

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



Proyecto Especial de Graduación
Elaboración de un suplemento líquido a partir de fitoesteroles de soya
(*Glycine max*)

Estudiantes:

Laura Salamanca Arenas

Melanie Ashley Cabezas Jiménez

Asesores

Luis Fernando Maldonado, Ph.D.

Raul Espinal, Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora 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.....	12
Localización del Estudio	12
Materiales.....	12
Fase Experimental.....	12
Metodología	13
Fase 1. Pruebas Preliminares	13
Elaboración de Tratamientos	14
Flujo de Proceso para la Elaboración de Tratamientos	16
Fase 2. Evaluación de Características Físicoquímicas.....	17
Análisis Físicos.....	17
Análisis Químico.....	18
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	20
Resultados y Discusión.....	21
Análisis Físicoquímicos.....	21
Viscosidad	21

	4
Color	22
Morfología	24
Potencial de Hidrógeno (pH).....	26
Perfil de Fitoesteroles	28
Conclusiones.....	33
Recomendaciones.....	34
Referencias	35

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Parámetros determinados para la elaboración de un suplemento líquido con adición de fitoesteroles de soya (<i>Glycine max</i>) por medio de una emulsión.	15
Cuadro 2 Resultados de viscosidad (mPa.S) a 20, 50, 80, 110 y 140 rpm para cada tratamiento.	21
Cuadro 3 Probabilidades obtenidas para 20, 50, 80, 110 y 140 rpm.....	22
Cuadro 4 Resultados en escala L, a, b e IB de análisis de color de los tratamientos.	23
Cuadro 5 Probabilidades obtenidas en la interacción de las variables evaluadas para valor el L, a, b e IB.....	24
Cuadro 6 Tamaño promedio de partícula (μm) para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.	25
Cuadro 7 Probabilidades obtenidas en el tamaño de partícula.	26
Cuadro 8 Potencial de hidrógeno promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.	27
Cuadro 9 Probabilidades obtenidas en el potencial de hidrógeno.	27
Cuadro 10 Tiempos de retención y concentración en porcentaje (%) de esteroles y estanoles encontrados en la muestra de concentrado utilizado en el presente estudio.	28
Cuadro 11 Concentración en porcentaje de β -Sitosterol, Campesterol y Estigmasterol para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.	30
Cuadro 12 Probabilidades obtenidas en la concentración en porcentaje de β -Sitoesterol, Campesterol y Estigmasterol.	30
Cuadro 13 Porcentaje de solubilidad en agua promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.	32
Cuadro 14 Probabilidades obtenidas en el índice de solubilidad en agua.	32

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema que muestra el flujo de proceso para la elaboración del suplemento líquido a partir de fitoesteroles de soya (<i>Glycine max</i>).	16
Figura 2 Imágenes tomadas por microscopio óptico invertido a un aumento de 40X, para distintos tratamientos.	24

Resumen

El consumo de suplementos a base de fitoesteroles promueve la reducción del colesterol total, niveles de LDL (Lipoproteína de Baja Densidad) y las Enfermedades No Transmisibles (ENT). En este estudio, se desarrolló una formulación y flujo de proceso para la elaboración de un suplemento líquido a partir de fitoesteroles de soya (*Glycine max*). Se utilizó un Diseño completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 3×2 , en donde se evaluaron las relaciones entre Agua: Emulsificante (15:1 y 7:1) y Tween 20: Span 20 (1.5:1.0, 1.0:1.0 y 0.5:1.0), utilizando LSMEANS para la comparación entre las medias y la interacción entre niveles de los factores con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Se evaluó la viscosidad, color, morfología, potencial de hidrógeno, perfil de fitoesteroles y su solubilidad en agua. Se obtuvo una mayor viscosidad en el tratamiento con una relación 0.5:1 de Tween 20: Span 20 con una relación 7:1 de Agua: Emulsificante. Para el color, se identificaron valores de L^* en un rango de 91.19 a 93.93, valores de a^* de 0.62 a 1.06, valores de b^* de 2.60 a 4.73 y el índice de blancura de 75.23 a 82.51. Los tamaños de partícula oscilaron en un rango de 569.65 a 771.04 μm . Los valores de pH variaron no fueron diferentes significativamente. El tratamiento con una relación 0.5:1 de Tween 20: Span 20, y una relación 15:1 de Agua: Emulsificante tuvo una mejor recuperación de β -Sitosterol, Campesterol y Estigmaesterol. Se recomienda evaluar la bioaccesibilidad del suplemento líquido a base de fitoesteroles de soya.

Palabras claves: colesterol, emulsificante, morfología, partícula, solubilidad.

Abstract

The consumption of phytosterol-based supplements promotes the reduction of total cholesterol, levels of LDL (Low Density Lipoprotein) and Non-Communicable Diseases (NCDs). In this study, a formulation and process flow were developed for the preparation of a liquid supplement from soybean phytosterols (*Glycine max*). A Completely Randomized Design (CRD) was used with a 3 × 2 factorial arrangement, where the ratios between Water:Emulsifier (15:1 and 7:1) and Tween 20: Span 20 (1.5:1.0, 1.0:1.0 and 0.5:1.0) were evaluated, using LSMEANS for the comparison between means and the interaction between factor levels with a significance level of $P \leq 0.05$. Viscosity, color, morphology, hydrogen potential, phytosterol profile and water solubility were evaluated. A higher viscosity was obtained in treatment with a 0.5:1 ratio of Tween 20: Span 20 with a 7:1 ratio of Water:Emulsifier. For color, L^* values were identified in a range from 91.19 to 93.93, a^* values from 0.62 to 1.06, b^* values from 2.60 to 4.73 and the whiteness index from 75.23 to 82.51. The particle sizes ranged from 569.65 to 771.04 μm . The pH values varied were not significantly different. The treatment with a 0.5:1 ratio of Tween 20: Span 20, and a 15:1 ratio of Water:Emulsifier had a better recovery of β -Sitosterol, Campesterol and Stigmasterol. It is recommended to evaluate the bioaccessibility of the liquid supplement based on soy phytosterols.

Keywords: cholesterol, emulsifier, morphology, particle, solubility

Introducción

En la actualidad existen distintos problemas relacionados a la salud, entre ellos se encuentran las Enfermedades No Transmisibles (ENT), como son las cardiovasculares, las cuales están vinculadas a la dieta. Cada año mueren por ENT en todo el mundo alrededor de 15 millones de personas entre las edades de 30 y 69 años; en la región de las Américas mueren 2.2 millones de personas por esta causa antes de cumplir 70 años (OPS 2020).

Las tendencias de consumo actuales arrojan a los consumidores a preferir alimentos no solo de buen sabor si no que fortalezcan y nutran, esto debido a la preocupación que les surge por su salud, por el brote de distintas enfermedades. Lo que dirige al consumo de una dieta más saludable, reforzada por alimentos funcionales, que brindan propiedades nutricionales y se enfocan en beneficiar funciones específicas. “Evidencias científicas indicaron que los alimentos, además de nutrientes, pueden contener compuestos bioactivos capaces de prevenir diversas enfermedades y/o fortalecer el sistema inmunológico” (De Ancos et al. 2016).

Una alternativa para esta problemática es impulsar el consumo de suplementos alimenticios que promueven la reducción del colesterol; uno de los principales elementos que ayudan a reducir el colesterol total y los niveles de LDL (colesterol malo) son los fitoesteroles. Los fitoesteroles constituyen un modelo muy adecuado para el desarrollo de alimentos funcionales ya que aportan un complemento saludable a una dieta equilibrada que ayuda a reducir y/o controlar los niveles de colesterol, y con esto, las enfermedades cardiovasculares.

Los fitoesteroles se consideran colesteroles vegetales; ya que son compuestos lipídicos derivados de plantas que son similares en estructura y funciones al colesterol. Los esteroides vegetales se encuentran naturalmente en las partes de todas las plantas y los investigadores afirman que pueden promover la salud del cuerpo humano y de los animales cuando se consumen regularmente durante un período razonable, ya sea en alimentos naturales o en suplementos alimenticios enriquecidos (Ogbe et al. 2015).

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) incluso aprobó una declaración de propiedades saludables sobre los fitoesteroles, que establece: "Alimentos que contienen al menos 0.65 gramos por porción de ésteres de esteroides vegetales de aceite vegetal, consumidos dos veces al día con las comidas para una ingesta diaria total de al menos 1.3 gramos, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, puede reducir el riesgo de enfermedades del corazón" (Muñoz Jáuregui et al. 2011).

El contenido de estos compuestos dependerá de su origen vegetal. 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/100g, girasol 225 mg/100g y maní 127 mg/100 g (Silva et al. 2016).

El germen de soya tiene una densidad de nutrientes relativamente baja. Son principalmente el grano y sus productos derivados los que tienen una mayor proporción (Rosas Morales 2006). Entre estos productos derivados se encuentran los esteroides, principalmente Estigmasterol, β -Sitoesterol y Campesterol (Silva et al. 2016). Comercialmente estos se obtienen de la extracción del destilado desodorante de aceite de soja (Prizzon et al. 2005).

El proceso de extracción de fitoesteroides inicia con la esterificación y transesterificación del aceite crudo donde se producen ésteres metílicos. A partir de la destilación al vacío de los ésteres metílicos se recupera el concentrado de fitonutrientes, en este proceso los componentes con mayor peso molecular se filtran durante la destilación al vacío de la segunda etapa. Finalmente, pasa por un proceso de saponificación donde se purifican los fitonutrientes y la materia insaponificable hace parte de solventes para la cristalización de fitoesteroides (Barrera López y Arrubla Vélez 2017; Martínez Hernández y Santana Parra 2019).

A pesar de los altos beneficios de los fitoesteroides, estos no se pueden consumir directamente, ya que pueden contribuir directamente a la aterogénesis. El efecto que tienen al consumirse es que al tener una estructura similar con el colesterol compiten con este por la absorción en el sistema

digestivo, lo que provoca que se bloquee la absorción de colesterol y se reduzcan los niveles de colesterol en sangre (ClevelandClinic 2019). El principal efecto fisiológico del consumo de fitoesteroles (2 a 3 g/día durante 21 a 30 días) es la reducción reportada del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un 10 a 15% (Wang 2015).

Los suplementos son productos creados para complementar la alimentación o la dieta que incluyen ingredientes tales como vitaminas, minerales, hierbas, aminoácidos y enzimas. Su objetivo es aportar nutrientes que en momentos puntuales o por algunas circunstancias, no se estén consumiendo en cantidades suficientes y también para reducir el riesgo de enfermedades. No se deben de sustituir por completo a las comidas que son necesarias para una dieta saludable. Estos se los pueden encontrar en formas de tabletas, cápsulas, perlas, cápsulas de gel, polvos y líquidos (FDA 2022). Los suplementos no son dañinos cuando se consumen de manera adecuada.

Debido al beneficio que pueden aportar los fitoesteroles en la salud humana, se han desarrollado diversas estrategias para aplicarlos en matrices alimenticias. Sin embargo, su baja solubilidad y biodisponibilidad es una limitante en su uso, ya que no se puede añadir en las cantidades recomendadas por los entes reguladores. Debido a esto, la presente investigación busca encontrar una formulación que permita su aplicación en las cantidades recomendadas de dosis diarias en matrices alimenticias acuosas, por lo cual los objetivos de estudio fueron:

Determinar una formulación y flujo de proceso para elaboración de un suplemento líquido a partir de fitoesteroles de soya (*Glycine max*).

Evaluar las características fisicoquímicas del suplemento líquido a partir de fitoesteroles de soya (*Glycine max*).

Determinar el efecto de la relación entre emulsificantes Tween 20: Span 20 y Agua: Emulsificantes, a partir de la eficiencia en solubilidad y contenido de fitoesteroles.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ), del Departamento de Agroindustria Alimentaria, esto incluyendo el desarrollo de las muestras con distintas formulaciones y los análisis fisicoquímicos de las mismas. El análisis físico, tamaño de partícula y morfología, se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria. Dichas instalaciones se encuentran en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el km 30 carretera de Tegucigalpa a Danlí, Valle del Yeguaire, Municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras.

Materiales

Mezcla de fitoesteroles de soya *Glycine max* (95% phytosterols, 40% beta-sitosterol, NuSci®, 348 Paseo Tesoro, Walnut, CA 91789, EE. UU.). Monolaurato de sorbitano Span 20 (Sigma-Aldrich, EE. UU.), monolaurato de polioxietilensorbitano Tween 20 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), goma guar y goma xanthan (adquiridas de un distribuidor local) y agua desionizada. Se utilizó agua desionizada para todos experimentos, la cual fue obtenida de un sistema de purificación de agua “Barnstead™” “Nanopure™” (“Thermo Scientific”, Waltham, MA, EE. UU.). Otros reactivos fueron utilizados para la realización de análisis químicos. Los mismos se utilizaron sin modificación.

Fase Experimental

La investigación se llevó a cabo en dos fases. La primera fase consistió en la realización y formulación de cada tratamiento, incluyendo pruebas preliminares. En la segunda fase se evaluaron las características fisicoquímicas de cada tratamiento.

Metodología

Fase 1. Pruebas Preliminares

Consistió en la búsqueda de combinaciones óptimas que permitieron la emulsión, logrando retener el mayor contenido de fitoesteroles en la formulación, esto con la finalidad de proveer la dosis diaria de fitoesteroles al consumidor.

Se realizaron pruebas preliminares para definir las relaciones entre emulsificantes Tween 20: Span 20 y la relación Agua: Emulsificante. El proceso consistió en prueba y error evaluando diferentes relaciones de emulsificantes, los cuales se mantuvieron en el margen de nivel máximo permitido para Span 20 (2000 mg/kg) y para Tween 20 (1000 mg/kg) para emulsiones grasas según el (RTCA 2012). Buscando usar el mayor porcentaje de fitoesteroles en la formulación.

A partir de distintas combinaciones de la fase dispersa, la cual consistió en las distintas concentraciones de los emulsificantes Span 20 y Tween 20, y los fitoesteroles, se estableció el porcentaje máximo de fitoesteroles a utilizar. Los emulsificantes sirvieron como solvente para los fitoesteroles, para ellos se calentaron en una estufa a 95 °C, temperatura que facilitó la disolución de los fitoesteroles, los cuales se agregaron lentamente mientras se agitaban a 300 rpm.

Asimismo, para la fase continua se llevó el agua desionizada a una temperatura de 95 °C, momento en el que se aplicaron las gomas Xanthan y Guar poco a poco para evitar la formación de grumos y se mantuvo una agitación de 300 rpm que permitió la hidratación de las gomas. Las gomas se mantuvieron a 0.05%, ya que mayores concentraciones generan soluciones con alta viscosidad, pudiendo formar pastas, las cuales no eran deseadas en el estudio.

A partir de esto se estableció un 6.25% de fitoesteroles por tratamiento, porcentaje que se definió por la homogeneidad en la dispersión hidrocoloidal. Disponiendo de ese dato se estableció una relación entre emulsificantes Tween 20: Span 20 y una relación entre el agua y los emulsificantes.

Elaboración de Tratamientos

La emulsión consistió en la fase dispersa, fitoesteroles de soya (*Glycine max*) a una concentración del 6.25%, Tween 20 y Span 20 a diferentes relaciones. Por otra parte, la fase continua consistió en agua desionizada, goma guar (0.5%) y goma xanthan (0.5%).

Ambas fases se calentaron por separado a una temperatura de 95 °C por 10 min. Se adicionaron lentamente las gomas al agua desionizada para la fase continua y los fitoesteroles en los emulsificantes, Tween 20: Span 20, para la fase dispersa. Ambas fases se mantuvieron en agitación de 300 rpm para facilitar la disolución de las gomas y los fitoesteroles, respectivamente.

Posteriormente se mezclaron las dos fases añadiendo el contenido de la fase dispersa a la fase continua. Para la mezcla se mantuvo la temperatura a 95 °C, y se homogenizó con el agitador magnético a 500 rpm por 10 min hasta formar una pre-emulsión gruesa. Después se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente (24 °C aproximadamente).

Se realizaron seis formulaciones, las cuales variaron en las relaciones entre Agua: Emulsificantes (15:1 y 7:1) y Tween 20: Span 20 (1.5, 1.0, y 0.5). Se efectuaron tres repeticiones por cada tratamiento para un total de 18 unidades experimentales (Cuadro 1).

Cuadro 1

Parámetros determinados para la elaboración de un suplemento líquido con adición de fitoesteroles de soya (Glycine max) por medio de una emulsión.

Tratamiento	Material	Porcentaje (%)
TRT1	Agua desionizada	87.95
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	2.28
	Tween 20	3.42
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05
TRT2	Agua desionizada	82.40
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	4.5
	Tween 20	6.76
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05
TRT3	Agua desionizada	87.93
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	2.86
	Tween 20	2.86
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05
TRT4	Agua desionizada	82.37
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	5.64
	Tween 20	5.64
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05
TRT5	Agua desionizada	87.97
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	3.78
	Tween 20	1.9
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05
TRT6	Agua desionizada	82.40
	Fitoesteroles	6.25
	Span 20	7.5
	Tween 20	3.75
	Goma Guar	0.05
	Goma Xanthan	0.05

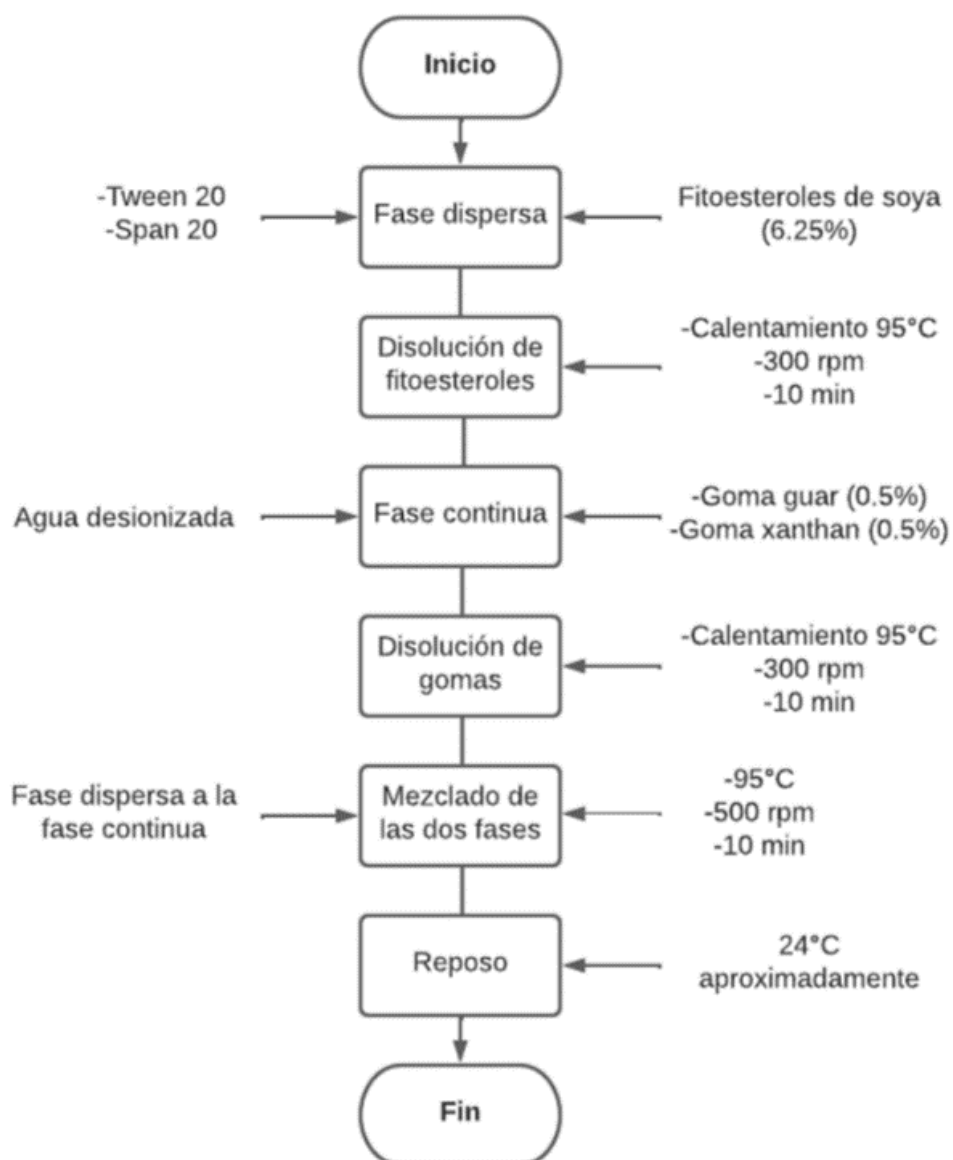
Nota. TRT: Tratamiento.

Flujo de Proceso para la Elaboración de Tratamientos

A partir de las pruebas preliminares se logró determinar un flujo de proceso que permitió la disolución de los fitoesteroles, como se muestra en la Figura 1.

Figura 1

Esquema que muestra el flujo de proceso para la elaboración del suplemento líquido a partir de fitoesteroles de soya (*Glycine max*).



Fase 2. Evaluación de Características Físicoquímicas

Análisis Físicos

Viscosidad.

Para este análisis se determinaron las propiedades reológicas del suplemento líquido, mediante un análisis físico de viscosidad a diferentes tasas o velocidades de cizalla utilizando el Reómetro de Brookfield LVDV-III Ultra (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, EE.UU.) (ISO 1652:2011 2011). Para el análisis, se depositarán 200 mL de cada tratamiento en un beaker, el cual se homogenizó por un minuto con una batidora de mano marca Kitchenaid modelo 5khbv83. Se aplicaron 15 tasas de cizallamiento, desde 20 a 140 rpm en incrementos de 10 rpm; tomando mediciones cada dos minutos entre las tasas de cizalla. Para dicho análisis se empleó un Spindle RV #5 para la medición.

Color.

Se utilizaron muestras de 10 mL usando el Colorflex de Hunterlab® por el método AN 1018.00. Al iniciar el análisis, se calibró el equipo utilizando los estándares negro y blanco. La lectura se realizó colocando la muestra en un vaso para líquidos y cubriéndola con el cobertor blanco para evitar variaciones de lectura. Se evaluó el color de las 18 unidades experimentales haciendo uso de una escala triestímulo con los valores L, a y b.

Con los valores L, a, b se calculó el Índice de Blancura (IB). El Índice de Blancura es una medida, en la cual si se tiene un valor de 100 indica que es una superficie blanca ideal (Montoya López et al. 2012). Para transformar los datos de la escala L, a, b a IB se empleó la Ecuación 1 (E12 Committee 2020):

$$IB = L - 3b + 3a [1]$$

Donde:

IB = Índice de Blancura

L = Luminosidad, escala blanco y negro

a = tonalidades verdes (-) y rojo (+)

b = tonalidades azules (-) y amarillo (+)

Los valores de Índice de Blancura superiores a 100 representan colores blancos azulados, mientras que los valores menores a 100 son blancos amarillentos. El blanco ideal está representado en esta escala por 100 (Montoya López et al. 2012).

Morfología.

El tamaño de partícula fue medido por un valor promedio de 10 partículas por repetición para identificar el tamaño de cada uno de los tratamientos. Se utilizó un microscopio invertido de marca Mshot MI11, con un aumento de 40x, al cual se le ubicó una cámara Dino-Eye AM-423X para poder observar las imágenes a la pantalla. Estas imágenes se pudieron observar y medir mediante el programa de Dino Capture 2.0 versión 2.0, a una escala de micrómetros para determinar el tamaño de las partículas y la morfología.

Análisis Químico

Potencial de Hidrógeno (pH).

El potencial de hidrógeno es una medida que ayuda a determinar el grado de alcalinidad o acidez de una solución, las cuales son determinadas por la concentración de H⁺. Se midió por medio del potenciómetro digital marca OAHUS modelo STARTER 2100, a través del método AOAC 981.12 (Takegami y Yoshida 1975). Para la medición de pH, se realizaron tres soluciones buffer estándar para calibrar el potenciómetro (pH 4, 7 y 10). Posterior a cada medición se lavó con agua destilada la sonda medidora. Se evaluó cada repetición sumergiendo la sonda en 100 mL de muestra en un beaker de 250 mL.

Perfil de Fitoesteroles.

La medición del perfil y cuantificación de fitoesteroles encapsulados se realizó en un cromatógrafo de gases (CG) (Agilent 6890 Serie GC System, EE.UU.), el cual posee un software CG ChemStation 2010.

Haciendo uso del método AOCS Ce 12-16, se preparó una solución estándar interno (IS) con Epicoprostanol, 5 β -colestano-3 α -o1 (5 mg/mL) disuelto en tolueno. Para cada uno de los tratamientos y sus repeticiones se pesó 1 g en un matraz de 50 mL, se colocaron cinco 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 tres min y se dejó en reposo dos 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 cinco 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 fitoesteroles, se extrajeron 300 μ L de la fase orgánica, los cuales se mezclaron 250 μ L de Piridina, 500 μ L de BSTFA al 1% (N, O-Bistrifluoroacetamida),. Se añadieron 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 dos min. Finalmente, se analizó cada muestra en el cromatógrafo de gases.

Índice de Solubilidad en Agua.

Se pesaron 2 g de cada muestra en tubos de ensayo de centrifugación, y se agregaron 24 mL de agua desionizada a temperatura ambiente. Se agitaron a 2,500 rpm por cinco min en un Vortex (Fisherbrand, EE. UU.). Posteriormente, se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 min. Por último, se extrajo el sobrenadante, el cual se colocó en un plato Petri y se llevó al horno a 105°C por 18 horas. Para determinar el porcentaje de solubilidad se usó la siguiente Ecuación 2.

$$\% \text{Porcentaje de solubilidad} = \frac{P_i - PMI}{P_i} * 100 \quad [2]$$

Donde:

P_i= Peso inicial.

PMI= Peso del material insoluble.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para la evaluación de los análisis físicoquímicos se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 3 × 2. Las variables evaluadas fueron la relación entre Agua: Emulsificante (15:1 y 7:1) y la relación Tween 20: Span 20 (1.5:1.0, 1.0:1.0, y 0.5:1.0). Se efectuaron tres repeticiones por cada tratamiento para un total de 18 unidades experimentales.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando LSMEANS para la comparación entre las medias y la interacción entre niveles de los factores. Para el análisis de los datos se utilizó el programa "Statistical Analysis System" (SAS®, versión 9.4).

Resultados y Discusión

Análisis Físicoquímicos

Viscosidad

La reología de los alimentos es el estudio de la consistencia y el flujo de los alimentos bajo fuerzas aplicadas específicas, para comprender los principios físicoquímicos subyacentes de la "estructuración" por los materiales alimentarios y su interacción (Day y Golding 2016).

En el Cuadro 2 se observan los resultados obtenidos de viscosidad expresado en Pascales por segundo (Pa.s), para 20, 50, 80, 110 y 140 revoluciones por minuto (rpm). Los seis tratamientos mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las diferentes revoluciones por minuto aplicados.

Por otro lado, se determinó que en todos los tratamientos evaluados al aumentar la velocidad (rpm) o tasa de cizalla, la viscosidad se redujo. Este comportamiento indica que el fluido tiene propiedades de pseudoplástico, debido a la disminución de su viscosidad al aumentar la velocidad de deformación aplicada. Resultados similares se encontraron al evaluar emulsiones de aceite en agua con distintas proporciones de Span 83 y Tween 80 las cuales presentaron un comportamiento de flujo no newtoniano (Jiao y Burgess 2003). Asimismo, se evaluó la viscosidad de un chocolate con adición de fitoesteroles y emulsificantes, tratamientos en los cuales se presentó una viscosidad pseudoplástica como en el presente estudio (Efraim et al. 2011)

Cuadro 2

Resultados de viscosidad (mPa.S) a 20, 50, 80, 110 y 140 rpm para cada tratamiento.

TRT	20 rpm Media \pm DE	50 rpm Media \pm DE	80 rpm Media \pm DE	110 rpm Media \pm DE	140 rpm Media \pm DE
1	275.13 \pm 15.61 ^E	173.73 \pm 12.43 ^E	130.43 \pm 10.20 ^E	109.83 \pm 9.13 ^F	97.63 \pm 9.45 ^F
2	283.93 \pm 23.65 ^{DE}	193.07 \pm 21.81 ^{DE}	159.50 \pm 8.71 ^D	140.67 \pm 5.46 ^E	130.07 \pm 2.64 ^E
3	532.37 \pm 14.18 ^C	343.83 \pm 15.65 ^C	262.40 \pm 22.77 ^C	207.63 \pm 16.67 ^C	170.10 \pm 15.64 ^C
4	321.73 \pm 14.68 ^D	221.90 \pm 25.50 ^D	179.30 \pm 27.63 ^D	162.57 \pm 16.87 ^D	148.97 \pm 9.70 ^D
5	991.97 \pm 30.11 ^B	572.43 \pm 7.98 ^B	436.17 \pm 3.61 ^B	342.30 \pm 2.20 ^B	295.03 \pm 2.94 ^B
6	1087.67 \pm 33.71 ^A	782.73 \pm 3.17 ^A	616.43 \pm 3.23 ^A	517.67 \pm 9.21 ^A	444.70 \pm 8.25 ^A
CV (%)	4.01	4.28	5.29	4.58	4.31
P Valor	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Nota. TRT 1, relación Tween 20: Span 20 1.5:1, relación Agua: Emulsificante 15:1; TRT 2, relación Tween 20 : Span 20 1.5:1, relación Agua: Emulsificante 7:1; TRT 3, relación Tween 20: Span 20 1:1, relación Agua: Emulsificante 15:1; TRT 4, relación Tween 20 : Span 20 1:1, relación Agua: Emulsificante 7:1; TRT 5, relación Tween 20: Span 20 0.5:1, relación Agua: Emulsificante 15:1; TRT 6, relación Tween 20 : Span 20 0.5:1, relación Agua: Emulsificante 7:1. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje; DE= Desviación Estándar; ^{A-F} = Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

El Tratamiento 6 presentó mayor viscosidad con una relación 0.5:1 de Tween 20: Span 20, y una relación 7:1 de Agua: Emulsificante. Mientras el Tratamiento 1 presentó una menor viscosidad con una relación Tween 20: Span 20 1.5:1 y una relación Agua: Emulsificante 15:1. En el Cuadro 3 se puede observar que el factor Tween 20: Span 20 y Agua: Emulsificante influye significativamente en la viscosidad, al igual que existió una interacción entre la relación Tween 20: Span 20 y Agua: Emulsificante, ya que presentaron un valor P menor a 0.05, lo que indican diferencia significativa. En un estudio similar, se evaluaron seis emulsiones de aceite en agua con diferentes concentraciones de surfactante, y se reportó un mayor valor de viscosidad a menores cantidades de surfactante (Oduntan 2017), lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio.

Cuadro 3

Probabilidades obtenidas para 20, 50, 80, 110 y 140 rpm.

Variables	Valor-p 20 rpm	Valor-p 50 rpm	Valor-p 80 rpm	Valor-p 110 rpm	Valor-p 140 rpm
RTS	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
RAE	0.01	0.00	0.00	<.0001	<.0001
RTS*RAE	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
CV (%)	4.01	4.28	5.29	4.58	4.31
R2	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00

Nota. RTS, es la relación Tween 20 : Span 20; RAE, es la relación Agua: Emulsificante y RTS*RAE, es la interacción entre la relación Tween 20 : Span 20 y la relación Agua: Emulsificante. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Color

Se analizaron los valores L, a, b, los cuales describen el color en una escala de tres ejes de coordenadas. El valor L mide claridad u oscuridad en una escala de 0 a 100, negro y blanco respectivamente. El valor a mide los colores rojo y verde, donde los valores positivos se asignan a rojo, valores negativos a verde y el valor 0 a tonalidades grises. Finalmente, el valor b mide los colores azul y amarillo, valores positivos para amarillo, valores negativos para azul y el valor 0 tonos grises.

Con base a los resultados presentados en el Cuadro 4, se puede observar que no existió diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos. En relación con la luminosidad L, el Tratamiento 1 con una relación Tween 20: Span 20 1.5:1 y con una relación Agua: Emulsificante 15:1 obtuvo el valor más alto con una media de 93.93, a diferencia del Tratamiento 4 con una relación Tween 20: Span 20 1:1 y con una relación Agua: Emulsificante 7:1 que obtuvo el valor más bajo con una media de 91.19. Los valores de a y b no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo anterior mencionado, se realizó el Índice de Blancura (IB) para determinar si estos se acercan al blanco ideal. El IB es una medida que correlaciona las clasificaciones visuales de la blancura para determinadas superficies blancas y se puede utilizar para cualquier material que su color parezca blanco. Según el Cuadro 4 y 5, el Tratamiento 5 fue el que más se acercó al blanco ideal en comparación a los demás tratamientos. Los fitoesteroles se caracterizan como un polvo ceroso cristalino o un polvo granular de flujo libre que es blanco a blanquecino y prácticamente inodoro (Chairman et al. 2014). Además, según se ha reportado en estudios anteriores, las emulsiones aceite en agua tienden a presentar tonalidades blancas, siendo su color básico, lo cual pudo influir en el resultado final del color de los tratamientos (Llano LE et al. 2016).

Cuadro 4

Resultados en escala L, a, b e IB de análisis de color de los tratamientos.

Relación Tween 20: Span 20	Relación Agua: Emulsificante	L \pm DE	a \pm DE	b \pm DE	IB
1.5:1	15:1	93.93 \pm 0.77 ^A	0.72 \pm 0.46 ^{AB}	3.53 \pm 0.90 ^{BC}	81.16 \pm 1.98 ^C
1.5:1	7:1	92.62 \pm 1.16 ^{AB}	1.06 \pm 0.15 ^B	4.73 \pm 1.34 ^A	75.23 \pm 4.62 ^F
1:1	15:1	93.04 \pm 0.57 ^{AB}	0.87 \pm 0.26 ^{AB}	3.01 \pm 0.77 ^{BC}	81.42 \pm 2.50 ^B
1:1	7:1	91.19 \pm 0.24 ^C	0.97 \pm 0.08 ^{AB}	3.58 \pm 0.50 ^{BC}	77.52 \pm 1.41 ^E
0.5:1	15:1	92.15 \pm 0.77 ^{BC}	0.62 \pm 0.19 ^A	2.60 \pm 0.61 ^C	82.51 \pm 1.49 ^A
0.5:1	7:1	92.13 \pm 0.98 ^{BC}	0.88 \pm 0.09 ^{AB}	3.76 \pm 0.16 ^B	78.21 \pm 0.83 ^D
CV (%)		0.87	0.41	22.64	2.01
PValor		0.02	0.31	0.09	0.0011

Nota. L (luminosidad); a rojo (+) y verde (-); b amarillo (+) y azul (-); IB (Índice de blancura); DE: Desviación Estándar; CV(%): Coeficiente de Variación; ^{A-C} = Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5

Probabilidades obtenidas en la interacción de las variables evaluadas para valor el L, a, b e IB.

VARIABLES	Valor p L	Valor p a	Valor p b	Valor p IB
Relación Tween 20 : Span 20	0.04	0.04	0.12	0.11
Relación Agua: Emulsificante	0.02	0.06	0.02	<.0001
Relación Tween 20 : Span 20* Agua: Emulsificante	0.17	0.70	0.75	0.53
CV (%)	0.87	0.41	22.64	22.64
R2	0.63	0.36	0.51	0.51

Nota. CV(%): Coeficiente de Variación.

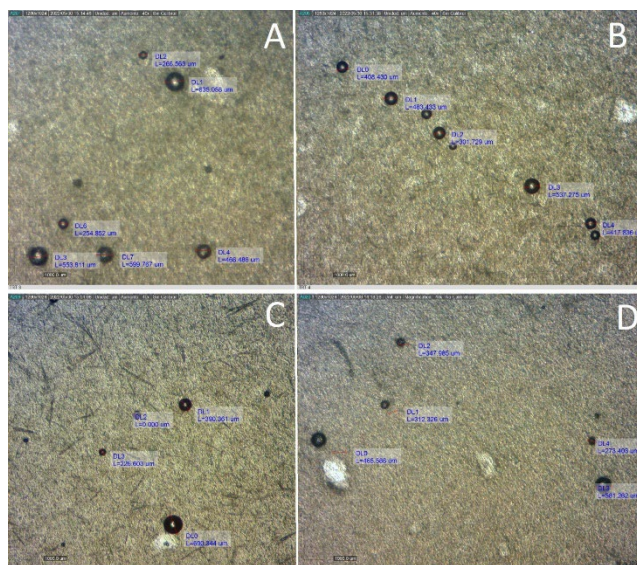
Morfología

Los fosfolípidos pueden existir en una variedad de formas dependiendo de su tipo, concentración, pH y fuente de aceite en la fase oleosa (Pichot et al. 2013). Al reducir el tamaño de partícula de los fitoesteroles se puede mejorar la estabilidad de la dispersión, entre más pequeños son, más área superficial contienen por unidad de volumen, y por lo tanto pueden ser mezclados más eficientemente con los otros ingredientes en los alimentos (Acevedo Estupiñán 2017).

En la Figura 2 se muestra que las estructuras observadas son gotas redondas típicas en las emulsiones, las cuales se forman al recubrir las gotas de la fase dispersa (Acevedo Estupiñán 2017).

Figura 2

Imágenes tomadas por microscopio óptico invertido a un aumento de 40X, para distintos tratamientos.



Nota. A = (Relación Tween 20 : Span 20 1:1, relación Agua: Emulsificante 15:1); B = (Relación Tween 20 : Span 20 1:1, relación Agua: Emulsificante 7:1); C = (Relación Tween 20 : Span 20 0.5:1, relación Agua: Emulsificante 7:1); D = (Relación Tween 20 : Span 20 1.5:1, relación Agua: Emulsificante 15:1).

Una vez enfriada la mezcla emulsificada se obtiene una dispersión acuosa de fitoesteroles de gran estabilidad y de tamaño medio, en general menor a 1000 nm (Harting Glade et al. 2010). En el Cuadro 6 se muestran que el tamaño de partícula fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos evaluados. Los tamaños oscilaron en un rango de 569.65 a 771.04 μm . Valores menores a los comparados con un estudio, en el cual se utilizó diferentes concentraciones de Tween 20 y Span 20 como agentes emulsificantes de aceite de Triglicéridos de Cadena Media (TCM) con promedio de tamaño de partícula de 924 a 1061 μm . En el mismo estudio se indicó que el incremento del contenido de aceite de TCMs también incrementa el tamaño de las gotas y la viscosidad del sistema (Wan Rusmawati et al. 2001).

Para obtener una dispersión de fitoesteroles de menor tamaño o reducir la dispersión de tamaños de partícula alrededor del tamaño medio, en vez de enfriar la mezcla emulsificada, dicha mezcla emulsificada se puede homogenizar (Harting Glade et al. 2010). Como se muestra en un estudio similar, donde se presentaron tamaños de partícula entre 10.187 y 33.121 μm . Esta diferencia puede deberse a que en dicho estudio se llevó la fase dispersa a una temperatura de 130 a 140 °C a 700 rpm, seguido de la unión de las fases a 3000 rpm (Izadi et al. 2012).

Cuadro 6

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

Relación Tween 20: Span 20	Relación Agua: Emulsificante	Tamaño de partícula (μm) ME \pm DE
1.5:1	15:1	586.15 \pm 16.50 ^{BC}
1.5:1	7:1	529.62 \pm 42.23 ^C
1:1	15:1	627.25 \pm 61.6 ^B
1:1	7:1	492.50 \pm 49.10 ^C

Relación Tween 20: Span 20	Relación Agua: Emulsificante	Tamaño de partícula (μm) ME \pm DE
0.5:1	15:1	726.48 \pm 68.57 ^A
0.5:1	7:1	701.64 \pm 69.54 ^A
CV (%)		8.92
P Valor		0.0011

Nota. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje; DE= Desviación Estándar; ^{A-C} = Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Según el análisis en el Cuadro 7, se estableció que el tamaño de partícula fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$), teniendo como parámetros de influencia mayormente la relación Tween 20 : Span 20 y la relación Agua: Emulsificante. No existió una interacción entre ambos factores. Como se reportó en un estudio donde el diámetro de las partículas decrecía al incrementar el valor HLB y la concentración del emulsionante (Park y Kim 2021). Con respecto a la relación Agua: Emulsificante, se demostró en un estudio que el aumento en el tamaño promedio de las gotas y la disminución de la velocidad de sedimentación están influenciados por el contenido de agua, el cual está asociado con el efecto de la población de gotas, por lo cual, un mayor contenido de agua causa un mayor tamaño de partícula (Souza WJ. et al. 2015).

Cuadro 7

Probabilidades obtenidas en el tamaño de partícula.

Variables	Valor p
Relación Tween 20 : Span 20	0.0004
Relación Agua: Emulsificante	0.0159
Relación Tween 20 : Span 20* Agua: Emulsificante	0.2386
CV (%)	8.92
R2	0.78

Nota. CV(%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Potencial de Hidrógeno (pH)

Con el potenciómetro digital marca OAHUS modelo STARTER 2100 se evaluó el pH de cada uno de los tratamientos. Según los resultados obtenidos en el Cuadro 8 y 9, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores de pH variaron en un rango de 5.37 a 5.62 debido a la presencia de Span 20 y las gomas Guar y Xanthan los cuales cuentan con valores de pH de

(5.5), (5-7) y (2-12), respectivamente. Teniendo como resultado un pH ligeramente ácido. Según Kulthanan et al. 2013 el agua desionizada tiene un pH 7, pero cuando entra en contacto con el dióxido de carbono atmosférico, puede reducir su pH a tan solo 5.5. Los resultados de pH se deben a las relaciones, las cuales, entre sí, tienen un pH ácido. El pH es uno de los factores que más influyen en la estabilidad de una forma en solución acuosa para garantizar la calidad de la formulación elaborada y éste debe mantenerse estable durante todo el periodo de validez y conservación establecidas (Vázquez-Blanco et al. 2018). Las emulsiones tienen un gran impacto en la industria alimentaria, debido al pH que presentó la emulsión, este puede ser añadido a alimentos como el yogur, café, chocolate, ya que estos presentan de igual manera pH ácidos.

Cuadro 8

Potencial de hidrógeno promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.

Relación Tween 20: Span 20	Relación Agua: Emulsificante	pH Media \pm DE
1.5:1	15:1	5.38 \pm 0.13 ^A
1.5:1	7:1	5.62 \pm 0.17 ^A
1:1	15:1	5.60 \pm 0.33 ^A
1:1	7:1	5.45 \pm 0.15 ^A
0.5:1	15:1	5.37 \pm 0.07 ^A
0.5:1	7:1	5.50 \pm 0.23 ^A
CV (%)		3.59
P Valor		0.5188

Nota. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje; DE= Desviación Estándar; ^{A-C} = Valores seguidos por letras iguales en la misma columna son estadísticamente iguales ($P \geq 0.05$).

Cuadro 9

Probabilidades obtenidas en el potencial de hidrógeno.

Variabes	Valor p
Relación Tween 20 : Span 20	0.7411
Relación Agua: Emulsificante	0.4589
Relación Tween 20 : Span 20* Agua: Emulsificante	0.2385
CV (%)	3.59
R2	0.27

Nota. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Perfil de Fitoesteroles

La cromatografía de gases permitió identificar y cuantificar el perfil de esteroides y estanoles presentes en cada tratamiento y en el concentrado de fitoesteroides utilizado. Para ello, los fitoesteroides se derivatizaron a Ésteres de Trimetilsililo (TMS) y fueron separados y cuantificados utilizando el método AOCS Ce 12-16. Se han descrito más de 200 tipos diferentes de esteroides vegetales en diferentes especies de plantas, siendo los más abundantes: el β -fitoesterol, campesterol y estigmasterol, constituyendo el 95-98% de los fitoesteroides identificados (Muñoz Jáuregui et al. 2011).

Se informó que el principal fitoesterol presente en la semilla de soja es el β -fitoesterol (43 – 67 %), seguido del campesterol (17 –34 %) y el estigmasterol (10 –30 %) (Hwang et al. 2020). Datos que concuerdan con el análisis del concentrado de la mezcla de fitoesteroides utilizado en el presente estudio, el cual demostró que tienen una concentración total promedio de 95.72%, de los cuales 24.46% son Campesteroides, 22.08% son Estigmasteroides y 40.83% son β -Sitosteroides. Estos últimos datos son similares a los declarados en el certificado de análisis del producto. El cual indica un contenido de 95% de fitoesteroides dentro de los cuales 40% son β -Sitosteroides. Otros esteroides y estanoles se encontraron presentes en menor cantidad y fueron identificados en el Cuadro 10.

Cuadro 10

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

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	% Fitoesteroides concentrados Promedio \pm DE		
1	Epicoprostanol	-	-		
2	Cholesterol *	31.074	0.607	\pm	0.002
3	Brassicasterol	33.15	0.041	\pm	0.001
4	Ergosterol *	34.55	0.115	\pm	0.001
5	24-Metileno Colesterol	35.095	0.322	\pm	0.004
6	Campesterol	35.985	24.46	\pm	0.013 0.008
7	Campestanol	36.484	0.741	\pm	

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	% Fitoesteroles concentrados Promedio \pm DE		
8	Estigmasterol	38.793	22.08	\pm	0.043
9	Δ 22-Estigmastenol	39.39	0.534	\pm	0.004
10	Δ 7-Campesterol	40.638	0.359	\pm	0.004
11	Clerosterol + Δ 5,23-Estigmastadienol	42.42	0.487	\pm	0.005
12	β -Sitosterol	44.434	40.83	\pm	0.041
13	Sitostanol	44.903	1.104	\pm	0.008
14	Δ 5-Avenasterol	45.817	1.251	\pm	0.008
15	Fucoesterol	48.508	0.575	\pm	0.007
16	Δ 7-Estigmastenol	49.478	1.887	\pm	0.011
17	Δ 7-Avenasterol	51.486	0.322	\pm	0.002

Nota. * No incluido en el cálculo de esteroides; DE = Desviación Estándar.

Para todos los tratamientos se encontraron 14 esteroides y estanoles los cuales los principales son β -Sitosterol, Campesterol y Estigmaesterol, de igual forma se detectaron los otros 11 esteroides y estanoles que se encontraron en un rango de 0.157 – 0.429% en menor proporción. Al igual que en un estudio donde los tratamientos también presentaron todos los mismos fitoesteroides en porcentajes similares, pero en cantidades diferentes, de acuerdo con su encapsulación. Por lo tanto, el proceso de encapsulación no afectó el perfil de fitoesteroides, sino la cantidad total de fitoesteroides recuperados (Bardales Castellanos y Alemán Martínez 2020). En este caso el proceso de emulsión no afectó el perfil de fitoesteroides, sino la cantidad total de fitoesteroides recuperados.

A partir de los fitoesteroides individuales indicados en el Cuadro 11, se pudo establecer que el Tratamiento 5, con una relación Tween 20: Span 20 0.5:1, Agua: Emulsificante 15:1, tuvo una mejor recuperación de β -Sitosterol, Campesterol y Estigmaesterol. En un estudio se desarrolló una bebida funcional de frutas a base de leche con fitoesteroides modificados con componentes lipídicos/emulsionantes para aumentar la biodisponibilidad de los fitoesteroides. Los autores encontraron que el contenido de fitoesteroides sumados e individuales, grasa, tipo de emulsificante y homogeneidad en las bebidas diferían. Los datos mostraron que la disponibilidad de fitoesteroides está influenciada tanto por el tipo/cantidad de grasa como por el tipo de emulsionante utilizado (Alvarez-Sala et al. 2016).

Efectos que se pueden rectificar con los resultados obtenidos en el Cuadro 12, que de acuerdo con el análisis de medias LSMeans, se pudo establecer que existe un efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) de las tres variables sobre el contenido de β -Sitosterol y Campesterol. Mientras que para el contenido de Estigmaesterol se encontró un efecto significativo en la relación Tween 20 : Span 20 y la interacción con la relación Tween 20 : Span 20* Agua: Emulsificante.

Cuadro 11

Concentración en porcentaje de β -Sitosterol, Campesterol y Estigmaesterol para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.

RTS	RAE	(%) β -Sitosterol Media \pm DE	(%) Campesterol Media \pm DE	(%) Estigmaesterol Media \pm DE
1.5:1	15:1	2.27 \pm 0.16 ^C	1.445 \pm 0.058 ^C	0.939 \pm 0.086 ^C
1.5:1	7:1	1.04 \pm 0.05 ^E	0.568 \pm 0.049 ^F	0.587 \pm 0.049 ^D
1:1	15:1	1.60 \pm 0.11 ^D	0.966 \pm 0.082 ^E	0.930 \pm 0.073 ^C
1:1	7:1	2.36 \pm 0.17 ^C	1.340 \pm 0.0311 ^D	1.458 \pm 0.009 ^B
0.5:1	15:1	3.03 \pm 0.03 ^A	1.778 \pm 0.03532 ^A	1.711 \pm 0.057 ^A
0.5:1	7:1	2.79 \pm 0.03 ^B	1.671 \pm 0.0257 ^B	1.528 \pm 0.039 ^B
CV (%)		4.95	3.915271	4.841049
P Valor		<.0001	<.0001	<.0001

Nota. RTS, es la relación Tween 20 : Span 20; RAE, es la relación Agua: Emulsificante y RTS*RAE, es la interacción entre la relación Tween 20 : Span 20 y la relación Agua: Emulsificante. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje; DE= Desviación Estándar; ^{A-C} = Valores seguidos por diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Cuadro 12

Probabilidades obtenidas en la concentración en porcentaje de β -Sitoesterol, Campesterol y Estigmaesterol.

Variables	Valor p β - Sitoesterol	Valor p Campesterol	Valor p Estigmaesterol
Relación Tween 20: Span 20	<.0001	<.0001	<.0001
Relación Agua: Emulsificante	0.00	<.0001	0.95
Relación Tween 20: Span 20* Agua: Emulsificante	<.0001	<.0001	<.0001
CV (%)	4.95	3.92	4.84
R2	0.98	0.99	0.99

Nota. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Índice de Solubilidad en Agua

Los fitoesteroles y los ésteres de fitoesteroles son insolubles en agua y tienen una solubilidad limitada en disolventes no polares, como el hexano. Los fitoesteroles tienen cierta solubilidad en medios hidrófobos, como grasas y aceites, pero su solubilidad depende del método de extracción y del tipo de fitoesterol (Zychowski 2018).

En el Cuadro 14, se observa que las relaciones Tween 20: Span 20 y Agua: Emulsificante presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. En el Cuadro 13 los Tratamientos 2, con una relación Tween 20: Span 20 1.5:1 y con una relación Agua: Emulsificante 7:1, y 4 con una relación Tween 20: Span 20 1:1 y con una relación Agua: Emulsificante 7:1 presentaron la mayor solubilidad con valores de 14.70 y 14.10, respectivamente. Estos dos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí. Los otros tratamientos evaluados presentaron una menor solubilidad, en un rango de 6.33 a 11.81. Estos resultados demuestran la manipulación de la relación Tween 20: Span 20 y Agua: Emulsificante pueden influir en la solubilidad de los fitoesteroles, por lo cual existe una brecha de estudio sobre estos parámetros. El utilizar sistemas emulsionantes de diversos valores de HLB, permite la emulsificación de una amplia gama de compuestos oleosos.

En otro estudio, los fitoesteroles se encapsularon en un aceite TAG de cadena media con un emulsionante Tween y se añadió lecitina o monoacilglicerol. Los resultados demostraron que tanto la encapsulación como la lecitina fueron las más efectivas para mejorar la solubilidad del fitoesterol, ya que las emulsiones con un 30% de lecitina y fitoesterol no cristalizaron incluso después de 60 días de almacenamiento (Engel y Schubert 2005).

En el estudio de Yuan *et al.* (2019), se determinó la solubilidad de los fitoesteroles sobre Tween 20, Tween 60 y Tween 80, en donde la menor solubilidad de fitoesteroles se presentó en el Tween 20, con un valor aproximadamente de 5 mg/g (Chuanxun *et al.* 2019).

En un estudio se documentó que la solubilidad del fitoesterol en agua podría alcanzar hasta 2.122 mg de fitoesterol sobre mL de emulsificante (0.21% de solubilidad), es decir hasta 155 veces

mayor que la del fitoesterol crudo (Li et al. 2021). Ambas investigaciones muestran datos menores a los encontrados en el presente estudio.

Cuadro 13

Porcentaje de solubilidad en agua promedio para los diferentes tratamientos y separación de medias por tratamiento.

Tratamiento	Relación Tween 20: Span 20	Relación Agua: Emulsificante	Solubilidad en agua ME ± DE
1	1.5:1	15:1	7.26 ± 0.48 ^C
2	1.5:1	7:1	14.70 ± 0.89 ^A
3	1:1	15:1	6.83 ± 0.31 ^C
4	1:1	7:1	14.10 ± 0.71 ^A
5	0.5:1	15:1	6.33 ± 0.47 ^C
6	0.5:1	7:1	11.81 ± 1.03 ^B
CV (%)			6.87
P Valor			<0.0001

Nota. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje. ^{A-C} = Valores seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P ≤ 0.05).

Cuadro 14

Probabilidades obtenidas en el índice de solubilidad en agua.

Variables	Valor p
Relación Tween 20: Span 20	0.0014
Relación Agua: Emulsificante	<.0001
Relación Tween 20: Span 20* Agua: Emulsificante	0.0579
CV (%)	6.86
R2	0.97

Nota. CV (%) = Coeficiente de Variación en porcentaje.

Conclusiones

Se desarrolló un flujo de proceso para la elaboración de un suplemento líquido con fitoesteroles de soya (*Glycine Max*) con las operaciones básicas y equipo necesario para la misma en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ).

El tamaño de partícula y color fueron afectados por la relación Tween 20: Span 20 y la relación Agua: Emulsificante, mientras que el pH no presentó cambios entre tratamientos.

El contenido de fitoesteroles recuperados fue afectado por la relación Tween 20: Span 20 y la relación Agua: Emulsificante para Estigmasterol, mientras que para β -sitoesterol y Campesterol también afectó la interacción entre dichas relaciones.

A menor relación de Agua: Emulsificante hubo una mayor solubilidad de fitoesteroles de soya (*Glycine Max*) en el suplemento líquido.

Recomendaciones

Se recomienda el uso de un ultrasonido para mejorar el proceso de homogenización y reducir el tamaño de partícula.

Se recomienda el uso de otros emulsionantes con valores de HLB, verificando su uso en suplementos alimentarios, altos para emulsiones aceite: agua.

Se recomienda evaluar la bioaccesibilidad del suplemento líquido a base de fitoesteroles de soya (*Glycine max*).

Se recomienda evaluar su aplicación distintas matrices alimentarias.

Se recomienda evaluar la estabilidad de la emulsión en el tiempo.

Referencias

- Acevedo Estupiñan MVP. 2017. Caracterización físico-química de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con emulsificantes modificados [Tesis para maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica]. Veracruz Ver. México: Tecnológico Nacional de México, Instituto tecnológico de Veracruz; [consultado el 13 de may. de 2022]. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/bitstream/TecNM/2531/1/Acevedo%20Estupin%cc%83an%20M%20V%20P%202017%20Caracterizaci%3%b3n%20f%3%a%20qu%3%admica%20de%20nanoemulsiones%20OW%20de%20fitoesteroles%20formuladas%20con%20emulsificantes%20modificados.pdf>.
- Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. No. 283-2012 (2012).
- Alvarez-Sala A, Garcia-Llatas G, Cilla A, Barberá R, Sánchez-Siles LM, Lagarda MJ. 2016. Impact of Lipid Components and Emulsifiers on Plant Sterols Bioaccessibility from Milk-Based Fruit Beverages. *J Agric Food Chem*; [consultado el 12 de feb. de 2022]. 64(28):5686–5691. eng. doi:10.1021/acs.jafc.6b02028.
- Bardales Castellanos AS, Alemán Martínez JA. 2020. Evaluación de la encapsulación de fitoesteroles de palma africana (*Elaeis guineensis*) utilizando diferentes concentraciones de gelatina, maltodextrina y relaciones de acetona: agua [Tesis de pregrado]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [consultado el 13 de mar. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/67a896d2-134a-4692-b565-a7e874550ce1/content>.
- Barrera López RE, Arrubla Vélez JP. 2017. Análisis de fitoesteroles en la semilla de *Persea americana miller* (Var. Lorena) por cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. *Rev. Fac. Cienc. Básicas*; [consultado el 18 de jun. de 2022]. 13(1):35–41. doi:10.18359/rfcb.2013.
- Chairman W, Bergfeld MD, Donald V. B, Klaassen CD. 2014. Safety Assessment of Phytosterols as Used in Cosmetics; [consultado el 12 de jun. de 2022]. https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Phytos_122013_Final.pdf.
- Chuanxun Y, Xueru Z, Risheng J. 2019. Development and characterization of phytosterol nanoemulsions and self-microemulsifying drug delivery systems. [sin lugar]: [sin editorial] (vol. 13); [consultado el 19 de jun. de 2022].
- ClevelandClinic. 2019. Boost Your Cholesterol-Lowering Potential With Phytosterols. [sin lugar]: [my.clevelandclinic.org](https://my.clevelandclinic.org/health/articles/17368-phytosterols-sterols--stanols); [consultado el 16 de jun. de 2022]. <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/17368-phytosterols-sterols--stanols>.
- Day L, Golding M. 2016. Food Structure, Rheology, and Texture. En: Melton L, Shahidi F, Varelis P, editores. *Encyclopedia of Food Chemistry*. vol. 5. [sin lugar]: Elsevier. p. 125–129 ; [consultado el 3 de jul. de 2022].
- De Ancos B, Fernández-Jalao I, Sánchez-Moreno C. 2016. Compuestos funcionales en productos de iv y v gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*; [consultado el 2 de jul. de 2022]. 17(2):130–148. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81349041002.pdf>.
- Determination of apparent viscosity by the Brookfield test method (2011).
- Dietary Supplement Products & Ingredients (2022).

- E12 Committee. 2020. Practice for Calculating Yellowness and Whiteness Indices from Instrumentally Measured Color Coordinates. West Conshohocken, PA: ASTM International. 2020; [actualizado 2020; consultado el 26 de jul. de 2022]. doi:10.1520/E0313-20.
- Efraim P, Marson GC, Jardim DCP, Garcia AO, Yotsuynagi K. 2011. Influence of phytosterols addition in the rheology and sensory attributes of dark chocolate. *Procedia Food Science*. 1(2):1633–1637. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.241.
- Engel R, Schubert H. 2005. Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*; [consultado el 1 de jul. de 2022]. 6(2):233–237. doi:10.1016/j.ifset.2005.01.004.
- Harting Glade TF, Diaz Fuenzalida MA, Rojas AM, inventores. 26 de ago. de 2010. Dispersion de fitoesteroles. Chile.
- Hwang T-Y, Park B-D, Sung J, Kim H-S. 2020. Variability of Phytochemicals by Breeding Year, Usage and Seed Size of Korean Soybean (*Glycine max (L.) Merrill*) Varieties. *Agriculture*; [consultado el 21 de jun. de 2022]. 10(4):100. doi:10.3390/agriculture10040100.
- Izadi Z, Nasirpour A, Garousi G. 2012. Optimization of Phytosterols Dispersion in an Oil/Water Emulsion Using Mixture Design Approach. *Journal of Dispersion Science and Technology*; [consultado el 21 de jun. de 2022]. 33(12):1715–1722. doi:10.1080/01932691.2011.646599.
- Jiao J, Burgess DJ. 2003. Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80. *AAPS PharmSci*; [consultado el 19 de jun. de 2022]. 5(1):E7. eng. doi:10.1208/ps050107.
- Kulthanan K, Nuchkull P, Varothai S. 2013. The pH of water from various sources: an overview for recommendation for patients with atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy*; [consultado el 18 de jun. de 2022]. 3(3):155–160. eng. doi:10.5415/apallergy.2013.3.3.155.
- Li A, Zhu A, Di Kong, Wang C, Liu S, Zhou L, Cheng M. 2021. Water-Dispersible Phytosterol Nanoparticles: Preparation, Characterization, and *in vitro* Digestion. *Front Nutr*; [consultado el 17 de jun. de 2022]. 8:793009. eng. doi:10.3389/fnut.2021.793009.
- Llano LE, Jiménez VP, Jiménez NR. 2016. Obtención y caracterización de una emulsión agua - biodiesel [Tesis de pregrado]. La Plata, Argentina: Facultad de Ingeniería, Universidad Militar Nueva Granada; [consultado el 15 de jun. de 2022]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/77370/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Martínez Hernández AT, Santana Parra AC. 2019. Evaluación de un proceso para la obtención de fitoesteroles partiendo de la semilla del aguacate (*Persea americana Mill. Var hass*) a escala laboratorio [Proyecto de grado]. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de América; [consultado el 2 de jul. de 2022]. <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7709/1/6141271-2019-2-IQ.pdf>.
- Montoya López J, Giraldo Giraldo GA, Lucas Aguirre JC. 2012. Determinación del índice de blancura en harina de trigo comercial; [consultado el 16 de jun. de 2022]. 19(1):415–416. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914130>.
- Muñoz Jáuregui AM, Alvarado-Ortíz UC, Encina Zelada C. 2011. Fitoesteroles y fitoesteranos: Propiedades saludables; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 11(2):93–100. <https://www.redalyc.org/pdf/3716/371637122007.pdf>.

- Oduntan A. 2017. Engineering the rheology and Interfacial behavior of Suspo-emulsion for enhanced oil recovery: How does concentration of surfactant affect the viscosity of oil/water emulsions. [sin lugar]: University of Louisiana at Lafayette; [actualizado 2019; consultado el 15 de jun. de 2022]. https://www.researchgate.net/post/How_does_concentration_of_surfactant_affect_the_viscosity_of_oil_water_emulsions.
- Ogbe RJ, Ochalefu DO, Mafulul SG, Olaniru OB. 2015. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits; [consultado el 23 de jun. de 2022]. 5. <https://www.imedpub.com/articles/a-review-on-dietary-phytosterols-their-occurrence-metabolism-and-health-benefits.pdf>.
- [OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2020. Enfermedades no transmisibles. [sin lugar]: OPS; [actualizado 2020; consultado el 4 de jun. de 2022]. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-no-transmisibles>.
- Park YH, Kim HJ. 2021. Formulation and stability of horse oil-in-water emulsion by HLB system. *Food Sci Biotechnol*; [consultado el 3 de jul. de 2022]. 30(7):931–938. eng. doi:10.1007/s10068-021-00934-8.
- Pichot R, Watson RL, Norton IT. 2013. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *Int J Mol Sci*; [consultado el 1 de jul. de 2022]. 14(6):11767–11794. eng. doi:10.3390/ijms140611767.
- Prizzon S, Martinello MA, Pramparo M. 2005. Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización; [consultado el 22 de jun. de 2022]. 56(3):228–234. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1254691>.
- Rosas Morales MR. 2006. Soja; [consultado el 24 de jun. de 2022]. 25(2):80–86. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-soja-13084465>.
- Silva P, Pinheiro AC, Rodríguez L, Figueroa V, Baginsky C. 2016. Fuentes naturales de fitoesteroides y factores de producción que lo modifican; [consultado el 2 de abr. de 2022]. 66. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2016/1/art-2/>.
- Souza WJ, Santos KMC, Cruz AA, Franceschi E, Dariva C, Santos AF, Santana CC. 2015. Effect of water content, temperature and average droplet size on the settling velocity of water-in-oil emulsions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*; [consultado el 2 de mar. de 2022]. 32(2):455–464. doi:10.1590/0104-6632.20150322s00003323.
- Takegami T, Yoshida K. 1975. Isolation and purification of cytokinin binding protein from tobacco leaves by affinity column chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; [consultado el 28 de abr. de 2022]. 67(2):782–789. doi:10.1016/0006-291x(75)90881-5.
- Vázquez-Blanco S, González-Freire L, Dávila-Pousa MC, Crespo-Diz C. 2018. Determinación del pH como criterio de calidad en la elaboración de fórmulas magistrales orales líquidas [pH determination as a quality standard for the elaboration of oral liquid compounding formula]. *Farm Hosp*; [consultado el 13 de abr. de 2022]. 42(6):221–227. eng. doi:10.7399/fh.10932.
- Wan Rusmawati WM, Dzulkafly K, Lim WH, Hamdan S. 2001. Emulsion Properties of Mixed Tween20-Span20 in Non-Aqueous System [Master's Thesis]. Malaysia: Universiti Putra Malaysia Press;

[consultado el 17 de may. de 2022]. http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/3743/1/Emulsion_Properties_of_Mixed_Tween20-Span20_in.pdf.

Wang T, editor. 2015. Soybeans, Chemistry, Production, Processing, and Utilization: Chapter 10 Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans. 1ª ed. [sin lugar]: Elsevier. ISBN: 9781893997646; [consultado el 23 de jun. de 2022].

Zychowski L. 2018. Effect of phytosterol enrichment on the crystallisation, physiochemical, and interfacial behaviour of bulk and emulsified milk fat triacylglycerol matrices [Tesis Doctoral]. Ireland, Cork: The National University of Ireland, University Collage Cork; [consultado el 5 de abr. de 2022]. <https://cora.ucc.ie/bitstream/handle/10468/5466/Lisa%20Zychowski%20PhD%20thesis%20final%20copy.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.