

**Evaluación de la relación etanol:agua y porcentaje de maltodextrina en las propiedades físico-químicas de fitoesteroles de palma (*Elaeis guineensis*) microencapsulados con gelatina**

**Arnoldo Jahir Pérez Valladares**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Noviembre, 2020

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Evaluación de la relación etanol:agua y porcentaje de maltodextrina en las propiedades físico-químicas de fitoesteroles de palma (*Elaeis guineensis*) microencapsulados con gelatina**

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:

**Arnoldo Jahir Pérez Valladares**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2020

# Evaluación de la relación etanol:agua y porcentaje de maltodextrina en las propiedades físico-químicas de fitoesteroles de palma (*Elaeis guineensis*) microencapsulados con gelatina

Arnoldo Jahir Perez Valladares

**Resumen.** Los alimentos nutraceuticos son de vital importancia como alternativa al control de las enfermedades no transmisibles (ENT), particularmente la colesterolemia. Los fitoesteroles son un excelente competidor contra el colesterol LDL, se recomienda un consumo entre 1 a 2 g diarios, aunque esto representa un desafío para su incorporación en alimentos debido a su insolubilidad acuosa. Este estudio evaluó el efecto de diferentes relaciones etanol:agua y porcentajes de maltodextrina en las propiedades físico-químicas de fitoesteroles de palma microencapsulados con gelatina. Se utilizaron tres relaciones etanol:agua (2:1, 3:1 y 4:1 v/v), dos porcentajes de maltodextrina (5 y 10% p/v) y concentración de gelatina constante (30 mg/mL). Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial  $3 \times 2$  con tres repeticiones, una separación de medias ajustadas (LSMEANS) para la interacción de los niveles de los factores y una prueba Duncan para comparar las medias de los factores con un nivel de significancia de 95%. Se evaluó la solubilidad, actividad de agua, tamaño de partícula y morfología, capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. Se obtuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en solubilidad, siendo mayor los tratamientos con 10% maltodextrina. La actividad de agua no presentó diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). El rango de tamaño de partículas encontrado fue de 40 a 100  $\mu\text{m}$ , con formas homogéneas, circulares y ovaladas. La capacidad de carga fue mayor con 5% maltodextrina y la eficiencia de encapsulación fue menor con el mismo porcentaje. Se incrementó la solubilidad acuosa de los fitoesteroles al microencapsularlos con gelatina y maltodextrina.

**Palabras clave:** Alimentos nutraceuticos, capacidad de carga, eficiencia de encapsulación.

**Abstract.** Nutraceutical foods are of vital importance as an alternative to the control of non-communicable diseases (NCDs), particularly cholesterolemia. Phytosterols are an excellent competitor against LDL cholesterol and a consumption between 1 to 2 g daily is recommended, although, this represents a challenge for its incorporation into food due to its aqueous insolubility. This study evaluated the effect of different ethanol:water ratios and maltodextrin percentages on the physicochemical properties of palm phytosterols microencapsulated with gelatin. Three ethanol:water ratios were used (2:1, 3:1 and 4:1 v/v), two encapsulating materials, with percentages of maltodextrin (5 and 10% w/v) and constant gelatin concentration (30 mg/mL). A Completely Randomized Design was used with a  $3 \times 2$  factorial arrangement with three replicates, adjusted means separation (LSMEANS) was used for the interaction of the factor levels and a Duncan test to compare the means of the factors with a significance level of 95%. Solubility, water activity, particle size and morphology, loading capacity and encapsulation efficiency were evaluated. Significant differences ( $P \leq 0.05$ ) were obtained for solubility; the treatments with 10% maltodextrin being greater. The water activity did not show significant differences ( $P \geq 0.05$ ). The particle size range found was between 40 and 100  $\mu\text{m}$ , with homogeneous, circular, and oval shape particles. The loading capacity was higher for the treatments with 5% maltodextrin and the encapsulation efficiency was lower with the same percentage. The aqueous solubility of phytosterols was increased by microencapsulating them with gelatin and maltodextrin.

**Key words:** Nutraceutical foods, loading capacity, encapsulation efficiency.

## ÍNDICE GENERAL

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen .....	iii
Contenido .....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>18</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>19</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Niveles del factor relación etanol:agua y porcentaje de maltodextrina a evaluar en la microencapsulación de fitoesteroles con gelatina y maltodextrina. ....	5
2. Condiciones de operación del secador por aspersión LabPlant SD – Basic.....	5
3. Condiciones de operación de cromatógrafo de gases Agilant 6890 Serie GC System, para análisis de fitoesteroles. ....	7
4. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en la actividad de agua promedio de los tratamientos de microencapsulado. ....	10
5. Probabilidad de los factores y su interacción para la actividad de agua.....	10
6. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en el tamaño de partículas promedio de los tratamientos de microencapsulado. ....	11
7. Probabilidad de los factores y su interacción para el tamaño de partícula. ....	11
8. Resultado de la relación etanol:agua en el tamaño de partículas promedio de los tratamientos de microencapsulado.....	13
9. Resultado del porcentaje de maltodextrina en el tamaño de partículas promedio de los tratamientos de microencapsulado.....	13
10. Probabilidad de los factores y su interacción para el porcentaje de solubilidad. ....	14
11. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en de la solubilidad promedio de los tratamientos de microencapsulado. ....	14
12. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de las microcápsulas con fitoesteroles. ....	15

Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la microencapsulación de fitoesteroles con gelatina, a diferentes relaciones etanol:agua y porcentaje de maltodextrina.....	4
2. Tamaño y morfología de microcápsulas de fitoesteroles. A) 5% MD, 4:1 RLC, B) 10% MD, 4:1 RLC. Donde MD: Maltodextrina y RLC: Relación etanol:agua. ....	12

Anexos	Página
1. Tratamientos preliminares.....	23
2. Preliminar relación 1:1 precipitado y relación 2:1. ....	23
3. Preliminares con menos precipitado, relaciones 2:1, 3:1 y 4:1 etanol:agua. ....	23
4. Controles fitoesteroles disueltos en tres relaciones etanol:agua, A) 2:1 RLC, B) 3:1 RLC, C) 4:1 RLC, donde RLC: Relación etanol:agua. ....	24

Anexos	Página
5. Morfología y tamaño por tratamiento A) 5% MD, 2:1 RLC, B) 5% MD, 3:1 RLC, C) 5% MD, 4:1 RLC, D) 10% MD, 2:1 RLC, E) 10% MD, 3:1 RLC, F) 10% MD, 4:1 RLC. Donde MD: Maltodextrina y RLC: Relación etanol:agua.....	24
6. Cromatograma del perfil de fitoesteroles usado para determinar la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.....	25
7. Tiempos de retención y concentración de esteroles y estanoles encontrados antes de la microencapsulación.....	25
8. Tiempos de retención y concentración de esteroles y estanoles encontrados después de la microencapsulación.....	26

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT), son la principal razón de muertes al rededor del mundo; de ellas destacan las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, problemas respiratorios y la diabetes (OMS 2016). El continente americano actualmente posee una tasa de mortalidad por ENT de 81%, de los cuales un 39% de las muertes son personas menores de 70 años (OPS 2019b). Las muertes por enfermedades cardiovasculares representan un 28.1% por cada 100,000 habitantes, muchos de los casos son muertes prematuras (OPS 2019a). Una alternativa para reducción de hipercolesterolemia es el consumo de Fitoesteroles, declarados como alimentos GRAS (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés) y con propiedades contra enfermedades coronarias (FDA 2003). Se recomienda un consumo diario de 2 g, para reducir el colesterol LDL (Low Density Lipoproteins) en aproximadamente 10% (Cabral y Karimi 2017). La absorción del colesterol y fitoesteroles tiene lugar en los enterocitos, específicamente a través de la proteína transportadora Nieman Pick tipo C1, presentes en el lumen del intestino (Yoo 2016). Por ser de origen vegetal, la absorción de fitoesteroles es insignificante y de fácil excreción por el organismo (Izar *et al.* 2011). Resultados anticancerígenos y antitumorales se atribuyen a dietas con consumo de fitoesteroles. Específicamente, el consumo de  $\beta$ -sitosterol y estigmaesterol reducen un 20% el riesgo de padecer cáncer de estómago y de ovario (Shahzad *et al.* 2017).

La insolubilidad de los fitoesteroles en agua está determinada por un peso aproximado de 60% esterol y 40% ácidos grasos, lo que los hace solubles en compuestos no polares (FAO 2008). Una de las técnicas para incorporar los fitoesteroles a los alimentos, es a través de la microencapsulación. En éste proceso se recubre un compuesto de interés con uno o más materiales pared y de esta forma se concentra en pequeñas partículas (Tolve *et al.* 2016). La microencapsulación evita la oxidación de los fitoesteroles y se promueve una mayor solubilidad en la matriz alimentaria. Existen varios factores a considerar para la microencapsulación de fitoesteroles, tales como el material y la técnica de encapsulación (Rossi *et al.* 2010). Tradicionalmente, los fitoesteroles se han adicionado a productos como grasas y aceites, limitando así su consumo, en personas con colesterolemia (Di Battista *et al.* 2018). De allí la importancia de disolver los fitoesteroles en un compuesto orgánico; como etanol, acetona, hexano y metanol. La elección de este compuesto orgánico dependerá de las características deseadas (tamaño, morfología, etc.), costo y si es de grado alimenticio. El material encapsulante debe ser un excelente estabilizador, una opción son las proteínas que naturalmente forman matrices coloidales en agua, mejorando así la dispersión de otros compuestos como los fitoesteroles (Cao *et al.* 2016).

La gelatina es una proteína con muchas propiedades y aplicaciones en la industria de alimentos, según Comunian *et al.* (2017), su uso no tiene efectos negativos significativos en las propiedades fisicoquímicas, reológicas, ni sensoriales en el yogur fortificado con fitoesteroles. Mondal (2019) encontró que la asociación de gelatina y polisacáridos como celulosa, brindan un aumento del 50% en la capacidad de almacenamiento de estructura formada. Para provocar cambios en la estructura de las proteínas Etorki *et al.* (2016), demostraron que con concentraciones de 50 a 99% de etanol, las proteínas adoptan nuevas formas, dando lugar a oportunidades de encapsulación. Paulo y Santos (2017), obtuvieron los mejores resultados en eficiencia de encapsulación de Aciclovir (~70%) al usar gelatina en su estudio.

La maltodextrina es un producto derivado de la hidrólisis de almidones, se caracteriza por ser económico, usado para aumentar concentración de sólidos, no tóxico, no aporta sabores ni olores y como encapsulante brinda protección contra la oxidación. La maltodextrina posee propiedades hidrofílicas que favorecen en solubilidad en alimentos (Gutiérrez *et al.* 2015). La maltodextrina también favorece la solubilidad de la gelatina y aumenta los rendimientos en secado por aspersión (Chuaychan y Benjakul 2016). El proceso de deshidratado de las microcápsulas puede realizarse por diversas vías, entre las más comunes se pueden mencionar; liofilización y secado por aspersión, siendo este último muy efectivo en la calidad de microcápsulas (Chen *et al.* 2013).

Existen diversos métodos de microencapsulación, para este estudio, el de interés es “Flash desolvantation”, una técnica para microencapsulación, que provoca un cambio estructural en la proteína que rodea al núcleo de interés (Sadeghi *et al.* 2014). De acuerdo con lo encontrado por Dias *et al.* (2015), varios tipos de proteínas y derivados del almidón son usados para la microencapsulación. Akhavan *et al.* (2016), en su estudio encontraron una mayor eficiencia de encapsulado de antocianinas al usar proteína y maltodextrina, que sólo la maltodextrina como material pared.

Este estudio se realizó con el propósito de combinar diferentes relaciones de etanol:agua, gelatina y diferentes porcentajes de maltodextrina, así como evaluar su efecto en el proceso de microencapsulación de fitoesteres. Para mejorar la solubilidad de los fitoesteres que, al ser muy baja en alimentos acuosos, es necesario la búsqueda de soluciones para su posterior uso en alimentos. Las relaciones etanol:agua y materiales encapsulantes pueden mejorar la solubilidad, por ende, la biocompatibilidad y biodigestibilidad de los fitoesteres. Así mismo, al realizar un deshidratado sobre los encapsulados, principalmente usando métodos como secado por aspersión, el cual, puede ser fácilmente trasladado a niveles de producción de escala industrial.

La presente investigación tuvo por objetivos:

- Evaluar el efecto de la relación etanol:agua y porcentaje de maltodextrina sobre el tamaño de partícula, actividad de agua y solubilidad.
- Determinar el tamaño y morfología de las microcápsulas con fitoesteres.
- Medir la influencia de la concentración de maltodextrina sobre la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del estudio

El estudio tuvo lugar en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ) donde se realizaron los análisis físicos y químicos. El deshidratado de las muestras, se realizó en la Planta de Innovación de Alimentos (PIA). El análisis de tamaño y morfología de las microcápsulas se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano ubicado a 30 km de la carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle de Yeguare, San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

### Materiales

Fitoesteroles de Palma (BIOSA®, Honduras), Gelatina B 275 Bloom (Gelnex®, Brasil), Maltodextrina (DE 10-15, Shandong Bangye Co Ltd, Shandong, China), Etanol EMSURE® (99%, UN1170, Alemania) y agua desionizada.

### Fase preliminar

Esta etapa consistió en una serie de pruebas para determinar la relación etanol:agua con mejor eficiencia de encapsulado. Las relaciones evaluadas fueron de 1:1, 2:1, 3:1, y 4:1 (v/v), de las cuales, se escogieron en las que se observó menos precipitación y las que se mantuvieron por más tiempo sin separación de fases. Para la fase acuosa se usó proteína gelatina como material encapsulante, la cual se preparó a concentraciones de 5 a 30 mg/mL (en intervalos de 5 mg/mL), disuelta en 10 mL de agua desionizada. La concentración de fitoesteroles se mantuvo igual en todas las unidades experimentales en una relación 2:1 (dos partes proteína:una de fitoesteroles). Los fitoesteroles fueron disueltos en etanol al 99%, dependiendo de la relación (20, 30 y 40 mL respectivamente).

Se comprobó que la mejor forma de preparar la microencapsulación es al agregar la solución orgánica a la acuosa. La elaboración de los tratamientos de microencapsulación se detalla en la Figura 1.

### Elaboración de los tratamientos

**Preparación de la fase orgánica.** Esta etapa consistió en la mezcla de fitoesteroles disueltos en etanol al 99%. La cantidad de fitoesteroles dependió de la cantidad de proteína y está a la vez de la relación etanol:agua (Cuadro 1). Para todos los tratamientos se aseguró que la relación entre proteína y fitoesteroles se mantuviera en 2:1 (p/p). La preparación se realizó en un matraz de 1,500 mL, a la que se agregó los fitoesteroles previamente pesados. Se adicionó la cantidad de etanol según cada relación, se mezclaron y calentaron en una plancha por 20 min, con agitación de 700 rpm y nivel 7 de temperatura, hasta su completa disolución.

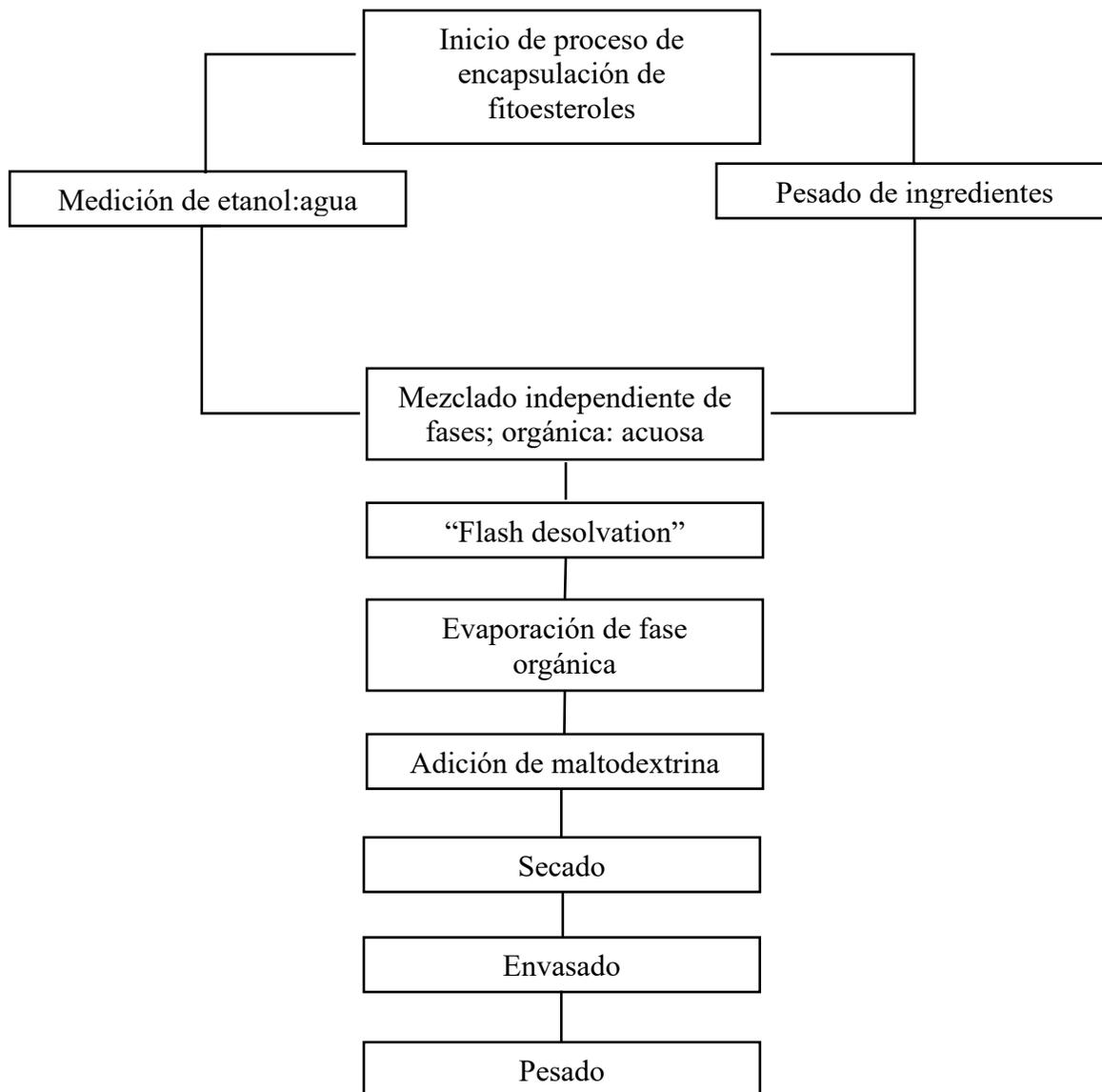


Figura 1. Flujo de proceso para la microencapsulación de fitoesteroles con gelatina, a diferentes relaciones etanol:agua y porcentaje de maltodextrina.

**Preparación de la fase acuosa.** La fase acuosa consistió en la dilución de gelatina (proteína) en 350 mL agua desionizada (cantidad constante en todos los tratamientos). Para ello, se pesó la gelatina para cada tratamiento, se depositaron en matraces de 2,000 mL y se mezclaron con el agua. Se sometió a mezclado (700 rpm) y temperatura (Nivel 6) en una plancha, hasta que se disolvió la gelatina completamente. Se dejó en enfriamiento a temperatura ambiente para su posterior mezclado con la fase orgánica.

Cuadro 1. Niveles del factor relación etanol:agua y porcentaje de maltodextrina a evaluar en la microencapsulación de fitoesteroles con gelatina y maltodextrina.

Tratamientos	Descripción de los niveles de la relación etanol:agua		Descripción de los niveles porcentaje de maltodextrina (%)
	Etanol	Agua	
1			5
2	2	1	10
3			5
4	3	1	10
5			5
6	4	1	10

**Preparación de la microencapsulación de fitoesteroles.** La fase orgánica (fitoesteroles disueltos en etanol) se mantuvo en movimiento en la plancha magnética y se le agregó la fase acuosa (gelatina disuelta en agua), con el método “Flash desolvation” (Wang *et al.* 2018). Posteriormente, se evaporó el etanol de cada muestra en un “rotoevaporador” (BÜCHI, modelo R-100, Suiza). Los parámetros usados para el evaporado fueron: temperatura del baño María 60 °C, temperatura del refrigerante 10 °C, vacío 175 mbar y 400 rpm. Una vez se evaporó el etanol, y solo estaba presente la fase acuosa con los fitoesteroles encapsulados, se adicionó la maltodextrina de acuerdo con el porcentaje para cada tratamiento. La muestra se colocó en matraces de 400 mL para su posterior deshidratado en el secador por aspersión.

**Deshidratado por aspersión.** El deshidratado se realizó en un secador por aspersión (LabPlant SD-Basic, UK), bajo las condiciones de operación detalladas en el Cuadro 2. La muestra se colocó en un matraz de 400 mL, en el cual se introdujo la manguera de absorción. Seguidamente se encendió la bomba peristáltica del deshidratador, la cual absorbió la muestra y la llevó al inyector donde la muestra se atomizó, por medio de aire comprimido a la cámara de deshidratado. En la cámara, las gotas atomizadas de la solución entraron en contacto con el aire caliente, produciendo una rápida reducción del contenido de agua y formando partículas secas de la muestra. Las partículas sólidas fueron arrastradas y depositadas en el frasco portador de la muestra. Se extrajo la muestra seca para envasado (Ziploc®) y pesado.

Cuadro 2. Condiciones de operación del secador por aspersión LabPlant SD – Basic.

Condiciones de uso	Parámetro
Temperatura de entrada	150 °C
Temperatura de salida	90 °C
Velocidad de bomba peristáltica	60 rpm
Presión de aire	300 kPa

## Análisis físicos y químicos

**Actividad de agua.** Se realizó la medición de la actividad de agua a través del método de la AOAC 978.18 con el uso de un Aqualab Serie 3 (Decagon Devices WA, USA). Para ello se puso la muestra en las copas plásticas del equipo, con nivel hasta la mitad. Se dejó la muestra en el equipo hasta que se alcanzó el equilibrio indicado con la luz de aparato y se procedió a registrar la lectura de la actividad de agua.

**Tamaño y morfología de partículas.** Las partículas fueron medidas en escala de 100  $\mu\text{m}$ , para lo cual se usó un microscopio invertido marca Mshot MI11, con aumento de 400x. Para la captura de imágenes se usó una cámara Dino-Eye AM-423X. La medición de las imágenes se realizó con el programa Dino Capture 2.0 versión 2.0 con escala en micrómetros.

**Solubilidad.** Brevemente, se pesaron 2 g de muestra en tubos de ensayo de centrifugación, y se agregaron 24 mL de agua desionizada. Se agitaron a 2,500 rpm por 5 min, en un Vortex (Fisherbrand, EEUU). Luego se llevaron a baño María a 30 °C por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 min. Se extrajo el sobrenadante, el cual se colocó en un plato Petri y se llevó al horno a 105 °C por 24 horas. Para determinar el porcentaje de solubilidad se usó la Ecuación 1.

$$\% \text{ Porcentaje de solubilidad} = \frac{P_i - \text{PMI}}{P_i} * 100 \quad [1]$$

Donde:

$P_i$  = Peso inicial.

PMI = Peso del material insoluble.

**Análisis de fitoesteroides.** La medición del perfil y cuantificación de fitoesteroides encapsulados se realizó en un cromatógrafo de gases (CG) (Agilent 6890 Serie GC System, USA), el cual posee un software CG ChemStation 2010, y haciendo uso del método de la AOCS Ce 12-16. Se preparó una solución estándar interno (IS) con Epicoprostanol, 5 $\beta$ -colestano-3 $\alpha$ -01 (5 mg/mL) disuelto en tolueno.

Para cada uno de los tratamientos se pesó 1 g de muestra, la cual se derivatizó con BSTFA al 1% (N, O-Bistrifluoroacetamida). Se colocó la muestra en un matraz de 50 mL, se agregó 5 mL del estándar interno, se colocaron tres perlas de cristal y 5 mL de HCl a 3 N. Posteriormente se colocó la muestra en un condensador de reflujo y con una plancha se calentó hasta 100 °C por 45 min, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 min. Una vez la muestra estaba fría, se realizó el primer lavado con una solución saturada de sal (NaCl), se agregó la solución saturada hasta el cuello del matraz, se agitó por 3 min y se dejó en reposo 2 min. Luego se retiró la fase orgánica, se colocó en otro matraz de 50 mL, al cual se agregó 5 mL de NaOH metanólico a 3 N y 3 perlas de cristal. Se colocó nuevamente en el condensador de reflujo, se calentó a 100 °C por 15 min; pasado el tiempo se dejó en enfriamiento por 20 min y se realizó el segundo lavado con NaCl. Para la derivatización de los fitoesteroides, se extrajeron 300  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica, los cuales se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  de Piridina, 500  $\mu\text{L}$  de BSTFA al 1% (N, O-Bistrifluoroacetamida), 0.001 g de sulfato de sodio y se colocaron en un vial de 1.5 mL. Luego, los viales se centrifugaron (VWR, Symphony 4417R, Alemania) a 6,000 rpm por 2 min. Finalmente, se analizó cada muestra en el cromatógrafo de gases. Las condiciones de operación del CG se detallan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de operación de cromatógrafo de gases Agilent 6890 Serie GC System, para análisis de fitoesteroles.

Módulos	Parámetros
Gases de arrastre	Hidrógeno
Columna	SP - 30 m x 0.320 mm x 0.25 μm
Horno	Temperatura inicial 55 °C, tiempo 3 minutos Temperatura final 120 °C., tiempo 2 minutos Velocidad de calentador 20 °C/min
Detector (FID)	Temperatura 250 °C Presión del aire 450 mL/min Presión del hidrógeno 40.0 mL/min
Inyector (Split)	Temperatura 175 °C Split radio 80.0 Velocidad lineal 39 cm/s
Duración del método	8.25 min
Volumen de inyección	1.0 μL
Patrones	Etanol

**Eficiencia de encapsulación.** La eficiencia de encapsulación se analizó con el contenido real y el contenido teórico de fitoesteroles microencapsulados, cuantificados por medio de la cromatografía de gases, para ello se usó la Ecuación 2 (Araújo *et al.* 2020).

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulado} = \left( \frac{CR}{CT * P} * 100 \right) \quad [2]$$

Donde:

CR = Cantidad real de fitoesteroles encapsulados, mg.

CT = Cantidad teórica de fitoesteroles encapsulados, mg.

P = Pureza de fitoesteroles

**Capacidad de carga.** Para determinar la capacidad de carga, se dividió la cantidad de fitoesteroles encapsulados (mg) por la cantidad de muestra usada para la cromatografía de gases (1 g) por medio de la ecuación 3, con alguna modificaciones (Zhang *et al.* 2017).

$$\text{Capacidad de carga} = \frac{(FR)}{(M)} \quad [3]$$

Donde:

FR = Fitoesteroles recuperados por cromatografía de gases, mg.

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

**Análisis estadístico.** Para la fase 1, se evaluaron los parámetros de solubilidad en agua, actividad de agua, tamaño y morfología de las partículas. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 3×2; utilizando tres niveles de relación etanol:agua (2:1, 3:1 y 4:1 v/v), y el factor porcentaje de maltodextrina de 5 y 10% (p/v). Representando lo anterior 6 tratamientos con tres repeticiones por cada tratamiento y un total de diez y ocho unidades

experimentales. Para el análisis de los datos se utilizó el “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.4) con una separación de medias ajustadas (LSMEANS) para la interacción de los niveles de los factores, y una prueba Duncan para comparar las medias de los factores con un nivel de significancia de 95%. En la fase 2 se evaluó la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. Se analizaron los datos por medio de una Prueba T-student con el programa “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.4).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Fase preliminar

Durante la fase preliminar se determinó las mejores relaciones etanol:agua, 2:1, 3:1 y 4:1, por ser la que menos precipitación presentaron y se mantuvieron por más tiempo sin separación de fases. Descartando la relación 1:1 y 5:1, ya que presentaron mayor porcentaje de precipitación. Se determinó una relación (p/p) 2:1 para gelatina y fitoesteres, es decir dos partes de gelatina respecto a una de fitoesteres. La concentración de gelatina se mantuvo constante en todos los tratamientos (30 mg/mL, disueltos en agua desionizada).

Durante el proceso de microencapsulación de fitoesteres, se observó que el proceso de “Flash desolvation” fue un buen método por ser rápido y sencillo. El proceso de “Flash desolvation” resultó en una mayor tasa de nucleación en la microencapsulación, provocando una sobresaturación en la mezcla, reflejado en más sitios de nucleación y en menor tamaño de partícula (Pustulka *et al.* 2013). Según Levit *et al.* (2019), esta técnica es eficiente y con ella se puede obtener una eficiencia de encapsulación de proteína de ~80%.

El deshidratado se realizó con una concentración preliminar de 30% de maltodextrina y se obtuvo una capacidad de carga de 36.45 mg/g. Debido a esto, se determinaron dos concentraciones de maltodextrina de 5 y 10%, lo que se reflejó en el aumento de la capacidad de carga, con menor porcentaje de maltodextrina, menos del 50% de maltodextrina recomendado para microencapsulación (Miller *et al.* 2016).

#### Fase 1. Análisis físicos y químicos

**Actividad de agua.** No se presentó diferencias estadísticas significativas en la actividad de agua de los tratamientos, es decir que las relaciones etanol:agua y entre porcentajes de maltodextrina no tuvieron efecto alguno sobre la actividad de agua (Cuadro 4). Así mismo, no se encontró interacción alguna entre los factores (Cuadro 5).

La maltodextrina juega un papel clave en la actividad de agua. En estudios anteriores se ha reportado que a mayor porcentaje de maltodextrina, mayor es la higroscopicidad (Vimala *et al.* 2018). En cambio Chuaychan y Benjakul (2016), mencionaron que tanto la maltodextrina como la gelatina poseen propiedades higroscópicas. Los grupos aminos y carboxilos de las proteínas les permiten interactuar y pueden atrapar humedad del ambiente. Así mismo, el no controlar las condiciones de manejo de las muestras deshidratadas, se refleja en mayor actividad de agua, esto debido a las propiedades higroscópicas de la maltodextrina. Santhalakshmy *et al.* (2015) por medio de su estudio concluyeron que el mayor redimiento de polvo y más baja actividad de agua lo obtuvieron usando 150 °C como temperatura de entrada en el secador por aspersión, respecto a 140, 145, 155 y 160 °C. En el estudio de Hussain *et al.* (2018), el deshidratado fue realizado por liofilización, y encontraron diferencias en la actividad de agua entre los tratamientos con 5 y 10% de maltodextrina, y los valores oscilaban entre 0.31 a 0.45.

En el presente estudio, el rango de actividad de agua entre los tratamientos osciló entre 0.18 y 0.23 (Cuadro 4), esto podría estar relacionado por el método de deshidratado utilizado. Estos bajos valores de actividad de agua están relacionados con la estabilidad química y microbiológica de los tratamientos evaluados (Gutiérrez *et al.* 2015). Dichos valores de actividad de agua coinciden con los reportados por Araújo *et al.* (2020), quienes obtuvieron valores de 0.215 al usar capas de gelatina y maltodextrina para encapsular aceite de naranja dulce en deshidratado por aspersión. Mis *et al.* (2016), en su estudio sobre microencapsulación de aceite de salmón con clara de huevo en polvo, obtuvo mayor actividad de agua a 130 °C de temperatura de entrada en el secador por aspersión, además, reportó diferencias estadísticas con menor actividad de agua a temperaturas de 140 y 150 °C. Los parámetros de deshidratado en el presente estudio se mantuvieron constantes para todos los tratamientos.

Cuadro 4. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en la actividad de agua promedio de los tratamientos de microencapsulado.

<b>Relación Etanol:agua</b>	<b>Maltodextrina (%)</b>	<b>Actividad de agua Media ± D.E. <sup>ns</sup></b>
2:1	5	0.18 ± 0.04
	10	0.23 ± 0.04
3:1	5	0.18 ± 0.03
	10	0.21 ± 0.04
4:1	5	0.18 ± 0.03
	10	0.20 ± 0.07
C.V. (%)		18.05

Cada medición de la actividad de agua representa la media de tres repeticiones. C.V.: Coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: Desviación estándar. ns: no significativo ( $P \geq 0.05$ )

Cuadro 5. Probabilidad de los factores y su interacción para la actividad de agua.

<b>Variable</b>	<b>Valor-p</b>
Relación	0.2168
Maltodextrina	0.1082
Relación*Maltodextrina	0.1513
C.V. (%)	18.05

C.V.: Coeficiente de variación.

**Tamaño de partícula.** Según los resultados obtenidos, los tratamientos con menor tamaño de partícula fueron los que se prepararon con menor porcentaje de maltodextrina (5%), y fueron los que presentaron menor cantidad de agregados. También se observó que el tamaño de la partícula dependió de la relación etanol:agua. Se obtuvieron tamaños pequeños con mayor cantidad de etanol, usando 5% de maltodextrina (~40  $\mu\text{m}$ ) y en los tratamientos con 10% de maltodextrina, tamaños grandes con menor relación etanol:agua (Cuadro 6). Las interacciones evaluadas presentaron diferencias estadísticas significativas, respecto al tamaño de partícula. De acuerdo con el análisis de medias (LSMEANS), si hubo interacción entre los factores (Cuadro 7). Cuatro de los

tratamientos presentaron diferencia estadística entre sí, a excepción de los tratamientos con 10% de maltodextrina y con relaciones 3:1 y 4:1 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en el tamaño de partículas promedio de los tratamientos de microencapsulado.

<b>Relación Etanol:agua</b>	<b>Maltodextrina (%)</b>	<b>Tamaño (µm) Media ± D.E.</b>
2:1	5	40.56 ± 4.83 <sup>e</sup>
	10	97.92 ± 8.75 <sup>a</sup>
3:1	5	48.44 ± 6.03 <sup>d</sup>
	10	87.21 ± 9.17 <sup>b</sup>
4:1	5	56.49 ± 5.25 <sup>c</sup>
	10	89.91 ± 9.64 <sup>b</sup>
C.V. (%)		10.75

Cada tamaño de partícula representa la media de tres repeticiones. C.V.: Coeficiente de variación en porcentaje.

D.E.: Desviación estándar.

<sup>a-e</sup>: Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) en tamaño de partículas de los tratamientos.

Cuadro 7. Probabilidad de los factores y su interacción para el tamaño de partícula.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor -p</b>
Maltodextrina	<0.0001
Relación	0.0200
Maltodextrina*Relación	<0.0001
C.V. (%)	10.75

C.V.: Coeficiente de variación

Las condiciones de secados fueron constantes, las diferencias obtenidas dependen la composición de cada tratamiento. Las formas de las partículas observadas en su mayoría eran esféricas y ovaladas, con rangos de tamaños entre 40 a 100 µm (Figura 2). Confirmando así la categoría de micropartículas (1- 800 µm), considerando que este estudio no implementó la homogenización de las partículas (Ruiz *et al.* 2019). Estos resultados concuerdan con los de Mehanna *et al.* (2019), que obtuvieron partículas más esféricas y con superficie lisa al usar maltodextrina, contrario a las partículas encapsuladas con manitol. Es importante recalcar que, en esta investigación, la temperatura de entrada del secador por aspersión fue constante para todos los tratamientos (150 °C), por lo que se descarta su efecto en el tamaño de partícula. En un estudio realizado por Mis *et al.* (2016), encontraron una dependencia del tamaño de partícula con la temperatura, obteniendo mayores tamaños de partícula a 150 °C, respecto a 130 y 140 °C. Luque *et al.* (2016), demostraron que a mayor relación de no solvente:solvente el tamaño de partícula es menor.

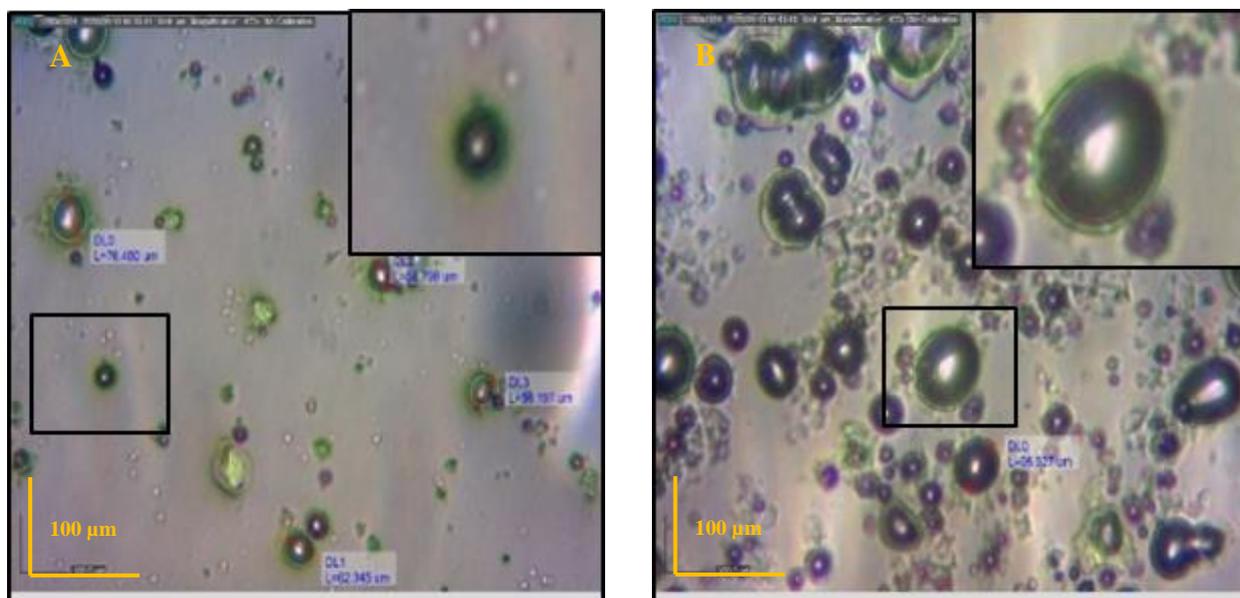


Figura 2. Tamaño y morfología de microcápsulas de fitoesteroles. A) 5% MD, 4:1 RLC, B) 10% MD, 4:1 RLC. Donde MD: Maltodextrina y RLC: Relación etanol:agua.

La relación etanol:agua presentó un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, sin embargo, en la interacción de ambos factores (Cuadro 8), la maltodextrina, tuvo la significancia mayor en el tamaño de partícula. De acuerdo con Etorki *et al.* (2016), con altas concentraciones de compuesto orgánico (>50%), las proteínas tiende a plegarse, generando así partículas de menor tamaño. Gullapalli y Mazzitelli (2017) mencionaron que el etanol es un inhibidor de la formación de triple hélices de la gelatina. El aumento de la concentración de etanol se refleja por ende en mayor inhibición y por lo tanto en menor tamaño de partícula. Los resultados de este estudio concuerdan con Ahsan y Rao (2017), que demostraron que el tamaño de partícula de encapsulado usando gelatina, aumenta al usar mayor concentración de compuesto orgánico, generando mayor agregación de partículas.

El efecto estérico es un factor a considerar en la evaluación de las relaciones etanol:agua, ya que tiene un efecto directo en los grupos funcionales de las proteínas (Israelachvili 2011). En otras palabras, el aumento del volumen tiene efecto en el grosor y la polaridad de la capa de las microcápsulas, debido al aumento o disminución de las fuerzas de atracción (McClements 2015). Se pudo observar que, a mayor volumen menor tamaño de partícula. El Cuadro 8, representa la prueba de medias DUNCAN de relaciones de etanol:agua, observando que el mayor tamaño se obtuvo con la menor relación de etanol. El tamaño promedio de la relación 2:1 se vio influenciada por la media de los tratamientos con 10% de maltodextrina, que presentaron mayor tamaño respecto a los tratamientos con 5% de maltodextrina, datos que no concuerdan con lo anteriormente mencionado.

Cuadro 8. Resultado de la relación etanol:agua en el tamaño de partículas promedio de los tratamientos de microencapsulado.

<b>Relación Etanol: agua</b>	<b>Tamaño (µm) Media ± D.E.</b>
2:1	67.83 ± 6.79 <sup>b</sup>
3:1	69.24 ± 7.60 <sup>b</sup>
4:1	73.20 ± 7.44 <sup>a</sup>
C.V. (%)	10.75

Cada tamaño de partícula representa la media de los tratamientos de cada relación etanol:agua. C.V.: Coeficiente de variación. D.E.: Desviación estándar.

<sup>a-b</sup>: Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) en tamaño de partículas, según la relación etanol:agua de cada tratamiento.

Para evaluar la influencia del porcentaje de maltodextrina en el tamaño de partícula se realizó una separación de medias Duncan (Cuadro 9), se observó que el porcentaje de maltodextrina utilizado influyó directamente en el tamaño de partícula. Los tratamientos con 10% de maltodextrina presentaron el mayor tamaño de partícula, respecto a los tratamientos con 5% de maltodextrina ( $P \leq 0.05$ ). Voron'ko *et al.* (2016), describieron en su estudio que el tamaño de la partícula se ve afectado por la cantidad de enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) y los grupos aminos ( $\text{NH}^+$ ), grupos presentes en la maltodextrina y la gelatina respectivamente. Las interacciones electrostáticas también tiene incidencia, según Qiao *et al.* (2017), a través de la medición por espectroscopia de infrarrojo por transformación de Fourier (FTIR), identificaron alteraciones de la longitud de banda de las amidas I, II y III de la gelatina, observando un efecto del grupo  $\text{COO}^-$  sobre el grupo amino. En presencia de más polisacáridos libres (mayor porcentaje de maltodextrina), posiblemente las interacciones fueron mayores, formando una capa de mayor grosor, pero es necesario estudiar con mayor profundidad (Pathak *et al.* 2017).

Cuadro 9. Resultado del porcentaje de maltodextrina en el tamaño de partículas promedio de los tratamientos de microencapsulado.

<b>Concentración de Maltodextrina (%)</b>	<b>Tamaño (µm) Media ± D.E.</b>
5	48.49 ± 5.25 <sup>b</sup>
10	91.68 ± 9.17 <sup>a</sup>
C.V. (%)	10.75

Cada tamaño de partícula representa la media de los tratamientos de cada porcentaje de maltodextrina.

C.V.: Coeficiente de variación. D.E.: Desviación estándar.

<sup>a-b</sup>: Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) en tamaño de partículas, según el porcentaje de maltodextrina de cada tratamiento.

**Solubilidad.** La solubilidad presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), es decir que al menos uno de los tratamientos fue diferente (Cuadro 11). Por medio de un análisis Duncan se evaluó las medias de solubilidad de los factores: relación etanol:agua y no se observó diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). El porcentaje de maltodextrina sí presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). Los tratamientos preparados con 10% de maltodextrina presentaron mayor solubilidad con respecto a los tratamientos con 5%. En la interacción entre maltodextrina y la relación etanol:agua, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 10).

En este estudio se demostró que mayor porcentaje de maltodextrina incrementó la solubilidad. La proteína (gelatina) de acuerdo con Akhavan *et al.* (2016), aporta a la solubilidad, ya que sus partes hidrofóbicas interactúan con otros materiales hidrofóbico y las hidrofílicas con el de recubrimiento. Di Battista *et al.* (2018) en su estudio reportaron, que la maltodextrina es uno de los mejores encapsulantes para fitoesteroles, debido al tamaño de partículas generado en secado por aspersión, lo que mejora la solubilidad. En su estudio Souza *et al.* (2013), reportaron que a pesar de usar tres temperaturas de aire de entrada en el secado por aspersión (130, 150 y 170 °C) y tres concentraciones de maltodextrina (10, 20 y 30% p/v), no encontraron diferencias significativas en la solubilidad. La solubilidad de los fitoesteroles en general se puede ver mejorada por su afinidad de las partes hidrófobas (prolina e hidroxiprolina mayormente) que posee la gelatina (Ahmad *et al.* 2019).

Cuadro 10. Probabilidad de los factores y su interacción para el porcentaje de solubilidad.

<b>Variable</b>	<b>Valor -p</b>
Relación	0.4436
Maltodextrina	0.0121
Relación*Maltodextrina	0.0905
C.V. (%)	3.14

C.V.: Coeficiente de variación.

Cuadro 11 Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en de la solubilidad promedio de los tratamientos de microencapsulado.

<b>Relación Etanol:agua</b>	<b>Maltodextrina (%)</b>	<b>Solubilidad (%) Media ± D.E.</b>
2:1	5	87.11 ± 2.48 <sup>b</sup>
	10	90.20 ± 0.51 <sup>a</sup>
3:1	5	83.59 ± 1.51 <sup>b</sup>
	10	87.26 ± 3.66 <sup>a</sup>
4:1	5	84.94 ± 5.07 <sup>b</sup>
	10	89.59 ± 3.00 <sup>a</sup>
C.V. (%)		3.14

Cada porcentaje de solubilidad representa la media de tres repeticiones. C.V.: Coeficiente de variación,

D.E.: Desviación estándar, <sup>a-b</sup>: Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el porcentaje de solubilidad de los tratamientos.

## Fase 2. Análisis químicos

Como resultado de la fase 1, se observó que el factor con mayor significancia fue el porcentaje de maltodextrina. En esta fase se evaluaron dos tratamientos con relación 2:1 (etanol:agua) y con variable 5 y 10% de maltodextrina, que a la vez representaron los extremos en tamaño de partícula, con el fin de determinar el efecto de la variable maltodextrina en la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.

**Capacidad de carga.** El análisis de estos dos parámetros se realizó a los dos tratamientos con mejor solubilidad, los cuales corresponden a los tratamientos con 5 y 10% de maltodextrina, con una misma relación etanol:agua (2:1). La estabilidad fue brindada en la proteína por las partes hidrofóbicas de la mismas, y la pérdida de la estructura se debe a pocas fuerzas desestabilizadoras. Lo que indican que la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación están determinadas por las fuerzas de atracción entre el material capa y el núcleo. Las fuerzas de atracción entre materiales hidrófobos, en este caso los fitoesteroles y la proteína pueden ser las fuerzas de van der Waals, y los enlaces de hidrógeno (McClements 2015).

En este estudio, la capacidad de carga es la cantidad de fitoesteroles encapsulados (mg) por gramo de muestra de cada tratamiento. Se encontró diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos evaluados (Cuadro 12), donde el tratamiento con la variable 5% de maltodextrina presentó la mayor capacidad de carga (mg/g). Es decir que, se puede encontrar mayor cantidad de fitoesteroles por cada gramo de material de recubrimiento, en comparación con el tratamiento con 10% de maltodextrina. Sin embargo, el aumentar el material de cobertura, se asegura una mejor protección de los fitoesteroles microencapsulados. Según lo dicho por Shaddel *et al.* (2018), mayor capacidad de carga no siempre es positivo, ya que eso implica, mayor concentración de material a encapsular, con menos material de recubrimiento, dando menos protección al material de interés.

Cuadro 12. Resultado del porcentaje de maltodextrina y relación etanol:agua en la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación de las microcápsulas con fitoesteroles.

Relación Etanol:agua	Maltodextrina (%)	Capacidad de carga (mg/g) Media $\pm$ D.E.	Eficiencia de encapsulación (%) Media $\pm$ D.E.
2:1	5	96.70 $\pm$ 0.36	59.90 $\pm$ 0.26
	10	88.69 $\pm$ 1.79	90.13 $\pm$ 1.78
Probabilidad		0.0178	0.0009
C.V. (%)		1.40	1.69

Cada capacidad de carga y porcentaje de eficiencia de encapsulación representa la media de tres repeticiones.

C.V.: Coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: Desviación estándar.

**Eficiencia de encapsulación.** Los tratamientos evaluados presentaron diferencia estadística significativa (Cuadro 12). Se pudo observar que el tratamiento con 10% de maltodextrina fue el que presentó la mayor eficiencia de encapsulación, mientras que la menor eficiencia fue la del tratamiento con 5% de maltodextrina. Esto implica que a mayor cantidad de sólidos se obtuvo una

mejora en la eficiencia de encapsulación. Es decir, que utilizar mayor porcentaje de maltodextrina genera mayor protección al núcleo de la cápsula.

De acuerdo con el estudio de Hussain *et al.* (2018), la eficiencia de encapsulación depende en gran medida del porcentaje de maltodextrina usado; ellos a través del método de liofilización lograron una eficiencia de encapsulación mayor con 10 que con 5% de maltodextrina, lo cual es consistente con lo encontrado en el presente estudio.

Si se comparan los datos de capacidad de carga y la eficiencia de encapsulado es notorio que hubo una mayor pérdida de fitoesteroles con menor porcentaje de maltodextrina. Lo anterior es compartido por el estudio de Araújo *et al.* (2020), quienes mencionaron que el éxito del proceso de microencapsulación está en la protección del material del núcleo. La pérdida de fitoesteroles puede deberse al proceso de rotoevaporado, agitado al momento de agregar la maltodextrina, durante el proceso de deshidratado de las muestras o en la digestión para el análisis por cromatografía de gases.

## 4. CONCLUSIONES

- La actividad de agua no se vio afectada por el porcentaje de maltodextrina, ni por la relación etanol:agua.
- El tamaño de partícula fue afectado por la interacción entre los factores etanol:agua y el porcentaje de maltodextrina.
- De los factores evaluados solamente porcentaje de maltodextrina afectó la solubilidad de las microcápsulas.
- Se observaron tamaños de las microcápsulas en un rango de 40 a 100  $\mu\text{m}$  y con forma típica de circular y ovalada, sin variaciones entre porcentajes de maltodextrina.
- La capacidad de carga fue mayor en el tratamiento con 5% de maltodextrina, mientras que la eficiencia de encapsulación fue mayor al usar 10% de maltodextrina.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Evaluar el efecto de la adición de concentraciones de maltodextrina entre 5 y 10% sobre el tamaño de las partículas.
- Determinar la estabilidad oxidativa de los fitoesteros microencapsulados y su resistencia en una simulación del proceso de digestión.
- Incorporar los fitoesteros microencapsulados en un alimento líquido o con características acuosas.

## 6. LITERATURA CITADA

- Ahmad T, Ismail A, Aqlima S, Abdul K, Teik L, Atta E, Qurni A. 2019. Physicochemical characteristics and molecular structures of gelatin extracted from bovine skin: effects of actinidin and papain enzymes pretreatment, *International Journal of Food Properties*. 22(1):138-153. doi: 10.1080/10942912.2019.1576731.
- Ahsan SM, Rao CM. 2017. The role of surface charge in the desolvation process of gelatin: implications in nanoparticle synthesis and modulation of drug release. *Int J Nanomedicine*. 12:795-808. doi:10.2147/IJN.S124938
- Akhavan Mahdavi S, Jafari SM, Assadpoor E, Dehnad D. 2016. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *Int J Biol Macromol*. 85:379–385. eng. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011.
- [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 Chemist's Society. 2017. Official Methods of Analysis Ce 12-16. Sterols and stanols and dietary supplements containing added phytosterols. InM. W. Collison (Ed), Official methods and recommended practices of the AOCS (7<sup>th</sup> ed). Urbana, IL. AOCS Press.
- Araújo JSF de, Souza EL de, Oliveira JR, Gomes ACA, Kotzebue LRV, da Silva D, Oliveira D, Mazzetto S, da Silva A, Cavalcanti M. 2020. Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatin mixtures: Preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities. *Int J Biol Macromol*. 143:991–999. eng. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.160.
- Cabral CE y Karimi M. 2017. Phytosterols in the Treatment of Hypercholesterolemia and Prevention of Cardiovascular Diseases. *Arq Bras Cardiol*. 109(5):475–482. eng. doi:10.5935/abc.20170158.
- Cao W, Ou S, Lin W, Tang C. 2016. Food protein-based phytosterol nanoparticles: fabrication and characterization. *Food Funct*. 7(9):3973–3980. eng. doi:10.1039/c6fo00861e.
- Chen Q, McGillivray D, Wen J, Zhong F, Quek S. 2013. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *Journal of Food Engineering*. 117(4):505–512. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.011.
- Chuaychan S, Benjakul S. 2016. Effect of maltodextrin on characteristics and antioxidative activity of spray-dried powder of gelatin and gelatin hydrolysate from scales of spotted golden goatfish. *J Food Sci Technol*. 53(9):3583–3592. eng. doi:10.1007/s13197-016-2340-7.
- Comunian T, Chaves I, Thomazini M, Moraes I, Ferro R, Castro I, Favaro C. 2017. Development of functional yogurt containing free and encapsulated echium oil, phytosterol and sinapic acid. *Food Chemistry*. 237:948–956. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.071.
- Di Battista A, Ramírez M, Piña J. 2018. Microencapsulation of Phytosterols by Spray Drying. 56:437–468. doi:10.1016/B978-0-444-64058-1.00011-X.

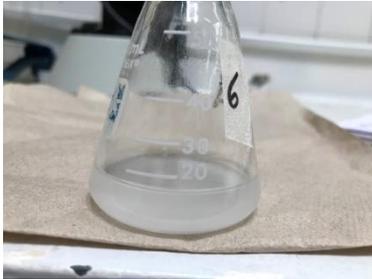
- Dias M, Ferreira I, Barreiro M. 2015. Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food Funct.* 6(4):1035–1052. eng. doi:10.1039/c4fo01175a.
- Etorki A, Gao M, Sadeghi R, Maldonado L, Kokini J. 2016. Effects of Desolvating Agent Types, Ratios, and Temperature on Size and Nanostructure of Nanoparticles from  $\alpha$ -Lactalbumin and Ovalbumin. *J Food Sci.* 81(10):E2511-E2520. eng. doi:10.1111/1750-3841.13447.
- [FDA] Food and Drug Administration. 2003. FDA Letter Regarding Enforcement Discretion With Respect to Expanded Use of an Interim Health Claim Rule About Plant Sterol/Stanol Esters and Reduced Risk of Coronary Heart Disease. Christine L. Taylor: Food and Drug Administration; [consultado el 16 de septiembre del 2020]. <https://www.fda.gov/food/food-labeling-nutrition/fda-letter-regarding-enforcement-discretion-respect-expanded-use-interim-health-claim-rule-about>
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2008. Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and Technical Assessment, Richard Cantrill; 69th JECFA. <http://www.fao.org/3/a-at965e.pdf>
- Gullapalli P, Mazzitelli L. 2017. Gelatin and Non-Gelatin Capsule Dosage Forms. *J Pharm Sci.* 106(6):1453–1465. eng. doi:10.1016/j.xphs.2017.02.006.
- Gutiérrez G, Alamilla L, del Pilar M, Welti J, Parada E, Barbosa G. 2015. Water Stress in Biological, Chemical, Pharmaceutical and Food Systems. New York, NY: Springer New York. 666 p. ISBN: 978-1-4939-2577-3.
- Hussain S, Hameed A, Nazir Y, Naz T, Wu Y, Suleria H, Song Y. 2018. Microencapsulation and the Characterization of Polyherbal Formulation (PHF) Rich in Natural Polyphenolic Compounds. *Nutrients.* 10(7). eng. doi:10.3390/nu10070843.
- Israelachvili, J. 2011. Intermolecular and Surface Forces, 3rd Edition. London, Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-21560-1>.
- Izar M, Tegani D, Kasma S, Fonseca F. 2011. Phytosterols and phytosterolemia: gene-diet interactions. *Genes Nutr.* 6(1):17–26. eng. doi:10.1007/s12263-010-0182-x.
- Levit S, Walker R, Tang C. 2019. Rapid, Single-Step Protein Encapsulation via Flash NanoPrecipitation. *Polymers (Basel).* 11(9). eng. doi:10.3390/polym11091406.
- Luque A, Lizardi J, Goycoolea F, Higuera I, Argüelles W. 2016. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. *RSC Adv.* 6(64):59250–59256. doi:10.1039/C6RA06563E.
- McClements D. 2015. Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/b17280>.
- Mehanna M, Mohyeldin S, Elgindy N. (2019) Rifampicin-Carbohydrate Spray-Dried Nanocomposite: A Futuristic Multiparticulate Platform For Pulmonary Delivery. *Int J Nanomedicine.* 14:9089-9112. doi:10.2147/IJN.S211182
- Miller D, Ellenberger D, Gil M. 2016. Spray-Drying Technology: Formulating Poorly Water Soluble Drugs. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series.* [place unknown]: 2016. 437-525 (vol. 22). ISBN: 978-3-319-42609-9. doi:10.1007/978-3-319-42609-9\_10.

- Mis K, Bankston J, Bechtel P, Sathivel S. 2016. Physicochemical Properties of Microencapsulated  $\omega$ -3 Salmon Oil with Egg White Powder. *J Food Sci.* 81(3):E600-9. eng. doi:10.1111/1750-3841.13228.
- Mondal M. 2019. *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*. Cham: Springer International Publishing. 1850 p. ISBN: 978-3-319-77829-7.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2016. Factores de riesgo de las enfermedades no transmisibles en la Región de las Américas: Consideraciones para fortalecer la capacidad regulatoria. Documento técnico de referencia REGULA. [www.paho.org/permissions](http://www.paho.org/permissions).
- [OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2019. Las ENT de un vistazo: Mortalidad por enfermedades no transmisibles y prevalencia de sus factores de riesgo en la región de las Américas. Organización Mundial de la Salud. Located at: Organización Mundial de la Salud; OPS/NMH/19-014. [www.paho.org](http://www.paho.org).
- [OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2019b. Enfermedades no transmisibles en la región de las Américas: hechos y cifras. [www.paho.org](http://www.paho.org).
- Pathak J, Priyadarshini E, Rawat K, Bohidar H. 2017. Complex coacervation in charge complementary biopolymers: Electrostatic versus surface patch binding. *Adv Colloid Interface Sci.* 250:40–53. eng. doi:10.1016/j.cis.2017.10.006.
- Paulo F, Santos L. 2017. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 77:1327–1340. eng. doi:10.1016/j.msec.2017.03.219.
- Pustulka K, Wohl A, Lee H, Michel A, Han J, Hoye T, McCormick A, Panyam J, Macosko C. 2013. Flash nanoprecipitation: particle structure and stability. *Mol Pharm.* 10(11):4367–4377. eng. doi:10.1021/mp400337f.
- Qiao C, Ma X, Zhang J, Yao J. 2017. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. *Food Chemistry.* 235:45–50. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.045.
- Rossi L, Seijen JW, Melnikov S, Velikov K. 2010. Colloidal phytosterols: synthesis, characterization and bioaccessibility. *Soft Matter.* 6(5):928–936. doi:10.1039/B911371A.
- Ruiz J, Velderrain G, Domínguez J, Preciado A, Alvarez E, Villegas M. 2019. Bioactives Molecules in Food: Encapsulation to Protect Different Bioactives to Be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients. [place unknown]: [publisher unknown]. 2163-2182. ISBN: 978-3-319-78030-6. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6\\_84](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_84).
- Sadeghi R, Moosavii A, Emam Z, Kalbasi A, Razavi S, 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.
- Santhalakshmy S, Don Bosco S, Francis S, Sabeena M. 2015. Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder. *Powder Technology.* 274:37–43. doi:10.1016/j.powtec.2015.01.016.
- Shaddel R, Hesari J, Azadmard S, Hamishehkar H, Fathi B, Huang Q. 2018. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *Int J Biol Macromol.* 107(Pt B):1800–1810. eng. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044.

- Shahzad N, Khan W, Md S, Ali A, Saluja S, Sharma S, Al-Allaf F, Abduljaleel Z, Ibrahim I, Abdel A, *et al.* 2017. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomed Pharmacother.* 88:786–794. eng. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.068.
- Souza V, Thomazini M, Balieiro JC, Fávoro C. 2013. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). *Food and Bioproducts Processing.* 93:39–50. doi:10.1016/j.fbp.2013.11.001.
- Tolve R, Galgano F, Caruso M, Tchienbou F, Condelli N, Favati F, Zhang Z. 2016. Encapsulation of health-promoting ingredients: applications in foodstuffs. *Int J Food Sci Nutr.* 67(8):888–918. eng. doi:10.1080/09637486.2016.1205552.
- Vimala S, Moses A, Anandharamakrishnan C. 2018. *Nano and Microencapsulation Using Food Grade Polymers.* [place unknown]: Springer International Publishing.
- Voron'ko N, Derkach S, Kuchina Y, Sokolan N. 2016. The chitosan-gelatin (bio)polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium. *Carbohydr Polym.* 138:265–272. eng. doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.059.
- Wang L, Chang Y, Osmanson A, Zhang J, Li L. 2018. Facile continuous production of soy peptide nanogels via nanoscale flash desolvation for drug entrapment. *Int J Pharm.* 549(1-2):13–20. eng. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.07.044.
- Yoo E. 2016. Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 21(1):7–14. eng. doi:10.6065/apem.2016.21.1.7.
- Zhang Y, Feng J, McManus S, Lu H, Ristroph K, Cho E, Dobrijevic E, Chan H, Prud'homme R. 2017. Design and Solidification of Fast-Releasing Clofazimine Nanoparticles for Treatment of Cryptosporidiosis. *Mol Pharm.* 14(10):3480–3488. eng. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00521.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Tratamientos preliminares.



### Anexo 2. Preliminar relación 1:1 precipitado y relación 2:1.



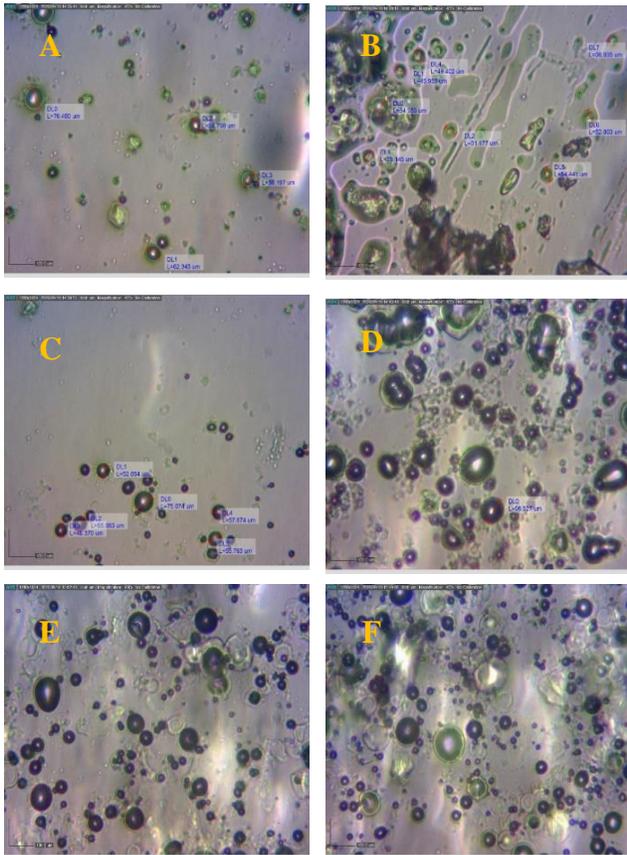
### Anexo 3. Preliminares con menos precipitado, relaciones 2:1, 3:1 y 4:1 etanol:agua.



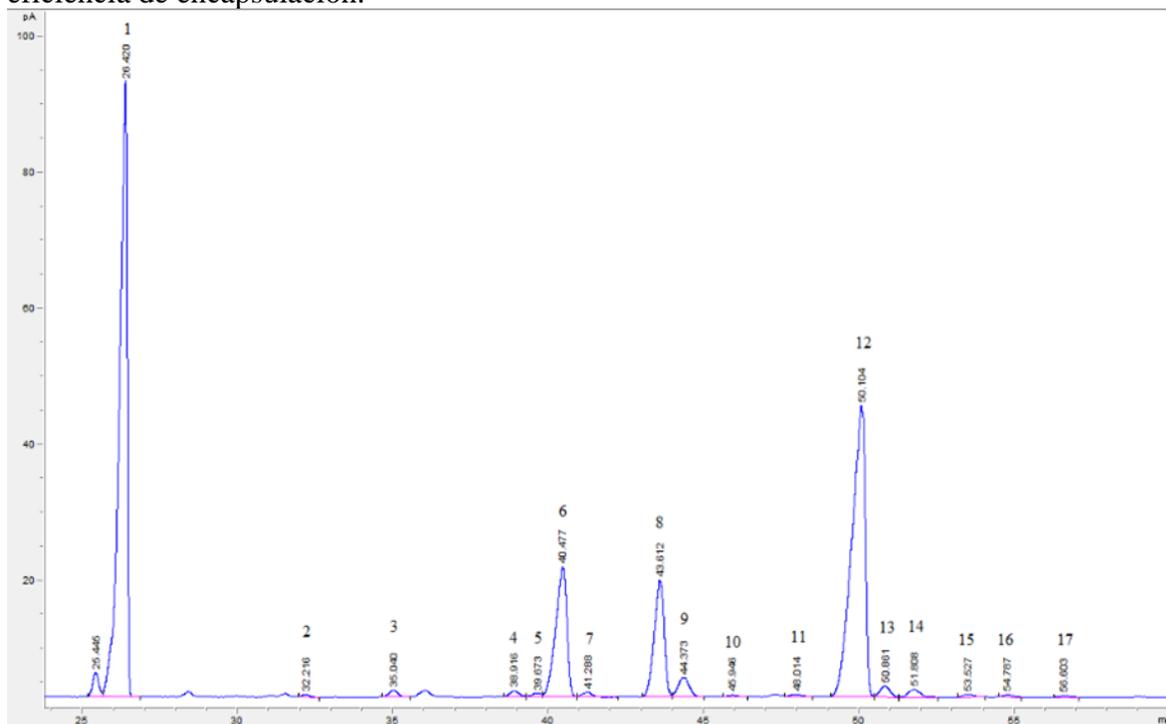
**Anexo 4.** Controles fitoesteros disueltos en tres relaciones etanol:agua, A) 2:1 RLC, B) 3:1 RLC, C) 4:1 RLC, donde RLC: Relación etanol:agua.



**Anexo 5.** Morfología y tamaño por tratamiento A) 5% MD, 2:1 RLC, B) 5% MD, 3:1 RLC, C) 5% MD, 4:1 RLC, D) 10% MD, 2:1 RLC, E) 10% MD, 3:1 RLC, F) 10% MD, 4:1 RLC. Donde MD: Maltodextrina y RLC: Relación etanol:agua.



**Anexo 6.** Cromatograma del perfil de fitoesteroles usado para determinar la capacidad de carga y eficiencia de encapsulación.



**Anexo 7.** Tiempos de retención y concentración de esteroides y estanoles encontrados antes de la microencapsulación.

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

**Anexo 8.** Tiempos de retención y concentración de esteroides y estanoles encontrados después de la microencapsulación.

<b>Pico</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Porcentaje de fitoesteroides en concentrado (%)</b>
1	5 $\beta$ -Colestano-3 $\alpha$ -ol (Estándar Interno)	26.518	---
2	Ergosterol*	35.107	0.79
3	24-Metileno Colesterol	38.708	0.05
4	Campesterol	39.791	0.47
5	Campestanol	40.831	19.64
6	Estigmasterol	41.441	0.71
7	$\Delta$ 22-Estigmastenol	43.956	14.76
8	$\Delta$ 7-Campesterol	44.681	0.38
9	Clerosterol + $\Delta$ 5,23-Estigmastadienol	47.443	0.38
10	$\beta$ -Sitosterol	49.143	0.89
11	Sitostanol	50.845	53.05
12	$\Delta$ 5-Avenasterol	51.262	1.49
13	Fucoesterol	52.091	1.21
14	$\Delta$ 7-Estigmastenol	53.732	0.71
15	$\Delta$ 7-Avenasterol	55.023	0.50