

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Elaboración de yogur con sabor a fresa fortificado con
fitoesteroles de soya (*Glycine max*) encapsulados, evaluación de su
bioaccesibilidad y propiedades fisicoquímicas**

Estudiantes

Ricardo Josue Barraqueta Cordero

Jose Carlos Cabezas Alvarez

Asesor

Luis F. Maldonado, Ph.D.

Honduras, noviembre 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRIGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora del Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Figuras	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos.....	13
Localización del Estudio	13
Materiales	13
Metodología.....	14
Fase 1. Pruebas Preliminares	14
Fase 2. Fortificación del Yogur	20
Fase 3. Prueba de bioaccesibilidad del fortificado	22
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	24
Fase 1	24
Fase 2	24
Fase 3	24
Resultados y Discusión.....	26
Fase 1	26
Perfil de Fitoesteroles en Concentrado Utilizado	26
Tamaño de Partícula	27
Comparación del Perfil de Fitoesteroles de los Encapsulados del F1C y F2C	28
Porcentaje (%) de Eficiencia de Encapsulación.....	30
Fase 2.	31
Selección del Tratamiento Utilizado.	31
Perfil de fitoesteroles del Encapsulado Utilizado.	32

Fase 3	34
Contenido de Fitoesteroles en el Yogur	34
Fitoesteroles en el Yogur y en el Encapsulado.....	35
Nivel de Fortificación Alcanzado.....	36
Bioaccesibilidad de Fitoesteroles.....	37
Conclusiones	41
Recomendaciones	42
Referencias.....	43

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Ingredientes para las formulaciones utilizadas para la preparación del encapsulado.	15
Cuadro 2	Parámetros utilizados en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 Serie GC System.	19
Cuadro 3	Composición de jugos gástricos.	23
Cuadro 4	Concentración en porcentaje de esteroides y estanoles del concentrado.	26
Cuadro 5	Comparación de tamaño de partícula entre tratamientos.	28
Cuadro 6	Comparación de fitoesteroides encapsulados entre tratamientos F1C y F2C.	29
Cuadro 7	Contenido de fitoesteroides total por tratamiento (mg fitoesteroides/1 g de encapsulado).	30
Cuadro 8	Contenido de fitoesteroides del tratamiento F1C (mg/g encapsulado).	32
Cuadro 9	Perfil de fitoesteroides del encapsulado para fortificar el yogur.	33
Cuadro 10	Contenido de fitoesteroides en 1 gramo de encapsulado utilizado para la fortificación. ...	34
Cuadro 11	Perfil de fitoesteroides presentes en 1 gramo de yogur.	34
Cuadro 12	Comparación de fitoesteroides presentes en encapsulado y en el yogur.	36
Cuadro 13	Comparación de contenido de fitoesteroides añadidos y encontrados en el yogur en 100 g	37
Cuadro 14	Bioaccesibilidad para principales fitoesteroides presentes en 100 g yogur.	39

Índice de Figuras

Figura 1 Flujo de proceso utilizado para la elaboración del encapsulado de fitoesteroles de soya....	17
Figura 2 Proceso de elaboración de yogur fortificado con encapsulado de fitoesteroles de Soya (Glycine Max).	21
Figura 3 Proceso seguido para la prueba de bioaccesibilidad.	24

Resumen

Los altos niveles de colesterol en la sangre pueden ser precursores de numerosas enfermedades cardiovasculares. Por lo que es necesario buscar y desarrollar alternativas alimenticias que contribuyan a la reducción del colesterol en la sangre. El objetivo de este estudio fue fortificar el yogur con fitoesteroles encapsulados y evaluar su bioaccesibilidad durante su vida de anaquel. Se desarrollaron 3 fases. En la primera fase, se prepararon 4 tratamientos para encapsular fitoesteroles de soya (*Glycine Max*) utilizando diferentes formulaciones de emulsión lípidos/agua con gomas alimenticias. Para la evaluación de los datos se empleó un Diseño Completamente al Azar y una separación de medias Duncan. Se encontró que los tratamientos con aplicación de homogenización de alta velocidad y ultrasonido obtuvieron los tamaños de partícula más pequeños, en un rango de 5-10 μm . Los fitoesteroles en el encapsulado se cuantificaron en un rango de 50-60 mg/g. En la segunda fase, se fortificó el yogur con los fitoesteroles encapsulados, y se realizó una comparación del porcentaje de fitoesteroles presentes en el encapsulado y en el yogur, esto se analizó usando una prueba T y no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en el perfil de fitoesteroles. En la tercera fase se determinó la bioaccesibilidad *in vitro* de los fitoesteroles en el yogur, a los 5 y 25 días de almacenamiento, encontrando valores cercanos al 40%. Se recomienda realizar una evaluación sensorial para determinar si existen diferencias entre el yogur fortificado y un yogur convencional.

Palabras claves: enfermedades cardiovasculares, emulsión, *in vitro*, tamaño de partícula, ultrasonido.

Abstract

High blood cholesterol levels can be precursors to numerous cardiovascular diseases. Therefore, it is necessary to research other food alternatives that contribute to the reduction of cholesterol in the blood. The present study aimed to fortify yogurt with encapsulated phytosterols and to evaluate their bioaccessibility during its shelf life. For this purpose, the study was developed in 3 phases. In the first phase, 4 treatments were prepared to encapsulate soybean (*Glycine Max*) phytosterols using different lipid/water emulsion formulations with food gums. A Completely Randomized Design (CRD) with Duncan mean separation was used to evaluate the data. It was found that treatments with application of high-speed homogenization and ultrasound obtained the smallest particle sizes, in the range of 5-10 μm . The phytosterols present in the encapsulate were quantified in the range of 50-60 mg/g. In the second phase, the yogurt was enriched with the encapsulated phytosterols, and a comparison of the percentage of phytosterols present in the encapsulate and in the yogurt was performed, this was analyzed using a T-test and no significant differences ($p < 0.05$) were found in the phytosterol profile. In the third phase, the *in vitro* bioaccessibility of phytosterols in yogurt was determined at 5 and 25 days of storage, finding values close to 40%. A sensory evaluation is recommended to determine if there are differences between fortified and conventional yogurt.

Key words: cardiovascular diseases, emulsion, *in vitro*, particle size, ultrasound.

Introducción

En el cuerpo humano existe el colesterol en la sangre, el cual es de suma importancia para el correcto funcionamiento del organismo. Esto porque, el colesterol es el principal esteroide del organismo, el cual ejerce importantes funciones, ya que es el precursor de diferentes hormonas y sales biliares, además de formar parte de las membranas celulares (Rodés et al., 2007).

Cuando las cifras de colesterol LDL (low-density lipoprotein) aumentan significativamente en la sangre, por encima de la cantidad óptima, las personas empiezan a presentar problemas de salud. En efecto, este lípido es el responsable del 8% de toda la carga de enfermedades de los países desarrollados, del 60% de las enfermedades de corazón y del 40% de los infartos cerebrales (Carvajal A., 2020).

El colesterol alto en la sangre se puede dar por muchos factores como lo son: el consumo de alcohol, la falta de ejercicio, edad y, sobre todo, la dieta en la que se basa una persona, ya que, una persona con sobrepeso y mala alimentación es más susceptible a tener un nivel de colesterol más alto, que conlleve a enfermedades cardiovasculares y cerebrales. Debido a esto, es importante reducir estos niveles de colesterol en la sangre. Se considera que el valor "ideal" de colesterol total en sangre debería ser inferior a 200 mg/dl (Ortega E. et al., 2018).

Para reducir los niveles de colesterol existen varios métodos, unos pueden ser llamados preventivos (antes que pueda ocurrir alguna enfermedad) o correctivos que es mediante el uso de fármacos durante un periodo de tiempo, con el fin de alcanzar los niveles normales. En la actualidad, se está buscando alternativas que puedan ayudar a reducir los niveles de colesterol en la sangre.

Una posible solución para este problema es incluir fitoesteroles en la dieta, los cuales son moléculas complejas que se encuentra de manera natural en aceites, frutas, verduras y semillas oleaginosas. Es decir, los fitoesteroles son esteroides de origen vegetal ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuya estructura es muy similar a la del colesterol (Valenzuela B. & Ronco M., 2004).

Con respecto a cómo este compuesto bioactivo actúa en la reducción del colesterol LDL, se debe a que, los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden desplazarlo de

las micelas de absorción, de esta manera se produce una disminución, por competición, de la incorporación del colesterol en las micelas y, en consecuencia, disminuye su absorción intestinal (Palou, 2005).sa

El contenido de fitoesteroles va a variar según la fuente de materia vegetal de la que se extrae. Las semillas de oleaginosas y de cereales son las mayores fuentes naturales de fitoesteroles. En este sentido, semillas de oleaginosas como canola tienen 399 mg/100 g, soya 353 mg/100 g, girasol 225 mg/100 g y maní 127 mg/100 g (Silva P. et al., 2016).

Para promover el consumo de fitoesteroles, se ha optado por incorporarlos en la composición de alimentos comunes que forman parte de la dieta diaria. Esto se debe a que no es práctico consumir fitoesteroles directamente en su forma pura, por lo que se extraen y luego se añaden a diversos productos alimenticios como yogur, leche, entre otros, con el fin de enriquecerlos.

El yogur se define como el producto de leche coagulada obtenida por la fermentación láctica producida por la acción de las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Para poder utilizar el término yogur, los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en una cantidad mínima de 1×10^7 colonias por gramo o mililitro (Babio et al., 2017).

La incorporación de fitoesteroles en el yogur (matriz líquida), según Alvarez-Sala (2018) indica que los alimentos enriquecidos con esteroides vegetales (1.6 g/día) como el yogur, son más eficaces para reducir el c-LDL que el pan (15.9% y 8.6%, respectivamente), y cereales para desayunos (5.4%), ya que estos esteroides se pueden encontrar más disponibles para su solubilización al momento de ingerir este alimento.

Para aprovechar los compuestos benéficos en una matriz alimenticia, el consumo de 1.6-2.0 g de fitoesteroides o fitoestanoles al día dio lugar a una reducción del colesterol sérico total y del colesterol LDL en un 8-13 % (Izadi et al., 2015).

Un método y técnica que ha sido muy estudiado para agregar fitoesteroides a matrices alimenticias es por medio de la encapsulación de este compuesto. La encapsulación se considera un

envase especial en el que se aplica un recubrimiento individual a pequeñas partículas sólidas, gotas líquidas o gases, protegiéndolas contra factores ambientales nocivos (Sandoval et al., 2011).

La encapsulación de compuestos bioactivos dentro de una matriz alimenticia, permite mejorar la liberación del mismo y las características benéficas que se están buscando, como menciona (Nava E et al., 2015), al encapsular se logra prevenir reacciones con otros componentes del alimentos para favorecer la máxima absorción de estos dentro del tracto digestivo.

Por otro lado, el material encapsulante que se seleccione dependerá del requerimiento de su aplicación, así también como el método de encapsulación que se puede realizar, según Martín M et al. (2009), las sustancias más utilizadas como recubrimiento son las gomas, carbohidratos, celulosa, lípidos, proteínas y materiales inorgánicos, junto a los principales métodos de encapsulación que estos pueden ser según su naturaleza, físicos y/o químicos.

Si un alimento llega a tener la cantidad recomendada para que puedan surgir efectos benéficos para la salud, el mismo tendrá que ser etiquetado según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA, 2012/67.01.60:10 (2012)), La declaración debe contener: “puede” o “podría” reducir el riesgo de contraer una enfermedad coronaria, o enfermedad cardiaca.

Existen maneras de cuantificar las cantidades de estos compuestos que pueden estar disponibles y sean absorbidos en nuestros cuerpos, esto mediante una evaluación de bioaccesibilidad, los cuales pueden ser *in vivo* e *in vitro*. El método *in vivo* es de forma directa midiendo la concentración de EV (Esteroles vegetales) y/o metabolitos conocidos en plasma, heces y/o bilis tras la ingesta de una dieta líquida administrada mediante perfusión intestinal van Campen and Glahn (1999). El método *in vitro* simula las condiciones fisiológicas y pueden resultar predictivo de la situación *in vivo*, mediante estudios *in vitro* se pueden simular las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, tiempo de incubación) del tracto gastrointestinal (Ekmekcioglu, 2002) .

Por esto es esencial incorporar estos fitoesteroles en alimentos comunes de la dieta diaria, asegurando que cumplan con los niveles adecuados. De esta manera, se busca promover beneficios positivos para la salud de las personas. En este contexto, el presente estudio se centró en el desarrollo

de un yogur enriquecido con fitoesteroles de soya encapsulados. Los objetivos de esta investigación son los siguientes:

Encapsular fitoesteroles de soya (*Glycine max*) en una emulsión lípido/agua y determinación del tamaño de partícula.

Elaborar un yogur con sabor a fresa fortificado con fitoesteroles encapsulados.

Cuantificar la bioaccesibilidad de los fitoesteroles encapsulados en el yogur con sabor a fresa.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

La elaboración de los tratamientos y la medida de tamaño de partícula de la fase preliminar del proyecto fue realizada en el departamento de Food Science de Purdue University (West Lafayette, Indiana, EE. UU.). El estudio se llevó a cabo principalmente en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), donde se realizaron los análisis fisicoquímicos y de bioaccesibilidad. Se elaboraron las distintas formulaciones de yogur en la Planta de Lácteos de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Ambas instalaciones ubicadas en el 30 km de la carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle de Yeguaré, San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

Materiales

Los materiales para la elaboración del encapsulado de fitoesteroles consistieron en: Mezcla de fitoesteroles de soya *Glycine Max* (90% phytosterols, Bulk Supplements, EE.UU.), monolaurato de sorbitano, Span 20 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), monolaurato de poliexioetilensorbitano, Tween 20 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), goma xanthan y goma guar (Bob's Red Mill, EE.UU.), agua desionizada, la cual se obtuvo utilizando el equipo agua "Barnstead™" "Nanopure™" (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), estufa de agitación magnética (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), agitador de alta velocidad Polytron PT1200 (DAIGGER, EE.UU.) y agitador de alta velocidad MXBAOHENG (MXBAOHENGus Instrument Co.) y Sonicador Fisherbrand™ Q500 (Fisher Scientific, EE.UU.). Los equipos que fueron utilizados para cada una de las pruebas realizadas en el estudio son especificados más adelante.

Los materiales utilizados para la prueba de bioaccesibilidad consistieron en: Urea (Fischer Scientific, EE. UU.), hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Tiocianato de potasio (J.T Baker™, EE.UU.), cloruro de potasio (J.T Baker™, EE.UU.), cloruro de sodio (J.T Baker™, EE.UU.), Fosfato de sodio (J.T Baker™, EE.UU.), cloruro de calcio (J.T Baker™, EE.UU.), cloruro de amonio (J.T Baker™, EE.UU.), cloruro de magnesio (J.T Baker™, EE.UU.), fosfato de potasio (J.T Baker™, EE.UU.), bicarbonato de sodio (J.T Baker™, EE.UU.), α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, EE.UU.),

Pancreatina de páncreas porcino (Sigma- Aldrich, EE.UU.), Pepsina de mucosa porcina gástrica (Sigma- Aldrich, EE.UU.), extracto de bilis porcina (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Mucina de estómago porcino (Sigma-Aldrich, EE.UU.), ácido D-Glucurónico, Glucosamina (Sigma-Aldrich, EE.UU.), ácido úrico (Sigma-Aldrich, EE.UU.), albumina bovina (J.T BakerTM, EE.UU.).

Metodología

La investigación se llevó a cabo en tres fases. Siendo la primera fase la selección del tratamiento a utilizar en fases posteriores y el mejoramiento del proceso de elaboración del encapsulado. La segunda fase consistió en la elaboración y fortificación del yogur. Finalmente, la tercera fase consistió en la evaluación de bioaccesibilidad del yogur durante su vida de anaquel.

Fase 1. Pruebas Preliminares

En la primera fase del experimento se evaluó una adaptación de las formulaciones realizadas por Salamanca L. and Cabezas M. (2022). Con el fin de determinar la formulación y el tratamiento físico a utilizar para el encapsulado a ser añadido al yogur.

Con base al estudio realizado por Salamanca L. and Cabezas M. (2022), se seleccionó la formulación que en este estudio fue definida como formulación 1 (F1), y a partir de esta formulación, se desarrolló la formulación 2 (F2) que consistió en un reemplazo total del Span 20 por Tween 20. Dichas formulaciones sirvieron como base para la preparación de los tratamientos evaluados en la fase preliminar de este estudio. Siendo los tratamientos F1C y F1CS los provenientes de la formulación 1 y los tratamientos F2C y F2CS los provenientes de la formulación 2. Los tratamientos F1C y F2C corresponden a su respectiva formulación expuesta a cizalla de alta velocidad (C) y los tratamientos F1CS y F2CS corresponden a los tratamientos de la formulación 1 y 2 con cizalla de alta velocidad (C) y sonicación (S).

Elaboración de los Tratamientos.

La formulación 1 (F1), utilizada para los tratamientos F1C y F1CS se prepararon en dos fases, la fase dispersa, compuesta por una emulsión de fitoesteroles de soya (*Glycine Max*), con Span 20 y Tween 20; y la fase continua, la cual fue elaborada a partir de agua desionizada, goma guar y goma

xanthan. La formulación 2 (F2), utilizada para los tratamientos F2C y F2CS, fue preparada en dos fases, la fase dispersa, compuesta por fitoesteroles (*Glycine Max*) y Tween 20; y la fase continua, elaborada a partir de agua desionizada, goma guar y goma xanthan. Las proporciones utilizadas para cada una de las formulaciones se presentan a continuación en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Ingredientes para las formulaciones utilizadas para la preparación del encapsulado.

Formulación	Ingrediente	Porcentaje (%)
Formulación 1	Agua desionizada	87.97
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	1.9
	Tween 20	3.78
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05
Formulación 2	Agua desionizada	87.97
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	0.0
	Tween 20	5.68
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05

La preparación de la fase dispersa y la fase continua de los tratamientos fue realizada de la forma que se detalla a continuación. En el caso de los tratamientos para los que se utilizó la Formulación 1, para la fase dispersa se mezcló Tween 20 y Span 20 a 500 rpm en un beaker de 50 mL a las concentraciones especificadas en el Cuadro 1. Esta mezcla fue calentada y se le añadieron gradualmente los fitoesteroles hasta alcanzar la disolución total de estos a una temperatura máxima de 110 °C. La fase continua se preparó en simultaneo en un beaker de 500 mL aparte, para esta, se calentó el agua desionizada y se fueron añadiendo las gomas xanthan y guar de forma gradual con una agitación constante de 500 rpm, hasta que se alcanzó una disolución total de las gomas y una temperatura final de 90 °C, es importante mencionar que para prevenir la evaporación del agua en la fase continua se debe realizar la adición de las gomas en un recipiente cubierto.

A continuación, las dos fases fueron mezcladas, para esto se incrementó la velocidad de agitación de la fase continua a 800 rpm y a esta fue añadida la fase dispersa. Las temperaturas a las que debe ocurrir la mezcla son de 110 °C para la fase dispersa y de 90 °C para la fase continua. Si la

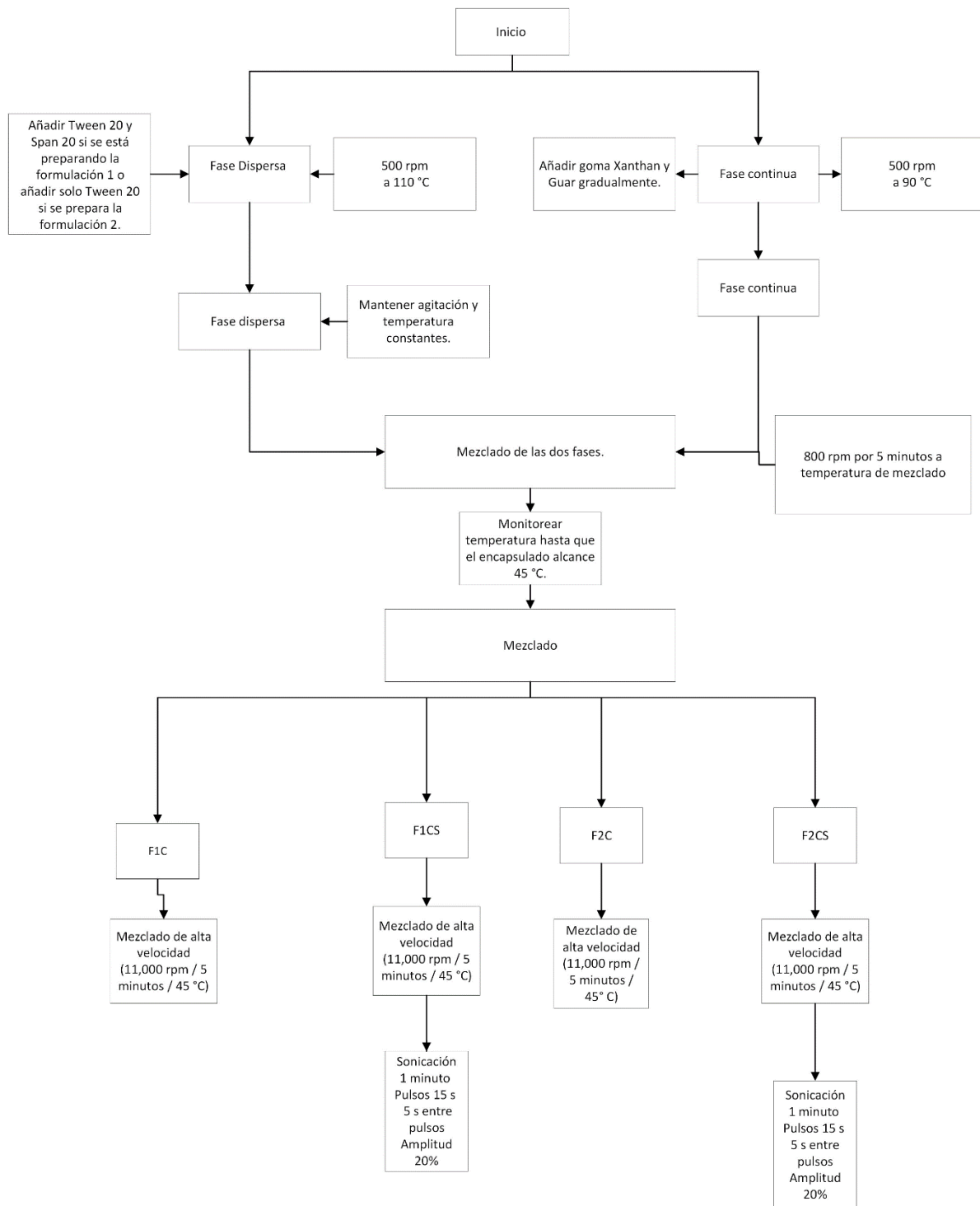
mezcla se realiza a una mayor temperatura se pueden presentar problemas en el proceso de encapsulación. A partir de la adición total de los fitoesteroides a la fase dispersa, se mantuvo la encapsulación a la temperatura y velocidad de mezclado por 5 minutos y posteriormente se retiró del calor la encapsulación y se mantuvo bajo agitación constante de 800 rpm hasta que se alcanzó la temperatura final de 45 °C. Una vez se alcanzada esta temperatura, el encapsulado fue expuesto a un agitador de alta velocidad (11,000 rpm) por 5 minutos. Finalmente, las muestras fueron dejadas en reposo hasta alcanzar una temperatura ambiente de 23 °C para su posterior almacenamiento.

Una vez la temperatura ambiente fue alcanzada, se tomaron de las preparaciones correspondientes y se extrajeron tres muestras de 10 mL de cada una, correspondientes a los tratamientos F1CS y F2CS (Formulación 1 y 2 con aplicación de cizalla de alta velocidad (C) y sonicación (S)). Estas fueron expuestas al proceso de sonicación, donde fueron colocadas en tubos de vidrio de 20 mL y fueron tratadas por un total de un minuto, en pulsos de 15 segundos con intervalos de cinco segundos de descanso entre pulsos, y una amplitud del 20%. Finalmente, todas las pruebas fueron guardadas en tubos herméticos para proceder con las pruebas de interés.

A partir del proceso elaborado por Salamanca L. and Cabezas M. (2022) y diversas pruebas realizadas utilizando este método logró determinar un flujo de proceso modificado que permitió la obtención de una encapsulación óptima, este flujo de proceso se muestra en la Figura 1.

Figura 1

Flujo de proceso utilizado para la elaboración del encapsulado de fitoesteroles de soya.



Medida del Tamaño de Partícula.

El tamaño de partícula fue medido utilizando el equipo Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical) en el cual se usaron los parámetros existentes en la base de datos del aceite de soya, siendo utilizada un índice de refracción de 1.472 y una absorción de 0.001. Se añadió la cantidad de muestra de cada uno de los tratamientos hasta que el equipo detectaba un rango de intensidad de laser óptimo de funcionamiento, lo que se obtenía con aproximadamente 500 μ L de muestra. Cada una de las medidas utilizada en el presente estudio es el resultado de 10 medidas tomadas por cada una de las repeticiones de los tratamientos. Entre medidas de cada repetición se le realizaron tres lavados al sistema de inyección del equipo antes de proseguir con la medida de la siguiente muestra.

Perfil de Fitoesteroles.

Con el fin de cuantificar la cantidad de fitoesteroles contenidos en la emulsión se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) (Agilent 6890 Serie GC System) el cual funciona con el software ChemStation 2010.

Para realizar esta prueba se utilizó el método para concentrados de fitoesteroles (AOCS Ce 12-16), para el cual se preparó una solución estándar interno con epicoprostanol, 5β -colestano- 3α -o1 (5mg/mL) disuelto en tolueno.

El contenido de fitoesteroles de soya presente en el suplemento utilizado para la elaboración de los tratamientos fue determinado por medio de un duplicado. Se utilizaron tubos de ensayo previamente lavados con tolueno y secados en un horno de convección por 15 minutos. Para cada muestra se pesaron 25 mg del suplemento en tubos de ensayo previamente tarados. Posteriormente se le añadió a cada tubo 2.5 mL de solución estándar y fue mezclado en el vortex por un minuto y medio. Luego se añadió 250 μ L de piridina y 500 μ L de BSTFA (1% TMCS) a cada tubo y fueron mezclados en el vortex hasta obtener una solución uniforme. A continuación, a los viales de muestra para el cromatógrafo de gases se añadieron 300 μ L de cada derivatización y se mezclaron con 500 μ L de tolueno. Finalmente, se realizó la cromatografía de gases bajo las condiciones detalladas en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Parámetros utilizados en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 Serie GC System.

Módulos	Parámetros
Gas de arrastre	Hidrógeno
Columna	SP - 30m x 0.320mm x 0.25 µL
Horno	Temperatura inicial 55 °C, tiempo tres minutos Temperatura final 120 °C, tiempo dos minutos Velocidad del calentador 20°C/min
Detector (FID)	Temperatura 250 °C Flujo de aire 400 mL/min Flujo de hidrógeno 40 mL/min
Inyector (Split)	Temperatura 175 °C Split radio 80 Velocidad lineal 39 cm/s
Duración del método	67 minutos
Volumen de inyección	1.0 µL

Para la determinación del contenido de fitoesteroles en los encapsulados se utilizó el método de digestión ácida/alcalina (AOCS Ce 12-16). Para llevar a cabo las digestiones se pesó 1 g de muestra en un matraz de ebullición de 50 mL, se colocaron tres perlas de cristal y se añadieron 5 mL de solución estándar y 5 mL de HCL a 3N. Posteriormente se colocó una muestra en un condensador de reflujo y con una plancha se calentó hasta alcanzar ebullición a 100 °C donde se mantuvo 45 minutos, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente por 20 minutos. Una vez la muestra fría se realizó el primer lavado con una solución saturada de NaCl, dicha solución se agregó hasta el cuello del matraz y se agitó por 3 minutos y se mantuvo en reposo por dos minutos o hasta ver la separación de fases. Luego se retiró la fase orgánica y se colocó en otro matraz de 50 mL, al cual se le agregó 5 mL de NaOH metanólico a 3N y cinco perlas de cristal. Nuevamente fue puesto en el condensador de reflujo y calentado a 100 °C donde se mantiene en ebullición por 15 minutos, una vez pasado este tiempo se dejó enfriar por 20 minutos y se le añadieron 7 mL de HCL 3N y se realizó un segundo lavado con NaCl a la muestra. La derivatización de los fitoesteroles se llevó a cabo extrayendo 300 µL de la fase orgánica, los cuales se mezclaron con 250 µL de Piridina y 500 µL de BSFTA al 1% (N, O—Bistrifluoroacetamida). Finalmente se analizó cada muestra en el cromatógrafo de gases con las especificaciones de cromatografía previamente mencionadas.

Porcentaje (%) de Eficiencia de la Encapsulación (EE).

El análisis de eficiencia de la encapsulación se midió a partir de una relación entre la cantidad de fitoesteroles añadidos originalmente y la cantidad de fitoesteroles resultantes que fueron encapsulados, el resultado de esto se multiplicó por 100. Este diferencial se determinó con los datos obtenidos de la cromatografía de gases del material encapsulado. La eficiencia de encapsulación se calculó según la Ecuación 1.

$$\%Eficiencia\ de\ Encapsulación = \frac{FF}{IF} * 100 \quad [1]$$

Donde:

FF = Fitoesteroles recuperados por cromatografía de gases, en mg.

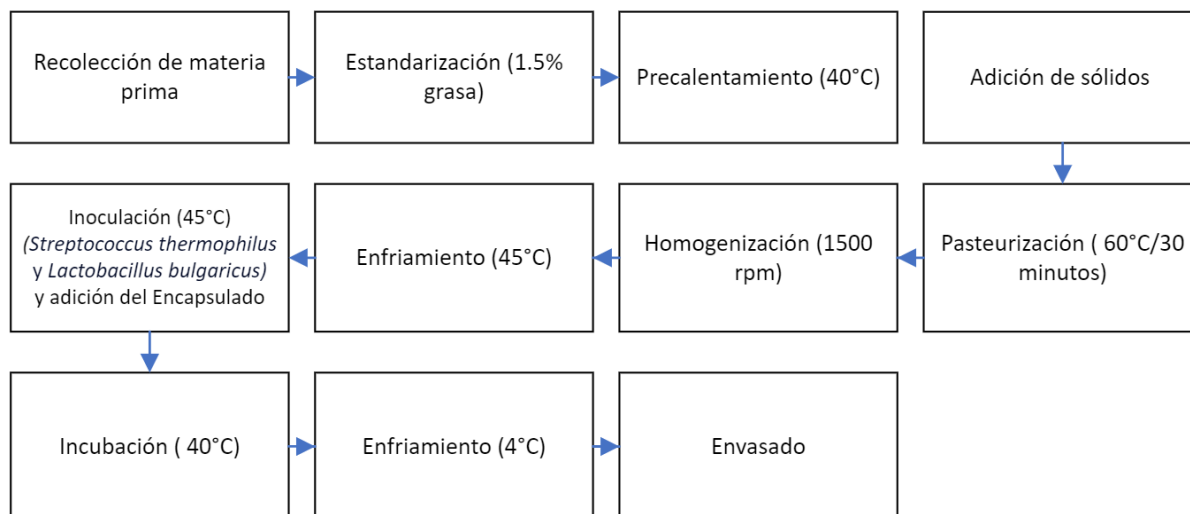
IF= Cantidad inicial de fitoesteroles, en mg.

Fase 2. Fortificación del Yogur

Una vez se determinó el tratamiento más adecuado para continuar con la investigación en la fase 1, se realizó el cálculo de la cantidad de microencapsulado a utilizar en la fortificación el yogur. Se prepararon tres repeticiones de encapsulado siguiendo el proceso expuesto en la Figura 1 y se añadieron al yogur al nivel de fortificación determinado. Se prepararon tres repeticiones de Yogur fortificado con el microencapsulado y un control, al cual no se le añadió encapsulado. El yogur fue preparado siguiendo el proceso descrito en la Figura 2. El encapsulado de fitoesteroles se añadió al yogur al momento de añadir los inóculos del yogur, con la finalidad de que el encapsulado se distribuya uniformemente. Finalmente, el yogur fue colocado en empaques herméticos y almacenado a 4 °C durante la duración del estudio. El proceso de elaboración de Yogur se detalla en la Figura 2.

Figura 2

Proceso de elaboración de yogur fortificado con encapsulado de fitoesteroles de Soya (Glycine Max).



Una vez realizada la fortificación del yogur se le realizaron las siguientes pruebas:

Pruebas Químicas.

Contenido de fitoesteroles. Con el fin de cuantificar la cantidad de fitoesteroles contenidos en el encapsulado a utilizar en la fortificación del yogur se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) (Agilent 6890 Serie GC System) el cual funciona con el software ChemStation 2010.

Para medir el contenido de fitoesteroles en el encapsulado se utilizó el método oficial de la AOCS Ce 12-16 para alimentos y suplementos dietéticos con una concentración menor al 20% de fitoesteroles. El proceso se describe a continuación:

Se inicio pesando 1 g de muestra y colocándolo en un balón de ebullición de 50 mL, al cual posteriormente se le añadieron 4 perlas de vidrio para ebullición.

Acto seguido, se agregaron 5 mL de HCL a 3 N al balón, y 5 mL de la solución de análisis interno (cuyo método de preparación fue explicado previamente). Las muestras fueron conectadas a condensadores de reflujo, colocadas sobre planchas y llevadas hasta ebullición a 100 °C por 45 minutos. Una vez pasados los 45 minutos las muestras se retiraron del calor, se taparon y se dejaron reposar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el primer lavado, para el cual se les agregó un aproximado de 40 mL de una solución saturada de NaCl a cada muestra,

se tapó y se agitó vigorosamente por 1 minuto, las muestras fueron dejadas en reposo hasta que se evidenció la separación de fases. Una vez la separación de fases fue evidente, se transfirió cuidadosamente la fase orgánica a otro balón de ebullición de 50 mL. Luego se añadieron 5 mL de una solución de NaOH al 2.3 N al balón y se puso a calentar hasta que alcanzó la ebullición a 100 °C y se mantuvo por 15 minutos, una vez pasados los 15 minutos, se retiró el balón del calor, se tapó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se le añadieron 7 mL de HCl a 3 N y 40 mL de la solución saturada de NaCl. Se cubrió el balón y mezcló hasta que se separaron las dos fases. Se esperó a que la separación de fases fuese evidente y total para iniciar con la preparación de las muestras para cromatografía de gases. Finalmente se tomaron 300 µL de la fase orgánica del balón y se colocó en un vial de 2 mL. A esta muestra se le añadieron 0.5 mL de piridina y 1 mL de BSFTA al 1% (N, O—Bistrifluoroacetamida) y se agitó el vial para mezclar su contenido. Una vez mezclado el contenido del vial, este está listo para análisis por cromatografía de gases utilizando las especificaciones previamente mencionadas (Cuadro 2).

Fase 3. Prueba de bioaccesibilidad del fortificado

Con base a los resultados de la fase 1 y 2 del nivel de fortificación del yogur, se determinó el grado de fortificación alcanzado en el yogur fortificado con fitoesteroles. Para esta fase se fue extrayendo yogur de empaques nuevos para los días 5 y 25, a los cuales se les realizaron los análisis correspondientes.

La vida de anaquel del yogur tradicional es de 25 días, por tal motivo las pruebas de bioaccesibilidad en el tiempo se realizarán en los días 5 y 25. Las pruebas a las que fueron sometidos los tratamientos durante este análisis se detallan a continuación:

Bioaccesibilidad.

Se simuló el proceso *in vitro* gástrico y gastrointestinal y se estimó el grado de solubilidad y captación de los fitoesteroles en la mucosa gastrointestinal mediante una adaptación de los métodos establecidos por Granado-Lorencio et al. (2007) y Alvarez-Sala et al. (2016). La adaptación consistió en la supresión del proceso final establecido por los autores previamente mencionados, en esta fase se

utilizaban enzimas como taurocolato de sodio y colesterol estearasa para complementar la digestión principal.

El proceso utilizado constó de tres etapas; salivar, donde se utilizaron sustancias inorgánicas, orgánicas y enzimáticas que simulan la composición de la saliva; gástrica, en la cual se utilizaron jugos gástricos; y la etapa duodenal y biliar, para la que se utilizaron fluidos duodenales y de la bilis. Todo el proceso se llevó a cabo utilizando los parámetros presentados a continuación: un peso de muestra de 20 g, agitación a 100 rpm, temperatura constante de 37 °C, peso constante entre repeticiones de 20 gramos, establecido de acuerdo con los métodos previamente citados y composición de los fluidos y duración de cada etapa de acuerdo con los métodos. La composición de los jugos para la simulación gastrointestinal que fue utilizada fue preparada de acorde al método utilizado por (Granado-Lorencio et al., 2007) como se muestra en el Cuadro 3. En la Figura 3 se muestra un esquema donde se observan los pasos seguidos durante la digestión *in vitro* y la preparación de los fitoesteroles para análisis.

Cuadro 3

Composición de jugos gástricos para el análisis de bioaccesibilidad.

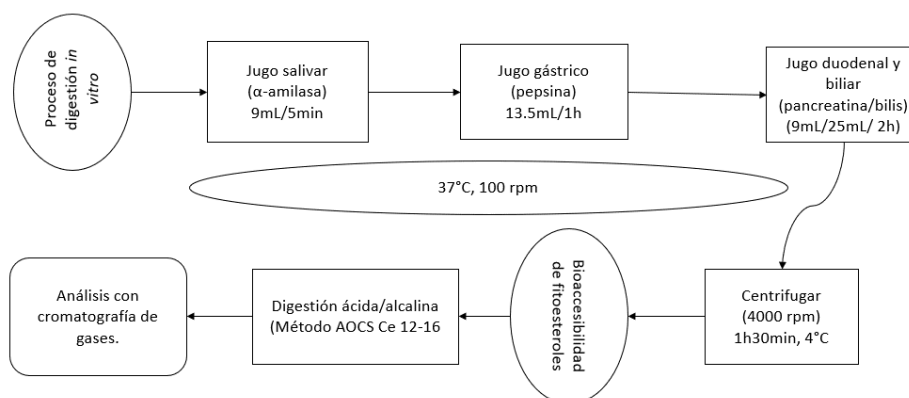
Componentes	Salivar	Gástrico	Duodenal	Bilis
Disoluciones inorgánicas (para 50 mL)	1mL KCl 89.6g/L	0.92mL KCl 89.6g/L	0.63mL KCl 89.6 g/L	
	1mL KSCN 20g/L	0.83mL HCl 37%(g/g)	4mL NaHCO ₃ 84.7g/L	3mL NaCl 175.3g/L
	1mL NaH ₂ PO ₄ 88.8g/L	0.3mL NaH ₂ PO ₄ 88.8g/L	1mL KH ₂ PO ₄ 8g/L	6.83mL NaHCO ₃ 84.7g/L
	170µL NaCl 175.3g/L	1.57mL NaCl 175.3g/L	4mL NaCl 175.3g/L	0.42mL KCl 89.6g/L
Disoluciones orgánicas (para 50 mL)	180µL NaOH 40g/L	1.8mL CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2g/L	1mL MgCl ₂ 5g/L	20µL HCL 37%(g/g)
		1mL NH ₄ Cl 30.6g/L	18µL HCl 37%(g/g)	
		0.34mL urea 25g/L		
		1mL Glucosa 65g/L		
	0.8mL Urea 25g/L	1mL ácido glucurónico 2g/L	0.4mL urea 25g/L	1mL urea 25g/L
		1mL glucosamina 33g/L		
Mezcla de ambas disoluciones y adición de:				
			0.9mL CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2g/L	0.18g BSA
	0.1mL α-amilasa	0.1g BSA	0.1g BSA	0.6g bilis
	1.5 mg ácido úrico	0.1g pepsina		1mL CaCl ₂ ·2H ₂ O 22.2g/L
	5 mg mucina	0.3g mucina	0.3g pancreatina	8.0 ± 0.2
pH	6.5 ± 0.2	1.07 ± 0.07	7.8 ± 0.2	

Nota. En la Figura 3 se puede observar la secuencia de los pasos que se realizaron para determinar la bioaccesibilidad de los fitoesteroles en el yogur, el proceso fue adaptado de la investigación realizada por (Alemany L, 2013).

En la Figura 3 se puede observar la secuencia de los pasos que se realizaron para determinar la bioaccesibilidad de los fitoesteroles en el yogur, el proceso fue adaptado de la investigación realizada por Alemany (2013).

Figura 3

Proceso seguido para la prueba de bioaccesibilidad.



Nota. Proceso adaptado de Alvarez-Sala et al. (2016) y Granado-Lorencio et al. (2007).

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Fase 1

Para la comparación del tamaño de partícula de los tratamientos F1C, F1CS, F2C y F2CS se utilizó un Diseño Completamente al Azar con separación de medias Duncan.

Para la comparación del contenido de fitoesteroles entre los tratamientos F1C y F2C se utilizó una prueba T pareada al 95% de nivel de confianza.

Fase 2

En la fase 2 se realizó una comparación entre el contenido de fitoesteroles en el encapsulado y los fitoesteroles encontrados en el yogur utilizando una prueba T pareada al 95% de confiabilidad.

Fase 3

En la fase 3 se realizó una comparación entre el contenido esperado de fitoesteroles en el yogur con el contenido real de fitoesteroles en el yogur utilizando una prueba T pareada al 95% de

confiabilidad. De igual forma se comparó los valores de bioaccesibilidad obtenidos para el día 5 y 25 de la vida de anaquel del Yogur utilizando una prueba T pareada al 95% de confiabilidad.

Resultados y Discusión

Fase 1

Perfil de Fitoesteroles en Concentrado Utilizado

El concentrado utilizado para la elaboración de los encapsulados fue sometido al análisis de fitoesteroles AOCS Ce 12-16 por cromatografía de gases, los resultados se detallan en el Cuadro 4. Se encontraron 16 esteroides a diferentes porcentajes siendo el compuesto predominante en la muestra el β -Sitosterol, representando el 46.16% del total de esteroides identificados, obteniendo datos similares a Agustina Di Battista (2016) quien reportó que el β -sitosterol apareció en un tiempo de retención de aproximadamente 23.49 minutos, siendo éste el pico más intenso del cromatograma. Además, se encontraron otros fitoesteroides, como el Estigmasterol (19.44%) y el Campesterol (15.34%), también presentes en proporciones significativas. Se observaron otros esteroides en cantidades menores, con concentraciones que oscilan entre el 0.26% y el 1.28%. Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos previamente por Salamanca y Cabezas (2022), donde el β -Sitosterol fue encontrado en mayor concentración, seguido del Campesterol y el Estigmasterol. Cabe mencionar que los porcentajes de los fitoesteroides pueden variar en función de la marca y el origen del concentrado utilizado. Esto sugiere la influencia de factores relacionados con la procedencia y procesamiento de la materia prima en la composición de fitoesteroides.

Cuadro 4

Concentración en porcentaje de esteroides y estanoles del concentrado.

Pico	Compuesto	% Fitoesteroides Concentrados Promedio \pm DE
1	Epicoprostanol	
2	Cholesterol *	0.278 \pm 0.012
3	Brassicasterol	0.165 \pm 0.04
4	Ergosterol *	0.278 \pm 0.086
5	24-Metileno Colesterol	0.261 \pm 0.008
6	Campesterol	15.349 \pm 0.059
7	Campestanol	0.732 \pm 0.028
8	Estigmasterol	19.444 \pm 0.265
9	Δ 22-Estigmasterol	0.848 \pm 0.172
10	Δ 7-Campesterol	0.396 \pm 0.004
11	Clerosterol + Δ 5,23-Estigmasteradienol	0.695 \pm 0.093
12	β -Sitosterol	46.164 \pm 0.112
13	Sitostanol	1.28 \pm 0.106

Pico	Compuesto	% Fitoesteroles Concentrados Promedio \pm DE
14	Δ 5-Avenasterol	1.103 \pm 0.002
15	Fucosterol	0.984 \pm 0.042
16	Δ 7-Estigmastenol	0.501 \pm 0.125
17	Δ 7-Avenasterol	0.263 \pm 0.040

Nota. DE: desviación estándar. * Indica los fitoesteroles que no son utilizados para el cálculo de fitoesteroles totales.

Tamaño de Partícula

De acuerdo con Huang et al. (2023), la morfología y el tamaño de una microencapsulación se ve influenciada por la tecnología utilizada, las condiciones de proceso, las características físico-químicas de los agentes encapsulantes y la proporción en la que los materiales fueron utilizados. En el estudio realizado por Salamanca L. and Cabezas M. (2022), se obtuvieron tamaños de partícula en un rango de 569 a 771 μ m utilizando la misma formulación que la utilizada para los tratamientos F1C y F1CS del presente estudio. Los tamaños de partícula de este estudio, presentados en el Cuadro 5, mostraron una reducción significativa con respecto a valores previamente obtenidos utilizando formulaciones y procesos similares, estos tamaños corresponden a un tamaño medio de partícula de 14.28 μ m para el F1C y de 7.44 μ m para el F2C, ambos con aplicación de cizalla de alta velocidad. La reducción de tamaño de partícula alcanzada en los tratamientos F1C y F2C se puede atribuir a la mejora del proceso y a la aplicación de mezclado de alta velocidad al que ambos tratamientos fueron sometidos, ya que de acuerdo con Li et al. (2017), “El mezclado de alta velocidad reduce el tamaño de partícula basado en el flujo turbulento y el estrés de cizalla hidrodinámico”.

Entre todos los tratamientos se presentó una diferencia significativa en el tamaño medio de partícula, pudiéndose apreciar que los tratamientos F1CS y F2CS tuvieron un menor tamaño de partícula respecto a los tratamientos F1C y F2C, para los cuales se utilizó la misma formulación, pero no fueron sometidos a sonicación (Cuadro 5). Esto se puede atribuir a las fuerzas producidas en el fenómeno de cavitación en el proceso de sonicación de las muestras. Según Böger et al. (2021), en la aplicación del ultrasonido, el fenómeno de cavitación causa que un líquido se comprima y expanda, lo que resulta en la formación de burbujas que al explotar reducen el tamaño de partícula. De acuerdo con Leong et al. (2017), la aplicación de sonicación en partículas encapsuladas genera partículas que

se encuentran en el rango de 100 nm a 20 μm . Lo que coincide con los tamaños obtenidos en la presente investigación.

Los tamaños de partícula obtenidos en todos los tratamientos representan un resultado positivo para la investigación. Ya que, según Tolve et al. (2020), es importante que los tamaños de partícula se mantengan por debajo de los 30 μm al momento de realizar la adición de un encapsulado a una matriz alimenticia, porque esto asegura que la encapsulación no afectará las características sensoriales y de textura del alimento. Por lo tanto, al momento de añadir la encapsulación al yogur en este caso u otra posible matriz alimenticia, el consumidor no debería ser capaz de notar la diferencia en textura entre un yogur fortificado y un yogur regular.

Cuadro 5

Comparación de tamaño de partícula entre tratamientos.

TRT	Tamaño de partícula (μm) \pm DE
F1C	14.29 \pm 1.02 ^a
F1CS	9.36 \pm 1.95 ^b
F2C	7.45 \pm 0.96 ^c
F2CS	5.04 \pm 1.30 ^d
CV%	5.05

Nota. DE: desviación estándar. F1C: Formulación 1 sometida a cizalla de alta velocidad. F1CS: Formulación 1 sometida a cizalla de alta velocidad y sonicación. F2C: Formulación 2 sometida a cizalla de alta velocidad. F2CS: Formulación 2 sometida a cizalla de alta velocidad y sonicación. ^{a-c}: Tratamientos con diferentes letras muestran diferencias significativas entre sus medias ($p < 0.05$).

Con base a los resultados obtenidos en las pruebas de tamaño de partícula, donde se encontró diferencia significativa entre los tratamientos, pero todos los tamaños de partícula se encontraron por debajo de los 30 μm y la limitación de herramientas con las que se contó para realizar las fases posteriores del estudio. Se decidió eliminar los tratamientos F1CS y F2CS y se prosiguió con la investigación únicamente con los tratamientos F1C y F2C como posibles candidatos para llevar a cabo la fortificación del yogur.

Comparación del Perfil de Fitoesteroides de los Encapsulados del F1C y F2C

En el análisis de las concentraciones de fitoesteroides encapsulados, se aplicó el método oficial de la AOCS Ce 12-16, diseñado específicamente para alimentos y suplementos dietéticos con una concentración menor al 20% de fitoesteroides. Los resultados, detallados en el Cuadro 6, revelan

algunas variaciones numéricas entre los diferentes fitoesteroles identificados en los encapsulados, sin embargo, estas diferencias no alcanzan la significancia estadística por lo que los encapsulados poseen la misma composición de fitoesteroles. Estos hallazgos sugieren que, en lo que respecta a los fitoesteroles encapsulados, ambos tratamientos no muestran diferencias sustanciales, a pesar de las diferencias en formulación y tamaño de partícula existentes entre estos tratamientos. Esto demuestra la encapsulación como un proceso consistente. Estos resultados corroboran las conclusiones de Cevallos J. (2019), quien también observó que las concentraciones de fitoesteroles encapsulados eran notablemente uniformes. En consecuencia, las ligeras variaciones numéricas de concentración entre los tratamientos se atribuyen principalmente a las propiedades de los materiales encapsulantes utilizados en el estudio y a posibles pérdidas durante el proceso de elaboración de los encapsulados.

Cuadro 6

Comparación de fitoesteroles encapsulados entre tratamientos F1C y F2C.

Variable	Media \pm DE		Pr> t
	%fitoesteroles (w/W)		
	F1C	F2C	
Cholesterol *	0.0281 \pm 0.0016	0.0249 \pm 0.0002	0.0925
Brassicasterol	0.0068 \pm 0.0013	0.0084 \pm 0.0030	0.4501
Ergosterol *	0.0213 \pm 0.0040	0.0192 \pm 0.0007	0.5861
24-Metileno Colesterol	0.0286 \pm 0.0022	0.0291 \pm 0.0033	0.8696
Campesterol	1.0504 \pm 0.1052	0.8905 \pm 0.0356	0.1416
Campestanol	0.2382 \pm 0.3150	0.0523 \pm 0.0026	0.4864
Estigmasterol	0.8044 \pm 0.6511	1.1141 \pm 0.0424	0.5691
Δ 22-Estigmasterol	0.0423 \pm 0.0096	0.0462 \pm 0.00003	0.6289
Δ 7-Campesterol	0.0596 \pm 0.0485	0.0260 \pm 0.0011	0.4216
Clerosterol + Δ 5,23-Estigmasteradienol	1.1581 \pm 1.8257	0.0116 \pm 0.0177	0.4995
β -Sitosterol	2.0500 \pm 1.7143	2.6150 \pm 0.1087	0.6886
Sitostanol	0.0942 \pm 0.0064	0.4767 \pm 0.5559	0.2829
Δ 5-Avenasterol	0.0756 \pm 0.0177	0.0767 \pm 0.0035	0.9384
Fucosterol	0.0559 \pm 0.0204	0.0537 \pm 0.0058	0.8936
Δ 7-Estigmasterol	0.0347 \pm 0.0085	0.0411 \pm 0.0046	0.4146
Δ 7-Avenasterol	0.0296 \pm 0.0074	0.0235 \pm 0.0038	0.4114

Nota. DE: desviación estándar. F1C: Formulación 1 expuesta a cizalla de alta velocidad. F2C: Formulación 2 expuesta a cizalla de alta velocidad. w/W: (relación entre peso de fitoesteroles de los fitoesteroles encontrados en la muestra con el peso de la muestra) x 100. Peso de muestra utilizado: 1mg. * Compuestos no utilizados para el cálculo total de fitoesteroles. Pr>|t|= Probabilidad para establecer diferencias significativas entre compuestos ($p < 0.05$).

Porcentaje (%) de Eficiencia de Encapsulación.

Con base a los resultados de contenido de fitoesteroles presentes en el tratamiento F1C y el tratamiento F2C, se calculó la eficiencia de encapsulación de cada uno de los tratamientos. Esta medida permitió saber qué cantidad del material original añadido a la encapsulación estuvo presente en el encapsulado final. El contenido de fitoesteroles en mg se presenta a en el Cuadro 7.

La eficiencia de encapsulación fue del 99.68% para el tratamiento F1C (Formulación 1 con aplicación de cizalla de alta velocidad) y de 84% para el tratamiento F2C (Formulación 2 con aplicación de cizalla de alta velocidad), respectivamente. Esto muestra que en el caso del tratamiento F1C la mayor parte de los fitoesteroles añadidos se encuentran presentes en el encapsulado. El tratamiento F2C tuvo una eficiencia de encapsulación del 84%, lo que implica que hubo pérdidas de fitoesteroles durante la preparación del encapsulado, esto puede atribuirse a una diversidad de factores, el principal de ellos es que de acuerdo con Takamura et al. (1979), al emplear emulsificantes individuales como Tween 20, se obtiene una menor capacidad emulsificante que al emplear mezclas como Tween 20 y Span 20. De manera similar, al momento de la preparación de los tratamientos se observó que el F2C se solidificaba considerablemente más rápido y a menor temperatura que el tratamiento F1C. Esto dificultó el proceso de mezclado de la fase dispersa con la fase continua y pudo ser causa de variación entre los tratamientos.

Cuadro 7

Contenido de fitoesteroles total por tratamiento (mg fitoesteroles/1 g de encapsulado).

Tratamiento	Media ± DE (mg/g)	Pr> t
F1C	6.24 ± 0.76	0.0948
F2C	5.25 ± 0.18	

Nota 1. DE: desviación estándar. F1C: Formulación 1 con cizalla de alta velocidad. F2C: Formulación 2 con cizalla de alta velocidad. Pr>|t|= Probabilidad establecida para establecer diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

Eficiencia de encapsulación tratamiento F1C:

$$\%Eficiencia\ de\ Encapsulación = \frac{6.23\ mg}{6.25\ mg} * 100 = 99.68$$

Eficiencia de encapsulación tratamiento F2C:

$$\%Eficiencia\ de\ Encapsulación = \frac{5.25\ mg}{6.25\ mg} * 100 = 84$$

Fase 2.

Selección del Tratamiento Utilizado.

Las pruebas realizadas de caracterización de tamaño de partícula para los encapsulados, de cantidad de fitoesteroles y de eficiencia de encapsulación sirvieron como principales factores de decisión al momento que se eligió el encapsulado que se utilizó para llevar a cabo la fortificación del yogur. Debido a que todos los tamaños de partícula de todos los tratamientos se encontraron por debajo de los 30 μm y no se encontraron diferencias significativas en la composición de los encapsulados ni en la cantidad de fitoesteroles encontrados en el encapsulado. Los principales criterios de decisión fueron la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de los encapsulados, y debido a esto se empleó el tratamiento F1C. Los tratamientos F2C y F2CS mostraron menor estabilidad en el tiempo ya que se logró identificar partículas visibles dentro de este, las cuales podían afectar las cualidades texturales y sensoriales de la matriz alimenticia a la que fueron añadidos. Con base a los criterios previamente mencionados, el microencapsulado elegido para llevar a cabo la fortificación fue el tratamiento F1C.

Para determinar el nivel de fortificación y cantidad de encapsulado a utilizar en el yogur, se buscó alcanzar la cantidad diaria de fitoesteroles recomendada por el RTCA, 2012/67.01.60:10 (2012), que es de 1.3 g de fitoesteroles proporcionado en dos porciones de alimento. Esto permite realizar la declaración saludable “puede reducir el riesgo de contraer una actividad coronaria o cardiaca”. Con tal objetivo en mente se llevó a cabo el siguiente proceso: Con la cantidad de fitoesteroles por gramo de encapsulado se calculó la cantidad necesaria de encapsulado a añadir en una porción de yogur de 225 g con el fin de conseguir aportar los 1.3 g solicitados por el RTCA en dos porciones al día.

En el Cuadro 8 se muestra el contenido de fitoesteroles en el tratamiento F1C obtenido en la fase preliminar.

Cuadro 8

Contenido de fitoesteroles del tratamiento F1C (mg/g encapsulado).

Tratamiento	Media \pm DE mg/g
FC1	62.37 \pm 0.72

Nota. DE: desviación estándar. F1C: Formulación 1 con cizalla de alta velocidad.

Utilizando el valor de contenido de encapsulado se estableció un nivel de fortificación óptimo del 5.3%, significando que de los 225 g de yogur que corresponden a una porción, 11.7 gramos serán de encapsulado. Esto aportaría 729.96 mg de fitoesteroles por porción de yogur o bien 620.69 mg de fitoesteroles en 100 g de yogur, dando un total de 1459 mg de fitoesteroles en dos porciones y alcanzando los niveles de fortificación requeridos por el RTCA para poder realizar la declaración saludable previamente mencionada.

Perfil de fitoesteroles del Encapsulado Utilizado.

Para llevar a cabo la fortificación se realizó una nueva preparación del encapsulado correspondiente al tratamiento F1C. Donde se obtuvo la composición de fitoesteroles que se muestra en el Cuadro 9. La composición del encapsulado preparado para fortificar el yogur posee una considerable similitud con el perfil de fitoesteroles encontrado en los encapsulados de la fase preliminar. Siendo los fitoesteroles más abundantes el β -Sitoesterol, Estigmasterol y el Campesterol.

Con este encapsulado se realizó la fortificación del yogur, añadiendo el encapsulado al momento previo de la inoculación para asegurar su correcta distribución en todo el producto.

Una vez finalizada la incubación, los yogures fueron puestos en refrigeración hasta alcanzar el ATECAL de empaque que fue de 0.75%.

Una vez se contó con el yogur empacado, se determinó la cantidad de fitoesteroles en 1 g de yogur, la cual se muestra en el Cuadro 9 y es proporcional al perfil de fitoesteroles encontrado en el encapsulado.

En el Cuadro 9 se muestra el perfil de fitoesteroles que se obtuvo del encapsulado que se utilizó para fortificar el yogur, lo cual mostró que el β -Sitosterol es el fitoesterol más predominante en el encapsulado, esto coincide con el estudio de Bardales A and Alemán J (2020), donde se muestra

una concentración promedio de alrededor del 2.52%, de estos esteroides, lo que es relevante, ya que este compuesto se ha asociado con la reducción del colesterol LDL en la dieta. Asimismo, el Estigmasterol y el Campesterol también están presentes en concentraciones notables, alcanzando un 1.07% y un 0.85%, respectivamente. Además, compuestos como el Ergosterol y el $\Delta 7$ -Avenasterol presentan concentraciones más bajas.

Cuadro 9

Perfil de fitoesteroides del encapsulado para fortificar el yogur.

Pico	Compuesto	%Fitoesteroides en encapsulado (W/w%) Media \pm DE
1	Epicoprostanol	-
2	Cholesterol*	0.0170 \pm 0.0000
3	Brassicasterol	0.0097 \pm 0.0015
4	Ergosterol*	0.0160 \pm 0.0046
5	24-Methylene Cholesterol	0.0250 \pm 0.0027
6	Campesterol	0.8457 \pm 0.0072
7	Campestanol	0.0467 \pm 0.0023
8	Stigmasterol	1.0707 \pm 0.0055
9	$\Delta 22$ -Stigmastenol	0.0463 \pm 0.0040
10	$\Delta 7$ -Campesterol	0.0267 \pm 0.0025
11	Clerosterol + $\Delta 5,23$ -Stigmastadienol	0.0843 \pm 0.0193
12	b-Sitosterol	2.5180 \pm 0.0178
13	Sitostanol	0.0787 \pm 0.0031
14	$\Delta 5$ -Avenasterol	0.0683 \pm 0.0042
15	Fucosterol + Unidentified	0.0517 \pm 0.0107
16	$\Delta 7$ -Stigmastenol	0.0353 \pm 0.0035
17	$\Delta 7$ -Avenasterol	0.0123 \pm 0.0015
Total		5.081

Nota. DE: desviación estándar. * Valores no tomados en cuenta para el cálculo de fitoesteroides totales. %W/w: (Relación peso de muestra con peso de fitoesteroides encontrados) x 100.

En el Cuadro 10 se muestra la cantidad de fitoesteroides del encapsulado utilizado para la fortificación del yogur, esta fue de 50.81 mg de fitoesteroides por gramo de encapsulado. Se presentó una diferencia de 12 mg/g con los datos obtenidos en la fase preliminar. Esto se atribuye a pérdidas ocurridas durante el proceso de elaboración del encapsulado, principalmente en el proceso de añadir la fase dispersa a la fase continua, donde una cantidad considerable de fitoesteroides se pierde en el proceso al quedar en las paredes del beaker en el que se preparó. A pesar de estas diferencias en el contenido de fitoesteroides del presente encapsulado con el de las pruebas preliminares el nivel de fortificación se mantuvo en 5.3%.

Cuadro 10

Contenido de fitoesteroles en 1 gramo de encapsulado utilizado para la fortificación.

Contenido de fitoesteroles en encapsulado	
Tratamiento	mg/g Media ± DE
FC1	50.81 ± 0.72

Nota. DE: desviación estándar. F1C: Formulación 1 con cizalla de alta velocidad.

Con base a los resultados obtenidos en la encapsulación elaborada para la fortificación es necesario modificar el valor de fitoesteroles que se espera encontrar en el yogur siendo este de 500.81 mg por cada 100 g de yogur, lo cual es equivalente a 2.69 mg de fitoesteroles por gramo de yogur.

Fase 3**Contenido de Fitoesteroles en el Yogur**

En el Cuadro 11 se muestra el perfil de fitoesteroles presentes en 1 gramo de yogur con sabor a fresa. Los fitoesteroles Estigmasterol y β -Sitoesterol emergen como los fitoesteroles más abundantes, con concentraciones de 0.16% y 0.43%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados observados en el Cuadro 9, donde se muestra el contenido de fitoesteroles en porcentaje del encapsulado utilizado para realizar la fortificación del yogur.

Cuadro 11

Perfil de fitoesteroles presentes en 1 gramo de yogur.

	Compuesto	Media ± DE %W/w Fitoesteroles en Yogur
1	Epicoprostanol	-
2	Cholesterol*	0.0073 ± 0.0015
3	Brassicasterol	0.0057 ± 0.0035
4	Ergosterol*	0.0103 ± 0.0128
5	24-Methylene Cholesterol	0.0147 ± 0.0132
6	Campesterol	0.1310 ± 0.1515
7	Campestanol	0.0177 ± 0.0245
8	Stigmasterol	0.1593 ± 0.1893
9	Δ 22-Stigmastenol	0.0223 ± 0.0250
10	Δ 7-Campesterol	0.0127 ± 0.0167
11	Clerosterol + Δ 5,23-Stigmastadienol	0.0483 ± 0.0274
12	β -Sitosterol	0.4277 ± 0.5606
13	Sitostanol	0.0257 ± 0.0332
14	Δ 5-Avenasterol	0.0303 ± 0.0390
15	Fucoesterol + Unidentified	0.0180 ± 0.0242
16	Δ 7-Stigmastenol	0.0107 ± 0.0107
17	Δ 7-Avenasterol	0.0180 ± 0.0228

Nota. DE: desviación estándar. * Valores no tomados en cuenta para el cálculo de fitoesteroles totales. %W/w: (Relación peso de muestra con peso de fitoesteroles encontrados) x 100.

Fitoesteroles en el Yogur y en el Encapsulado.

En el Cuadro 12 se presenta la comparación entre el porcentaje de fitoesteroles presentes en el microencapsulado y el perfil de fitoesteroles presentes en el yogur fortificado, considerando solamente los fitoesteroles añadidos al yogur de acuerdo con la formulación. Esta comparación muestra que la mayor parte de los fitoesteroles presentes en el microencapsulado se encuentran en la misma proporción dentro del yogur. Esto concuerda con una de las principales ventajas de añadir compuestos bioactivos encapsulados a una matriz alimenticia, la cual de acuerdo a Huang et al. (2023), es proveer al compuesto bioactivo de una protección contra el ambiente de la matriz alimenticia. Adicionalmente, protege a los fitoesteroles de posibles procesos oxidativos que pueden ocurrir durante la preparación y el almacenamiento del yogur, ya que de acuerdo a Soupas et al. (2006), en bebidas lácteas y yogures con fortificación utilizando fitoesteroles libres se encontraron diversos compuestos producto de la oxidación de los fitoesteroles en la matriz alimenticia. Estos productos de la oxidación de los fitoesteroles son conocidos como POPs (Oxidation Products of Phytosterols), por sus siglas en inglés. De acuerdo a Tolve, R. et al. (2018), los POPs no poseen ningún efecto benéfico para la salud y pueden cancelar los beneficios de la reducción del colesterol.

En el estudio realizado por Alemany, se encontró que el valor de los POPs varía significativamente durante el almacenamiento. La posible formación de POPs en el presente estudio no fue cuantificada, pero estos deben ser analizados utilizando el método descrito por (2001), que difiere considerablemente del método utilizado para analizar los fitoesteroles del yogur. Por consecuencia no hubo pérdida de fitoesteroles por la formación de óxidos y es posible decir que la encapsulación cumplió su función de proteger los fitoesteroles.

A pesar de que en la mayoría de los fitoesteroles no se presentó diferencia, si se registró una diferencia significativa para la cantidad de Campesterol, Estigmasterol y $\Delta 22$ -Estigmasterol dentro del

yogur. Esta diferencia puede atribuirse a pérdidas del encapsulado durante alguna parte del proceso como la adición al yogur.

Cuadro 12

Comparación de fitoesteroles presentes en encapsulado y en el yogur.

Compuesto	Media \pm DE		Pr> t
	%Fitoesteroles en Encapsulado	%Fitoesteroles en Yogur	
Cholesterol	0.0170 \pm 0.0000	0.0678 \pm 0.0592	0.2110
Brassicasterol	0.0096 \pm 0.0015	0.0597 \pm 0.0673	0.2678
Ergosterol	0.0160 \pm 0.0046	0.0515 \pm 0.0262	0.0819
24-Methylene Cholesterol	0.0250 \pm 0.0027	0.0970 \pm 0.0663	0.1334
Campesterol*	0.8457 \pm 0.0072	0.7190 \pm 0.0771	0.0472
Campestanol	0.0467 \pm 0.0023	0.0763 \pm 0.0227	0.0874
Stigmasterol*	1.0707 \pm 0.0055	0.8501 \pm 0.1202	0.0337
Δ 22-Stigmastenol*	0.0463 \pm 0.0040	0.1256 \pm 0.0349	0.0175
Δ 7-Campesterol	0.0267 \pm 0.0025	0.0549 \pm 0.0189	0.0622
Clerosterol + Δ 5,23-Stigmastadienol	0.0843 \pm 0.0193	0.4534 \pm 0.3713	0.1606
b-Sitosterol	2.5180 \pm 0.0178	2.0005 \pm 0.5573	0.1832
Sitostanol	0.0787 \pm 0.0031	0.1179 \pm 0.2531	0.0559
Δ 5-Avenasterol	0.0683 \pm 0.0042	0.1389 \pm 0.0635	0.1271
Fucosterol + Unidentified	0.0517 \pm 0.0107	0.0820 \pm 0.0195	0.0779
Δ 7-Stigmastenol	0.0353 \pm 0.0035	0.0640 \pm 0.0236	0.1061
Δ 7-Avenasterol	0.0123 \pm 0.0015	0.0816 \pm 0.0550	0.0948

Nota. DE: desviación estándar. * Variables que presentan diferencia significativa. Pr: probabilidad de error estadístico significativa ($p < 0.05$).

Nivel de Fortificación Alcanzado.

En el Cuadro 13 se muestra el contenido de fitoesteroles añadidos, de acuerdo con formulación, en 100 gramos de yogur y su comparación con el contenido de fitoesteroles encontrados en el yogur.

Como se puede observar, no se presentó diferencia significativa entre la cantidad de fitoesteroles añadidos al yogur y la cantidad de fitoesteroles medidos por medio de cromatografía de gases. Esto refuerza el argumento de que el encapsulado fue una manera eficiente de llevar los fitoesteroles a la matriz alimenticia, ya que de acuerdo a Alemany (2013), durante el almacenamiento se pueden generar óxidos de fitoesteroles si estos son añadidos en su forma libre a la matriz alimenticia. En este caso, el encapsulado protegió al yogur de la posible formación de dichos óxidos. El incremento en valor numérico de los fitoesteroles encontrados en el yogur respecto a los fitoesteroles añadidos al yogur se atribuye a las pérdidas de agua por evaporación durante el proceso

de elaboración del yogur, las cuales no fueron tomadas en cuenta al momento de realizar los cálculos correspondientes de fortificación.

Cuadro 13

Comparación de contenido de fitoesteroles añadidos y encontrados en el yogur en 100 g.

TRT	Media \pm DE	Pr> t
F1C	269.86 \pm 0.08	0.6388
Yogur fortificado	275.30 \pm 0.62	

Nota. F1C: Formulación 1 con cizalla de alta velocidad. Yogur fortificado: Yogur con adición de fitoesteroles encapsulados.

Con la cantidad de fitoesteroles encontrados en el yogur se puede establecer el nivel de fortificación alcanzado. Siendo este equivalente a 275.30 mg de fitoesteroles por cada 100 gramos de yogur o 619.43 mg de fitoesteroles por cada porción de 225 g de yogur. Esto equivale a un aporte de 1239 mg de fitoesteroles diarios repartidos en dos porciones, lo que a pesar de no ser suficiente para poder realizar la declaración saludable establecida por el RTCA, si es suficiente para realizar una declaración saludable establecida por la Comisión Reguladora de la Unión Europea, donde de acuerdo a (Shortt, 2015) se establece que 0.8 g de fitoesteroles provistos por un alimento en 1 o más porciones de este mismo permiten hacer la declaración saludable de “Ayuda a mantener los niveles de colesterol en sangre normales”. Cabe mencionar que si se hubiese corregido la cantidad de encapsulado a añadir en el yogur se hubiese alcanzado el nivel de fortificación originalmente planificado, ya que se encontraron todos los fitoesteroles añadidos originalmente al yogur.

Bioaccesibilidad de Fitoesteroles.

La bioaccesibilidad (BA) de los cuatro principales fitoesteroles presentes en el yogur antes y después de la digestión *in vitro* se muestra en el Cuadro 14. El colesterol fue suprimido del resultado de bioaccesibilidad del presente estudio, ya que no fue posible establecer valores de bioaccesibilidad para este componente. Esto se debe a dos principales motivos, siendo el primero que no se utilizaron las enzimas taurocolato sódico, colesterol estearasa, lipasa, colipasa y fosfolipasa A₂. Estas enzimas fueron utilizadas en previos estudios como los realizados por Granado L et al. (2007) y Alemany (2013)

y en estudios más recientes realizados por Makran et al. (2022), se determinó que “el uso de lipasa gástrica reduce hasta en un 47% los valores de bioaccesibilidad del colesterol. De forma similar, el uso de colesterol estearasa en combinación con lipasa gástrica reduce la bioaccesibilidad del colesterol entre un 50 y 60%”. Como segunda razón, no se incluyó los valores de bioaccesibilidad de colesterol por que los niveles de este mismo no fueron determinados en los reactivos utilizados durante el proceso de digestión *in vitro* empleado en este estudio. Esto puede afectar los valores de colesterol detectados en la fracción bioaccesible, ya que en el estudio de Makran et al. (2022) se demostró que las sales biliares y la pancreatina porcina son fuentes considerables de colesterol, a tal grado que la pancreatina porcina contribuye hasta con 1.7 mg de los encontrados en la digestión. De manera similar, se encontraron fitoesteroles en números despreciables dentro de los extractos previamente mencionados.

En el Cuadro 14 se presentan las cantidades de fitoesteroles encontradas en 1 g de yogur, la cantidad de los fitoesteroles encontrados en 1 g de la fracción biodisponible (FB) y los valores de bioaccesibilidad correspondientes a los días 5 y 25. La cantidad de fitoesteroles encontrada en la FB fue menor con respecto a las cantidades añadidas originalmente al yogur para todos los fitoesteroles evaluados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diversos estudios donde se ha realizado bioaccesibilidad por diversos protocolos y en diversos alimentos, en el aspecto que en todos se reportaron valores menores de los analitos de interés en la fracción bioaccesible a comparación del alimento original. Algunos ejemplos de estos estudios son los realizados por Ubeyitogullari and Ciftci (2019), Alemany (2013), y Tolve et al. (2018).

Respecto a los valores de bioaccesibilidad, de manera general se puede observar que la bioaccesibilidad de todos los fitoesteroles se redujo de un 42% en el día 5 a un 14% en el día 25 para, a pesar de que dicha reducción no fue causa de una diferencia significativa. Los valores de bioaccesibilidad en el día 5 corresponden a un 37% de BA para el Estigmasterol, un 39% para el β -stioesterol, un 55% para el Campestanol y un 68% para el Campesterol, siendo este último el fitoesterol que presentó mayor bioaccesibilidad y el Estigmasterol el menor. Esto corresponde al

orden de Bioaccesibilidad encontrado por Alemany (2013), donde se encontró que aunque sin diferencias significativas, el fitoesterol con mayor bioaccesibilidad en bebidas sabor a frutas de origen lácteo fue el Campesterol, seguido por el Campestanol, y en menor proporción en Estigmasterol y β -Sitoesterol. Por otro lado, en el día 25 la bioaccesibilidad se vio reducida para todos los fitoesteroles en más del 50%, encontrándose en un 12.7% para el Campesterol, un 13.36% para el Estigmasterol, un 15.8% para el β -Sitoesterol y un 28% para el Campestanol. A pesar de que estos valores fueron menores a los encontrados en el día 25, son comparables a los encontrados por Boyd et al. (2021), donde se obtuvieron valores de BA del (4-16.02%) para el Campesterol, (4.32-17.91%) para el Estigmasterol y (4.16-20.26%) para el β -Sitoesterol.

A pesar de la reducción de valores en BA encontrados en el presente estudio, estos se encuentran dentro del rango reportado por Ubeyitogullari and Ciftci (2019), donde se reportaron valores del 19% al 92% de bioaccesibilidad en diferentes matrices alimenticias evaluadas.

Cuadro 14

Bioaccesibilidad para principales fitoesteroles presentes en 100 g yogur.

Compuesto	Contenido en yogur (mg)	Media \pm DE				
		Contenido en FB D5 (mg)	Contenido en FB D25 (mg)	BA (%) Día 5	BA (%) Día 25	Pr> t para-BA
Campesterol	43.31 \pm 3.84	24.53 \pm 10.81	23.32 \pm 1.35	55.42 \pm 19.93	12.69 \pm 6.59	0.1025
Campestanol	3.72 \pm 8.20	2.69 \pm 1.53	5.20 \pm 6.24	68.35 \pm 25.42	28.00 \pm 4.80	0.1582
Stigmasterol	50.16 \pm 1.21	18.75 \pm 9.02	12.87 \pm 12.71	37.23 \pm 13.36	13.36 \pm 7.81	0.215
b-Sitosterol	5.95 \pm 2.46	39.16 \pm 21.64	15.79 \pm 8.61	39.33 \pm 25.94	15.85 \pm 10.33	0.3565
Total	201.32 \pm 7.85	83.10 \pm 40	29.21 \pm 9.16	42.69 \pm 22.99	14.69 \pm 8.72	0.2487

Nota. FB: Contenido de fitoesteroles obtenido de la fracción Bioaccesible. BA: Bioaccesibilidad. Día 5 y Día 25. Días de almacenamiento. BA calculado utilizando la formula: BA= (mg fitoesteroles en FB /mg fitoesteroles en alimento original) x 100. Pr>|t| para-BA: Probabilidad para establecer diferencias significativas entre los valores de Bioaccesibilidad del día 5 y 25.

Los resultados de bioaccesibilidad obtenidos tienen sus limitaciones debido al grado de complejidad que posee el sistema gástrico y el número de interacciones que aún no están clara o que son específicas para cada compuesto bioactivo, esto causa que exista diferencia entre los resultados de pruebas *in vivo* y pruebas *in vitro*. De acuerdo con Bohn et al. (2018), se ha observado que los valores obtenidos en la bioaccesibilidad *in vitro* suelen sobre estimar los valores de bioaccesibilidad *in vivo* debido a que no todos los compuestos bioactivos que son incorporados en las micelas serán

absorbidos por el cuerpo. Adicionalmente, estas diferencias podrían ser explicadas por el hecho que los estudios *in vitro* solo toman en consideración el contenido de fitoesteroles en la fracción soluble, sin considerar la influencia de los enterocitos en la absorción (Garcia-Llatas et al., 2015). A pesar de estas limitaciones. Los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* pueden ser utilizados como herramientas para comparar metodologías de fortificación de alimentos con compuestos bioactivos.

Conclusiones

Se encapsularon fitoesteroles de soya en una emulsión lípidos/agua alcanzando un tamaño de partícula que no afectó las propiedades texturales del yogur al que se añadió.

Se elaboró un yogur fortificado con fitoesteroles encapsulados que permite realizar una declaración saludable de acorde a la Comisión Reguladora Europea.

Se cuantificaron los valores de bioaccesibilidad *in vitro* en el yogur con sabor a fresa fortificado con fitoesteroles, donde se encontró que la bioaccesibilidad de los fitoesteroles rondó el 42%.

Recomendaciones

Utilizar un equipo de ultrasonido para reducir los tamaños de partículas y poder realizar la fortificación con una nano encapsulación.

Realizar un estudio *in vivo* donde se corroboren los efectos de los fitoesteroles y los valores de bioaccesibilidad obtenidos.

Realizar un análisis sensorial para determinar si existen diferencias entre el yogur fortificado y un yogur convencional.

Realizar pruebas de actividad enzimática para cada uno de los ingredientes orgánicos utilizados en la prueba de bioaccesibilidad *in vitro* y ajustar las cantidades de cada ingrediente en base a los resultados obtenidos.

Realizar un estudio de bioaccesibilidad *in vitro* utilizando el protocolo INFOGEST para comparar los resultados obtenidos.

Carvajal A. (2020). *Día mundial contra el colesterol – 19 de septiembre*. <https://scc.org.co/dia-mundial-contra-el-colesterol-19-de-septiembre/>

Cevallos J. (2019). *Optimización de la encapsulación de fitoesteroles de palma africana (Elaeis guineensis), con alginato de sodio como material encapsulante para su adición en yogur natural* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/5ab26869-9131-426b-8758-19340f85148f/content>

Ekmekcioglu, C. (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, 76(2), 225–230. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00291-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00291-6)

García-Llatas, G., Cilla, A., Alegría, A., & Lagarda, M. J. (2015). Bioavailability of plant sterol-enriched milk-based fruit beverages: In vivo and in vitro studies. *Journal of Functional Foods*, 14, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.023>

Granado L, Olmedilla A, Herrero B, Blanco N, & Perez, B. S. (2007). In vitro bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 102(3), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.043>

Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Pérez-Sacristan, B., Blanco-Navarro, I., & Blazquez-García, S. (2007). Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6387–6394. <https://doi.org/10.1021/jf070301t>

Huang, K., Yuan, Y., & Baojun, X. (2023). A Critical Review on the Microencapsulation of Bioactive Compounds and Their Application. *Food Reviews International*, 39(5), 2594–2634. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1963978>

Izadi, Z., Nasirpour, A., Garoosi, G. A., & Tamjidi, F. (2015). Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5341–5346. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1593-2>

Leong, T. S. H., Martin, G. J. O., & Ashokkumar, M. (2017). Ultrasonic encapsulation - A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35(Pt B), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.017>

Li, X., Wang, L., & Wang, B. (2017). Optimization of encapsulation efficiency and average particle size of Hohenbuehelia serotina polysaccharides nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 229, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.051>

Makran, M., Faubel, N., López-García, G., Cilla, A., Barberá, R., Alegría, A., & Garcia-Llatas, G. (2022). Sterol bioaccessibility in a plant sterol-enriched beverage using the INFOGEST digestion method: Influence of gastric lipase, bile salts and cholesterol esterase. *Food Chemistry*, 382, 132305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132305>

Martín M, Morales M, Gallardo V, & Ruiz M (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 50(1), 43–50. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/27475/Ars%20Pharm%202009%3b50%281%2943-50.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Nava E, Álvarez G, Iliná A, & Martínez J (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigacion Y Ciencia*, 23(66), 64–70. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67446014009>

Ortega E., Moize V., Zambón D., Yago G., & Amor A. (2018). *¿Qué es el Colesterol Alto o la Hipercolesterolemia?* Hospital Clinic Barcelona. <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/hipercolesterolemia>

Palou, A. (2005). *El Libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación* [Unilever Foods].

Etiquetado Nutricional de Productos Alimenticios Preenvasados Para Consumo Humano Para la Población a Partir de 3 Años de Edad, 2012. [nfotrade.minec.gob.sv/ca/wp-content/uploads/sites/7/2019/03/Anexo-RES-281-2012-RTCA-67016010-Etiquetado-nutricional-preenvasado-3-años-edad.pdf](https://www.nfotrade.minec.gob.sv/ca/wp-content/uploads/sites/7/2019/03/Anexo-RES-281-2012-RTCA-67016010-Etiquetado-nutricional-preenvasado-3-años-edad.pdf)

Rodés, J., Piqué, J. M., & Trilla, A. (2007). *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA: Alteraciones del colesterol y enfermedad cardiovascular*. Fundación BBVA.

Salamanca L., & Cabezas M. (2022). *Elaboración de un suplemento líquido a partir de fitoesteroides de soya (Glycine max)* [Proyecto Especial de Graduación]. Escuela Agrícola Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/items/4280370e-d7e0-4fa4-8414-34953fb189dc>

Sandoval, Rodríguez E, & Ayala Aponte (2011). Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos. *Ingeniería Y Competitividad*, 5(2), 73. <https://doi.org/10.25100/iyc.v5i2.2298>

Shortt, C. (2015). Authorised EU health claims for phytosterols. In *Foods, Nutrients and Food Ingredients with Authorised EU Health Claims: Volume 2* (Vol. 122, pp. 31–47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-382-9.00002-5>

Silva P., Pinheiro A., Rodríguez L., Figueroa V., & Baginsk C. (2016). *Fuentes naturales de fitoesteroides y factores de producción que lo modifican*. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2016/1/art-2/#>

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.-M., & Piironen, V. (2006). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 266–273. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0031-0>

Takamura, A., Minowa, T., Noro, S., & Kubo, T. (1979). Effects of tween and span group emulsifiers on the stability of o/w emulsions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 2921–2926. <https://doi.org/10.1248/cpb.27.2921>

Tolve, Condelli N, Caruso M, Barletta, D., Favati, F., & Galgano, F. (2018). Fortification of dark chocolate with microencapsulated phytosterols: Chemical and sensory evaluation. *Food & Function*, 9(2), 1265–1273. <https://doi.org/10.1039/C7FO01822C>

Tolve, R., Cela, N., Condelli, N., Di Cairano, M., Caruso, M. C., & Galgano, F. (2020). Microencapsulation as a Tool for the Formulation of Functional Foods: The Phytosterols' Case Study. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/foods9040470>.

Tolve, R., Condelli, N., Can, A., & Tchienbou-Magaia, F. L. (2018). Development and Characterization of Phytosterol-Enriched Oil Microcapsules for Foodstuff Application. *Food and Bioprocess Technology*, 11(1), 152–163. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1990-4>

Ubeyitogullari, A., & Ciftci, O. N. (2019). In vitro bioaccessibility of novel low-crystallinity phytosterol nanoparticles in non-fat and regular-fat foods. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 123, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.014>

Valenzuela B., A., & Ronco M., A. M. (2004). Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la proteccion de la salud cardiovascular. *Revista Chilena De Nutrición*, 31. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182004031100003>

van Campen, D. R., & Glahn, R. P. (1999). Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research*, 60(1-2), 93–113. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(98\)00135-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(98)00135-X)