvo en agitación constante a 600 rpm con un agitador magnético por un tiempo aproximado de 20 minutos.

Preparación de la solución orgánica. La cantidad de fitoesteroles a utilizar fue determinada en base a la proporción de proteína utilizada en la solución acuosa. Se empleó acetona grado reactivo como solvente, a la cual se le agregó el fitoesterol según el tipo de tratamiento y relación de solventes a ser preparada. La cantidad de fitoesteroles planteada fue de 50% del total de proteína usado en la fase acuosa de cada tratamiento (para una relación de 1 parte de fitoesteroles por cada dos partes de gelatina). Para preparar esta solución se colocó la acetona en un beaker de 500 mL, se agregaron los fitoesteroles previamente pesados. La mezcla se puso en una plancha con agitación magnética constante a 600 rpm durante 12 minutos aproximadamente.

Roto evaporación. Una vez fueron preparadas las soluciones acuosas y orgánicas, se agregó de manera directa la solución orgánica a la acuosa y se mantuvo en agitación magnética constante durante 8 minutos. Las proporciones definidas fueron de 2:1, 1:1.5, 1:1 (acetona: agua). La muestra con los fitoesteroles ya encapsulados se roto evaporó para remover la acetona. Adicionalmente, se agregó la maltodextrina como material de segunda encapsulación a la solución acuosa que contenía la proteína y los fitoesteroles encapsulados. La cantidad usada de maltodextrina (5 o 10%) fue en relación con la proporción de agua utilizada inicialmente antes de realizar el proceso de roto evaporación.

Secado por aspersión. Para el deshidratado de los tratamientos se utilizó un secador por aspersión “LabPlant SD-Basic” (Keison Products, Reino Unido). Se hizo pasar aproximadamente 50 mL de agua por todo el equipo para eliminar cualquier suciedad que pudo haber quedado de muestras anteriores y que pudieron ser un potencial contaminante de la siguiente muestra a secar. El tratamiento fue inyectado a través de la manguera a una velocidad de 6 mL/min, 3 bares de presión, una temperatura de entrada 150 y 90 °C de temperatura de salida en flujo continuo como se establece en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones de uso del secador por aspersión.

Condiciones de uso	Parámetros
Temperatura de entrada	150 °C
Temperatura de salida	90 °C
Velocidad de bomba peristáltica	6 rpm
Presión de aire	3 bar

Fase 1. Análisis químicos y físicos de los encapsulados con fitoesteroles

Perfil de fitoesteroles. Para determinar el perfil de fitoesteroles de la muestra mezcla de fitoesteroles y los tratamientos, se realizó un análisis de Cromatografía de Gases (CG) Agilent modelo 6890 mediante el método AOCS Ce 12-16 (AOCS 2017c). Brevemente, se preparó la solución de estándar interno utilizando Epicoprostanol (5β -colestano- 3α -ol) en tolueno como

solvente (5 mg/mL). A continuación, se pesó 1 g de la muestra encapsulada en un matraz de 50 mL, en el cual se añadieron perlas de ebullición. Seguidamente al matraz que contenía la muestra se le agregó 5 mL del estándar interno y 5 mL de HCL a 3 N y se colocó en planchas a 100 °C en el condensador de reflujo durante 45 minutos donde se llevó a cabo una hidrólisis ácida de la muestra. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se adicionó 40 mL de NaCl saturada hasta aforar para realizar el lavado de la muestra. Se agitó la muestra manualmente durante 2 minutos y se dejó en reposo durante 5 minutos o hasta que se llevara a cabo la separación de fases, luego con una micropipeta se extrajo la fase orgánica y se colocó en un nuevo matraz de 50 mL. Se le adicionó 5 mL de NaOH/MeOH a 2.3 N y se llevó a cabo una hidrólisis alcalina a 100 °C durante 15 minutos, después se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente se le agregó 7 mL de HCL 3 N y 40 mL de NaCl saturada hasta aforar el cuello del matraz. Luego se agitó por 2 minutos y se dejó en reposo hasta observar la separación de fases. Inmediatamente se preparó el vial para el análisis de cromatografía. El vial fue preparado con 0.1 g de sulfato de sodio, 0.3 mL de muestra de la fase orgánica, 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de BSTFA (N, O-Bistrifluoroacetamida) para poder derivatizar y facilitar la cuantificación de los fitoesteres recuperados. Se colocaron los viales dentro de tubos de centrifugación de 15 mL y fueron centrifugados a 6000 rpm durante 3 minutos. Los tratamientos realizados fueron sometidos a este método para calcular la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga.

Actividad de Agua (aw). La actividad de agua de cada tratamiento se midió después de ser secados en el proceso de secado por aspersión. Se determinó usando el medidor AQUALAB modelo serie 3 por el método AOAC 978.18. Este equipo mide la temperatura superficial de las muestras mediante infrarrojo y el punto de rocío sobre un espejo enfriado. Primero se calibró el equipo utilizando un estándar de 0.500 de actividad de agua, seguidamente se procedió a llenar las copas de muestra de plástico hasta la mitad y se realizó el análisis hasta que el equipo logrará alcanzar el equilibrio. Se tomaron tres lecturas de cada tratamiento.

Solubilidad. El índice de solubilidad en agua fue determinado según el método descrito por (Ahmed *et al* 2010), al cual se le realizaron modificaciones para adaptarlo a la investigación. Se tomaron 2 gramos de muestra de encapsulado por cada repetición y tratamiento, se colocó en un tubo plástico de centrifuga con capacidad de 50 mL, al cual se le agregó 24 mL de agua desionizada. Posteriormente, se mezcló la muestra en un Vortex durante 5 minutos a 2500 rpm. La mezcla se llevó por 30 minutos a 30 °C en baño maría y se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm, esto para poder separar el material no soluble. Se extrajo el sobrenadante y se trasladó a una placa Petri que fue previamente pesada en una balanza analítica. Se pesó la placa Petri junto con el residuo y se dejó en el horno durante 24 h a 105 °C. Una vez transcurrido el tiempo necesario en el horno, las muestras se dejaron enfriar en un desecador por aproximadamente 20 minutos, se pesó la muestra seca y se realizaron los cálculos. El porcentaje de solubilidad se calculó utilizando la Ecuación 1:

$$\% \text{Solubilidad} = \left(\frac{\text{PMS}}{\text{PMI}} \right) \times 100 \quad [1]$$

Donde:

PMS: Peso muestra seca.

PMI: Peso de material inicial.

Tamaño de partícula y morfología. El tamaño de partícula fue determinado mediante la observación y medición del valor promedio de 15 partículas de cada tratamiento. Se utilizó un

microscopio invertido de marca Mshot MI11, con un aumento de 400X. Seguidamente al microscopio se le colocó una cámara Dino-Eye AM-423X, esto permitió visualizar mejor las partículas. Las imágenes pudieron observarse y medirse usando el programa Dino capture 2 - 0 versión 2.0. La escala utilizada en la medición del tamaño y morfología de partículas fue en micrómetros.

Fase 2. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

Porcentaje (%) de Eficiencia de Encapsulación (EE). El análisis de eficiencia de encapsulación se midió a partir de una relación entre la cantidad de fitoesteroles iniciales (peso) añadidos en la mezcla del encapsulado, y la cantidad de fitoesteroles resultantes que fueron encapsulados (cuantificación), y esto se multiplicó 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. Se calculó la E.E. según la Ecuación 2.

$$\% \text{ Eficiencia de Encapsulación} = \frac{\text{FF}}{\text{IF}} \times 100 \quad [2]$$

Donde:

FF = Fitoesteroles recuperados por cromatografía de gases.

IF = Cantidad inicial de fitoesteroles.

Capacidad de Carga (CC). Se obtuvo la cantidad de fitoesteroles por gramo de muestra según el resultado obtenido luego de integrar el área debajo de las curvas de la gráfica obtenida en cromatografía, según el método AOCS Ce 12-16. Luego se sumó la cantidad por gramo de cada uno de los fitoesteroles en el total de la muestra para determinar los miligramos de fitoesteroles por gramo de muestra. Se calculó la CC según la Ecuación [3].

$$\text{Capacidad de carga} = \frac{\text{FR}}{\text{CMC}} \quad [3]$$

Donde:

FR = Fitoesteroles recuperados por cromatografía de gases, mg.

CMC = Cantidad de muestra utilizada para cromatografía de gases, g.

Diseño experimental.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA para ambas fases de los análisis químicos y físicos. Se evaluaron doce (12) tratamientos (tres relaciones de acetona:agua, dos concentraciones de proteína y dos porcentajes de maltodextrina) con tres repeticiones para cada tratamiento, para un total de 36 unidades experimentales (Cuadro 2). Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANDEVA). Se utilizó la prueba de Duncan para la separación de medias de los tratamientos y LSMEANS para evaluar las interacciones entre las variables evaluadas con una probabilidad del 95%. Para el análisis de los datos se utilizó el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®]) versión 9.4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1

Durante la primera fase del experimento se establecieron los parámetros de actividad de agua, porcentaje de solubilidad en agua, tamaño y morfología de las partículas de los diferentes tratamientos. Luego de obtener los resultados, se obtuvieron los mejores tratamientos por cada variable evaluada. De igual forma, se estableció el efecto del porcentaje (%) de maltodextrina, relación acetona: agua y gelatina sobre las variables evaluadas. Con esta información se procedió a elegir los tratamientos en los cuales se evaluaría la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. Se tomó en cuenta la información establecida por el análisis de separación de medias Duncan y de interacciones LS Means para elegir las variables a evaluar en capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

Perfil de fitoesteres. Se evaluó mediante cromatografía de gases el perfil de esteroides y estanoles presentes en el concentrado de fitoesteres utilizados en el presente estudio. Para ello, los fitoesteres se derivatizaron a éteres de trimetilsililo (TMS) y fueron separados y cuantificados utilizando el método AOCS Ce 12-16. El análisis de la mezcla de fitoesteres demuestra que tenían una concentración total promedio de 98.85%, de los cuales 19.66% eran Campesteroles, 15.54% eran Estigmasteroles y 53.68% eran β -Sitoesteres. Estos últimos datos son similares a los declarados en el certificado de análisis del producto. Otros fitoesteres se encontraron en menor cantidad (9.67%) y fueron identificados en el Cuadro 3 y Figura 2. Por otro lado, los tratamientos de encapsulados también presentaron todos los mismos fitoesteres en porcentajes similares, pero en cantidades diferentes, de acuerdo con su encapsulación. Por lo tanto, el proceso de encapsulación no afectó el perfil de fitoesteres, sino la cantidad total de fitoesteres recuperados.

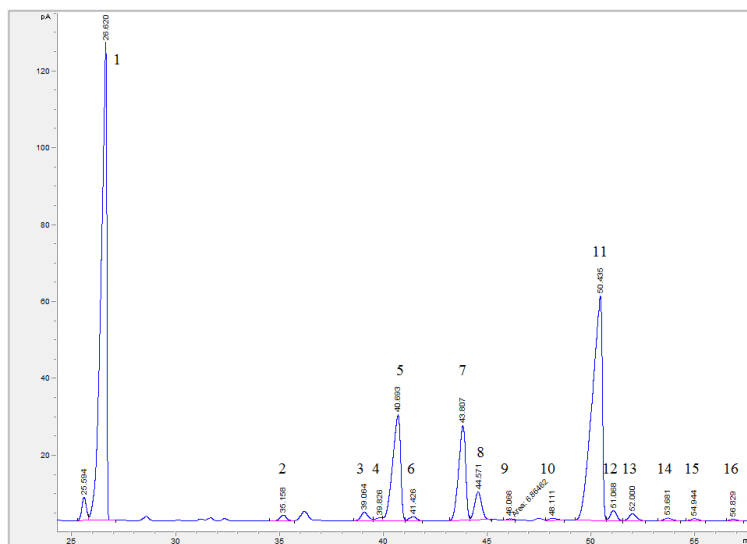


Figura 2. Cromatograma obtenido de la muestra de concentrado de fitoesteres. La identificación de cada pico se presenta en el Cuadro 3. Eje Y=Pico amperios, pA; Eje X= Tiempo, min.

Cuadro 3. Tiempos de retención y concentración en porcentaje (%) de esteroides y estanoles encontrados en la muestra de concentrado utilizado en el presente estudio.

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	%Fitoesteroides en concentrado Promedio \pm D.E.
1	5 β -Colestano-3 α -ol (Estándar Interno)	26.42	---
2	Brasicasterol	35.16	0.86 \pm 0.00
3	Ergosterol*	39.06	1.15 \pm 0.41
4	24-Metileno Colesterol	39.06	0.47 \pm 0.05
5	Campesterol	40.69	19.66 \pm 0.03
6	Campestanol	41.42	0.69 \pm 0.05
7	Estigmasterol	43.8	15.54 \pm 0.46
8	Δ 22-Estigmasterol	44.57	3.56 \pm 1.36
9	Δ 7-Campesterol	46.04	0.30 \pm 0.09
10	Clerosterol + Δ 5,23-Estigmastadienol	48.11	0.38 \pm 0.06
11	β -Sitosterol	50.43	53.68 \pm 1.65
12	Sitostanol	51.07	1.41 \pm 0.08
13	Δ 5-Avenasterol	52	1.17 \pm 0.03
14	Fucosterol	53.68	0.46 \pm 0.04
15	Δ 7-Estigmasterol	54.94	0.39 \pm 0.01
16	Δ 7-Avenasterol	56.83	0.26 \pm 0.07

* No incluido en el cálculo de esteroides; D.E.= Desviación Estándar.

Actividad de agua. Un bajo valor en actividad de agua en los alimentos permite reducir su actividad microbiológica cuando es menor a 0.6. La actividad de agua de un polvo que se encuentra entre 0.2-0.4 provee de reducciones en procesos como oxidación y reacciones enzimáticas como empardeamiento (Caliskan y Dirim 2016). A baja actividad de agua se forma una capa de agua fina que protege las partículas del contacto con el oxígeno (Labuza *et al.* 1969). Se denota en el Cuadro 4 que el rango de actividad de agua se encontró entre 0.22 a 0.43. Los resultados obtenidos en el estudio son superiores a los obtenidos por Tolve *et al.* (2018). En dicho estudio se utilizó proteína de suero, inulina y quitosano como agentes encapsulantes de fitoesteroides secados por aspersión en los que se obtuvo un rango de actividad de agua de 0.24 a 0.44.

La maltodextrina es altamente soluble en agua y con comportamiento hidrofílico (Barthold *et al.* 2019). Dada las propiedades de higroscopicidad de la partícula, se tuvo en cuenta que durante su manejo los valores en aw pudieron cambiar drásticamente. Según los resultados obtenidos en el Cuadro 5 y de acuerdo con el análisis de medias LS Means, se pudo establecer que existe un efecto estadísticamente significativo ($P < 0.05$) del porcentaje de maltodextrina y relación acetona: agua sobre actividad de agua. De los parámetros evaluados, la cantidad de proteína no tuvo influencia significativa ($P > 0.05$) sobre la actividad de agua. En un estudio realizado por Mishra *et al.* (2013), encontraron que el porcentaje de maltodextrina de 5 a 9% para polvo de jugo de Amla secado por aspersión provocó una disminución en el contenido de humedad de un 5.6 a un 3.8%. Esto demuestra que un aumento en el contenido de maltodextrina puede reducir el porcentaje de agua en la muestra a secar por aspersión. Esto se puede deber a que un aumento en el contenido de

sólidos provoca que se tenga que eliminar una menor cantidad de agua durante el secado (Kha *et al.* 2010). Por otro lado, la relación acetona: agua pudo tener un efecto en la aglomeración de las partículas. Al incrementar la aglomeración debido a un incremento en las interacciones Van der Waals se obtiene una menor eficiencia en el secado por aspersión (Birchal 2005).

Cuadro 4. Actividad de agua de promedio de los diferentes tratamientos y separación Duncan por tratamiento.

	%Maltodextrina (p/v)	Gelatina (mg/mL)	Actividad de agua
			media \pm D.E.
2:1	5	30	0.43 \pm 0.025 ^a
		40	0.35 \pm 0.024 ^b
	10	30	0.23 \pm 0.036 ^e
		40	0.28 \pm 0.019 ^{cd}
1.5:1	5	30	0.31 \pm 0.049 ^{bc}
		40	0.26 \pm 0.016 ^{de}
	10	30	0.25 \pm 0.017 ^{de}
		40	0.24 \pm 0.014 ^{de}
1:1	5	30	0.27 \pm 0.019 ^{cd}
		40	0.26 \pm 0.028 ^{de}
	10	30	0.28 \pm 0.032 ^{cd}
		40	0.22 \pm 0.019 ^e
C.V. (%)			17.02

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje; D.E.= Desviación Estándar; (p/v) = peso/volumen; ^{a-e} = Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Cuadro 5. Probabilidades obtenidas en el análisis de varianza de la actividad de agua de las partículas.

Variables	Valor-p
Gelatina	0.144
Relación acetona: agua	0.001
Concentración de maltodextrina	0.005
Proteína*Relación solventes	0.811
Proteína*Maltodextrina	0.229
Relaciones solventes*Maltodextrina	0.002
Proteína* Relación solventes*Maltodextrina	0.055
C.V. (%)	17.02
R ²	0.70

C.V. (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Solubilidad. La utilización de compuestos a base de proteína mejora la solubilidad de los fitoesteroles al momento de ser encapsulados. Bajo este concepto se estableció el uso de gelatina y maltodextrina, ya que al poseer extremos hidrofílicos mejoran la solubilidad de las partículas en agua (Meng y Cloutier 2014). La solubilidad de los encapsulados con fitoesteroles fue mayor a 80% para la mayoría de los tratamientos evaluados como se muestra en el Cuadro 6. Solamente dos tratamientos presentaron una solubilidad menor al 80%.

Cuadro 6. Porcentaje de solubilidad promedio para los diferentes tratamientos y separación Duncan por tratamiento.

Relación acetona: agua	%Maltodextrina (p/v)	Gelatina (mg/mL)	% Solubilidad en agua
			promedio \pm D.E.
2:1	5	30	83.88 \pm 2.95 ^{ab}
		40	82.37 \pm 2.89 ^{bc}
	10	30	88.62 \pm 1.12 ^a
		40	88.01 \pm 1.29 ^{ab}
1.5:1	5	30	84.53 \pm 3.40 ^{ab}
		40	77.83 \pm 7.32 ^{cd}
	10	30	89.40 \pm 0.85 ^a
		40	88.87 \pm 2.31 ^a
1:1	5	30	82.25 \pm 2.14 ^{bc}
		40	75.42 \pm 4.07 ^d
	10	30	88.69 \pm 1.65 ^a
		40	87.94 \pm 0.85 ^{ab}
C.V. (%)			3.67

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje; D.E.= Desviación Estándar; (p/v) = peso/volumen; ^{a-d}: Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Según el análisis de interacciones en el Cuadro 7, se puede observar que la relación entre porcentaje de maltodextrina y proteína promovió cambios estadísticamente significativos (P < 0.05) en el % de solubilidad en agua. Por otro lado, se estableció que la relación acetona: agua no tuvo ninguna influencia significativa (P > 0.05) sobre la solubilidad de las partículas. El aumento en el porcentaje (%) de maltodextrina provocó un aumento en la solubilidad de las partículas. Los resultados de solubilidad obtenidos en el presente estudio son comparables con los reportados por Siacor *et al.* (2020), en el cual se encapsuló compuestos fenólicos de semilla de mango. En dicho estudio se estableció que el incremento de un 2 a un 5% de maltodextrina resultó en un aumento significativo (P < 0.05) en el índice de solubilidad en agua. Este comportamiento puede ser asociado al hecho de que la maltodextrina es una molécula altamente polar y con amplia cantidad de grupos hidroxilo (Do Valle Calomeni *et al.* 2017). Esto último resulta en un aumento de la solubilidad cuando los encapsulados se solubilizan en agua. Sumado a esto, la interacción entre la gelatina bovina y la maltodextrina, al contener ambas moléculas secciones hidrofílicas, estas interactúan y vuelven a la

partícula más soluble en ambientes acuosos (Semenova *et al.* 2002). Esto justifica el aumento en solubilidad y actividad de agua de las partículas al interactuar con el agua.

Cuadro 7. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para el porcentaje de solubilidad (%) en agua de las partículas.

Variables	Valor-p
Gelatina	0.012
Relación acetona: agua	0.235
Concentración de maltodextrina	<.0001
Proteína*Relación solventes	0.494
Proteína*Maltodextrina	0.045
Relaciones solventes*Maltodextrina	0.251
Proteína* Relación solventes*Maltodextrina	0.502
C.V. (%)	3.663
R ²	0.755

C.V. (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Morfología y tamaño de partícula. De acuerdo con la clasificación morfológica para microcápsulas establecida por Gharsallaoui *et al.* (2007), se clasificó la forma para los tratamientos. Para los tratamientos se encontraron microcápsulas de forma irregular como se ilustra en la Figura 3. Además, se encontraron microcápsulas multipared para todos los tratamientos, donde se puede observar la doble capa formada alrededor del fitoesterol. Las microcápsulas pueden ser clasificadas como Figuras amorfas, las cuales según Cao *et al.* (2016) aumentan la solubilidad en agua por su forma.

En el caso de tamaño de partícula, este es uno de los factores más importantes de los compuestos encapsulados. Este parámetro permite determinar si el tamaño afectará la textura del alimento donde será incorporado (Comunian y Favaro-Trindade 2016). Por ello, es esencial monitorear el tamaño de partícula de los encapsulados con fitoesterol, ya que según Tolve *et al.* (2020), tamaños de partícula superiores a los 30 μm pueden afectar la textura de los alimentos en los que se incorporarán. Los resultados en el Cuadro 8 muestran que el tamaño de partícula fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) entre los tratamientos evaluados. El rango de tamaños que se obtuvo fue de 43 a 60 μm . Los valores obtenidos están por encima de lo obtenido por Di Battista *et al.* (2018), en el cual se utilizó goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes de fitoesterol con promedio de tamaño de partícula de 5 μm . Esta diferencia puede deberse a que en el estudio Di Battista *et al.* (2018), utilizaron un proceso de homogenización a la hora de preparar las muestras, contrario a lo realizado en el presente estudio.

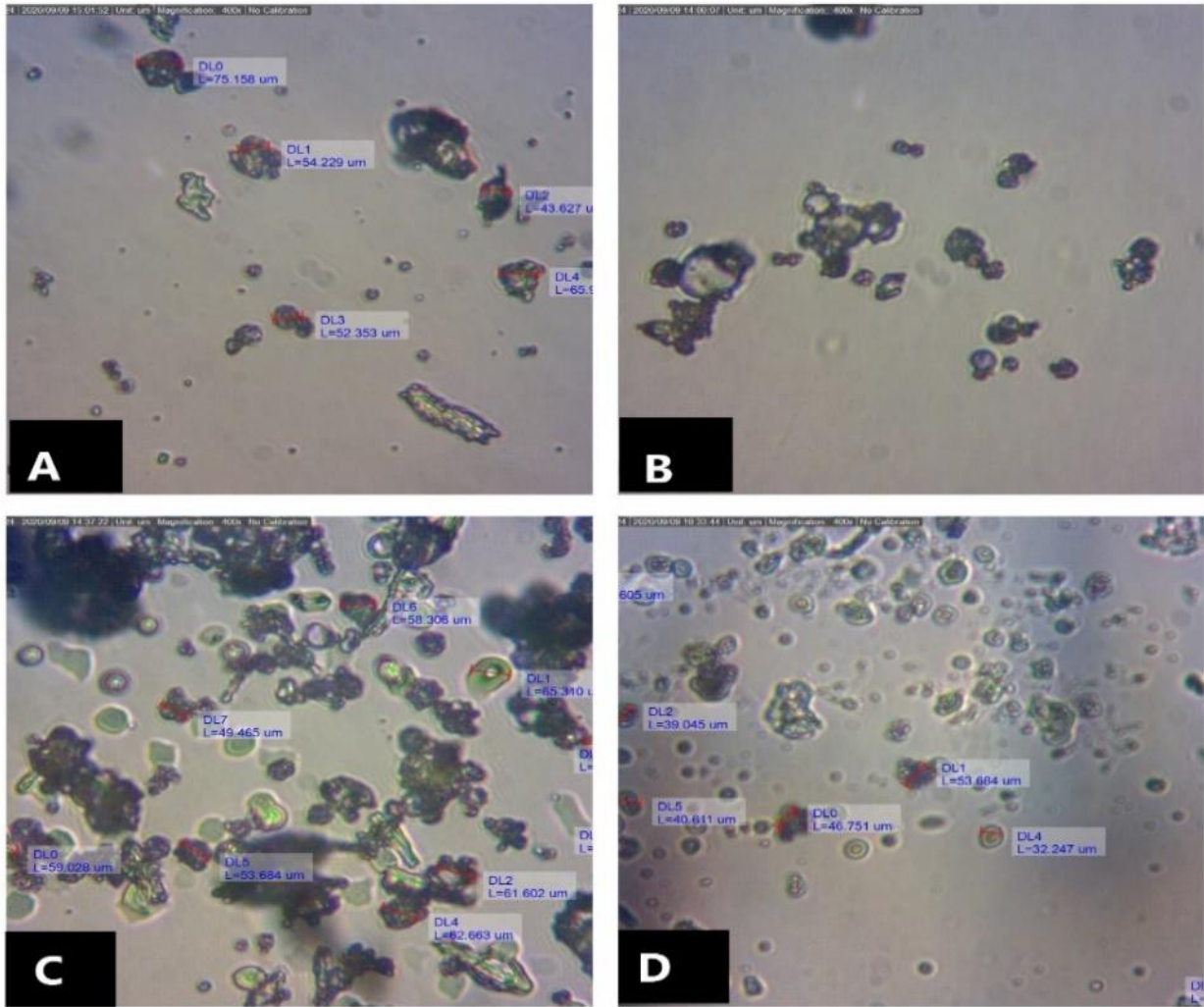


Figura 3. Imágenes tomadas por microscopio óptico invertido. Aumento de 400X. Para: A = (Relación 2:1, 5% maltodextrina, 30 mg/mL gelatina); B = (Relación 1:1, 10% maltodextrina, 40 mg/mL gelatina); C = (Relación 2:1, 5% maltodextrina, 40 mg/mL gelatina); D = (Relación 1.5:1, 5% maltodextrina, 30 mg/mL gelatina).

Cuadro 8. Tamaño promedio de partícula (μm) para los diferentes tratamientos y separación Duncan por tratamiento.

Relación			Tamaño de partícula(μm)
acetona: agua	% Maltodextrina (p/v)	Gelatina (mg/mL)	promedio \pm D.E.
2:1	5	30	60.59 \pm 5.43 ^a
		40	56.62 \pm 5.44 ^{ab}
	10	30	57.81 \pm 5.44 ^{ab}
		40	54.78 \pm 5.75 ^{bc}
1.5:1	5	30	49.83 \pm 4.36 ^{de}
		40	52.30 \pm 6.00 ^{cd}
	10	30	50.44 \pm 5.92 ^{ed}
		40	49.14 \pm 4.83 ^{def}
1:1	5	30	46.86 \pm 5.46 ^{efg}
		40	43.17 \pm 4.07 ^g
	10	30	45.28 \pm 5.35 ^{fg}
		40	44.16 \pm 4.68 ^g
C.V. (%)			10.5

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje; (p/v) = peso/volumen; ^{a-g}: valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$); D.E. = Desviación Estándar.

Según el análisis en el Cuadro 9, se estableció que el tamaño de partícula fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$), teniendo como parámetros de influencia la relación acetona: agua y el porcentaje de maltodextrina por muestra. Por otro lado, se ha reportado que el uso de compuestos orgánicos como acetona y etanol promueven la precipitación de la albumina de suero bovino al ser incompatibles (Sadeghi *et al.* 2014). Según el mismo autor, la incompatibilidad genera aglomerados al ser disueltos la fase orgánica con la fase acuosa conteniendo la proteína. Este efecto pudo ocurrir en el presente estudio, ya que se utilizó acetona como agente no solvente y gelatina (proteína) como material encapsulante.

Cuadro 9. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para el tamaño de partícula (μm) de las partículas.

Variables	Valor-p
Gelatina	0.078
Relación acetona:agua	0.007
Concentración de maltodextrina	<.0001
Proteína*Relación solventes	0.759
Proteína*Maltodextrina	0.429
Relación solventes*Maltodextrina	0.034
Proteína* Relación solventes*Maltodextrina	0.152
C.V. (%)	10.16
R ²	0.55

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje.

Como se puede observar en el Cuadro 10, se determinó que a medida se incrementó la concentración de acetona en la mezcla de no-solvente: solvente, se obtuvo un mayor tamaño de partícula. Esto no concuerda con lo reportado por Etorki *et al.* (2016), quienes crearon nanoencapsulación de partículas utilizando α -lactalbumina y ovoalbúmina, en el uso de diferentes agentes disolventes no encontraron un efecto significativo en los tamaños de partículas. Para este efecto, ellos concluyeron que utilizar agentes disolventes en concentraciones alrededor del 70 al 80% causa que la proteína se despliegue y se pliega para agregarse y formar nanopartículas, y que la adición de más agente disolvente no tiene efecto sobre el tamaño. Sin embargo, en comparación con solventes orgánicos como el etanol, la polaridad de la acetona promueve una menor hidrofobicidad, lo cual reduce el tamaño de la partícula (Sahoo *et al.* 2015). El aporte que compuestos como la acetona establecen es un menor tamaño de partícula en albumina de suero (Sadeghi *et al.* 2014) y una mejor solubilidad de los fitoesteroles (Leong *et al.* 2011).

Cuadro 10. Efecto de relación disolvente: agua sobre el tamaño promedio de partícula (μm) de fitoesteroles encapsulados y separación de medias Duncan para relación acetona: agua.

Relación acetona: agua	Tamaño de partícula (μm)
	promedio \pm D.E.
2:1	57.45 \pm 6.19 ^a
1.5:1	50.43 \pm 5.32 ^b
1:1	44.87 \pm 4.76 ^c
CV (%)	10.5
P.	<0.0001

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje; P=Probabilidad; D.E= Desviación Estándar
^{a-b}: Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

Fase 2

Se determinó que los factores que tuvieron mayor influencia en los parámetros como actividad de agua, tamaño de partícula y solubilidad fueron el porcentaje de maltodextrina y proteína. Para el caso de la concentración de gelatina, se encontró que 30 mg/mL de proteína produjo los mejores resultados en % de solubilidad en comparación con 40 mg/mL. Debido a esto, se seleccionaron solamente los tratamientos con 30 mg/mL para los análisis de capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. Por lo cual, solamente se evaluaron las variables de relación acetona: agua y porcentaje de maltodextrina. Además, los resultados en el Cuadro 7 demostraron que la maltodextrina fue más significativa para el parámetro de solubilidad en agua, por lo cual se decidió estudiar esta variable, ya que este ingrediente es más barato y se encuentra en mayor cantidad en la formulación de los encapsulados. Al final, se obtuvo la capacidad de carga y porcentaje de eficiencia de encapsulación para los siguientes tratamientos; 1) Relación acetona: agua (2:1), 5 % maltodextrina y 30 mg/mL de gelatina; 2) Relación acetona: agua (2:1), 10 % maltodextrina y 30 mg/mL de gelatina; 3) Relación acetona: agua (1.5:1), 5 % maltodextrina y 30 mg/mL de gelatina, y 4) Relación acetona: agua (1.5:1), 10 % maltodextrina y 30 mg/mL de gelatina.

Eficiencia de encapsulación. Los resultados del Cuadro 11 muestran que la eficiencia de encapsulación de los fitoesteroles fue mayor al 80%, alcanzando para algunos tratamientos hasta un 94%, lo cual demuestra que el método utilizado en conjunto con la gelatina y maltodextrina como materiales encapsulantes tienen un alto potencial para la encapsulación de fitoesteroles. Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos para eficiencia de encapsulación (Cuadro 11). Se estableció que, a menor cantidad de acetona utilizada, se encontró una tendencia al incremento en los resultados de eficiencia de encapsulación. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Cao *et al.* (2006), quienes reportaron eficiencias de encapsulación en el rango de 63 a 95% para fitoesteroles encapsulados en caseinato de sodio, proteína de soja o proteína de suero de leche.

Cuadro 11. Porcentaje de encapsulación promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias Duncan por tratamiento.

Relación (acetona: agua)	% Maltodextrina (p/v)	% Eficiencia de encapsulación
		promedio \pm D.E.
2:1	5	80.80 \pm 5.31 ^b
	10	88.44 \pm 2.85 ^{ab}
1.5:1	5	88.76 \pm 3.62 ^{ab}
	10	94.31 \pm 4.05 ^a
C.V. (%)		6.48

C.V. (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje; a-b: valores seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$); D.E= Desviación Estándar.

En el Cuadro 12 se puede observar que la relación acetona: agua tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) en el porcentaje (%) de eficiencia de encapsulación de los fitoesteroles. Esto concuerda con lo obtenido por Lee *et al.* (2010). En el estudio de Lee, se estableció que una reducción del no solvente (etanol) con relación al solvente provocó un aumento en el rendimiento de encapsulado de gelatina bovina. De igual forma, Castellanos *et al.* (2001) establecieron que cambios en la relación fase acuosa-orgánica provocó diferentes resultados en la eficiencia de encapsulación de albúmina de suero bovino (BSA) en microesferas de poli (lactida-co-glicólido) (PLG). Añadiendo a esto, Sadeghi *et al.* (2014) estableció que la acetona en comparación con solventes como etanol, produce la mejor eficiencia de encapsulado de nanopartículas de albúmina de suero bovino y encapsulación de curcumina, el cual es un compuesto con características hidrofóbicas similares a los fitoesteroles.

Cuadro 12. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para la eficiencia de encapsulación (%) de las partículas.

Variables	Valor-p
Relación acetona/agua	0.036
Concentración de Maltodextrina	0.030
Relaciones solventes*Maltodextrina	0.688
C.V. (%)	4.630
R ²	0.671

C.V. (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Otro factor significativo ($P < 0.05$) fue el porcentaje (%) de maltodextrina, ya que a medida se incrementó el porcentaje de maltodextrina, se incrementó la eficiencia de encapsulación. Este comportamiento también fue reportado por Akhavan Mahdavi *et al.* (2016), quienes utilizaron maltodextrina, goma arábica y gelatina para encapsular antocianinas. La eficiencia de encapsulación estuvo en un rango entre un 89 a un 96%.

Capacidad de carga. Según Joye y McClements (2014), la capacidad de carga es uno de los parámetros que evalúa el aporte del material encapsulante en el sistema de encapsulación. Como consecuencia de esto, se establece en el Cuadro 13 que en los tratamientos con menor cantidad de maltodextrina se obtuvo una mayor capacidad de carga. Con esta técnica se alcanzó una capacidad de carga de hasta 142 mg de fitoesteroles por cada gramo de encapsulados en polvo (Cuadro 13). Estos resultados son prometedores, ya que son consistentes con algunos valores reportados otros estudios previos para la encapsulación de fitoesteroles en caseinato de sodio, proteína de soja o proteína de suero de leche (Cao *et al.* 2006). En dicho estudio se reportaron capacidades de carga para los fitoesteroles en el rango de 49 – 270 mg/g, o de 4.9 – 270 g/100 g. Asimismo, ellos reportaron que a medida se incrementó el porcentaje de caseinato sodio, la capacidad de carga disminuyó. La capacidad de carga es dependiente de la cantidad de material núcleo a encapsular con relación a la cantidad de material encapsulante.

Cuadro 13. Capacidad de carga promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias Duncan por tratamiento.

Relación (acetona: agua)	% Maltodextrina (p/v)	Capacidad de carga (mg ft. /g muestra)
		promedio ± D.E.
2:1	5	129.16 ± 8.48 ^a
	10	86.99 ± 2.81 ^b
1.5:1	5	141.88 ± 5.79 ^a
	10	88.06 ± 8.65 ^b
C.V. (%)		6.15

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje; mg ft. /g muestra = mg de fitoesterol por gramo de producto de muestra; ^{a-b}: Valores seguido por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$); D.E.= Desviación Estándar.

Según el análisis del Cuadro 14, el porcentaje (%) de maltodextrina fue el factor que afectó de forma significativa ($P < 0.05$) la capacidad de carga de los fitoesteroles encapsulados. A medida se aumentó el porcentaje de maltodextrina, se observó una reducción en la capacidad de carga (mg/g). Esto se debe al aumento en la concentración de maltodextrina con respecto a los compuestos encapsulados, reduciendo así la cantidad de fitoesteroles por gramo de muestra. El efecto del aumento de concentración de maltodextrina en compuestos encapsulados fue demostrado en estudios previos (Barthold *et al.* 2019). En dicho estudio, se utilizaron 2 concentraciones de maltodextrina (2.5 y 10% w/w) y se concluyó que el aumento en porcentaje (%) de maltodextrina produjo una reducción en la concentración de fenoles totales de extractos de desechos de piña secados por aspersión.

Cuadro 14. Probabilidades obtenidas en el Análisis de varianza para la capacidad de carga (mg/g) de las partículas.

Variables	Valor-p
Relación acetona: agua	0.120
Concentración de maltodextrina	<.0001
Rel*Malt	0.180
C.V. (%)	6.150
R ²	0.950

C.V. (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

4. CONCLUSIONES

- El perfil de fitoesteroles no cambia al realizar el proceso de encapsulación.
- Solamente el porcentaje de maltodextrina y la concentración de gelatina, de los factores evaluados, afectan la solubilidad de las partículas con fitoesteroles.
- El porcentaje de maltodextrina, gelatina y la relación acetona: agua no afectan la actividad de agua de las partículas.
- El tamaño de partícula se verá afectada por la interacción entre los factores acetona: agua y concentración de proteína. Se observa tamaños de partículas en un rango de 40 a 60 μm y con forma irregular y amorfa.
- La concentración de maltodextrinas y relación acetona: agua afectan de manera directa dando un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las partículas.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el uso de un surfactante para mejorar tamaño promedio de partícula.
- Se recomienda realizar pruebas de color, sabor y textura en una matriz alimenticia para establecer los cambios obtenidos.

6. LITERATURA CITADA

- [AOAC] Association of Official Analytical. 1995. Water Activity of Canned Vegetables in Official Methods of Analysis. Gaithersburg, MD. Method number 978.18
- [AOCS] American Oil Chemists Society. 2017. Official Method Ce 12-16: Sterols and stanols in foods and dietary supplements containing added phytosterols. In M. W. Collison, (Ed.), Official methods and recommended practices of the AOCS (7th ed.). Urbana, IL: AOCS Press.
- Ahmed M, Akter MS, Lee J-C, Eun J-B. 2010. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology*. 43(9):1307–1312. doi:10.1016/j.lwt.2010.05.014
- Akhavan Mahdavi S, Jafari SM, Assadpoor E, Dehnad D. 2016. E. *Int J Biol Macromol*. 85:379–385. eng. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011.
- Briggs A. 1991. The story of the Leverhulme trust: For purposes of research and education. London: The Trust. 320 p. ISBN: 0123456789.
- Birchal V, Passos ML, Wildhagen G, Mujumdar A. 2005. Effect of Spray-Dryer Operating Variables on the Whole Milk Powder Quality. *Drying Tech*. 23(3):611–636. doi:10.1081/DRT-200054153.
- Barthold S, Hittinger M, Primavessy D, Zapp A, Groß H, Schneider M. 2019. Preparation of maltodextrin nanoparticles and encapsulation of bovine serum albumin - Influence of formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 142:405–410. eng. doi:10.1016/j.ejpb.2019.07.003
- Calvo P, Hernández T, Lozano M, González D. 2010. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 112(8):852–858. doi:10.1002/ejlt.201000059.
- Cao W-J, Ou S-Y, Lin W-F, Tang C-H. 2016. Food protein-based phytosterol nanoparticles: fabrication and characterization. *Food Funct*. 7(9):3973–3980. eng. doi:10.1039/c6fo00861e
- Caliskan G, Dirim SN. 2016. The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*. 287:308–314. doi:10.1016/j.powtec.2015.10.019.
- Comunian TA, Favaro-Trindade CS. 2016. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*. 61:442–457. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.06.003
- Castellanos IJ, Carrasquillo KG, López JDJ, Alvarez M, Griebenow K. 2001 Encapsulation of bovine serum albumin in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by the solid-in-oil-in-water technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53(2):167–178. doi:10.1211/0022357011775361

- Destailleur G, Vernailen P, Pluygers E. 1975. Utilisation des isotopes dans la mise au points des tumeurs malignes du sein [Use of isotopes in the diagnosis of malignant breast tumors]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 4 SUPPL 2:109–116. fre.
- Do Valle Calomeni, A., de Souza, V.B., Tulini, F.L., Thomazini, M., Ostroschi, L.C., de Alencar, S.M., Massarioli, A.P., de Carvalho Balieiro, J.C., de Carvalho, R.A., Favaro Trindade, C.S. 2017. Characterization of antioxidant and antimicrobial properties of spray-dried extracts from peanut skins. *Food Bioprod Process*. 105, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.001>
- HI CA, Constenla D, Ramírez Rigo MV, Piña J. 2017. Process analysis and global optimization for the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*. 321:55–65. doi: 10.1016/j.powtec.2017.08.008.
- Di Battista CA, Ramírez MV, Piña J. 2018. Microencapsulation of phytosterols by spray drying. En: Vol. 56. [sin lugar]: Elsevier. p. 437–468 (Studies in Natural Products Chemistry).
- Etorki AM, Gao M, Sadeghi R, Maldonado LF, Kokini JL. 2016. Effects of desolvating agent types, ratios, and temperature on size and nanostructure of nanoparticles from α -Lactalbumin and ovalbumin. *J Food Sci*. 81(10): E2511-E2520. eng. doi:10.1111/1750-3841.13447.
- Ferreira CD, da Conceição E JL, Machado BAS, Hermes VS, Oliveira Rios A de, Druzian JI, Nunes IL. 2016. Physicochemical characterization and oxidative stability of microencapsulated crude palm oil by spray drying. *Food bioprocess technol*. 9(1):124–136. doi:10.1007/s11947-015-1603-z.
- Goeckermann JA, Vigil EL. 1975. Peroxisome development in the metanephric kidney of mouse. *J Histochem cytochem*. 23(12):957–973. eng. doi:10.1177/23.12.440.
- Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40(9):1107–1121. doi: 10.1016/j.foodres.2007.07.004.
- Germershaus O, Lühmann T, Rybak J-C, Ritzler J, Meinel L. 2015. Application of natural and semi-synthetic polymers for the delivery of sensitive drugs. *International Materials Reviews*. 60(2):101–131. doi:10.1179/1743280414Y.0000000045.
- Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. 2005. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm*. 299(1-2):167–177. eng. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.014.
- Izadi Z, Nasirpour A, Garousi G. 2012. Optimization of phytosterols dispersion in an oil/water emulsion using mixture design approach. *Journal of dispersion science and technology*. 33(12):1715–1722. doi:10.1080/01932691.2011.646599.
- Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul*. 27(3):187–197. eng. doi:10.3109/02652040903131301
- Joye IJ, McClements DJ. 2014. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current opinion in colloid & interface science*. 19(5):417–427. doi: 10.1016/j.cocis.2014.07.002.

- Jesch ED, Carr TP. 2017. Food ingredients that inhibit cholesterol absorption. *Preventive nutrition and food science*. 22(2):67–80. eng. doi:10.3746/pnf.2017.22.2.67.
- Kha TC, Nguyen MH, Roach PD. 2010. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*. 98(3):385–392. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016.
- Labuza TP, Tsuyuki H, Karel M. Kinetics of linoleate oxidation in model systems. 1969. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1969;46(8):409–416. doi:10.1007/bf02545625
- Losse H. 1975. Treatment of renal hypertension. *Clin Nephrol*. 4(5):194–197. eng.
- Maneksha S, Harry TV. 1975. Lorazepam in sexual disorders. *Br J Clin Pract*. 29(7):175–176. eng.
- Leong W-F, Lai O-M, Long K, Che Man YB, Misran M, Tan C-P. 2011. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. *Food Chemistry*. 129(1):77–83. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.027.
- Modig J, Busch C, Waernbaum G. 1975. Effects of graded infusions of monomethylmethacrylate on coagulation, blood lipids, respiration, and circulation. An experimental study in dogs. *Clin Orthop Relat Res*. (113):187–197. eng. doi:10.1097/00003086-197511000-00030.
- Martín-Aragón S, Marcos E. 2008. Hipercolesterolemia y alimentos funcionales. *Nutrifarmacia*. 22. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-hipercolesterolemia-alimentos-funcionales-13117884>.
- Meng Y, Cloutier S. 2014. Gelatin and Other Proteins for Microencapsulation. En: *Microencapsulation in the Food Industry*. [sin lugar]: Elsevier. p. 227–239.
- Mishra P, Mishra S, Mahanta CL. 2014. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*. 92(3):252–258. doi: 10.1016/j.fbp.2013.08.003.
- Mba OI, Dumont M-J, Ngadi M. 2015. Palm oil: Processing, characterization, and utilization in the food industry – A review. *Food Bioscience*. 10:26–41. doi: 10.1016/j.fbio.2015.01.003.
- Mohammadi M, Jafari SM, Hamishehkar H, Ghanbarzadeh B. 2020. Phytosterols as the core or stabilizing agent in different nanocarriers. *Trends in food science & technology*. 101:73–88. doi: 10.1016/j.tifs.2020.05.004.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020 *Enfermedades Cardiovasculares*. Ginebra: editorial; https://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/
- Rossi L, Seijen ten Hoorn JWM, Melnikov SM, Velikov KP. 2010. Colloidal phytosterols: synthesis, characterization and bioaccessibility. *Soft Matter*. 6(5):928–936. doi:10.1039/b911371a.
- Ramos RMQ de, Siacor FDC, Taboada EB. 2020. Effect of maltodextrin content and inlet temperature on the powder qualities of spray-dried pineapple (*Ananas comosus*) waste extract. *waste biomass valor*. 11(7):3247–3255. doi:10.1007/s12649-019-00651-8.
- Semenova MG, Antipova AS, Belyakova LE. Food protein interactions in sugar solutions. 2002. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 7(5-6):438–444. doi:10.1016/s1359-0294(02)00079-1

- Sadeghi R, Moosavi AA, Emam Z, Kalbasi A, Razavi SH, Karimi M, Kokini J. 2014. The effect of different desolvating agents on BSA nanoparticle properties and encapsulation of curcumin. *J Nanopart Res.* 16(9):5906. doi:10.1007/s11051-014-2565-1.
- Sahoo N, Sahoo RK, Biswas N, Guha A, Kuotsu K. 2015. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int J Biol Macromol.* 81:317–331. eng. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.08.006.
- Sun S, Xiao Q-R, Wang Y, Jiang Y. 2018. Roles of alcohol desolvating agents on the size control of bovine serum albumin nanoparticles in drug delivery system. *Journal of drug delivery science and technology.* 47:193–199. doi: 10.1016/j.jddst.2018.07.018.
- Siacor FDC, Lim KJA, Cabajar AA, Lobarbio CFY, Lacks DJ, Taboada EB. 2020. Physicochemical properties of spray-dried mango phenolic compounds extracts. *Journal of Agriculture and Food Research.* 2:100048. doi: 10.1016/j.jafr.2020.100048..
- Thornton JA, Harrison MJ. 1975. Letter: Duration of action of AH8165. *Br J Anaesth.* 47(9):1033. eng. doi:10.1093/bja/47.9.1033.
- Tolve R, Condelli N, Can A, Tchuenbou FL. 2018. Development and characterization of phytosterol-enriched oil microcapsules for foodstuff application. *Food bioprocess technol.* 11(1):152–163. doi:10.1007/s11947-017-1990-4.
- Tolve R, Cela N, Condelli N, Di Cairano M, Caruso MC, Galgano F. 2020. Microencapsulation as a tool for the formulation of functional foods: The phytosterols' case study. *Foods.* 9(4). eng. doi:10.3390/foods9040470.
- Turasan H, Bonilla J, Bozkurt F, Maldonado L, Li X, Yilmaz T, Sadeghi R, Kokini J. 2020. Comparison of the fabrication methods, formation dynamics, structure, and delivery performance of solid nanoparticles and hollow layer-by-layer edible/biodegradable nanodelivery systems. *J Food Process Eng.* 43(5):582. doi:10.1111/jfpe.13413.
- Yang L, Cui F, Cun D, Tao A, Shi K, Lin W. 2007. Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles. *Int J Pharm.* 340(1-2):163–172. eng. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.03.028.
- Zepp EA, Thomas JA, Knotts GR. 1975. Some pharmacologic aspects of the antihistamines. A survey of current clinical applications. *Clin Pediatr (Phila).* 14(12):1119–1124. eng. doi:10.1177/000992287501401205.

7. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de actividad de agua.

Interacción	Probabilidad
Gelatina	0.144
Relación acetona: agua	0.001
Concentración de maltodextrina	0.005
Gelatina*relación acetona: agua	0.811
Gelatina*concentración de maltodextrina	0.229
Relación acetona: agua*concentración de maltodextrina	0.002
Relación acetona: agua*concentración de maltodextrina*gelatina	0.055
C.V. (%)	17.018
R2	0.700

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje.

Anexo 2 Análisis de varianza para porcentaje de solubilidad (%) en agua.

Interacción	Probabilidad
Gelatina	0.012
Relación acetona: agua	0.235
Concentración de maltodextrina	<.0001
Gelatina*Relación acetona: agua	0.494
Gelatina*Concentración de maltodextrina	0.045
Relación acetona: agua*Concentración de maltodextrina	0.251
Relación acetona: agua*Concentración de maltodextrina*Gelatina	0.502
C.V. (%)	3.663
R2	0.755

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje.

Anexo 3. Análisis de varianza para tamaño de partícula.

Interacción	Probabilidad
Maltodextrina	0.078
Gelatina	0.007
Relación acetona:agua	<.0001
Concentración de maltodextrina*gelatina	0.759
Concentración de maltodextrina*relación acetona:agua	0.429
Gelatina*relación acetona: agua	0.034
Concentración de maltodextrina*gelatina*relación acetona: agua	0.152
C.V. (%)	10.160
R2	0.552

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje.

Anexo 4. Análisis de varianza para capacidad de carga

Interacción	Probabilidad
Relación acetona: agua	0.120
Concentración de maltodextrina	<.0001
Relación acetona: agua*concentración de maltodextrina	0.180
C.V. (%)	6.150
R2	0.950

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje.

Anexo 5. Análisis de varianza para eficiencia de encapsulación.

Interacción	Probabilidad
Relación acetona: agua	0.036
Concentración de maltodextrina	0.030
Relación acetona: agua*concentración de maltodextrina	0.688
C.V. (%)	4.630
R2	0.671

C.V. (%) = Coeficiente de variación en porcentaje.