



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

Microencapsulación de Fitoesteroles Mediante Secado por Atomización

Ing. Carla Agustina Di Battista

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2016

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre el 15 de diciembre de 2009 y el 20 de septiembre de 2016, bajo la dirección de la Dra. Juliana Piña y la Dra. Diana Teresita Constenla.

[Firma del Alumno]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación
Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la
calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que pasaron por mi vida durante este tiempo de doctorado, sin embargo me esforzaré por mencionarlas sin olvidar a ninguna de ellas, porque de alguna manera se grabaron en mi corazón.

En primer lugar siento un fuerte deseo de agradecer a mis directoras, Juliana y Diana, por toda su ayuda, tiempo y paciencia; por el amor que le brindaron a esta tesis y por no bajar los brazos cuando el barco parecía hundirse. Gracias por apostar siempre un poco más y confiar en mí. Gracias por dejarme volar y traerme de nuevo cuando perdía el rumbo. Les tengo una deuda eterna. En la misma línea, quiero agradecer a Vero Rigo por toda su ayuda, su colaboración, su calidez y buena predisposición. Gracias a las tres por permanecer a mi lado y alentarme siempre a un poco más.

A Daiana, por su inmensa labor a mi lado, su entusiasmo y su esfuerzo durante su estadía en el instituto.

A las chicas de administración, Any, Selva, Adri, Nora y Elsa, a los chicos del taller, Gustavo, Claudio, Ariel y Beto, y a Seba porque su labor es invaluable para muchos de nosotros, y ver que lo realizan con una sonrisa a pesar de nuestra poca comprensión, es muy lindo. A la Cooperativa Obrera de Consumo y Vivienda y a la empresa Saporiti, por sus donaciones, sin las cuales hubiera sido muy difícil el desarrollo de esta tesis. A CONICET, la UNS y la ANPCyT por ser el sustento económico de esta tesis y a PLAPIQUI por recibirme con las puertas abiertas.

A mis compañeros y amigos del grupo de Tecnología de Partículas, Vero B., Ivi, Lore, Maxi, Fer, Leo, Naza, Marty, Consu, Meli, Charly, Diego, Paz, Mariela y Pao, por confiar en mi y brindarme un espacio de trabajo lleno de alegría y compañerismo. Por ser excelentes personas, dentro y fuera del instituto. Gracias también a mis compañeros y amigos de Reactores, Edu, Marisa, Espi, Andrés, Pepe, Yani B., Yani M., Edu I., Susy y Daniel, por contribuir a ese espacio con sus risas y estar pendientes de cada necesidad y detalle, porque con ellos también crecí. A los grupos de Alimentos, Catálisis y Polímeros, por los hermosos momentos compartidos y por la instrucción que me dieron todos estos años. En este sentido, gracias a Mati, Ruth, Graciela, Daniel,

al Pelado, Cristina, Clarisa, Forbi y Julia por darme una mano siempre que lo necesité y por confiar en mi en los siguientes pasos de aprendizaje.

A Maga y Andre, porque son personas increíbles que me enseñan a diario. Las palabras que escriba para ustedes serían otra tesis. Gracias por ayudarme a crecer, personal, profesional y espiritualmente; por brindarme su amistad y ayudarme a saltar cada vez más alto. A Pili, por ser un ejemplo de alegría, simpleza, nobleza y amistad sin barreras ni distancias. A mis compañeros y amigos, Nati C., Irene, Dani, Fercho, Pau, Andrés C., Mariana R., Diego, Mari A., Fran, Guapa, Benja, Pao, Edu X. (y familia), Lean, Clau, Marco y Romi, Diego R., Karolth, Hannibal (y familia), Julie (y familia), Fiore, Fer Camejo, Paula, Gaby, Carito, Claudia C., Crispy, Yese y Carlos. Al grupo de chicos de Colombia que no mencioné, en especial a May y Jhovany, dos de mis personas favoritas. Gracias a todos por tantos momentos y tanto cariño; gracias por los momentos que vendrán.

A mis amigos de Tesistiendo, Diana, Migue y Carlitos, por ser quienes son, estar en el lugar apropiado y ocupar ese sitio intocable en mi corazón. Gracias infinitas por el tiempo, las risas, las comidas, las ayudas y el apoyo en los momentos más difíciles. Este logro es compartido con ustedes. A Ani y Lore, por los grandes momentos compartidos en la casa y por enseñarme a ser mejor persona cada día.

A mi familia, por ser mi núcleo, por mostrarme dónde está lo más importante de nuestras vidas, por enseñarme los valores que intento aplicar a diario, por ser mi ejemplo de lucha, de amor, de unidad. Son mi fortaleza. También agradezco a mis tíos Anita, Ogui y Graciela, por ser mi familia bahiense, que siempre me apoyó, alentó y me acompañó durante todos estos años en la ventosa. A mis amigas de Tandil, Charo, Mh, Lu, Feli, Lauri, Pame y Jo por todo ese cariño y aliento, por esta esta amistad que atraviesa la distancia, el tiempo y las circunstancias.

A PLAPIQUI, por darme la posibilidad de continuar transitando estos pasillos.

A Dios, por todo lo anterior y todo lo que sigue.

A todos ellos, infinitas gracias!

A mi familia, gracias por tanto amor

RESUMEN

En la actualidad, se estima que alrededor del 40 % de la población adulta mundial presenta elevados niveles de colesterol en sangre, lo que constituye un total de 4.4 millones de muertes anuales a nivel mundial. En nuestro país, si bien la prevalencia es algo menor, entre los años 2005 y 2009 alrededor de 455000 personas murieron por enfermedades cardiovasculares. A pesar de estas cifras alarmantes, las estrategias implementadas, tanto a nivel mundial como nacional, aún no han logrado controlar, ni mucho menos revertir, esta problemática.

Por otra parte, existe desde hace algunos años una tendencia hacia el consumo de alimentos saludables o funcionalizados con ingredientes que promueven la salud. En este sentido, los fitoesteroles son subproductos del procesamiento de aceites, que inhiben la absorción del colesterol y que han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y otras afecciones. Dada la naturaleza sumamente hidrofóbica que presentan, su aplicación ha sido orientada tradicionalmente hacia matrices sólidas o semisólidas, por lo que la incorporación en alimentos acuosos resulta un campo atractivo que requiere de ciertos tratamientos. Aprovechando este impulso hacia el consumo de alimentos saludables, la presente Tesis se centra en la microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización para su posterior incorporación en alimentos de base acuosa.

En el Capítulo I se describe la relevancia del consumo de fitoesteroles en el tratamiento y la prevención de las enfermedades cardiovasculares provocadas por elevados niveles de colesterol en sangre. Además, se incluye una extensa revisión bibliográfica sobre la presencia de fitoesteroles en las fuentes vegetales y su incorporación en alimentos, como así también sobre el estado del arte en la microencapsulación de diversos ingredientes alimenticios y las principales características del proceso seleccionado.

En el Capítulo II se presentan todos los materiales utilizados en las distintas etapas de desarrollo. Asimismo, se exponen las técnicas empleadas e implementadas para caracterizar las materias primas y productos, y las herramientas estadísticas utilizadas para analizar los resultados obtenidos.

En el Capítulo III se incluyen ensayos exploratorios tendientes a seleccionar agentes encapsulantes aptos para la encapsulación de los fitoesteroles mediante el proceso de secado por atomización. Además, se presentan y discuten los resultados de las diversas técnicas empleadas para facilitar la selección de agentes encapsulantes. Asimismo, se aborda la caracterización y acondicionamiento del polvo de fitoesteroles a usar como ingrediente activo.

En el Capítulo IV se presentan las experiencias llevadas a cabo para seleccionar el tensoactivo y su concentración en la formulación a atomizar. En particular, se estudia cómo afectan al rendimiento de secado, la eficiencia de encapsulación, la retención de fitoesteroles y el tamaño de las micropartículas obtenidas. De esta manera, se determina una concentración óptima de tensoactivo.

Esta composición en tensoactivo se utiliza en un diseño de experimentos, tipo Box - Behnken, desarrollado en el Capítulo V para identificar condiciones de proceso y de formulación que optimicen la microencapsulación de los fitoesteroles mediante secado por atomización. En particular, se analizan los efectos de las variables de formulación de la suspensión y de las condiciones operativas del secado sobre el rendimiento, la eficiencia de encapsulación, la retención de fitoesteroles y el tamaño de partículas obtenidas. Los modelos de ajuste encontrados para cada respuesta se utilizan para determinar las condiciones que conducen a sus valores óptimos. Además, se establecen valores óptimos para la deseabilidad global, los cuales se corroboran experimentalmente.

En el Capítulo VI se describe la aplicación de los productos correspondientes a los óptimos del diseño de experimentos desarrollado, en dos sistemas de base acuosa, agua destilada y una bebida de preparación y consumo instantáneo. La calidad de los mismos se evalúa en términos del tiempo de redispersión y estabilidad de las microcápsulas en el producto final.

Por último, en el Capítulo VII se presentan las conclusiones generales de esta tesis, junto a los principales aspectos a considerar en trabajos futuros.

ABSTRACT

Nowadays, about 40 % of world adult population presents high cholesterol levels in blood, which constitutes a total of 4.4 million worldwide deaths per year. In Argentina, although the cholesterol prevalence is slightly lower, between 2005 and 2009, around 450000 people died due to cardiovascular diseases. Despite these alarming numbers, the implemented strategies, both globally and nationally, have not yet managed to control neither to reverse this issue.

On the other hand, in recent years there is a trend towards consuming healthy foods or foods functionalized with health-promoter food ingredients. In this sense, phytosterols are by-products of oil processing, which inhibit the cholesterol absorption and have been broadly used in treatments of cardiovascular diseases and other affections. Due to their highly hydrophobic nature, phytosterols have been traditionally applied to solids and semisolids matrices; thus, their incorporation in aqueous foods is an attractive field that requires some treatments. Considering the increasing demand of healthy foods, this Thesis focuses on the phytosterols microencapsulation by means of spray drying for their subsequent incorporation into aqueous based foods.

In Chapter I, it is described the importance of the phytosterols consumption on the treatment and prevention of cardiovascular diseases caused by high levels of cholesterol in blood. In addition, it is included an extensive bibliographic review about the phytosterols' presence in vegetables sources and their application in foods, as well as about the state of the art in the microencapsulation of different food ingredients and the main features of the selected process.

In Chapter II, all the materials that have been used at the different development stages are presented. Furthermore, the employed and implemented techniques to characterize the raw materials and products are discussed. Moreover, the statistics tools used for the results analysis are exposed.

In Chapter III, exploratory trials aiming to select suitable encapsulating agents (for the phytosterols encapsulation by means of spray drying process) are included. Also, the results of the techniques employed to facilitate the encapsulation agents'

selection are presented and discussed. Moreover, the characterization and conditioning of phytosterols powder used as active ingredient is addressed.

In Chapter IV, the experiences aiming to select the tensoactive and their concentration in the formulation to be spray dried are presented. Particularly, it is studied how they affect the process yield, encapsulation efficiency, phytosterols retention and mean size of the obtained microparticles. Thus, the optimal surfactant concentration is determined.

This tensoactive composition is used in a design of experiments, Box - Behnken type, developed in Chapter V in order to identify the formulation and process conditions that optimize the phytosterols microencapsulation by spray drying. Particularly, it is analyzed the effect of the formulation variables and operating conditions on the process yield, encapsulation efficiency, phytosterols retention and mean size of the obtained microparticles. The fitting models found for each response are used to determine the conditions that lead to optimal values. Also, the optimal values of the global desirability are established and experimentally verified.

In Chapter VI, it is described the application of the products corresponding to the optimal points of the developed design of experiments, in two aqueous-based systems, distilled water and a beverage of instantaneous preparation and consumption. Their quality is judged in terms of the redispersion time and stability of microcapsules in the final product.

Finally, in Chapter VII, it is presented the general conclusions of this thesis work, along with the main aspects to be considered in future works.



ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Colesterol: Un esteroles esencial	2
1.1.1. Transporte del colesterol: Lipoproteínas	4
1.2. Enfermedades Cardiovasculares	5
1.2.1. Factores de riesgo	6
1.3. Escenario mundial del deceso cardiovascular	8
1.4. Fitoesteroles	11
1.4.1. Propiedades funcionales sobre la salud	13
1.4.2. Dosis diaria recomendada, consumo y efectos adversos	15
1.4.3. Mecanismo de acción	17
1.4.4. Principales fuentes de fitoesteroles, extracción e identificación	18
1.4.5. Funcionalización de alimentos con fitoesteroles y derivados	23
1.5. Microencapsulación	27
1.5.1. Objetivos y aplicaciones de la microencapsulación	28
1.5.2. Estructura de las microcápsulas	30
1.5.3. Técnicas de microencapsulación - Secado por atomización	31
1.5.4. Aplicaciones del secado por atomización para la microencapsulación de ingredientes alimenticios	36



1.6. Objetivos	39
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1. Materiales	42
2.1.1. Ingrediente activo a encapsular	42
2.1.1.1. Fitoesteroles (FE).....	42
2.1.2. Agentes encapsulantes.....	44
2.1.2.1. Goma arábica (GA).....	44
2.1.2.2. Maltodextrina (MD).....	47
2.1.2.3. Goma guar (GG).....	49
2.1.2.4. Carboximetilcelulosa sódica (CC)	51
2.1.3. Agentes tensoactivos	54
2.1.3.1. Polisorbato: Tween 20 (T20)	54
2.1.3.2. Dodecilsulfato de sodio (SDS).....	56
2.2. Métodos	58
2.2.1. Determinación y cuantificación de esteroides en la mezcla comercial.....	58
2.2.1.1. Identificación de esteroides.....	59
2.2.1.2. Cuantificación de esteroides y estanoles.....	59
2.2.2. Tamizado de los fitoesteroides.....	60
2.2.3. Preparación de las suspensiones a secar	61
2.2.3.1. Homogeneización y sonicado	61
2.2.4. Caracterización de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo y de las suspensiones de fitoesteroides.....	61
2.2.4.1. Tensión superficial (γ).....	61
2.2.4.2. Ángulo de contacto (θ).....	62
2.2.4.2.1. Método directo.....	62



2.2.4.2.2.	Dimensión de gota	64
2.2.4.3.	Comportamiento reológico.....	64
2.2.4.4.	Tamaño de las partículas	65
2.2.4.5.	Estabilidad	65
2.2.4.6.	Potencial Z	66
2.2.4.7.	Conductividad y pH.....	67
2.2.5.	Secado por atomización	67
2.2.5.1.	Rendimiento de secado (RS).....	68
2.2.5.2.	Recolectado en cámara de secado (PC).....	68
2.2.5.3.	Eficiencia de encapsulación (EE)	69
2.2.5.3.1.	Fitoesteroles totales (FE _T)	70
2.2.5.3.2.	Fitoesteroles libres (no encapsulados) (FE _L).....	71
2.2.5.4.	Retención de Fitoesteroles (RFE)	71
2.2.6.	Caracterización del producto particulado.....	72
2.2.6.1.	Tamaño de las partículas encapsuladas.....	72
2.2.6.2.	Morfología de las microcápsulas	72
2.2.6.3.	Humedad residual (HR)	72
2.2.6.4.	Redispersabilidad	73
2.2.6.5.	Turbidez	74
2.2.7.	Ensayos de caracterización generales de los polvos.....	75
2.2.7.1.	Fluidez del polvo: Índice de Carr (IC)	75
2.2.7.2.	Difracción de rayos X (DRX)	76
2.2.7.3.	Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	76
2.2.7.4.	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	77
2.2.7.5.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	77



2.2.7.6.	Microscopía Óptica y Microscopía de Platina Calefaccionante	78
2.2.8.	Análisis estadístico	78
CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FITOESTEROLES Y ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA LA SELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES.....		80
3.1.	Introducción	80
3.2.	Procedimiento experimental	83
3.2.1.	Caracterización de los fitoesteroles	83
3.2.2.	Selección de los agentes encapsulantes	83
3.3.	Resultados y discusión	84
3.3.1.	Caracterización y acondicionamiento de los fitoesteroles	84
3.3.1.1.	Identificación y cuantificación de los esteroides y estanoles presentes en el ingrediente a encapsular.....	84
3.3.1.2.	Difracción de rayos X de los fitoesteroles.....	86
3.3.1.3.	Perfil térmico de los fitoesteroles.....	87
3.3.1.4.	Análisis de Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) de los fitoesteroles	91
3.3.1.5.	Tamaño de partícula del polvo de fitoesteroides utilizado como materia prima	93
3.3.2.	Selección de los agentes encapsulantes	94
3.3.2.1.	Viscosidad de soluciones de agentes encapsulantes.....	94
3.3.2.2.	Mojado.....	95
3.3.2.3.	Tamaño medio de partícula de las suspensiones, observaciones sobre la homogeneización y la estabilidad.....	97
3.3.2.4.	Secado por atomización	99
3.3.2.5.	Eficiencia de encapsulación.....	101



3.3.3. Combinación de goma arábiga y maltodextrina para la microencapsulación de los fitoesteroles.....	102
3.4. Conclusiones	103
CAPÍTULO 4. SELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y ESTUDIO DEL SECADO POR ATOMIZACIÓN.....	106
4.1. Introducción	106
4.2. Desarrollo experimental.....	108
4.2.1. Caracterizaciones previas al secado por atomización	109
4.2.2. Condiciones de secado por atomización	109
4.2.3. Estudios posteriores al secado	110
4.3. Resultados y discusión	111
4.3.1. Mojado de los fitoesteroles por parte de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo	111
4.3.2. Tensión Superficial	114
4.3.3. Viscosidad de las suspensiones a secar	117
4.3.4. Distribución de tamaño de partículas en las suspensiones y en el producto secado	119
4.3.5. Morfología de las microcápsulas	124
4.3.5.1. Estructura interna	127
4.3.6. Caracterización sólida de las microcápsulas.....	128
4.3.7. Rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles.....	131
4.3.8. Redispersabilidad	134
4.4. Conclusiones	135
CAPÍTULO 5. DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA y OPTIMIZACIÓN	139



5.1. Introducción	139
5.1.1. Metodología de superficie de respuesta. Diseños Box - Behnken	139
5.1.2. Optimización global: Deseabilidad individual (d) y global (D).....	142
5.1.2.1. Función deseabilidad individual (d).....	143
5.1.2.2. Función deseabilidad global (D).....	145
5.2. Desarrollo Experimental	147
5.2.1. Diseño Box - Behnken. Formulación y Secado.....	147
5.2.2. Estrategias para el análisis de los resultados	149
5.1.1.1. Análisis estadístico	149
5.1.1.2. Ajuste del modelo	149
5.1.1.3. Valoración del modelo ajustado	150
5.2. Resultados.....	151
5.2.3. Rendimiento de Secado (Y_1)	155
5.2.4. Tamaño de partícula de la alimentación líquida (suspensión) (Y_2) y del producto en polvo (Y_3).....	161
5.2.5. Retención de Fitoesteroles (Y_5).....	172
5.2.6. Eficiencia de Encapsulación (Y_6).....	177
5.2.7. Deseabilidad experimental (D)	180
5.2.8. Deseabilidad Ajustada y Optimización.....	182
5.3. Conclusiones	186
 CAPÍTULO 6. APLICACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS	190
6.1. Introducción	190
6.2. Desarrollo experimental.....	192
6.2.1. Redispersabilidad	192
6.2.2. Estabilidad	192



6.2.2.1.	Principio de medición e interpretación de los resultados.....	193
6.3.	Resultados.....	195
6.3.1.	Redispersión de los Óptimos ① y ②.....	195
6.3.2.	Estabilidad de Fitoesteroles en agua.....	196
6.3.3.	Estabilidad de Óptimo ① y Óptimo ② en agua.....	198
6.3.4.	Estabilidad de Óptimo ① y Óptimo ② en la bebida artificial de preparación instantánea.....	204
6.4.	Conclusiones	207
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS		210
APÉNDICE CAPÍTULO 2.MATERIALES Y MÉTODOS		216
APÉNDICE CAPÍTULO 3.CARACTERIZACIÓN DE LOS FITOESTEROLES Y ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA LA SELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES.....		218
APÉNDICE CAPÍTULO 4..... SELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y ESTUDIO DEL SECADO POR ATOMIZACIÓN.....		229
4.1.1.	Dodecilsulfato de sodio	229
4.1.2.	Tween 20	234
4.1.3.	Goma arábiga, maltodextrina y fitoesteroles	235
APÉNDICE CAPÍTULO 5.DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA y OPTIMIZACIÓN		238
NOMENCLATURA		261
BIBLIOGRAFÍA		268



Capítulo I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Colesterol: Un esteroles esencial

El colesterol es una molécula multifuncional que consiste en un esqueleto planar tetracíclico (núcleo esteroide), unido a un tallo hidrofóbico y un grupo polar hidroxilo (Figura 1.1a) (Hovenkamp *et al.*, 2008; Kamal-Eldin & Moazzami, 2009).

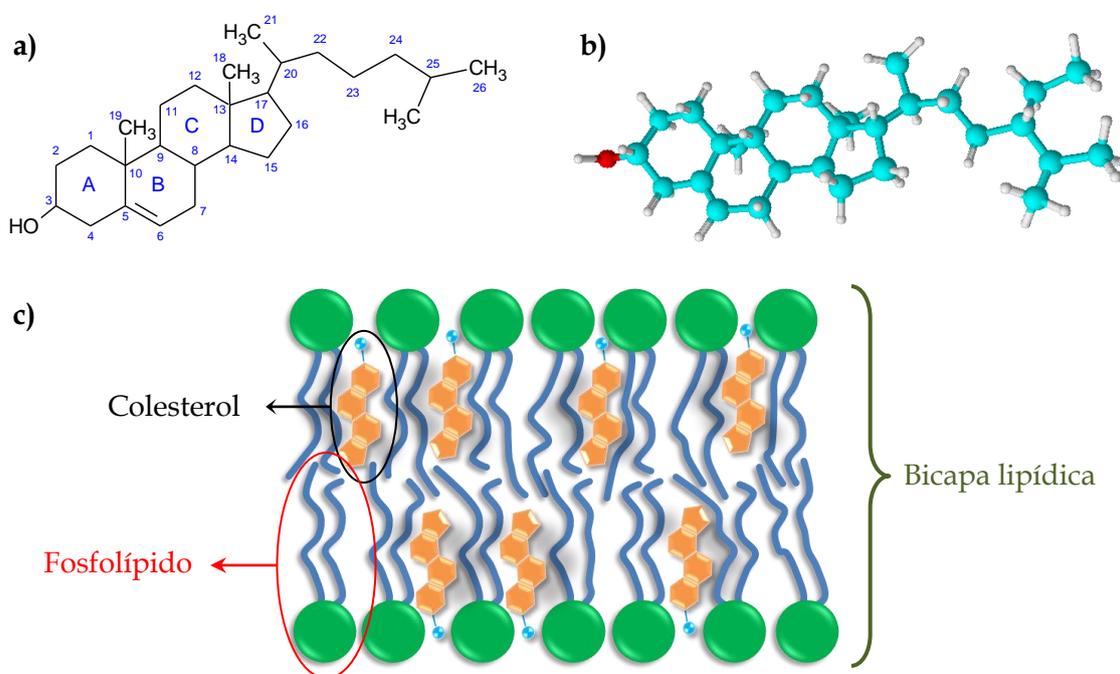


Figura 1.1. a) Estructura química del colesterol; b) Estereoquímica del colesterol; c) Esquema de interacción entre el colesterol y los fosfolípidos en la bicapa lipídica.

Junto a los fosfolípidos, son los lípidos más abundantes que conforman las membranas celulares de los mamíferos (Rozner & Garti, 2006). En ellas, los fosfolípidos se ubican de manera de formar una bicapa (orientando su grupo polar hacia el exterior de la membrana y su cola hacia el centro). Por su parte, el colesterol orienta su núcleo esteroide cerca de las cadenas de los fosfolípidos (interactuando con ellos mediante fuerzas de Van der Waals) y su grupo hidroxilo hacia la fase acuosa (interactuando con



los fosfolípidos mediante puentes Hidrógeno) (Figura 1.1b) (Chan, Chen, Chiu & Lu, 2004; Rozner & Garti, 2006).

La presencia del colesterol en los organismos es de vital importancia para mantener la estabilidad y proveer funcionalidad a sus membranas (Mel'nikov, Seijen ten Hoorn & Bertrand, 2004; Moreau, Whitaker & Hicks, 2002; Rozner, Popov, Uvarov, Aserin & Garti, 2009). En este sentido, al ubicarse entre los fosfolípidos, la presencia del colesterol permite modular la fluidez de la membrana y restringir su movimiento, modificando así la permeabilidad, la actividad enzimática, el gradiente electroquímico, etc. (Rozner & Garti, 2006). Además de la importancia estructural, el colesterol participa activamente en diversas funciones biológicas, tales como la regulación de la actividad de diferentes proteínas (de señalización cerebral, oncogénica, de membranas, enzimática, etc.), además de intervenir en numerosas vías metabólicas como precursor del ácido biliar, de la vitamina D3 y de hormonas esteroideas (Chan *et al.*, 2004; Clement, Heuer, Thomas & Mason, 2008; Kamal-Eldin & Moazzami, 2009; Mel'nikov *et al.*, 2004; Pfrieder, 2003; Rozner & Garti, 2006; Rozner *et al.*, 2009).

Su presencia en los organismos puede ser originada por la propia síntesis en el hígado (colesterol endógeno); o bien por ingesta en la dieta diaria (colesterol exógeno) (Franke, 2006; Rozner & Garti, 2006). Además, los niveles de colesterol en sangre dependen no sólo de la cantidad ingerida y sintetizada, sino también de la remoción (absorción celular) y la conversión del colesterol en otras moléculas (ácidos biliares y hormonas esteroideas) (Vučić & Cvetković, 2016).

No obstante su esencialidad en las funciones mencionadas anteriormente, contenidos elevados de colesterol en sangre pueden dar lugar a la formación de placas ateroscleróticas y conducir a enfermedades cardiovasculares (Mel'nikov *et al.*, 2004), como así también favorecer la formación de depósitos patológicos (cálculos biliares) o la cristalización en el lumen intestinal cuando las concentraciones son muy elevadas (Christiansen, Karjalainen, Seppänen-Laakso, Hiltunen & Yliruusi, 2003).

Más aún, la insaturación del carbono 5 en la estructura química (anillo B, Figura 1.1a) admite la oxidación del colesterol por acción del calor, la luz y el aire para dar productos con consecuencias biológicas negativas severas (Apprich & Ulberth, 2004).



En efecto, la presencia de estos óxidos en niveles elevados, puede causar efectos citotóxicos (necrosis e inhibición del crecimiento celular), aterogénesis (reducción del calibre de los vasos sanguíneos), enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis, entre otras (Apprich & Ulberth, 2004; Dyer, Hetherington, Alberti & Laker, 1995; Menéndez-Carreño, Ansorena & Astiasarán, 2008; Rozner & Gardi, 2006; Xu, Guan, Sun & Chen, 2009).

La presencia de estos dos efectos contrapuestos del colesterol en nuestro organismo sugiere la necesidad de un mecanismo de control que regule sus niveles de forma tal de satisfacer los requerimientos celulares, sin que esto resulte en niveles perjudiciales para la salud.

1.1.1. Transporte del colesterol: Lipoproteínas

Debido a que el colesterol es insoluble, circula en el plasma sanguíneo gracias a la asistencia de lipoproteínas que lo transportan hacia su destino (Clement *et al.*, 2008; Rosenson, 2015). Las lipoproteínas son sistemas que llevan en su interior ésteres de colesterol y triglicéridos, y en su superficie colesterol libre, fosfolípidos y una fracción proteica (apolipoproteína) que les otorga funcionalidad (Knopp, 1988; Rosenson, 2015). Existen cinco grandes grupos de lipoproteínas: *quilomicrones* (son partículas grandes que contienen lípidos dietarios); *VLDL* (lipoproteínas de muy baja densidad que transportan triglicéridos endógenos y, en menor grado, colesterol); *IDL* (lipoproteínas de densidad intermedia que transportan principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol); *LDL* (lipoproteínas de baja densidad que transportan principalmente ésteres de colesterol de origen endógeno) y *HDL* (lipoproteínas de alta densidad que transportan principalmente ésteres de colesterol de origen exógeno) (Rosenson, 2015). Cada una de estas lipoproteínas participa en vías metabólicas particulares, de modo tal que el colesterol de origen exógeno circula en una ruta diferente a la del colesterol endógeno.

Las lipoproteínas *LDL - C* (lipoproteínas *LDL* unidas al colesterol) están involucradas en el transporte del colesterol hacia las células. Son consideradas formas no saludables del colesterol, conocidas habitualmente como “colesterol malo” debido a



que están fuertemente relacionadas con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Clement *et al.*, 2008; Dutta, 2004; Frayn, 2005; Ponec *et al.*, 1981; Vučić & Cvetković, 2016). Por el contrario, las lipoproteínas de alta densidad enlazadas al colesterol (*HDL - C*) se consideran formas saludables del colesterol, o “colesterol bueno” y están involucradas en la remoción del colesterol en exceso desde los tejidos periféricos hacia el hígado, el que procesa su eliminación del cuerpo (Clement *et al.*, 2008; Frayn, 2005; Ponec *et al.*, 1981; Vučić & Cvetković, 2016). A estas lipoproteínas también se les atribuyen otras propiedades ateroprotectoras (antioxidante, antiinflamatorias, etc.) (Vučić & Cvetković, 2016). Un gran número de estudios epidemiológicos sugieren que bajos niveles de *HDL* inducen el desarrollo de enfermedades coronarias; mientras que altos niveles están asociados a la reducción de la incidencia de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Vučić & Cvetković, 2016).

En vista de la esencialidad del colesterol en las funciones del organismo, como así también de los perjuicios de poseer altos niveles en sangre, su apropiado control está sumamente relacionado con el balance de estas lipoproteínas. Se estima que una concentración en sangre deseada de colesterol total debe ser inferior a 200 mg/dL, distribuido de tal forma que el nivel de *LDL - C* permanezca por debajo de 100 mg/dL y el de las lipoproteínas *HDL - C* por encima de 40 mg/dL (Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

1.2. Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un número de enfermedades que afectan al corazón y los vasos sanguíneos (arterias y venas) y constituyen una de las causas más importantes de discapacidad y muerte prematura en todo el mundo (Maton *et al.*, 1993). Entre ellas, puede distinguirse la *cardiopatía coronaria* (que afecta los vasos sanguíneos que irrigan el miocardio); las *enfermedades cerebrovasculares* (que afectan los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro); las *arteriopatías periféricas* (que afectan a los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores); la *cardiopatía reumática* (que implica lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas



debidas a fiebre reumática); las *cardiopatías congénitas* (malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento); y las *trombosis venosas profundas* y *embolias pulmonares* (coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones).

El problema subyacente de las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis (Dutta, 2004; Salinas Botrán, Ramos Rincón & de Górgolas Hernández-Mora, 2013; Stewart, 2006), que progresa silenciosamente a lo largo de los años, de modo que cuando aparecen los síntomas, la enfermedad suele estar en una fase avanzada. La aterosclerosis es causada por un inadecuado transporte del colesterol, que induce la acumulación de sus ésteres y la consecuente formación y engrosamiento de placas en las paredes de los vasos sanguíneos (Hoving, 1995; Rozner & Garti, 2006). La progresión de la aterosclerosis conduce a diversas lesiones en la pared interna de los vasos sanguíneos y finalmente a ataques cardíacos (Wang, Lee & Lee, 2013).

1.2.1. Factores de riesgo

El término *factor de riesgo* describe aquellos parámetros que contribuyen a la ocurrencia de las enfermedades cardiovasculares, e incluyen estilos de vida modificables, características bioquímicas y fisiológicas, además de características no modificables, tales como la edad, el sexo y la historia familiar (Frayn, 2005).

La Tabla 1.1 describe algunos factores de riesgo y la dirección en que afectan cada uno de ellos. Salvo el género y la edad, todos constituyen factores modificables con la dieta o la incorporación de hábitos saludables. Respecto al género, el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares tiende a igualarse durante la menopausia, probablemente debido a la ausencia de estrógenos y al aumento de peso que sufren las mujeres (Frayn, 2005).

Entre los factores modificables, pueden destacarse la dislipidemia (altas concentraciones de proteínas *LDL*, solas o en combinación con elevados niveles de triglicéridos), la adicción al tabaco y la diabetes Mellitus (Dutta, 2004).



La hipercolesterolemia se reconoce como un factor de riesgo independiente para las enfermedades coronarias, la mayor causa de muerte en los países desarrollados (Saraiva, Semedo, Castilho, Silva & Ramos, 2011). Entonces, la disminución de los niveles de colesterol plasmático es vital para la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Además, el estilo de alimentación es un factor esencial para la regulación de los niveles de colesterol (Santos *et al.*, 2007).

Tabla 1.1. Factores de riesgo convencionales para las enfermedades cardiovasculares (Dutta, 2004; Frayn, 2005).

Factor de riesgo	Dirección de asociación	Tipo de factor
Edad	Incrementa con la edad	De predisposición
Género	Hombres tienen mayor riesgo	De predisposición
Nivel socioeconómico	Menor estatus aumenta el riesgo	De predisposición
Grupos étnicos	Algunos están más predispuestos	De predisposición
Cigarrillo	Fumadores tienen mayor riesgo	Causal
Colesterol Sérico Total	Incrementa con su concentración	Causal
LDL - C Sérico	Incrementa con su concentración	Causal
HDL - C Sérico	Disminuye con su concentración	Causal
Triglicéridos	Incrementa con su concentración	Condicional
Presión arterial	Niveles altos incrementan el riesgo	Causal
Diabetes Mellitus	Incrementa el riesgo	Causal
Inactividad física	Incrementa el riesgo	De predisposición
Sobrepeso/Obesidad	Incrementa el riesgo	De predisposición



1.3. Escenario mundial del deceso cardiovascular

Actualmente, se estima que el colesterol es causante del 18 % de accidentes cerebrovasculares a nivel mundial y del 56 % de las cardiopatías isquémicas, lo que conduce a un total de 4.4 millones de muertes anuales (World Health Organization, 2016).

De acuerdo a datos reportados por la Organización Mundial de la Salud, en 2008 (World Health Organization, 2016), la prevalencia de colesterol total elevado (≥ 5.0 mmol/L) en adultos mayores de 25 años a nivel mundial fue del 39 %. Este valor indica sólo una pequeña variación respecto al valor obtenido en el año 1980, cayendo por menos de 0.1 mmol/L por década en los hombres y las mujeres.

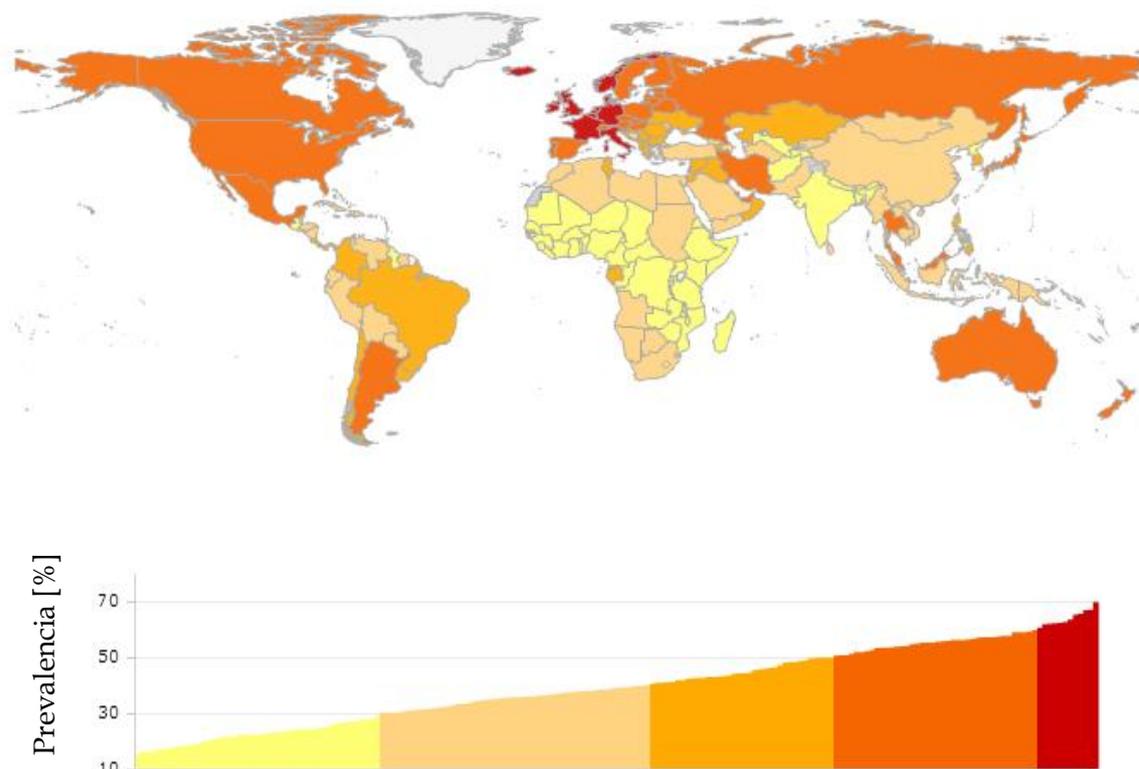


Figura 1.2. Prevalencia de colesterol total elevado en adultos mayores de 25 años (Año 2008; Fuente: World Health Organization, 2016).



La Figura 1.2 muestra la prevalencia de colesterol para los distintos países a nivel mundial. De acuerdo a este mapa, la región europea presentó la prevalencia más alta de colesterol elevado en sangre (54 % para ambos sexos), seguida de la Región de América (48 % para ambos sexos). En África y el sureste de Asia se obtuvieron los porcentajes más bajos (23 % y 29 %, respectivamente). Los datos para Argentina fueron valorados estadísticamente, presentando una prevalencia estimada de casi 51 % de colesterol elevado en habitantes mayores de 25 años.

En el año 2011, la Organización Mundial de la Salud realizó un estudio sobre la prevalencia de hipercolesterolemia (colesterol sérico total ≥ 6.2 mmol/L o ≥ 240 mg/dL) y el nivel medio de colesterol total en ocho países (Alemania, Escocia, Estados Unidos, Inglaterra, Japón, Jordania, México y Tailandia) (World Health Organization, 2016). En este estudio también se determinaron las fracciones de individuos que fueron diagnosticados y tratados con hipocolesterolemiantes y controlados eficazmente de modo de mantener una concentración de colesterol sérico total menor a 6.2 mmol/L (240 mg/dL).

Los resultados provistos por este estudio indicaron que el porcentaje de personas con concentraciones elevadas de colesterol sérico total que reciben un tratamiento eficaz es pequeño. En efecto, la proporción de pacientes en tratamiento, con resultados que evidenciaron haber conseguido controlar la enfermedad, osciló entre el 4 % en Alemania y el 58 % en Japón.

Los datos aportados por este estudio muestran por primera vez la magnitud de la brecha a nivel mundial en el tratamiento de la hipercolesterolemia, un factor de riesgo común para la mortalidad cardiovascular precoz. Esto indica no sólo que esta problemática está mal controlada, sino que además, la cobertura de medicación eficaz contra el colesterol elevado sigue siendo decepcionantemente baja (World Health Organization, 2016).

En Argentina, desde 2005 y cada cuatro años, el Ministerio de Salud lanza la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo en la cual se evalúa el control y la prevalencia de diversos factores de riesgo. La tercera encuesta, realizada en el año 2013, reveló una prevalencia de colesterol elevado a nivel país del 30 % para habitantes mayores de



18 años. Según esta encuesta, las provincias más afectadas por esta problemática fueron las de la región norte (Salta 35.3 %, Jujuy 35.1 % y Misiones 34.6 %). Por otro lado, las jurisdicciones que mostraron valores menores que el total nacional fueron San Luis (22 %) y Santa Fe (25 %).

Si bien los datos obtenidos por esta encuesta fueron muy inferiores a los estimados por la Organización Mundial de la Salud (Figura 1.2) (posiblemente por las edades abordadas y la estimación de los datos del 2008), este porcentaje es igualmente alarmante en cuanto al número de muertes provocadas por la enfermedad. En efecto, el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2016) informó que entre los años 2005 y 2009 unas 455000 personas murieron por causas de enfermedades en el sistema circulatorio, lo que representa aproximadamente el 30 % del total de muertes ocurridas en ese período.

Con el objeto de reducir y prevenir el desarrollo del colesterol elevado, el Ministerio de Salud de la Nación, desde la Dirección de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades no Transmisibles, propuso cambiar los hábitos alimentarios a nivel poblacional y mejorar la atención profesional de las problemáticas relacionadas. Con este fin, se desarrollaron y presentaron un conjunto de herramientas que combinaron un abordaje integral tanto desde la demanda (a través de la concientización en la población y la creación de entornos saludables), como desde la oferta (desde la educación y la regulación a la industria de alimentos). También desde los servicios de salud, mediante capacitación y difusión de las recomendaciones a los efectores.

Actualmente, a nivel nacional, el Ministerio de Salud de la Nación, a través del Plan Argentina Saludable, lleva a cabo estrategias relacionadas con la promoción de la alimentación saludable y la actividad física y el desarrollo de guías de práctica clínica para efectos de salud. Una de las estrategias más efectivas para reducir el nivel de colesterol de las personas es la reducción del consumo de las grasas trans. Mediante la campaña “Argentina 2014 Libre de Grasas Trans” se modificó el Código Alimentario Argentino, a través de una resolución conjunta entre el Ministerio de Salud y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, para limitar la cantidad permitida de grasas trans en los alimentos industrializados.



Desde la Dirección de Promoción de la Salud y Control de Enfermedades no Transmisibles se desarrolló la Guía de Prevención de las Enfermedades Cardiovasculares para los profesionales de la salud, que permite tomar decisiones terapéuticas en función del riesgo cardiovascular global.

Por lo expuesto, y dado el impacto del colesterol elevado sobre la salud pública, resulta necesario seguir avanzando en las estrategias mencionadas con el objetivo de reducir la exposición a los determinantes de la hipercolesterolemia y ampliar el acceso a los tratamientos disponibles.

1.4. Fitoesteroles

Los fitoesteroles son compuestos de estructura y funcionalidad similar a la del colesterol (Figura 1.1) (da Costa, Ballus, Teixeira-Filho & Godoy, 2010; Dutta & Normen, 1998; Fernandes & Cabral, 2007; Franke, 2006; Johnsson & Dutta, 2005; Lagarda, García-Llatas & Farré, 2006; Mel'nikov *et al.*, 2004), y que se dan naturalmente en las plantas, pero no pueden ser sintetizados por el organismo humano (Rozner & Garti, 2006; Saraiva, Conceição Castilho, Rosário Martins, Silveira & Ramos, 2010).

Al igual que el colesterol, son componentes estructurales importantes en la membrana celular, donde su principal función es la de mantener la integridad y regular su fluidez, siendo principalmente afectada por la proporción de cada uno de ellos (Alexander, Acero Lopez, Fang & Corredig, 2012; Fernandes & Cabral, 2007; Lagarda *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Monu, Blank, Holley & Zawistowski, 2008; Moreau *et al.*, 2002; Rozner & Garti, 2006; Zhang, Vasanthan & Wettasinghe, 2007).

La única diferencia estructural respecto al colesterol reside en la presencia de una cadena hidrofóbica adicional en el C24 de la estructura (Alexander *et al.*, 2012; Fernandes & Cabral, 2007; Lagarda *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2002; Rozner *et al.*, 2009; Shin, Pegg, Phillips & Eitenmiller, 2010) (Figura 1.3a). Sorpresivamente, esa pequeña diferencia entre ambos componentes, otorga grandes diferencias en su funcionalidad biológica en el organismo humano (Santos *et al.*, 2007), tal como se describe posteriormente en la Sección 1.4.1. *Propiedades funcionales sobre la salud.*



Los fitoesteros pertenecen a la familia de los triterpenos, en la cual pueden identificarse más de 200 compuestos diferentes (Han, Yang & Feng, 2008; Lagarda *et al.*, 2006; Lu, Zhang, Wu & Shi, 2007; Moreau *et al.*, 2002; Rozner & Garti, 2006; Shin *et al.*, 2010).

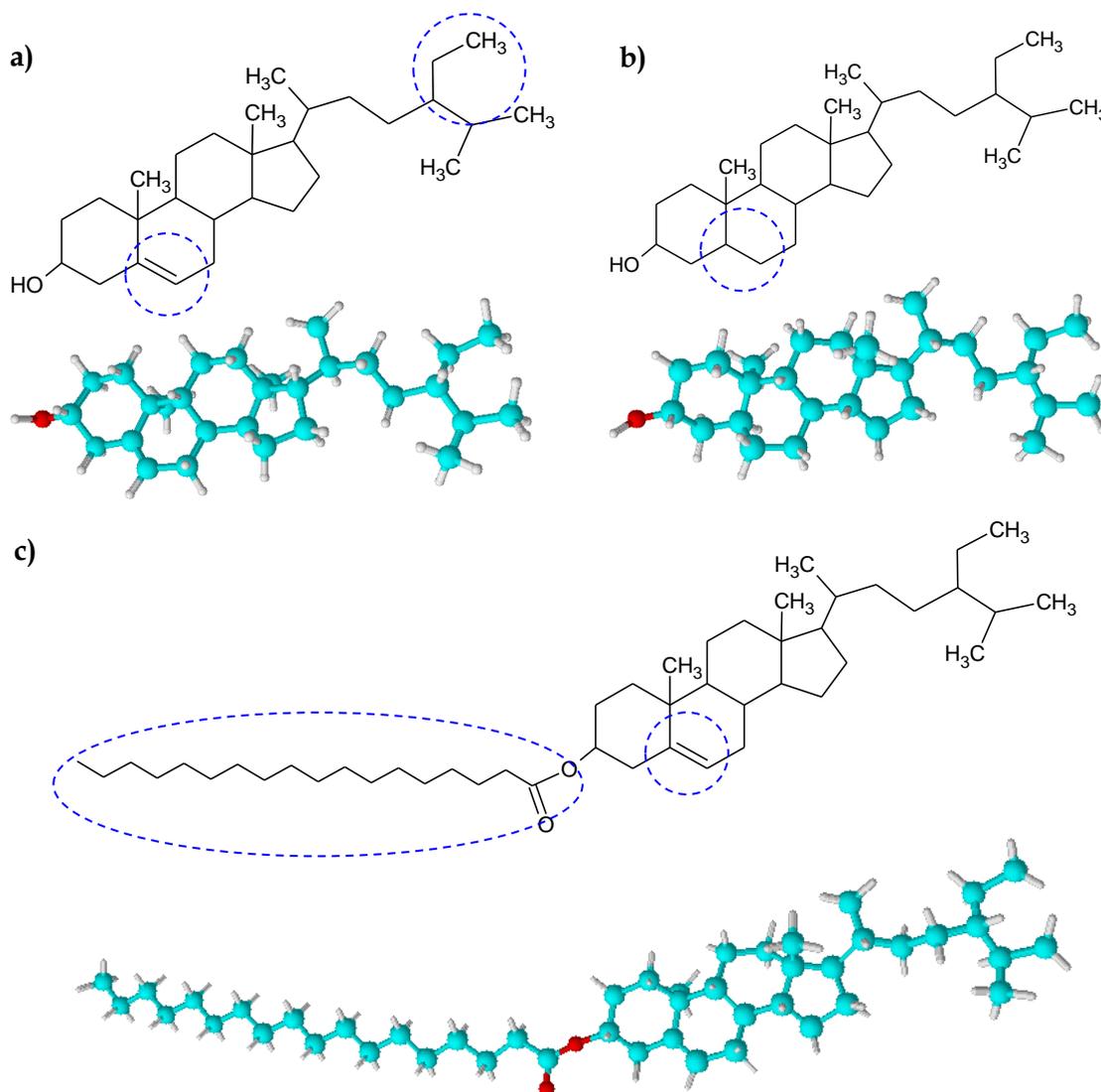


Figura 1.3. Estructura química y estereoquímica: **a)** fitoesterol: β -sitosterol; **b)** fitoestanol: sitostanol; **c)** éster de fitoestanol: sitosteril estearato (sitosterol éster).

Tal como se presenta en la Sección 1.4.4. *Principales fuentes de fitoesteros, extracción e identificación*, los más abundantes en la naturaleza son β -sitosterol



campesterol y estigmasterol (Alexander *et al.*, 2012; Auweter, Bohn, Hasselwander & Runge, 2009; Delaney *et al.*, 2004; Fernandes & Cabral, 2007; Hovenkamp *et al.*, 2008; Lagarda *et al.*, 2006; Monu *et al.*, 2008; Pennisi Forell, Ranalli, Zaritzky, Andrés & Califano, 2010; Santos *et al.*, 2007).

Debido a la gran variedad de esteroides existentes, se presentan diversas maneras de clasificarlos. En particular, de acuerdo a la presencia o ausencia del doble enlace en el C5 se identifican como fitoesteroides y fitoestanoles, respectivamente (Monu *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2002; Rozner & Garti, 2006; Shin *et al.*, 2010) (Figura 1.3b); siendo estos últimos menos abundantes en la naturaleza (Harrabi *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2010).

Además, pueden presentarse en forma libre, o bien conjugados con ácidos grasos (ésteres de fitoesteroides) (Figura 1.3c), entre otras conjugaciones que son menos frecuentes (Bi, Yang, Li, Zhang & Guo, 2006; Fernandes & Cabral, 2007; Lagarda *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2010; Toivo, Phillips, Lampi & Piironen, 2001). La Figura 1.3 muestra, a modo de ejemplo representativo, la estructura química de uno de los esteroides más abundantes en la naturaleza (β -sitosterol), junto a la de su análogo saturado (sitostanol) y conjugado con un grupo ácido esteárico (sitosteril estearato).

1.4.1. Propiedades funcionales sobre la salud

El uso de fitoesteroides, se remonta al año 1951, cuando se demostró la habilidad del β -sitosterol para la reducción del colesterol y el tratamiento de lesiones ateroscleróticas en pollos (Dutta, 2004; Engel & Schubert, 2005; Fernandes & Cabral, 2007; Harting Glade, Días Fuenzalida & Markovits Rojas, 2010; Lagarda *et al.*, 2006; Mel'nikov *et al.*, 2004; Monu *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2002; Rozner & Garti, 2006; Shin *et al.*, 2010). Desde entonces los fitoesteroides son consumidos para reducir los niveles de colesterol total y LDL - C, biliar (endógeno) y dietario (exógeno), conocidos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y coronarias, sin afectar los niveles de HDL - C (Alexander *et al.*, 2012; Beveridge, Li & Drover, 2002; Binder & Gottmoller, 2004; da Costa *et al.*, 2010; Delaney *et al.*, 2004; Dutta & Normen, 1998; Lagarda *et al.*,



2006; Lu *et al.*, 2007; Mel'nikov *et al.*, 2004; Monu *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2002; Rozner *et al.*, 2009; Saraiva *et al.*, 2010; Svetlana & Segal, 2007; Toivo *et al.*, 2001; Verleyen *et al.*, 2001).

Además de las propiedades hipocolesterolémicas, los fitoesteroles han demostrado poseer actividad preventiva contra el cáncer y la aterosclerosis, como también propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antifúngicas y antibacteriales, antipiréticas, antineoplásicas, antiulcerantes, siendo asimismo útiles para el tratamiento de la hiperplasia prostática, hiperglicemia, trombosis, demencia y envejecimiento (Beveridge *et al.*, 2002; da Costa *et al.*, 2010; Fernandes & Cabral, 2007; Harrabi *et al.*, 2008; Herchi *et al.*, 2009; Lagarda *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Rocco & Fanali, 2009; Saraiva *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010; Svetlana & Segal, 2007; Zawistowski, 2007)

Todas estas propiedades impulsaron el interés y consumo de los fitoesteroles, así como también el desarrollo de alimentos enriquecidos con estos compuestos como una estrategia para prevenir y tratar enfermedades cardiovasculares (da Costa *et al.*, 2010; Dutta, 2004; Franke, 2006; Iafelice, Verardo, Marconi & Caboni, 2009; Lagarda *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007; Moreau *et al.*, 2002).

Por su parte, los fitoestanoles también tienen la capacidad de reducir los niveles de colesterol en sangre (Mel'nikov *et al.*, 2004; Saraiva *et al.*, 2010). No obstante, por ser menos abundantes en las fuentes vegetales (Lagarda *et al.*, 2006; Mel'nikov *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2010), han sido estudiados de manera adjunta a los fitoesteroles. La saturación del doble enlace en el C5 sugiere una naturaleza más hidrofóbica que la de los propios fitoesteroles, por lo que durante muchos años se creyó que su efecto hipocolesterolémico era superior. Sin embargo, esta teoría fue recientemente refutada, considerándose que entre ellos no existen diferencias en cuanto al grado de efectividad (Harrabi *et al.*, 2008; Iafelice *et al.*, 2009; Rozner & Garti, 2006; Santos *et al.*, 2007; Saraiva *et al.*, 2010).

Respecto a los ésteres de fitoesteroles, como se mencionó anteriormente, son las formas conjugadas más abundantes en la naturaleza. Estos conjugados tienen una solubilidad mayor que los fitoesteroles libres (no conjugados), por lo que suelen ser



más atractivos para su incorporación en alimentos (Moreau *et al.*, 2002; Phillips, Ruggio, Toivo, Swank & Simpkins, 2002; Soupas, Huikko, Lampi & Piironen, 2005; Stewart, Milanova, Zawistowski & Wallis, 2000). En efecto, su solubilidad en aceites es 10 veces superior que la de los fitoesteroles (Engel & Schubert, 2005). Sin embargo, es importante mencionar que la efectividad sobre la reducción del colesterol se da a través de los fitoesteroles libres, por lo que sus ésteres son menos efectivos y se requieren cantidades más abundantes para ejercer un mismo efecto (Moreau *et al.*, 2002; Zawistowski, 2007). Por cierto, si bien son más solubles, deben hidrolizarse para poder ejercer efecto hipocolesterolémico (Delaney *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2002).

1.4.2. Dosis diaria recomendada, consumo y efectos adversos

El consumo diario de fitoesteroles recomendado resulta un factor importante para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, y pesar de la gran trayectoria en su aplicación, aún no se han establecido los niveles y la frecuencia de consumo óptimos para alcanzar los beneficios (Shin *et al.*, 2010). No obstante, sí se pudo conocer que la mejor efectividad, debido a los posibles mecanismos de acción, se logra mediante la administración por vía oral (Thakkar & Diller, 1975).

El consumo de 1.5 - 2.0 g/día en alimentos enriquecidos puede lograr una reducción del LDL - C en un 5 - 15 % (Fernandes & Cabral, 2007; Harting Glade *et al.*, 2010; Hovenkamp *et al.*, 2008; Iafelice *et al.*, 2009); aunque un beneficio mayor se puede lograr consumiendo 3 g/día según la edad y demás factores de riesgo mencionados anteriormente (Harrabi *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2002; Quílez, Ruiz, Brufau & Rafecas, 2006; Rozner & Garti, 2006).

Pese al conocimiento de estas cifras, se estima que dependiendo de la dieta se consumen entre 150 y 400 mg/día de fitoesteroles y fitoestanoles (Han *et al.*, 2008; Harrabi *et al.*, 2008; Iafelice *et al.*, 2009; Kamal-Eldin & Moazzami, 2009; Lagarda *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2002; Saraiva *et al.*, 2010). En efecto, en Estados Unidos se considera que la ingesta diaria de fitoesteroles es de 180 mg, aproximadamente; mientras que en Japón este valor asciende a 400 mg/día (Gajewski, Przybył & Szymczak, 2007; Nolasco *et al.*, 2010). Incluso, se estima que el consumo medio de una dieta típica occidental es



de 60 – 80 mg/día, siendo de 500 mg/día en una dieta vegetariana (Stewart *et al.*, 2000; Zawistowski, 2007).

Si bien no están establecidas claramente las dosis recomendadas, la ingesta elevada de fitoesteroles no ejerce efectos secundarios o colaterales y tampoco ha mostrado toxicidad subcrónica o actividad mutagénica (Delaney *et al.*, 2004; Fernandes & Cabral, 2007; Moreau *et al.*, 2002; Ostlund, 1999; Rozner & Garti, 2006). Además, son compuestos muy estables bajo condiciones ambientales, presentando como única desventaja la posibilidad de interferir en la absorción de carotenoides y vitaminas (Franke, 2006; Quílez *et al.*, 2006; Rozner & Garti, 2006; Saraiva *et al.*, 2010). Efectivamente, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) incluyó a los fitoesteroles, fitoestanoles y ésteres de fitoesteroles en la lista de ingredientes Generalmente Reconocidos Como Seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (Kamal-Eldin & Moazzami, 2009; Lagarda *et al.*, 2006; Pennisi Forell *et al.*, 2010; Rozner & Garti, 2006; Svetlana & Segal, 2007).

Por otro lado, debido a la similitud estructural con el colesterol, muchos investigadores han indagado sobre la posibilidad de formación de óxidos de esteroles, ya que la oxidación es la reacción que más afecta a este tipo de compuestos (Beleggia *et al.*, 2011; Cercaci, Rodríguez-Estrada, Lercker & Decker, 2007) y sus productos, en muy elevadas concentraciones, pueden tener efectos citotóxicos comparables a los del oxicolesterol (Cercaci *et al.*, 2007; Hovenkamp *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha encontrado que los fitoesteroles son compuestos sumamente estables (González-Larena *et al.*, 2011; Soupas *et al.*, 2005) y que los posibles óxidos se producen bajo condiciones muy severas de temperatura y concentración de oxígeno, que no ocurren de manera habitual (Orozco, Priego-Capote & Luque de Castro, 2011). Más aún, ante la posibilidad de generarse, sólo se dan en muy bajas concentraciones (Rozner & Garti, 2006) y su absorción es muy limitada (Hovenkamp *et al.*, 2008). Por estos motivos, la oxidación de los fitoesteroles no parece ser un inconveniente que requiera demasiada atención, a menos que se utilicen en condiciones severas de trabajo (temperaturas superiores a 180 °C por períodos de hasta dos horas; Soupas *et al.* (2005). No obstante, a los efectos citotóxicos, los óxidos de fitoesteroles poseen propiedades antiinflamatorias



y antidiabéticas y retrasan el desarrollo de la aterosclerosis, entre otros beneficios para la salud (Hovenkamp *et al.*, 2008).

1.4.3. Mecanismo de acción

Debido a la cadena adicional en el C24, los fitoesteroles son compuestos más hidrofóbicos que el colesterol (Rozner & Garti, 2006; Stewart *et al.*, 2000). En efecto, son insolubles en agua y muy poco solubles en aceites y grasas (Auweter *et al.*, 2009; Engel & Schubert, 2005; Franke, 2006; Rozner & Garti, 2006; Türk & Lietzow, 2004). Además, la velocidad a la que estos compuestos se disuelven es muy baja (Türk & Lietzow, 2004) y son apenas dispersables en agua (Zawistowski, 2007). Estas propiedades, junto a su alto punto de fusión (alrededor de 130 °C) (Franke, 2006) limitan su biodisponibilidad, siendo su absorción despreciable (menos del 2 % de los fitoesteroles presentes) y en efecto, su concentración en sangre prácticamente nula (Engel & Schubert, 2005; Lagarda *et al.*, 2006; Ostlund, 1999; Rozner & Garti, 2006).

El mecanismo de acción de los fitoesteroles para la reducción del colesterol en sangre no está del todo claro (Engel & Schubert, 2005; Lagarda *et al.*, 2006; Mel'nikov *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2002; Rozner *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2000; Zawistowski, 2007), pero se cree que actúan en varias de las etapas de absorción.

En primer lugar, durante la digestión habitual de los lípidos se forma una emulsión aceite/agua, rica en triacilglicérols, vitaminas, carotenoides, ésteres y colesterol libre (Rozner & Garti, 2006). Las gotas dispersas, frecuentemente denominadas "micelas mixtas", son las encargadas de transportar estos compuestos a través de la membrana intestinal. Sin embargo, ante la presencia de fitoesteroles, se produce un efecto de desplazamiento competitivo del colesterol debido a que las micelas resultan más afines a los fitoesteroles que al colesterol (Moreau *et al.*, 2002; Rozner & Garti, 2006; Stewart *et al.*, 2000). Sin esta incorporación del colesterol en la fase micelar, el mismo no alcanza los sitios de absorción del intestino, por lo cual no tiene lugar el pasaje hacia el torrente sanguíneo (Lagarda *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2002; Rozner & Garti, 2006).



En segundo lugar, cuando se incrementa la concentración de lípidos dentro de las micelas, éstos pueden precipitar dando lugar a cristales formados por fitoesteroles y colesterol (co - cristalización) muy poco solubles y no absorbibles (Lagarda *et al.*, 2006; Mel'nikov *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2002; Rozner *et al.*, 2009).

Aparte de estos aspectos fisicoquímicos, los fitoesteroles pueden actuar inhibiendo la actividad de lipasas y otras enzimas poco específicas presentes en el sitio de absorción (Rozner & Garti, 2006). Finalmente, la última etapa en la que pueden actuar los fitoesteroles, si alcanzan los sitios de absorción, es en el tráfico intracelular (microvellosidades del intestino) hasta la linfa, ocupando los sitios reservados para el colesterol en los quilomicrones (Rozner & Garti, 2006).

1.4.4. Principales fuentes de fitoesteroles, extracción e identificación

Como se mencionó anteriormente, los fitoesteroles sólo están disponibles en el organismo humano a través de su incorporación en la dieta (Kamal-Eldin & Moazzami, 2009). Se encuentran ampliamente distribuidos como parte de la fracción lipídica en las plantas y en los alimentos basados en ellas (Ai, 1997; da Costa *et al.*, 2010; Dutta, 2004). En efecto, están presentes en semillas, frutas, legumbres, granos de cereales, frutos secos y productos elaborados como margarinas y aceites vegetales o de caña crudos y refinados (Fernandes & Cabral, 2007; Herchi *et al.*, 2009; Hovenkamp *et al.*, 2008; Kamal-Eldin & Moazzami, 2009; Lagarda *et al.*, 2006; Monu *et al.*, 2008; Rozner & Garti, 2006; Svetlana & Segal, 2007).

La composición de cada uno de los fitoesteroles depende en gran medida de la procedencia, del origen geográfico, del tipo de cultivo, período de cosecha, etc. (Nolasco *et al.*, 2010; Rocco & Fanali, 2009). Además, la metodología seleccionada para cuantificar los fitoesteroles puede influenciar significativamente los valores analíticos obtenidos (Shin *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha encontrado que no hay diferencias significativas entre la concentración de fitoesteroles en los alimentos crudos y cocidos (Gajewski *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008), pero sí con el tiempo de almacenamiento (siendo afectada positiva o negativamente, dependiendo del alimento) (Gajewski *et al.*, 2007).



El contenido total, expresado en base húmeda (o fresca) es considerablemente menor en vegetales, frutas y bayas que en aceites vegetales y cereales (Dutta, 2004; Han *et al.*, 2008). La Tabla 1.2 muestra el contenido total de fitoesteroles de las principales fuentes vegetales y derivados (Rozner & Garti, 2006).

De acuerdo a lo observado, los frutos secos, en especial las almendras, son de los vegetales más ricos en contenido total de fitoesteroles. En sintonía, Shin *et al.* (2010) observaron un contenido similar de fitoesteroles totales en el maní (1.30 - 1.50 g/kg), acompañado de otros ingredientes funcionales como vitamina E y compuestos fenólicos. Respecto al aceite extraído de los frutos secos, Lagarda *et al.* (2006) reportaron un contenido de 0.99 - 2.07 g/kg de aceite en nueces, almendras, maní, avellanas y macadamia; siendo campesterol y estigmasterol los fitoesteroles más abundantes en estos alimentos.

Tabla 1.2. Contenido total de fitoesteroles en alimentos (Rozner & Garti, 2006).

Alimento	Contenido total [g/ kg _{alimento}]
Almendras	1.43
Frijoles	0.76
Trigo	0.69
Lechuga	0.38
Banana	0.16
Manzana	0.12
Tomate	0.07

Se reportaron concentraciones considerablemente inferiores para otros vegetales, frutas y bayas. En efecto, Dutta (2004) y Han *et al.* (2008) encontraron concentraciones de 0.40 g/kg de fitoesteroles para el brócoli, 0.41 g/kg para la coliflor, 0.75 g/kg para la palta y alrededor de 0.24 g/kg en la naranja (todos basados en peso fresco). A pesar de ser contenidos significativamente menores con respecto a los aceites vegetales y los cereales, el consumo de estos alimentos es elevado, por lo que también



han sido motivo de estudio (Han *et al.*, 2008). Más aún, cuando las concentraciones de fitoesteroles son expresadas en base seca de alimento, los valores cambian significativamente hasta llegar a 0.25 - 4.1 g/kg (Dutta, 2004; Gajewski *et al.*, 2007). En este contexto, Toivo *et al.* (2001) reportaron un contenido total de fitoesteroles en cebolla seca entre 0.22 y 0.55 g/kg, dependiendo del método de extracción del compuesto estudiado.

Respecto a los aceites vegetales, la Tabla 1.3 muestra la composición de esteroides media de diversos aceites vegetales crudos y refinados (Johnsson & Dutta, 2005). La mayoría de los aceites vegetales crudos contienen entre 1 y 5 g/kg de fitoesteroles totales; a excepción de aquellos provenientes de maíz y colza, cuyo contenido alcanza valores superiores a 13 y 8 g/kg, respectivamente. Un contenido similar para el aceite de colza fue reportado por Toivo *et al.* (2001), de aproximadamente 7 g/kg en el desarrollo de un método alternativo de extracción, mientras que Zhang *et al.* (2007) encontraron un contenido total entre 5 y 11 g/kg, compuesto mayoritariamente por β -sitosterol (45 - 58 % del total). Aunque en menor concentración, el aceite de soja también es rico en fitoesteroles (Erinç, Tekin & Musa Özcan, 2009). Rozner & Garti (2006) reportaron contenidos similares en aceite de oliva (1.76 g/kg), maíz (9.52 g/kg), palma (0.49 g/kg) y soja (2.21 g/kg); mientras que en aceite de girasol establecieron un contenido de fitoesteroles sustancialmente mayor, de 7.25 g/kg de aceite. Como se mencionó anteriormente, estas diferencias radican en el origen del aceite, la ubicación geográfica, el período de cosecha, etc. (Nolasco *et al.*, 2010; Rocco & Fanali, 2009).

Por otro lado, Beveridge *et al.* (2002) encontraron como fuente rica de fitoesteroles al aceite de ginseng, obteniendo un contenido de 9 g/kg de aceite, valor comparable al obtenido en el aceite de maíz. Asimismo, Herchi *et al.* (2009) reportaron al aceite de lino como una fuente rica en fitoesteroles, con un contenido de 16 g/kg.

De la Tabla 1.3 se observa además que el contenido de fitoesteroles totales en aceites refinados disminuye respecto al aceite crudo (Nolasco *et al.*, 2010). Por ejemplo, Dutta (2004) encontró una pérdida de esteroides con aumentos en la temperatura o el tiempo de procesamiento, siendo más importante durante los procesos de desgomado y blanqueado del aceite (Dutta, 2004).



Tabla 1.3. Composición de esteroides y estanoles en diversos aceites vegetales crudos y refinados (g/kg) (Dutta, 2004).

Muestra	Brasicasterol	Campesterol	β -Sitosterol	Estigmasterol	Avenasterol	Estanoles	Total
Maíz, crudo	TR	2.59	9.89	0.98	0.36	--	13.9
Maíz, refinado	ND	1.23 - 1.64	4.54 - 5.43	0.46 - 0.59	0.10 - 0.41	0.23 - 0.33	6.86 - 7.73
Oliva, extravirgen	--, ND	0.045 - 0.050	1.18 - 1.33	0.009 - 0.013	0.17 - 0.22	0.0035 - 0.007	1.44 - 1.62
Oliva, prensado en frío	ND	0.02 - 0.05	1.22 - 1.30	ND - 0.03	0.16 - 0.60	0.03 - 0.04	1.56 - 1.96
Maní, refinado	0.01	0.24 - 38	1.15 - 1.69	0.12 - 0.22	ND - 0.13	0.03	1.67 - 2.29
Colza, crudo	1.11	2.93	4.2	ND	--	--	6.82 - 8.78
Colza, refinado	0.51 - 0.92	1.64 - 3.00	3.58 - 3.95	ND - 0.16	0.14 - 0.36	0.02 - 0.12	6.93 - 7.67
Soja, crudo	--	0.57 - 0.71	1.73 - 1.84	0.58 - 0.61	0.11 - 0.14	--	3.02 - 4.44
Soja, refinado	ND - 0.007	0.34 - 0.82	1.24 - 1.73	0.37 - 0.64	0.04 - 0.14	ND - 0.07	2.03 - 3.28
Girasol, refinado	0.02	0.27 - 0.55	1.94 - 2.57	0.18 - 0.32	0.19 - 0.56	0.04	2.63 - 3.76

ND: No detectado; TR: trazas; -- No reportado.



La Tabla 1.4 muestra la composición de fitoesteroles y el contenido total en diversos cereales (Dutta, 2004), reconocidos como buenas fuentes de fitoesteroles. Como se mencionó anteriormente, los valores son considerablemente mayores a los que corresponden a vegetales y frutas, siendo el maíz el cereal con mayor contenido (1.78 g/kg de grano fresco).

Tabla 1.4. Contenido de fitoesteroles en cereales (g/kg de materia húmeda) (Dutta, 2004).

Fuente	Campesterol	β -Sitosterol	Estigmasterol	Avenasterol	Total
Cebada	0.15 - 0.19	0.44 - 0.48	0.02 - 0.04	0.06 - 0.07	0.72 - 0.80
Trigo sarraceno	0.09	0.78	TR	0.04	0.96
Maíz	0.32	1.20	0.21	--	1.78
Mijo	0.11	0.37	0.02	0.09	0.77
Avena	0.04 - 0.05	0.26 - 0.32	0.02 - 0.04	0.16 - 0.21	0.48 - 0.61
Arroz	0.15	0.38	0.10	0.02	0.72
Sésamo	0.13 - 0.21	0.36 - 0.61	0.02 - 0.04	0.01 - 0.04	0.71 - 1.13
Trigo	0.11 - 0.15	0.29 - 0.49	0.015 - 0.02	ND - 0.02	0.45 - 0.83

TR: trazas; --: No reportado.

En estos alimentos, los fitoesteroles se encuentran localizados más preferentemente en las semillas, por lo que la dosis incorporada en la dieta depende de la forma en que los cereales son consumidos, ya sea en productos integrales o como harinas refinadas (Dutta, 2004). Lagarda *et al.* (2006) encontraron resultados similares para el contenido total de fitoesteroles en trigo, avena y cebada, reportando además un contenido de 0.955 g/kg en semillas de centeno.



Aunque los fitoesteroles están presentes en concentraciones muy bajas en las células vegetales y membranas, pueden ser extraídos usando diversas técnicas (extracción con solventes, tratamientos químicos, destilación molecular, etc.) (Rozner & Gardi, 2006). En general, son subproductos del procesamiento de aceites vegetales que se extraen junto a la fracción insaponificable en una destilación con vapor, que luego de una etapa de purificación se obtienen como polvo cristalino blanco (Azadmard-Damirchi & Dutta, 2006; Engel & Schubert, 2005; Fernandes & Cabral, 2007; Toivo *et al.*, 2001; Verleyen *et al.*, 2001). En efecto, los fitoesteroles son uno de los compuestos bioactivos más importantes que constituyen la fracción insaponificable de los lípidos (Bi *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010). La determinación de la fracción de cada uno de los fitoesteroles presentes puede realizarse mediante métodos cromatográficos, siendo la cromatografía gaseosa el método que mejor resolución provee para la identificación y cuantificación de los fitoesteroles (Harrabi *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2011; Toivo *et al.*, 2001).

1.4.5. Funcionalización de alimentos con fitoesteroles y derivados

En los últimos años se ha incrementado la demanda de alimentos saludables, seguros, naturales y que requieran mínimo esfuerzo y tiempo para su preparación (Plaza, Sánchez-Moreno, de Pascual-Teresa, de Ancos & Cano, 2009). Más aún, los estilos de vida actuales no son compatibles con la ingesta de vegetales y la preparación de alimentos conteniendo fitoesteroles (Santos *et al.*, 2007), lo que ha derivado en el desarrollo de alimentos listos para consumir, mínimamente procesados (Plaza *et al.*, 2009). En este contexto, dada la gran cantidad de beneficios adjudicados a la ingesta diaria de fitoesteroles y a su presencia en cantidades insuficientes en alimentos naturales, los fitoesteroles se han ido incorporando en la dieta mediante suplementos (Fernandes & Cabral, 2007).

Con el aumento de la popularidad de los alimentos funcionales, los fitoesteroles también se han ido incorporando en alimentos disponibles comercialmente, incluyendo untables de base grasa, aderezos para ensalada, aceites y margarinas (Alvim, Souza, Koury, Jurt & Dantas, 2013; Harrabi *et al.*, 2008; Herchi *et al.*, 2009; Hovenkamp *et al.*,



2008; Lagarda *et al.*, 2006; McClements, Decker & Weiss, 2007; Monu *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2010). Sin embargo, este tipo de alimentos se encuentra claramente restringido en dietas hipocolesterolémicas y saludables (Auriou, 2003; Santos *et al.*, 2007). Además, este campo de aplicación implica la dispersión/solución a altas temperaturas, favoreciendo la generación de productos de oxidación de los aceites y grasas utilizados (Zawistowski, 2007). Asimismo, los fitoesteroles han sido incluidos en algunos alimentos sólidos, tales como productos de panadería, magdalenas, croissants (Quílez *et al.*, 2006) y premezclas (Haarasilta, Reinikainen & Sulanto, 1998), donde también pueden ser oxidados debido a los períodos prolongados de exposición a las temperaturas de horneado (170 - 190 °C durante 15 - 20 minutos) (Quílez *et al.*, 2006).

Las formulaciones de base acuosa (por ejemplo: bebidas, sopas y otras) constituyen un atractivo campo de aplicación. Sin embargo, la incorporación de los fitoesteroles en este tipo de alimentos presenta algunos desafíos. En primer lugar, y como se mencionó anteriormente, su hidrofobicidad, insolubilidad en agua y alto punto de fusión, los hacen pobres candidatos para producir dispersiones estables, limitando su aplicabilidad en productos intermedios o finales de base acuosa (Auweter *et al.*, 2009; McClements *et al.*, 2007). Más aún, son compuestos más livianos que el agua, por lo que al ser incorporados sin agregados (emulsificantes y/o espesantes) ascienden a la superficie debido a la diferencia de densidad (Lerchenfeld & Striegel, 2008; Zawistowski, 2007). Además, los fitoesteroles no son organolépticamente aceptados debido a la consistencia cerosa y arenosa que imparten al paladar (Lerchenfeld & Striegel, 2008; Stevens & Schmelzer, 2003; Thakkar & Diller, 1975; Zawistowski, 2007).

A pesar de ser compuestos insolubles en agua, se ha comprobado que para que los fitoesteroles puedan ejercer su efecto hipocolesterolémico no es necesario que estén disueltos, sino que resulta suficiente si se encuentran en forma finamente dispersa en el alimento (Harting Glade *et al.*, 2010; Thakkar & Diller, 1975). En efecto, los fitoesteroles deben ser administrados finamente divididos con el objeto de facilitar su exposición a las sales biliares, y preferentemente en tamaño de partícula inferiores a 25 μm (Thakkar & Diller, 1975), asegurando así, además, la preparación de un producto con buena palatabilidad (Auriou, 2003; Stewart *et al.*, 2000; Zawistowski, 2002).



Actualmente, un desafío crucial para las industrias farmacéutica y alimentaria es desarrollar un producto que pueda ser administrado en dosis suficientemente bajas, sin que esto implique una pérdida de eficiencia (Rozner & Garti, 2006), y que al ser utilizado en aplicaciones de base acuosa dé lugar a productos homogéneos (donde los fitoesteroles se mantengan en estado disperso, sin separación de fases) y con buena palatabilidad (Harting Glade *et al.*, 2010). En este sentido, existen distintos enfoques propuestos en la literatura abierta que pueden incluirse en alguna de las siguientes estrategias:

- **La modificación química para dar lugar a la esterificación con ácidos grasos.** Este enfoque se basa en la reacción de esterificación, que consiste en hacer reaccionar los fitoesteroles con ácidos grasos de un aceite a 90 - 120 °C bajo la presencia de un catalizador durante períodos de tiempo prolongados (Miettinen, Vanhanen & Wester, 1996; Milstein, Biermann, Leidl & Von Kries, 2008; Stewart *et al.*, 2000), y se suele utilizar para incorporar los ésteres de fitoesteroles en sistemas oleosos y grasos (Chung, Noh & Kim, 2000; Miettinen *et al.*, 1996; Wester, 2000). Además, Stewart *et al.* (2000) plantearon la esterificación y posterior hidrogenación de los fitoesteroles con el fin de incluirlos en bebidas y nutracéuticos, incluyendo gaseosas, jugos y suplementos dietarios, entre otras aplicaciones alimenticias.
- **La creación de emulsiones y microemulsiones.** El término “emulsión” hace referencia a un sistema disperso en el cual ambas fases (dispersa y continua) se encuentran en estado líquido. Varios autores se focalizaron en la elaboración de emulsiones de fitoesteroles mediante su mezclado en caliente (a temperatura superior a la de fusión de los fitoesteroles, 135 °C), utilizando agua junto a un tensoactivo que se absorba en la interfase y sea estable a altas temperaturas (por encima de 90 °C) (Auriou & Ferreres, 2002; Engel & Schubert, 2005; Gottemoller, 2004; Rozner & Garti, 2006; Stevens & Schmelzer, 2003). Una vez realizado el mezclado, se sugiere la homogeneización a 80 - 100 °C y el agregado de agentes inhibidores de la cristalización que permitan el posterior enfriamiento de la emulsión (Binder & Gottemoller, 2004; Rozner & Garti, 2006). Por otro lado, Auweter *et al.* (2009) realizaron emulsiones de fitoesteroles mediante su disolución a 140 - 180 °C en un solvente orgánico inmiscible



en agua (como acetona) y su posterior dispersión en un medio acuoso coloidal por un período de 8 horas.

- **La creación de suspensiones estables.** Por “suspensión” se entiende a un sistema disperso en el cual una de las fases es líquida (fase continua) y la otra sólida (fase dispersa). Específicamente para fitoesteroles, se abordaron distintas estrategias tendientes a extender la vida útil de esta dispersión: a) el incremento de las fuerzas repulsivas entre las partículas del material disperso (utilizando tensoactivos iónicos o no iónicos o polímeros, Tadros (2011)); b) la reducción del tamaño de partícula (mediante la aplicación de etapas de homogeneizado o molienda, que pueden ser acompañadas del uso de tensoactivos) (Thakkar & Diller, 1975); y c) el aumento de la viscosidad (a través del uso de agentes espesantes) (Harting Glade *et al.*, 2010; McClements *et al.*, 2007; Rozner & Garti, 2006).

De acuerdo a Stevens & Schmelzer (2003) muchas de estas alternativas presentan desventajas inherentes tales como: el costo adicional en la modificación química (debido al uso de solventes y/o catalizadores y la incorporación de etapas posteriores de purificación) y la ausencia de garantías respecto a la seguridad del alimento (como consecuencia del uso de solventes orgánicos y/o catalizadores no alimentarios). Harting Glade *et al.* (2010) destacan desventajas adicionales como: la gran cantidad de etapas involucradas en algunos procesos (6 o más en la invención de Auweter *et al.* (2009)), las severas condiciones acompañadas de extensos tiempos de tratamiento (por ejemplo, 6 horas de pasteurización sugeridas en la invención de Thakkar & Diller (1975); o bien 10 minutos de tratamiento a 80 - 100 °C en la invención de Gottemoller (2004) y la pobre estabilidad que presentan las composiciones de fitoesteroles a pesar de su procesamiento (Binder & Gottemoller, 2004).

Independientemente del abordaje tenido en cuenta, la mayoría de los métodos mencionados requiere de una o más etapas de reducción del tamaño de partícula o de gota para mejorar la dispersabilidad de los fitoesteroles y cuando se desea obtener un material sólido, la inclusión de una etapa de secado. Para la reducción del tamaño, varios autores estudiaron diferentes técnicas, entre otras: a) molienda en seco del



material enfriado (usando, por ejemplo, molinos de atrición con aire, molinos de martillo de alta energía, molinos de impacto (Kluetz, Klein, Snyder, Goulson & Cavallini, 2005; Thakkar & Diller, 1975)); b) homogeneización de dispersiones (emulsiones o suspensiones) incluyendo agentes tensoactivos (Binder & Gottemoller, 2004; Gottemoller, 2004; Lerchenfeld & Striegel, 2008); y c) homogeneización de alta presión o por esfuerzo de corte de un material fundido (Binder & Gottemoller, 2004; Harting Glade *et al.*, 2010; Stevens & Schmelzer, 2003).

1.5. Microencapsulación

En el contexto descrito, la microencapsulación resulta una estrategia promisoriosa. Esta tecnología consiste en el empaque de compuestos sólidos, líquidos o gaseosos (en forma finamente dividida) dentro de cápsulas selladas, con tamaños que van de unos pocos nanómetros a unos pocos micrómetros, que puedan liberar su contenido a velocidades controladas y/o bajo condiciones específicas (Anal & Singh, 2007; Balasubramani, Viswanathan & Vairamani, 2013; Calvo, Hernández, Lozano & González-Gómez, 2010; Desai & Park, 2005; Estevinho, Rocha, Santos & Alves, 2013; Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger, 2012; Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley & Saurel, 2007; Gibbs, Kermasha, Alli & Mulligan, 1999; Kaushik, Dowling, Barrow & Adhikari, 2015; Nesterenko, Alric, Silvestre & Durrieu, 2013; Sarkar & Singhal, 2011; Wang, Lu, Lv & Bie, 2009; Zuidam & Nedovic, 2010).

El material a encapsular suele ser denominado de diversas maneras, tales como núcleo, ingrediente activo, fase interna, etc., (Gibbs *et al.*, 1999; Kaushik *et al.*, 2015; Ré, 1998; Zuidam & Nedovic, 2010) y puede estar compuesto por uno o más ingredientes de interés (Balasubramani *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007). La retención del ingrediente activo dentro de la microcápsula está gobernada por su funcionalidad química, solubilidad, polaridad y volatilidad (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Por otro lado, el material que se encuentra encapsulando puede ser denominado agente encapsulante, cobertura, membrana, cáscara, material transportador, material de pared, fase externa; y también puede estar compuesto de



uno o varios materiales (Balasubramani *et al.*, 2013; Gibbs *et al.*, 1999; Kaushik *et al.*, 2015; Ré, 1998) siempre y cuando sea capaz de formar una barrera entre el ingrediente activo y sus alrededores (Estevinho *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Nesterenko *et al.*, 2013; Zuidam & Nedovic, 2010).

1.5.1. Objetivos y aplicaciones de la microencapsulación

La tecnología de encapsulación ha sido utilizada en la industria de los alimentos por más de 60 años como alternativa para proveer ingredientes líquidos o sólidos con una barrera efectiva a las interacciones químicas y/o ambientales hasta el momento apropiado para su liberación (Carvalho, Silva & Hubinger, 2014; Desai & Park, 2005; Risch & Reineccius, 1996). De esta manera, permite aumentar la efectividad de muchos compuestos en la industria, mejorando u otorgando otras nuevas funcionalidades (Estevinho *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

La aplicación de la microencapsulación en la industria se sustenta en sus diversas ventajas (Desai & Park, 2005; Estevinho *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Jyothi *et al.*, 2010; Kha, Nguyen, Roach & Stathopoulos, 2014; Nesterenko *et al.*, 2013; Ré, 1998; Sarkar & Singhal, 2011). En efecto, esta estrategia permite:

- Separar y proteger al ingrediente activo de la degradación mediante la reducción de su reactividad con el medio que lo rodea (por ejemplo: calor, humedad, luz y aire).
- Modificar las características físicas del ingrediente activo y facilitar su manipulación.
- Adaptar el producto y regular su velocidad de transferencia hacia el exterior, para que se comporte como de liberación lenta o controlada en el tiempo.
- Enmascarar el sabor del ingrediente activo.
- Diluir el ingrediente activo, cuando sólo se requiere en muy pequeñas cantidades y aun así alcanzar una dispersión uniforme en el agente encapsulante.



En efecto, casi cualquier material que necesite ser protegido, aislado, liberado lenta o controladamente en el tiempo puede ser encapsulado. Entre los ingredientes alimenticios que pueden ser beneficiados por la encapsulación cabe mencionar: aromas, ácidos, bases, buffers, lípidos, enzimas, microorganismos, edulcorantes artificiales, vitaminas, minerales, preservantes, antioxidantes, agentes entrecruzantes, agentes de fermentación, colorantes y nutrientes (Barbosa-Cánovas, Ortega-Rivas, Juliano & Yan, 2005). Más aún, esta tecnología tiene diferentes aplicaciones no sólo en la industria alimentaria sino también en, las industrias biomédica, farmacéutica y cosmética, además de agricultura y catálisis (Nesterenko *et al.*, 2013); siendo las áreas de aplicación más abordadas la farmacéutica, química, bioquímica e ingeniería química (Figura 1.4).

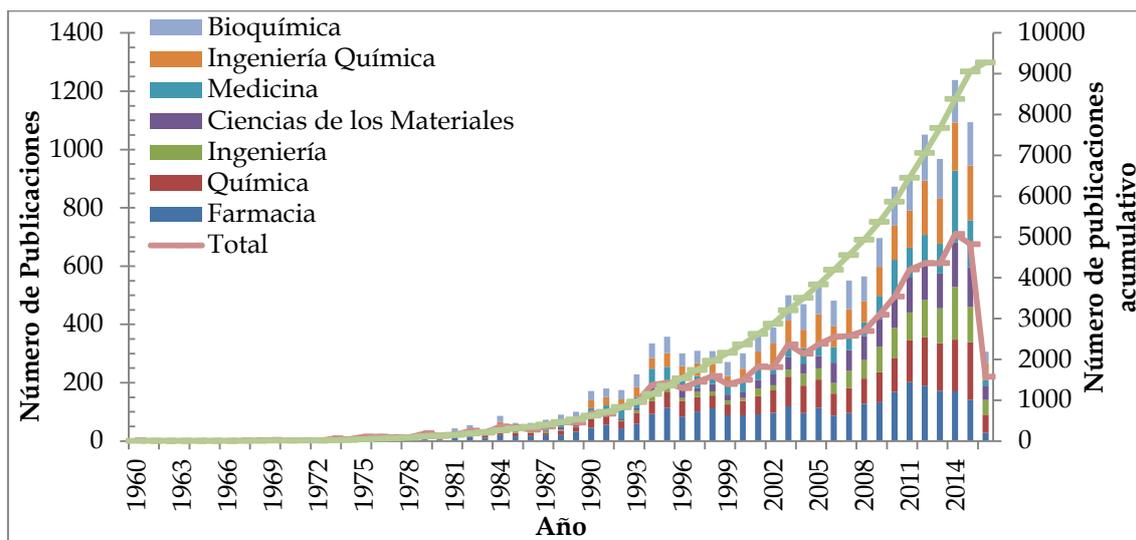


Figura 1.4. Número de publicaciones total y por área de investigación (La curva *Total* indica el número total de trabajos de cada año, algunos de los cuales están contemplados en más de un área de investigación).

Asimismo, las aplicaciones de microencapsulación han tenido un incremento exponencial en las últimas décadas (Estevinho *et al.*, 2013). En este sentido, un análisis de las publicaciones concernientes a la técnica de microencapsulación indica un total



de casi 9300 artículos publicados desde 1960, de los cuales alrededor de 3200 fueron publicados en los últimos 5 años (Figura 1.4) (Scopus, 2016).

1.5.2. Estructura de las microcápsulas

El término microencapsulación ha sido interpretado ampliamente para incluir microcápsulas, micropartículas, nanocápsulas, etc. (Ré, 1998). En su mayoría son esferas pequeñas; sin embargo, su tamaño y forma dependen de los materiales y métodos utilizados (Estevinho *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007) (Figura 1.5).

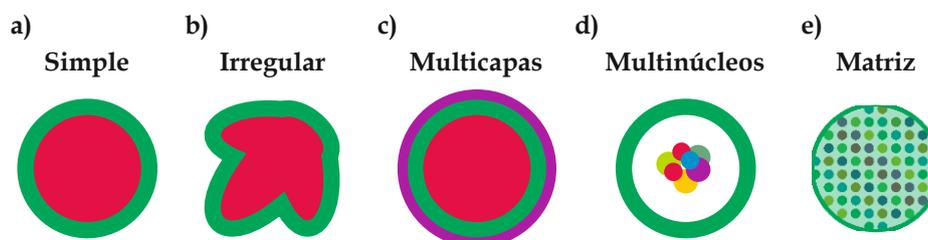


Figura 1.5. Morfología de las microcápsulas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

De acuerdo a la distribución del ingrediente activo en el sistema, se distinguen distintos tipos de microcápsulas (Desai & Park, 2005; Ré, 1998). La estructura más simple es aquella en que un núcleo de ingrediente activo (esférico o no) es rodeado por una pared o membrana de espesor uniforme del agente encapsulante (Desai & Park, 2005; Gibbs *et al.*, 1999). Esta estructura de microcápsula se denomina estructura *partícula simple* (Figura 1.5a; Figura 1.5b). También se pueden formar estructuras multicapas que consisten de múltiples paredes de diferente composición rodeando a un único núcleo (Figura 1.5c) (Calvo *et al.*, 2010; Desai & Park, 2005; Estevinho *et al.*, 2013; Gibbs *et al.*, 1999), o bien estructuras multinúcleos que contienen numerosos núcleos en el interior de una única pared, también conocidas como “agregados” (Figura 1.5d) (Calvo *et al.*, 2010; Desai & Park, 2005; Gibbs *et al.*, 1999). Por otro lado, se pueden formar estructuras tipo *matriz*; las cuales comprenden aquellas partículas en



que el núcleo se encuentra disperso uniformemente a través de todo el agente encapsulante (Figura 1.5e) (Desai & Park, 2005; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

Algunas propiedades de las microcápsulas, tales como composición, mecanismo de liberación, tamaño y forma, se pueden modificar según la aplicación específica del ingrediente activo (Desai & Park, 2005). En efecto, las microcápsulas son formuladas para que el núcleo sea liberado de una manera rápida o bien controlada (Ré, 1998). La liberación del núcleo contenido en la microcápsula a una velocidad controlada puede ser desencadenada mediante agitación, disolución, difusión, calentamiento o acción de enzimas o pH (Nesterenko *et al.*, 2013; Ré, 1998).

1.5.3. Técnicas de microencapsulación - Secado por atomización

Existen muchas técnicas que pueden ser utilizadas para la microencapsulación de ingredientes (Borgogna, Bellich, Zorzin, Lapasin & Cesàro, 2010; Estevinho *et al.*, 2013; Nesterenko *et al.*, 2013; Shu, Yu, Zhao & Liu, 2006; Soottitantawat, Bigeard, *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Yoo, Song, Chang & Lee, 2006). La aplicación de un método, con diferentes adaptaciones y especificidades, se lleva a cabo considerando el tipo de microcápsula deseado (tamaño y forma), las propiedades físicas y químicas del ingrediente activo y el agente encapsulante, el perfil de liberación requerido y la escala y costo de producción (Estevinho *et al.*, 2013; Nesterenko *et al.*, 2013; Ré, 1998).

A grandes rasgos, las técnicas utilizadas para la microencapsulación del núcleo pueden agruparse en tres grandes categorías, según respondan a un proceso químico, fisicoquímico o físicomecánico (Jyothi *et al.*, 2010; Ré, 1998) (Tabla 1.5).

Gouin (2004) presentó resumidamente una manera simple de orientar la selección del método de encapsulación más apropiado, teniendo en cuenta las características del ingrediente activo (hidrofílico, lipofílico o anfifílico), su estado físico y tamaño de partícula/gota; el costo operativo, la capacidad de producción y el modo de operación (continuo o discontinuo); y el mecanismo y tasa de liberación del núcleo (térmico, mecánico o por digestión; rápida o controlada, respectivamente).

**Tabla 1.5.** Diferentes técnicas utilizadas para la microencapsulación.

Procesos Químicos	Procesos Físicoquímicos	Procesos Fisicomecánicos
Polimerización interfacial	Separación de fases (orgánica o acuosa)	Secado por atomización (<i>spray drying</i>) y enfriamiento por atomización (<i>spray congealing/cooling</i>)
Polimerización <i>In situ</i>	Encapsulación sol-gel	Recubrimiento en lecho fluidizado
Policondensación	Microencapsulación asistida con CO ₂ supercrítico	Recubrimiento en bandeja
Inclusión molecular	Coacervación Liposomas	Evaporación de solvente Extrusión

De todas las técnicas mencionadas, el secado por atomización es el método más comúnmente utilizado en la industria de los alimentos (Drusch, 2007; Frascareli *et al.*, 2012; Kha *et al.*, 2014; Krishnaiah, Sarbatly & Nithyanandam, 2012; Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno & Osorio, 2015) debido a la facilidad de industrialización y la posibilidad de operación en modo continuo (Shu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). Además, esta técnica presenta bajos costos operativos y buena disponibilidad de equipamiento (Balasubramani *et al.*, 2013; Calvo *et al.*, 2010; Estevinho *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2013; Kaushik *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009). Por otro lado, el secado por atomización es un método que se caracteriza por una operación muy flexible y altamente reproducible y por producir partículas de buena calidad (Estevinho *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012).

Este método implica la transformación de una alimentación en estado líquido (solución, dispersión o emulsión) a un sistema particulado seco, mediante el secado con un gas (generalmente aire) suficientemente caliente como para lograr una rápida evaporación del solvente contenido (generalmente agua) (Estevinho *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2013; Krishnaiah *et al.*, 2012; Soottitantawat, Bigeard, *et al.*, 2005). La remoción del agua en el secado por atomización es una práctica común en la ingeniería que persigue diversos fines; entre otros, asegurar la estabilidad microbiológica de los



productos, evitar el riesgo de degradaciones químicas y biológicas, reducir los costos de almacenamiento y transporte, y obtener un producto con propiedades específicas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En líneas generales, una bomba peristáltica conduce la alimentación hacia un atomizador en el cual se produce la creación de una gran cantidad de microgotas que se mezclan con el aire de secado caliente en el interior de la cámara de secado (Figura 1.6). Este aire caliente (a una dada temperatura, T_{entrada}) permite la evaporación del agua contenida en las gotas para producir un polvo fino que circula hacia un ciclón de separación y se deposita en un recipiente colector. El aire exhausto, cargado de partículas finas, pasa a través de un filtro y es descargado a la atmósfera a través de un aspirador ubicado aguas abajo del filtro.

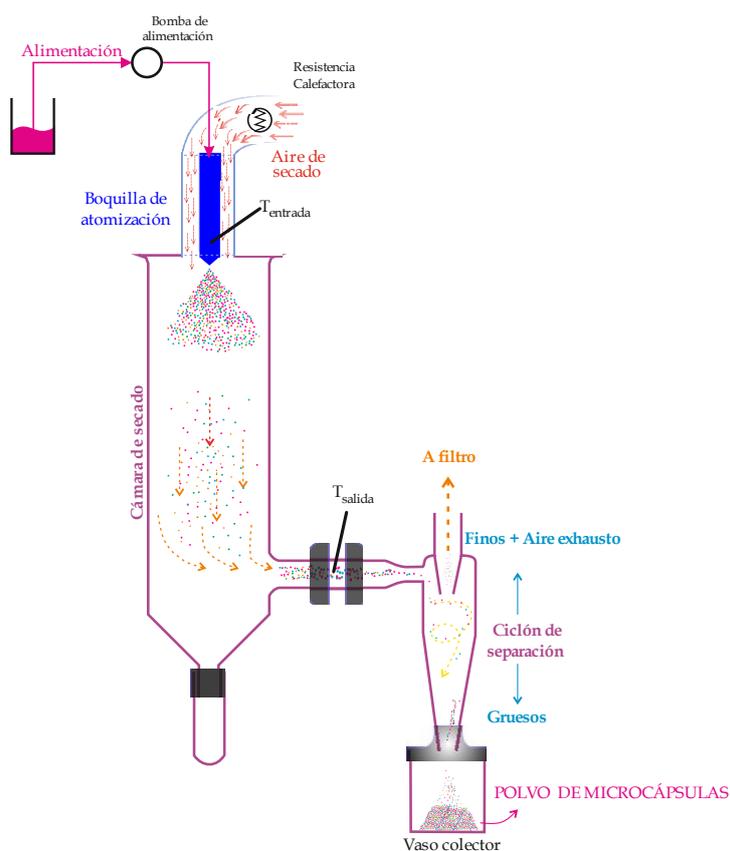


Figura 1.6. Principio de funcionamiento del secadero por atomización (esquema co - corriente).



Según la ubicación del atomizador con relación a la alimentación del aire de secado caliente, se puede distinguir entre el secado a co - corriente y a contracorriente (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Ré, 1998; Sosnik & Seremeta, 2015). En el proceso a co - corriente el líquido se alimenta en la misma dirección que el aire caliente y la evaporación ocurre casi instantáneamente, limitando la degradación térmica. Por otro lado, en el secado a contracorriente, el líquido se alimenta en dirección opuesta al flujo de aire caliente y el producto se expone a altas temperaturas, limitando su aplicación a productos sensibles al calor (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Sosnik & Seremeta, 2015).

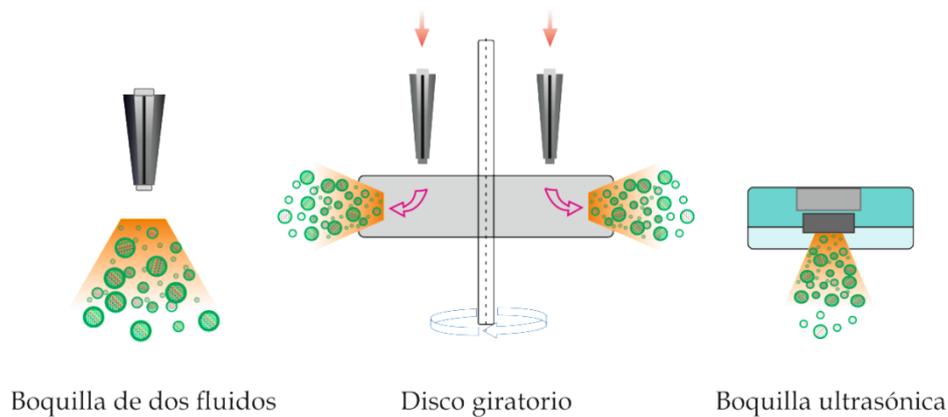


Figura 1.7. Principales tipos de atomizadores utilizados en el secado por atomización.

Por otra parte, el proceso de atomización se puede llevar a cabo mediante diversos tipos de atomizadores, entre los cuales se destacan el atomizador de disco giratorio, la boquilla binaria (de dos fluidos) y la boquilla de ultrasonido (Figura 1.7) (Benita, 2006; Estevinho *et al.*, 2013; Okuro, Eustáquio, Junior & Favaro-Trindade, 2013). En cualquier caso, el objetivo de la atomización es generar la máxima área de transferencia de calor y masa entre el aire de secado y el líquido (Gharsallaoui *et al.*, 2007). La selección del atomizador depende de la naturaleza y el caudal de la alimentación y de las características del polvo seco que se desea obtener (Gallo, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007). En particular, en los atomizadores de dos fluidos, la alimentación líquida y el aire de atomización (comprimido) entran separados al atomizador a través de canales concéntricos y salen juntos en el extremo opuesto de la



boquilla (Kaushik *et al.*, 2015). Este diseño utiliza la energía del gas comprimido para atomizar el líquido en gotas muy finas (10 - 1000 μm), cuyo tamaño depende del caudal (o presión) del gas. Se utiliza frecuentemente para atomizar líquidos viscosos (Masters, 1979).

Los atomizadores de disco rotatorio utilizan la energía de una rueda giratoria de alta velocidad para dividir la muestra líquida en gotas ($> 200 \mu\text{m}$) (Benita, 2006). Para este tipo de atomizador, el tamaño de partícula se puede variar fácilmente cambiando la velocidad de la rueda (Gaonkar, Vasisht, Khare & Sobel, 2014). En efecto, el tamaño de la gota formada es inversamente proporcional a la velocidad de giro del disco (Paudel, Worku, Meeus, Guns & Van den Mooter, 2013).

En los atomizadores ultrasónicos el tamaño de las gotas obtenidas se rige principalmente por la frecuencia a la que vibra la boquilla (Masters, 1979). En cualquier caso, un incremento en la energía proporcionada al atomizador conduce a un menor tamaño de las gotas generadas, mientras que un efecto opuesto se logra mediante aumentos en la viscosidad y tensión superficial de la alimentación (Estevinho *et al.*, 2013; Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En general, las microcápsulas producidas mediante secado por atomización son de tipo matricial y menores a 100 μm , siendo el tamaño y su distribución función de las condiciones del proceso y de la formulación (Estevinho *et al.*, 2013; Kaushik *et al.*, 2015; Ré, 1998). Además, el mecanismo de liberación del ingrediente activo está típicamente controlado por la acción de los solventes y la difusión del activo a través de la matriz de agentes encapsulantes (Estevinho *et al.*, 2013).

La preparación de la alimentación líquida al secadero juega un rol importante en el contenido final del material encapsulado en el polvo (Frascareli *et al.*, 2012). En efecto, los parámetros más significativos a ser considerados en la formación de la alimentación son la concentración total de sólidos y del ingrediente activo, la viscosidad, la estabilidad, el tamaño de partícula (si se trata de una suspensión) o gota (si se trata de una emulsión), la tensión superficial y el método de dispersión (Estevinho *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012).



Por otro lado, las condiciones operativas y el diseño del secadero dependen de las características del material a secar y de las especificaciones del producto deseado (Gallegos-Infante *et al.*, 2013). En este sentido, se deben considerar las condiciones óptimas de secado, tales como caudal y temperatura de entrada y salida del aire de secado, caudal de alimentación y de aire de atomización, etc., con el objeto de obtener la mínima cantidad de ingrediente activo en la superficie exterior de las partículas obtenidas (no encapsulado) (Frascareli *et al.*, 2012; Otálora *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009). El caudal de alimentación debe ser ajustado para garantizar que cada gota atomizada alcance el nivel de secado deseado antes de tomar contacto con la cámara de secado; mientras que la temperatura y el caudal del aire de secado pueden alterar las propiedades de las microcápsulas formadas (Wang *et al.*, 2009). Finalmente, el caudal de atomización determina entre otras cosas el tamaño medio de gota formada, y por lo tanto influye sobre la cinética de secado, el rendimiento de proceso y el tamaño de partícula en el producto.

En síntesis, para una dada formulación, la calidad del producto final y la eficiencia del proceso de microencapsulación dependen de las condiciones operativas (Estevinho *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012; Otálora *et al.*, 2015).

1.5.4. Aplicaciones del secado por atomización para la microencapsulación de ingredientes alimenticios

Como se mencionó anteriormente, el secado por atomización se ha utilizado exitosamente en la industria de los alimentos durante muchas décadas; siendo el proceso de microencapsulación de aromas el más antiguo (desde 1930) (Calvo *et al.*, 2010; Gouin, 2004). Desde entonces, esta técnica se ha empleado para encapsular una gran diversidad de aceites vegetales, esencias, extractos de frutas, compuestos bioactivos y probióticos, etc. (Ahn *et al.*, 2008; Estevinho *et al.*, 2013; Frascareli *et al.*, 2012; Kaushik & Roos, 2007; Krishnaiah *et al.*, 2012). La Tabla 1.6 muestra algunas de las aplicaciones más frecuentes del secado por atomización para la encapsulación de diversos ingredientes alimenticios.



Tabla 1.6. Principales ingredientes alimenticios encapsulados mediante secado por atomización.

Ingrediente	Referencia
Aceite de pescado y calamar	Aghbashlo, Mobli, Madadlou & Rafiee (2012); Annamalai, Dushyant C & Gudipati (2015); Chen, McGillivray, Wen, Zhong & Quek (2013); Drusch (2007); Jafari, Assadpoor, Bhandari & He (2008); Lin, Lin & Hwang (1995); Petrovic, Sovilj, Katona & Milanovic (2010)
Aceites vegetales (Microalgas, Lino, Chía, Girasol, Oliva, Mezclas)	Ahn et al, (2008); Bao <i>et al.</i> (2011); Calvo <i>et al.</i> (2010); Chatterjee, Salaün, Campagne, Vaupre & Beirão (2012); Fuchs <i>et al.</i> (2006); Gallardo <i>et al.</i> (2013); Petrovic <i>et al.</i> (2010); Quispe-Condori, Saldaña & Temelli (2011); Roccia, Martínez, Llabot & Ribotta (2014); Rodea-González <i>et al.</i> (2012); Tonon, Grosso & Hubinger (2011); Tontul & Topuz (2014); Turchiuli <i>et al.</i> (2005)
Pigmentos y Antioxidantes (Licopeno, α -Tocoferol, Ubiquinona, Betalaínas, Astaxantina, Amaranto, β -Caroteno, Isoflavona)	Bule, Singhal & Kennedy (2010); Bustos-Garza, Yáñez-Fernández & Barragán-Huerta (2013); Cai & Corke, 2000; Castro-Muñoz, Barragán-Huerta & Yáñez-Fernández (2015); Coronel-Aguilera & San Martín-González (2015); Otálora <i>et al.</i> (2015); Panizzon, Bueno, Ueda-Nakamura, Nakamura & Filho (2014); Rocha, Fávaro-Trindade & Grosso (2011); Saenz, Tapia, Chavez & Robert (2009); Shu <i>et al.</i> (2006); Yoo <i>et al.</i> (2006)



Tabla 1.6. (Cont.). Principales ingredientes alimenticios encapsulados mediante secado por atomización.

Ingrediente	Referencia
Aceites esenciales (Menta, Onagra, Romero, Café, Limoneno)	Carvalho <i>et al.</i> (2014); Fernandes, Borges & Botrel (2014); Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger (2011); Liu & Yang (2011); Sarkar, Gupta, Variyar, Sharma & Singhal (2012); Soottitantawat, Takayama, <i>et al.</i> (2005)
Extractos vegetales (Citrifolia, Batata, Uva, Hoja de Roble, <i>l</i> -mentol, Acerola, Ají, Guava, Ginkgo, Mezclas)	Ahmed, Akter, Lee & Eun (2010); Gallegos-Infante <i>et al.</i> (2013); Guadarrama-Lezama <i>et al.</i> (2012); Haidong, Fang, Zhihong, Huanwei & Tiehui (2012); Krishnaiah <i>et al.</i> (2012); Kuck & Noreña (2016); Osorio, Forero & Carriazo (2011); Righetto & Netto (2005); Sansone <i>et al.</i> (2011); Soottitantawat, Bigeard, <i>et al.</i> (2005)
Oleorresinas (Ajo, Cardamomo, Comino)	P. Balasubramani <i>et al.</i> (2015); Kanakdande, Bhosale & Singhal (2007); Krishnan, Bhosale & Singhal (2005)
Otros (Aceites hidrogenados bajos en TRANS, Ácidos grasos CLA, proteínas hidrolizadas, lipasas, manteca)	Alloue, Destain, Amighi & Thonart (2007); Álvarez Cerimedo, Cerdeira, Candal & Herrera (2008); Jimenez, Garcia & Beristain (2008); Kurozawa, Park & Hubinger (2009); Molina Ortiz <i>et al.</i> (2009); Pauletti & Amestoy (1999)



Respecto a la microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización, sólo dos invenciones aparecen en la literatura abierta (Auriou, 2003; Auweter *et al.*, 2009). Auweter *et al.* (2009) propusieron la disolución de los fitoesteroles en un solvente orgánico (como acetona), seguido de la dispersión de la mezcla en una matriz acuosa de caseinato de sodio y almidón modificado. Luego de la remoción del solvente, la dispersión fue secada por atomización para obtener un producto en polvo. La principal desventaja de esta propuesta es el uso de solventes orgánicos, los cuales afectan negativamente la salubridad del producto e implican etapas posteriores asociadas a su remoción y control que conllevan sus propios costos (como se mencionó con anterioridad en la Sección 1.4.5. *Funcionalización de alimentos con fitoesteroles y derivados*).

Por su parte, Auriou (2003) propuso la creación de micelas comprendiendo fitoesteroles y ésteres de sacarosa como surfactantes en un medio acuoso, seguido del recubrimiento de estas micelas con una mezcla de octenilsuccinato y almidón de maíz mediante una etapa de secado por atomización. La principal desventaja de esta técnica es el desconocimiento del tamaño medio de partículas obtenido, además del número de etapas involucradas y del tiempo de procesamiento requerido, especialmente durante la esterilización (6 horas).

Si bien ambas contribuciones son interesantes, ninguna de ellas cubre el diseño racional de un sistema particulado que contenga fitoesteroles con adecuado tamaño de partícula (menor a 25 μm), utilizando microencapsulación mediante secado por atomización libre de solventes orgánicos. Más aún, esas invenciones no analizaron la influencia de las variables operativas y la composición de la alimentación al secadero sobre la performance del proceso y la calidad del producto en polvo.

1.6. Objetivos

En este contexto, el objetivo general de esta tesis es la encapsulación de partículas de fitoesteroles en una matriz que permita su aplicación directa en alimentos de base acuosa, donde éstos permanezcan en estado disperso el mayor tiempo posible.



Para lograr este propósito se establecen diversos objetivos parciales que abarcan desde la formulación del sistema hasta su aplicación en agua y bebidas de consumo instantáneo.

- Determinar las características fisicoquímicas de los fitoesteroles para establecer la factibilidad de su microencapsulación mediante secado por atomización e identificar los posibles cambios que pudieran sufrir durante este proceso.
- Seleccionar, sobre una base racional, materiales de cobertura para la microencapsulación de fitoesteroles.
- Identificar condiciones apropiadas de formulación y preparación de las suspensiones para su posterior procesamiento mediante secado por atomización.
- Seleccionar agentes tensoactivos que permitan una mejora significativa en las características de las suspensiones y, por lo tanto, en la microencapsulación.
- Estudiar la influencia de las principales variables de formulación y de proceso sobre las respuestas de interés (*e. g.*, rendimiento, eficiencia de encapsulación, retención de fitoesteroles, tamaño de las microcápsulas) en la microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización.
- Construir modelos estadísticos apropiados para cada respuesta de interés que predigan su comportamiento dentro del dominio experimental explorado
- Optimizar simultáneamente todas las respuestas relevantes, ajustando tanto la formulación y como las condiciones operativas.
- Estudiar la incorporación de los productos óptimos en alimentos de base acuosa y establecer su potencial aplicación final.



Capítulo II

MATERIALES y MÉTODOS



CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

En la presente sección se detallan todos los materiales utilizados durante el transcurso de esta tesis y las principales características que ellos presentan. Cabe destacar que todos los productos fueron adquiridos con su correspondiente certificado de análisis.

2.1.1. *Ingrediente activo a encapsular*

2.1.1.1. *Fitoesteroles (FE)*

La mezcla de esteroides vegetales comerciales (Advasterol® 90, Advanced Organic Materials) fue provista por la empresa Grupo Saporiti S.A. (Buenos Aires, Argentina) a través de la empresa Cooperativa Obrera de Consumo y Vivienda (Bahía Blanca, Argentina) en carácter de donación. Estos esteroides son derivados de aceites vegetales y se presentan bajo la forma de un polvo blanco (Figura 2.1). Poseen un ligero olor característico de dichos aceites.



Figura 2.1. Aspecto físico de los fitoesteroides (Advasterol® 90).



De acuerdo a la ficha técnica, la mezcla comercial es rica en β -sitosterol, stigmasterol y campesterol e incluye pequeñas cantidades de otros esterol e estanoles. La Figura 2.2 muestra la estructura química general de los esterol e s, junto a la de los componentes principales de la mezcla Advasterol® 90. Las características estructurales de los fitoesterol e s y sus derivados fueron descriptas en la Sección 1.4. *Fitoesterol e s.*

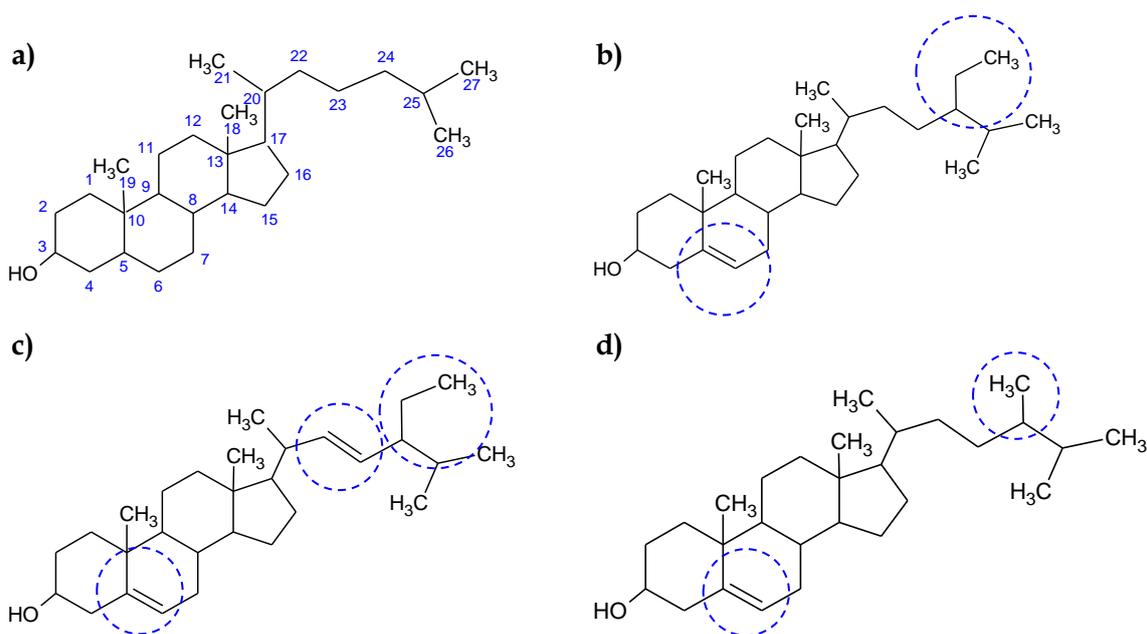


Figura 2.2. Estructura química: **a)** general de los esterol e s; **b)** β -sitosterol; **c)** stigmasterol; **d)** campesterol.

Como se observa en la Figura 2.2, las principales diferencias entre los fitoesterol e s radican en la presencia del doble enlace en los carbonos 5 o 22 y la ramificación en el carbono 27, dependiendo del esterol en cuestión.

En la Tabla 2.1 se resumen las principales características fisicoquímicas de la mezcla comercial de fitoesterol e s utilizada.



Tabla 2.1. Características fisicoquímicas de la mezcla Advasterol® 90 (Datos provistos por la ficha técnica de la mezcla comercial, Advanced Organic Materials S.A.).

Características de la mezcla de fitoesteroles	
Total de esteroides vegetales	Mínimo 90 %
β -sitosterol*	35 - 55 %
Campesterol*	18 - 27 %
Estigmasterol*	21 - 35 %
Brasicasterol*	0 - 2 %
Sitostanol*	0 - 2 %
Otros esteroides*	2 - 3 %
Aspecto	Polvo blanco
Olor	Aceite vegetal
Peso molecular	400.69 - 414.72
Densidad a 25 °C	0.3 - 0.5 g/cm ³
Punto de fusión	135 - 145 °C
Solubilidad en agua	Insoluble

*Como porcentaje del total de esteroides.

2.1.2. Agentes encapsulantes

A continuación se detallan las principales características de los materiales encapsulantes que se utilizaron en el transcurso de esta tesis.

2.1.2.1. Goma arábica (GA)

La goma arábica (Kerry®) fue provista por la empresa Grupo Saporiti S.A. (Buenos Aires, Argentina). Se presenta como un polvo fino de color pardo y de aroma propio característico (Figura 2.3).

La goma arábica (N° CAS 9000 - 01 - 5) es una goma natural, biocompatible y no tóxica (Sarika, James, Kumar, Raj & Kumary, 2015). Es un exudado proveniente de



los tallos y ramas de cepas naturales de acacias (Al-Assaf, Phillips, Aoki & Sasaki, 2007; Ali, Maqbool, Ramachandran & Alderson, 2010; Evans, Ratcliffe & Williams, 2013; Ramakrishnan, Pandit, Badgujar, Bhaskar & Rao, 2007; Sarkar, Gupta, Variyar, Sharma & Singhal, 2013). Cerca del 80 % de la goma arábica comercial se deriva de la especie *Acacia Senegal* (*A. Senegal*) y la mayoría remanente de *Acacia Seyal* (*A. Seyal*) (Ma, Bell, Davis & Chai, 2015).



Figura 2.3. Aspecto físico de la goma arábica (Kerry®).

La goma arábica es un complejo altamente ramificado compuesto principalmente por polisacáridos de alto peso molecular (380 - 850 kDa), formados por arabinosa, galactosa, ramnosa, ácido glucurónico y ácido 4-*O*-metilglucurónico (Thevenet, 2012) (Figura 2.4), y por sales de calcio, magnesio y potasio. Este complejo también presenta pequeñas cantidades (alrededor del 2 % m/m) de proteínas como una parte integral de la estructura (Al-Assaf *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2013; Guan & Zhong, 2015; Ma *et al.*, 2015; Sarika *et al.*, 2015; Thevenet, 2012). El alto nivel de ramificación que presenta la goma arábica le confiere una baja viscosidad en soluciones concentradas, en comparación con otros hidrocoloides lineales como la goma guar (Thevenet, 1995).

Esta goma natural biodegradable se utiliza ampliamente en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas, encontrándose catalogada en la lista de ingredientes GRAS por la FDA (Nayak, Das & Maji, 2012). Asimismo, más de la mitad del



suministro mundial de goma arábica se utiliza en la elaboración de dulces para retardar la cristalización del azúcar y para espesar dulces, jarabes, glaceados y goma de mascar (Ali *et al.*, 2010).

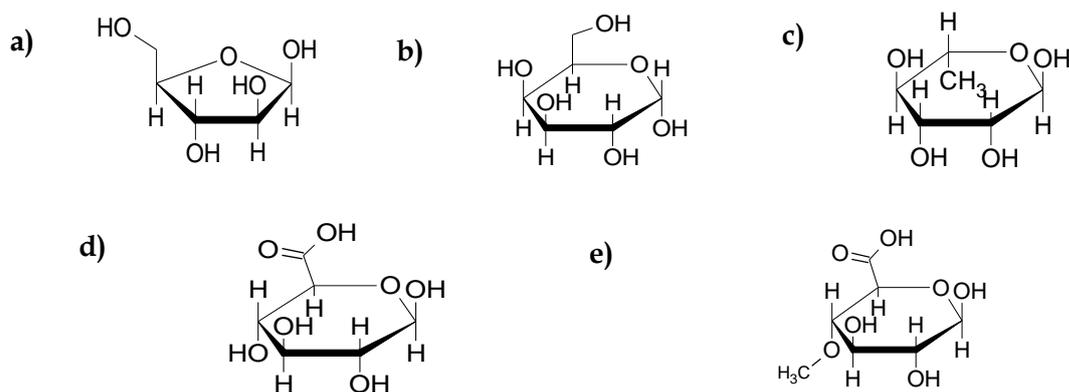


Figura 2.4. Unidades de azúcar que componen la goma arábica: **a)** arabinosa; **b)** galactosa; **c)** ramnosa; **d)** ácido glucurónico; **e)** ácido 4-*O*-metilglucurónico.

Por otra parte, la goma arábica es uno de los agentes encapsulantes de mayor uso en la microencapsulación mediante secado por atomización (aromas y emulsificación de aceites aromáticos en la industria de bebidas carbonatadas, Ma *et al.*, 2015; extractos de jugos y frutas, Kuck & Noreña, 2016; antioxidantes y fenoles en frutos de tomate y papaya, Khaliq, Muda Mohamed, Ghazali, Ding & Ali, 2016; aceite de café, Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger, 2012; extractos de hierbas aromáticas, Fernandes, Candido & Oliveira, 2012; extractos del brote de maní, Lee, Ahn & Kwak, 2013; aceite esencial de chía, Rodea-González *et al.*, 2012; entre otros). La adaptación de la goma arábica en diversas aplicaciones de la microencapsulación se debe a su alta solubilidad en agua, baja viscosidad, buenas propiedades para formar películas, y para formar y estabilizar emulsiones sobre un amplio rango de condiciones ácidas e iónicas (Ali *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2013; Guan & Zhong, 2015; Khaliq *et al.*, 2016; Krishnan, Kshirsagar & Singhal, 2005; Kuck & Noreña, 2016; Ma *et al.*, 2015; Ramakrishnan *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2013).



Sin embargo, el suministro inconsistente, la variación de calidad y el incremento de los precios de la goma arábiga han motivado la búsqueda de nuevos polímeros alternativos que puedan reemplazarla total o parcialmente (Krishnan, Bhosale & Singhal, 2005; Krishnan, Kshirsagar, *et al.*, 2005; Kuck & Noreña, 2016).

2.1.2.2. Maltodextrina (MD)

La maltodextrina grado DE 15 (Globe® 019150) fue provista por la empresa Todo Droga (Córdoba, Argentina). Se presenta como un polvo blanco de buena fluidez (Figura 2.5), algo higroscópico y sin olor.



Figura 2.5. Aspecto físico de la maltodextrina grado DE 15 (Globe® 019150).

Las maltodextrinas (N° CAS 9050 - 36 - 6) se obtienen por hidrólisis parcial (ácida o enzimática) del almidón (Avaltroni, Bouquerand & Normand, 2004; Fernandes, Borges & Botrel, 2014; Rowe, Sheskey & Owen, 2006). Usualmente se clasifican de acuerdo a su grado de hidrólisis, expresado como dextrosa equivalente (DE), por lo que este valor está estrechamente relacionado con su peso molecular (Avaltroni *et al.*, 2004). La maltodextrina es un sacárido nutritivo, no dulce. Está conformada por una mezcla de polímeros que consiste de unidades de D-glucosa, con un valor de dextrosa equivalente inferior a 20 (Rowe *et al.*, 2006). Las unidades de D-glucosa están unidas primariamente por enlaces α -(1 \rightarrow 4) (Figura 2.6a), pero también



existen segmentos ramificados unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Figura 2.6b) (Fioramonti, Arzeni, Pilosof, Rubiolo & Santiago, 2015; Rowe *et al.*, 2006).

Se utilizan muy comúnmente como agentes encapsulantes debido a su bajo costo, su buena digestibilidad, su ausencia de sabor, su alta solubilidad en agua (por encima del 75 %) y su baja viscosidad cuando se encuentran en solución (Avaltroni *et al.*, 2004; Balasubramani, Viswanathan & Vairamani, 2013; Coronel-Aguilera & San Martín-González, 2015; Fernandes *et al.*, 2014; Gallegos-Infante *et al.*, 2013; Krishnaiah, Sarbatly & Nithyanandam, 2012; Saenz, Tapia, Chavez & Robert, 2009).

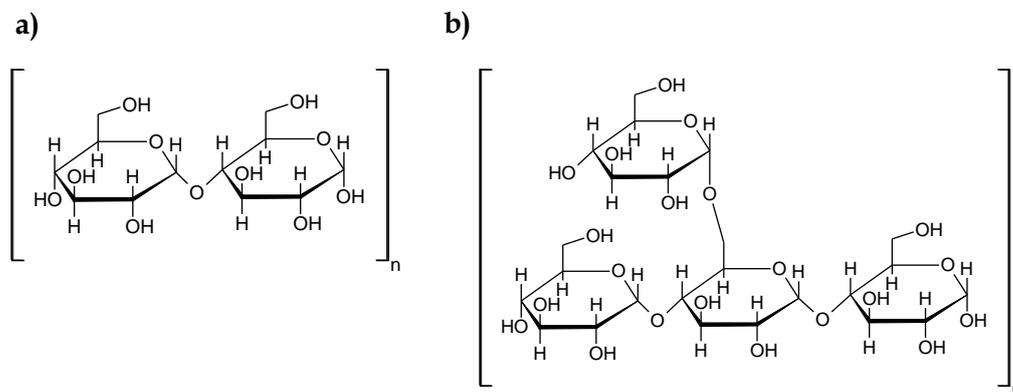


Figura 2.6. Estructura química de la maltodextrina: **a)** cadena lineal de dos unidades de glucopiranososa; **b)** ramificaciones sobre la cadena lineal.

En particular, las maltodextrinas constituyen frecuentes agentes de encapsulación de ingredientes alimenticios (Fernandes *et al.*, 2014). Entre otros, oleorresinas de ajo (P. Balasubramani *et al.*, 2015), extractos de hoja de ginkgo (Haidong, Fang, Zhihong, Huanwei & Tiehui, 2012), aceite de soja (McNamee, White, O’Riordan & O’Sullivan, 2001), extracto de *Morinda citrifolia* L (Krishnaiah *et al.*, 2012).

Asimismo, actualmente se encuentran dentro de la lista de ingredientes GRAS, son aceptadas como aditivo alimentario y están incluidas en la guía de ingredientes inactivos por la FDA (Rowe *et al.*, 2006).



Las maltodextrinas cumplen una gran variedad de funciones, tales como el aumento de volumen, la formación de películas, la disminución en la permeabilidad al oxígeno de la matriz de pared (Ahmed, Akter, Lee & Eun, 2010; Gallegos-Infante *et al.*, 2013; Sansone *et al.*, 2011; Turasan, Sahin & Sumnu, 2015). Sin embargo, presentan como principales limitaciones una baja capacidad de emulsificación y retención marginal de volátiles, razón por la cual se suelen mezclar con otros agentes encapsulantes (Fernandes *et al.*, 2014).

En el proceso de secado por atomización, las maltodextrinas se utilizan en combinación con la goma arábica para reducir costos y aumentar la eficiencia de encapsulación (algunas formulaciones típicas incluyen un 15 % m/m de goma arábica y 25 % m/m de maltodextrina) (Gallegos-Infante *et al.*, 2013; Kanakdande, Bhosale & Singhal, 2007; Krishnan, Kshirsagar, *et al.*, 2005; Williams & Phillips, 2000).

2.1.2.3. Goma guar (GG)

La goma guar utilizada (Parafarm®) fue provista por Droguería Saporiti (Buenos Aires, Argentina). Se presenta como un polvo fino de color beige (Figura 2.7) y tiene olor propio característico.



Figura 2.7. Aspecto físico de la goma guar (Parafarm®).



La goma guar (N° CAS 9000 - 30 - 0) es un poligalactomanano extraído del endospermo de las semillas de *Cyamopsis tetragonolobus*, de la familia Leguminosae (Von Borries-Medrano, Jaime-Fonseca & Aguilar-Méndez, 2016; Patel, Karve & Patel, 2014; Prabakaran, 2011; Prajapat, Subhedar & Gogate, 2016; Rowe *et al.*, 2006; Sarkar, Gupta, Variyar, Sharma & Singhal, 2012; Sarkar & Singhal, 2011).

El esqueleto principal de este biopolímero consiste en cadenas lineales de (1 → 4) β -D-manopiranosil y ramificaciones de α -D-galactopiranosil unidas por enlaces (1 → 6), formando así ramificaciones cortas (Figura 2.8) (Von Borries-Medrano *et al.*, 2016; Bosio *et al.*, 2014; Prabakaran, 2011; Prajapat & Gogate, 2015). La goma guar contiene cerca de un 80 % m/m de glucomanano, 12 % m/m de agua, 5 % m/m de proteína, 2 % m/m de una ceniza ácida insoluble y 0.7 % m/m de grasa (Prabakaran, 2011) y su peso molecular promedio es de 200 - 300 kDa aproximadamente (Bosio *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2014).

La goma guar es soluble en agua fría, hidratándose rápidamente para producir una solución viscosa pseudo - plástica que generalmente tiene una viscosidad más alta a bajos esfuerzos de corte que otros hidrocoloides (Prabakaran, 2011). Es insoluble en hidrocarburos, grasas, alcoholes, ésteres y cetonas (Patel *et al.*, 2014).

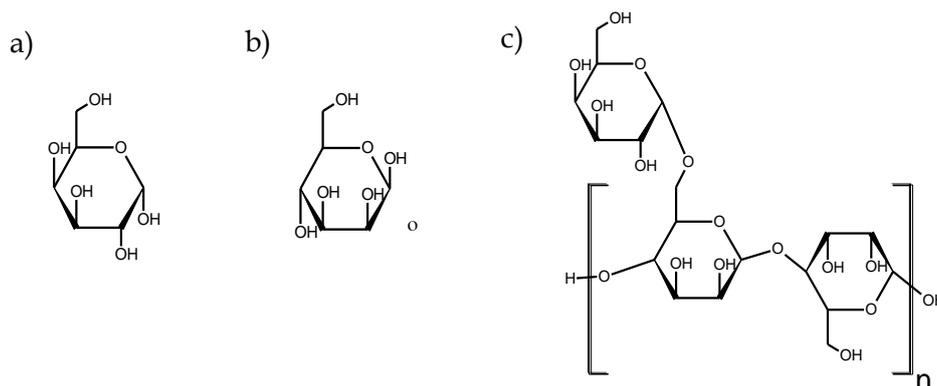


Figura 2.8. Goma guar: **a)** unidades de β -D-manopiranosil; **b)** unidades de α -D-galactopiranosil; **c)** unidad repetitiva de la goma guar.



Se utiliza comúnmente en las industrias cosmética, alimentaria, textil, del petróleo, papelera, de explosivos y farmacéutica debido a sus excelentes propiedades espesantes y su bajo costo (Von Borries-Medrano *et al.*, 2016; Bosio *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2014; Prajapat *et al.*, 2016; Rowe *et al.*, 2006). En la industria farmacéutica se utiliza en forma sólida de diversas maneras, como ligante, desintegrante, agente de suspensión y estabilizante, espesante, y como agente de liberación controlada (Patel *et al.*, 2014; Prabakaran, 2011; Rowe *et al.*, 2006). Su uso en la liberación controlada de drogas se debe en parte a sus propiedades gelificantes (Bosio *et al.*, 2014; Prabakaran, 2011). Adicionalmente, la goma guar tiene alta capacidad espesante (aproximadamente ocho veces respecto al almidón de maíz), siendo utilizada en formulaciones para prevenir la coalescencia de gotas y/o la agregación molecular y la sedimentación de partículas (Bosio *et al.*, 2014).

Además, se utiliza terapéuticamente como parte de la dieta en pacientes con diabetes mellitus y como supresora del apetito (Rowe *et al.*, 2006). Por otro lado, se considera un aditivo en la industria de alimentos (yogurt, kéfir y productos de queso líquidos) y un agente preventivo en la formación de cristales de hielo en salsas, aderezos, carnes, productos horneados, helados y alimentos secos (por ejemplo: sopas y postres) (Bosio *et al.*, 2014). Asimismo, actualmente se encuentra dentro de la lista de ingredientes GRAS, es aceptada como aditivo alimentario y está incluida en la guía de ingredientes inactivos por la FDA (Rowe *et al.*, 2006).

Sin embargo, la goma guar no posee propiedades emulsificantes, una característica crucial en la microencapsulación de algunos ingredientes activos; y además, su alta viscosidad puede, en ciertos casos, limitar su aplicación en el secado por atomización agente encapsulante (Patel *et al.*, 2014; Prajapat *et al.*, 2016; Sarkar *et al.*, 2012, 2013; Sarkar & Singhal, 2011).

2.1.2.4. Carboximetilcelulosa sódica (CC)

En esta tesis se utilizó carboximetilcelulosa sódica de baja viscosidad (Parafarm®) provista por Droguería Saporiti (Buenos Aires, Argentina). Este polímero se encuentra disponible comercialmente bajo cuatro grados diferentes



(carboximetilcelulosa de baja viscosidad, de media viscosidad, de alta y de ultra alta viscosidad), de acuerdo a su viscosidad (entre 0.05 y 4.5 Pa.s) en solución acuosa al 2 % m/v y 25 °C (Rowe *et al.*, 2006). Se presenta como un polvo de color blanquecino (Figura 2.9) (Gallo, 2013).



Figura 2.9. Aspecto físico de la carboximetilcelulosa de baja viscosidad (Parafarm®).

La carboximetilcelulosa (CAS 9004 - 32 - 4) es un polisacárido lineal aniónico, derivado de la celulosa, que se obtiene a partir de la esterificación de las unidades de glucosa (Burgardt *et al.*, 2015; Gaonkar, Vasisht, Khare & Sobel, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). En este sentido, mediante la reacción de Williamson se produce el reemplazo parcial de los grupos hidroxilos de la glucosa, por el grupo $\text{CH}_2\text{-COOH}$ o su sal sódica $\text{CH}_2\text{-COONa}$ (Figura 2.10) (Gaonkar *et al.*, 2014; Li, Wu, Chen & Wang, 2009; Oliveira *et al.*, 2015; Taubner, Synytsya & Čopíková, 2015). La sustitución de hidroxilos es predominante en las posiciones O-2 y O-6 de las unidades de glucosa (Figura 2.10) (Taubner *et al.*, 2015).

Las propiedades físicas, químicas y biológicas de la carboximetilcelulosa dependen del peso molecular del polímero, el número medio de carboximetilos por unidad de glucosa (denominado “grado de sustitución”, DS) y la distribución que tienen estas sustituciones a lo largo de la cadena del polímero (Geng *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Taubner *et al.*, 2015). Los productos comerciales de carboximetilcelulosa tienen



valores de DS entre 0.4 y 1.4, siendo el grado más común, entre 0.7 y 0.8 (Gaonkar *et al.*, 2014).

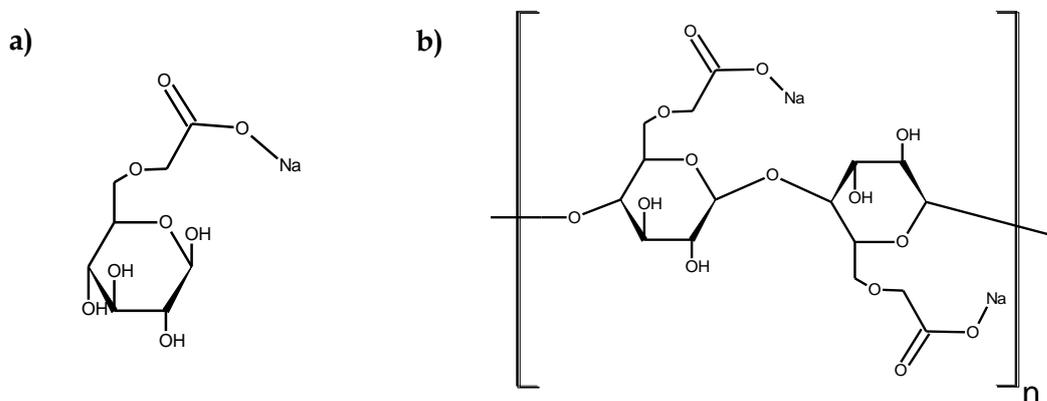


Figura 2.10. Carboximetilcelulosa: a) unidad de glucopiranososa sustituida con un grupo carboximetil sódico en el C6; b) unidad repetitiva de la carboximetilcelulosa (DS = 1.0).

La presencia de grupos carboximetilo hace a la molécula de celulosa más hidrofílica, promoviendo su solubilidad en agua (Fekete, Borsa, Takács & Wojnárovits, 2016; Taubner *et al.*, 2015). Su higroscopicidad, junto con otras propiedades, como su poder espesante y floculante, su fácil dispersión en agua y la habilidad para formar películas sustentan su aplicación en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética, etc. (Fekete *et al.*, 2016; Geng *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015; Taubner *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2011). Además, la carboximetilcelulosa es biocompatible y biodegradable, presenta buena compatibilidad con la piel y las membranas de mucosas, inmunogenicidad baja y no tiene efectos peligrosos sobre la salud humana (Li *et al.*, 2015; Taubner *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2011). Actualmente, se encuentra dentro de la lista de ingredientes GRAS, es aceptada como aditivo alimentario y está incluida en la guía de ingredientes inactivos por la FDA (Rowe *et al.*, 2006).

Por otro lado, la carboximetilcelulosa es ampliamente conocida como agente encapsulante (Barbosa-Cánovas, Ortega-Rivas, Juliano & Yan, 2005; Gaonkar *et al.*, 2014; Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley & Saurel, 2007; Gouin, 2004; Zuidam & Nedovic, 2010). Fue exitosamente utilizada para proteger cúrcuma mediante la



formación de complejos con lisozima (Li *et al.*, 2015); en combinación con maltodextrina y otros materiales para proteger de la oxidación a diversos compuestos bioactivos presentes en el aceite de nuez (frente al oxígeno, la luz y la humedad) (Calvo, Lozano, Espinosa-Mansilla & González-Gómez, 2012); para para producir microcápsulas con fines electroforéticos junto a gelatina (Li *et al.*, 2009) y laurilsulfato de sodio o laurilsulfonato de sodio (Wu *et al.*, 2011), entre otras aplicaciones.

2.1.3. Agentes tensoactivos

2.1.3.1. Polisorbato: Tween 20 (T20)

En el transcurso de esta tesis se utilizó el polisorbato Tween 20 (Laboratorios Cicarelli®) (N° CAS 9005 - 64 - 5), que fue provisto por Reagents S.A. (Santa Fe, Argentina) y se presenta como un líquido color ámbar, sin aroma (Figura 2.11).

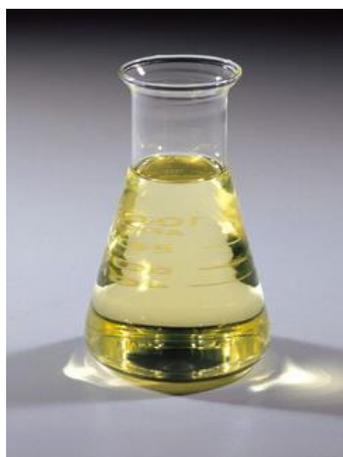


Figura 2.11. Aspecto físico del Polisorbato Tween 20 (T20).

Los polisorbatos son tensoactivos no iónicos utilizados ampliamente en la industria farmacéutica para estabilizar y proteger proteínas contra la agregación inducida de las interfases. Se obtienen a partir de sorbitol, mediante un proceso que



involucra la remoción de agua de la molécula, seguido de la esterificación del mismo con un ácido graso y la posterior inserción de un grupo oxietileno en presencia de un catalizador (Rowe *et al.*, 2006).

Es un tensoactivo anfifílico, compuesto de ésteres de ácidos grasos de polioxi etil en sorbitano (Figura 2.12). Exhibe una estructura compuesta del anillo sorbitano y un cierto número de unidades de polietilenglicol (polioxi etil eno) que pueden estar esterificadas con uno o más ácidos grasos (R') (Figura 2.12).

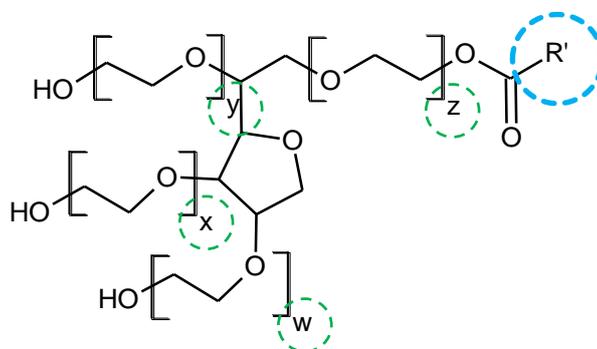


Figura 2.12. Estructura básica de los polisorbatos monoéster (R').

En general, los polisorbatos se utilizan en procesos y condiciones que involucran interacciones interfaciales, como filtración, bombeo, agitación, enfriamiento o congelamiento y liofilización, y pueden permitir la agregación. Su uso prevalente se debe a su alto valor de balance hidrofílico - lipofílico, o simplemente HLB (acrónimo inglés de *Hydrophilic - Lipophilic Balance*), y su buena actividad superficial a bajas concentraciones (Kishore *et al.*, 2011).

En particular, el polisorbato Tween 20 utilizado en esta tesis es GRAS (Liu & Wu, 2010) y está incluido en la lista de ingredientes inactivos de la FDA (Rowe *et al.*, 2006). Es un tensoactivo cuya estructura contiene 20 unidades de polietilenglicol ($w + x + y + z = 20$; Figura 2.12) y se encuentra monoesterificado con ácido láurico (R'). Presenta un HLB de 16.7 (Butstraen, Salaün & Devaux, 2015; Rowe *et al.*, 2006) y se utiliza en muchas formulaciones de detergentes y de emulsiones para aplicaciones domésticas de alimentos y fármacos, y como un emulsificante aceite en agua por su



buena estabilidad y relativa atoxicidad (Borges *et al.*, 2012; Butstraen *et al.*, 2015). El Tween 20 es aceptado por la Organización Mundial de la Salud por su atoxicidad, lo que le permite ser utilizado en aplicaciones farmacéuticas (Ratanajajaroen, Watthanaphanit, Tamura, Tokura & Rujiravanit, 2012).

La aplicación de tensoactivos en la elaboración de sistemas dispersos a secar por atomización ha sido ampliamente abordada. En particular, los polisorbatos Tween 20 y Tween 80 fueron estudiados en la encapsulación de aceite de girasol (Yölmaz, Jongboom, Feil & Hennink, 2001) y en la producción de nanopartículas de luteína (Liu & Wu, 2010). Además, Bustos-Garza, Yáñez-Fernández & Barragán-Huerta (2013) utilizaron Tween 20 para la encapsulación de oleoresina astaxantina utilizando como agentes encapsulantes goma arábiga y proteínas de suero en combinación con inulina y maltodextrina. En tanto, Aghbashlo, Mobli, Madadlou & Rafiee (2012) analizaron la dependencia de la eficiencia de encapsulación de aceite de timo con la propiedad hidrofóbica de este tensoactivo.

2.1.3.2. Dodecilsulfato de sodio (SDS)

El dodecilsulfato de sodio (Laboratorios Cicarelli®) fue provisto por Reagents S.A. (Santa Fe, Argentina). Se presenta como un polvo cristalino, de color blanquecino y buena fluidez (Figura 2.13).



Figura 2.13. Aspecto físico del laurilsulfato de sodio (Cicarelli®).



El dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato sódico (SDS, por su sigla en inglés) (N° CAS 151 - 21 - 3) (Figura 2.14) es un tensoactivo GRAS producido mediante la sulfatación de dodecanol (Rowe *et al.*, 2006) y utilizado como aditivo en una gran variedad de alimentos. Además, está incluido en la lista de ingredientes inactivos de la FDA (Rowe *et al.*, 2006).

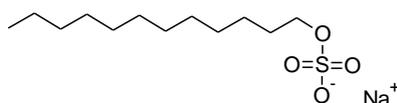


Figura 2.14. Laurilsulfato de sodio.

Es uno de los tensoactivos de uso común más importante (Gao, Ren & Ge, 2009), por lo cual se considera un tensoactivo “modelo” (Onesippe & Lagerge, 2008). Se utiliza ampliamente en formulaciones farmacéuticas sólidas como tensoactivo o como agente de mojado para mejorar la solubilidad de drogas poco solubles (Bharate, Bharate & Bajaj, 2010; Lee, Kim & Kim, 1999). Es un anión anfifílico porque posee un grupo sulfato como cabeza polar y la cadena hidrocarbonada no polar que finaliza con un grupo metilo (Figura 2.14) (Coiro, Manigrasso, Mazza & Pocheiti, 1987). Tiene la capacidad de formar agregados micelares en soluciones acuosas a concentraciones por encima de la concentración micelar crítica (8.2×10^{-3} mol/L a 20 °C, Rowe *et al.* 2006).

El dodecilsulfato de sodio se utiliza también en la formulación y elaboración de microcápsulas, presentando un papel importante en la encapsulación por coacervación compleja (Li *et al.*, 2009; Onesippe & Lagerge, 2008). En efecto, Vinetsky & Magdassi (1997) encapsularon aceite de soja con gelatina tipo A y SDS.

En el secado por atomización, el SDS se utilizó para disminuir el pegado de material sobre las paredes internas de la cámara del secadero (Lee *et al.*, 1999). Chatterjee, Salaün, Campagne, Vaupre & Beirão (2012) utilizaron SDS como tensoactivo para preparar microcápsulas multicapas de quitosano alrededor de gotas de aceite; observando que las moléculas de SDS pueden ser adsorbidas rápidamente



durante el proceso de homogeneización en la encapsulación mediante deposición capa por capa.

2.2. Métodos

En esta sección se detallan los principales métodos utilizados para realizar ensayos experimentales, como así también las condiciones en las cuales fueron llevados a cabo. Resulta de importancia resaltar que la gran mayoría de técnicas estandarizadas utilizadas en esta tesis debieron ser apropiadamente ajustadas al sistema de estudio para su correcto análisis.

2.2.1. *Determinación y cuantificación de esteroides en la mezcla comercial.*

La mezcla de esteroides se analizó mediante cromatografía de gases con columna capilar, siguiendo una simplificación del método de análisis dispuesto por el Consejo Oleícola Internacional (Determinación de la composición y del contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar, COI/T.20/ Doc. n° 10/2009), el cual describe un procedimiento para determinar el contenido individual y total de estos componentes en aceites de oliva y orujo.

El principio consiste en la separación de la fracción de esteroides y dialcoholes triterpénicos en la mezcla mediante cromatografía de capa fina con una placa gel de sílice básico. Las fracciones recuperadas de gel de sílice se transforman en éteres de trimetilsilil y se analizan entonces por cromatografía de gases de columna capilar. Todos los reactivos utilizados en esta técnica fueron de grado cromatográfico.

Esa última etapa fue llevada a cabo en un cromatógrafo gaseoso Agilent HP4890 D (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, USA) provisto de un detector de ionización de llama (FID) y un inyector “split/splitless” con una relación “split” de 1 : 99; y equipado con una columna capilar de sílice fundida, recubierta con difenil (5 %) y dimetilpolisiloxano (95 %) en fase estacionaria (SE 54) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.2 μm de espesor uniforme (Supelco Inc., Bellefonte, USA).



El gas portador (hidrógeno) se circuló a 37 cm/s y una presión de cabeza de $7.58 \cdot 10^4$ Pa (11 psi). La temperatura del horno se estableció en 260 °C durante los primeros 2 minutos, y luego se ascendió en 1 °C/min hasta alcanzar los 265 °C, manteniéndose así durante los siguientes 25 min. Por su parte, el volumen de inyección fue de 1 μ L y las temperaturas del inyector y del detector se establecieron en 280 °C y 300 °C, respectivamente.

2.2.1.1. Identificación de esterol es

De acuerdo a esta metodología, los esterol es y estanol es presentes en la muestra se identificaron utilizando los tiempos de retención reportados en la Tabla 2.2. De acuerdo al método de análisis, el tiempo de retención del β -sitosterol debe estar en 20 ± 5 minutos.

2.2.1.2. Cuantificación de esterol es y estanol es

Para la cuantificación de los esterol es y estanol es presentes en la mezcla, se siguió un método de cálculo basado en la relación de áreas de cada pico cromatográfico respecto al estándar interno utilizado (α -colestanol). Cabe destacar que, de acuerdo a la descripción de la técnica, no debe cuantificarse el ergosterol y que los picos que puedan aparecer en el perfil y no estén contemplados en el listado dado en la Tabla 2.2 tampoco deben ser incluidos en el cálculo. Asimismo, es necesario mencionar que se consideró un factor de respuesta igual a 1 para el α -colestanol.

La concentración de cada esterol ($C_{Esterol}$) [mg/kg de muestra] se calculó como sigue:

$$C_{Esterol} = \frac{A_{Esterol} \cdot m_{\alpha-colestanol}}{A_{\alpha-colestanol} \cdot m} \cdot 1000 \quad (2.1)$$

donde $A_{Esterol}$ [cuentas] y $A_{\alpha-colestanol}$ [cuentas] son el área computada del esterol de interés y del α -colestanol, respectivamente; y $m_{\alpha-colestanol}$ [mg] y m [g] las masas adicionadas de α -colestanol y de muestra, respectivamente.



Tabla 2.2. Tiempos de retención relativos al β -sitosterol (TRR) para la identificación de componentes esteroides y estanoles.

Identificación		TRR
Colesterol	Δ -5-colesten-3 β -ol	0.67
Colestanol	5 α -colestan-3 β -ol	0.68
Brasicasterol	[24S]-24-metil- Δ -5,22-colestadien-3 β -ol	0.73
Ergosterol*	[24S]-24 meti- Δ 5-7-22 colestatrien 3 β -ol	0.78
4-metilen-colesterol	24-metilen- Δ -5,24-colestadien-3 β -ol	0.82
Campesterol	(24R)-24-metil- Δ -5-colesten-3 β -ol	0.83
Campestanol	(24R)-24-metil-colestan-3 β -ol	0.85
Estigmasterol	(24S)-24-etil- Δ -5,22-colestadien-3 β -ol	0.88
Δ -7-campesterol	(24R)-24-metil- Δ -7-colesten-3 β -ol	0.93
Δ -5,23-estigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,23-colestadien-3 β -ol	0.95
Clerosterol	(24S)-24-etil- Δ -5,25-colestadien-3 β -ol	0.96
β -sitosterol	(24R)-24-etil- Δ -5-colesten-3 β -ol	1.00
Sitostanol	24-etil-colestan-3 β -ol	1.02
Δ -5-avenasterol	(24Z)-24-etiliden- Δ -colesten-3 β -ol	1.03
Δ -5-24-estigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -5,24-colestadien-3 β -ol	1.08
Δ -7-estigmastadienol	(24R,S)-24-etil- Δ -7-colesten-3 β -ol	1.12
Δ -7-avenasterol	(24Z)-24-etilidene- Δ -7-colesten-3 β -ol	1.16
Eritrodiol	5 α -olean-12en-3 β -28-diol	1.41
Uvaol	Δ 12-ursen-3 β -28-diol	1.52

2.2.2. Tamizado de los fitoesteroides

Se utilizó un tamizador vibratorio Zonytest (Rey & Ronzoni, Buenos Aires, Argentina) y las mallas ASTM #100, #140 y #200. El tamizado se llevó a cabo durante 15 minutos, alternando el sentido de giro cada 20 segundos.



2.2.3. Preparación de las suspensiones a secar

Las suspensiones de fitoesteroles se prepararon por disolución en agua destilada a 60 °C de los agentes encapsulantes seleccionados (①), seguido de la disolución del agente tensoactivo (②) y la posterior dispersión (③) y homogeneización y/o sonicado del polvo de fitoesteroles (④) (Figura 2.15).

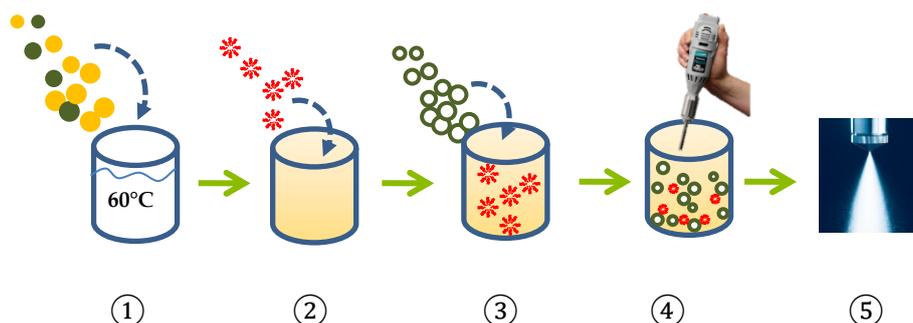


Figura 2.15. Esquema general del proceso de preparación de las suspensiones a secar.

2.2.3.1. Homogeneización y sonicado

Las suspensiones se homogeneizaron en un equipo Pro 200 Homogenizer (Pro Scientific Inc., Oxford, USA) a 25 °C, durante un tiempo determinado a una velocidad de 25000 - 35000 rpm, para su posterior atomización en un secadero a escala laboratorio (⑤). Posteriormente, el sonicado se llevó a cabo en un baño ultrasónico Cole - Parmer 8892, a 25 °C y durante períodos de tiempo establecidos en cada ensayo.

2.2.4. Caracterización de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo y de las suspensiones de fitoesteroles.

2.2.4.1. Tensión superficial (γ)

La tensión superficial de soluciones y suspensiones se determinó mediante un tensiómetro Krüss EasyDyne (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemania) a 20 °C y utilizando el método de Wilhelmy (Hiemenz, 1986) (Figura 2.16). Las muestras se

dejaron estabilizar durante 15 minutos para garantizar el equilibrio dinámico de las moléculas de tensoactivo disuelto antes de la medición.

El método de Wilhelmy consiste en suspender una placa (lámina) sobre la superficie de un líquido, siendo sostenida por el brazo de una balanza (Figura 2.16). Por simplicidad, la lámina se posiciona de tal manera que su borde inferior se encuentre en el mismo plano que la superficie del líquido. La manifestación de la tensión superficial en esta situación es a través del arrastre de un menisco alrededor del perímetro de la lámina suspendida. Si la placa está tarada antes de alcanzar el punto de contacto, ocurre un desbalance en el punto de contacto debido al peso del menisco. Como el menisco asciende debido a la tensión en la superficie, el peso medido por el equipo puede ser utilizado para determinar el valor de γ mediante un simple balance de fuerzas (Hiemenz, 1986).

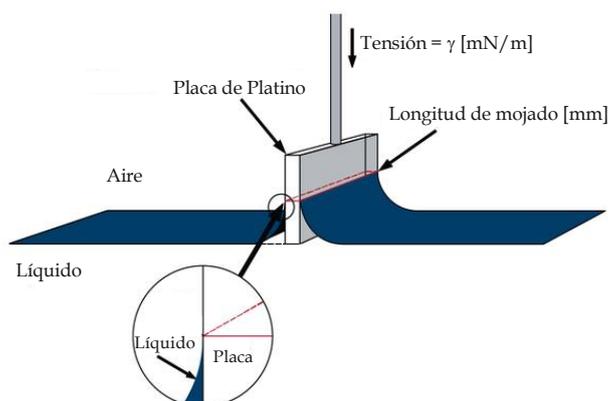


Figura 2.16. Esquema de medición de la tensión superficial por el método de Wilhelmy.

2.2.4.2. Ángulo de contacto (θ)

2.2.4.2.1. Método directo

El ángulo de contacto se determinó por observación lateral de una gota del líquido de interés de aproximadamente $20 \mu\text{L}$ depositada sobre una placa de vidrio



recubierta con una fina capa del polvo de fitoesteroles. Para realizar esta experiencia, se utilizó un equipo Krüss DSA 10 Mk2 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemania). Las mediciones se realizaron, al menos, por duplicado a 21 °C, tanto en el instante inicial (t_0), como luego de permanecer en contacto por 5 minutos (t_1).

El recubrimiento de las placas de vidrio con fitoesteroles se logró mediante la disolución del polvo en hexano, seguida por la deposición de una alícuota de solución suficiente para recubrir toda la superficie de un portaobjetos de vidrio. La elevada volatilidad del hexano facilitó su rápida evaporación y la formación de una delgada lámina homogénea de residuo sólido de fitoesteroles sobre la placa de vidrio.

Algunos autores han sugerido la formación de comprimidos para lograr una superficie del material sobre el cual se depositan las gotas (Alghunaim, Kirdponpattara & Newby, 2016). Sin embargo, el polvo de fitoesteroles no presentó buenas propiedades de compactación, y la formación de comprimidos implicó la adición de agentes lubricantes para el proceso de compresión, alterando así la superficie y modificando los resultados de mojado. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que el ángulo de contacto en este tipo de sistemas es afectado por la fuerza de compactación aplicada; es decir, diferencias en la fuerza de compactación inducen cambios en el ángulo de contacto medido (Paudel, Worku, Meeus, Guns & Van den Mooter, 2013). De esta manera, la disolución de los fitoesteroles surgió como alternativa factible para lograr una superficie lisa para depositarlos.

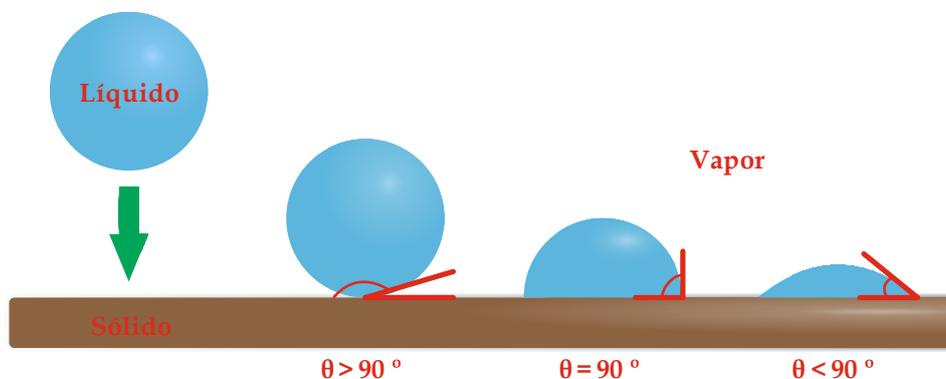


Figura 2.17. Ángulo de contacto entre un líquido y un sólido de interés.



En líneas generales, un ángulo de contacto menor a 90° (Figura 2.17) indica que el mojado de la superficie es favorable y el líquido mojante se esparcirá sobre una gran área de la superficie del sólido, mientras que ángulos mayores a 90° están asociados con un mojado desfavorable, de tal forma que el líquido tenderá a minimizar el contacto con la superficie y formará una gota turgente y compacta (Litster, Ennis & Liu, 2004; Schramm, 2005).

2.2.4.2.2. Dimensión de gota

Alternativamente, se utilizó esta técnica desarrollada con el objeto de suplantar este método directo, debido a la no disponibilidad del equipo de medición en el lugar de trabajo. La mojabilidad se evaluó a partir de la deposición de gotas de igual volumen sobre placas de vidrio con fitoesteroles. A diferencia del método directo, la observación de las gotas a través de una vista superior permitió estimar sus dimensiones para evaluar el grado de esparcimiento sobre los fitoesteroles, tanto en el instante inicial como al cabo de 5 minutos de contacto.

Para esto, se implementó una variación a la técnica desarrollada por Lassalle, Failla & Vallés (2006) de modo de complementar los ensayos anteriores, utilizando un microscopio óptico Carl Zeiss Phomi III Pol acoplado a una cámara fotográfica Leica 1280. Brevemente, se colocó una pequeña gota ($1 \mu\text{L}$) de la solución del agente encapsulante estudiado sobre la placa en la cual estaban soportados los fitoesteroles adheridos. El mojado se evaluó mediante la observación microscópica de este sistema y la determinación de la variación de las dimensiones de la gota a través de una vista superior de las mismas, utilizando la herramienta gráfica Leica IM50®.

2.2.4.3. Comportamiento reológico

Se estudió el comportamiento reológico, tanto de las soluciones conteniendo los agentes encapsulantes y tensoactivo, como de las suspensiones constituidas para su posterior atomización.



Se utilizó un reómetro de esfuerzo controlado Anton Paar Physica MCR 301 (Anton Paar GmbH, Ostfildern, Alemania) a 25 °C, acoplado al sistema de medición de cilindros coaxiales CC27 - SN16635 (radio interno 13.329 mm, radio externo 14.460 mm, longitud de la parte cilíndrica 40.000 mm, ángulo de cono 120 °). Todos los ensayos se realizaron, al menos, por duplicado, variando la velocidad de deformación desde 0 hasta 1000 s⁻¹. En los casos que correspondía, la viscosidad se calculó utilizando un ajuste al modelo Newtoniano, a partir de la relación entre el esfuerzo de corte y la velocidad de corte.

2.2.4.4. Tamaño de las partículas

La distribución de tamaño de las partículas en suspensión se determinó utilizando un equipo de difracción de rayos láser Horiba LA - 950 V2 (Horiba Ltd., Kioto, Japón). El tamaño promedio de las partículas se expresó como el diámetro volumétrico medio D[4,3].

Asimismo, a partir de este mismo ensayo se estimó qué porcentaje de la distribución pasa a través de una malla de 25 μm de apertura ($f_{\text{acum}25}$), es decir, qué fracción de la muestra presenta un tamaño inferior a 25 μm. Otros indicadores del grado de dispersión de la distribución de tamaño fueron el D[v, 0.10] y el D[v, 0.90], referidos como el tamaño por debajo del cual se encuentra el 10 % y el 90 % de la población de partículas, respectivamente.

2.2.4.5. Estabilidad

Se colocaron 10 mL de suspensión en tubos de ensayo de 14 mm de diámetro interno y se dejaron reposar en posición vertical a 25 °C. Se registró con un calibre Vernier Caliper (rango de precisión 0.02 mm) la altura de separación entre fases en función del tiempo, hasta no observar cambios significativos entre mediciones consecutivas.

La Figura 2.18 muestra un esquema del sistema de análisis de estabilidad. A partir de la altura de separación entre fases (H), se calculó el volumen de cremado (V)



como una fracción del volumen total de suspensión, mediante las Ecuaciones (2.2) y (2.3).

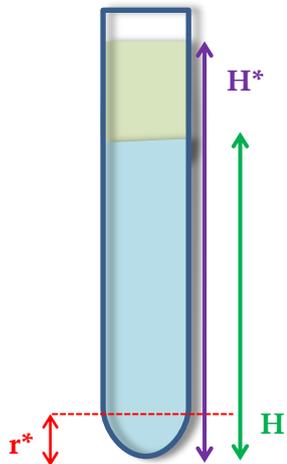

$$V = \frac{\pi \frac{H^2}{3} (3r^* - H)}{\pi r^{*2} (H^* - r^*) + 2\pi \frac{r^{*3}}{3}} \cdot 100\% \quad \text{Si } H \leq r^* \quad (2.2)$$
$$V = \frac{\pi r^{*2} (H - r^*) + 2\pi \frac{r^{*3}}{3}}{\pi r^{*2} (H^* - r^*) + 2\pi \frac{r^{*3}}{3}} \cdot 100\% \quad \text{Si } H > r^* \quad (2.3)$$

Figura 2.18. Esquema representativo para la observación de la separación de fases.

Debido a que el tubo de ensayo presentaba una base semiesférica de radio R igual al radio interno del tubo, el volumen dado por la Ecuación (2.2) se determinó considerando el casquete esférico de radio r^* y altura H y se aplicó para los tiempos en que $H \leq r^*$. Por otro lado, el volumen expresado por la Ecuación (2.3), válido para los tiempos en que $H > r^*$, se estableció contemplando además de la sección inferior semiesférica, la sección superior cilíndrica del tubo.

La estabilidad fue evaluada por medio del “tiempo de demora”, definido como el tiempo transcurrido para observar la aparición de dos fases claramente diferenciadas y por medio de la apreciación del “volumen de cremado” en función del tiempo.

2.2.4.6. Potencial Z

La determinación del potencial Z se realizó utilizando un equipo Malvern ZetaSizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Cada suspensión a secar fue ensayada por triplicado a 25 °C.



2.2.4.7. Conductividad y pH

La determinación de estas dos propiedades se realizó utilizando un medidor Adwa Ad8000 (Adwa Instruments, Hungría) y los electrodos de cada medición A1131B y A76309, para pH y conductividad respectivamente, calibrados con antelación a cada conjunto de ensayos.

2.2.5. Secado por atomización

Los ensayos exploratorios de secado por atomización se realizaron utilizando un equipo a escala laboratorio Mini Spray Drier Büchi B - 290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) (Figura 2.19).



Característica Técnica	
Capacidad de evaporación de agua	1 kg/h
Flujo de aire de secado	Máximo 35 m ³ /h
Temperatura máxima de entrada	220 °C
Gas de atomización	Aire, 5 · 10 ⁵ - 8 · 10 ⁵ Pa (200 - 800 L/h)
Diámetro de la boquilla	0.7 mm
Tiempo de residencia	1.0 - 1.5 s
Dimensiones de la cámara (Altura/Diámetro)	0.51 m / 0.11 m

Figura 2.19. Características técnicas: Büchi Mini Spray Drier B - 290.

El equipo está provisto de una tobera de atomización binaria de mezcla externa. Por el canal central circula la suspensión a atomizar, mientras que por el canal anular adyacente circula el aire de atomización que facilita la dispersión del líquido en



pequeñas gotas. Los diámetros internos de los orificios para el líquido y el gas son de 0.7 mm y 1.5 mm, respectivamente.

Las condiciones operativas de secado se especifican en detalle en los capítulos siguientes. Para estabilizar y facilitar la limpieza del equipo, se circuló agua destilada durante 10 minutos previos y 10 minutos posteriores a la atomización de las suspensiones, respectivamente. Durante el período de operación, las suspensiones a atomizar se mantuvieron homogéneas mediante agitación magnética continua.

Cada ensayo se realizó, al menos, por duplicado. Los polvos recuperados (también llamados “microcápsulas”, “micropartículas”) se pesaron y almacenaron a temperatura ambiente en frascos de vidrio de color caramelo, sellados y colocados en la oscuridad. Para todas las experiencias realizadas, se registró la temperatura de salida.

2.2.5.1. Rendimiento de secado (RS)

El rendimiento del proceso se determinó gravimétricamente como la relación entre la cantidad de polvo colectado luego de cada experiencia de secado por atomización (producto particulado en forma de microcápsulas) y el contenido de sólidos totales presente en las suspensiones atomizadas (Ecuación (2.4)):

$$RS(\%) = \frac{\text{Masa de sólidos colectados (g)}}{\text{Masa de sólidos alimentados (g)}} \cdot 100\% \quad (2.4)$$

2.2.5.2. Recolectado en cámara de secado (PC)

En algunos casos, también se determinó gravimétricamente el material recolectado en la cámara de secado. En este sentido, el PC se definió de manera análoga a la Ecuación (2.4), como la relación másica entre los sólidos colectados en las paredes de la cámara y los sólidos alimentados al proceso.



2.2.5.3. Eficiencia de encapsulación (EE)

Una vez que culmina el proceso de secado, el producto en polvo (microcápsulas) que se obtuvo está compuesto de 3 tipos de partículas: fitoesteroles libres (sin encapsular), fitoesteroles encapsulados y agentes encapsulantes (no utilizados en la encapsulación) (Figura 2.20). Como su nombre lo indica, la determinación de la eficiencia de encapsulación permite evaluar la efectividad del proceso en cuestión.



Figura 2.20. Composición del producto de secado y fracciones para determinación de eficiencia.

En la bibliografía existen diversas maneras de establecer la eficiencia de encapsulación y, a su vez, diferentes formas de definirla. Algunos autores definen la eficiencia de encapsulación como la relación entre el contenido total de ingrediente activo en el producto final y su cantidad alimentada (Gamboa, Gonçalves & Grosso, 2011; Kaushik & Roos, 2007; Shu, Yu, Zhao & Liu, 2006; Xiao & Zhong, 2011); mientras que otros, la definen como la relación entre la cantidad de activo encapsulado y contenido total de activo en el producto final (Aghbashlo *et al.*, 2012; Calvo, Hernández, Lozano & González-Gómez, 2010; Haidong *et al.*, 2012; Jun-xia, Hai-yan &



Jian, 2011; Tonon, Grosso & Hubinger, 2011; Velasco, Holgado, Dobarganes & Márquez-Ruiz, 2009). En esta tesis se utiliza la definición de Eficiencia de Encapsulación (EE) dada por la Ecuación (2.5); es decir, la relación másica entre los fitoesteroles encapsulados (FE_E), expresados como la diferencia entre los fitoesteroles totales (FE_T) y los fitoesteroles libres (FE_L), y los fitoesteroles totales en el producto (Figura 2.20).

$$EE(\%) = \frac{FE_E}{FE_T} \cdot 100\% = \frac{FE_T - FE_L}{FE_T} \cdot 100\% \quad (2.5)$$

Las fracciones FE_T y FE_L se determinaron mediante extracción con solventes siguiendo la metodología desarrollada por Velasco *et al.* (2009), la cual se describe a continuación.

2.2.5.3.1. Fitoesteroles totales (FE_T)

La determinación del contenido total de fitoesteroles en las microcápsulas se basó en el método de Röse - Gottlieb, ampliamente aplicado para la determinación cuantitativa de grasa en leches y polvos de leche (Velasco *et al.*, 2009). Se dispersaron 4 g de micropartículas en 40 mL de agua destilada, previamente calentada a 65 °C. Luego de una agitación vigorosa, se agregaron a la suspensión 8 mL de una solución acuosa al 25 % de NH_4OH y se mantuvo la mezcla a 65 °C durante 20 minutos en agitación. Seguidamente, se enfrió la suspensión a temperatura ambiente, y se la dispuso en una ampolla de decantación para extraer el total de lípidos presentes.

La extracción de los fitoesteroles se realizó en 3 etapas sucesivas. En la primera, se agregaron 20 mL de etanol, 50 mL de éter etílico y 50 mL de *n*-hexano. En la segunda, se utilizaron 10 mL de etanol, 50 mL de éter etílico y 50 mL de *n*-hexano; mientras que en la tercera se adicionaron 50 mL de éter etílico y 50 mL de *n*-hexano. En cada etapa de extracción, se agregaron los solventes sucesivamente con agitación vigorosa entre cada adición. Luego de dejar en reposo, la fase superior de cada



extracción se colectó y filtró a través de un papel de filtro conteniendo Na₂SO₄ anhidro. Posteriormente, se sometió a evaporación bajo una corriente de N₂, hasta alcanzar peso constante. La fase acuosa se dispuso para la extracción subsiguiente.

El contenido total de fitoesteroles (FE_T) se calculó como:

$$FE_T(\%) = \frac{\text{Masa total de Fitoesteroles colectada (g)}}{\text{Masa total de sólidos colectados (g)}} \cdot 100\% \quad (2.6)$$

2.2.5.3.2. Fitoesteroles libres (no encapsulados) (FE_L)

La fracción de fitoesteroles libres se extrajo por agitación de 5 g de microcápsulas en un volumen de 200 mL de *n*-hexano, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de filtrar a través de papel de filtro, se evaporó el solvente en un rotoevaporador a 60 °C y 0.200 atm, aproximadamente. Los fitoesteroles extraídos se secaron hasta alcanzar peso constante bajo una corriente de N₂. El contenido de fitoesteroles libres (FE_L) se computó como:

$$FE_L(\%) = \frac{\text{Masa de Fitoesteroles libres (g)}}{\text{Masa total de sólidos colectados (g)}} \cdot 100\% \quad (2.7)$$

2.2.5.4. Retención de Fitoesteroles (RFE)

La retención de fitoesteroles se expresó como la relación entre la cantidad total de fitoesteroles en las micropartículas (libres y encapsulados) y la cantidad de fitoesteroles alimentados al secadero en la suspensión (Frascareli *et al.*, 2012).

$$RFE(\%) = \frac{\text{Masa de total Fitoesteroles colectados (g)}}{\text{Masa total de Fitoesteroles alimentados (g)}} \cdot 100\% \quad (2.8)$$



2.2.6. Caracterización del producto particulado

2.2.6.1. Tamaño de las partículas encapsuladas

La distribución de tamaño de las partículas obtenidas como producto del secado por atomización y el tamaño medio aritmético en volumen $D[4,3]$ se determinaron siguiendo el método descrito en la Sección 2.2.4.4. *Tamaño de las partículas* para caracterizar el tamaño de las partículas en suspensión.

Asimismo, a partir de este mismo ensayo se estimó el porcentaje de la distribución que pasa a través de una malla de $25\ \mu\text{m}$ de apertura ($f_{\text{acum}25}$), es decir, qué fracción de la muestra presenta un tamaño inferior a $25\ \mu\text{m}$.

2.2.6.2. Morfología de las microcápsulas

Para determinadas experiencias de secado por atomización, se estudió la morfología de las partículas que constituyen el producto mediante microscopía de barrido electrónico (SEM). Se utilizó un microscopio de barrido electrónico LEO EVO 40-XVP (Carl Zeiss AG, Oberkochen Alemania). Para la preparación de las muestras, se secaron los polvos bajo corriente de aire sobre un portaobjeto y luego se metalizaron con oro.

El estudio de la estructura interna de las micropartículas fue abordado también por SEM. Para ello, el polvo fue embebido en una resina epoxi de baja viscosidad (Spurr®) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 días hasta alcanzar la solidificación completa de la resina. Dicho sólido conteniendo las microcápsulas fue sometido a cortes sucesivos en un ultramicrotomo para generar pequeñas láminas que luego fueron metalizadas y observadas por SEM de la manera convencional.

2.2.6.3. Humedad residual (HR)

El contenido de humedad de las microcápsulas se determinó usando un analizador de humedad con lámpara halógena M45, OHAUS como fuente de calor



(Ohaus Corporation, Parsippany, USA). El análisis del contenido de humedad se realizó por duplicado e inmediatamente después del proceso de secado por atomización.

2.2.6.4. Redispersabilidad

Una vez obtenidas las microcápsulas, se evaluó su facilidad para ser redispersadas en agua a temperatura ambiente. Algunos autores analizaron la redispersabilidad como el tiempo requerido para que cierta cantidad de polvo se hidrate completamente (observado a través de un cambio de color) (Auriou, 2003) o para que desaparezca de la superficie del agua (Turchiuli *et al.*, 2005), se disuelva completamente (Pérez-Alonso, César *et al.*, 2009), o bien, para que se disperse completamente (Chen, Zhong, Wen, McGillivray & Quek, 2013). Por su parte, otros autores estudiaron la redispersión mediante el análisis de la distribución de tamaño de las partículas a ciertos intervalos de tiempo (Cerdeira, Martini & Herrera, 2005; Fäldt & Bergenståhl, 1996; Tewa-Tagne, Briançon & Fessi, 2007). La velocidad de agitación del medio de dispersión utilizada en los estudios mencionados fue diferente o no reportada.

Considerando la ausencia de un método estandarizado para determinar la redispersabilidad de las microcápsulas y los antecedentes disponibles en la bibliografía, se seleccionó e implementó la metodología que se describe a continuación.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio exploratorio para determinar la velocidad de agitación adecuada para el ensayo. En este sentido, siguiendo la técnica propuesta por Chen *et al.* (2013) se colocaron 0.5 g de micropartículas en 150 mL de agua destilada a temperatura ambiente y se determinó el tiempo requerido para dispersarlas mediante agitación manual, simulando el proceso habitual de redispersión. Posteriormente, se realizó el mismo ensayo pero utilizando un agitador magnético a diferentes velocidades.

En base a los resultados obtenidos (Figura 2.21), la velocidad de agitación magnética para los ensayos de redispersabilidad se estableció en 750 rpm, aquella para la cual el tiempo de redispersión coincidió con el de agitación manual.



La capacidad de redispersión de las partículas se evaluó entonces como el tiempo requerido para redispersar una masa de 0.5 g de micropartículas en 150 mL de agua destilada a una velocidad de agitación de 750 rpm.

Adicionalmente, se analizaron las partículas redispersadas en términos de su tamaño por difracción láser y se corroboró que no existieran cambios significativos en la distribución al cabo de 30 minutos. De esta manera, se garantizó que el tiempo de redispersión (TRD) reportado fuera confiable.

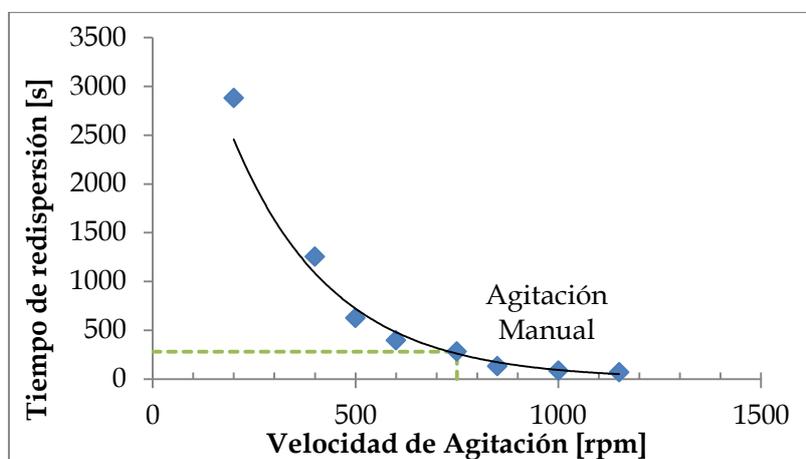


Figura 2.21. Tiempo de redispersión (TRD) en función de la velocidad de agitación.

2.2.6.5. Turbidez

Los ensayos de estabilidad de las microcápsulas redispersadas se llevaron a cabo en un Turbiscan Classic MA 2000 (Formulation SA, L'Union, Francia), un instrumento óptico diseñado para estudiar los procesos de agregación y separación de fases en sistemas coloidales. Este equipo opera con una fuente de luz a 850 nm y dos sensores ópticos que reciben la luz transmitida por la muestra (180° entre la luz incidente y el sensor) y la luz dispersada (45° entre la radiación incidente y el detector). El haz de luz recorre longitudinalmente la muestra colocada en un tubo cilíndrico hasta 80 mm, adquiriendo los datos cada $40 \mu\text{m}$.



La turbidez se estudió con el objeto de evaluar la estabilidad de las microcápsulas redispersadas a 25 °C. Para ello, se preparó una suspensión de 0.2 g de microcápsulas en 60 mL de agua destilada y se escaneó una alícuota de 8 mL siguiendo el esquema de monitoreo descrito en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Intervalos de escaneo de turbidez.

Intervalo de tiempo entre medición	Período de medición por cada intervalo
5 minutos	2 horas
15 minutos	2 horas
30 minutos	20 horas
1 hora	24 horas
8 horas	2 días
24 horas	3 días

Finalmente, la muestra se escaneó cada una semana, durante tres semanas. En cada escaneo se registró la variación de la luz transmitida (T %) y dispersada (BS %) respecto a los perfiles de referencia medidos en el tiempo inicial.

2.2.7. Ensayos de caracterización generales de los polvos

2.2.7.1. Fluides del polvo: Índice de Carr (IC)

Para determinar las propiedades de flujo de los fitoesteroles utilizados y las micropartículas obtenidas mediante secado por atomización se calculó el Índice de Carr. Para ello, el polvo se vertió en una probeta de 10 cm³ previamente tarada y se pesó para determinar la masa del mismo. La densidad a granel ($DensG$) se calculó como la relación entre la masa de polvo y el volumen ocupado por el mismo (graduado en la probeta). La densidad empaquetada ($DensE$) se determinó sometiendo la probeta con el polvo pesado a una serie de impactos verticales suaves hasta que el volumen



final ocupado no presentó variaciones. La $DensE$ se calculó como la relación entre la masa de polvo y el volumen ocupado por el mismo después de los impactos. La fluidez del polvo se evaluó utilizando el Índice de Carr (Schüssele & Bauer-Brandl, 2003) según la Ecuación (2.9):

$$IC = \frac{DensE - DensG}{DensE} \cdot 100 \% \quad (2.9)$$

Valores de IC por debajo del 10 % indican flujo excelente, valores entre 11 - 15 % son representativos de buena fluidez, desde 16 y hasta 20 % el flujo es razonable, mientras que entre 21 - 25 % el material presenta aceptables propiedades de flujo. El polvo posee pobre fluidez cuando los valores de IC se encuentran entre 26 - 31 % (USP 30 - NF 25, 2007).

2.2.7.2. Difracción de rayos X (DRX)

Para establecer el tipo de estructura sólida de los materiales particulados (antes y después del secado) se utilizó un difractómetro Rigaku Geigerflek D/MAX 3 - C (Rigaku Corporation, Tokio, Japón). El ánodo se operó a 35 kV y 15 mA. Las mediciones se realizaron entre 2 y 70 ° sobre la escala 2θ y a una velocidad de barrido de 2 °/min.

2.2.7.3. Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Para ciertas experiencias de secado se analizó el producto mediante espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier. También se evaluaron los componentes individuales que las conforman, previamente secados de manera independiente.

Cada muestra a ensayar se preparó realizando una mezcla con bromuro de potasio (KBr) en una relación másica 1 : 99, respectivamente. Una pequeña fracción de



esta mezcla se colocó en una placa portamuestra y se analizó en un espectrofotómetro FT - IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific™, Waltham, USA), barriendo longitudes de onda entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} . El análisis de los espectros obtenidos se realizó mediante el software OMNIC v.5.12 (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, USA). La asignación de las bandas de absorción se llevó a cabo utilizando las bibliotecas disponibles en el software en conjunto con datos bibliográficos.

2.2.7.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El comportamiento térmico de distintos productos obtenidos se estudió utilizando un calorímetro Pyris 1 Perkin Elmer (Perkin Elmer, Waltham, USA), cuyos datos fueron registrados con el software Pyris (Perkin Elmer, Waltham, USA) articulado al equipo. Tanto el flujo calórico como los puntos de fusión se calibraron utilizando Indio (In) y el punto de fusión del agua pura, respectivamente. Todos los datos se referenciaron a la celda vacía.

Para determinadas experiencias de secado, se pesaron aproximadamente 10 mg de producto, en cápsulas de aluminio posteriormente cerradas por prensado. El tratamiento térmico se efectuó bajo una atmósfera inerte (N_2) para evitar descomposiciones aceleradas por la presencia de oxígeno. Una vez establecida la muestra durante 1 minuto a 20 °C, se la sometió a un calentamiento hasta 170 o 200 °C (dependiendo del material ensayado, y para evitar su descomposición) a una tasa de 10 °C/min. Este primer calentamiento se utiliza generalmente para eliminar el agua residual que posee la muestra. Luego se dejó estabilizar nuevamente por 1 minuto a la máxima temperatura y se comenzó a disminuir la temperatura hasta 20 °C también a 10 °C/min. Finalmente, se realizó un segundo calentamiento hasta la máxima temperatura y a 10 °C/min.

2.2.7.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se realizó utilizando una balanza Discovery TA (TA- Instruments, New Castle, USA), cuyos datos se colectaron mediante el software



Trios (TA - Instruments, New Castle, USA) articulado al equipo. Para ciertas experiencias de secado, se pesaron 5 - 10 mg de producto que se sometieron a tratamiento térmico bajo una atmósfera inerte (N₂) entre 30 °C y 200 °C y a una velocidad de calentamiento de aproximadamente 10 °C/min. Para algunas muestras y con el objeto de identificar la temperatura de descomposición de los materiales, se realizó el análisis en el modo Hi - Resolution, hasta 1000 °C y a una tasa de calentamiento de 5 °C/min. Este modo de calentamiento permite incrementar la resolución de los ensayos en las zonas donde se observan cambios bruscos de peso con el aumento de temperatura.

2.2.7.6. Microscopía Óptica y Microscopía de Platina Calefaccionante

Para algunas muestras se observaron las características morfológicas utilizando el microscopio óptico Carl Zeiss Phomi III Pol acoplado a una cámara fotográfica Leica 1280 utilizando una magnificación de 160X.

El mismo microscopio fue utilizado para observar los cambios morfológicos de algunas muestras durante el proceso de calentamiento en el análisis térmico. En este contexto, el microscopio se acopló a un sistema de platina calefaccionante Mettler. Las muestras fueron observadas bajo el microscopio en un rango de temperatura de entre 30 y 200 / 210 °C a una tasa de calentamiento de 2 °C/min, utilizando una magnificación de 160 X. Para identificar los cambios morfológicos, las imágenes fueron tomadas con y sin el uso de una placa de retardación intercalada de 1 λ.

2.2.8. Análisis estadístico

El análisis de todos los resultados y la comparación entre ensayos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), el cual permite identificar si la fuente de variación entre dos muestras se corresponde con cambios en las condiciones de trabajo o con el error experimental (Montgomery, 1991). Se utilizó siempre un nivel de confianza del 95 % (nivel de significancia $\alpha = 0.05$) para identificar diferencias significativas entre ensayos.



Capítulo III

**CARACTERIZACIÓN DE LOS
FITOESTEROLES y ENSAYOS
EXPLORATORIOS PARA LA
SELECCIÓN DE LOS AGENTES
ENCAPSULANTES**



CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FITOESTEROLES Y ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA LA SELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES

3.1. Introducción

Tal como se menciona en la Sección 1.5.3. *Técnicas de microencapsulación – Secado por atomización*, la preparación de la dispersión o emulsión a ser procesada es la primera etapa involucrada en el proceso de encapsulación por secado por atomización (Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger, 2012). En líneas generales, el proceso comienza con la preparación de la solución de la matriz, compuesta principalmente por uno o más agentes encapsulantes, dentro de la cual se incorporará el material activo a ser encapsulado. La matriz, seleccionada conforme a la aplicación final de las microcápsulas, se disuelve en un solvente tal que el ingrediente activo sea insoluble o inmisible en él. El ingrediente activo se agrega entonces a la solución de agentes encapsulantes y se dispersa mediante una agitación vigorosa (Ré, 1998).

En este contexto de formulación de la dispersión, resulta indispensable conocer ciertas propiedades fisicoquímicas de los materiales a encapsular para determinar su compatibilidad con los agentes que se seleccionen como encapsulantes y establecer las condiciones de preparación de la suspensión. En consecuencia, el presente capítulo incluye la caracterización del polvo original de fitoesteroles en términos de contenido y composición en esteroides y estanoles, así como la distribución de tamaño de sus partículas. Además, se presenta un estudio térmico y el análisis de sus grupos funcionales para evaluar su estabilidad frente al secado por atomización.

Otro aspecto importante en el desarrollo de las microcápsulas es la selección del/ de los agente/s encapsulante/s. No sólo deben ser apropiados para su uso en alimentos y garantizar la funcionalidad y liberación requeridas del ingrediente activo sino que también deben poseer ciertas características adicionales, tales como buena resistencia mecánica, compatibilidad con el ingrediente activo y los productos alimenticios donde se incorporarán las microcápsulas, adecuada capacidad emulsificante (que permita obtener un apropiado tamaño de partícula final) (Matsuno



& Adachi, 1993; Ré, 1998), y prolongada vida útil luego del secado, etc. (Desai & Park, 2005; Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley & Saurel, 2007; Ré, 1998). Si en particular se utiliza el secado por atomización como proceso de encapsulación (Matsuno & Adachi, 1993), los agentes encapsulantes deben además: presentar buena solubilidad en el medio de dispersión (habitualmente agua), generar sistemas dispersos de alta estabilidad (Matsuno & Adachi, 1993; Ré, 1998) y evitar tanto la segregación del ingrediente activo durante el proceso de deshidratación como la coalescencia de las gotas generadas (Matsuno & Adachi, 1993).

A pesar de disponer de todos estos criterios, la selección de los agentes encapsulantes para la microencapsulación mediante secado por atomización ha involucrado tradicionalmente procedimientos de prueba y error, en los cuales las microcápsulas formadas son evaluadas en términos de la eficiencia de encapsulación, la estabilidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento, el grado de protección del ingrediente activo y la observación de la superficie por microscopía, entre otros aspectos (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En general, no existe un único componente que reúna todas las características deseadas. Por lo tanto, en la práctica cada material se utiliza en sus formas modificadas y/o en combinación con otros agentes encapsulantes u otras sustancias que posean diferentes características como antioxidantes, agentes quelantes y/o tensoactivos (Desai & Park, 2005).

Existen numerosos materiales de uso alimenticio disponibles como agentes encapsulantes, los cuales pueden ser agrupados dentro de las siguientes categorías (Ré, 1998; Vilstrup, 2001):

- **Carbohidratos:** Son considerados buenos agentes encapsulantes de materiales insolubles en agua porque exhiben baja viscosidad a altas concentraciones y buena solubilidad (por ejemplo la maltodextrina, descrita en la Sección 2.1.2.2. *Maltodextrina (MD)*). Sin embargo, no poseen las propiedades interfaciales requeridas para una alta eficiencia de encapsulación. Por ende, suelen asociarse a otros agentes encapsulantes tales como derivados de carbohidratos (ésteres, éteres, gomas) y proteínas



(Gharsallaoui *et al.*, 2007; Vilstrup, 2001). Algunos de éstos (como la pectina, la goma guar y la carboximetilcelulosa descritas en las Secciones 2.1.2.3. *Goma guar (GG)* y 2.1.2.4. *Carboximetilcelulosa sódica (CC)*, respectivamente) poseen propiedades gelificantes y/o espesantes que los hacen propicios para estabilizar emulsiones frente a la floculación y la coalescencia (Gharsallaoui *et al.*, 2007); mientras que otros (como la goma arábica, descrita en 2.1.2.1. *Goma arábica (GA)*) presentan propiedades interfaciales adecuadas para la generación de una dispersión estable (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Vilstrup, 2001).

- **Lípidos (tipo ceras, parafinas, grasas, aceites, lecitinas):** Suelen ser utilizados para encapsular ingredientes alimenticios solubles en agua y, debido su bajo punto de fusión, pueden ser fundidos para encapsular núcleos sólidos (Vilstrup, 2001). La principal desventaja de los lípidos es que presentan polimorfismos que pueden alterar gradualmente su estructura cristalina y, con ello, las propiedades de barrera (Vilstrup, 2001).
- **Proteínas:** Poseen propiedades interfaciales útiles en la preparación de la alimentación al secadero (por ejemplo, gelatina, proteína de soja y proteínas del suero) (Gharsallaoui *et al.*, 2007) y son utilizadas para microencapsular ingredientes no solubles en agua (como aceites, vitaminas y aromas) (Vilstrup, 2001). No obstante, durante la deshidratación en el secadero, el incremento gradual en la temperatura de la gota atomizada puede dar lugar a la desnaturalización de las proteínas, afectando las propiedades de las microcápsulas (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En este marco, además de la caracterización de los fitoesteroles, el presente capítulo aborda el estudio de selección de los agentes encapsulantes, evaluando la humectabilidad (o mojabilidad) de las soluciones de agentes encapsulantes sobre los fitoesteroles, la estabilidad y facilidad de manipulación de las suspensiones a secar y el rendimiento de secado como indicadores primarios de la potencial eficacia de los agentes encapsulantes preseleccionados.



3.2. Procedimiento experimental

3.2.1. Caracterización de los fitoesteroles

La identificación de los fitoesteroles fue realizada mediante cromatografía gaseosa (según las Secciones 2.2.1.1. *Identificación de esteroides* y 2.2.1.1. *Identificación de esteroides*), mientras que la caracterización general del polvo se llevó a cabo siguiendo las técnicas descritas en las subsecciones de 2.2.7. *Ensayos de caracterización generales de los polvos* (espectrofotometría infrarroja, calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría, rayos X). La selección del corte de fitoesteroles a utilizar y la determinación del tamaño medio de sus partículas se realizaron de acuerdo a las técnicas descritas en las Secciones 2.2.2. *Tamizado de los fitoesteroles* y 2.2.4.4. *Tamaño de las partículas*.

3.2.2. Selección de los agentes encapsulantes

Como se mencionó anteriormente, un gran número de compuestos pueden ser seleccionados para la encapsulación de ingredientes alimenticios. Sin embargo, debido a las propiedades destacadas en las Secciones 2.1.2.1. *Goma arábica (GA)* y 2.1.2.2. *Maltodextrina (MD)*, la goma arábica y la maltodextrina lideran la lista de los agentes encapsulantes más utilizados. Por otro lado, si bien la goma guar y la carboximetilcelulosa son usados menos frecuentemente, su capacidad para formar geles a bajas concentraciones resulta una característica atractiva para la encapsulación de fitoesteroles.

En este proceso de selección, la goma arábica y la maltodextrina fueron utilizadas en una concentración del 20 % m/v, mientras que la goma guar y la carboximetilcelulosa en concentraciones de 1 % m/v y 2 % m/v, respectivamente, de acuerdo con datos bibliográficos y ensayos experimentales previos (Balasubramani *et al.*, 2015; Fernandes, Borges & Botrel, 2014; Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger, 2011; Gibbs, Kermasha, Alli & Mulligan, 1999; Pérez-Alonso, César *et al.*, 2009; Ré, 1998; Rodea-González *et al.*, 2012; Saenz, Tapia, Chavez & Robert, 2009; Turchiuli *et al.*, 2005).



La discriminación entre agentes encapsulantes se realizó observando conjuntamente las propiedades de mojado de las soluciones formuladas sobre los fitoesteroles y su viscosidad, el tamaño de partícula de las suspensiones y el rendimiento de secado como una medida de la factibilidad del proceso sujeto al uso de estos materiales.

Las suspensiones homogeneizadas fueron atomizadas en un secadero Büchi Mini Spray Drier B - 290, a una temperatura de 160 °C, un caudal de aire de atomización de 536 L/h (equivalente a 45 mm de la altura del rotámetro), estableciendo la bomba de alimentación al 10 % de apertura (2 - 3 mL/min) y la aspiración al 100 % (correspondiente a un caudal de aire de secado de 35 - 38 m³/h).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Caracterización y acondicionamiento de los fitoesteroles

3.3.1.1. Identificación y cuantificación de los esteroides y estanoles presentes en el ingrediente a encapsular

La Figura 3.1 muestra el cromatograma obtenido para la identificación de los fitoesteroides. En él se distinguen una gran variedad de picos cromatográficos, algunos de los cuales se corresponden con los fitoesteroides y fitoestanoles detallados en la norma utilizada.

Tal como se mencionó en la Sección 2.2.1.1. *Identificación de esteroides*, la identificación de la señal correspondiente al β -sitosterol fue el punto de partida para reconocer los demás esteroides y estanoles presentes. Como puede observarse, el β -sitosterol apareció en un tiempo de retención de aproximadamente 23.49 minutos, siendo éste el pico más intenso del cromatograma (nomenclado con el número 16, Figura 3.1). Seguidamente, considerando la masa de α -colestanol incorporada como



estándar interno y conociendo las áreas de cada uno de los picos cromatográficos, se establecieron las composiciones porcentuales de cada esteroles y estanol.

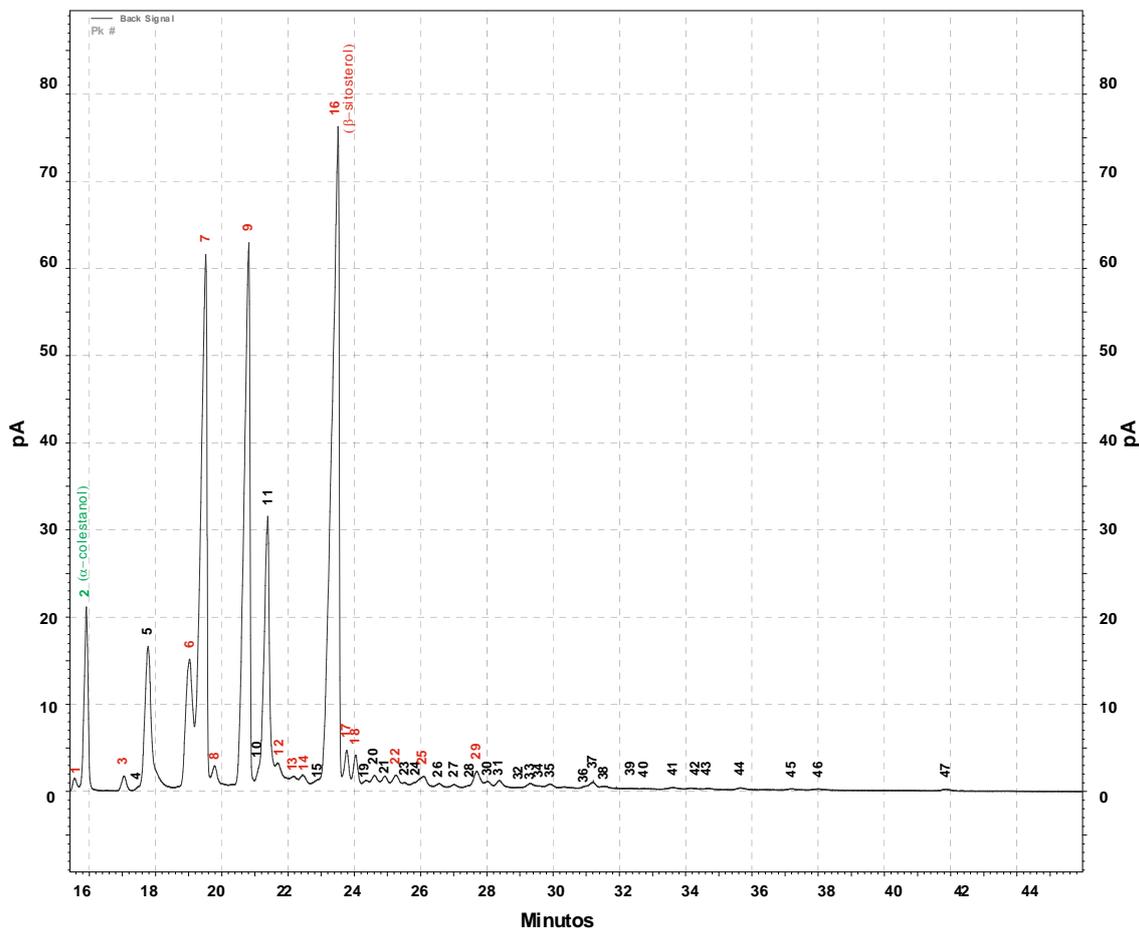


Figura 3.1. Cromatograma de los fitoesteres a encapsular.

En la Tabla 3.1 se presentan los tiempos de retención relativos de todos los fitoesteres identificados y la composición porcentual promedio de cada uno de ellos, calculada a partir de la Ecuación (2.1).

Efectivamente, la muestra comercial de fitoesteres estuvo compuesta principalmente por β -sitosterol (36.36 %), campesterol (24.55 %) y estigmasterol (23.71 %). Los resultados indicaron que el polvo Advasterol® 90 contenía un



90.28 ± 3.57 % m/m de fitoesteroles y fitoestanoles, verificando la información reportada en la Tabla 2.1.

Tabla 3.1. Tiempos de retención relativos (TRR) y composición de esteroides presentes.

Nro. Pico	Fitoesterol / Fitoestanol	TRR	Contenido
			[mg/100 mg esteroides totales]
1	Colesterol	0.66	0.43 ± 0.01
3	Brasicasterol	0.72	0.56 ± 0.07
6	24-metilen-colesterol	0.81	9.17 ± 3.78
7	Campesterol	0.83	24.55 ± 1.04
8	Campestanol	0.84	0.79 ± 0.07
9	Estigmasterol	0.89	23.71 ± 0.84
12	Δ-7-campesterol	0.92	0.71 ± 0.05
13	Δ-5,23-estigmastadienol	0.94	0.15 ± 0.05
14	Clerosterol	0.95	0.24 ± 0.04
16	β-sitosterol	1.00	36.36 ± 1.45
17	Sitostanol	1.01	0.87 ± 0.22
18	Δ-5-avenasterol	1.02	0.81 ± 0.09
22	Δ-5,24-estigmastadienol	1.07	0.37 ± 0.10
25	Δ-7-estigmastenol	1.11	0.55 ± 0.12
29	Δ-7-avenasterol	1.18	0.72 ± 0.13

3.3.1.2. Difracción de rayos X de los fitoesteroides

La Figura 3.2 presenta el difractograma de rayos X realizado para la mezcla de esteroides comerciales. Los compuestos presentaron una estructura principalmente cristalina, confirmada por la presencia de picos bien definidos a 4.96°, 15.16°, 18.6°, 18.9°, 21.5° y 22.0° en el patrón de difracción.

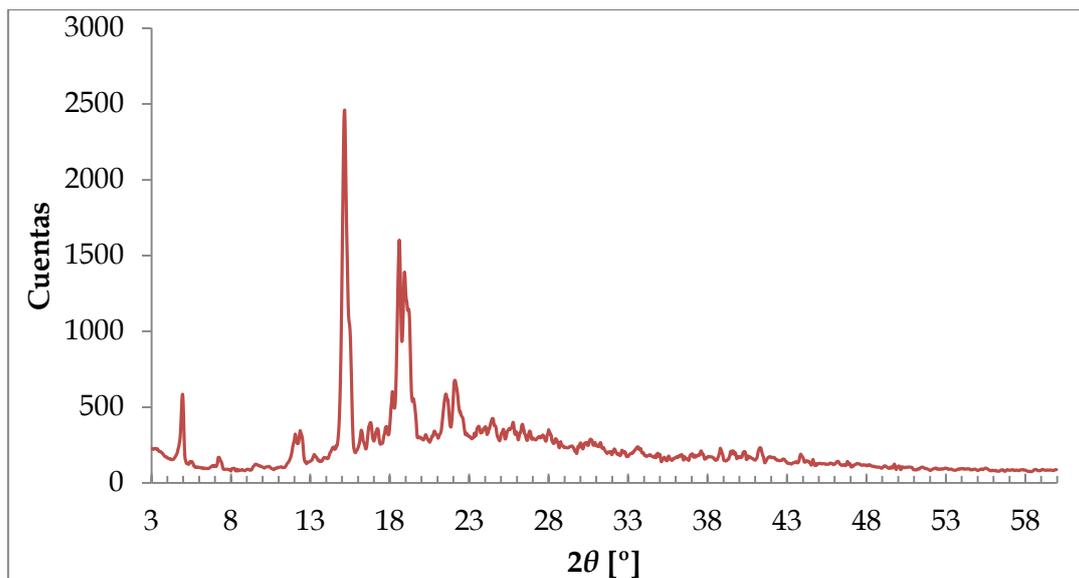


Figura 3.2. Diffractograma de rayos X de la mezcla comercial Advasterol® 90.

Mel'nikov, Seijen ten Hoorn & Bertrand (2004) mostraron estructuras similares para β -sitosterol puro, esteroides de aceites vegetales y madera y sitostanol; mientras que Türk, Upper & Hils (2006) y Rozner, Popov, Uvarov, Aserin & Garti (2009), obtuvieron resultados equivalentes en mezclas de esteroides ricas en β -sitosterol, campesterol y estigmasterol.

3.3.1.3. Perfil térmico de los fitoesteroides

La Figura 3.3 muestra el perfil térmico que presentaron los fitoesteroides, evaluado desde 30 °C hasta 200 °C en los ciclos de calentamiento y enfriamiento, a una tasa de variación de 10 °C/min, así como también el análisis termogravimétrico realizado en el mismo intervalo de temperatura y a una misma tasa de calentamiento.

Los perfiles de DSC (tanto en el primer calentamiento como en el segundo) indicaron un comportamiento típico de materiales cristalinos, acorde a lo presentado en la sección anterior (3.3.1.2. *Difracción de rayos X de los fitoesteroides*). La mezcla de fitoesteroides presentó dos eventos endotérmicos, uno de ellos alrededor de 54 °C y el otro cerca de 138 °C, ambos acompañados por un evento recíproco en el ciclo de



enfriamiento (Figura 3.3). Estos picos podrían corresponderse con el punto de fusión (y su análoga cristalización) de los ésteres (54 °C) y esteroides (138 °C), respectivamente.

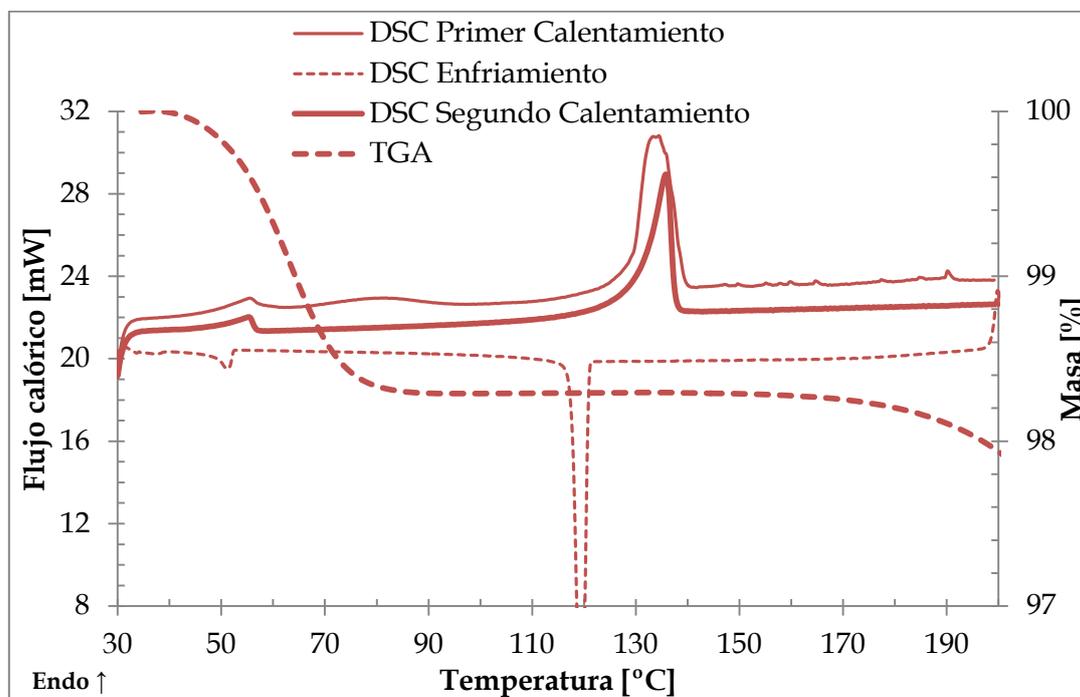


Figura 3.3. Perfiles de DSC y TGA de la mezcla comercial de fitoesteroides Advasterol® 90 (explicados sobre los ejes izquierdo y derecho, respectivamente).

En particular, el primer calentamiento mostró estos eventos con menor intensidad debido a la presencia de agua libre. La evaporación lograda con el aumento de la temperatura durante el primer calentamiento permitió observar estos eventos más definidos en el segundo calentamiento. Esta pérdida de agua se observó en el perfil de TGA a partir de los 40 °C, alcanzando una proporción de alrededor del 1.7 % respecto a la masa inicial. Los fitoesteroides son compuestos altamente hidrofóbicos, sugiriendo que el agua presente en el polvo se encontraba lo suficientemente libre como para que su eliminación se diera a bajas temperaturas. Este perfil de TGA indicó además que la descomposición de los fitoesteroides comenzó cerca de los 180 °C, donde se observó una importante pérdida de masa (Figura 3.3).



Para corroborar la hipótesis de fusión de estanoles y esteroides, se realizó un ensayo de microscopía de platina calefaccionante utilizando la misma tasa de calentamiento que en los ensayos de TGA y DSC. La Figura 3.4 muestra el seguimiento del calentamiento de las muestras de fitoesteroides. Los dos fenómenos de fusión fueron claramente identificados, entre 50 y 60 °C; y entre 125 y 140 °C, respectivamente. En efecto, en el transcurso del ensayo se observaron zonas de diferentes tonalidades, tanto con el uso de la placa de retardación como sin ella. Las imágenes adquiridas sin la placa de retardación resultaron más brillantes indicando un reordenamiento de los cristales con el incremento de la temperatura, producto de la incipiente fusión. Al alcanzar los 125 - 140 °C, la fusión de la muestra se aceleró; en efecto, las imágenes sin la placa de retardación se tornaron rápidamente oscuras debido a la desaparición de estructuras cristalinas. El proceso de enfriamiento también se estudió mediante esta técnica, mostrando evidencias de cristalización en cercanías a las mismas temperaturas.

Rozner *et al.* (2009) obtuvieron un perfil de DSC similar para una mezcla de fitoesteroides, reportando tres picos de fusión muy cercanos entre ellos (114.4 °C; 132.0 °C y 140.0 °C) para fitoesteroides provenientes de una mezcla de diversas plantas. Por su parte, Christiansen, Karjalainen, Seppänen-Laakso, Hiltunen & Yliruusi (2003) encontraron sólo un pico endotérmico a 138.1 ± 0.6 °C en el termograma de β -sitosterol cristalizado. Mel'nikov *et al.* (2004) observaron dos picos de fusión en el estudio de β -sitosterol (133.1 °C y 142 °C), mientras que para el sitosterol reportaron sólo uno a 141.3 °C.

Los resultados obtenidos permitieron asegurar la estabilidad de los fitoesteroides frente al proceso de secado (garantizando así su procesabilidad) debido a la ausencia de eventos de descomposición en el rango de temperaturas de operación utilizado.

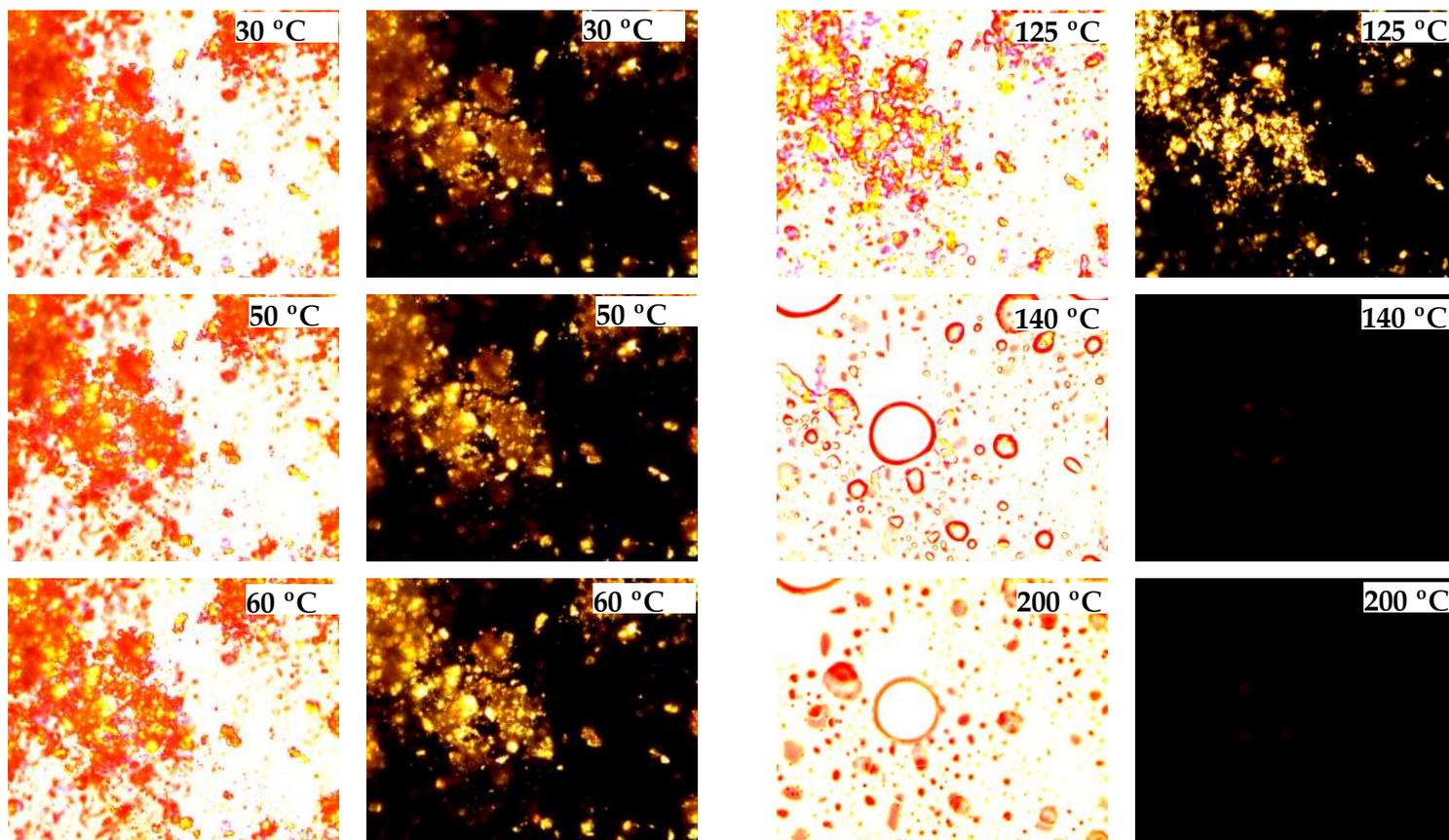


Figura 3.4. Microscopía de platina calefaccionante de la mezcla de fitoesteroles, con y sin placa de retardación (imágenes claras y oscuras, respectivamente).



3.3.1.4. Análisis de Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) de los fitoesteros

De acuerdo a la estructura que presentan los fitoesteros (Figura 2.2a), en el espectro infrarrojo se esperaba encontrar información relativa al grupo funcional OH (C3), los anillos aromáticos (de 6 y 5 carbonos), y la cadena de 5 carbonos y sus ramificaciones. A continuación se presenta el espectro obtenido para la mezcla comercial de esteroides (Figura 3.5).

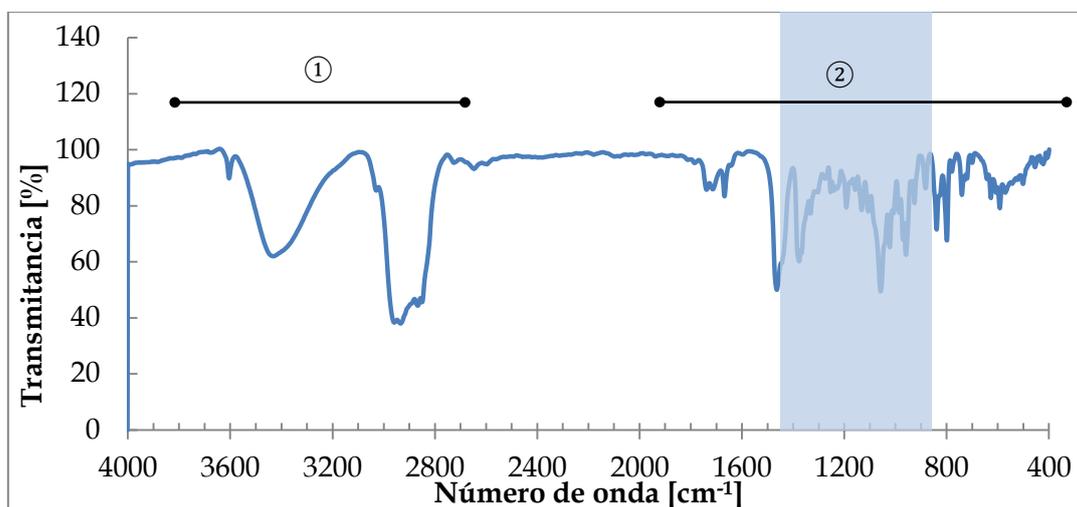


Figura 3.5. Espectro FTIR de los fitoesteros.

En el espectro de transmisión se observaron dos grandes zonas marcadas en distintas frecuencias. La zona ①, de alta frecuencia, presentó un pequeño pico en 3604 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión del OH libre (no asociado por puente H), y una banda de absorción entre 3070 y 3500 cm^{-1} propia de la vibración de tensión del OH asociado por puente H (3200 - 3600 cm^{-1}). La presencia de humedad en la muestra estaría contribuyendo a esta zona de absorción.

Disminuyendo en el número de onda, entre 3070 y 2730 cm^{-1} , aproximadamente, aparecieron las bandas características de los grupos metilo y



metileno de la cadena lateral de la molécula. Esta zona incluyó las vibraciones de tensión de CH_3 asimétrica y simétrica a 2958 y 2867 cm^{-1} , respectivamente; de $-\text{CH}_2$ asimétrica a 2933 cm^{-1} y simétrica a 2849 cm^{-1} ; como así también las de tensión del CH del grupo $\text{CH} = \text{CH}$ (3028 cm^{-1}).

La zona ②, de frecuencias bajas, presentó bandas de absorción cerca de 1780 y hasta 1562 cm^{-1} aproximadamente, donde fue difícil identificar grupos funcionales debido a que entre 1737 y 1716 cm^{-1} las vibraciones son coincidentes con las de los ésteres ($1730 - 1710\text{ cm}^{-1}$) y la de los aromáticos ($1730 - 1715\text{ cm}^{-1}$).

Por otra parte, entre 1667 y 1629 cm^{-1} aparecieron las vibraciones del enlace $\text{C} = \text{C}$ (cis) del grupo $\text{HC} = \text{CH}$ (en general a $1665 - 1635\text{ cm}^{-1}$) que podrían estar solapadas con la vibración de tensión del enlace $\text{C} = \text{C}$ en cicloalcanos insaturados ($1640 - 1560\text{ cm}^{-1}$).

A frecuencias entre $1533 - 1297\text{ cm}^{-1}$ se observó una banda de absorción con un pico en 1463 cm^{-1} correspondiente a la vibración de flexión asimétrica del CH_3 , que podría encontrarse solapada con la deformación de tijera del metileno (dada en 1468 cm^{-1}). A frecuencias de 1438 cm^{-1} y 1376 cm^{-1} se encontraron la deformación asimétrica y vibración simétrica del enlace CH del grupo CH_3 , respectivamente. Sobre esta misma zona, a 1367 cm^{-1} se detectó una banda de absorción (solapada al pico mayor de 1376 cm^{-1}) que se correspondió con la deformación del $\text{C} - \text{H}$ en el grupo $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ presente generalmente sobre el final de la cadena lateral de los esteroides, mientras que las vibraciones de tensión del esqueleto de $\text{C} - \text{C}$ y flexión del $\text{C} - \text{C} - \text{H}$ del mismo grupo se observaron a 1173 y 1157 cm^{-1} , respectivamente.

Sobre los 1331 cm^{-1} se halló la banda correspondiente a la vibración de tensión del $\text{C} - \text{O}$ en el grupo $\text{C} - \text{O} - \text{H}$, mientras que en 1106 cm^{-1} se encontró la vibración de tensión del $\text{C} - \text{O}$ del mismo grupo.

A frecuencias inferiores a 1218 cm^{-1} se apreciaron una gran cantidad de bandas de absorción, siendo la mayor de ellas a 1058 cm^{-1} correspondiente a la vibración de flexión fuera del plano del enlace $\text{C} - \text{O}$ correspondiente al grupo OH del carbono 3. A 1132 cm^{-1} se da la absorción de las vibraciones de tensión del enlace $\text{C} - \text{C}$ del grupo metilo, solapada con la de deformación de balanceo de ese mismo grupo.



Finalmente, sobre los 960 y 1304 cm^{-1} se observaron las vibraciones de deformación fuera y en el plano del C - H, respectivamente, correspondientes al grupo - CH = CH -. Esta última absorción podría estar solapada con la deformación del aleteo del - CH₂ -CH₂ (generalmente dada a 1306 - 1303 cm^{-1}).

Los espectros obtenidos en ambos casos fueron similares a los obtenidos por Sosińska, Przybylski, Hazendonk, Zhao & Curtis (2013) en la descripción del β -sitosterol, componente mayoritario de la mezcla de esteroides utilizada en este estudio. En ese trabajo, los autores destacaron la presencia de dos bandas, una muy amplia a 3350 cm^{-1} y otra muy intensa a 1050 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos OH y CO, respectivamente.

Por otra parte, Tan & Shahidi (2013) estudiaron la modificación química de una mezcla de fitoesteroides mediante distintas técnicas. El espectro FTIR obtenido presentó un perfil similar al de este estudio, prestando atención al comportamiento de una banda presente a 1053 cm^{-1} (correspondiente a la tensión CO), que desapareció cuando los fitoesteroides fueron esterificados, como así también la banda ancha alrededor de los 3300 - 3500 cm^{-1} , característica del grupo OH, que denotó la presencia de fitoesteroides libres en el producto de reacción.

3.3.1.5. Tamaño de partícula del polvo de fitoesteroides utilizado como materia prima

Tal como se mencionó en la Sección 2.1.1.1. *Fitoesteroides (FE)* los fitoesteroides se presentaron como un polvo blanco con el aroma característico de los aceites vegetales originarios. Para obtener una fracción uniforme del polvo de fitoesteroides y asegurar su homogeneidad independientemente del lote utilizado, el polvo se tamizó utilizando una malla ASTM #100, obteniéndose un material cuya distribución se muestra en la Figura 3.6. De esta manera el polvo de fitoesteroides que se utilizó como materia prima en este trabajo de tesis presentó un tamaño medio en volumen de $83.92 \pm 5.16 \mu\text{m}$, mientras que el 80 % de la distribución se encontró entre 160 μm ($D[v, 0.90]$) y 27 μm ($D[v, 0.10]$).

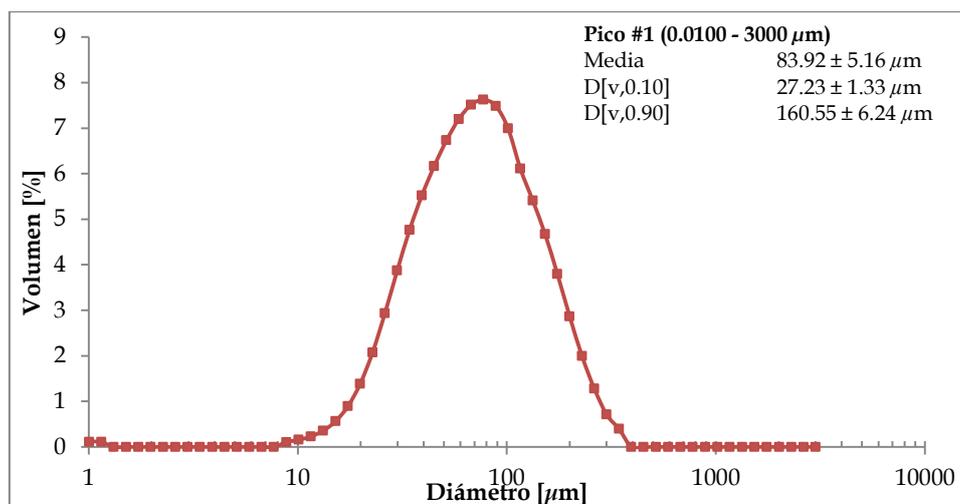


Figura 3.6. Distribución de tamaño de los fitoesteroles luego del tamizado (malla ASTM #100).

3.3.2. Selección de los agentes encapsulantes

3.3.2.1. Viscosidad de soluciones de agentes encapsulantes

Se estudió el comportamiento reológico de las soluciones acuosas de los agentes encapsulantes preseleccionados con el objeto de determinar la viscosidad de las mismas y evaluar la factibilidad de ser procesadas mediante secado por atomización. En la Figura 3.7 se presenta el comportamiento obtenido para las soluciones de, goma arábica al 20 % m/v, maltodextrina 20 % m/v, carboximetilcelulosa al 2 % m/v y goma guar 1 % m/v.

Tanto las soluciones acuosas de maltodextrina como de goma arábica mostraron un comportamiento newtoniano, ya que la viscosidad permaneció casi invariante con la velocidad de deformación aplicada. En efecto, el ajuste de la viscosidad a este modelo dio un valor de 3.01 mPa.s para la solución de maltodextrina y 24.95 mPa.s para la de goma arábica, con un coeficiente de determinación R^2 superior a 0.99 en ambos casos. Estas viscosidades resultaron apropiadas para atomizar la suspensión al secadero (BÜCHI Labortechnik AG, 2016).

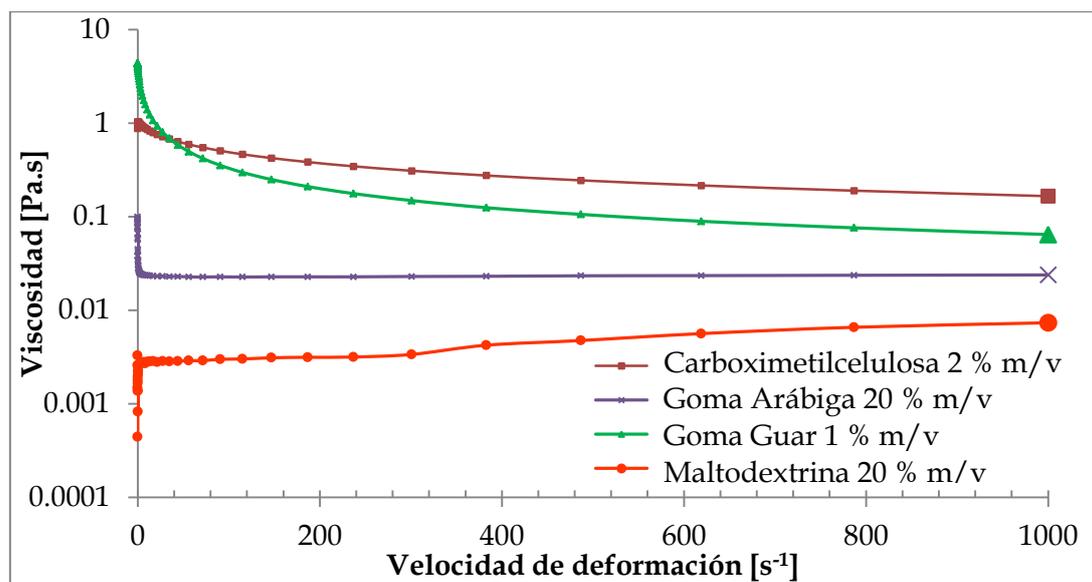


Figura 3.7. Comportamiento reológico de soluciones de agentes encapsulantes a 25 °C.

Por otra parte, tanto la solución de carboximetilcelulosa como la de goma guar presentaron un comportamiento del tipo no newtoniano (pseudoplástico), con una disminución en la viscosidad ante aumentos en la velocidad de deformación. Sin embargo, la viscosidad medida para estas últimas soluciones acuosas permaneció siempre por encima de las de goma arábica y maltodextrina, pese a que sus concentraciones fueron inferiores. Más aún, a bajas velocidades de deformación la viscosidad superó considerablemente el límite máximo de 300 mPa.s impuesto para lograr una apropiada atomización en el secadero (BÜCHI Labortechnik AG, 2016).

3.3.2.2. Mojado

Esta propiedad describe la habilidad de una superficie para ser mojada por el líquido elegido, y en general se caracteriza en términos del ángulo de contacto (*i.e.*, el ángulo entre la superficie del sólido de interés y la tangente de una gota del líquido que se está evaluando en la intersección de las interfaces gas - líquido y líquido - sólido) (Susana, Campaci & Santomaso, 2012) (Figura 2.17).

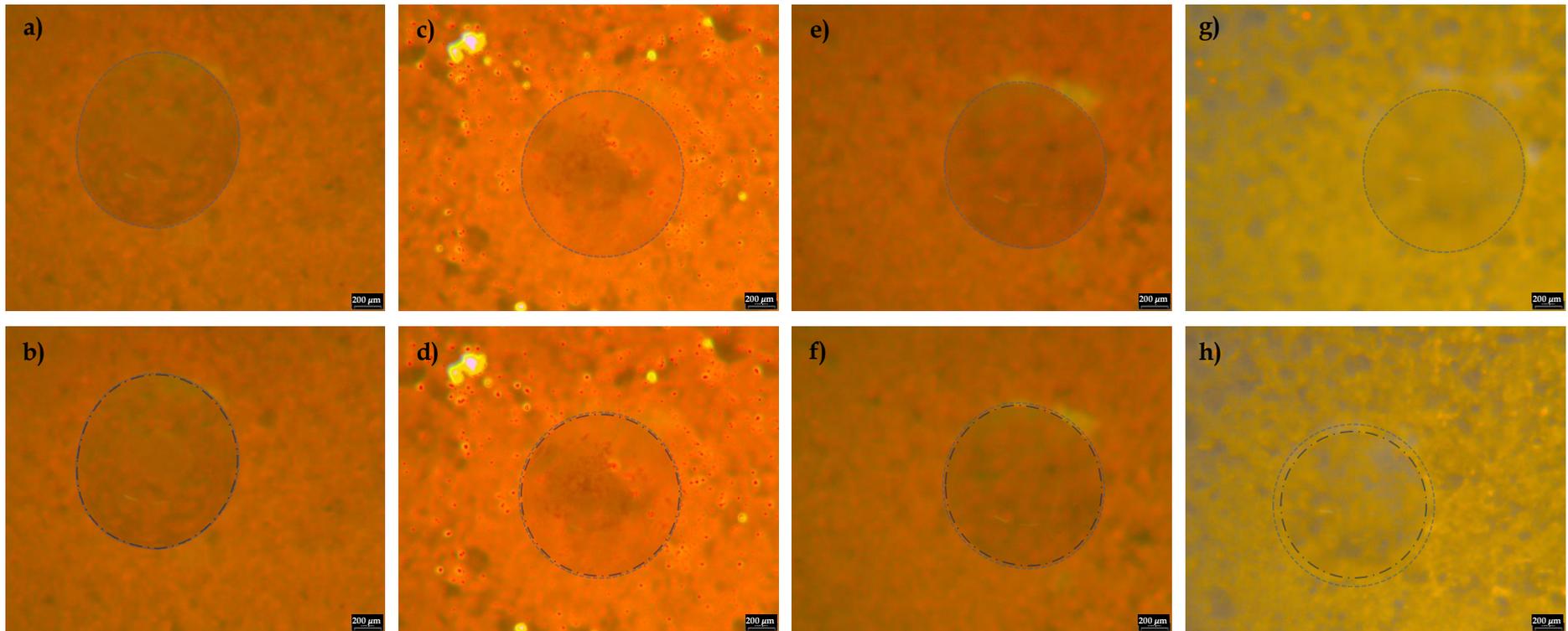


Figura 3.8. Vista superior de las gotas depositadas. Las líneas punteadas delimitan la gota depositada a $t = 0$ minutos (t_0) (-----) y a $t = 5$ minutos (t_1) (-.-.). **a)** Goma arábica 20 % m/v, t_0 ; **b)** Goma arábica 20 % m/v, t_1 ; **c)** Goma guar 1 % m/v, t_0 ; **d)** Goma guar 1 % m/v, t_1 ; **e)** Maltodextrina 20 % m/v, t_0 ; **f)** Maltodextrina 20 % m/v, t_1 ; **g)** Carboximetilcelulosa 2 % m/v, t_0 ; **h)** Carboximetilcelulosa 2 % m/v, t_1 .



La mojabilidad (humectabilidad) de un polvo es una propiedad importante involucrada en diversos problemas prácticos, tales como la caracterización de la dispersabilidad del polvo en un líquido y la selección de un material líquido para recubrir o granular un polvo (Susana *et al.*, 2012).

Se estudió el mojado de los agentes encapsulantes preseleccionados sobre una placa de fitoesteroles mediante la observación de la gota en una vista superior. Los resultados obtenidos no fueron promisorios. En efecto, las gotas no se esparcieron aún transcurridos 5 minutos luego de su deposición sobre la placa de fitoesteroles.

En la Figura 3.8 se muestra la vista superior de las gotas de solución de goma arábica y maltodextrina al 20 % m/v, goma guar al 1 % m/v y carboximetilcelulosa al 2 % m/v, inmediatamente después de ser depositadas (tiempo 0, t_0) y al cabo de 5 minutos de la deposición sobre la placa (tiempo 1, t_1). Todas estas soluciones resultaron ser no mojantes sobre la superficie de fitoesteroles. Efectivamente, se observaron gotas turgentes y una ausencia de esparcimiento de las mismas. Más aún, en todos los casos el diámetro de gota se redujo, indicando la existencia de dos fenómenos que no pueden ser independizados: la evaporación del agua contenida y la retardación de la gota producto de la alta hidrofobicidad de los fitoesteroles.

3.3.2.3. Tamaño medio de partícula de las suspensiones, observaciones sobre la homogeneización y la estabilidad

Las suspensiones de fitoesteroles fueron elaboradas en una concentración de 6.66 % m/v en las soluciones de los diferentes agentes encapsulantes preseleccionados. De acuerdo a la Figura 3.6, el tamaño medio de las partículas de fitoesteroles fue superior a 25 μm , por lo que fue indispensable incorporar una etapa de homogeneizado durante la preparación de las suspensiones. Para determinar el tiempo requerido de homogeneización, se realizó un ensayo exploratorio en agua, sometiendo suspensiones acuosas a este proceso y analizando el tamaño medio y la distribución en función del tiempo aplicado. En dicho ensayo, presentado en el APÉNDICE 3.1. *Reducción del tamaño medio: Homogeneización en suspensión acuosa*, se observó que 9 minutos de homogeneización fueron suficientes para alcanzar de manera conjunta un



tamaño medio inferior a $25 \mu\text{m}$ y una distribución estrecha de tamaños. A partir de ese tiempo, no se logró una disminución considerable en el tamaño medio. No obstante, al no contener ningún agente encapsulante, estas suspensiones resultaron sumamente inestables (*i.e.*, con formación instantánea de agregados sobre la superficie).

Siguiendo este estudio, las suspensiones de fitoesteroles en las soluciones de los agentes encapsulantes se homogeneizaron durante 9 minutos y se determinó el tamaño medio de las partículas en suspensión. En todos los casos, las muestras fueron sonicadas durante 1 minuto para eliminar la espuma formada durante la homogeneización.

La Tabla 3.2 presenta el $D[4,3]$ obtenido para cada una de las suspensiones formuladas ($D[4,3]_{\text{Susp}}$). En ella se observa que los tamaños de partícula medios obtenidos fueron superiores a $25 \mu\text{m}$, siendo influenciados principalmente por las propiedades inherentes de la solución de agente encapsulante.

Por un lado, la carboximetilcelulosa y la goma guar condujeron a viscosidades tan elevadas que, si bien generaron sistemas sumamente estables (sin separación de fases por períodos de días), no lograron una disminución considerable en el tamaño de partícula de los fitoesteroles. De este modo, estos agentes no sólo no facilitaron la reducción del tamaño medio en la suspensión, sino que además no lograron un mezclado eficiente de los fitoesteroles.

Tabla 3.2. Tamaño de partícula medio para las suspensiones de fitoesteroles.

Agente Encapsulante	$D[4,3]_{\text{Susp}} [\mu\text{m}]^*$
Goma arábica	$36.401 \pm 3.177^{\text{a}}$
Maltodextrina	$52.529 \pm 0.972^{\text{b}}$
Carboximetilcelulosa	$65.988 \pm 5.042^{\text{c}}$
Goma guar	$83.530 \pm 4.685^{\text{d}}$

*Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).



Por su parte, las suspensiones conteniendo goma arábica y maltodextrina sí lograron reducir el tamaño medio, a valores de $36.401 \pm 3.177 \mu\text{m}$ y $52.529 \pm 0.972 \mu\text{m}$, respectivamente; siendo estos tamaños significativamente inferiores a los obtenidos con goma guar y carboximetilcelulosos ($p < 0.05$). Dicha reducción en el tamaño fue importante respecto a la mezcla original tamizada, posiblemente debido a la viscosidad moderada de las soluciones de los agentes encapsulantes (que permitió un mezclado eficiente de los fitoesteroides) y, en particular para la goma arábica, a las propiedades interfaciales que presenta. En consecuencia, la presencia de goma arábica suministró un sistema con mayor estabilidad que el provisto por la maltodextrina, el cual resultó altamente inestable (*i.e.*, con separación de fases inmediata).

En efecto, el análisis de la estabilidad de las suspensiones formuladas en función del tamaño de partícula y el tiempo de homogeneización (presentado en el APÉNDICE 3.1. *Reducción del tamaño medio: Homogeneización en suspensión acuosa*) indicó no sólo una reducción en el tamaño medio de las partículas en suspensión a medida que el tiempo de homogeneización aumentaba, sino también una mayor estabilidad de las suspensiones tanto en términos del mayor tiempo requerido para observar separación de fases (superior a 4 horas luego de la preparación) como de una menor fracción volumétrica de la fase de cremado (18 %).

Aunque no se lograron tamaños inferiores a $25 \mu\text{m}$ (requeridos para ejercer un apropiado efecto hipocolesterolémico) en las suspensiones basadas en los diferentes agentes encapsulantes preseleccionados, el estudio de la homogeneización, focalizado en la estabilidad de las suspensiones y los tamaños medios de partícula, permitió proponer a la goma arábica como principal agente encapsulante.

3.3.2.4. Secado por atomización

En la Tabla 3.3 se presentan los resultados de rendimiento de secado y tamaño medio de partícula en el producto para las muestras ensayadas.

Tanto la suspensión con carboximetilcelulosa al 2 % m/v como aquella con goma guar al 1 % m/v presentaron rendimientos de secado no aceptables para la



escala laboratorio del proceso (23.51 % y 8.82 %, respectivamente). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se descartó el uso de goma guar y carboximetilcelulosa para encapsular fitoesteroles mediante secado por atomización. A pesar de sus promisorias propiedades formadoras de geles, el mojado ineficiente junto a las elevadas viscosidades en todo el rango de velocidades de deformación, condujeron a tamaños de partícula muy grandes, tanto de suspensión como de producto, y a rendimientos de secado excesivamente bajos. En efecto, el comportamiento reológico de las soluciones de goma guar y carboximetilcelulosa dificultaron el mezclado y la homogeneización y, consecuentemente, su aplicabilidad en la encapsulación.

Tabla 3.3. Rendimiento de secado para las suspensiones formuladas y tamaño de partícula del producto.

Agente Encapsulante	Rendimiento [%]*	D[4,3]_{Part} [μm]*
Goma arábica	55.12 ± 0.95 ^a	38.924 ± 3.609 ^a
Maltodextrina	63.88 ± 1.73 ^b	51.607 ± 1.595 ^b
Carboximetilcelulosa	23.51 ± 1.25 ^c	52.430 ± 1.566 ^b
Goma guar	8.82 ± 1.46 ^d	61.131 ± 5.108 ^c

* Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

A pesar de que en ambos casos el proceso de secado disminuyó el tamaño medio de partícula respecto al de la suspensión ($p < 0.05$), esta reducción no fue suficiente para alcanzar los tamaños requeridos para que los fitoesteroles ejerzan un apropiado efecto hipocolesterolémico. El fenómeno de reducción de tamaño observado para estos dos agentes encapsulantes pudo deberse, en mayor medida, al pegado de material sobre las paredes de la cámara, que condujo a rendimientos de secado inferiores al 100 %. En efecto, al procesarse materiales no volátiles, la principal pérdida durante el secado podría adjudicarse al pegado, y en menor medida al arrastre de las partículas pequeñas aguas abajo del ciclón de separación.



Por otra parte, tanto la goma arábica como la maltodextrina pudieron ser procesadas en soluciones más concentradas, obteniéndose mejores y aceptables rendimientos de secado (55.12 % y 63.88 %, respectivamente). Como era de esperar, la maltodextrina condujo a tamaños de partícula significativamente superiores a los obtenidos utilizando goma arábica ($p < 0.05$). Sin embargo, su correspondiente rendimiento de secado también fue significativamente superior al asociado a la presencia de goma arábica ($p < 0.05$).

3.3.2.5. Eficiencia de encapsulación

Por lo expuesto anteriormente, la determinación de eficiencia de encapsulación se realizó únicamente sobre las microcápsulas provenientes de las suspensiones con goma arábica o maltodextrina.

Tabla 3.4. Eficiencia de encapsulación (EE) y retención de fitoesteroles (RFE) utilizando goma arábica y maltodextrina.

Agente Encapsulante	EE [%]*	RFE [%]*
Goma arábica	22.92 ± 2.21 ^a	16.88 ± 2.05 ^a
Maltodextrina	19.56 ± 0.13 ^a	23.31 ± 0.30 ^b

* Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$).

Los resultados de eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles se presentan en la Tabla 3.4. La eficiencia de encapsulación utilizando maltodextrina no fue significativamente diferente de aquella obtenida al usar goma arábica, mientras que la retención de fitoesteroles fue superior ($p < 0.05$), posiblemente debido al mayor rendimiento observado. En este sentido, la posibilidad de utilizar ambos agentes encapsulantes de manera conjunta se presentó como una estrategia atractiva para



obtener una estabilidad apropiada de las suspensiones, en conjunto con tamaño de partícula, rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles mejorados respecto al uso de los agentes individuales. Efectivamente, en la literatura abierta se ha reportado una gran variedad de sistemas de encapsulación en los que se utiliza la combinación de estos dos agentes encapsulantes en diferentes proporciones (Bhandari, Dumoulin, Richard, Noleau & Lebert, 1992; Fernandes *et al.*, 2014; Thevenet, 1995; Turchiuli *et al.*, 2005).

3.3.3. Combinación de goma arábica y maltodextrina para la microencapsulación de los fitoesteroles

Tal como se mencionó en la Sección 3.1. *Introducción*, la combinación de dos o más agentes encapsulantes y otros materiales es una táctica muy utilizada para lograr las propiedades deseadas en el producto microencapsulado. En el contexto de la presente tesis, la combinación de goma arábica y maltodextrina resultó atractiva de acuerdo con los resultados exploratorios obtenidos anteriormente. En efecto, algunas propiedades resultaron beneficiadas por el uso individual de goma arábica, mientras que otras por el de maltodextrina.

La utilización de goma arábica en conjunto con maltodextrina se abordó en una relación másica GA:MD de 3:1, obteniéndose un rendimiento de secado de 58.24 ± 0.61 %, una eficiencia de encapsulación de 20.15 ± 1.06 %, una retención de 22.33 ± 1.12 % y un tamaño de partículas de 25.933 ± 1.419 μm . Tal como se esperaba, la combinación de estos agentes encapsulantes proporcionó un efecto sinérgico, conduciendo a mejores resultados globales con respecto al uso de cada uno de estos agentes encapsulantes de manera individual. El rendimiento de secado, la eficiencia de encapsulación y la retención de fitoesteroles estuvieron en los rangos establecidos por el uso de los materiales por separado, mientras que el tamaño de partícula de producto mejoró significativamente ($p < 0.05$) acercándose al valor deseado de 25 μm .

Teniendo en cuenta estos resultados, en los capítulos subsiguientes se aborda un estudio profundizado de la combinación goma arábica-maltodextrina como agentes encapsulantes.



3.4. Conclusiones

La caracterización de los fitoesteroles utilizados como materia prima permitió confirmar la composición del polvo comercial en términos de contenido y tipo de fitoesteroles y fitoestanoles presentes. Además, se logró identificar la estructura cristalina del polvo de fitoesteroles, así como también los eventos térmicos que podrían manifestarse durante el proceso de secado por atomización.

Respecto a los agentes encapsulantes analizados, ninguno evidenció buenas propiedades de mojado sobre la capa de fitoesteroles. Sin embargo, los resultados de viscosidad de sus soluciones acuosas y un análisis preliminar de la encapsulación de los fitoesteroles, permitieron descartar el uso de algunos de esos materiales. En particular, la carboximetilcelulosa y la goma guar presentaron viscosidades muy altas e incluso superiores a las establecidas para garantizar una buena atomización, conduciendo a bajos rendimientos de secado. Además, para la carboximetilcelulosa y la goma guar esta misma propiedad perjudicó la reducción del tamaño de las partículas en suspensión al ser sometidas a homogeneización, fenómeno no observado con el uso de otros agentes encapsulantes.

El uso de goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes para el sistema en estudio proveyó buenos resultados, tanto en términos de rendimiento como de tamaño de partícula del producto, siendo aún baja la eficiencia de encapsulación. Si bien ambos agentes encapsulantes suministraron resultados similares en cuanto a este último parámetro de interés, la goma arábica fue superior en términos de la estabilidad de las suspensiones y el tamaño de partícula en suspensión y en el producto microencapsulado. El uso de ambos agentes encapsulantes en forma complementaria surgió como una alternativa viable para lograr una buena encapsulación.

Si bien la combinación de goma arábica y maltodextrina suministró mejores resultados que el uso de ambos agentes en forma individual, tanto la eficiencia de encapsulación, como la retención de los fitoesteroles deben ser mejoradas. En este sentido, la combinación adicional con agentes tensoactivos para reducir la tensión superficial, mejorar las propiedades de mojado y reducir los tamaños de partícula, aparece como una estrategia efectiva. Un estudio detallado del efecto de estos



componentes sobre el proceso de encapsulación se presenta en el CAPÍTULO 4. *SELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y ESTUDIO DEL SECADO POR ATOMIZACIÓN.*

Cabe destacar que algunos de los principales resultados de este capítulo fueron presentados en las siguientes publicaciones y/o trabajos a congreso:

- *Rendimiento de secado por atomización: Enfoque y puesta a punto de la técnica de microencapsulación.* C. A. Di Battista, D. Constenla, J. Piña. II Reunión Interdisciplinaria de Tecnologías y Procesos Químicos. Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 24 a 27 de octubre de 2010. Resumen Extendido RQ-4 en CD-ROM ISBN 987-950-33-0811-0.
- *Medición del ángulo de contacto para la selección de agentes de cobertura.* C. A. Di Battista, J. Piña, D. Constenla. II Reunión Interdisciplinaria de Tecnologías y Procesos Químicos. Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 24 a 27 de octubre de 2010. Resumen Extendido RQ-5 en CD-ROM ISBN 987-950-33-0811-0.
- *Estabilidad de fitoesteroles en suspensiones biopoliméricas: Influencia del tamaño de partícula.* Di Battista, C.A.; Constenla, D., Ramírez Rigo, M. V. y Piña, J. IX Simposio Argentino de Polímeros, Bahía Blanca, Argentina, 15 a 18 de noviembre de 2011. Resumen Extendido T82. Trabajo Completo en CD-ROM ISBN 978-987-1620-63-0.



Capítulo IV

SELECCIÓN DEL
TENSOACTIVO y ESTUDIO
DEL SECADO POR
ATOMIZACIÓN



CAPÍTULO 4. SELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y ESTUDIO DEL SECADO POR ATOMIZACIÓN

4.1. Introducción

Como se mencionó en el Capítulo III, las propiedades deseadas para la matriz encapsulante no suelen estar provistas por un único componente, por lo que resulta indispensable la combinación de materiales para lograr una encapsulación eficiente. En este contexto, las propiedades emulsificantes y la capacidad de mantener en dispersión al ingrediente activo (Sección 3.1. *Introducción*) pueden ser asistidas mediante la adición de agentes tensoactivos (Bule, Singhal & Kennedy, 2010; Li, Rouaud & Poncelet, 2008).

Por definición, un tensoactivo (también denominado “surfactante”) es una molécula anfifílica, que en su estructura posee una “cabeza” con grupos funcionales hidrofílicos y un “tallo” con mayor afinidad por las fases oleosas (Li *et al.*, 2008; McClements, 1999). Las propiedades que presenta cada tensoactivo están determinadas por la naturaleza y las características de ambas partes (McClements, 1999). En efecto, según la naturaleza de la “cabeza” hidrofílica pueden distinguirse cuatro tipos diferentes de tensoactivos: aniónicos, catiónicos, anfóteros o zwitteriónicos y no iónicos. Todos ellos se comportan de manera diferente en solución acuosa: liberando carga negativa o positiva según sean aniónicos o catiónicos, respectivamente; mientras que los anfóteros o zwitteriónicos dependen de las condiciones del medio (pH) para liberar un tipo u otro de carga y los no iónicos no liberan carga en solución (McClements, 1999).

Otra manera de clasificar los tensoactivos es a través de las características fisicoquímicas que presentan. Entre ellas, el balance hidrofílico - lipofílico (HLB) es de las más comunes (McClements, 1999). El HLB es un concepto semiempírico que describe la afinidad relativa (y la solubilidad) entre las fases acuosa y oleosa que exhibe el tensoactivo de acuerdo a su estructura química. En efecto, un tensoactivo con HLB bajo (normalmente < 9) es predominantemente hidrofóbico, se disuelve preferencialmente en aceite, estabiliza emulsiones agua/aceite y forma micelas



reversas en aceite; mientras que un tensoactivo con HLB alto (> 11) es predominantemente hidrofílico, se disuelve preferencialmente en agua, estabiliza emulsiones aceite/agua y forma micelas en agua (McClements, 1999; Ruckenstein, 1999; Schramm, 2005).

El tensoactivo se utiliza frecuentemente para facilitar la dispersión de una fase en otra, en la cual es inmisible, y para la estabilización de la dispersión obtenida a través de varios mecanismos (por ejemplo: reduciendo la tensión superficial de la fase continua, evitando así la coalescencia y aglomeración; interactuando con proteínas o polisacáridos; formando micelas; incrementando la elasticidad superficial, etc.) (Aghbashlo, Mobli, Madadlou & Rafiee, 2012; Li *et al.*, 2008; McClements, 1999; Schramm, 2005; de Vos, Faas, Spasojevic & Sikkema, 2010).

En el campo de la microencapsulación, existe una amplia variedad de estudios acerca del uso de tensoactivos para microencapsular ingredientes activos (Bule *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008). Además, de favorecer la dispersión del ingrediente activo, se ha demostrado que el agregado de tensoactivos permite aumentar el mojado y la estabilidad de las dispersiones (Ortega-Toro, Jiménez, Talens & Chiralt, 2014), así como también modificar y controlar la transferencia de masa durante el secado por atomización (Frey & King, 1986). Petrovic, Sovilj, Katona & Milanovic (2010) estudiaron el efecto de la adición del tensoactivo dodecilsulfato de sodio en diferentes concentraciones sobre la encapsulación mediante secado por atomización de aceite de girasol en una matriz de hidroxipropilmetil celulosa. Por su parte, Aghbashlo *et al.* (2012) utilizaron diversos agentes de cobertura y Tween 20 como tensoactivo para la encapsulación de aceite de pescado mediante secado por atomización; mientras que Liu & Yang (2011) estudiaron el efecto del agregado de mezclas de agentes tensoactivos de diferente HLB en la encapsulación de aceite de onagra (una planta cuya semilla es rica en ácidos grasos insaturados, en especial γ -linolénico) mediante secado por atomización utilizando una mezcla de caseinato de sodio y goma arábica como agentes de cobertura.

Teniendo en cuenta los antecedentes sobre el uso de tensoactivos en la microencapsulación mediante secado por atomización, y la necesidad de mejorar el



tamaño de partícula, la estabilidad de la dispersión de los fitoesteroles y, por ende, su eficiencia de encapsulación, se planteó como objetivo de este capítulo estudiar la incorporación de los tensoactivos Tween 20 (T20) y dodecilsulfato de sodio (SDS) a las suspensiones a secar. La selección de T20 y SDS se fundamentó en que ambos tensoactivos facilitan la estabilización de sistemas dispersos (en este caso, una suspensión) mediante mecanismos diferentes. En efecto, se ha demostrado que el uso de tensoactivos no iónicos, como el Tween 20, permite incrementar la estabilidad de este tipo de sistemas mediante mecanismos estéricos (Duquemin & Nixon, 1986); mientras que los tensoactivos iónicos, como el SDS, lo hacen mediante repulsiones electrostáticas (Duquemin & Nixon, 1986).

En particular, se evaluó el efecto de ambos tensoactivos, en concentraciones crecientes desde 0.1 % m/v hasta 2.65 % m/v, sobre el rendimiento de secado, la eficiencia de encapsulación, la retención de fitoesteroles y el tamaño, la morfología, estructura y redispersabilidad de las microcápsulas.

Complementariamente, se analizaron parámetros importantes de la alimentación, tales como la estabilidad térmica de sus componentes, el mojado (ángulo de contacto y tensión superficial) de los fitoesteroles por soluciones de los agentes encapsulantes (goma arábica y maltodextrina) y el tensoactivo, la viscosidad de las suspensiones y el tamaño de las partículas en las mismas.

4.2. Desarrollo experimental

En la Tabla 4.1 se introducen los diferentes casos de estudio, en términos de denominación y composición, que se abordan en este capítulo. Cabe destacar que para identificar las soluciones de agentes encapsulantes se utilizó la letra "W", mientras que para las suspensiones a secar se adoptó la letra "F" y, para las microcápsulas, la letra "M". Por otro lado, la segunda letra de la nomenclatura se usó para indicar el tensoactivo involucrado ("T" para Tween 20 y "S" para SDS), y "R" de referencia para las formulaciones sin tensoactivo. Finalmente, el número que acompaña a la letra se



relaciona con la concentración creciente de tensoactivo (comprendida entre 0.1 % m/v y 2.65 % m/v).

La preparación de las suspensiones a secar se realizó siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.2.3. *Preparación de las suspensiones a secar* y utilizando un tiempo de homogeneización de 9 minutos a 25000 - 35000 rpm.

4.2.1. Caracterizaciones previas al secado por atomización

Se determinó, al menos por duplicado, el ángulo de contacto entre los fitoesteroles y las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo, y tensión superficial de las soluciones y las suspensiones, la viscosidad y las distribuciones y tamaño medio de las partículas en las suspensiones. Asimismo, se analizó la estabilidad de cada uno de los materiales utilizados frente al secado por atomización (a través de ensayos FTIR, DSC y DRX). Se encontró que este proceso no produjo modificaciones químicas (*i.e.*, descomposición, oxidación, etc.) en ninguno de los componentes (ver APÉNDICE 4.1 *Estabilidad de los materiales durante el secado*). Todos los ensayos mencionados en este capítulo se realizaron siguiendo la metodología descrita en el Capítulo II.

4.2.2. Condiciones de secado por atomización

Las suspensiones se procesaron por duplicado utilizando el secadero Büchi B - 290 a 160 °C, bajo un caudal de aire de atomización de 601 L/h (correspondiente a una altura del rotámetro de 50 mm), un caudal de alimentación de 2 - 3 mL/min (10 % de apertura de la bomba) y un caudal de aire de secado de 35 - 38 m³/h. Estas condiciones fueron establecidas en base a la experiencia previa. Un estudio respecto a los efectos de estas variables sobre la encapsulación de los fitoesteroles se presenta en el Capítulo V.



Tabla 4.1. Denominación y composición de las soluciones de agentes encapsulantes y suspensiones a secar.

Denominación			Concentraciones [% m/v]				
Solución de Agentes de Cobertura	Suspensión a Secar	Microcápsulas	GA	MD	Tensoactivo	FE	
WR (referencia)	FR (referencia)	MR (referencia)	15.00	5.00	--	0.00	6.66
WT1	FT1	MT1	15.00	5.00	T20	0.10	6.66
WT2	FT2	MT2	15.00	5.00		0.50	6.66
WT3	FT3	MT3	15.00	5.00		1.00	6.66
WT4	FT4	MT4	15.00	5.00		1.50	6.66
WT5	FT5	MT5	15.00	5.00		2.00	6.66
WT6	FT6	MT6	15.00	5.00		2.65	6.66
WS1	FS1	MS1	15.00	5.00	SDS	0.10	6.66
WS2	FS2	MS2	15.00	5.00		0.50	6.66
WS3	FS3	MS3	15.00	5.00		1.00	6.66
WS4	FS4	MS4	15.00	5.00		1.50	6.66
WS5	FS5	MS5	15.00	5.00		2.00	6.66
WS6	FS6	MS6	15.00	5.00		2.65	6.66

4.2.3. Estudios posteriores al secado

Inmediatamente luego del secado, se analizó el contenido de humedad de las microcápsulas formadas de acuerdo a la Sección 2.2.6.3. *Humedad residual (HR)*; es decir calentado el producto a 105 °C y hasta no observar variaciones en su peso durante 90 segundos. Estos ensayos fueron realizados al menos por duplicado. Para todas las muestras ensayadas, el contenido de agua residual se encontró entre 3 y 5 % m/m. Además, se determinó la distribución y tamaño medio de las microcápsulas, su morfología, estructura y redispersabilidad según la metodología descrita en el Capítulo II.



Por otra parte, la performance del proceso se evaluó en términos de rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles, conforme a las Secciones 2.2.5.1. *Rendimiento de secado (RS)*, 2.2.5.3. *Eficiencia de encapsulación (EE)*, 2.2.5.4. *Retención de Fitoesteroles (RFE)*, respectivamente.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Mojado de los fitoesteroles por parte de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo

Tal como se mencionó en el Capítulo II, el mojado describe la habilidad que tiene un líquido para mojar una superficie sólida, por ende el potencial que tiene la fase continua para estabilizar y encapsular una fase dispersa.

La Figura 4.1 muestra la variación del ángulo de contacto con respecto a la concentración de tensoactivo en el estado inicial ($t_0 = 0$ min, en trazo continuo) y a 5 minutos posteriores a la deposición de la gota ($t_1 = 5$ min, en línea punteada) para las soluciones de agentes encapsulantes conteniendo T20 o SDS. La adición de tensoactivo afectó significativamente el ángulo de contacto ($p < 0.05$).

En la Figura 4.1 también se incluyen imágenes obtenidas del ensayo de ángulo de contacto para las soluciones de agentes encapsulantes WR, WT1 a WT6 y WS1 a WS6, inmediatamente luego de la deposición de la gota sobre la película de fitoesteroles. En ausencia de tensoactivos (WR), la gota apareció turgente y casi esférica debido a la naturaleza hidrofóbica de los fitoesteroles. El mojado fue pobre a pesar de la actividad superficial de la goma arábica.

El agregado de tensoactivos mejoró considerablemente la propiedad de mojado. La solución de agentes encapsulantes WS6 (*i.e.* 2.65 % w/v de SDS) presentó el menor ángulo de contacto (50 °). En efecto, inmediatamente luego del impacto, la gota de este líquido se esparció de forma casi completa sobre la superficie de los fitoesteroles.

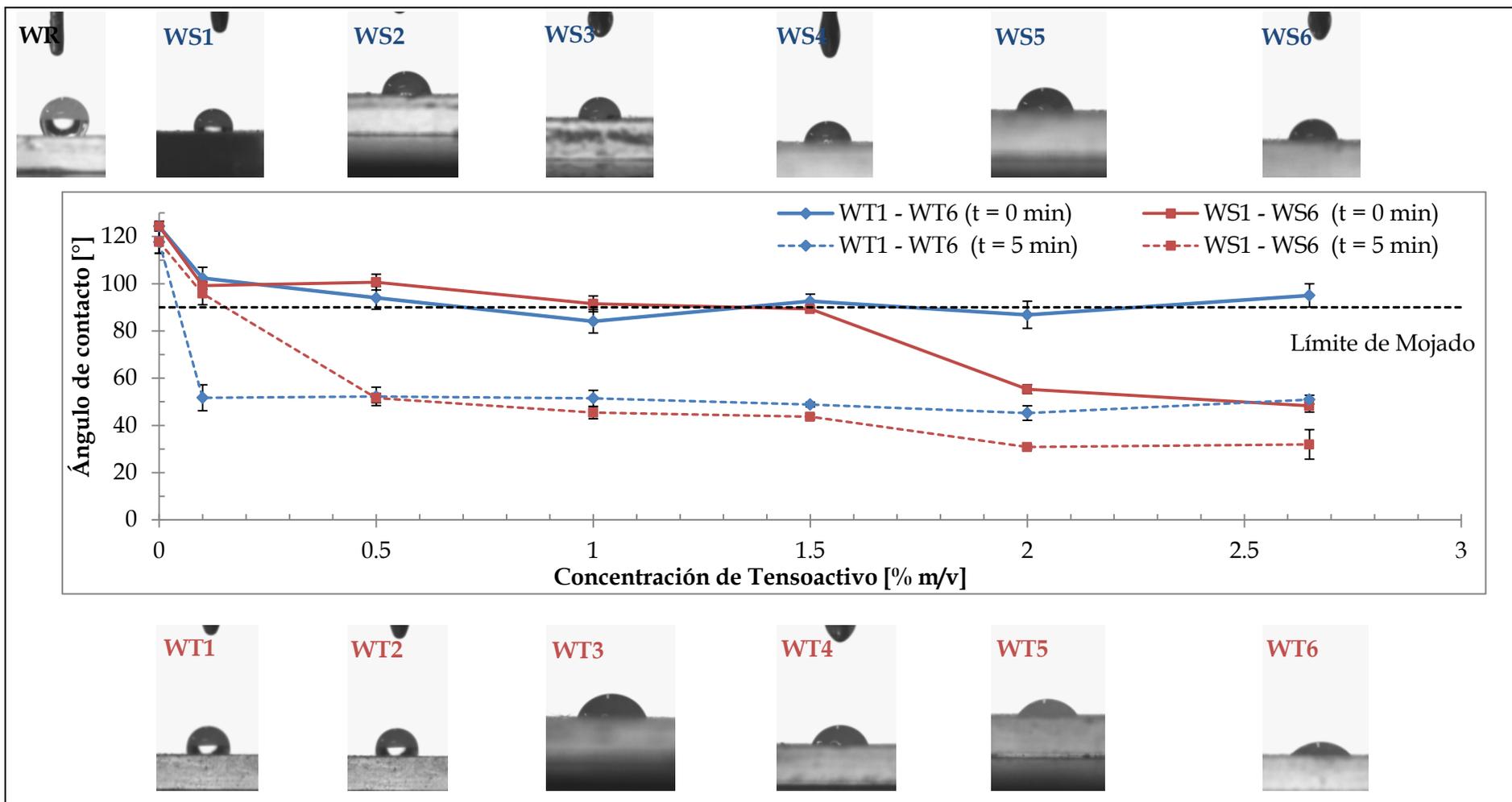


Figura 4.1. Ángulo de contacto entre los fitoesteroides y las soluciones de agentes encapsulantes y tensioactivo en función de la concentración de tensioactivo.



Para las soluciones incluyendo T20, el ángulo de contacto decreció desde 124 ° hasta casi 90 ° cuando la concentración de tensoactivo aumentó de 0 a 0.5 % m/v (WR a WT2). Para mayores concentraciones de este tensoactivo, el ángulo de contacto permaneció casi constante y cerca del límite de mojado. Esta tendencia está de acuerdo con los resultados que reportaron Wang, Narsimhan & Kim (2008) para un sistema conteniendo aceite de soja hidrogenado (en estado sólido) y soluciones acuosas de T20.

Para las soluciones de agentes de cobertura basadas en SDS (WS1 a WS6), el ángulo de contacto disminuyó a medida que aumentó la concentración de tensoactivo para todo el rango estudiado. Por encima de 1.5 % m/v de SDS (WS4) las soluciones fueron buenos líquidos mojantes (*i.e.* el ángulo de contacto fue inferior a 90 °), siendo el ángulo de contacto alrededor de 50 ° para la solución de agente de cobertura WS6 (2.65 % m/v de SDS).

Transcurridos 5 minutos de la deposición de la gota y como resultado de su esparcimiento, se observó una evolución en el mojado de los fitoesteroles para todas las soluciones de agentes encapsulantes (tanto aquellas conteniendo T20, como las que incluían SDS). El límite de mojado se alcanzó a menores concentraciones de tensoactivo; para T20 por encima de 0.1 % m/v el ángulo de contacto se mantuvo en 50 °, mientras que en presencia de SDS se observó una reducción más pronunciada en el ángulo de contacto ($t = 5$ min) hasta alrededor de 30 °.

Por lo tanto, ambos tensoactivos mejoraron significativamente la interacción entre los agentes encapsulantes y los fitoesteroles ($p < 0.01$). Más aún, el SDS proveyó ángulos de contacto inferiores a los provistos por el T20, probablemente debido a la diferencia en la tensión superficial (Adhikari, Howes, Wood & Bhandari, 2009; Bezelgues, Serieye, Crosset-Perrotin & Leser, 2008) y el balance hidrofílico - lipofílico (Smith & Charter, 2010). En efecto, Yölmaz, Jongboom, Feil & Hennink (2001) observaron una disminución en el ángulo de contacto de gotas de aceite de girasol sobre muestras de almidón moldeado ante aumentos en el HLB del tensoactivo.

Tal como se muestra en la Sección 4.3.2. *Tensión Superficial*, las mediciones de tensión superficial realizadas con el objeto de explorar el efecto del tipo y concentración de tensoactivo sobre la actividad superficial en el equilibrio (tanto de las



soluciones de agentes encapsulantes como de las suspensiones a secar) indicaron que la tensión superficial de las formulaciones con SDS (WS1 a WS6 y FS1 a FS6) fueron un 25 - 30 % menores que aquellas conteniendo T20 (WT1 a WT6 y FT1 a FT6). Este comportamiento, junto al de mojado estudiado en esta sección, sugirió que la interface líquido/aire se encontraba saturada con T20 en todo el rango de concentraciones explorado (McClements, 1999).

4.3.2. Tensión Superficial

La Figura 4.2 presenta la tensión superficial para todas las soluciones de agentes encapsulantes (WR, WT1 a WT6 y WS1 a WS6) y las suspensiones a procesar mediante secado por atomización (FR, FT1 a FT6 y FS1 a FS6) en función de la concentración de tensoactivo. Con el objeto de interpretar los fenómenos aislados, en la Figura 4.2 también se incluyen los resultados de tensión superficial de las suspensiones acuosas conteniendo únicamente fitoesteroles y el tensoactivo (T20 o SDS) en concentraciones crecientes (es decir, sin agentes encapsulantes).

Generalmente, la tensión superficial tanto de las soluciones como de las suspensiones comprendiendo SDS fue menor a la correspondiente a las formulaciones con T20 (entre un 25 y un 30 % inferior), en concordancia con el comportamiento observado para el ángulo de contacto. Para ambos tensoactivos, la tensión superficial de las soluciones de agentes encapsulantes y de las suspensiones a secar decreció cuando la concentración de tensoactivo aumentó hasta 0.1 - 0.5 % m/v y luego permaneció casi invariante ($p < 0.05$). Este resultado sugirió que la interfaz líquido/aire se encontraba saturada con el correspondiente tensoactivo en el rango de concentraciones estudiado.

Por otro lado, la suspensión de fitoesteroles en agua (en ausencia de tensoactivos y agentes encapsulantes) presentó una tensión superficial de 60 mN/m; mientras que este valor descendió a 56.5 mN/m cuando se incluyeron agentes encapsulantes en la fase continua (aún sin tensoactivo) como consecuencia de la actividad superficial que posee la goma arábica. Este efecto, se observó para todo el



rango de concentración de tensoactivo, sin importar cuál de los dos se estuviera utilizando.

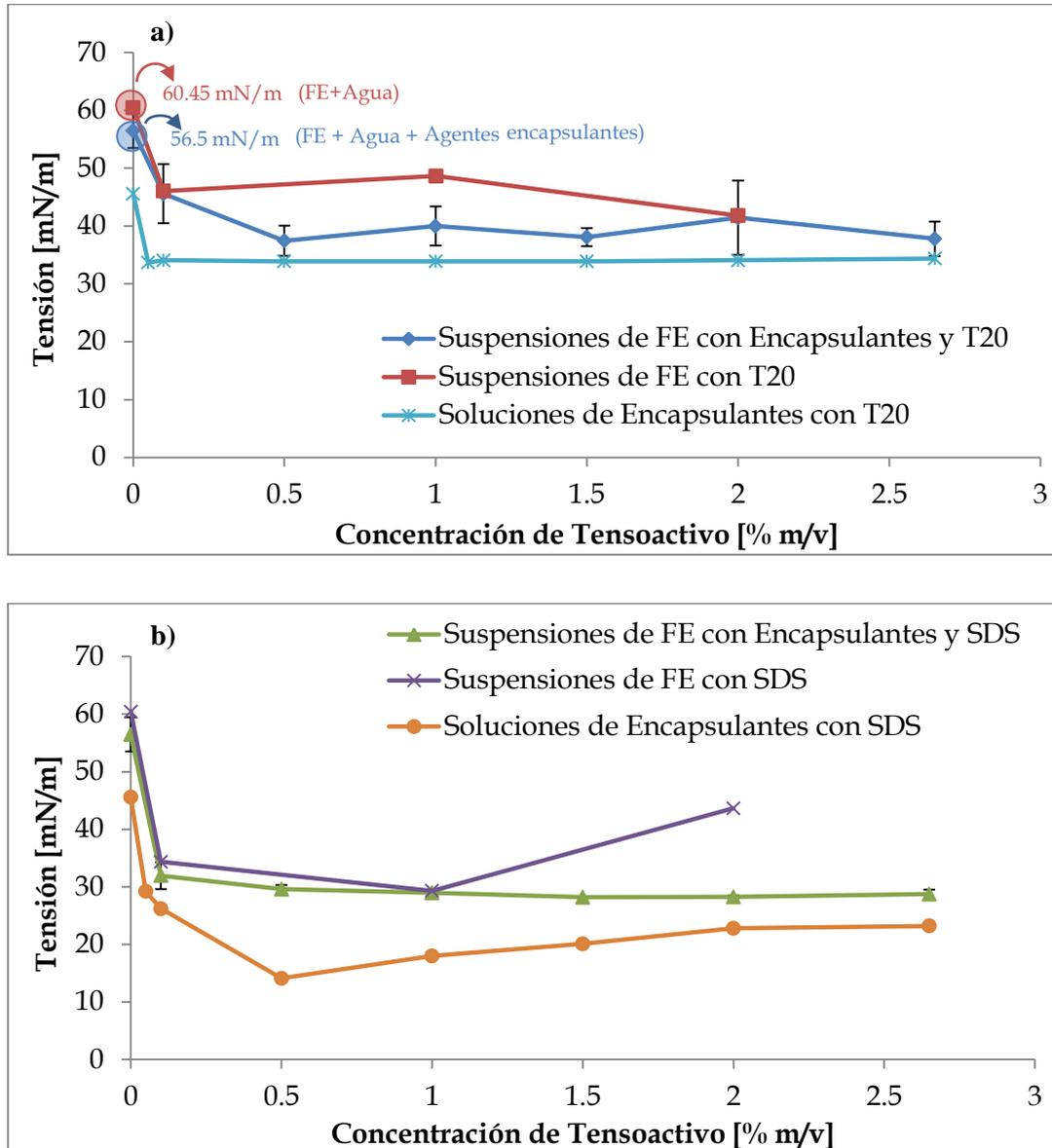


Figura 4.2. Tensión superficial de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo, las suspensiones a secar y suspensiones acuosas de fitoesteroles y tensoactivo (*i.e.* sin agentes encapsulantes) utilizando: **a)** T20; **b)** SDS.

Efectivamente, para cada concentración de tensoactivo, la tensión superficial de la suspensión acuosa de fitoesteroles fue mayor que la de aquellas conteniendo además



agentes encapsulantes (FT1 a FT6 y FS1 a FS6). Estos resultados indicaron que los agentes encapsulantes seleccionados promovieron el mojado de los fitoesteroles, favoreciendo la estabilidad de las suspensiones. Más aún, las mediciones de tensión superficial sugirieron la presencia de un efecto sinérgico en la reducción de la tensión superficial entre los agentes encapsulantes (goma arábica y maltodextrina) y los tensoactivos estudiados (T20 o SDS).

Es importante mencionar que las suspensiones acuosas de fitoesteroles y SDS mostraron la aparición del fenómeno de floculación, particularmente importante a concentraciones de SDS de 2 % m/v. Se ha reportado que, a pesar de sus buenas propiedades de mojado y su efecto dispersante, a concentraciones relativamente altas, el SDS puede inducir la agregación de las partículas por floculación (Hejazi, Erfan & Alireza Mortazavi, 2013).

Por contraparte, no se observó este fenómeno de floculación para las suspensiones que contenían además agentes encapsulantes (FS1 a FS6), lo cual demuestra el efecto sinérgico propuesto. Hejazi *et al.* (2013) encontraron un comportamiento similar para sistemas de SDS y megestrol acetato (una hormona femenina); de hecho, el uso de polímeros no iónicos resultó en dispersiones defloculadas. Con el propósito de evaluar el impacto de los agentes encapsulantes sobre el fenómeno de floculación mencionado, se midió el tamaño de partículas en la suspensión acuosa de SDS y FE, obteniéndose un $D[4,3]$ de $41.960 \pm 0.510 \mu\text{m}$. Como se observará más adelante, este valor fue muy superior al obtenido para una suspensión que además contenía los agentes encapsulantes ($17.307 \pm 2.156 \mu\text{m}$) (Tabla 4.3). Este resultado indicó que los polímeros encapsulantes (goma arábica y maltodextrina) tienden a disminuir el tamaño medio de las partículas en suspensión.

La combinación de estos materiales con el tensoactivo permitió obtener suspensiones no sólo con menores tamaños de partícula sino también con una adecuada viscosidad para su posterior procesamiento mediante secado por atomización (Sección 4.3.3. *Viscosidad de las suspensiones a secar*). Por otro lado y como consecuencia del fenómeno de floculación, se observó una alta viscosidad para la suspensión acuosa de fitoesteroles con SDS al 2 % m/v, lo cual provocó inconvenientes durante el proceso de homogeneización.



4.3.3. Viscosidad de las suspensiones a secar

La Figura 4.3 muestra la variación de la viscosidad con la velocidad de deformación para las suspensiones a secar.

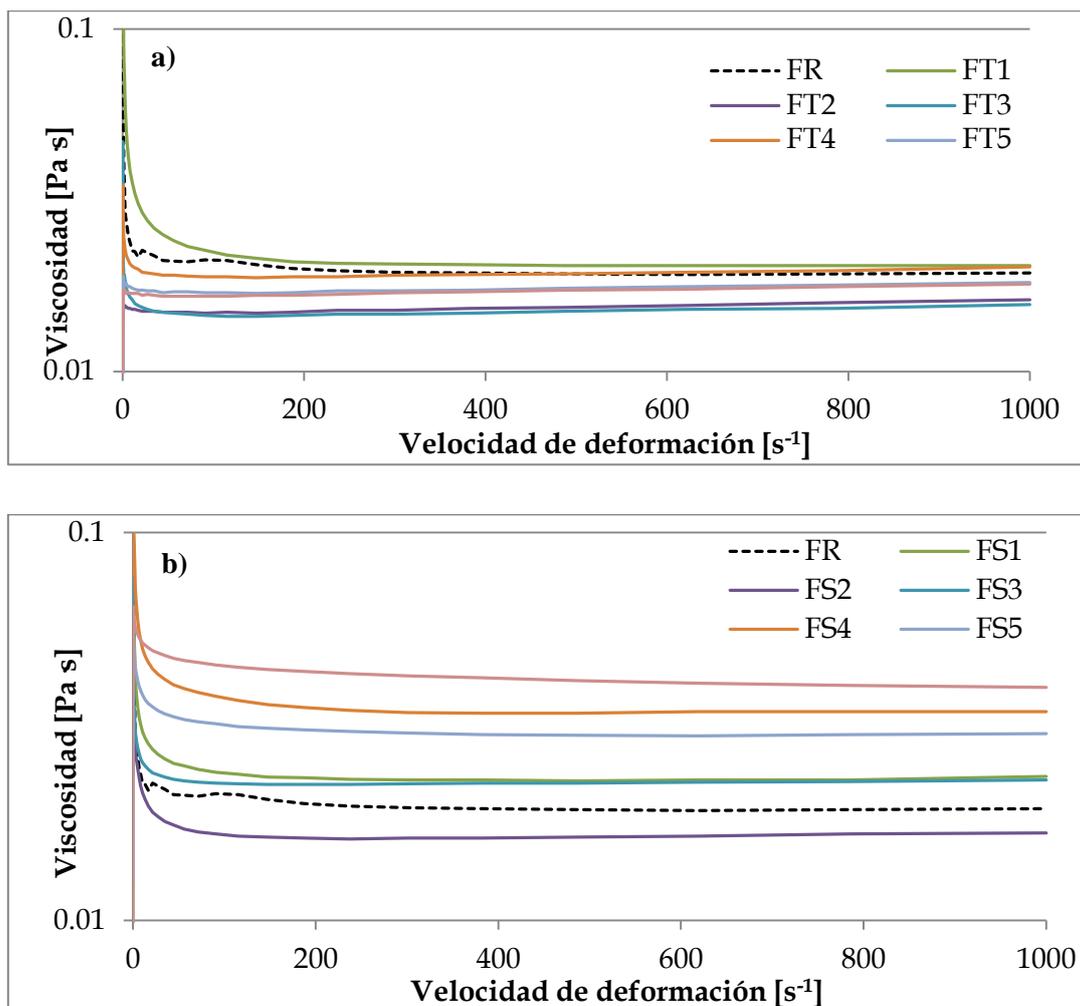


Figura 4.3. Comportamiento reológico de las suspensiones a secar: **a)** de referencia (FR) y con Tween 20 (FT1 a FT6); **b)** de referencia (FR) y con dodecilsulfato de sodio (FS1 a FS6).

La viscosidad permaneció casi constante dentro del rango de velocidades estudiado (0 - 300 s⁻¹), por lo que el modelo newtoniano otorgó una buena descripción



de los datos experimentales (Bird, Stewart & Lightfoot, 2002). Estos resultados pueden ser atribuidos a la presencia de la goma arábica como componente principal de las formulaciones, cuyo comportamiento reológico es newtoniano (Sección 3.3.2.1. *Viscosidad de soluciones de agentes encapsulantes*). Tonon, Grosso & Hubinger (2011) y Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger (2012) observaron tendencias similares en emulsiones de aceite de lino y goma arábica, y en la microencapsulación de aceite de café con goma arábica como agente encapsulante, respectivamente.

La Tabla 4.2 presenta la viscosidad obtenida de ajustar los datos experimentales al modelo newtoniano. En todos los casos, el coeficiente R^2 fue superior a 0.999. Para ambos tensoactivos, su agregado y concentración afectaron significativamente la viscosidad ($p < 0.05$). Para las suspensiones conteniendo Tween 20, la viscosidad se encontró en valores entre 15 y 20 mPa.s, mientras que aquellas basadas en SDS presentaron una viscosidad entre 16 y 41 mPa.s. La viscosidad fue siempre considerablemente inferior al valor máximo admisible, garantizando de esta manera su procesamiento mediante secado por atomización.

Tabla 4.2. Viscosidad de las suspensiones a secar.

Suspensión	Viscosidad* [mPa.s]	Suspensión	Viscosidad* [mPa.s]
FR (referencia)	18.94 ± 0.40 ^c	FR (referencia)	18.94 ± 0.40 ^A
FT1	20.02 ± 0.16 ^d	FS1	22.67 ± 0.31 ^B
FT2	15.11 ± 0.04 ^a	FS2	16.04 ± 0.41 ^A
FT3	14.84 ± 0.17 ^a	FS3	22.44 ± 0.55 ^B
FT4	18.77 ± 0.39 ^c	FS4	32.62 ± 2.27 ^C
FT5	17.21 ± 0.16 ^b	FS5	31.49 ± 1.96 ^C
FT6	16.83 ± 0.22 ^b	FS6	41.30 ± 1.44 ^D

* Diferentes letras en las columnas indican diferencias significativas en la viscosidad ($p < 0.05$).



A pesar de haberse observado algunas fluctuaciones, posiblemente debidas a la formación de espuma (Genovese, 2012), la viscosidad de las suspensiones que incluían SDS mostró una tendencia de aumento con la concentración de tensoactivo (FS1 a FS6). Esto podría ser atribuido al mayor contenido de sólidos disueltos (Tinke, Govoreanu, Weuts, Vanhoutte & De Smaele, 2009), al menor tamaño medio de partículas y a la distribución de tamaño más estrecha (ver Sección 4.3.4. *Distribución de tamaño de partículas en las suspensiones y en el producto secado*) (Barnes, 1994; Genovese, 2012).

4.3.4. Distribución de tamaño de partículas en las suspensiones y en el producto secado

En la Tabla 4.3 se presenta el diámetro medio en volumen $D[4,3]$ para todas las suspensiones estudiadas y sus correspondientes microcápsulas. Además, se incluye el valor promedio de frecuencia acumulada pasante a $25 \mu\text{m}$, tanto para las suspensiones como para sus microcápsulas.

Para ambos tensoactivos, Tween 20 y SDS, el $D[4,3]$ estuvo significativamente afectado por su concentración ($p < 0.05$), tanto en las suspensiones como en las microcápsulas. Para las suspensiones con Tween 20 (FT1 a FT6), el $D[4,3]$ se encontró aproximadamente entre 31.8 y $42.3 \mu\text{m}$, cerca del diámetro medio en volumen de la suspensión de referencia (sin tensoactivo) (FR, $D[4,3] \approx 39.1 \mu\text{m}$). El $D[4,3]$ de las correspondientes microcápsulas (MT1 a MT6) se mantuvo entre 17.7 y $29.5 \mu\text{m}$, también cercano al de las microcápsulas de la suspensión de referencia (MR, $D[4,3] \approx 25.9 \mu\text{m}$).

Por otro lado, las suspensiones conteniendo SDS (FS1 a FS6) y sus correspondientes microcápsulas (MS1 a MS6) presentaron una importante disminución en el $D[4,3]$ a medida que la concentración de tensoactivo aumentaba (*e.g.*, de 39.1 a $17.3 \mu\text{m}$ y de 25.9 a $9.8 \mu\text{m}$, para las suspensiones y las microcápsulas, respectivamente). El menor tamaño medio de partículas provisto por el SDS puede ser atribuido inicialmente a los menores ángulos de contacto. En efecto, y de acuerdo a Tinke *et al.* (2009), un mejor mojado promueve la dispersión del polvo y desagrega los aglomerados existentes. Más aún, un líquido es ideal para dispersar polvos cuando éste



presenta, entre otras características, una baja tensión superficial (Tinke *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008).

Tabla 4.3. Diámetro medio de las suspensiones a secar y de las microcápsulas ya formadas.

	D[4,3] [μm]	$f_{\text{acum}25}$ [%]		D[4,3] [μm]	$f_{\text{acum}25}$ [%]
FR	39.087 \pm 2.271 ^{b,c}	38.1 \pm 1.5 ^{a,b}	MR	25.933 \pm 1.419 ^{c,d}	66.4 \pm 1.7 ^a
FT1	42.307 \pm 0.257 ^c	37.1 \pm 0.6 ^a	MT1	26.193 \pm 0.474 ^{c,d}	68.6 \pm 0.3 ^a
FT2	39.365 \pm 1.165 ^{b,c}	40.9 \pm 2.5 ^{a,b,c}	MT2	23.447 \pm 0.633 ^{b,c}	72.2 \pm 0.7 ^{a,b}
FT3	39.052 \pm 0.421 ^{b,c}	41.4 \pm 0.8 ^{a,b,c}	MT3	22.525 \pm 1.069 ^{b,c}	73.5 \pm 1.4 ^{a,b}
FT4	36.302 \pm 4.212 ^{a,b}	45.4 \pm 4.0 ^c	MT4	20.397 \pm 1.814 ^{a,b}	77.7 \pm 2.5 ^{b,c}
FT5	31.793 \pm 2.986 ^a	52.8 \pm 6.6 ^d	MT5	17.650 \pm 3.858 ^a	82.0 \pm 7.7 ^c
FT6	38.904 \pm 2.141 ^{b,c}	44.3 \pm 2.7 ^{b,c}	MT6	29.537 \pm 0.105 ^d	67.0 \pm 1.1 ^a
	D[4,3] [μm]	$f_{\text{acum}25}$ [%]		D[4,3] [μm]	$f_{\text{acum}25}$ [%]
FR	39.087 \pm 2.271 ^C	38.1 \pm 1.5 ^A	MR	25.933 \pm 1.419 ^D	66.4 \pm 1.7 ^A
FS1	42.086 \pm 0.482 ^C	40.2 \pm 0.4 ^A	MS1	20.232 \pm 3.883 ^C	79.7 \pm 8.1 ^B
FS2	31.287 \pm 1.452 ^B	58.1 \pm 4.2 ^B	MS2	15.294 \pm 0.451 ^{B,C}	87.5 \pm 1.9 ^{B,C}
FS3	30.137 \pm 3.107 ^B	62.7 \pm 4.2 ^B	MS3	13.129 \pm 1.609 ^{A,B}	92.7 \pm 1.8 ^{C,D}
FS4	20.919 \pm 2.284 ^A	76.2 \pm 4.8 ^C	MS4	9.773 \pm 1.120 ^A	96.3 \pm 0.2 ^D
FS5	17.307 \pm 2.156 ^A	81.1 \pm 4.2 ^C	MS5	9.965 \pm 1.297 ^A	97.4 \pm 1.2 ^D
FS6	17.728 \pm 4.092 ^A	81.2 \pm 1.7 ^C	MS6	12.958 \pm 2.903 ^{A,B}	93.7 \pm 1.8 ^{C,D}

* Para cada columna y cada tensoactivo, diferentes letras indican diferencias significativas en el tamaño medio ($p < 0.05$).



Además, en la Figura 4.4 se presenta la distribución de tamaño de partículas de las suspensiones a secar y sus correspondientes microcápsulas. Comparando con la Figura 3.6 se observó que para los fitoesteres tamizados sólo una fracción menor de la población se encontraba por debajo de $25 \mu\text{m}$ (menos de un 8 %); mientras que para la suspensión de referencia (FR, Figura 4.4a) ese porcentaje ascendió a 38 % (Tabla 4.3, valores estimados a partir de las curvas de distribución de frecuencia acumulada no mostradas en esta tesis).

El agregado de tensoactivos redujo aún más el tamaño de las partículas en suspensión. Tomando como ejemplos representativos las formulaciones conteniendo Tween 20 al 2 % (FT5) y SDS al 2 % (FS5), se encontró un 52.8 % de la población de partículas de la suspensión FT5 por debajo de $25 \mu\text{m}$, mientras que la formulación FS5 presentó un 81.1 % de su población por debajo de dicho tamaño límite.

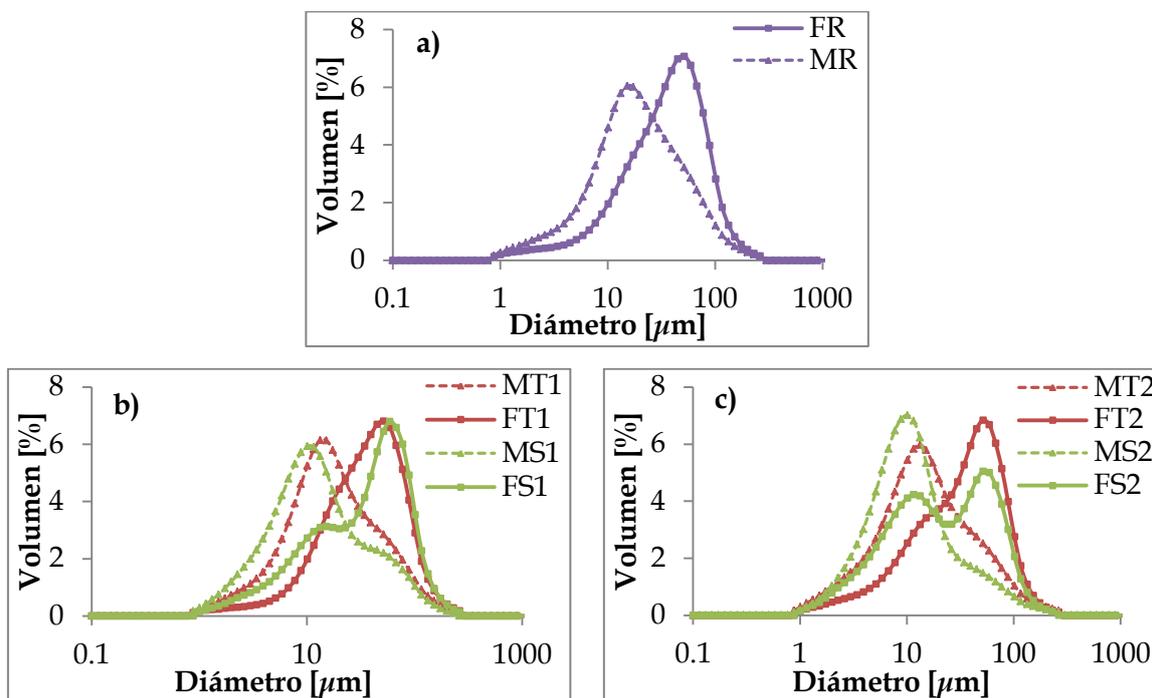


Figura 4.4. Distribución de tamaño de partículas de las suspensiones a secar y sus correspondientes microcápsulas: **a)** sin tensoactivo (FR y MR); **b)** FT1, FS1, MT1, MS1; **c)** FT2, FS2, MT2, MS2; **d)** FT3, FS3, MT3, MS3; **e)** FT4, FS4, MT4, MS4; **f)** FT5, FS5, MT5, MS5; **g)** FT6, FS6, MT6, MS6.

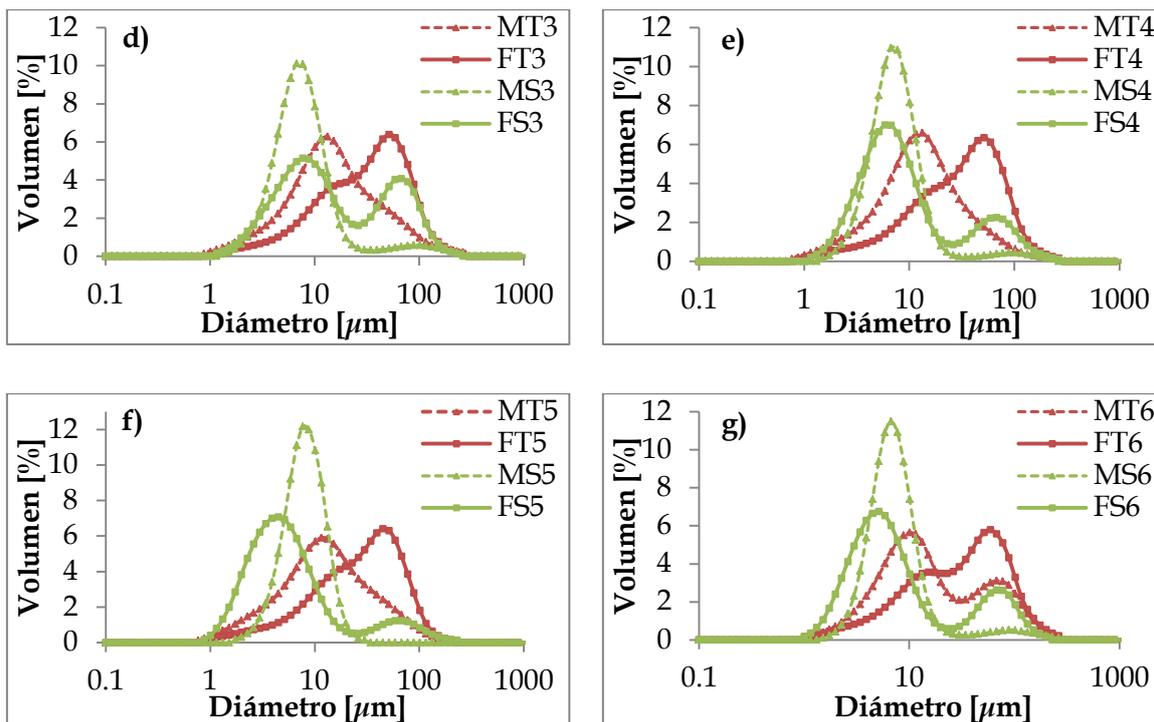


Figura 4.4. (Cont). Distribución de tamaño de partículas de las suspensiones a secar y sus correspondientes microcápsulas: **a)** sin tensoactivo (FR y MR); **b)** FT1, FS1, MT1, MS1; **c)** FT2, FS2, MT2, MS2; **d)** FT3, FS3, MT3, MS3; **e)** FT4, FS4, MT4, MS4; **f)** FT5, FS5, MT5, MS5; **g)** FT6, FS6, MT6, MS6.

Generalmente, el $D[4,3]$ de las microcápsulas fue menor que el tamaño medio de las partículas en suspensión ($p < 0.05$). Este efecto podría ser explicado por el hecho de que las partículas más grandes tienden a colisionar más frecuentemente con las paredes de la cámara de secado que aquellas que tienen menores tamaños.

Como se muestra en la Figura 4.5, para la suspensión de referencia y, a modo de ejemplo, para las formulaciones con 2 % de tensoactivo, este fenómeno se observó en las distribuciones de tamaño de partículas de las suspensiones a secar, sus respectivas microcápsulas y el material colectado de la cámara de secado.

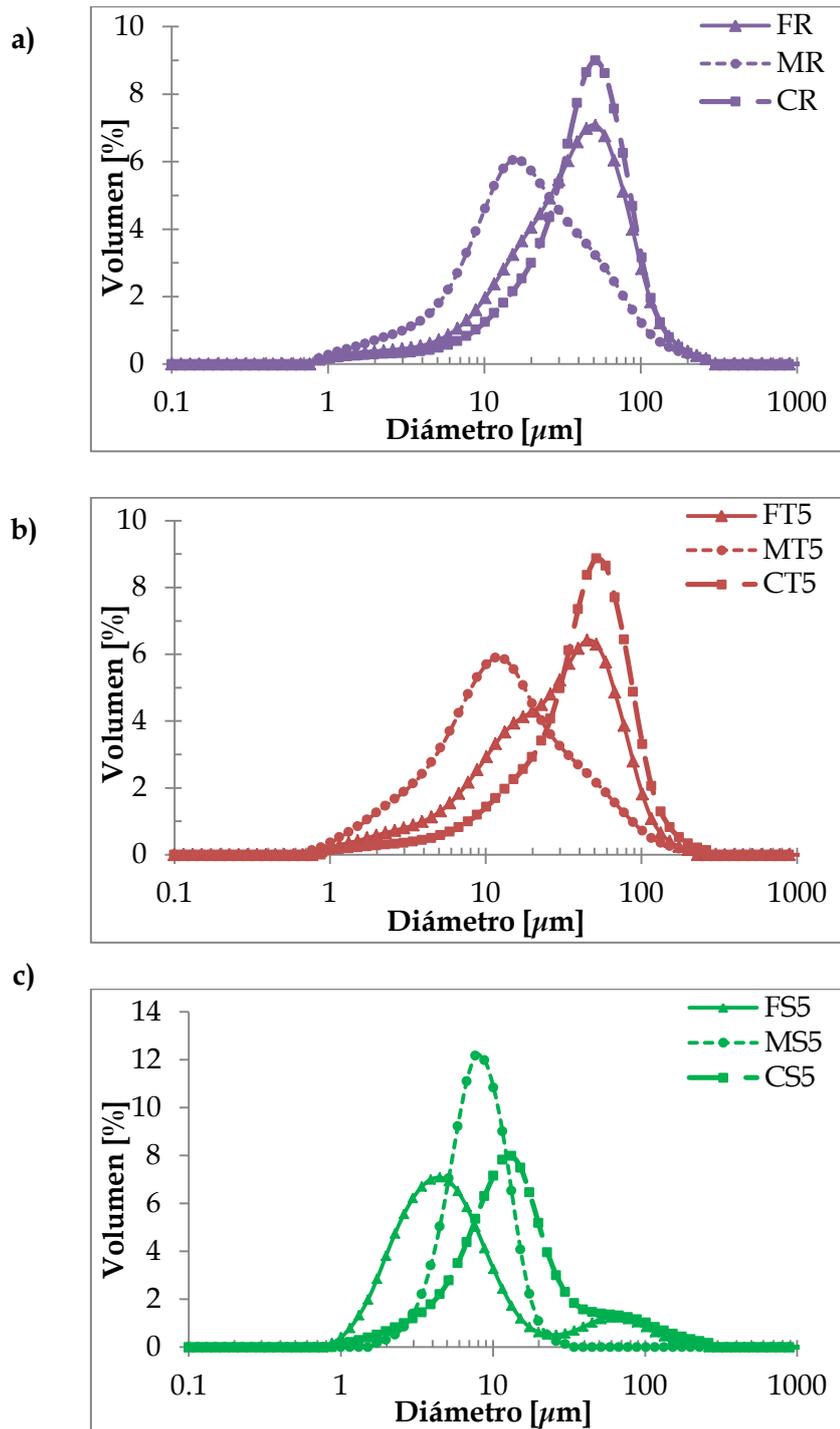


Figura 4.5. Distribución de tamaño de partículas de suspensiones (FR, FT5 y FS5), microcápsulas formadas (MR, MT5 y MS5) y material colectado en la cámara de secado (CR, CT5 y CS5): **a)** FR, MR y CR (material colectado de la cámara); **b)** FT5, MT5 y CT5 (correspondiente al material pegado en la cámara); **c)** FS5, MS5 y CS5 (colectado de la cámara de secado).



En casi todos los productos obtenidos, el D[4,3] satisfizo el límite superior de tamaño más estricto ($25 \mu\text{m}$), el cual garantiza la incorporación de los fitoesteroles en la fase micelar del intestino (Thakkar & Diller, 1975). Por otra parte, para todas las microcápsulas estudiadas, la distribución de tamaño permaneció invariante en el tiempo, indicando una buena redispersabilidad del polvo.

Además, y de acuerdo con la Figura 4.4, las microcápsulas presentaron una distribución de tamaño más estrecha que su correspondiente suspensión a secar. Esto se adjudicó al pegado de la fracción de material grueso sobre la cámara de secado (en efecto, ninguno de los materiales que conformaron las microcápsulas era volátil y por lo tanto no pudo ser perdido por evaporación durante el proceso de secado). Cerca del 66 %, 82 % y 97 % de la población de microcápsulas presentaron un tamaño menor a $25 \mu\text{m}$, para la formulación de referencia (MR), y con 2 % m/v de T20 (MT5) y SDS (MS5), respectivamente.

4.3.5. Morfología de las microcápsulas

La Figura 4.6 muestra las micrografías SEM de las micropartículas obtenidas mediante secado por atomización de los materiales que conforman las microcápsulas (a excepción del T20 que se presenta como líquido a temperatura ambiente), como así también, a modo de ejemplo, de las microcápsulas MR, MT1, MT3, MT5, MS1, MS3 y MS5.

Las micropartículas de goma arábica (Figura 4.6a) y maltodextrina (Figura 4.6b) se mostraron como esferas algo deformadas y dentadas, con una superficie lisa y arrugada, respectivamente; siendo estas morfologías típicas de los polímeros secados por atomización (Tonon *et al.*, 2011). Por otro lado, las micropartículas de SDS secado por atomización se presentaron de forma irregular y considerablemente más pequeñas que las demás (Figura 4.6c). Las partículas de fitoesteroles aparecieron como pequeños cristales parcialmente fundidos, algunos con forma de agujas y otros tipo escamas (Figura 4.6d). Türk, Upper & Hils (2006) encontraron estructuras similares para una mezcla de fitoesteroles, compuesta principalmente por β -sitosterol, estigmasterol y campesterol, al igual que la mezcla comercial utilizada en esta tesis.

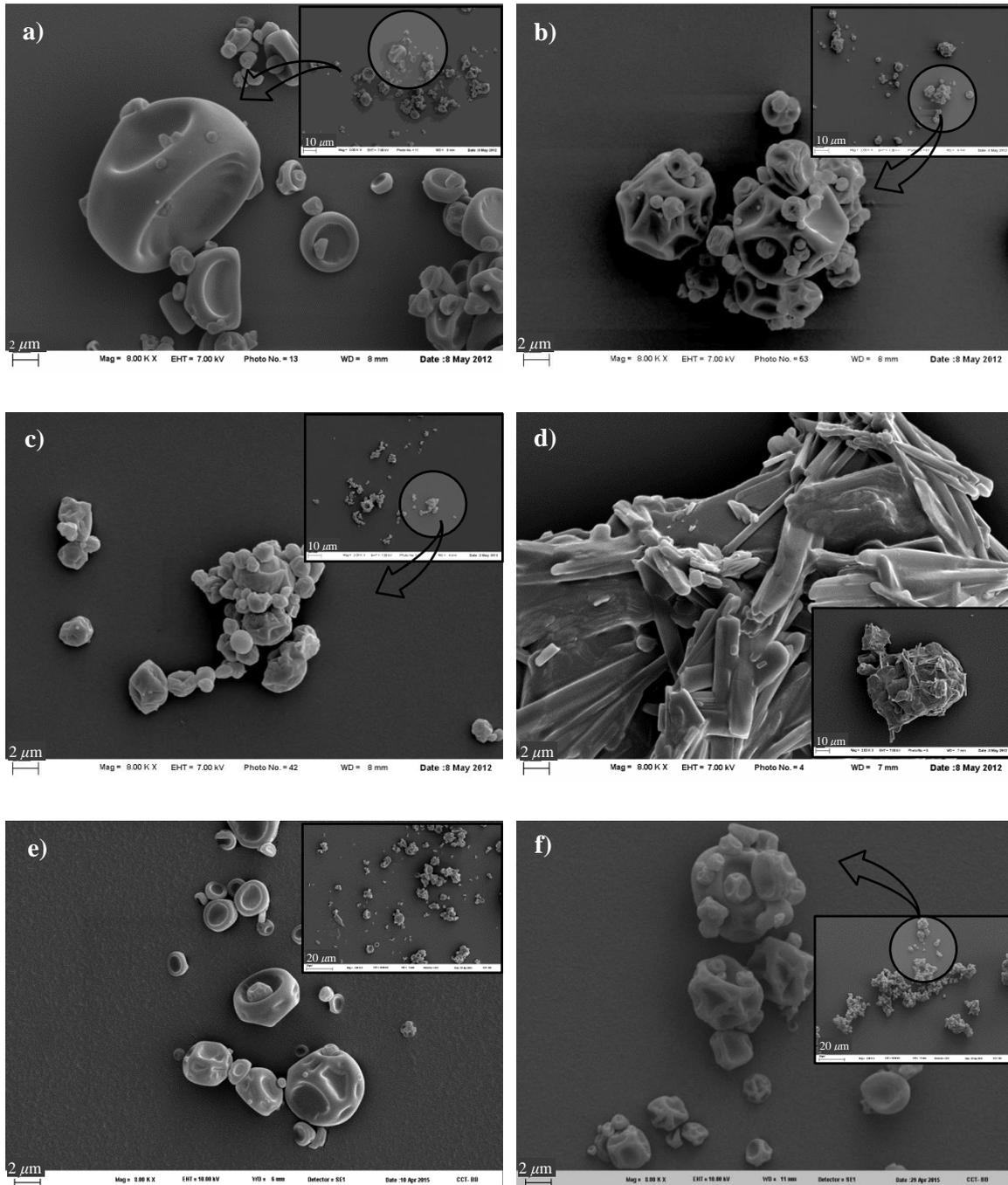


Figura 4.6. Micrografías SEM de las micropartículas y microcápsulas obtenidas (imágenes pequeñas grandes tomadas a 2000X y 8000X, respectivamente): **a)** goma arábiga atomizada; **b)** maltodextrina atomizada; **c)** dodecilsulfato de sodio atomizado; **d)** fitoesteroles atomizados; **e)** microcápsulas de referencia (MR); **f)** microcápsulas MT1; **g)** microcápsulas MT3; **h)** microcápsulas MT5; **i)** microcápsulas MS1; **j)** microcápsulas MS3; **k)** microcápsulas MS5.

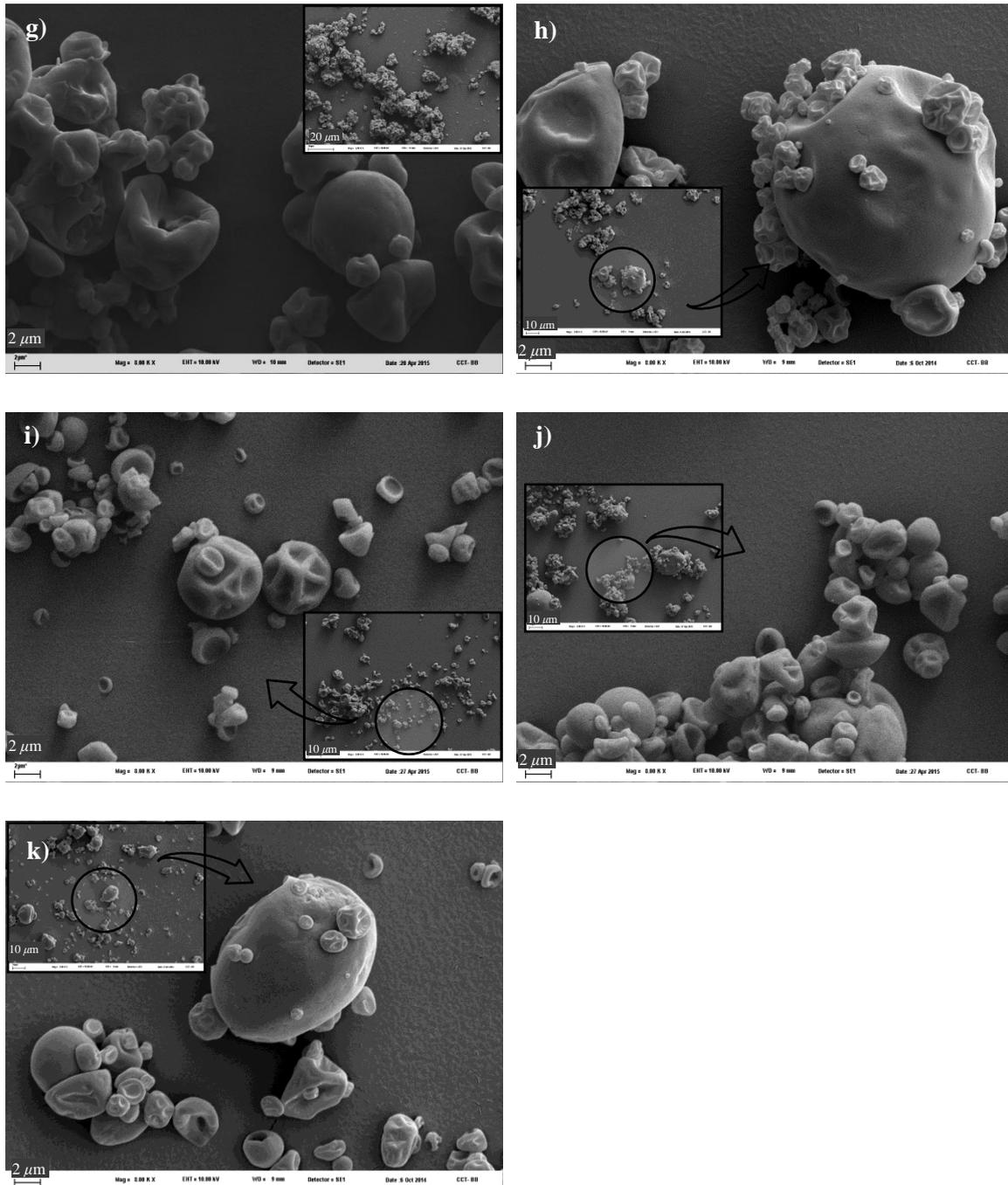


Figura 4.6. (Cont.). Micrografías SEM de las micropartículas y microcápsulas obtenidas (imágenes pequeñas grandes tomadas a 2000X y 8000X, respectivamente): **a)** goma arábiga atomizada; **b)** maltodextrina atomizada; **c)** dodecilsulfato de sodio atomizado; **d)** fitoesteroles atomizados; **e)** microcápsulas de referencia (MR); **f)** microcápsulas MT1; **g)** microcápsulas MT3; **h)** microcápsulas MT5; **i)** microcápsulas MS1; **j)** microcápsulas MS3; **k)** microcápsulas MS5.



Las microcápsulas de referencia (Figura 4.6e) se encontraron aglomeradas y constituidas por partículas con depresiones, mientras que las microcápsulas formadas por las suspensiones que contenían Tween 20 se presentaron principalmente como aglomerados compuestos de partículas con depresiones (Figura 4.6f, Figura 4.6g y Figura 4.6h). La presencia de estos agregados coincide con los tamaños de partículas obtenidos por difracción láser (Figura 4.4 y Figura 4.5).

Por otro lado, las microcápsulas conteniendo SDS se presentaron como esferas lisas más pequeñas (Figura 4.6i, Figura 4.6j y Figura 4.6k). En efecto, y de acuerdo a la distribución de tamaño, las muestras estuvieron mayoritariamente compuestas por partículas pequeñas (Figura 4.4). Es de destacar entonces que la morfología de las microcápsulas estuvo gobernada principalmente por la naturaleza del tensoactivo. Por otra parte, todas las microcápsulas obtenidas presentaron paredes continuas, sin fisuras y grietas aparentes, siendo ésta una característica importante para proveer una buena protección y retención de los fitoesteroles. Más aún, las morfologías fueron claramente diferentes de las de los materiales puros.

4.3.5.1. Estructura interna

La Figura 4.7 muestra, a modo de ejemplo, la estructura interna de una microcápsula obtenida mediante secado por atomización de FS5. Tal como se mencionó en la Sección 2.2.6.2. *Morfología de las microcápsulas*, debido a la dificultad para la preparación de la muestra sólo se presenta el ensayo realizado sobre el producto MS5. La microcápsula de MS5 exhibió una estructura con el centro ahuecado y los cristales de fitoesteroles se encontraron embebidos dentro de la matriz formada por los agentes encapsulantes, de acuerdo con las micrografías SEM de las microcápsulas MS5 (Figura 4.6k).

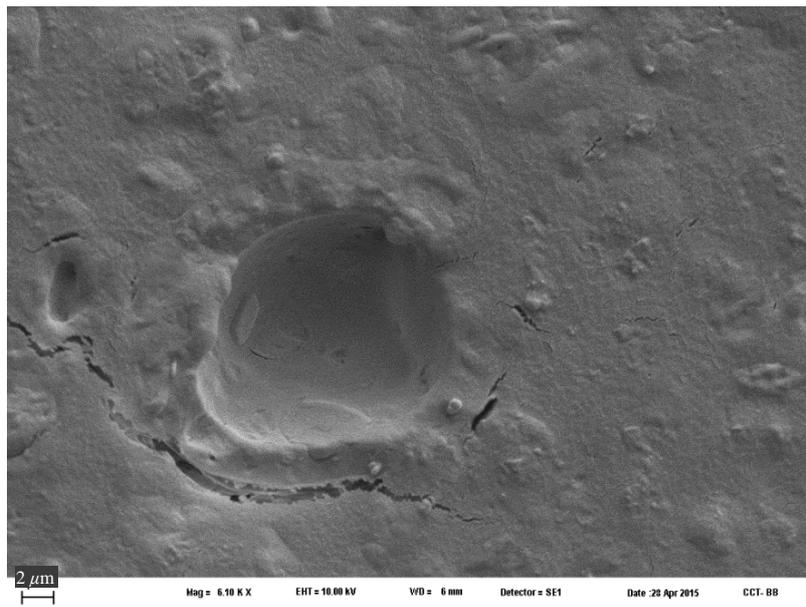


Figura 4.7. Micrografía SEM de la estructura interna de una microcápsula de MS5.

4.3.6. Caracterización sólida de las microcápsulas

Con el objeto de conocer la conformación de las microcápsulas, identificar si existieron interacciones químicas asociadas al proceso de microencapsulación y estimar la estabilidad del producto, se analizaron las microcápsulas por calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico y difracción de rayos X. Los distintos patrones encontrados para las microcápsulas de referencia (MR) y con 2 % m/v de tensoactivo (MT5 y MS5) se muestran en la Figura 4.8.

Respecto al patrón de difracción de rayos X (Figura 4.8a), las microcápsulas presentaron un halo amorfo, característico de los agentes encapsulantes utilizados y acentuado por el proceso de secado por atomización (*APÉNDICE 4.1. Estabilidad de los materiales durante el secado*). En efecto, este halo amorfo fue más intenso en las microcápsulas sin tensoactivo (MR). Por otra parte, el difractograma mostró además los picos característicos de los fitoesteroles, indicando que estos compuestos se encontraban en estado cristalino dentro de la estructura del material. Este fenómeno también fue observado mediante microscopía SEM (Sección 4.3.5. *Morfología de las microcápsulas y 4.3.5.1. Estructura interna*).

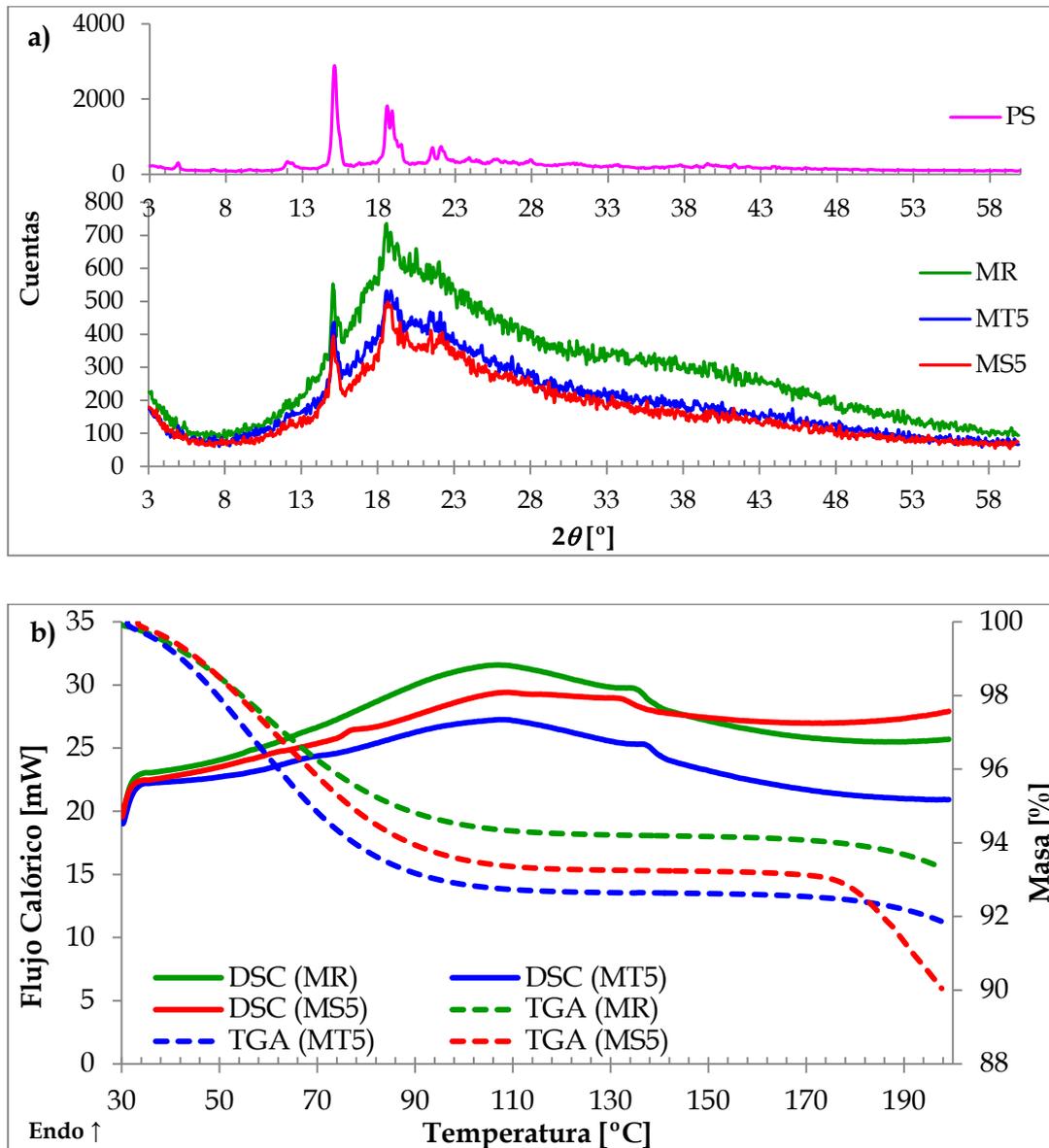


Figura 4.8. Caracterización de las microcápsulas MR, MT5 y MS5: **a)** difractograma de rayos X; **b)** perfil térmico de DSC (trazo continuo) y TGA (trazo punteado).

De la misma manera, el primer calentamiento del perfil DSC de las microcápsulas (Figura 4.8b) demostró una gran absorción de agua por parte de las mismas (típica de los materiales amorfos), junto a los eventos característicos de cada componente. En todos los casos se distinguió el pico de fusión de los fitoesteroles alrededor de 135 °C, señalando nuevamente su naturaleza cristalina dentro de las microcápsulas. Asimismo, durante el segundo calentamiento de las muestras (datos no



mostrados) también se observó el pico de fusión de la fracción de estanoles presentes (en 55 – 60 °C, aproximadamente) que en el primer calentamiento quedó opacado por el flujo calórico asociado a la pérdida de agua. Para MS5, se evidenció además el pico de fusión del SDS alrededor de 80 °C.

La reproducción de los picos cristalinos en las posiciones en que se presentaron para los componentes puros (APÉNDICE 4.1. *Estabilidad de los materiales durante el secado*) indicó que no existieron interacciones fuertes entre los materiales que conformaron las microcápsulas. Corroborando esta hipótesis, la Figura 4.9 presenta a modo de ejemplo el espectro FTIR de las microcápsulas con 2 % m/v de tensoactivo, (MT5 y MS5).

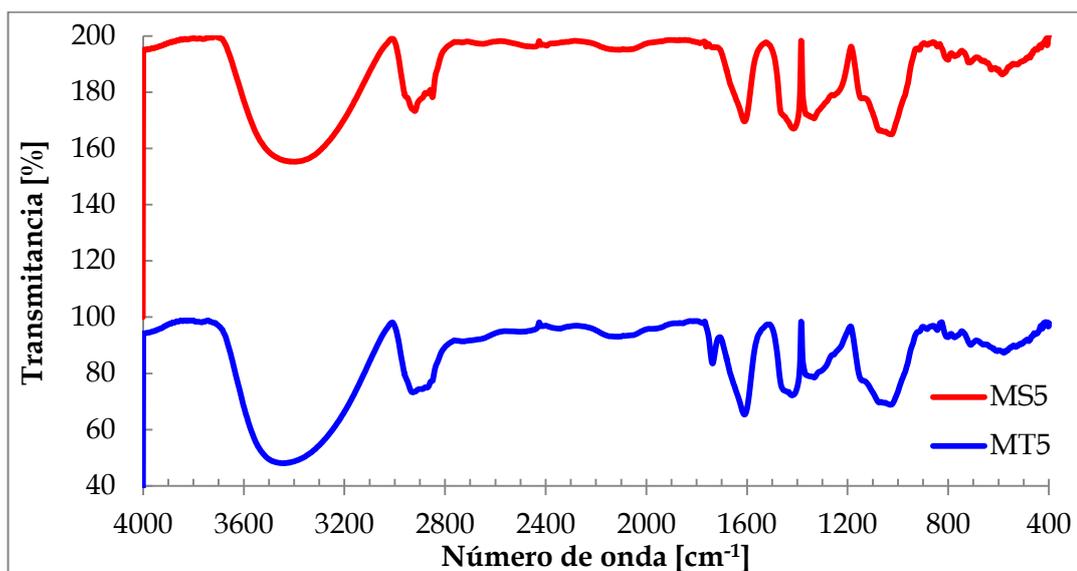


Figura 4.9. Espectroscopía infrarrojo de las microcápsulas MT5 y MS5 (esta última elevada 100 unidades de transmitancia para mejorar la visualización).

Realizando un análisis exhaustivo de los perfiles infrarrojo se podría concluir que no hubo interacción entre los componentes de las muestras. En efecto, no se observó corrimiento de las bandas y las intensidades de las mismas resultaron acordes a la composición aproximada de las microcápsulas. Asimismo, los perfiles obtenidos



para las microcápsulas parecieron ser la conjunción de los espectros individuales de los compuestos puros.

Estos resultados indicarían que las microcápsulas fueron formadas por interacción *física* entre las coberturas y los fitoesteroles y no por alguna interacción química fuerte (Aghbashlo *et al.*, 2012; Gurrapu, Jukanti, Bobbala, Kanuganti & Jeevana, 2012). Krishnaiah, Sarbatly & Nithyanandam (2012) concluyeron que no existía interacción química entre el componente bioactivo de interés y el material de pared al observar que en las microcápsulas aparecían todos los picos de los compuestos que las conformaban.

4.3.7. Rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles

La Figura 4.10 muestra el rendimiento de secado, la eficiencia de encapsulación y la retención de los fitoesteroles en las microcápsulas en función del contenido de tensoactivo en las suspensiones a secar.

De acuerdo a lo esperado, el rendimiento de secado estuvo afectado significativamente por la adición de tensoactivo (Adhikari *et al.*, 2009; Jayasundera, Adhikari, Adhikari & Aldred, 2011), disminuyendo desde 58.24 % (en ausencia de tensoactivo) hasta menos de 50 % cuando los tensoactivos se agregaron en proporciones bajas. Luego de alcanzar este valor mínimo para 0.1 % m/v de tensoactivo, el rendimiento aumentó con la concentración de tensoactivo ($p < 0.05$). Este comportamiento pudo ser explicado en términos de los menores tamaños de partículas en las suspensiones a atomizar.

El incremento en el rendimiento de secado con la concentración de tensoactivo fue más marcado en el caso de las formulaciones conteniendo Tween 20. En efecto, para concentraciones mayores al 1.5 % m/v, el rendimiento sobrepasó el valor obtenido para la formulación de referencia, es decir, sin tensoactivo (FR) y aumento hasta 65 %.



Respecto a las formulaciones conteniendo SDS, a pesar de que el rendimiento se incrementó con la concentración de tensoactivo, sus valores permanecieron por debajo de 58.24 %, es decir, por debajo del rendimiento para la formulación sin tensoactivo.

Para todas las formulaciones estudiadas, el rendimiento de secado fue mayor en presencia de T20, respecto a aquellas conteniendo SDS, como consecuencia de la mayor tensión superficial (Adhikari *et al.*, 2009) y la menor viscosidad de la formulación (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley & Saurel, 2007; Tonon, Brabet & Hubinger, 2008) (Sección 4.3.3. *Viscosidad de las suspensiones a secar*), siendo ambas propiedades comúnmente asociadas a las pérdidas de producto por pegado sobre la cámara de secado (Adhikari *et al.*, 2009). No obstante, todos los rendimientos de secado obtenidos fueron satisfactorios para la escala laboratorio de secaderos por atomización.

La eficiencia de encapsulación y la retención de fitoesteroles también estuvieron afectadas significativamente por la concentración de tensoactivo ($p < 0.05$). La eficiencia de encapsulación decreció desde 20.0 % para la formulación sin tensoactivo (FR) hasta 10.8 % para la formulación conteniendo 0.1 % m/v de Tween 20; mientras que la retención disminuyó desde 22.0 % hasta 18.5 % en el mismo rango de estudio. A concentraciones de T20 mayores, tanto la eficiencia como la retención aumentaron con la concentración de tensoactivo hasta 23.8 % y 32.5 %, respectivamente. Por otra parte, estos dos parámetros de interés aumentaron de forma casi monótona con la concentración de SDS, alcanzando valores máximos de 50.6 % para la eficiencia de encapsulación y 40.8 % para la retención de fitoesteroles.

Para ambos tensoactivos, las variaciones en la eficiencia de encapsulación con la concentración de tensoactivo estuvieron de acuerdo con los comportamientos observados en el ángulo de contacto. En efecto, las mayores eficiencias de encapsulación encontradas en las formulaciones conteniendo SDS (con respecto a aquellas basadas en Tween 20) estuvieron relacionadas con los menores ángulos de contacto, que indicaron una mejor interacción entre los fitoesteroles y las soluciones de agentes encapsulantes incluyendo tensoactivo (Sección 4.3.1. *Mojado de los fitoesteroles por parte de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo*).

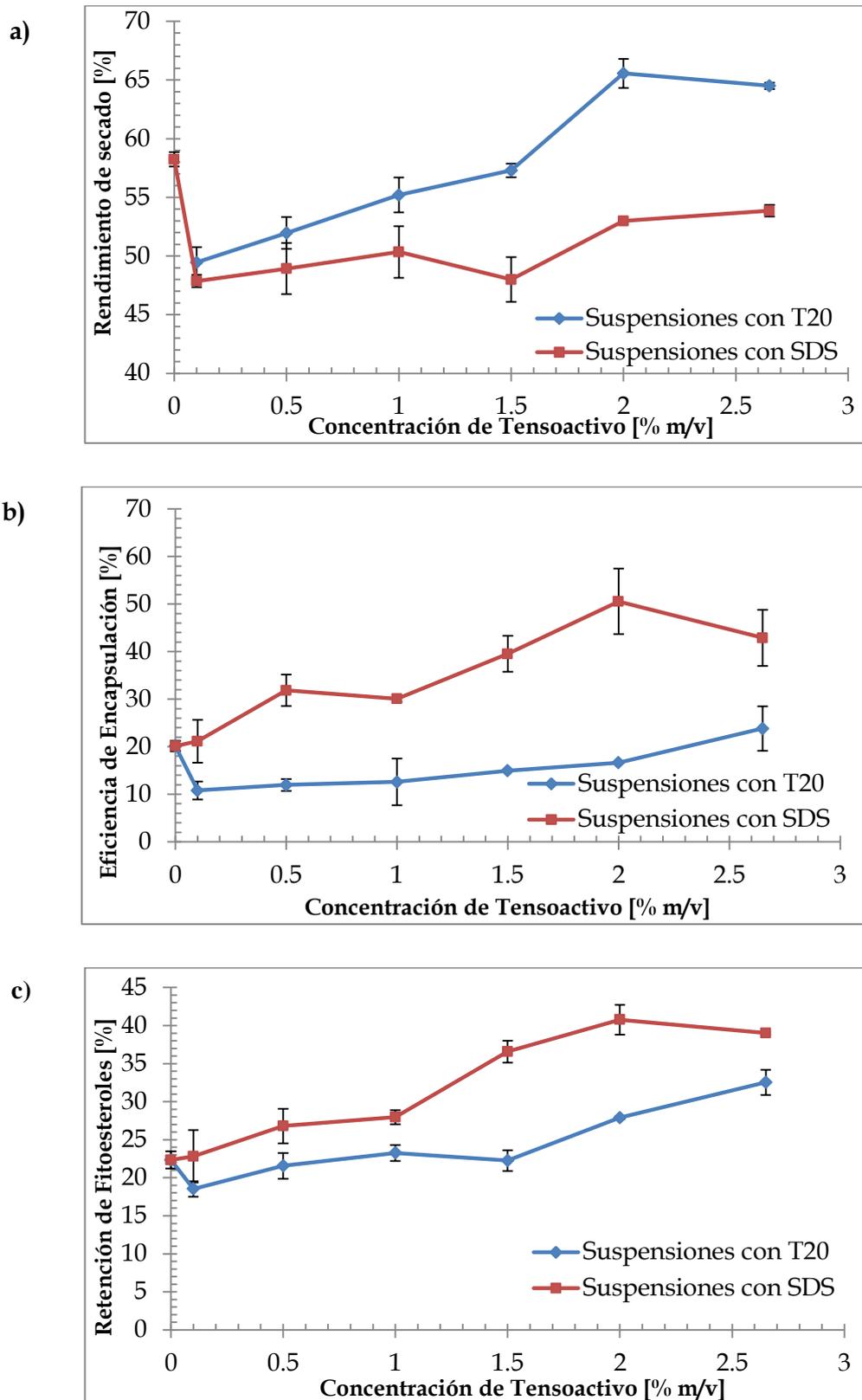


Figura 4.10. Influencia de la concentración de tensoactivo en: a) rendimiento de secado; b) eficiencia de encapsulación; c) retención de fitoesteroles.



Por otro lado, los menores tamaños de partículas en las suspensiones que incluyeron SDS (Tabla 4.3 y Figura 4.4) favorecieron el proceso de encapsulación. En efecto, para el secado por atomización de emulsiones aceite/agua, diversos autores reportaron altas eficiencias de encapsulación para tamaños de gotas en la emulsión pequeños (Frascareli *et al.*, 2012; Jafari, Assadpoor, Bhandari & He, 2008; Soottitantawat *et al.*, 2005; Tonon *et al.*, 2011).

A pesar de los menores rendimientos de secado, la retención de los fitoesteroles fue mayor en las microcápsulas conteniendo SDS (en comparación a aquellas compuestas de Tween 20) debido a la mayor eficiencia de encapsulación. Una mayor eficiencia de encapsulación indica que existió una menor cantidad de fitoesteroles libres y, entonces, una menor probabilidad de pérdida de fitoesteroles por pegado sobre las paredes de la cámara de secado.

4.3.8. Redispersabilidad

En la Tabla 4.4 se presentan los tiempos requeridos para dispersar el polvo de microcápsulas de todas las muestras ensayadas en agua. Este tiempo, se determina cuando la dispersión es completa y no se observa la presencia de aglomerados. En la mayoría de los casos, fue entre 1 y 3 minutos, tiempo comparable al obtenido para la mayoría de los productos comerciales redispersables.

Asimismo, cabe destacar que las distribuciones de tamaño de partícula de estas muestras permanecieron invariantes por al menos 30 minutos luego de la redispersión, asegurando así que el tiempo de dispersión medido es confiable y que el producto no sufrió cambios de tamaño durante ese período. Adicionalmente, como un indicador de la estabilidad de las redispersiones, se midió el potencial Z y se encontró que en el caso de las microcápsulas conteniendo Tween 20, este valor estuvo entre -21.7 y -26.5 mV. Este parámetro, estuvo entre -31.3 y -37.8 mV para las microcápsulas redispersas conteniendo SDS, por lo que se espera que sean más estables en el tiempo, debido a la mayor repulsión entre las partículas dispersas (Salopek, Krasic & Filipovic, 1992).



Tabla 4.4. Tiempos de redispersión de las microcápsulas de fitoesteroles.

Muestra	Tiempo requerido para redispersión [s]	Muestra	Tiempo requerido para redispersión [s]
MR	186 ± 15		
MT1	144 ± 6	MS1	127 ± 12
MT2	111 ± 10	MS2	134 ± 18
MT3	173 ± 7	MS3	162 ± 14
MT4	122 ± 25	MS4	114 ± 9
MT5	148 ± 15	MS5	116 ± 7
MT6	89 ± 9	MS6	141 ± 23

4.4. Conclusiones

Se estudió el efecto del agregado de tensoactivo a las formulaciones conteniendo goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes para la microencapsulación de fitoesteroles. En particular se evaluó el uso de Tween 20 y dodecilsulfato de sodio en bajas concentraciones (0.1 a 2.65 % m/v).

En este contexto, se observó un efecto significativo del tipo y concentración de tensoactivo sobre el rendimiento de secado, la eficiencia de encapsulación, la retención de los fitoesteroles y la calidad de las microcápsulas producidas. Todas las tendencias observadas estuvieron bien correlacionadas con las propiedades de las suspensiones estudiadas (viscosidad de las suspensiones, tamaño de partículas de la fase dispersa, mojado de los fitoesteroles por parte de las soluciones de agentes encapsulantes y tensoactivo, etc.).

Aunque se obtuvieron mejores rendimientos de secado utilizando Tween 20 en las formulaciones, la adición de dodecilsulfato de sodio suministró mayores y satisfactorias eficiencias de encapsulación y retención de fitoesteroles. Además, condujo a menores tamaños de partículas y a rendimientos de secado adecuados para secaderos de escala laboratorio.



La mejora en la performance provista por el SDS (con respecto al T20) fue explicada en términos de la buena afinidad entre los fitoesteroles y las soluciones de agentes encapsulantes. Para todas las formulaciones conteniendo SDS, los diámetros medios en volumen de las microcápsulas satisficieron el límite superior más estricto de 25 μm , requerido para asegurar la incorporación de los fitoesteroles en la fase micelar del intestino.

La mejor formulación, dentro del rango de concentración de tensoactivos estudiado, fue aquella comprendiendo un 2 % de dodecilsulfato de sodio. Esto se demostró no sólo en el tamaño de las microcápsulas obtenidas sino también en la eficiencia de encapsulación y la retención de fitoesteroles (cercana a 50 % y 40 %, respectivamente). El rendimiento de secado estuvo sobre 50 %, siendo un valor aceptable para la escala laboratorio del secadero utilizado.

Por otra parte, la caracterización de las microcápsulas obtenidas no evidenció interacciones fuertes entre los materiales que las componen; indicando que los fitoesteroles se encontraron disponibles en su estado original dentro de las microcápsulas. Tampoco se observaron cambios químicos (degradación) en los materiales utilizados, lo cual garantiza su estabilidad bajo las condiciones operativas utilizadas. Asimismo, se logró la redispersión de las microcápsulas de manera satisfactoria, asegurando una estabilidad electrocinética moderada, con ausencia de variaciones en el tamaño de las partículas durante 30 minutos.

Algunos resultados de este capítulo fueron presentados en las siguientes publicaciones y/o trabajos a congreso:

- *Influencia del contenido y tipo de tensoactivo en la microencapsulación de fitoesteroles.* Di Battista C.A., Constenla D., Piña J., Ramírez Rigo M.V. IV Congreso Internacional en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina, 14 a 17 de noviembre de 2012. Trabajo completo en libro ISBN 978-950-33-1071-7.



- *Estudio térmico en microcápsulas de fitoesteroles.* Di Battista C.A., Constenla D., Ramírez Rigo M.V. y Piña J. XV Congreso Latinoamericano y Exhibición de Grasas y Aceites. Santiago de Chile, Chile, 20 a 23 de agosto de 2013. Resumen 272827.
- *Microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).* Di Battista, C.A.; Constenla, D.; Piña, J. Ramírez Rigo, M.V. XXI Congreso Farmacéutico Argentino. Salta, Argentina, 3 a 5 de octubre del 2013. Resumen en CD-ROM I&D 44.
- *The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying.* Carla Agustina Di Battista; Diana Constenla; Verónica Ramírez-Rigo; Juliana Piña. Powder Technology. Doi:10.1016/j.powtec.2015.08.016.



Capítulo V

**DISEÑO DE SUPERFICIE DE
RESPUESTA y OPTIMIZACIÓN**



CAPÍTULO 5. DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA y OPTIMIZACIÓN

5.1. Introducción

5.1.1. Metodología de superficie de respuesta. Diseños Box - Behnken

Con frecuencia, en los experimentos de ingeniería se requiere encontrar las condiciones bajo las cuales ciertos procesos conducen a resultados óptimos, es decir, determinar los niveles de los parámetros de diseño en los cuales la respuesta de interés alcanza su punto óptimo (valor mínimo, máximo u objetivo según sus requerimientos) (Raissi & Farsani, 2009).

El uso de diseños de experimentos permite la evaluación simultánea de varios factores, evitando la realización de numerosas corridas independientes que caracteriza a la tradicional aproximación paso a paso (Elmizadeh *et al.*, 2013; Liu, Wang, Schlindwein & Li, 2013; Xu *et al.*, 1998). Los procedimientos de optimización sistemática se pueden llevar a cabo seleccionando una función objetivo, encontrando los factores más importantes o contribuyentes a dicha función e investigando la relación entre factores y respuestas (Liu *et al.*, 2013). Entre las estrategias de optimización, una de las más destacadas es la optimización por metodología de superficie de respuesta (RSM) (Lundstedt *et al.*, 1998).

Esta metodología abarca un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas, útiles para modelar y analizar problemas en los cuales la respuesta de interés (variable de salida) está influenciada por muchos factores (variables de entrada) y el objetivo planteado es su optimización (Balasubramani, Viswanathan & Vairamani, 2013; Liu *et al.*, 2013; Montgomery, 1991; Raissi & Farsani, 2009). Dichos modelos se pueden construir a partir de experiencias físicas, computacionales (simulaciones) u observaciones experimentales (Raissi & Farsani, 2009). La principal ventaja de la RSM es el desarrollo de productos y procesos mejorados en costo y tiempo (Balasubramani



et al., 2013). El procedimiento para un diseño de superficie de respuesta puede contemplar algunas de las siguientes etapas (Raissi & Farsani, 2009):

- I. Diseño de la serie de experiencias para la medición de la respuesta de interés.
- II. Desarrollo de un modelo matemático para la respuesta.
- III. Búsqueda del conjunto de parámetros experimentales que conduce al óptimo de la respuesta de interés.
- IV. Representación de los efectos de los parámetros sobre la respuesta de interés.

Existen diversos tipos de diseños de experimentos para ajustar superficies de respuesta. En particular, en el año 1960, Box y Behnken propusieron algunos diseños de tres niveles (es decir, tres valores donde se evalúa cada variable de entrada o factor), combinando factoriales 2^k (donde 2 representa el número de niveles y k el número de factores estudiados) con diseños de bloques incompletos (Montgomery, 1991). En un diseño factorial la influencia de todos los factores y los efectos de interacción entre ellos son estudiados para cada una de las respuestas de interés. En este sentido, si k factores son estudiados en 2 puntos experimentales (llamados niveles), se requiere realizar un conjunto de 2^k ensayos (Liang, Zhiyong; Wang, 2004). Los diseños de experimentos por bloques son aquellos que se analizan de manera fraccionada en porciones (bloques) más homogéneas de material, cuyo análisis permite incrementar la precisión del experimento. Son bloques completos cuando todos los tratamientos o ensayos son probados en cada bloque, e incompletos cuando esto no sucede (Montgomery, 1991).

Una ventaja significativa de los diseños Box – Behnken es que suelen ser más eficientes, en términos del número de corridas requerido, en comparación con otros diseños de superficie de respuesta como los centrales compuestos (que se basan en diseños factoriales e incluyen puntos experimentales en el centro de cada factor y en posiciones axiales, Montgomery (1991), los factoriales de 3 niveles y los diseños D - Óptimos (diseños generalmente utilizados cuando los tradicionales no pueden ser aplicados) (Govender *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013). A su vez, tienen la ventaja adicional de ser rotables (o casi rotables) (Govender *et al.*, 2005; Montgomery, 1991; Zidan *et al.*, 2007).



La rotabilidad es una propiedad muy importante en la selección de un diseño de superficie de respuesta porque proporciona estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones. Dado que la finalidad de la metodología RSM es la optimización, y que se desconoce de antemano la ubicación del óptimo, tiene sentido usar un diseño que sea rotable (Montgomery, 1991).

En un diseño Box - Behnken de 3 factores no se observan puntos en los vértices de la región cúbica creada por los límites inferior y superior de cada variable, sino en la mitad de cada una de las aristas (Figura 5.1) (Montgomery, 1991; Zidan *et al.*, 2007). Esto podría ser ventajoso cuando los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones factor - nivel prohibitivamente costosas o imposibles de probar debido a restricciones físicas del proceso (Govender *et al.*, 2005; Montgomery, 1991). La representación gráfica de un diseño Box - Behnken de más de 3 factores resulta más compleja; sin embargo, la distribución de los puntos experimentales resulta equivalente a la presentada en la Figura 5.1.

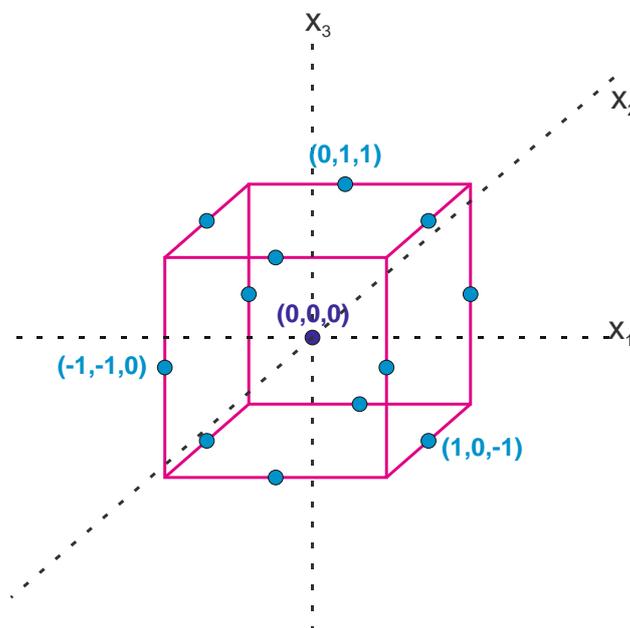


Figura 5.1. Combinación de niveles para 3 factores en un diseño Box - Behnken.



Si todos los factores son medibles, la superficie de respuesta (Y') se puede expresar como:

$$Y' = f(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad (5.10)$$

donde k representa el número total de factores analizados (X) que pueden ser ajustados e Y' la variable de respuesta ajustada cuyo objetivo es ser optimizada (Raissi & Farsani, 2009). Una vez obtenida la función Y' que mejor representa los datos experimentales, ésta se puede optimizar (minimizar, maximizar o ajustar a un valor deseado, según sea el objetivo de la respuesta) para encontrar las condiciones experimentales que conducen a los mejores resultados.

La optimización del proceso de microencapsulación de secado por atomización mediante la metodología de superficie de respuesta ha sido abordada por diversos autores (Kha, Nguyen, Roach & Stathopoulos, 2014; Lee, Ahn & Kwak, 2013; Liu & Yang, 2011; Pauletti & Amestoy, 1999). Sin embargo el uso de diseños tipo Box - Behnken no ha sido muy explorado. En este sentido, Balasubramani *et al.* (2013) encapsularon oleorresina de ajo y utilizaron este tipo de diseño para optimizar el contenido de alicina y la humedad del producto mediante la manipulación de la concentración del material de cobertura y del ingrediente activo así como también de la temperatura del aire de secado. Por su parte, Tontul & Topuz (2014) encapsularon aceite de lino mediante secado por atomización y utilizaron este diseño para encontrar las concentraciones de material de cobertura y de aceite y el tiempo de ultrasonido que maximizan la eficiencia de encapsulación y el rendimiento de secado.

5.1.2. Optimización global: Deseabilidad individual (d) y global (D)

En muchos casos, la performance de un producto manufacturado puede no ser caracterizada por una única respuesta, sino por un grupo de ellas, que pueden o no estar correlacionadas. A su vez, cada una de estas respuestas suele estar determinada en unidades y escalas de medición diferentes, por lo que pueden estar sujetas a



diferentes requerimientos de optimización. En estas circunstancias resulta difícil alcanzar una optimización global del sistema, en la cual un único conjunto de condiciones optimicen simultáneamente todas las respuestas.

Este tipo de optimización simultánea (global) ha sido abordada mediante muchas metodologías heurísticas que combinan los requerimientos individuales de cada respuesta en un único requerimiento compuesto (Raissi & Farsani, 2009). En este contexto, en el año 1965 Harrington desarrolló la *función deseabilidad* para optimizar de manera simultánea las múltiples respuestas, la cual fue luego modificada para mejorar su practicidad (Kuhn, 2009; Raissi & Farsani, 2009). La estrategia de la función deseabilidad es una de las técnicas de optimización multi-respuesta más utilizadas.

El primer paso para la optimización con esta metodología consiste en transformar cada una de las funciones de superficie de respuesta (Y_i') en su correspondiente función deseabilidad individual (d_i), para luego combinarlas y formar la función deseabilidad global (D) como único objetivo de optimización.

5.1.2.1. Función deseabilidad individual (d)

Una vez establecida la función de superficie de respuesta (Ecuación (5.10)), la deseabilidad individual de esa respuesta se puede construir de forma tal que tome el valor 1 cuando se alcanza el nivel deseado de la respuesta (ya sea mínimo, máximo u objetivo) y que tienda a 0 cuando se aleja de este valor (Kuhn, 2009). De este modo, se pueden proponer tres formas diferentes de la función deseabilidad (d) en función del objetivo de optimización ($d_{\text{mín}}$, $d_{\text{máx}}$, d_{obj}) (Kuhn, 2009). En los casos que se busca *maximizar* la función variable de respuesta, se define $d_{\text{máx}}$ tal que:

$$d_{\text{máx}} = \begin{cases} 0 & \text{Si } Y' < L \\ \left(\frac{Y' - L}{U - L}\right)^s & \text{Si } L < Y' < U \\ 1 & \text{Si } Y' > U \end{cases} \quad (5.11)$$



donde L y U son los límites inferior y superior del intervalo donde se desea que se encuentre la respuesta, independientemente del objetivo de optimización, respectivamente. El peso s establece la linealidad de la función deseabilidad con respecto al modelo. Por otro lado, en los casos en que Y desea ser *minimizada*, la deseabilidad se define como d_{min} tal que:

$$d_{min} = \begin{cases} 0 & \text{Si } Y' > U \\ \left(\frac{Y' - U}{L - U}\right)^s & \text{Si } L < Y' < U \\ 1 & \text{Si } Y' < L \end{cases} \quad (5.12)$$

Finalmente, cuando se busca que la variable de respuesta tenga un valor específico (t^*), su función deseabilidad se define como d_{obj} , tal que tome el valor 1 en ese punto y se definen nuevas expresiones a ambos lados del punto objetivo:

$$d_{obj} = \begin{cases} \left(\frac{Y' - L}{t^* - L}\right)^{s_1} & \text{Si } L < Y' < t^* \\ \left(\frac{Y' - U}{t^* - U}\right)^{s_2} & \text{Si } t^* < Y' < U \\ 0 & \text{En cualquier otro caso} \end{cases} \quad (5.13)$$

En todos los casos, fuera del intervalo $L - U$ la deseabilidad se anula (Raissi & Farsani, 2009). Los valores de s , s_1 y s_2 se eligen de acuerdo a la facilidad o dificultad con la que se satisfacen las condiciones. Un valor de $s = 1$ establece una relación lineal entre la función ajustada de la respuesta y la deseabilidad. Cuando se desea penalizar las situaciones en las que la función ajustada se aleja del óptimo, se debe considerar un valor de $s > 1$, de modo que la deseabilidad caiga abruptamente a medida que las condiciones se alejan del óptimo. Finalmente, un valor de $s < 1$ se aplica en una



situación más flexible, es decir cuando se espera que la deseabilidad se encuentre cercana a 1 aún en lejanías de los puntos óptimos (ver Figura 5.2).

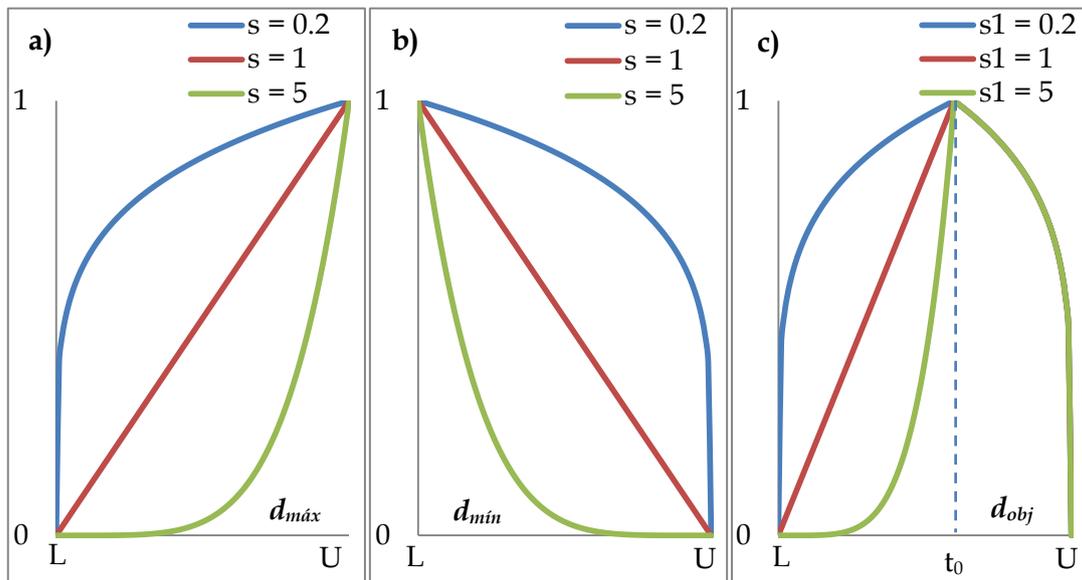


Figura 5.2. Funciones deseabilidad. Se desea que la respuesta de interés alcance: a) un valor máximo ($d_{m\acute{a}x}$); b) un valor mínimo ($d_{mín}$); c) un valor objetivo (d_{obj}) (para cada s_1 , el $s_2 = 0.2$, por lo que desde t^* hasta U las curvas quedan superpuestas).

5.1.2.2. Función deseabilidad global (D)

Una vez establecida la función deseabilidad para cada una de las respuestas de interés, éstas pueden ser combinadas para formar una única función deseabilidad compuesta (o global) que convierte el problema multi-respuesta en uno de respuesta simple (Raissi & Farsani, 2009; Vera Candiotti, De Zan, Cámara & Goicoechea, 2014). La función deseabilidad global (D) se define como la media geométrica de las deseabilidades individuales (d_i) (Kuhn, 2009; Raissi & Farsani, 2009), tal que:

$$D = \left(\prod_i^n d_i \right)^{1/n} \quad (5.14)$$



donde n es el número total de respuestas involucradas. Así, si todas las características de calidad alcanzan su valor ideal, la deseabilidad es 1 para todas las respuestas individuales ($d_i = 1$ para toda i); si alguna respuesta no alcanza su valor ideal, su deseabilidad es menor a 1, por lo tanto la global también lo es; y si alguna de las respuestas cae fuera de los requerimientos de calidad, su deseabilidad es 0 y entonces la deseabilidad total también es nula (Raissi & Farsani, 2009).

Eventualmente, se puede incorporar un factor en cada término de la productoria llamado *coeficiente de impacto* (I_i) que contemple la importancia de una respuesta sobre las demás (Vera Candiotti *et al.*, 2014). Dicho valor suele establecerse entre 1 y 5. De esta forma, la función deseabilidad global puede ser escrita como:

$$D = \left(\prod_i^n d_i^{I_i} \right)^{1/\sum I_i} \quad (5.15)$$

El proceso de optimización global consiste entonces en encontrar las condiciones de operación/formulación que conducen a un máximo valor de deseabilidad global, que puede ser resuelto mediante técnicas computacionales.

Tanto las deseabilidad individuales, como la global pueden calcularse también para los datos experimentales, cambiando la función Y' por su valor experimental Y . De esta manera, se obtiene un valor de deseabilidad para cada punto ensayado.

A lo largo del Capítulo IV se estudió la microencapsulación de los fitoesteroles manteniendo todas las variables operativas en valores preestablecidos y modificando el tipo de surfactante y su concentración en la suspensión. En este capítulo se presenta un diseño de experimentos tipo Box - Behnken, realizado con el objeto de evaluar y optimizar los efectos principales, de interacción y cuadráticos, de las variables de proceso y de la composición de la formulación sobre las respuestas más relevantes de la microencapsulación de los fitoesteroles.



5.2. Desarrollo Experimental

5.2.1. Diseño Box - Behnken. Formulación y Secado

El diseño experimental Box-Behnken contempló 6 factores evaluados en 3 niveles (Tabla 5.1) para facilitar la construcción de modelos polinómicos de segundo orden y la exploración de superficies de respuesta cuadráticas para su posterior optimización (Liu *et al.*, 2013).

La Tabla 5.1 muestra los factores estudiados y sus niveles en el diseño Box - Behnken propuesto. Se estudiaron la temperatura de secado ($^{\circ}\text{C}$), el caudal de aire de atomización expresado como la altura del rotámetro (mm), el caudal de alimentación líquida expresado en función del porcentaje de apertura de la bomba peristáltica (%), el contenido de fitoesteroles y de sólidos totales (g/100 mL), y la relación másica entre el contenido de goma arábica y maltodextrina. En todos los casos, el caudal de aire de secado se mantuvo en 35 - 38 m^3/h , correspondiente a la aspiración máxima (100 %). En el APÉNDICE 2.1. *Características Técnicas del secadero Büchi B - 290* se presentan las tablas y gráficas de conversión de los parámetros de secado (caudal de atomización (Tabla A.2.1), caudal de alimentación líquida (Figura A.2.1) y caudal de aire de secado (Figura A.2.2). Para cada factor, los niveles bajo, medio y alto, codificados como (-), (0) y (+) respectivamente, fueron seleccionados en base a la experiencia preliminar.

La Tabla 5.1 muestra, además, las respuestas a analizar, inicialmente elegidas en función de los fines de la microencapsulación. También se muestra el objetivo de optimización de cada respuesta (búsqueda del valor máximo, mínimo u objetivo). Además, se tuvieron en cuenta otros aspectos durante el procesamiento de las muestras. En efecto, para todas las experiencias, se registró la temperatura de salida y se colectó el material depositado sobre la cámara de secado.



Tabla 5.1. Factores y niveles en el diseño Box - Behnken y principales respuestas de interés analizadas en el diseño.

Factores Independientes	Niveles			Unidades
	Bajo (-)	Medio (0)	Alto (+)	
X_1 : Temperatura de secado ($T_{entrada}$)	110	135	160	°C
X_2 : Caudal de aire de atomización (Q_{atom})	30	45	60	mm
X_3 : Caudal de alimentación líquida (Q_{bomba})	5	10	15	%
X_4 : Contenido de FE ($Cont_{FE}$)	2	5	8	g/100 mL
X_5 : Contenido de sólidos totales ($Cont_{sólTot}$)	15	25	35	g/100 mL
X_6 : Relación GA a MD (GA/MD)	1/19	9.5263	19/1	-

Respuestas Dependientes	Unidades	Óptimo
Y_1 : Rendimiento de Secado (RS)	%	Máximo
Y_2 : Tamaño de Partícula - Suspensión ($D[4,3]_{Susp}$)	μm	Mínimo
Y_3 : Tamaño de Partícula - Producto ($D[4,3]_{Part}$)	μm	Mínimo
Y_4 : Humedad Residual (HR)	%	Mínimo
Y_5 : Retención de Fitoesteroles (RFE)	%	Máximo
Y_6 : Eficiencia de Encapsulación (EE)	%	Máximo
Y_7 : Índice de Carr (IC)	%	Mínimo

El diseño estableció un total de 54 experimentos, de las cuales 6 constituyeron repeticiones del punto central para la estimación del error experimental (Montgomery, 1991). Las suspensiones a atomizar se prepararon utilizando las condiciones



establecidas en la Tabla 5.2 y siguiendo el procedimiento reportado en la Sección 2.2.3. *Preparación de las suspensiones a secar*. Para cada suspensión, la distribución y tamaño de las partículas se analizó según la descripción de la Sección 2.2.4.4. *Tamaño de las partículas*. Las respuestas Y_1 a Y_7 se evaluaron de acuerdo a la metodología detallada en las Secciones 2.2.5. *Secado por atomización* y 2.2.6. Caracterización del producto particulado. Además, la fluidez del polvo se estableció mediante la determinación del Índice de Carr (Sección 2.2.7.1. *Fluidez del polvo: Índice de Carr (IC)*).

5.2.2. Estrategias para el análisis de los resultados

5.1.1.1. Análisis estadístico

El análisis del diseño de experimentos permite establecer cuáles son las variables más significativas sobre las respuestas de interés; y posteriormente construir modelos que se ajusten adecuadamente a los datos obtenidos. De esta manera, los modelos permiten estimar el comportamiento de dichas variables en otras condiciones dentro del dominio experimental. En este sentido, el análisis de la varianza permite establecer con cierto nivel de confianza si los factores analizados afectan significativamente o no la respuesta de interés. En este trabajo de tesis se utilizó un nivel de significancia del 5 % para la evaluación de los estadísticos.

5.1.1.2. Ajuste del modelo

Tal como se mencionó anteriormente, el desarrollo de un diseño de experimentos permite establecer un modelo de ajuste similar al expresado en la Ecuación (5.10). En la mayoría de los problemas de RSM, se desconoce la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes, por lo que el primer paso consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre Y y el conjunto de variables independientes (Montgomery, 1991). En particular, el modelo de ajuste que se puede establecer en un diseño de superficie de respuesta de



segundo orden (Box - Behnken en este caso) que contempla seis factores se define como:

$$Y' = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_6X_6 + a_{11}X_1X_1 + a_{12}X_1X_2 + \dots + a_{66}X_6X_6 \quad (5.16)$$

o genéricamente, como:

$$Y' = a_0 + \sum_{i=1}^{i=k} a_iX_i + \sum_{\substack{i=1 \\ j=1}}^{\substack{i=k \\ j=k}} a_{ij}X_iX_j \quad (5.17)$$

donde Y' es la respuesta estudiada ajustada, asociada a cada combinación factor - nivel, y los coeficientes a_0 , a_i y a_{ii} se calculan a partir de la regresión de los datos experimentales de Y . El modelo se puede analizar en tres grandes términos: uno de orden cero (a_0), uno lineal (a_iX_i) y otro de segundo orden ($a_{ij}X_iX_j$), el cual contempla la interacción de dos efectos (cuando $i \neq j$) y de efectos cuadráticos (cuando $i = j$).

5.1.1.3. Valoración del modelo ajustado

Existen diversas maneras de determinar la bondad de un modelo ajustado. En primer lugar, en el *análisis de los residuos* (diferencia entre los valores ajustados de cada respuesta y los datos obtenidos experimentalmente) se evalúa la forma de la distribución de los mismos. En general, el ajuste del modelo implica la suposición de distribución normal de los residuos. En los casos en que estos no se distribuyan normalmente, podría ser necesaria una transformación de los datos experimentales. En esta misma línea, es de esperar que un buen modelo represente los datos ajustados contra los observados en cercanías de la recta diagonal $y = x$.

Otras herramientas gráficas para juzgar un modelo ajustado son la gráfica de los residuos contra el valor ajustado de la respuesta, la representación de los residuos



contra los factores estudiados (Montgomery, 1991) y la gráfica de los residuos contra el número de corrida, es decir, el orden en que fueron llevados a cabo los experimentos. En estos tres casos, la ausencia de patrones definidos en la distribución de los residuos fortalece la hipótesis de idoneidad del modelo; es decir, permite considerar que el modelo de regresión es adecuado para ajustar los datos.

El valor p del modelo ajustado (p_{MOD}) es un indicador de la existencia de una relación significativa entre las variables dependiente e independientes; siendo adecuado en los casos que p_{MOD} sea inferior al nivel de significancia propuesto (asumido igual a 0.05).

Por otra parte, la *prueba de falta de ajuste (LOF)* permite saber si el orden del modelo supuesto es correcto y se realiza descomponiendo la suma de cuadrados del error en el análisis de la varianza, y determinando el valor del estadístico F_0 de la prueba (Montgomery, 1991). La misma prueba puede analizarse considerando que si el valor p de falta de ajuste (p_{LOF}) es inferior al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), entonces se asume que hay falta de ajuste; de lo contrario se considera que el modelo es apropiado para ajustar los datos experimentales.

Finalmente, el *coeficiente de determinación (R^2)* es un indicador de la variabilidad de los datos explicada por el modelo ($0 \% \leq R^2 \leq 100 \%$) (Montgomery, 1991). Este estadístico debe usarse con cautela dado que puede hacerse igual a 100 % fácilmente, agregando términos al modelo sin representar necesariamente un mejor ajuste.

5.2. Resultados

La Tabla 5.2 presenta los resultados de las principales respuestas estudiadas, que son discutidas en las secciones siguientes. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se ajustaron los modelos apropiados para cada respuesta de interés.



Tabla 5.2. Puntos experimentales y resultados del diseño de experimentos Box - Behnken. Los valores en negrita corresponden a los puntos mínimo y máximo de cada respuesta.

N°	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇
1	110	45	15	5	25	19	51.31	8.040	8.326	3.46	39.57	23.37	46.7
2	135	45	15	2	25	19	61.59	12.763	9.382	2.75	32.91	39.69	42.2
3	135	60	15	5	35	9.5263	47.94	9.180	7.140	3.67	37.16	39.84	51.4
4	160	30	10	8	25	9.5263	43.28	19.965	15.479	2.15	32.04	9.88	54.5
5	135	45	10	5	25	9.5263	60.24	7.908	8.858	2.72	50.16	24.59	58.1
6	135	45	15	8	25	19	54.27	13.448	9.420	2.79	42.78	15.71	53.5
7	135	60	10	5	35	0.0526	61.22	16.907	9.270	2.51	46.82	27.60	43.6
8	135	60	5	5	15	9.5263	70.27	11.769	8.058	2.09	50.00	32.24	46.2
9	110	30	10	2	25	9.5263	37.56	10.402	10.418	2.45	33.52	57.42	38.5
10	110	45	10	8	15	9.5263	59.58	25.761	10.945	2.17	43.42	56.70	44.2
11	110	45	5	5	25	19	55.50	9.614	7.693	2.63	48.58	34.18	45.0
12	110	45	10	2	35	9.5263	49.66	11.452	9.456	3.01	48.02	63.62	48.4
13	135	30	15	5	15	9.5263	39.67	7.044	10.328	3.24	34.75	29.93	48.7
14	135	45	10	5	25	9.5263	55.14	7.105	8.697	2.75	49.26	26.38	50.9
15	135	30	15	5	35	9.5263	26.53	11.808	12.345	3.14	20.50	22.59	43.4
16	135	60	15	5	15	9.5263	58.10	11.825	7.980	2.41	46.15	38.19	44.9
17	135	60	10	5	15	19	71.51	12.960	7.444	4.09	61.24	36.13	46.2
18	110	45	15	5	25	0.0526	63.73	22.792	9.892	3.07	48.85	23.95	45.6



Tabla 5.2. (Cont.). Puntos experimentales y resultados del diseño de experimentos Box – Behnken. Los valores en **negrita** corresponden a los puntos mínimo y máximo de cada respuesta.

N°	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇
19	135	30	10	5	35	0.0526	44.94	21.087	8.301	2.89	32.62	23.41	43.9
20	160	30	10	2	25	9.5263	48.61	10.154	8.546	3.61	48.45	65.92	38.8
21	160	45	15	5	25	0.0526	66.26	25.762	9.188	2.83	47.67	38.05	43.5
22	135	45	10	5	25	9.5263	62.37	9.067	8.142	3.06	51.94	21.06	46.4
23	135	30	5	5	35	9.5263	39.91	9.841	10.292	2.88	35.51	30.99	39.1
24	135	45	15	8	25	0.0526	61.99	36.857	12.187	2.46	44.2	30.32	46.1
25	110	60	10	2	25	9.5263	59.70	8.917	6.874	3.88	45.8	42.20	41.1
26	160	45	10	2	35	9.5263	58.14	11.002	6.252	2.93	53.41	55.55	44.1
27	135	60	10	5	15	0.0526	74.98	30.399	11.610	2.83	62.73	50.34	48.3
28	160	45	15	5	25	19	68.82	10.230	7.846	2.84	68.69	38.78	43.4
29	135	30	10	5	35	19	34.87	11.729	10.986	2.78	30.39	37.77	39.0
30	135	45	15	2	25	0.0526	79.17	4.668	6.397	2.83	71.98	78.06	41.9
31	135	45	5	8	25	19	62.06	13.198	8.998	2.76	50.33	45.14	44.8
32	135	45	10	5	25	9.5263	63.73	6.534	8.312	2.95	61.13	44.14	44.2
33	160	45	10	8	35	9.5263	58.09	16.738	9.518	2.35	48.49	27.39	46.0
34	135	30	10	5	15	19	51.86	7.208	10.032	4.05	47.55	30.90	52.5
35	135	45	5	2	25	19	71.33	13.197	6.277	3.28	67.43	54.67	42.4
36	135	30	10	5	15	0.0526	41.45	19.188	10.650	3.01	34.24	36.03	46.5



Tabla 5.2. (Cont.). Puntos experimentales y resultados del diseño de experimentos Box – Behnken. Los valores en **negrita** corresponden a los puntos mínimo y máximo de cada respuesta.

N°	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇
37	110	45	10	2	15	9.5263	80.04	4.807	6.186	4.11	74.94	55.66	48.0
38	160	45	10	8	15	9.5263	71.64	26.526	12.310	2.96	62.32	62.74	42.9
39	135	60	5	5	35	9.5263	59.47	10.464	7.023	2.36	51.14	37.92	45.3
40	135	30	5	5	15	9.5263	60.82	4.845	11.486	2.96	51.04	43.92	48.5
41	135	45	10	5	25	9.5263	65.18	6.372	8.756	3.2	59.79	41.73	43.5
42	110	45	5	5	25	0.0526	73.22	27.930	10.335	2.75	50.60	21.62	44.8
43	160	45	10	2	15	9.5263	81.70	5.290	6.083	3.39	76.10	50.83	45.7
44	160	45	5	5	25	19	66.24	12.016	11.708	4.39	85.56	51.16	38.0
45	110	45	10	8	35	9.5263	53.32	18.329	9.041	2.97	42.50	38.95	43.8
46	135	45	5	8	25	0.0526	68.61	34.469	8.696	2.62	49.47	55.81	37.3
47	110	60	10	8	25	9.5263	55.53	15.244	8.354	3.18	44.86	50.27	43.4
48	160	60	10	2	25	9.5263	61.80	11.118	6.362	3.71	57.08	55.59	42.9
49	110	30	10	8	25	9.5263	25.20	11.543	16.717	3.77	29.66	49.91	48.0
50	160	45	5	5	25	0.0526	71.75	21.904	9.318	3.07	57.91	44.13	41.7
51	135	45	10	5	25	9.5263	65.12	5.695	8.401	2.99	63.04	32.36	44.6
52	160	60	10	8	25	9.5263	59.44	16.876	7.221	3.39	46.76	32.72	46.6
53	135	60	10	5	35	19	56.53	6.387	6.549	4.56	48.19	43.15	46.4
54	135	45	5	2	25	0.0526	86.72	4.731	6.381	3.81	66.21	70.33	42.9



Cabe destacar que para mejorar el ajuste de los modelos propuestos, fue necesario replicar algunas experiencias. Así, el procedimiento, implicó la realización de sucesivos ajustes, en cada uno de los cuales el modelo propuesto fue juzgado de modo de garantizar que no exista falta de ajuste y que el valor p del modelo (p_{MOD}) sea inferior al nivel de significancia establecido de 0.05, manteniendo además el valor del coeficiente de determinación (R^2) lo más alto posible. Además, se valoraron cada uno de los modelos según los perfiles que presentaron los residuos y los valores ajustados, de acuerdo a la descripción de la Sección 5.1.1.3. *Valoración del modelo ajustado.*

No obstante, el ajuste de la humedad residual (Y_4) al tipo de modelo propuesto no fue adecuado. En efecto, el R^2 fue de 52.22 % y la falta de ajuste fue significativa ($p > 0.05$). Por lo tanto, debería evaluarse si un modelo de mayor complejidad permite ajustar esos datos experimentales. Sin embargo, y debido a que todas las mediciones de humedad indicaron bajos contenidos de agua residual (inferiores a 5 % m/m), es de esperar que el producto sea estable microbiológicamente en condiciones ambientales. En consecuencia, no resultó indispensable el ajuste de un modelo para optimizar esta respuesta.

Por otro lado, dado que la fluidez del polvo (IC) resultó siempre muy pobre, no se enfatizó la búsqueda de un modelo para esta respuesta (Y_7). En circunstancias que requieran un polvo de buena fluidez, el mismo deberá ser previamente acondicionado para su uso.

5.2.3. Rendimiento de Secado (Y_1)

De acuerdo con la Tabla 5.2, el rendimiento de secado obtenido experimentalmente estuvo comprendido entre 25.20 % (corrida 49) y 86.72 % (corrida 54). A continuación se presenta el modelo cuadrático ajustado para el rendimiento de secado (Y'_1), en función de las variables independientes estudiadas y sus interacciones.



$$\begin{aligned} Y'_1 = & -134.51 + 1.4282X_1 + 7.6110X_2 - 0.4059X_3 - 16.8733X_4 - 1.9995X_5 \\ & - 3.3262X_6 - 0.0054X_1^2 - 0.0057X_1X_2 + 0.0113X_1X_3 \\ & + 0.0159X_1X_4 + 0.0058X_1X_5 + 0.0104X_1X_6 - 0.0639X_2^2 \\ & - 0.0152X_2X_3 + 0.0146X_2X_4 - 0.0084X_2X_5 - 0.0066X_2X_6 \quad (5.18) \\ & - 0.0177X_3^2 - 0.0081X_3X_4 - 0.0288X_3X_5 + 0.0012X_6 + 0.6463X_4^2 \\ & + 0.1780X_4X_5 + 0.2708X_4X_6 + 0.0141X_5^2 - 0.0265X_5X_6 \\ & + 0.0660X_6^2 \end{aligned}$$

El R^2 obtenido fue de 96.14 % y la prueba de falta de ajuste (p_{LOF}) fue superior a 0.05 (Tabla A.5.1), asegurando que el modelo ajustado fue apropiado para el ajuste de los datos. Además, el valor p del modelo (p_{MOD}) fue inferior al 5 %, por lo que pudo afirmarse que existe una correlación estadísticamente significativa entre las variables. Asimismo, la representación de valores observados experimentalmente en función de los ajustados (predichos) Y'_1 (ver Apéndice 5, Figura A.5.1a) indicó una buena correlación entre ambos y con ello un buen ajuste del modelo. Los residuos entre los valores reales y los predichos por el modelo siguieron una distribución aproximadamente normal (Figura A.5.1b). Por otro lado, los residuos tampoco presentaron un patrón definido al ser representados contra el número de corrida (es decir, en función del orden en que fueron ensayados los experimentos) (Figura A.5.1c) ni contra cada una de las variables independientes (Figura A.5.2a a Figura A.5.2f) indicando así que no existe una correlación entre ellos; mientras que la ausencia de un patrón definido en la gráfica de los residuos contra el valor ajustado (predicho) (Figura A.5.1d) indica que el modelo seleccionado describe adecuadamente los datos experimentales, respectivamente. En el APÉNDICE 5.1. *Ajuste de Rendimiento de Secado* se presentan estos diagnósticos de ajuste para esta respuesta.

Realizando un análisis de la varianza de los valores observados (Tabla A.5.1), se encontró que todos los *efectos principales* (X_1 a X_6) afectaron significativamente a la respuesta de interés ($p < 0.05$). Por otro lado, los efectos de orden superior que resultaron significativos fueron las *interacciones* temperatura de secado - relación GA a MD (X_1X_6), y las interacciones mutuas entre contenido de fitoesteroles, contenido de sólidos totales y relación GA a MD (X_4X_5 , X_4X_6 y X_5X_6). La temperatura de secado (X_1^2),



el caudal de aire de atomización (X_2^2), el contenido de fitoesteroles (X_4^2) y la relación GA a MD (X_6^2) ejercieron un efecto significativo también en *orden cuadrático*. Estos efectos se vieron reflejados en las Figura 5.3, que muestra las superficies de respuesta ajustadas del rendimiento de secado para cada par de variables independientes.

El rendimiento de secado fue mayor a elevados caudales de aire de atomización y temperaturas de secado (Figura 5.3a). El análisis de la varianza evidenció al caudal de atomización como principal parámetro influyente sobre el rendimiento, tanto en su término lineal como cuadrático. De acuerdo a lo mencionado en el Capítulo I (Sección 1.5.3. *Técnicas de microencapsulación – Secado por atomización*), una mayor energía aplicada al proceso de atomización (observada en este caso como caudal de aire de atomización) conduce a partículas con tamaños cada vez menores, aumentando así el área total de transferencia de calor por unidad de volumen y, por ende, la transferencia de calor y masa.

Zhang & Youan (2010) encontraron un efecto similar en el estudio del proceso de nanoencapsulación de compuestos oleosos, explicando la eficiencia de secado como una función del tiempo requerido por la gota para secarse, el cual está relacionado linealmente con el tamaño inicial de la misma y la tasa de evaporación. Por otra parte, cuando los tamaños de partícula son más pequeños, el cono de atomización formado es más estrecho, por lo que las gotas generadas tienen menos posibilidad de alcanzar las paredes de la cámara de secado, y cuando lo hacen (hacia el final de la longitud total de la cámara), éstas ya se encuentran casi secas, reduciendo así las pérdidas por pegado (Goula & Adamopoulos, 2003).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, también el efecto cuadrático del caudal de aire de atomización fue significativo ($p < 0.05$). A caudales de atomización demasiado altos, se observó una pequeña disminución en el rendimiento de secado, probablemente provocada por la disminución excesiva en el tamaño de las gotas generadas y el consecuente arrastre de una mayor fracción de polvo en la corriente de aire exhausto que abandona el ciclón (Sección 5.2.4. *Tamaño de partícula de la alimentación líquida (suspensión) (Y2) y del producto en polvo (Y3)*).

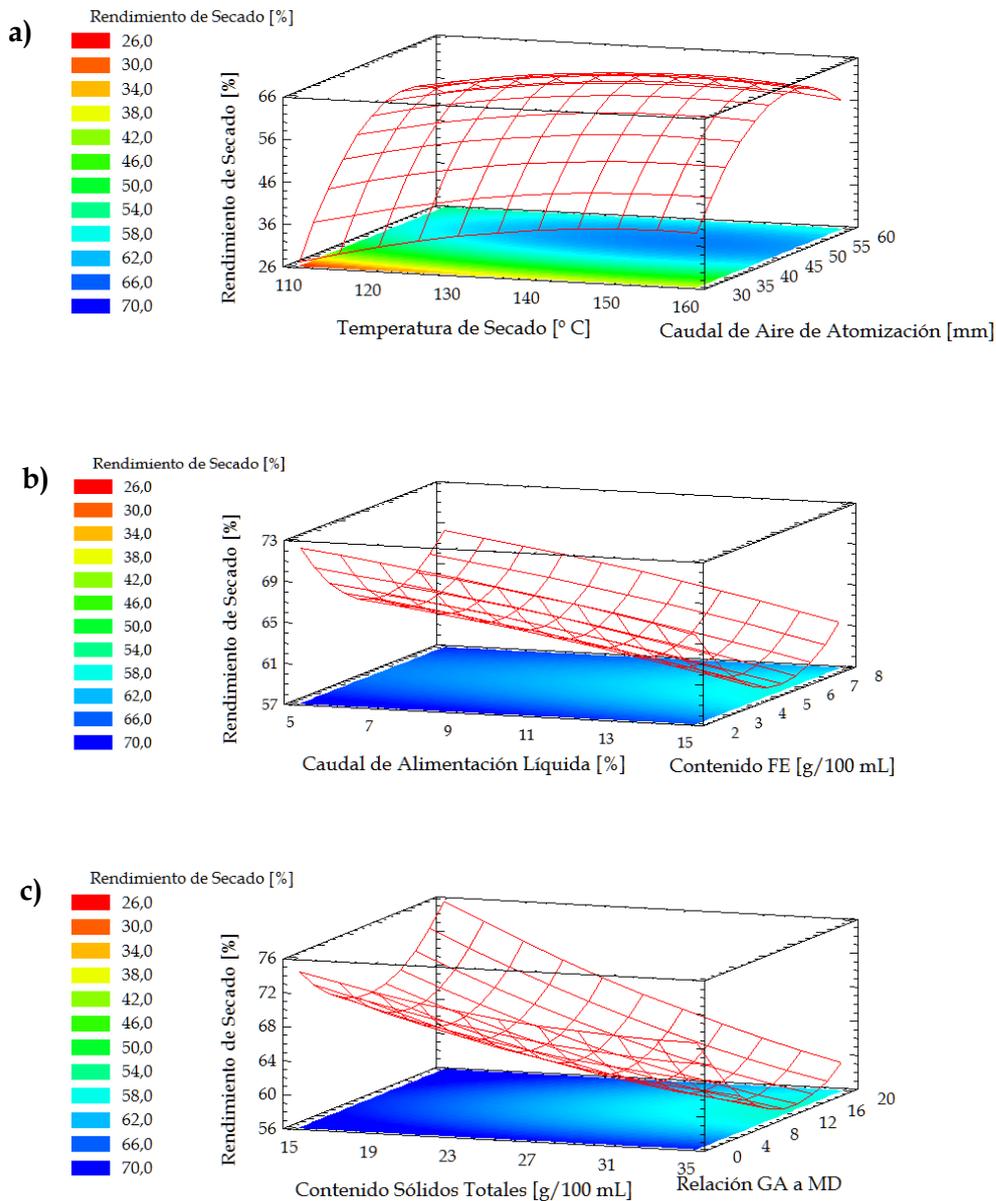


Figura 5.3. Superficies de respuesta para el rendimiento de secado en función de: **a)** la temperatura del aire de secado y el caudal de aire de atomización; **b)** el caudal de alimentación y el contenido de fitoesteroles; **c)** el contenido de sólidos totales y la relación másica GA a MD. Para cada gráfica, el resto de las variables se encontraron en su nivel medio.

Por otra parte, es ampliamente conocido que si la temperatura de entrada no es suficientemente alta, el agua contenida en la gota atomizada no se vaporiza



completamente, facilitando el pegado de polvo sobre la pared de la cámara de secado. Este fenómeno, explicado anteriormente en función del tamaño de las gotas atomizadas, también está fuertemente relacionado con la temperatura de secado. En efecto, a altas temperaturas la evaporación de agua ocurre con mayor facilidad, debido a la mejor transferencia de calor y masa con el aire de secado, conduciendo así a un mayor rendimiento de proceso. Varios autores reportaron observaciones equivalentes durante el secado por atomización de otros materiales (Cai & Corke, 2000; Kha *et al.*, 2014; Roccia, Martínez, Llabot & Ribotta, 2014; Tonon, Brabet & Hubinger, 2008).

A medida que el caudal de alimentación líquida se incrementó, el rendimiento de secado disminuyó (Figura 5.3b) en una relación prácticamente lineal ($p < 0.05$). Efectivamente, un aumento en la velocidad de alimentación líquida produce un secado insuficiente de cada gota/partícula debido a la reducción en la relación másica entre los caudales de aire de secado y de alimentación líquida (Zhang & Youan, 2010) y en el tiempo de contacto con este aire de secado (Anekella & Orsat, 2013). De esta manera, a bajos caudales de alimentación líquida, la mayor parte del contenido acuoso pudo ser evaporado, disminuyendo la probabilidad de adhesión sobre la cámara de secado y, por lo tanto, aumentando el rendimiento de secado. Un fenómeno similar fue reportado además por Kaur, Singh, Garg, Gulati & Vaidya (2015) en la formulación de una dispersión sólida mediante secado por atomización, como así también por Roccia *et al.* (2014) en la encapsulación de aceite de girasol.

El rendimiento de secado también disminuyó casi linealmente frente a incrementos en el contenido de sólidos totales (Figura 5.3c), siendo el término lineal de este factor uno de los más significativos sobre dicha respuesta. Como se mencionó en el Capítulo IV (Sección 4.3.7. *Rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles*), esta reducción pudo haber estado relacionada con el aumento en la viscosidad de la suspensión a atomizar, que promovió el pegado sobre la cámara de secado. Este efecto de la viscosidad fue observado además por Tonon *et al.* (2008) durante el secado por atomización de açai y por Tontul & Topuz (2014) en la producción de polvos a base de aceite de lino. El contenido de fitoesteroles y la relación másica GA a MD también mostraron un impacto significativo sobre el rendimiento de secado, pero de menor importancia. En ambos casos, el orden cuadrático resultó



preponderante sobre el lineal y el rendimiento de secado ajustado por el modelo resultó mejor para las condiciones en que ambos factores se encontraron en su nivel bajo.

Complementariamente a las superficies de respuesta presentadas en la Figura 5.3, la Figura 5.4 muestra el rendimiento de secado en función de pares de factores. Para cada par, el primero de los factores se varía entre sus niveles mínimo y máximo; mientras que en la línea, el segundo factor se mantiene en su valor bajo o alto (- o +, respectivamente). Todos los demás factores, excepto los involucrados en la interacción, se mantienen constantes en sus niveles centrales. En acuerdo con los efectos principales, se observa que también las interacciones entre los tres factores mencionados (X_4X_5 , X_4X_6 y X_5X_6) sugirieron trabajar con ambos factores en su nivel más bajo para aumentar el rendimiento de secado. Sin embargo, en el último caso (X_5X_6), el mejor rendimiento se observó a bajos contenidos de sólidos totales, independientemente de la relación GA a MD observada.

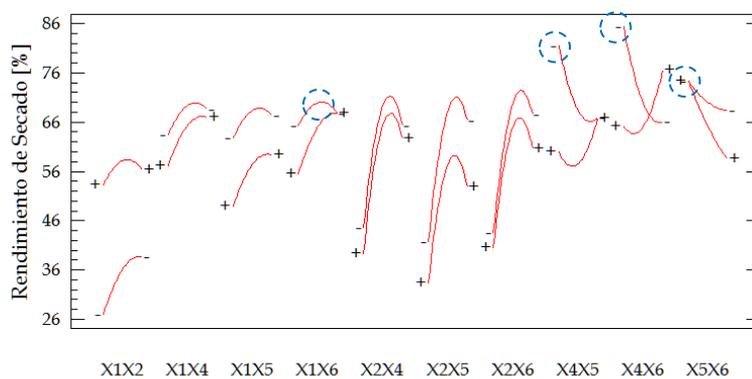


Figura 5.4. Efectos de interacción para el rendimiento de secado.

En cuanto a la interacción entre la temperatura de secado y la relación GA a MD (X_1X_6), los mejores rendimientos fueron observados a bajas relaciones GA a MD y temperaturas de secado intermedias.



Una vez establecida la ecuación que modela el comportamiento del rendimiento de secado con las variables independientes, se buscó y encontró el conjunto de condiciones óptimas para esta respuesta. En efecto, estableciendo una temperatura de secado de 111.7 °C, un caudal de atomización correspondiente a 55 mm de altura del rotámetro, un 5 % en la apertura de la bomba de alimentación, contenidos de 2.00 g/100 mL de fitoesteroles y 15.02 g/100 mL de sólidos totales en la formulación y una relación másica de GA a MD de 0.0583, se podría alcanzar un rendimiento de secado óptimo de 100 %, con un 95 % de probabilidad de ser superior a 91.06 %.

5.2.4. Tamaño de partícula de la alimentación líquida (suspensión) (Y_2) y del producto en polvo (Y_3)

De acuerdo a la Tabla 5.2, el tamaño medio en volumen de partícula de las suspensiones estuvo comprendido entre 4.668 μm (ensayo 30) y 36.857 μm (ensayo 24). Ambos extremos en el tamaño medio de partícula se correspondieron con ensayos a bajos y altos contenidos de fitoesteroles en la formulación, respectivamente.

Mediante un análisis de la varianza, contemplando únicamente los factores referentes a la formulación (Tabla A.5.2), pudo encontrarse que el factor más influyente sobre el tamaño medio de las partículas en la suspensión fue el contenido de fitoesteroles (X_4) en término lineal y, en menor grado, cuadrático (X_4^2). Asimismo, la relación GA a MD tanto en su término lineal como cuadrático (X_6 y X_6^2) afectó significativamente el tamaño medio de las partículas en suspensión. El contenido de sólidos totales (X_5) no afectó significativamente esta respuesta, pero sí su efecto cuadrático, al igual que todas las interacciones entre los factores, exceptuando X_5X_6 .

El contenido de fitoesteroles en la alimentación también afectó significativamente a la distribución de tamaño. La Figura 5.5 muestra las distribuciones de tamaño de partículas para suspensiones representativas de cada una de las concentraciones de fitoesteroles. Para el nivel bajo de contenido de fitoesteroles, la distribución obtenida fue de tipo unimodal; mientras que para el nivel alto de este factor, la distribución de tamaño de partículas fue bimodal, sugiriendo una dispersión incompleta de los fitoesteroles. En estos casos, un mayor tiempo de mezclado y



homogeneización pudo haber sido necesario para mejorar la dispersión de los fitoesteroles. Por otro lado, a concentraciones de fitoesteroles intermedias la forma de la distribución de tamaño también estuvo afectada por los otros dos factores y sus interacciones, sin presentar un patrón definido.

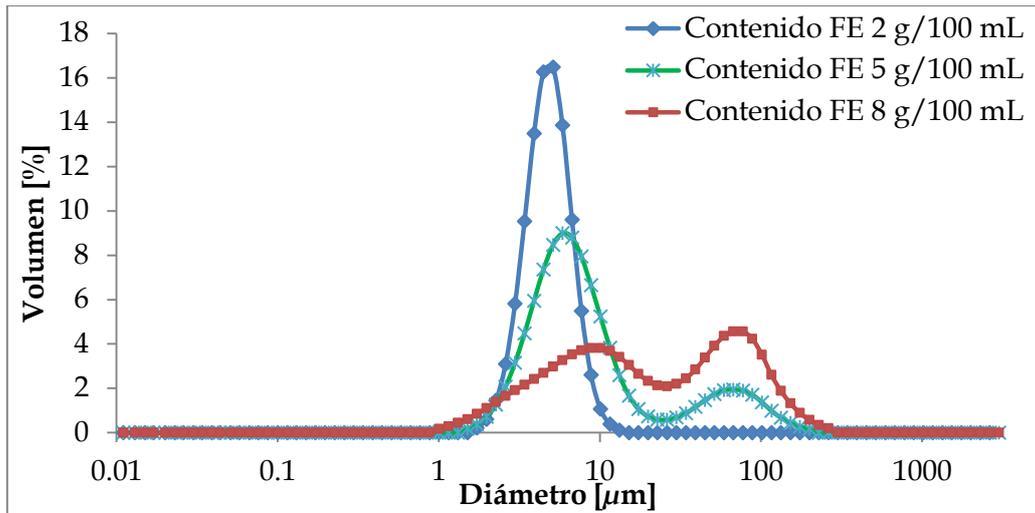


Figura 5.5. Distribución de tamaño de partículas para las suspensiones a distintas concentraciones de fitoesteroles (2 g/100 mL, ensayo 30; 5 g/100 mL, ensayo 7; 8 g/100 mL, ensayo 24).

La Ecuación (5.19) muestra el modelo cuadrático ajustado para el tamaño medio de las suspensiones (p_{MOD} 0.0000), el cual fue obtenido con un coeficiente de determinación R^2 de 95.21 %, sin presentar falta de ajuste (p_{LOF} = 0.1408). De esta manera, puede afirmarse con un nivel de confianza del 95 % que el modelo resultante fue apropiado para representar los datos experimentales obtenidos.

$$Y'_2 = 5.9585 + 2.3878X_4 - 0.5900X_5 - 0.0637X_6 + 0.5580X_4^2 - 0.1198X_4X_5 - 0.2818X_4X_6 + 0.0212X_5^2 + 0.0099X_5X_6 - 0.0458X_6^2 \quad (5.19)$$



Además, la representación de valores ajustados (predichos) de Y_2 en función de los correspondientes valores experimentales indicó un buen ajuste del modelo (Figura A.5.3a) y los residuos entre los valores reales y los predichos por el modelo siguieron una distribución aproximadamente normal (Figura A.5.3b). Por otro lado, los residuos representados en función del número de corrida (orden de ensayo) (Figura A.5.3c), como también en función del valor predicho (Figura A.5.3d) y de cada uno de los factores estudiados (Figura A.5.4a a Figura A.5.4c) no presentaron un patrón definido, ratificando la afirmación de que el modelo fue apropiado para representar los datos. En el APÉNDICE 5.2. *Ajuste Tamaño de Partícula - Suspensión* se presentan los diagnósticos de ajuste para esta respuesta.

La Figura 5.6 presenta las superficies de respuesta ajustadas para el tamaño medio de partícula en las suspensiones como función de los factores que resultaron significativos sobre esta respuesta. En concordancia con las distribuciones de tamaño mostradas en la Figura 5.5, se observa un menor tamaño medio de partículas para las suspensiones preparadas con el menor contenido de fitoesteroles (Figura 5.6a), debido a una mayor proporción de surfactante y materiales de cobertura por unidad de ingrediente activo. El tamaño medio de partícula en las suspensiones aumentó considerablemente con la concentración de fitoesteroles, hasta aproximadamente $37 \mu\text{m}$ (ensayo 24).

El efecto cuadrático del contenido de sólidos totales sobre el tamaño medio de las partículas en suspensión pudo estar relacionado con un aumento en su viscosidad (Figura 5.6b). En efecto, a bajas concentraciones de sólidos totales, un pequeño incremento en este factor generó un efecto similar sobre la viscosidad, que pudo permitir una mejor dispersión durante el homogeneizado y por ende, una pequeña disminución en el tamaño medio de las partículas. Sin embargo, un aumento excesivo en la viscosidad de la suspensión, pudo haber dificultado la homogeneización, impidiendo así la reducción de tamaño.

El efecto de la relación GA a MD sobre el tamaño medio de las partículas en suspensión estuvo altamente interrelacionado con la concentración de fitoesteroles. Para el nivel más bajo de este último factor, el tamaño medio de partículas aumentó con la relación de GA a MD; mientras que para el nivel más alto de concentración de



fitosteroles la relación de GA a MD presentó un efecto cuadrático más pronunciado sobre el tamaño de partícula en suspensión, siendo mejor la dispersión (*i.e.*, menor el tamaño medio de partículas) para la relación de GA a MD en su mayor nivel.

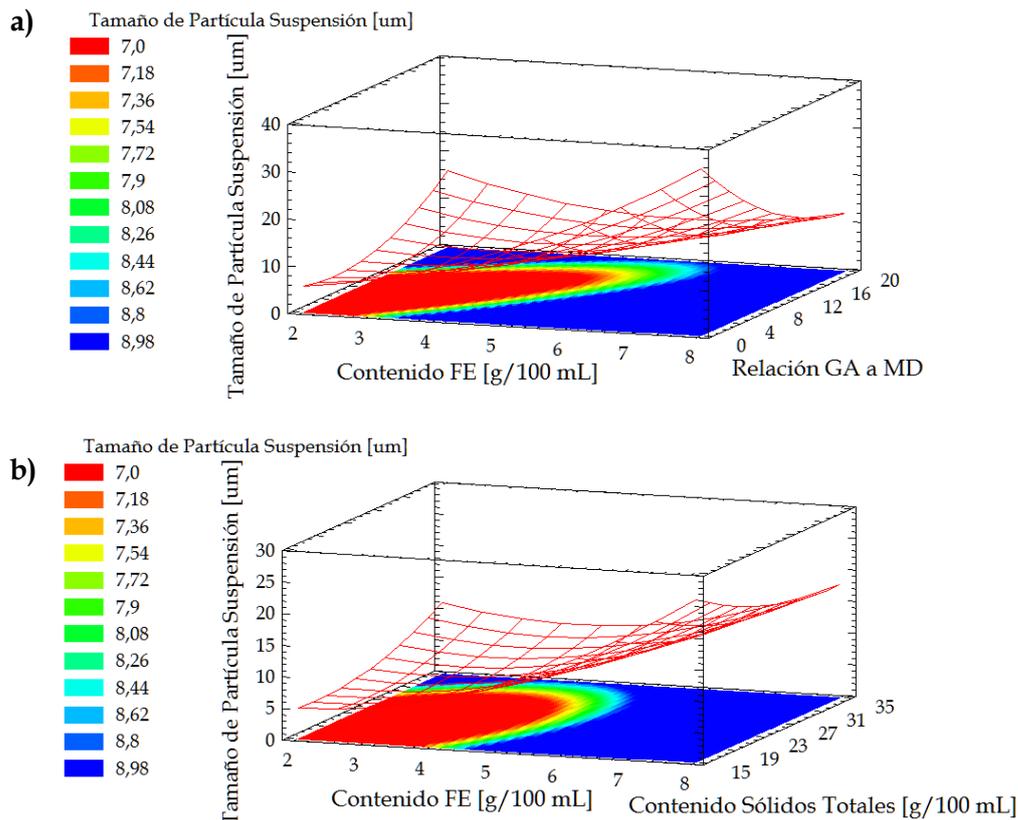


Figura 5.6. Superficie de respuesta para el tamaño de partícula medio en suspensión en función de: **a)** el contenido de fitosteroles y la relación másica GA a MD; **b)** el contenido de fitosteroles y de sólidos totales. Para cada gráfica, la variable restante se mantuvo en su punto central.

La Figura 5.7 muestra los efectos de interacción significativos sobre el tamaño medio de partícula en las suspensiones a atomizar. Conforme a lo mencionado con anterioridad, manteniendo un contenido de fitosteroles (X_4) bajo y una baja relación másica de GA a MD (X_6), el tamaño de las partículas resultó menor. Probablemente, la baja viscosidad esperada de la suspensión permitió un mezclado más efectivo y una



dispersión más eficiente de los fitoesteroles, conduciendo así a tamaños de partículas más pequeños.

De acuerdo a estos resultados, el tamaño de partícula en la suspensión mínimo ($3.786 \mu\text{m}$) podría ser alcanzado si el contenido de fitoesteroles se mantuviese en $2.00 \text{ g}/100 \text{ mL}$, acompañado de un contenido de sólidos totales de $18.47 \text{ g}/100 \text{ mL}$ y una relación másica GA a MD de 4.88.

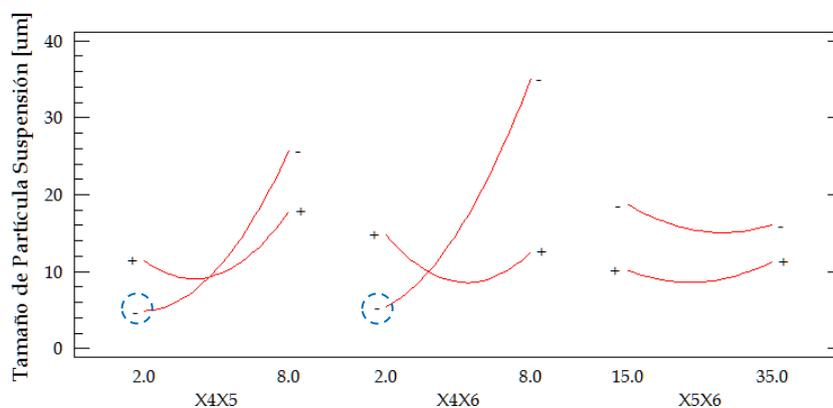


Figura 5.7. Efectos de interacción para el tamaño de partícula en la suspensión.

Por otra parte, todos los tamaños medios de partícula obtenidos luego del secado por atomización (*i.e.*, producto) (Y_3) estuvieron entre $6.083 \mu\text{m}$ (corrida 43) y $16.717 \mu\text{m}$ (corrida 49), generalmente diferentes a los obtenidos en las suspensiones, tal como se discute posteriormente (Figura 5.11).

Para esta respuesta (Y_3), todos los efectos principales excepto el caudal de alimentación líquida (X_3) fueron significativos ($p < 0.05$); así como las interacciones de ellos con el caudal de aire de atomización (X_1X_2 , X_2X_4 , X_2X_5 , y X_2X_6) y con la relación GA a MD (X_1X_6 , X_4X_6 , X_5X_6 , y X_2X_6) (Tabla A.5.3). También fueron significativas las interacciones entre el contenido de sólidos totales y el caudal de alimentación líquida (X_3X_5) y los contenidos de sólidos totales y de fitoesteroles (X_4X_5). Así como ejercieron efecto principal, la temperatura de secado, el caudal de aire de atomización y el



contenido de sólidos totales también ejercieron efectos cuadráticos significativos (X_1^2 , X_2^2 y X_5^2 , respectivamente).

Fue posible ajustar un modelo apropiado para el tamaño medio de partículas en función de las variables independientes analizadas en el diseño (Y'_3). La Ecuación (5.20) muestra el modelo cuadrático con interacciones propuesto.

$$\begin{aligned} Y'_3 = & 45.6856 - 0.4152X_1 - 0.9181X_2 + 0.0166X_3 + 2.1208X_4 + 0.5519X_5 \\ & - 0.2358X_6 + 0.0009X_1^2 + 0.0036X_1X_2 - 0.0015X_1X_3 \\ & + 0.0045X_1X_4 - 0.0002X_1X_5 + 0.0040X_1X_6 + 0.0077X_2^2 \\ & - 0.0074X_2X_3 - 0.0229X_2X_4 - 0.0031X_2X_5 - 0.0075X_6 \\ & + 0.0151X_3^2 - 0.0353X_4 + 0.0137X_3X_5 + 0.0061X_3X_6 + 0.0179X_4^2 \\ & - 0.0196X_4X_5 - 0.0399X_4X_6 - 0.0106X_5^2 + 0.0060X_5X_6 \\ & - 0.0007X_6^2 \end{aligned} \quad (5.20)$$

Este modelo propuesto explicó en un 93.83 % la variabilidad de los datos (R^2); sin presentar falta de ajuste ($p_{LOF} = 0.1054$) e indicando con un nivel de confianza del 95 % que el modelo seleccionado resultó adecuado para describir los datos observados. Asimismo, el valor p_{MOD} obtenido fue menor a 0.05, garantizando una relación estadísticamente significativa entre las variables al 95 % y los residuos, los cuales fueron graficados en función del orden de corrida (Figura A.5.5c), de los datos predichos (ajustados) (Figura A.5.5d) y de cada factor ensayado (Figura A.5.6a a Figura A.5.6f) y no presentaron patrones definidos, reafirmando, junto a la gráfica de valores observados en función de los predichos (ajustados) (Figura A.5.5a), que el modelo resultó adecuado. Además, los residuos se ubicaron sobre la línea de distribución normal (Figura A.5.5b). En el APÉNDICE 5.3. *Ajuste Tamaño de Partícula - Producto* se presentan los diagnósticos de ajuste para esta respuesta.

La Figura 5.8 muestra las superficies de respuesta ajustadas del tamaño medio de las partículas de producto en función de los diversos factores involucrados. De acuerdo con Gharsallaoui, Roudaut, Chamblin, Voilley & Saurel (2007), el tamaño medio de las partículas formadas está directamente relacionado con los cambios



fisicoquímicos producidos en las partículas durante el proceso debido a la temperatura de secado. A bajas temperaturas, su aumento generó una disminución en el tamaño medio de las partículas del producto (Figura 5.8a). Esto pudo deberse a la disminución en la tensión superficial y en la viscosidad de la fase líquida de la alimentación, que permitieron la atomización en gotas más pequeñas, resultando en menores tamaños medios de polvo.

Gallo, Llabot, Allemandi, Bucalá & Piña (2011) encontraron un efecto similar en la atomización de cáscara sagrada; así como también Mishra, Mishra & Mahanta (2014), en el estudio de secado por atomización de jugo de *Emblica officinalis*. No obstante, a temperaturas de secado más altas, se observó un efecto opuesto, es decir, que un aumento en la temperatura generó partículas con tamaños medios más grandes. Walton & Mumford (1999) atribuyeron este efecto a la formación de partículas menos densas, producto de un fenómeno de “inflado”. Más aún, a altas temperaturas el secado puede darse de manera muy acelerada. Así, el tamaño final de las partículas se establece antes que el secado ocurra por completo y no tiene lugar el encogimiento que ocurre típicamente durante el secado (Drusch & Schwarz, 2006; Tonon, Grosso & Hubinger, 2011).

Uno de los factores más significativos sobre el tamaño medio de las partículas en el producto fue el caudal de aire de atomización, tanto en su término lineal como cuadrático (Figura 5.8a). En este sentido, y como se mencionó anteriormente (Sección 5.2.3. *Rendimiento de Secado (Y1)*), un mayor caudal de aire atomización induce la formación de gotas cada vez más pequeñas, favoreciendo la formación de un polvo particulado más fino (Estevinho, Rocha, Santos & Alves, 2013; Gallo *et al.*, 2011; Goula & Adamopoulos, 2003). Sin embargo, para caudales de atomización elevados, el tamaño de las partículas en el producto aumentó, posiblemente debido al arrastre de los finos en la corriente de aire exhausto que sale del ciclón, aumentando así el tamaño medio del producto y disminuyendo el rendimiento de secado.

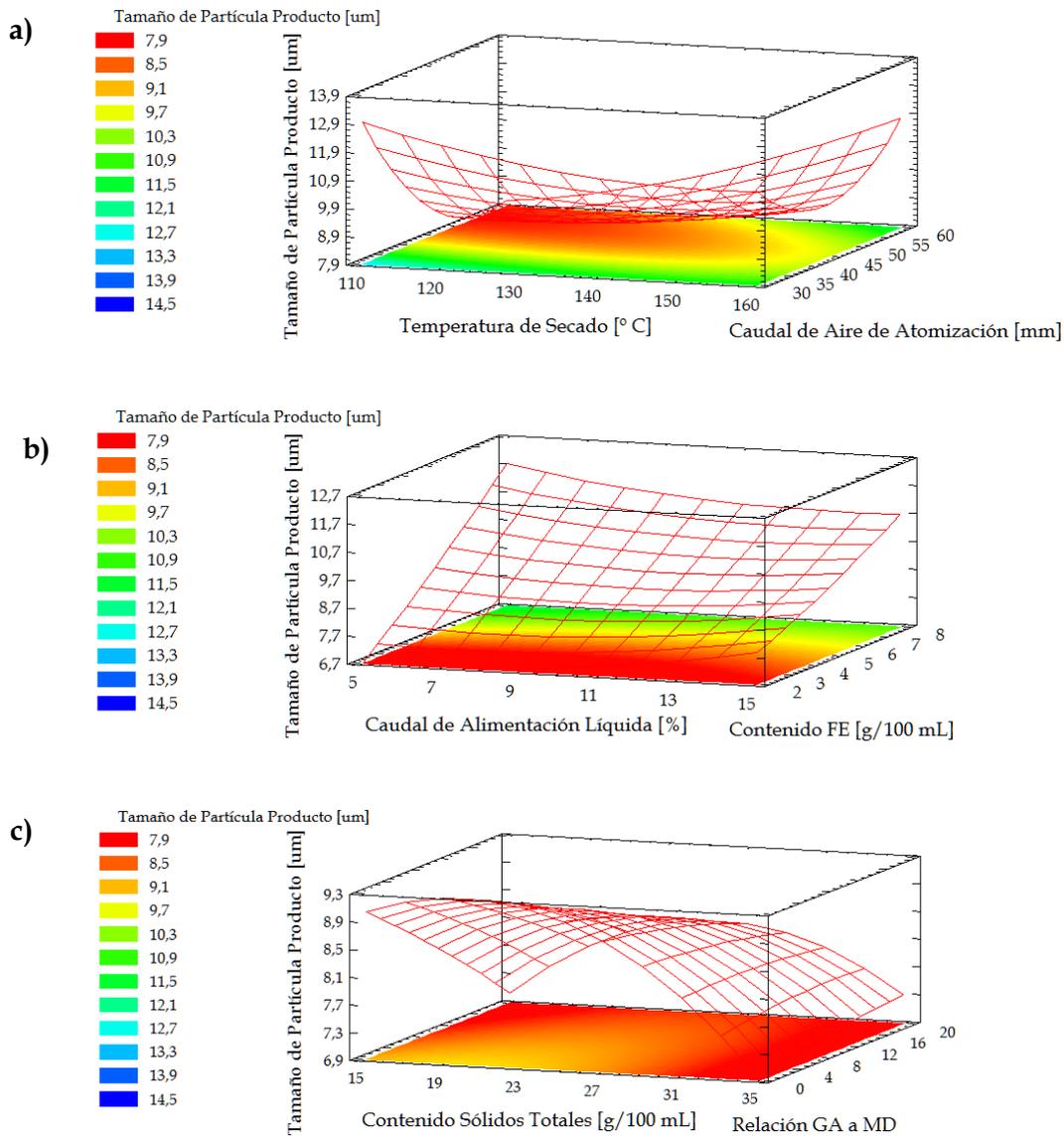


Figura 5.8. Superficies de respuesta para el tamaño de partícula medio del producto en función de: **a)** la temperatura del aire de secado y el caudal de aire de atomización; **b)** el caudal de la alimentación y el contenido de fitoesteroles; **c)** el contenido de sólidos totales y la relación másica GA a MD. Para cada gráfica, el resto de las variables se encontraron en su nivel medio.

Como era de esperar, el factor más significativo sobre el tamaño medio de las partículas fue el contenido de fitoesteroles en la suspensión a atomizar. En efecto, un aumento en la concentración de fitoesteroles condujo a un incremento casi lineal en el



tamaño medio de las partículas que conforman el material particulado que abandona el secadero (Figura 5.8b). Un efecto similar observaron Carmona, Tonon, da Cunha & Hubinger (2013) durante la encapsulación de aceite esencial de naranja. Además, la viscosidad de la suspensión aumentó con el contenido de fitoesteroles, dando gotas y, por ende, partículas de mayor tamaño medio.

Respecto al contenido total de sólidos incorporados, este factor mostró efectos significativos sobre el tamaño medio de las partículas en el producto, tanto a través de su término lineal como cuadrático, siendo este último más importante. Así, a bajas concentraciones de sólidos totales, el tamaño medio de las partículas producidas aumentó con este factor, probablemente debido a la mayor viscosidad de la suspensión, que generó gotas más grandes. Sin embargo, para concentraciones de sólidos relativamente altas, el tamaño medio de las partículas en el producto disminuyó con este factor, en acuerdo con un menor rendimiento de secado (producto del pegado). De acuerdo a Goula & Adamopoulos (2003), las gotas más grandes tienden a formar un cono de atomización más amplio que las pequeñas, por lo que las partículas chocan con las paredes de la cámara de secado en las zonas más altas de la misma, cuando el secado aún no es completo. De esta manera, las gotas y partículas más grandes tienden a quedar retenidas sobre las paredes del secadero, disminuyendo así el tamaño medio de las partículas que llegan al vaso colector.

Finalmente, la relación másica de GA a MD tuvo un efecto significativo menor, de orden lineal, sobre el tamaño medio de las partículas en el producto (Figura 5.8c). El aumento de este factor generó tamaños más pequeños, probablemente debido a la mayor proporción de goma arábiga, cuya tensión superficial es inferior a la de la maltodextrina y, por ende, conduce a un menor tamaño en las gotas atomizadas.

La Figura 5.9 muestra los efectos de interacción sobre el tamaño medio de partículas en el producto. De acuerdo al análisis de la varianza Tabla A.5.3, una de las interacciones más importantes que afectó el tamaño medio de las partículas producidas fue aquella entre el caudal de aire de atomización y la relación másica entre GA y MD (X_2X_6 , Figura 5.9). Respecto a esta interacción, el menor tamaño medio de partícula de polvo se obtuvo para ambos factores, caudal de aire de atomización y relación GA a MD, en su nivel alto. La segunda interacción más relevante sobre el tamaño medio de



partículas en el producto fue la provista por la temperatura de secado y el caudal de aire de atomización (X_1X_2 , Figura 5.9), que predijo un tamaño mínimo de partículas para la temperatura de secado en su nivel más bajo y el caudal de aire de atomización en su nivel más alto. El resto de las interacciones significativas se puede analizar en forma similar para encontrar los pares de valores que conducen a tamaños medios de partículas de polvo adecuados.

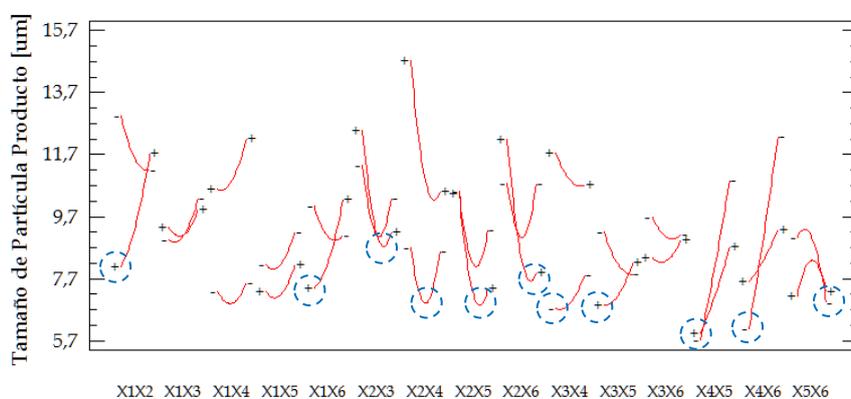


Figura 5.9. Efectos de interacción para el tamaño medio de partículas en el producto. En cada par de interacción, el resto de los factores se mantienen constantes en su valor central.

De acuerdo a este modelo, pudo encontrarse el conjunto de condiciones que minimizan el tamaño medio de partículas en el producto. En efecto, el tamaño más pequeño podría alcanzarse si se fijase la temperatura de secado en 160.0 °C, el caudal de aire de atomización correspondiente a 34 mm de la altura del rotámetro, un 5 % en la apertura de la bomba de alimentación, un contenido de 2.0 g/100 mL de fitoesteroles, un contenido de 35 g/100 mL de sólidos totales en la formulación y una relación másica de GA a MD de 0.0526. Bajo estas condiciones, el tamaño de partícula medio estimado fue de 2.996 μm , comprendido en un intervalo de confianza al 95 %, entre 1.023 μm y 4.969 μm . Sin embargo, difícilmente se pueda alcanzar un tamaño de partícula tan pequeño en este secadero. En efecto, el proceso de secado produjo cambios no sólo en el tamaño medio, sino también en las distribuciones de tamaño de partículas. La Figura 5.10 muestra las distribuciones de tamaño de partículas para tres



ensayos representativos con diferentes contenidos de fitoesteroles. Independientemente del tipo de distribución original, el secado produjo distribuciones unimodales.

Así, a bajos contenidos de fitoesteroles, durante el proceso de secado se incrementó el valor medio del tamaño final, probablemente debido al arrastre de las partículas más finas por parte del gas exhausto aguas abajo del ciclón. Este fenómeno está relacionado con la capacidad de separación del ciclón; al cual le resulta muy difícil recuperar partículas de tamaño inferior a $2 \mu\text{m}$ (Sosnik & Seremeta, 2015).

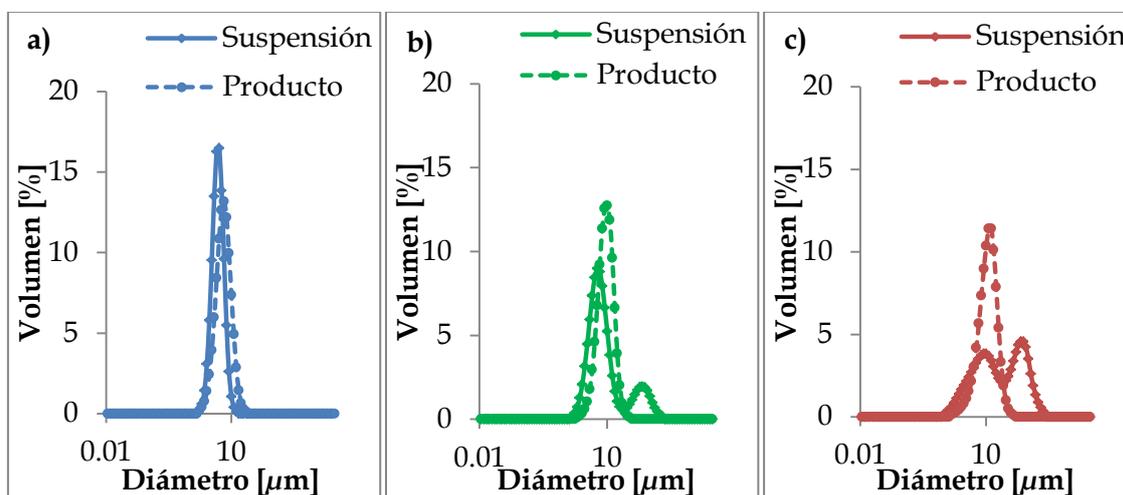


Figura 5.10. Distribución de tamaño de partícula en las suspensiones y productos conteniendo fitoesteroles: **a)** 2 g/100 mL (corrida 30); **b)** 5 g/100 mL (corrida 7); y **c)** 8 g/100 mL (corrida 24).

Por otro lado, para contenidos más altos de fitoesteroles, el tamaño medio de las partículas fue menor, posiblemente debido al pegado selectivo de las partículas más grandes sobre las paredes del secadero, tal como fue descrito en la Sección 4.3.4. *Distribución de tamaño de partículas en las suspensiones y en el producto secado.*

La Figura 5.11 muestra la relación entre los tamaños medios de partículas obtenidos antes y después del secado, en función del tamaño medio de partícula en la suspensión. Para las suspensiones más gruesas, el proceso de secado redujo



considerablemente el tamaño medio de partículas, por lo que la relación $D[4,3]_{Part}/D[4,3]_{Susp}$ fue inferior a 1, e incluso menor a 0.5 para partículas en suspensión mayores a $20 \mu\text{m}$. Para aquellas suspensiones con partículas de tamaño por debajo de $10 \mu\text{m}$, el proceso de secado produjo un aumento en el tamaño de partículas, hasta alcanzar 2.5 veces el tamaño original de la suspensión.

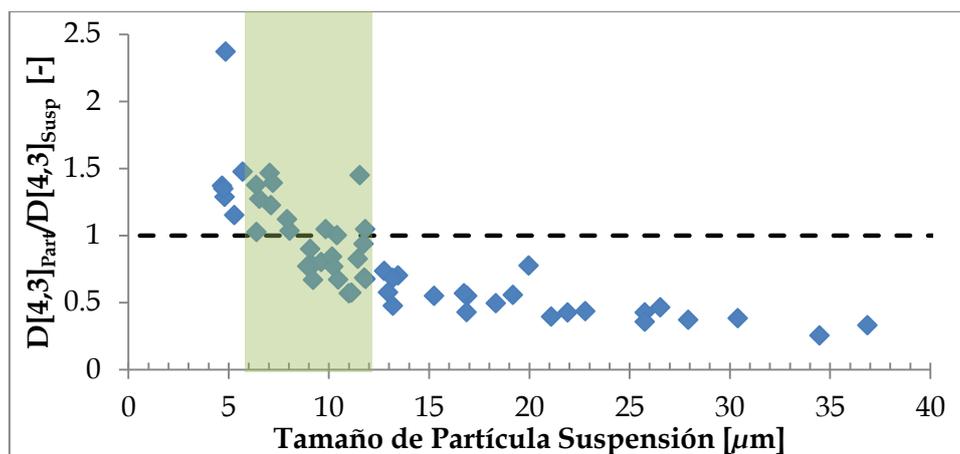


Figura 5.11. Relación de tamaños medios antes ($D[4,3]_{Susp}$) y después ($D[4,3]_{Part}$) del secado.

De esta manera, bajo estas condiciones resulto difícil alcanzar tamaños medios de partícula inferiores a $6 - 8 \mu\text{m}$ en el producto. No obstante, todos los tamaños medios de partícula en los polvos obtenidos estuvieron por debajo de $25 \mu\text{m}$, valores excelentes respecto a los tamaños esperados para este secadero. En efecto, de acuerdo a Estevinho *et al.* (2013) el secado por atomización puede producir polvos finos de $10 - 50 \mu\text{m}$, dependiendo de la alimentación y las condiciones de secado.

5.2.5. Retención de Fitoesteroides (Y_5)

La retención de fitoesteroides experimental se mantuvo entre 20.50 % (corrida 15) y 85.56 % (corrida 44), respectivamente. En general, aunque no siempre, esta retención de fitoesteroides fue menor que los respectivos rendimientos de secado. Debido a que



los fitoesteroles no son compuestos volátiles, las principales pérdidas en este proceso se deben a la deposición sobre las paredes de la cámara de secado y al arrastre por el aire de secado aguas abajo del ciclón. En efecto, la diferencia entre el rendimiento de secado y la retención de fitoesteroles sugirió la deposición selectiva hacia los fitoesteroles sobre las paredes de la cámara de secado.

El análisis de la varianza realizado sobre los datos obtenidos (Tabla A.5.4) permitió concluir que excepto el caudal de alimentación líquida (X_3) y la relación GA a MD (X_6), todos los efectos principales fueron significativos ($p < 0.05$) sobre la retención de los fitoesteroles (X_1 , X_2 , X_4 y X_5). Además, el caudal de aire de atomización ejerció un efecto cuadrático significativo (X_2^2), como también fue significativa la interacción entre la relación GA a MD y el caudal de alimentación líquida (X_3X_6).

El modelo ajustado para la retención de fitoesteroles se presenta en la Ecuación (5.21). Sus coeficientes explicaron de manera aceptable en un 77.87 % la variabilidad de los datos (R^2), mientras el valor p_{LOF} fue de 0.7556 (Tabla A.5.4), superior al 5 %, indicando que el modelo obtenido es apropiado para ajustar los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. Por otro lado, el valor p_{MOD} fue menor a 0.05. Estos tres parámetros en su conjunto permitieron asegurar que el modelo cuadrático puede ser utilizado para explicar la retención de los fitoesteroles en esta ventana operativa. Más aún, los residuos presentaron una distribución normal (Figura A.5.7b). La gráfica de valores observados contra los valores predichos (Figura A.5.7a) indicó que el modelo fue adecuado para predecir los valores observados. La Figura A.5.7c que representa los residuos contra el número de corrida señaló que no existe correlación serial con el orden en que fueron recolectados los datos. Finalmente, las gráficas de los residuos contra los valores predichos (Figura A.5.7d) y contra los factores (Figura A.5.8a a Figura A.5.8f) confirmaron la aseveración acerca de la idoneidad del modelo.



$$\begin{aligned} Y'_5 = & -102.859 + 0.8908X_1 + 5.1242X_2 + 5.8425X_3 - 7.5705X_4 - 1.5524X_5 \\ & - 2.7425X_6 - 0.0023X_1^2 - 0.0014X_1X_2 - 0.0105X_1X_3 \\ & - 0.0025X_1X_4 - 0.0040X_1X_5 + 0.0200X_1X_6 - 0.0546X_2^2 \\ & - 0.0018X_2X_3 + 0.0250X_2X_4 + 0.0139X_2X_5 - 0.0036X_2X_6 \quad (5.21) \\ & - 0.1009X_3^2 - 0.1054X_3X_4 - 0.0585X_3X_5 - 0.1045X_3X_6 \\ & + 0.0101X_4^2 + 0.1428X_4X_5 + 0.2178X_4X_6 + 0.0152X_5^2 \\ & - 0.0073X_5X_6 + 0.0138X_6^2 \end{aligned}$$

Las distintas superficies de respuesta obtenidas para la retención de fitoesteroles en función de cada par de factores independientes se presentan en la Figura 5.12. Estas fueron graficadas manteniendo el resto de los factores en su nivel medio de operación.

La temperatura de secado ejerció un efecto lineal positivo sobre la retención de fitoesteroles (Tabla A.5.4). Este fenómeno pudo haber estado relacionado con que a mayores temperaturas de secado el rendimiento de secado fue mayor (Sección 5.2.3. *Rendimiento de Secado (Y1)*), mejorando así la recuperación de sólidos. En este contexto, efectos dispares fueron observados por Frascareli, Silva, Tonon & Hubinger (2012), donde un aumento en la temperatura de secado generó una disminución en la retención de aceite de café mediante secado por atomización; mientras que un efecto similar al de esta tesis fue observado por Shiga *et al.* (2004) para la encapsulación de *Lenthinus Edodes*.

El caudal de aire de atomización resultó ser el factor más influyente sobre la retención de fitoesteroles, siendo su efecto cuadrático el de mayor relevancia, seguido de su efecto lineal (Figura 5.12a). En este sentido, al igual que en el caso del rendimiento, a bajos caudales de aire de atomización, su incremento condujo a mayores retenciones de fitoesteroles (Sección 5.2.3. *Rendimiento de Secado (Y1)*). Sin embargo, el comportamiento fue opuesto a altos caudales de aire de atomización. Así, la retención de fitoesteroles disminuyó conforme el caudal de atomización aumentó por encima de un dado valor, revelando una mayor pérdida de material tanto por pegado sobre las paredes, como también por arrastre de las partículas más pequeñas por el gas que abandona el ciclón (Sosnik & Seremeta, 2015).

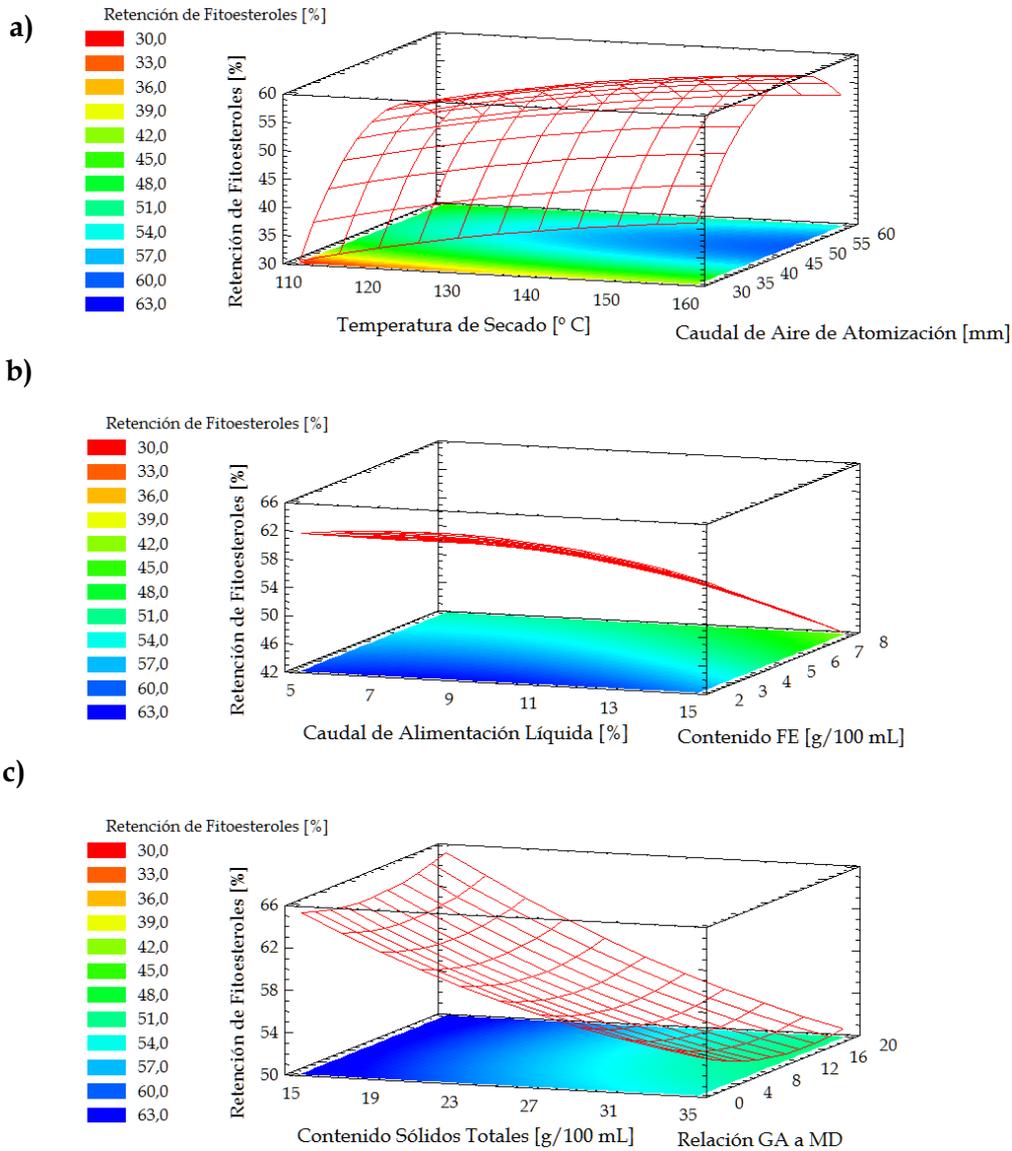


Figura 5.12. Superficies de respuesta para la retención de los fitoesteroles en función de: **a)** la temperatura del aire de secado y el caudal de aire de atomización; **b)** el caudal de la alimentación y el contenido de fitoesteroles; **c)** el contenido de sólidos totales y la relación másica GA a MD.

El contenido de sólidos totales y de fitoesteroles en la suspensión líquida ejercieron un efecto lineal significativo sobre la retención de fitoesteroles, mientras que el término cuadrático no la afectó de manera considerable (Figura 5.12c y Figura 5.12b,



respectivamente). En este sentido, la mayor retención de fitoesteroles se obtuvo cuando ambos factores se encontraron en su nivel bajo. Este efecto podría estar relacionado nuevamente con la variación observada en el tamaño medio de las partículas en la suspensión a medida que el contenido de fitoesteroles y/o de sólidos totales se incrementó.

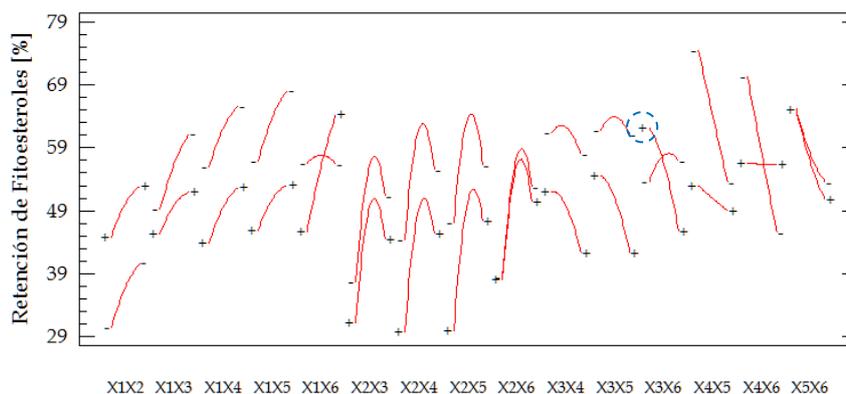


Figura 5.13. Efectos de interacción para la retención de fitoesteroles. En cada par de interacción, el resto de los factores se mantienen constantes en su valor central.

Finalmente, el efecto de interacción más significativo sobre la retención de fitoesteroles fue aquel entre el caudal de alimentación líquida y la relación másica GA a MD (X_3X_6 , en la Figura 5.13). De acuerdo a la Figura 5.13, con todos los factores mantenidos en su valor central, la retención de fitoesteroles resulta máxima cuando el caudal de alimentación líquida y la relación másica GA a MD asumen su nivel bajo y alto, respectivamente.

Una vez obtenido el modelo que ajusta adecuadamente los datos experimentales, pudieron encontrarse las condiciones que conducen a la máxima retención de fitoesteroles. En efecto, manteniendo una temperatura de secado de 125.9 °C, un caudal de aire de atomización correspondiente a 48 mm de la altura del rotámetro, un 5 % en la apertura de la bomba de alimentación, un contenido de 2.0 g/100 mL de fitoesteroles y un contenido de 15.2082 g/100 mL de sólidos totales en



la formulación y una relación másica de GA a MD de 0.0529, podría obtenerse una retención de fitoesteroles de 85.30 % (en un intervalo de confianza al 95 % que abarca desde 70.82 % hasta 99.77 %).

5.2.6. Eficiencia de Encapsulación (Y_6)

Finalmente, la eficiencia de encapsulación estuvo comprendida entre 9.88 % (corrida 4) y 70.33 % (corrida 54). También pudo ajustarse a un modelo cuadrático con interacciones. Sólo el caudal de alimentación líquida expresado como porcentaje de apertura de la bomba (X_3) y el contenido de fitoesteroles (X_4) ejercieron efectos principales significativos ($p < 0.05$) sobre la eficiencia de encapsulación (Tabla A.5.5). Además, el efecto cuadrático del contenido de fitoesteroles (X_4^2) afectó significativamente, como así también fue significativa su interacción con el contenido de sólidos totales (X_4X_5). Ni la temperatura de secado, ni el caudal de aire de atomización, ni la relación másica GA a MD, ejercieron efectos significativos en sus términos lineales y de interacción sobre la eficiencia de encapsulación. Tampoco lo hicieron las interacciones del caudal de la alimentación con el resto de los factores.

La Ecuación (5.22) presenta el modelo ajustado contemplando todos los efectos para la eficiencia de encapsulación, el cual explica de manera aceptable en un 72.65 % los datos experimentales, sin presentar falta de ajuste ($p_{LOF} > 0.05$), por lo que se puede afirmar que describe adecuadamente los datos experimentales y su valor p_{MOD} fue inferior a 0.05, indicando que existe una relación significativa entre las variables. En el APÉNDICE 5.5. *Ajuste Eficiencia de Encapsulación* se presentan los criterios de evaluación del ajuste, que indicaron una buena adecuación del modelo a los datos experimentales (valores observados contra valores predichos, Figura A.5.9a; residuos en función de los valores predichos, Figura A.5.9d; y de los factores independientes, Figura A.5.10a a Figura A.5.10f), una distribución normal de los residuos (Figura A.5.9b), que no existe una correlación entre los residuos y el orden en que fueron realizados los ensayos (Figura A.5.9c).



$$\begin{aligned} Y'_6 = & 159.094 - 0.5117X_1 - 1.6936X_2 - 0.2089X_3 - 8.5319X_4 - 0.5022X_5 \\ & - 3.2035X_6 + 0.0027X_1^2 + 0.0091X_1X_2 - 0.0185X_1X_3 \\ & - 0.0555X_1X_4 - 0.0077X_1X_5 + 0.0077X_1X_6 - 0.0078X_2^2 \\ & + 0.0504X_2X_3 + 0.1354X_2X_4 + 0.0073X_2X_5 - 0.0069X_2X_6 \quad (5.22) \\ & + 0.0450X_3^2 - 0.2404X_3X_4 + 0.0039X_3X_5 - 0.0472X_3X_6 \\ & + 1.5519X_4^2 - 0.2970X_4X_5 + 0.1374X_4X_6 + 0.0349X_5^2 \\ & + 0.0650X_5X_6 + 0.0261X_6^2 \end{aligned}$$

La Figura 5.14 muestra las diferentes superficies de respuesta establecidas para la eficiencia de encapsulación, en función de cada par de variables independientes. Para cada gráfica, el resto de las variables se encontraron en su nivel medio.

La contribución de la temperatura de secado y el caudal de aire de atomización no fue significativa sobre la eficiencia de encapsulación, respecto a los demás factores. Por otro lado, el caudal de alimentación líquida ejerció un efecto principalmente lineal sobre la eficiencia de encapsulación (Figura 5.14b), requiriéndose el ajuste del factor en su nivel más bajo para aumentar la respuesta. Wang, Lu, Lv & Bie (2009) también observaron una mejor eficiencia de encapsulación a menores caudales de alimentación líquida durante la encapsulación de pigmentos de cúrcuma.

Las contribuciones lineal y cuadrática del contenido de fitoesteroles en la alimentación al secadero tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación (Figura 5.14b). En efecto a bajas concentraciones de fitoesteroles, esta respuesta alcanzó los valores más altos, debido probablemente al menor tamaño medio de partícula en suspensión (Di Battista, Constenla, Ramírez-Rigo & Piña, 2015). Aghbashlo, Mobli, Madadlou & Rafiee (2012) encontraron un efecto similar para la microencapsulación de aceite de pescado mediante secado por atomización. Por otra parte, conforme aumentó el contenido de fitoesteroles en la alimentación, la eficiencia disminuyó considerablemente hasta un valor mínimo; a partir del cual entonces, la respuesta de interés se incrementó pero sin alcanzar los niveles de eficiencia de encapsulación observados a bajos contenidos de fitoesteroles.

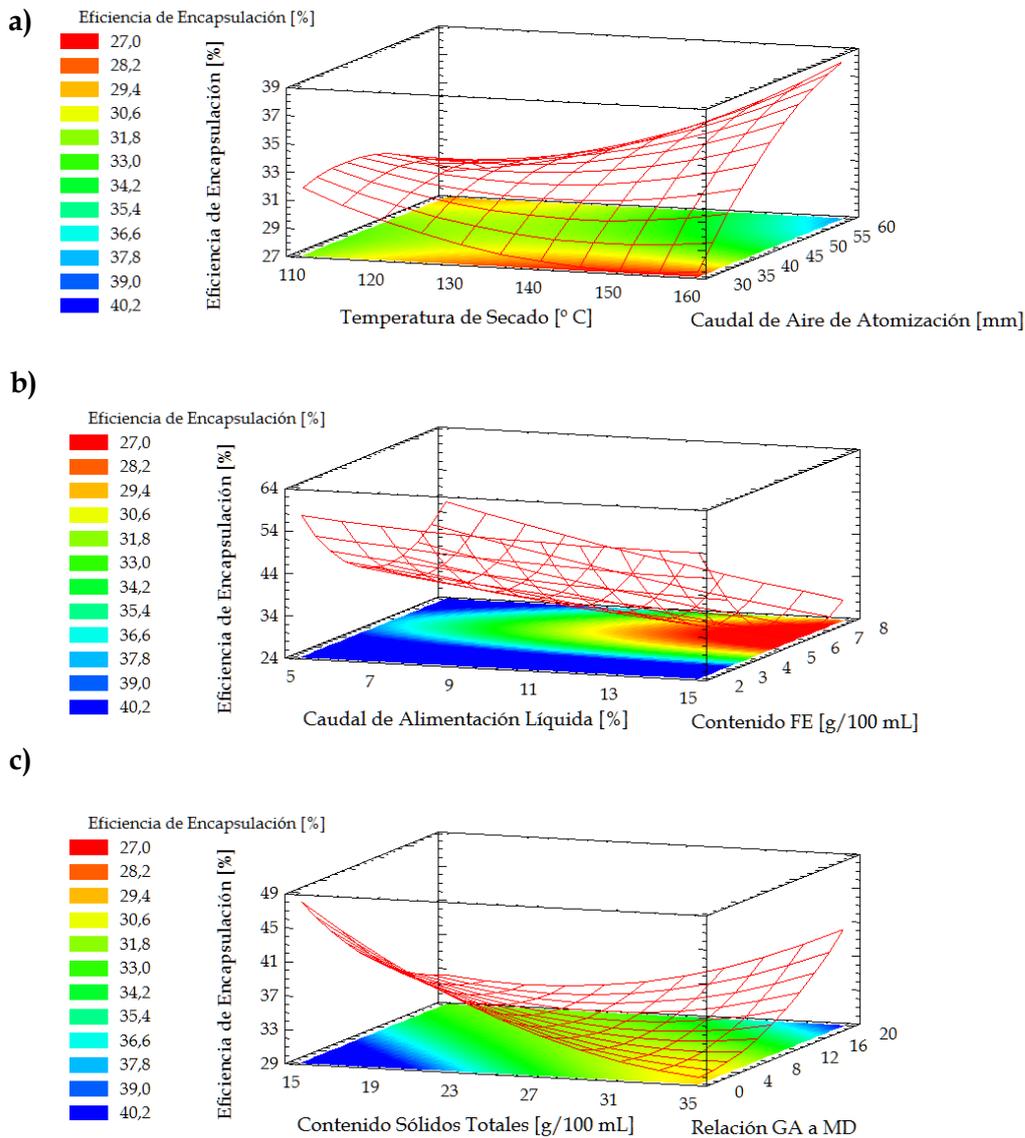


Figura 5.14. Superficies de respuesta para la eficiencia de encapsulación en función de: **a)** la temperatura del aire de secado y el caudal de aire de atomización; **b)** el caudal de la alimentación y el contenido de fitoesteroles; **c)** el contenido de sólidos totales y la relación másica GA a MD.

La Figura 5.15 muestra los efectos de interacción de todos los factores estudiados. En cada par de interacciones, el resto de los factores se mantienen constantes en su valor central. En particular, la interacción entre el contenido de



fitoesteroles y el contenido de sólidos totales (X_4X_5 , Figura 5.15) generó el efecto más significativo sobre la eficiencia de encapsulación. En este sentido, manteniendo el resto de los factores en su punto central, la mejor eficiencia de encapsulación se estimó cuando el contenido de fitoesteroles y el contenido de sólidos totales en la suspensión se encontraron en sus niveles más bajo y alto, respectivamente.

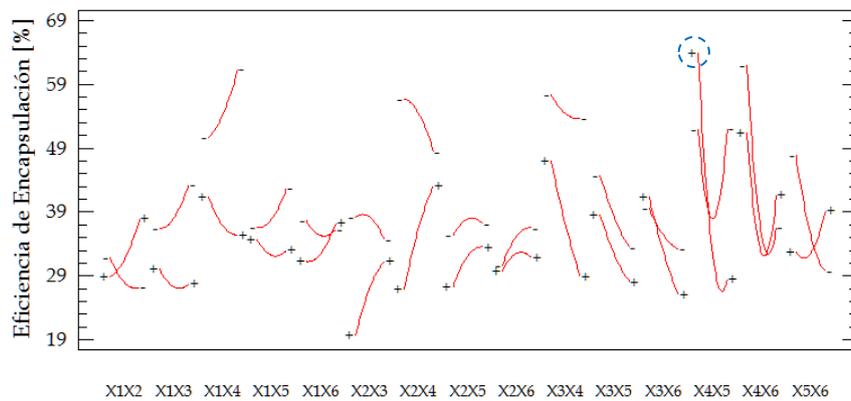


Figura 5.15. Efectos de interacción para la eficiencia de encapsulación.

Finalmente, el procedimiento de optimización estimó una eficiencia de encapsulación máxima de 83.94 % con un nivel de confianza del 95 %, si la temperatura de secado, el contenido de sólidos totales y la relación másica se mantuvieran en su nivel más alto (160 °C, 35 g/100 mL y 19, respectivamente), y el caudal de aire de atomización, la bomba de alimentación de líquido y el contenido de fitoesteroles asumieran su nivel más bajo (30 mm, 5 % y 2 g/100 mL, respectivamente).

5.2.7. Deseabilidad experimental (D)

En la sección precedente se obtuvieron los conjuntos de condiciones que conducen al óptimo de cada respuesta individual y el intervalo de confianza en el que se establece el valor óptimo. Como era de esperar, estos conjuntos fueron diferentes entre sí. En consecuencia, resulta imposible alcanzar un único conjunto de condiciones para el cual todas las respuestas se encuentren en su valor óptimo. Por lo tanto, la



deseabilidad es una herramienta útil para determinar el conjunto de condiciones que asegure un óptimo global del proceso. En este sentido y siguiendo las Ecuaciones (5.11) y (5.12), se definieron las funciones deseabilidad (d_i) para cada una de las respuestas de interés. Para cada función, el correspondiente intervalo de valores se estableció considerando los valores experimentales mínimo y máximo de cada respuesta (presentados en la Sección 5.2. *Resultados*). Además, en todos los casos el peso s se estableció igual a 1. Así, para el rendimiento de secado (d_1), la función deseabilidad quedó definida como:

$$d_1 = \begin{cases} 0 & \text{Si } Y_1 < 25.20 \\ \frac{Y_1 - 25.20}{86.72 - 25.20} & \text{Si } 25.20 < Y_1 < 86.72 \\ 1 & \text{Si } Y_1 > 86.72 \end{cases} \quad (5.23)$$

Por su parte, para el tamaño de partícula en el polvo (d_3):

$$d_3 = \begin{cases} 0 & \text{Si } Y_3 > 16.717 \\ \frac{Y_3 - 16.717}{6.083 - 16.717} & \text{Si } 6.083 < Y_3 < 16.717 \\ 1 & \text{Si } Y_3 < 6.083 \end{cases} \quad (5.24)$$

Para la retención de fitoesteroles (d_5):

$$d_5 = \begin{cases} 0 & \text{Si } Y_5 < 20.50 \\ \frac{Y_5 - 20.50}{85.56 - 20.50} & \text{Si } 20.50 < Y_5 < 85.56 \\ 1 & \text{Si } Y_5 > 85.56 \end{cases} \quad (5.25)$$



Y finalmente, para la eficiencia de encapsulación (d_6):

$$d_6 = \begin{cases} 0 & \text{Si } Y_6 < 9.88 \\ \frac{Y_6 - 9.88}{78.06 - 9.88} & \text{Si } 9.88 < Y_6 < 78.06 \\ 1 & \text{Si } Y_6 > 78.06 \end{cases} \quad (5.26)$$

Una vez establecidas las deseabilidades, la función global (D) se definió mediante la Ecuación (5.15), contemplando un coeficiente de impacto $I_i = 1$, tal que:

$$D = (d_1 d_3 d_5 d_6)^{1/4} \quad (5.27)$$

Introduciendo los valores experimentales de Y_1 , Y_3 , Y_5 e Y_6 , se determinó el valor que toma la deseabilidad global para cada ensayo experimental del diseño. Así, esta herramienta permitió encontrar el conjunto de condiciones que condujo a un óptimo global experimental. En efecto, las corridas 30 y 54 fueron las que presentaron el mejor balance entre las respuestas de interés, con una deseabilidad de 0.91 y 0.88, respectivamente. Para corroborar los óptimos experimentales, ambas corridas fueron replicadas, observándose en estas réplicas una deseabilidad global promedio de 0.87 y 0.94, respectivamente. Si bien no se obtuvieron valores de deseabilidad global exactamente iguales, ambas réplicas mantuvieron sus respuestas dentro de los intervalos de confianza delimitados por los modelos (Tabla A.5.6).

5.2.8. Deseabilidad Ajustada y Optimización

Así como se encontraron las condiciones experimentales para las cuales la deseabilidad observada fue máxima (ensayos óptimos), también fue posible predecir el conjunto de condiciones que conduciría a un óptimo global dentro de la ventana operativa del diseño.

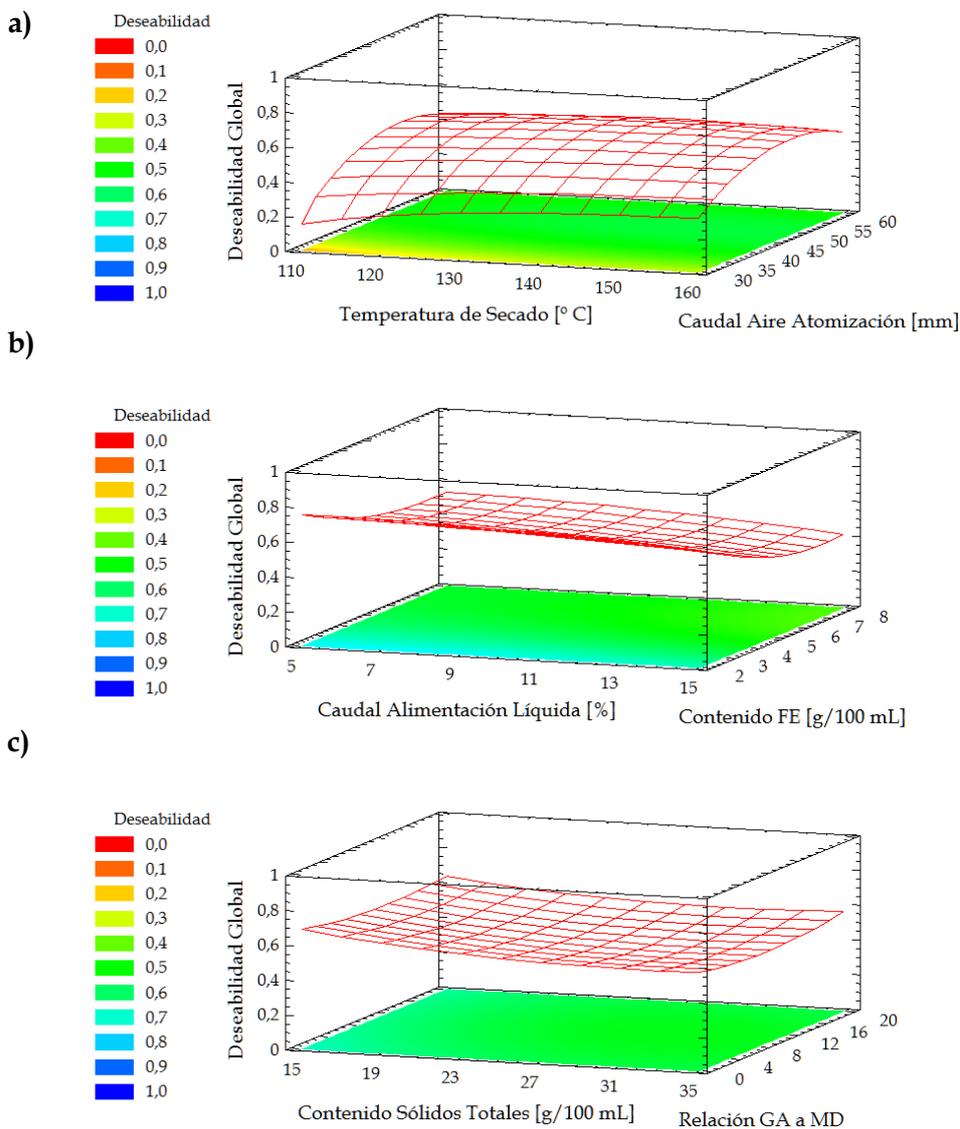


Figura 5.16. Deseabilidad global ajustada en función de: **a)** la temperatura del aire de secado y el caudal de aire de atomización; **b)** el caudal de la alimentación y contenido de fitoesteroles; **c)** el contenido de sólidos totales y la relación másica GA a MD. Para cada gráfica, el resto de las variables se encontraron en su nivel medio.

Para esto, se definió la deseabilidad global ajustada (D') en función de las deseabilidades individuales (d_i) mediante una expresión similar a la Ecuación (5.27). Sin embargo, en este caso, cada d_i se expresó en términos de la ecuación de ajuste (Y'_i)



apropiada de la respectiva respuesta (Ecuaciones (5.18), (5.20), (5.21) y (5.22)). La Figura 5.16 muestra la variación de la deseabilidad global ajustada en función de los diversos factores estudiados.

Una vez especificada la función deseabilidad global ajustada (D'), el proceso matemático iterativo de optimización permitió encontrar el conjunto de condiciones (dentro de la ventana operativa del diseño) que predijo un óptimo global del proceso. Para este proceso iterativo se tuvieron en cuenta diversos puntos iniciales: el punto central, el mejor punto experimental del diseño (corrida 30) y todos los puntos vértices.

Analizando todos los resultados, se detectaron dos puntos óptimos con diferente deseabilidad (Óptimo ① y Óptimo ②) para los conjuntos de condiciones que se describen en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Condiciones de deseabilidad máxima ensayadas.

	Óptimo ①	Óptimo ②
Temperatura de secado	159 °C	160 °C
Caudal de aire de atomización	49 mm	42 mm
Caudal de alimentación líquida	15 %	7 %
Contenido de FE	2.0 g/100 mL	2.0 g/100 mL
Contenido de Sólidos totales	15 g/100 mL	15 g/100 mL
Relación GA a MD	0.0703	2.0575
Deseabilidad media prevista	0.97	0.93

Bajo estas condiciones, los óptimos ① y ② se ensayaron experimentalmente por duplicado. La Tabla 5.4 muestra los resultados de las respuestas de interés del diseño, junto al valor estimado y los intervalos de confianza al 95 % de cada una de ellas.



Tabla 5.4. Comparación de respuestas observadas y predichas en las condiciones óptimas.

Óptimo ①			
	Observado	Predicho	Intervalo de Confianza
Y_1	$85.77 \% \pm 2.14 \%$	90.90%	$83.05 \% - 98.75 \%$
Y_3	$5.478 \mu\text{m} \pm 0.260 \mu\text{m}$	$5.759 \mu\text{m}$	$4.172 \mu\text{m} - 7.347 \mu\text{m}$
Y_5	$85.48 \% \pm 0.03 \%$	84.02%	$65.23 \% - 102.81 \%$
Y_6	$52.03 \% \pm 1.26 \%$	72.36%	$49.47 \% - 95.25 \%$
Deseabilidad	0.89 ± 0.01		
Óptimo ②			
	Observado	Predicho	Intervalo de Confianza
Y_1	$81.73 \% \pm 0.39 \%$	84.36%	$77.93 \% - 90.75 \%$
Y_3	$4.827 \mu\text{m} \pm 0.090 \mu\text{m}$	$5.491 \mu\text{m}$	$4.215 \mu\text{m} - 6.767 \mu\text{m}$
Y_5	$84.62 \% \pm 1.39 \%$	76.59%	$61.31 \% - 91.87 \%$
Y_6	$68.30 \% \pm 7.99 \%$	72.34%	$53.65 \% - 91.03 \%$
Deseabilidad	0.94 ± 0.03		

Si bien la deseabilidad global estimada para el punto óptimo fue mayor, todas las respuestas observadas permanecieron dentro del intervalo de confianza establecido por su modelo individual. Esto puede deberse a que la deseabilidad prevista no contempla que cada respuesta presenta un intervalo de confianza dentro del cual se encuentran los valores ajustados, por lo que sólo representa el valor medio de la deseabilidad prevista.



El punto Óptimo ① condujo a una deseabilidad observada promedio de 0.89, sin presentar diferencias significativas respecto a la deseabilidad promedio de la corrida 30, como así tampoco con la corrida 54. En cuanto a las respuestas individuales, en particular el rendimiento de secado, este Óptimo ① no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) con los ensayos 30 y 54. Tampoco se observaron diferencias significativas en la retención de fitoesteroles y la eficiencia de encapsulación respecto a la corrida 30 ($p > 0.05$), pero sí comparando con la corrida 54 ($p < 0.05$). Por último y en relación al tamaño de partícula en el producto, el Óptimo ① presentó tamaños de partícula significativamente inferiores a aquellos correspondientes tanto a la corrida 30 como a la 54 ($p < 0.05$).

Por otro lado, el punto Óptimo ② presentó una deseabilidad observada promedio de 0.94, cercana a la estimada por la función ajustada pero sin diferencias significativas respecto al Óptimo ① ($p > 0.05$) y a los ensayos experimentales 30 y 54. Más aun, y en relación con las respuestas individuales, el Óptimo ② no presentó diferencias significativas en ninguna de ellas con respecto al ensayo 30 ($p > 0.05$), salvo en el tamaño de partícula de producto que resultó significativamente más pequeño ($p < 0.05$). En comparación con el ensayo 54, el Óptimo ② no mostró diferencias significativas en la eficiencia de encapsulación, pero sí lo hizo en el rendimiento de secado, el tamaño de partícula en el producto y la retención de fitoesteroles.

5.3. Conclusiones

En el transcurso del presente capítulo se explicaron las diferentes contribuciones de los factores de formulación y de procesamiento sobre las distintas respuestas de interés.

En particular, el rendimiento de secado se vio principalmente afectado por el caudal de aire de atomización, en sus contribuciones lineal y cuadrática; mientras que, como era de esperar, el contenido de fitoesteroles en las suspensiones fue el factor más relevante sobre el tamaño medio de las partículas, tanto en suspensión como de producto. En este contexto, también se observó un cambio en la distribución de tamaño



de partículas como consecuencia del proceso de secado. Así, en todos los casos se logró reducir el ancho de las distribuciones, eliminando los picos modales correspondientes a los tamaños más grandes.

Por otra parte, se encontró que la retención de fitoesteroles estuvo afectada principalmente por el caudal de aire de atomización, mientras que la eficiencia de encapsulación podría incrementarse considerablemente a través de la modificación del contenido de fitoesteroles y su interacción con el contenido de sólidos totales, así como también variando el caudal de alimentación líquida.

Una vez identificados los principales factores que están involucrados en las respuestas de interés, se establecieron los modelos de segundo orden con interacciones para ajustar las respuestas más relevantes del proceso de microencapsulación. Los modelos obtenidos representaron adecuadamente los datos experimentales, presentando además buenos coeficientes de correlación (R^2).

Cada una de las respuestas de interés ajustada se analizó de manera individual para identificar las condiciones experimentales que conducen a su óptimo individual. Debido a que los conjuntos de condiciones no fueron iguales en todas las respuestas, se realizó el análisis de optimización simultánea utilizando la función deseabilidad.

La deseabilidad global experimental se evaluó en función de las respuestas observadas en cada punto del diseño y de los intervalos de valores donde se encontró cada respuesta. De esta manera, los ensayos experimentales que presentaron mejores resultados en términos globales (mejor deseabilidad) fueron el 30 y el 54, con una deseabilidad de 0.91 y 0.88, respectivamente. Para estos ensayos la temperatura de secado se mantuvo en 135 °C, mientras que la altura del rotámetro que ajusta el caudal de aire de atomización estuvo en 45 mm (536 L/h), la concentración de fitoesteroles en 2 g/100 mL, el contenido de sólidos totales en 25 g/100 mL y la relación másica GA a MD en 0.0526. La única diferencia entre estos dos ensayos fue el caudal de alimentación líquida, que en el ensayo 30 estuvo fijada en un 15 % (4 mL/min, aproximadamente), mientras en el ensayo 54 se fijó en 5 % (1.5 mL/min, aproximadamente). Ambos ensayos fueron replicados y los resultados de estas réplicas se mantuvieron muy cercanos a los originales.



Asimismo, se encontraron óptimos globales definiendo la función deseabilidad ajustada en función de los modelos obtenidos para cada respuesta. Ambos óptimos ajustados se ensayaron experimentalmente y se observó que representaron de manera adecuada los valores predichos para cada respuesta ajustada. En efecto, con las condiciones ajustadas se obtuvieron rendimientos de hasta un 85 %, tamaños medio de partículas en el producto de 4.8 μm , una retención de fitoesteroles superior al 85 % y una eficiencia de encapsulación de hasta 68 %.



Capítulo VI

APLICACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS



CAPÍTULO 6. APLICACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS

6.1. Introducción

En los últimos años, el interés por alimentos funcionales creció enormemente impulsado por el reconocimiento de la relación existente entre la dieta y la salud por parte de los consumidores, el acceso a una educación nutricional y el envejecimiento de la población mundial, entre otros aspectos (Alexander, Acero Lopez, Fang & Corredig, 2012; Paul Paquin PhD, 2009; Salmerón, Thomas & Pandiella, 2015). Con ello, el desarrollo de nuevas tecnologías para incorporar componentes promotores de la salud en los alimentos está aumentando de manera sustancial (Alexander *et al.*, 2012; Salmerón *et al.*, 2015), con un ascenso en la venta de bebidas basadas en probióticos, antioxidantes, frutas y extractos, compuestos preventivos contra el envejecimiento, compuestos para promover la salud cardiovascular, ingredientes naturales y orgánicos, etc. (Paul Paquin PhD, 2009).

Los vehículos para incluir estos compuestos en los alimentos necesitan no sólo ser capaces de incorporar estos ingredientes eficientemente y liberarlos de manera controlada, sino también proteger su bioactividad contra la degradación y prevenir las interacciones con los demás componentes presentes en la matriz del alimento (Alexander *et al.*, 2012).

Las suspensiones son sistemas naturalmente inestables pero pueden ser considerados cinéticamente estables si su velocidad de desestabilización es suficientemente baja comparada con su esperanza de vida (Mengual, Meunier, Cayre, Puech & Snabre, 1999). Del mismo modo que la separación de fases de una emulsión puede ejercer influencia en el sabor y otras propiedades organolépticas (por ejemplo, el color) de una bebida, y así limitar su vida útil (Chaudhari, Pan & Nitin, 2015), los demás sistemas dispersos (espumas y suspensiones) pueden presentar consecuencias similares si no fueron desarrollados de manera apropiada para evitar su desestabilización.



Los dos grupos principales de fenómenos de desestabilización que afectan la homogeneidad de dispersiones son la *migración* (por cremado y sedimentación) y la variación en el tamaño de las partículas o *agregación* (por coalescencia y floculación) (Matsumiya *et al.*, 2014; Mengual *et al.*, 1999; Schramm, 2005).

La estabilidad se puede determinar mediante dos tipos de estrategias. Una de ellas está basada en *predecir* la estabilidad mediante la medición del potencial Z en la superficie de las partículas. Este enfoque puede emplearse fácilmente en preparaciones simples, pero resulta inviable en formulaciones complejas (múltiples componentes). Por otro lado, los ensayos de *envejecimiento* consisten en almacenar las preparaciones en condiciones específicas (de temperatura, luz, oxígeno, etc.) y someterlas a un análisis regular de estabilidad. En cualquier caso, la desestabilización puede ser juzgada por inspección visual o por instrumentos analíticos (microscopía, espectroscopía, turbidimetría y análisis de tamaño de partícula) (Liu, Yang & Huang, 2011; Matsumiya *et al.*, 2014; Mengual *et al.*, 1999).

La dispersión de la luz es una técnica útil para estudiar los fenómenos de desestabilización en emulsiones y suspensiones (Dudášová, Flåten, Sjöblom & Øye, 2009). En este sentido, cuando un haz de luz incide sobre una suspensión, parte de esta luz es absorbida, otorgándole una apariencia turbia al sistema de estudio, mientras el resto de la energía es dispersada y transmitida (Schramm, 2005). La intensidad de la luz dispersada depende principalmente del tamaño y la forma de las partículas y de la diferencia en el índice de refracción entre las fases (Schramm, 2005).

En el presente capítulo se presenta el estudio de la redispersión de las microcápsulas obtenidas a partir de los puntos óptimos del diseño de experimentos desarrollado en el capítulo precedente. En particular, se aborda el análisis de la estabilidad de las suspensiones obtenidas a partir de estos óptimos mediante su redispersión en agua y en un polvo de preparación instantánea, tipo jugo.

Estos ensayos fueron realizados para: verificar la aplicabilidad de los productos obtenidos en los Óptimos ① y ② en los sistemas de estudio, observar las mejoras obtenidas respecto al uso de fitoesteroles no encapsulados y, finalmente, determinar el tipo de uso que puede darse a las microcápsulas correspondientes a los Óptimos ① y



② en función de los resultados de estabilidad. En este sentido, la aplicación de aquellos polvos de microcápsulas que generen suspensiones estables en el tiempo o cuya inestabilidad se dé en forma paulatina, será orientada a aquellos alimentos de consumo prolongado o con un mayor tiempo de vida útil. En su defecto, aquellos sistemas que se desestabilicen de manera más inmediata, podrán ser orientados a productos alimenticios de consumo instantáneo.

6.2. Desarrollo experimental

6.2.1. Redispersabilidad

Una vez obtenidos los puntos que maximizaron la función deseabilidad, Óptimo ① y Óptimo ②, se realizó el estudio de dispersabilidad de estos productos, siguiendo la metodología descrita en la Sección 2.2.6.4. *Redispersabilidad*.

6.2.2. Estabilidad

Asimismo, se evaluó la estabilidad de los Óptimos ① y ② en suspensiones acuosas, de acuerdo a la descripción detallada en la Sección 2.2.6.5. *Turbidez*. A modo comparativo y como caso base, se estudió el comportamiento del polvo comercial de fitoesteroles sin encapsular (de origen) suspendido en agua por simple mezclado (FE_Susp), como así también, sometido a 4 minutos de sonicado (FE_Sonic).

Los medios acuosos seleccionados fueron agua destilada a temperatura ambiente (21 °C) y una bebida analcohólica artificial dietética de bajas calorías preparada a partir de polvo marca Clight sabor naranja (Mondēlez International, Inc.) según las indicaciones del envase (en 1 L de agua destilada). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado a temperatura ambiente. Luego de la preparación de la suspensión y su colocación en la celda de medición, cada ensayo se realizó inmediatamente.



6.2.2.1. Principio de medición e interpretación de los resultados

Como se mencionó con anterioridad, cuando un haz de luz incide sobre una muestra, parte de la luz no absorbida es retrodispersada y otra parte es transmitida. El equipo Turbiscan Classic MA2000 (Sección 2.2.6.5. *Turbidez*), registra ambas fracciones de la luz, permitiendo analizar los diferentes fenómenos de desestabilización que pueden surgir de una suspensión.

Tanto el flujo de luz retrodispersada (*Back Scattering, BS*) como el de luz transmitida (*Transmission, T*) están relacionados directamente con el tamaño de las partículas y con la concentración volumétrica de los sólidos dispersos (Formulation, 2000) (Figura 6.1). En particular, cuando el tamaño de las partículas es menor a la longitud de onda de trabajo (850 nm), la retrodispersión de la luz aumenta con el tamaño, mientras que por encima de esa longitud de onda, ese flujo disminuye (Figura 6.1a). Un efecto opuesto se observa en la transmitancia alrededor de un tamaño de partículas crítico, que en principio es desconocido (Figura 6.1c).

Por otro lado, la retrodispersión y la transmitancia también se ven afectadas por la concentración volumétrica de sólidos dispersos (Figura 6.1b y Figura 6.1d, respectivamente). En este sentido, de acuerdo a modelos físicos, el flujo de retrodispersión se incrementa con la fracción volumétrica de sólidos (ϕ) dentro de un intervalo definido entre la concentración crítica (ϕ_c) y la concentración de sólidos de saturación (ϕ_s) (Figura 6.1b). La saturación en la señal dada a concentraciones de sólidos por encima de ϕ_s puede ser explicada a partir de un fenómeno de difusión dependiente, donde las partículas están tan cerca que se organizan espacialmente y producen interferencias en la difusión proveniente de cada partícula. Estas interferencias pueden inducir un aumento en el recorrido medio de los fotones y, por lo tanto, una reducción en el flujo de retrodispersión.

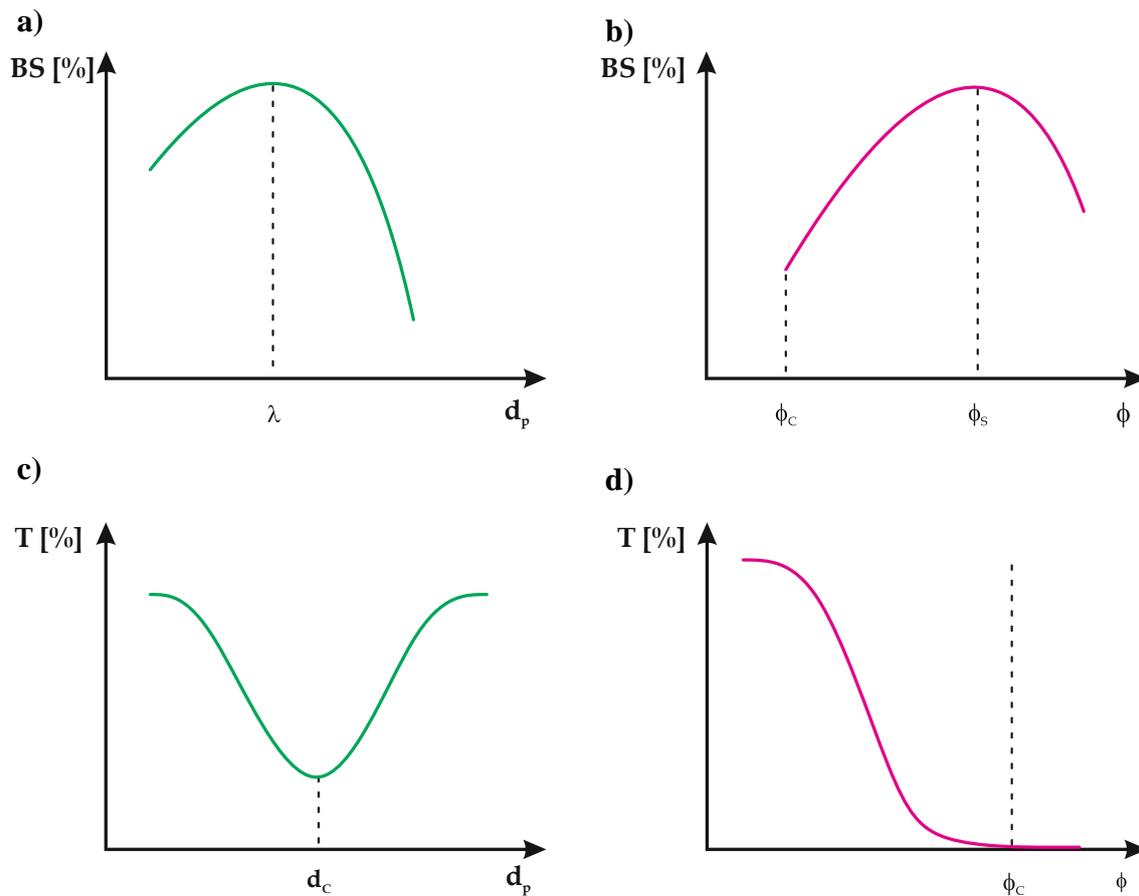


Figura 6.1. Variación de los flujos de retrodispersión (a y b) y transmisión (c y d) en función del tamaño medio de partícula (d_p) (a y c) y de la concentración volumétrica de sólidos dispersos (ϕ) (b y d).

La concentración volumétrica crítica (ϕ_c) se corresponde con la concentración a la que los fotones comienzan a ser transmitidos. Para concentraciones por debajo de ϕ_c (llamado régimen de transmitancia), se puede observar un incremento en el flujo de retrodispersión, debido a las reflexiones internas en la celda de medición, por lo que en esta zona la retrodispersión no constituye una herramienta confiable de análisis. Finalmente, la transmisión de la luz disminuye de forma exponencial con la concentración de sólidos y se anula cuando la concentración alcanza el valor de ϕ_c (Figura 6.1d). A partir de ϕ_c , el estudio de la transmitancia no provee resultados de utilidad, y esta zona se denomina régimen de retrodispersión.



En este contexto, el estudio de estabilidad consistió en el seguimiento temporal de los perfiles de transmitancia ($T\%$) y retrodispersión de la luz ($BS\%$) a lo largo de la celda de medición. Una vez obtenidos, se pudieron identificar diferentes zonas a lo largo de la celda (fondo, centro y tope) en función de los perfiles temporales.

Los primeros 6 - 7 mm, aproximadamente, no se tuvieron en cuenta en el análisis porque se correspondieron con la presencia del tapón en la base de la celda. En función de los perfiles observados, se establecieron los distintos fenómenos de desestabilización en cada zona, los cuales se estudiaron en términos de la velocidad con que sucedieron y su extensión espacial.

Para este análisis, resultó más apropiada la representación de los perfiles de manera relativa a la primera medida, es decir, el cambio en transmitancia y retrodispersión relativos al primer ensayo ($t = 0$), expresados como $\Delta T (\%)$ y $\Delta BS (\%)$, respectivamente. De este modo, las variaciones observadas se explicaron respecto al tiempo inicial de medición, facilitando la identificación de zonas de desestabilización y la estimación de los espesores de las mismas y su velocidad de formación.

6.3. Resultados

6.3.1. Redispersión de los Óptimos ① y ②

Los productos obtenidos en las condiciones óptimas resultaron fácilmente redispersables a 750 rpm y temperatura ambiente, tanto en agua como en la bebida artificial instantánea Clight. En efecto, ambas muestras fueron dispersadas en tiempos inferiores a un minuto (entre 40 y 50 segundos) en ambos sistemas, manteniendo además su tamaño medio de partícula en el tiempo luego de su dispersión. De esta manera, se garantizó la aplicabilidad de los productos en agua y en la bebida artificial Clight, con tiempos de redispersión sumamente inferiores a los obtenidos fuera de las condiciones óptimas de trabajo (ver Sección 4.3.8. *Redispersabilidad*).



6.3.2. Estabilidad de Fitoesteroles en agua

La Figura 6.2 presenta los perfiles axiales obtenidos de transmitancia y retrodispersión de la luz para la suspensión de fitoesteroles en función del tiempo (hasta 100 horas).

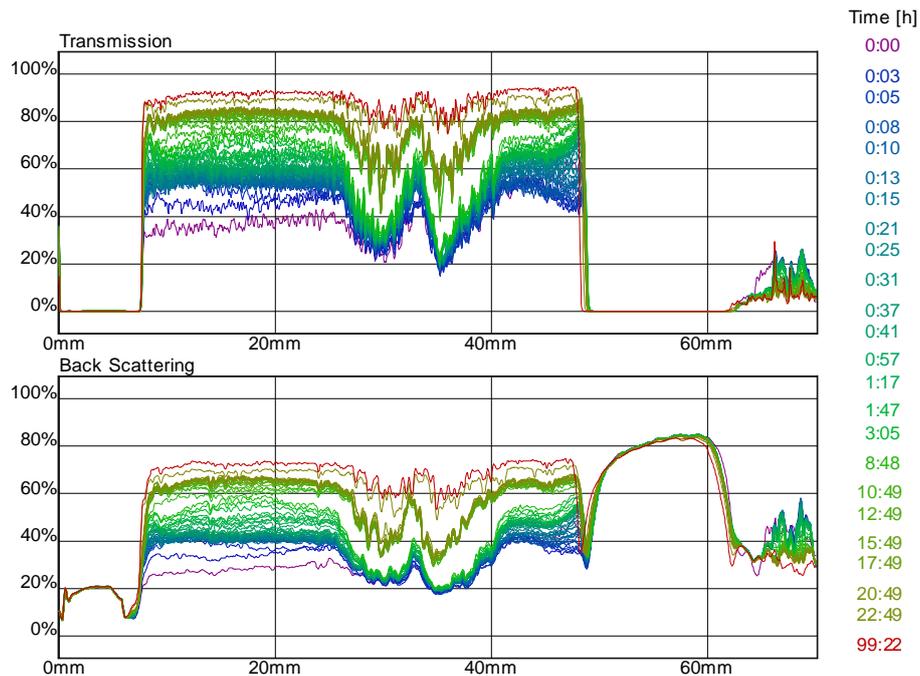


Figura 6.2. Perfiles de transmisión (*Transmission*) y retrodispersión (*Back Scattering*) de luz para la suspensión de fitoesteroles.

Como se mencionó en reiteradas oportunidades, los fitoesteroles son compuestos hidrofóbicos, cuya densidad es inferior a la del agua. Estas dos propiedades también fueron observadas cuando se realizaron estos ensayos de turbidez. En efecto, y como se aprecia en el perfil de transmitancia, entre 50 mm y 64 mm de altura, este parámetro se redujo a cero inclusive en el instante inicial de medición, indicando que la concentración de partículas en esa región fue suficientemente alta como para reducir la transmisión de la luz incidente. En conclusión, el fenómeno de cremado se dio de manera inmediata, incluso antes de ser



obtenida la primera medición. Asimismo, no existió una variación significativa de esta zona en el tiempo, por lo que las curvas se superpusieron de forma casi exacta.

Por otra parte, este fenómeno de cremado condujo a concentraciones de sólidos más bajas en la zona central de la celda de medición. Así, desde aproximadamente 7 mm hasta 50 mm, el sistema diluido mostró una elevada transmitancia. En estas condiciones de concentración, se desaconseja el análisis de los perfiles de retrodispersión, por verse afectados por grandes reflexiones con las paredes de la celda.

La Figura 6.3 muestra la variación temporal de la transmitancia relativa a la primera medida (tiempo inicial), que surge de promediar los datos de la zona central de los perfiles (9 mm a 50 mm). En ella se observa un incremento de la transmitancia en función del tiempo, posiblemente ocasionado por un aumento en el tamaño de las partículas dispersas, debido a su agregación. Esta agregación de las partículas se produce inicialmente y de manera rápida, provocando un aumento repentino y considerable en la transmitancia relativa. Conforme disminuye el número de partículas individuales dispersas, la velocidad de agregación disminuye, y por ende disminuye también la variación temporal en la transmitancia relativa.

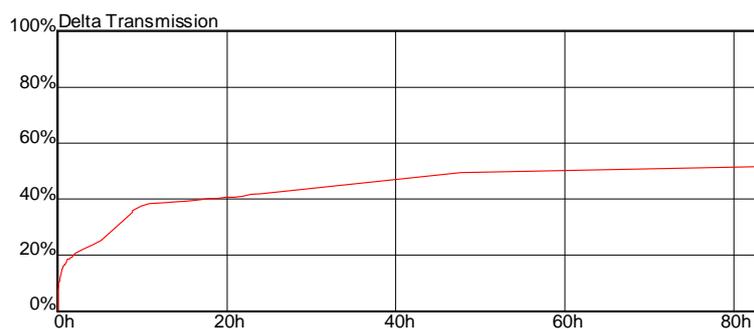


Figura 6.3. Valor medio de la zona central (9 mm a 50 mm) del perfil de $\Delta T\%$, para la suspensión acuosa de fitoesteroles, en función del tiempo.



6.3.3. Estabilidad de Óptimo ① y Óptimo ② en agua

De la misma manera, se realizó el estudio de las suspensiones acuosas de las microcápsulas de fitoesteroles obtenidas en las condiciones óptimas alcanzadas en el diseño de experimentos. La Figura 6.4 muestra los perfiles axiales de transmitancia (T) y retrodispersión (BS) de la luz para el Óptimo ① a distintos tiempos de ensayo. La transmitancia y la retrodispersión fueron superiores en la zona central de la muestra (10 mm hasta 64 mm, aproximadamente), producto de la presencia de partículas en suspensión que proveyeron turbidez a la muestra.

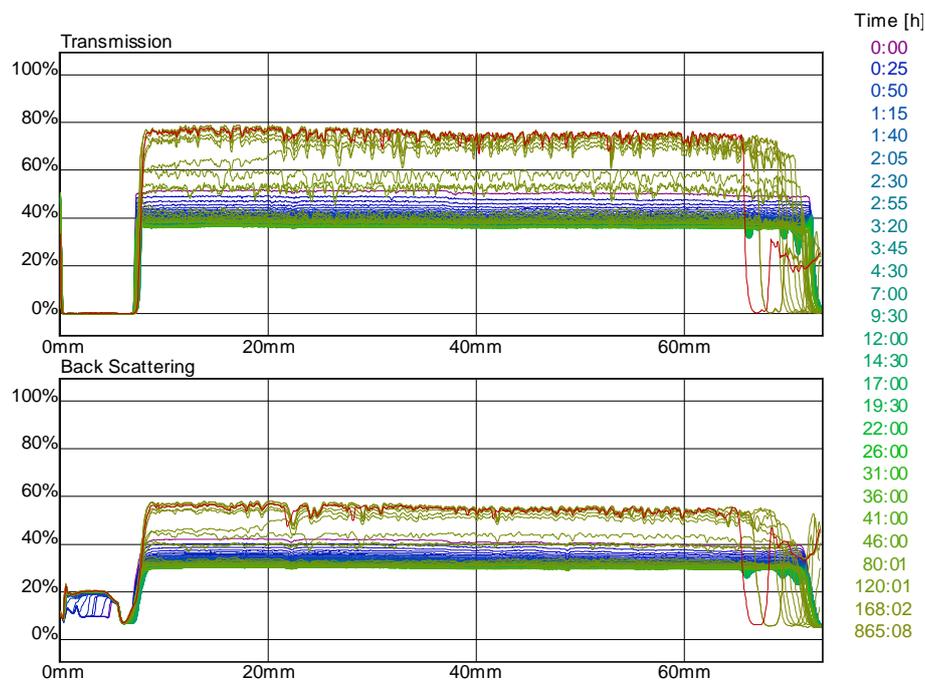


Figura 6.4. Perfiles de transmisión (*Transmission*) y retrodispersión (*Back Scattering*) de luz para la suspensión acuosa del Óptimo ①.

En estos perfiles se pudieron identificar 3 zonas (fondo, centro y tope) con distinto comportamiento temporal (Figura 6.4). En el caso del fondo de la muestra Óptimo ① (Figura 6.5a), tanto la transmitancia como la retrodispersión fueron reduciéndose paulatinamente durante las primeras 7 horas, aproximadamente,



advirtiendo la formación de una fase precipitada con concentraciones muy bajas de partículas (por debajo de la concentración crítica, ϕ_c).

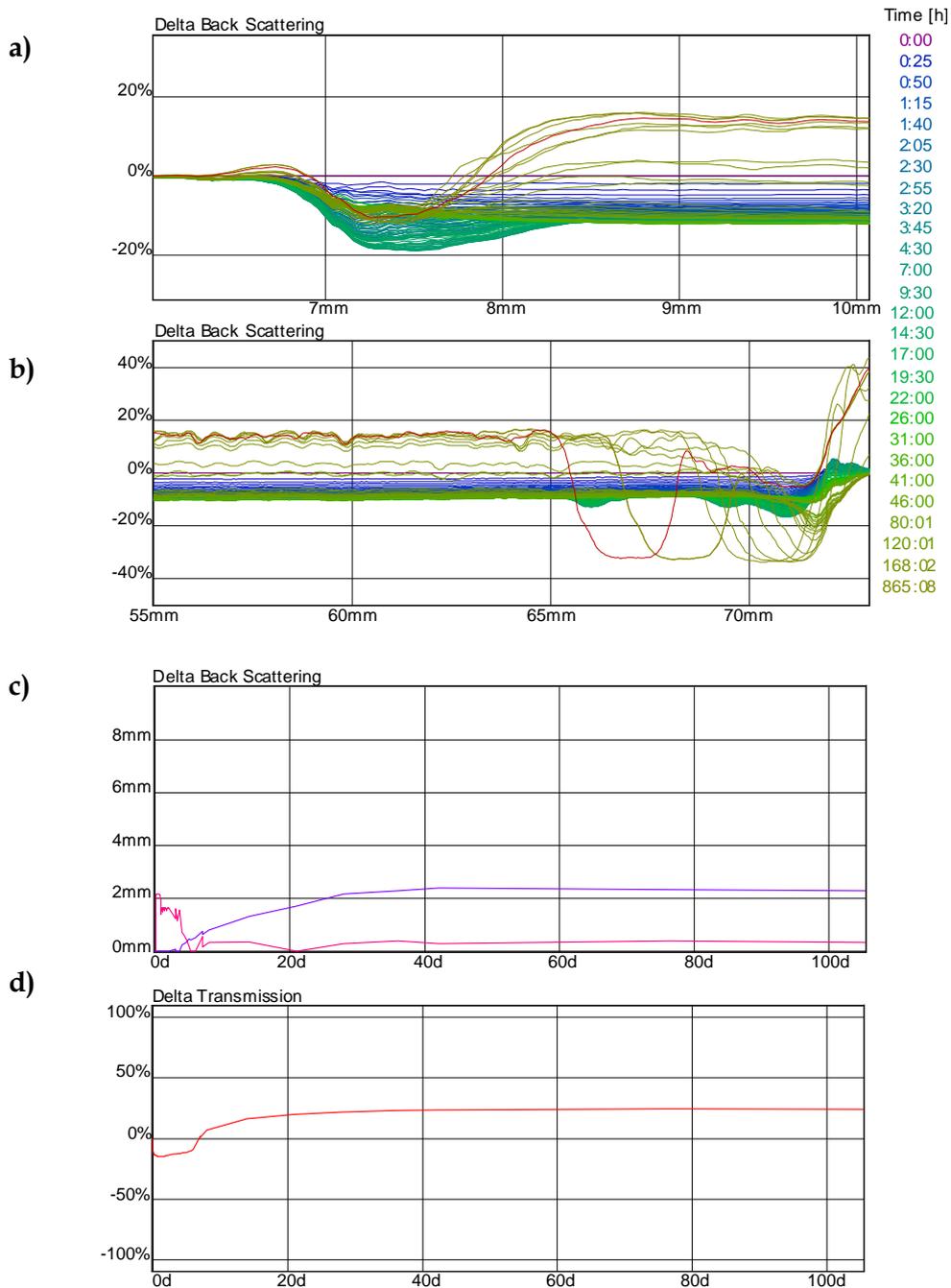


Figura 6.5. Perfiles de retrodispersión relativos al tiempo inicial del Óptimo ①: **a)** en la base; **b)** en el tope de la muestra; **c)** Espesor de fases inferior (—) y superior (—) en función del tiempo (en días) de ensayo; **d)** Variación de la transmitancia relativa media en la zona central de la muestra.



La representación de la retrodispersión relativa en el tiempo (ΔBS) permitió corroborar este efecto en la base de la celda de medición (Figura 6.5a). En estas condiciones, utilizando el perfil de ΔBS se pudo establecer el espesor de la fase incipiente en 2.12 mm, aproximadamente, es decir, un 2.90 % del volumen total de muestra (Figura 6.5c). Este pequeño precipitado permaneció por un breve lapso de tiempo, para luego comenzar a reincorporarse al resto de la muestra, indicando que las interacciones entre las partículas eran muy débiles. Hacia el final del período de ensayo (105 días), su espesor fue de 0.32 mm; es decir, un 0.4 % del volumen total de muestra.

El mismo fenómeno de formación de fases se observó en el tope de la celda de medición (Figura 6.5b), donde el cremado comenzó luego de 90 horas, aproximadamente, alcanzando cerca de 2.28 mm de espesor hacia el final del ensayo (3.12 % del volumen total de muestra) (Figura 6.5c).

Finalmente, la zona central de la muestra presentó una variación temporal tanto en la transmitancia como en la retrodispersión de la luz, análoga a la que se presenta cuando la concentración volumétrica de partículas es inferior a la crítica (Figura 6.1). En estas condiciones, un análisis de la transmitancia resultó apropiado para indicar la presencia de un fenómeno de aumento de tamaño a tiempos relativamente bajos (1.5 días, aproximadamente), producto de la agregación de partículas. A partir de entonces, y respondiendo al fenómeno de cremado discutido anteriormente, y en menor grado a la formación de la pequeña fase de precipitado, la concentración de partículas en la zona central disminuyó, ocasionando así un aumento en la transmitancia.

La Figura 6.6 muestra los perfiles axiales de transmitancia y retrodispersión de la luz para el Óptimo ② a distintos tiempos de ensayo. La transmitancia y la retrodispersión fueron superiores en la zona central de la muestra (11 mm hasta 63 mm, aproximadamente).

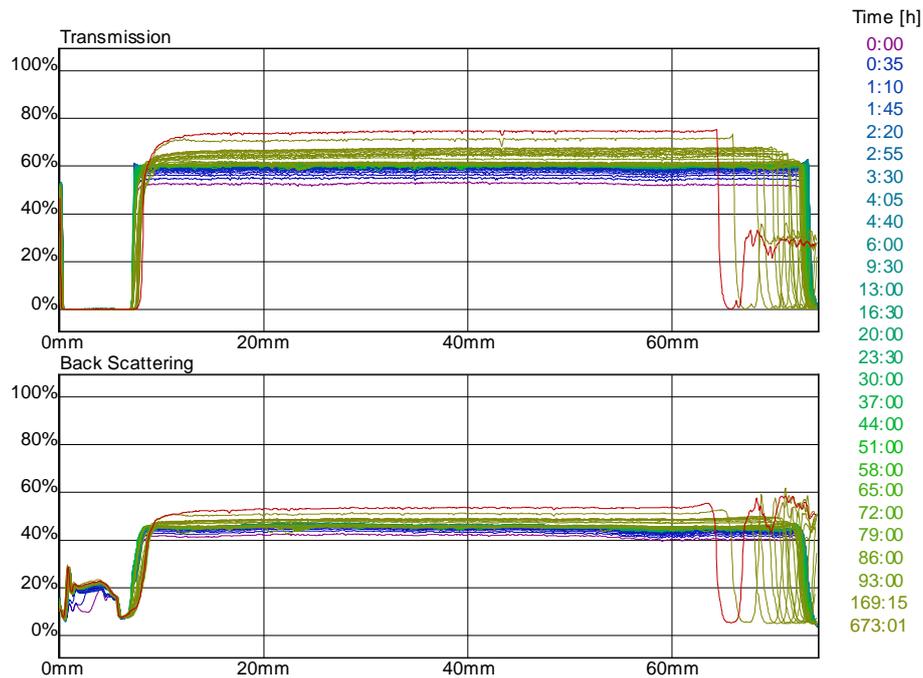


Figura 6.6. Perfiles de transmisión (*Transmission*) y retrodispersión (*Back Scattering*) de luz para la suspensión acuosa del Óptimo ②.

De la misma manera, el Óptimo ② presentó variaciones temporales tanto en la zona central como en los extremos (fondo y tope) de la muestra (Figura 6.7a y Figura 6.7b). En este sentido, se observó que luego de 4 días de ensayo, se hizo visible la formación de una fase precipitada en el fondo de la celda de medición (Figura 6.7c). Esta fase creció paulatinamente hasta alcanzar 1.16 mm de espesor (1.56 % del volumen total de la muestra) hacia el final del tiempo de medición (124 días).

Respecto al tope de la muestra, en esta zona se comenzó a formar una fase de cremado luego de transcurridos 1.5 días (Figura 6.7c), que evolucionó hasta alcanzar 2.52 mm (3.39 % del volumen total de muestra), aproximadamente, al finalizar el estudio. Asimismo, para elevados tiempos de ensayo, se observó que esta fase se fue trasladando hacia longitudes más bajas sin modificarse considerablemente la retrodispersión relativa (Figura 6.7b). Este efecto pudo deberse a la evaporación del agua contenida y su condensación observada por encima de la altura de medición, que disminuyó el nivel de muestra observado.

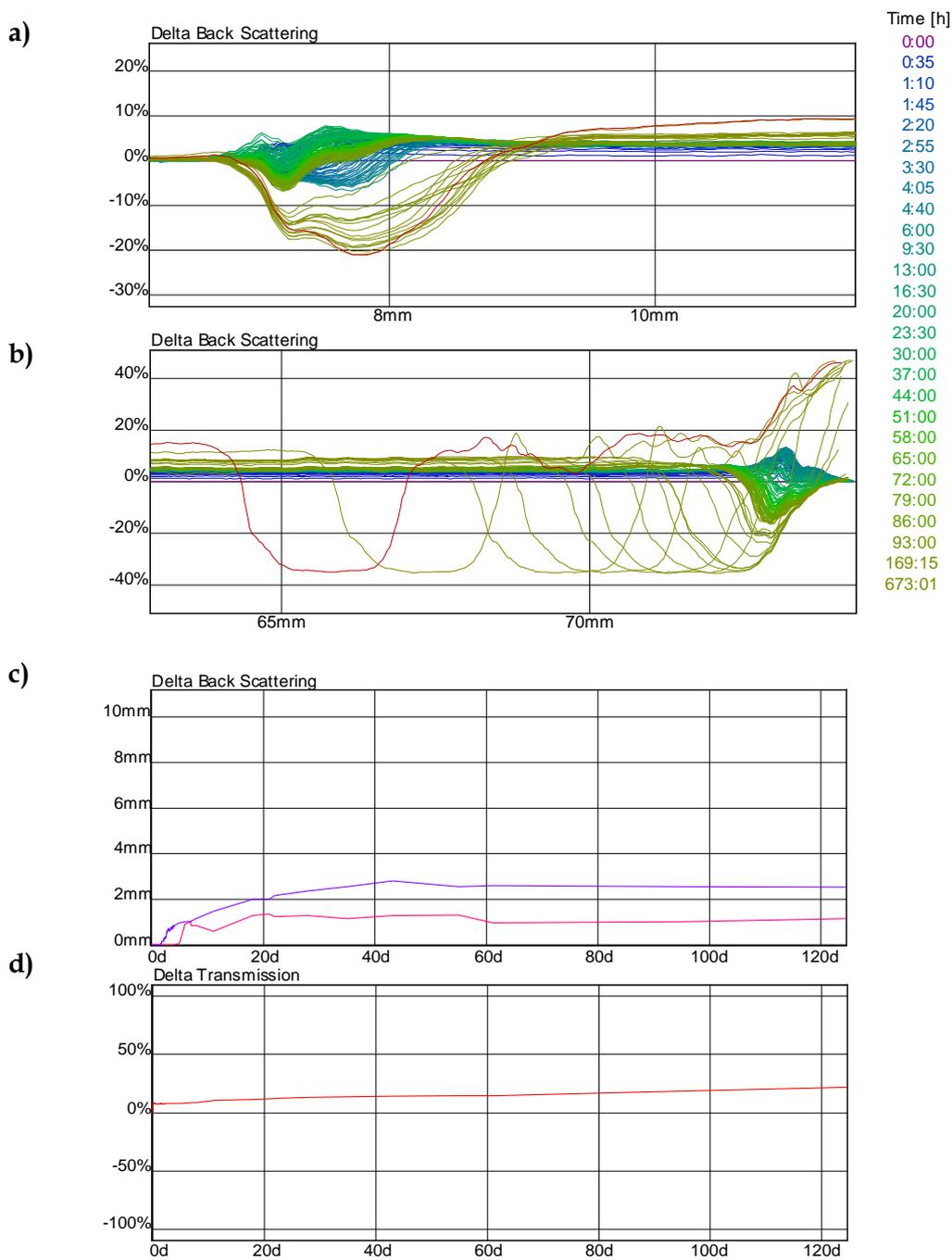


Figura 6.7. Perfiles de retrodispersión relativos al tiempo inicial del Óptimo (2): **a)** en la base; **b)** en el tope de la muestra; **c)** Espesor de fases inferior (—) y superior (—) en función del tiempo (en días) de ensayo; **d)** Variación de la transmitancia relativa media en la zona central de la muestra.



Como sucedió con el Óptimo ①, la zona central presentó un aumento progresivo en la transmitancia, generado en gran parte por la disminución en la concentración de partículas presentes en esta zona (Figura 6.7d), posiblemente acompañado de un aumento en el tamaño medio de las partículas debido a un proceso de agregación.

De esta manera, y en base a los resultados de los Óptimos ① y ② en agua (Figura 6.8), es posible concluir que ambas muestras obtenidas pudieron aplicarse en agua y lograron permanecer estables en el tiempo con una fase inminente que representó sólo una fracción muy pequeña del volumen total de muestra y cuya evolución temporal fue muy lenta comparada con la de los fitoesteres sin tratamiento. Observando la formación de las fases en el tiempo, se encontró que el Óptimo ① tuvo un comportamiento más estable a tiempos elevados (luego de 20 días), donde ambas fases se formaron más lentamente y terminaron alcanzando menores espesores que el Óptimo ②. Por otro lado, a tiempos cortos de estudio (por ejemplo, 1 día), el Óptimo ② mostró una mejor performance, dado que no presentó separación de fases en ese período.

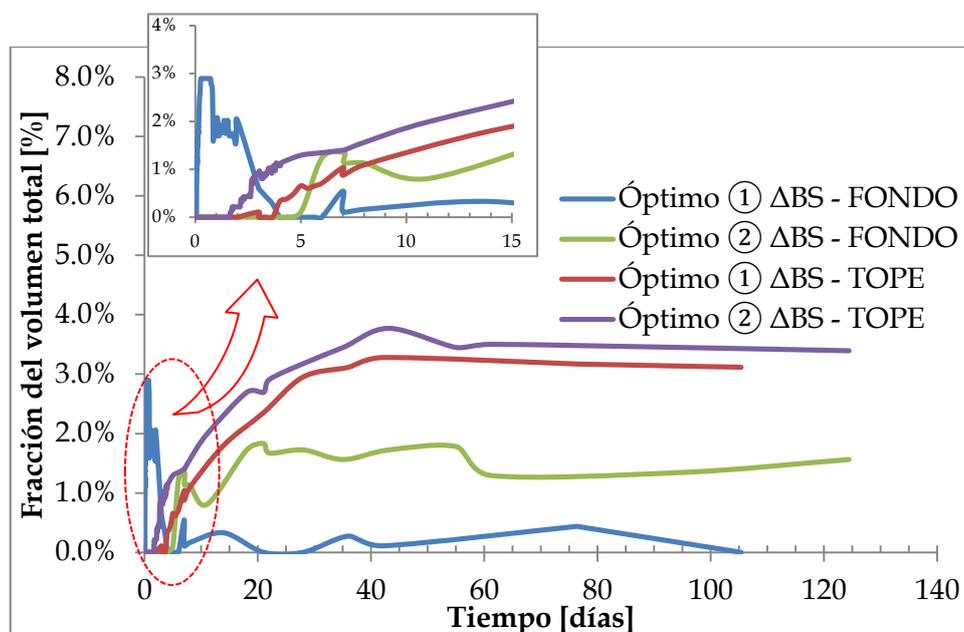


Figura 6.8. Evolución temporal de las fases de precipitado y cremado en las suspensiones acuosas de los Óptimos ① y ②.



6.3.4. Estabilidad de Óptimo ① y Óptimo ② en la bebida artificial de preparación instantánea

De la misma manera, los productos fueron incorporados a la bebida artificial obtenida a partir del polvo Clight de preparación instantánea y se estudió la turbidez en función del tiempo por un período de 14 días, prestando especial énfasis al primer día de reposo, debido a que constituye el tiempo de consumo recomendado luego de la preparación. A modo comparativo, también se analizó la estabilidad de la bebida artificial sin fitoesteroles.

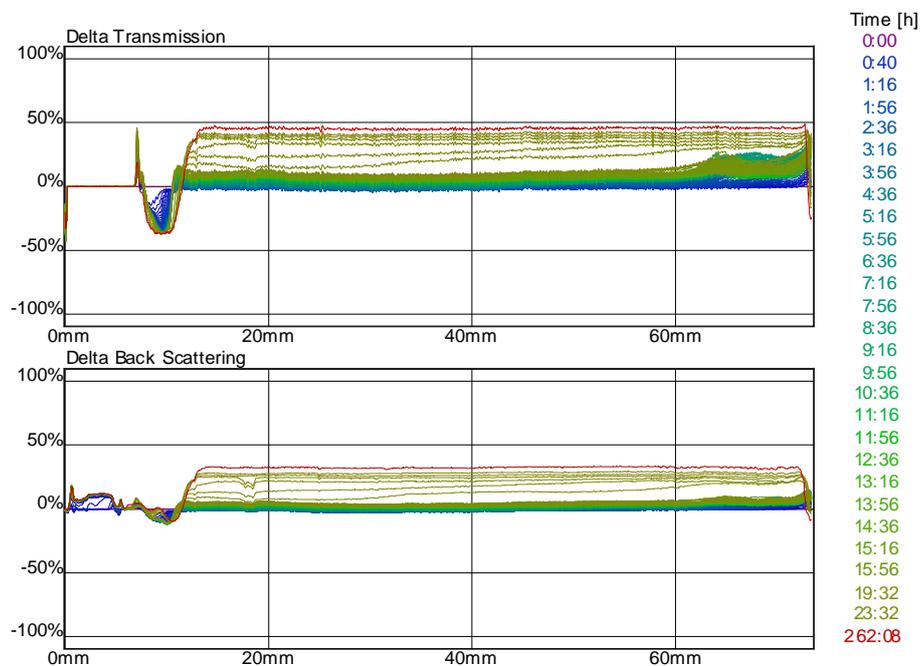


Figura 6.9. Perfiles de transmisión (*Transmission*) y retrodispersión (*Back Scattering*) de luz para la bebida artificial Clight.

La Figura 6.9 muestra la evolución temporal de los perfiles axiales de transmitancia y retrodispersión para la bebida artificial. En ellos se puede distinguir la formación de una fase precipitada, acompañada de un fenómeno de clarificación en la zona superior del tubo, sin detectar una fase definida en dicha zona. Por otra parte, se observó un aumento de ambas medidas en la zona central del tubo, producto del



aumento en el tamaño de los flóculos formados desde los primeros minutos luego de la preparación.

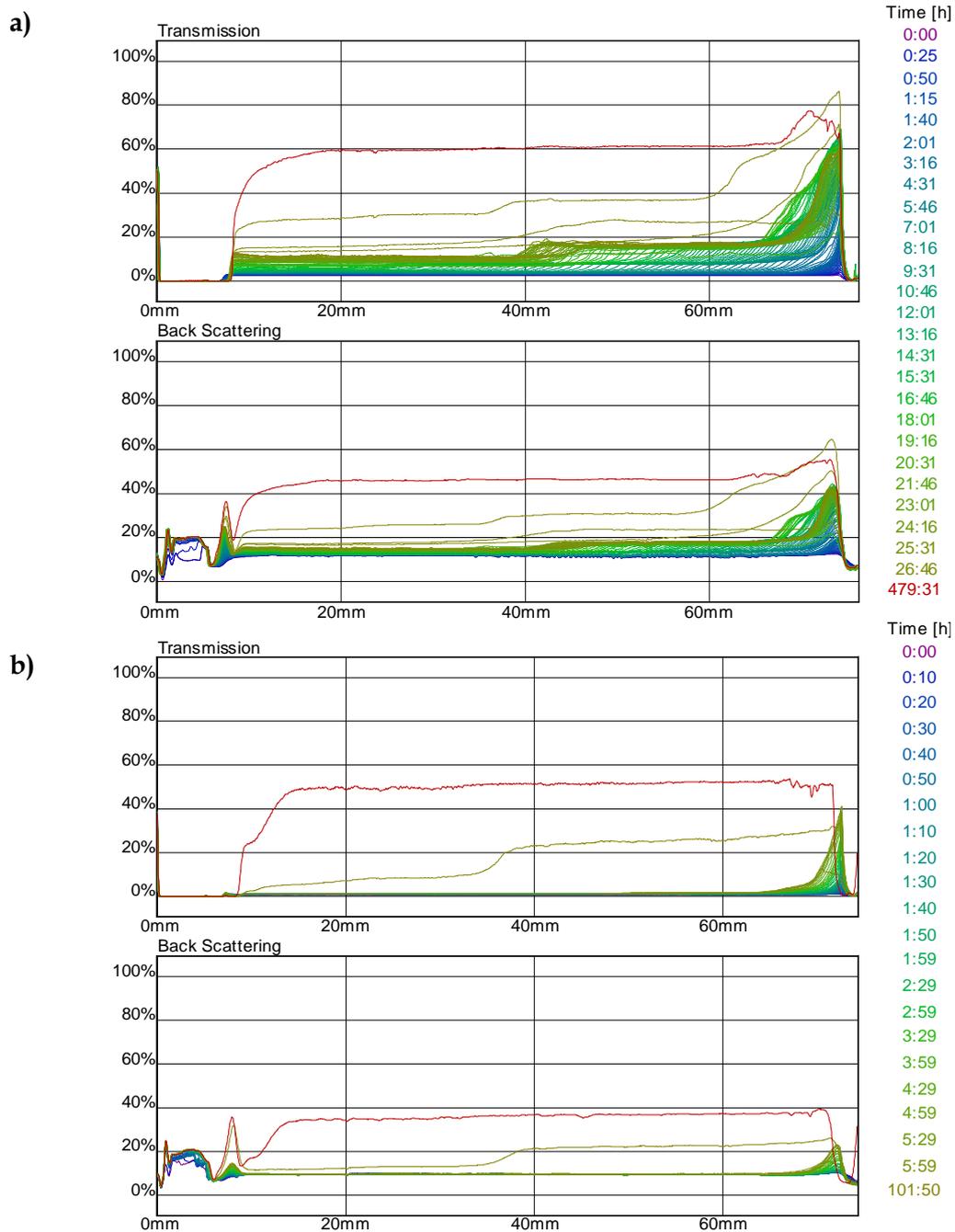


Figura 6.10. Perfiles de transmisión (*Transmission*) y retrodispersión (*Back Scattering*) de luz para el: **a)** Óptimo ① suspendido en bebida Clight; **b)** Óptimo ② suspendido en bebida Clight.

La Figura 6.10 muestra los perfiles temporales de las suspensiones de los Óptimo ① y ② en la bebida artificial, tanto de transmitancia como de retrodispersión. Se observa que existió una evolución hacia la formación de una fase precipitada en el fondo, conforme a la disminución en la transmitancia alrededor de 7.5 mm (Óptimo ①, Figura 6.10a) y 7.3 mm (Óptimo ②, Figura 6.10b) y al aumento en la retrodispersión en ambas muestras.

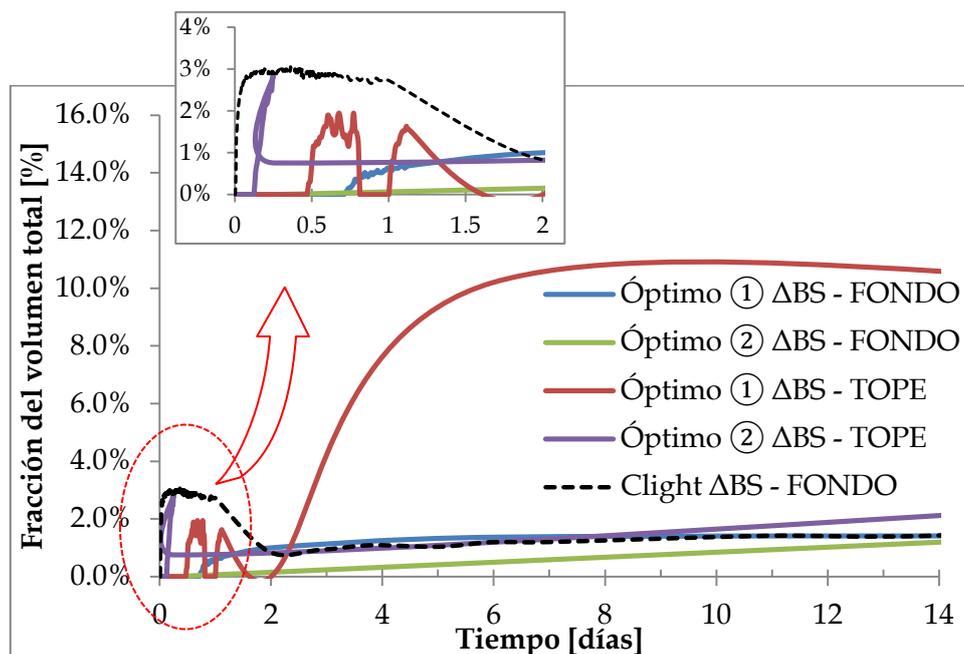


Figura 6.11. Evolución temporal de la fase de precipitado de la bebida Clight y de las fases de precipitado y cremado en las suspensiones de los Óptimos ① y ② en la bebida Clight.

La Figura 6.11 muestra la evolución temporal, tanto de la fase precipitada de la bebida artificial, como de las fases formadas en las suspensiones de las microcápsulas en esta bebida. Es posible notar que en este caso, existió una desestabilización mucho más pronunciada que en el caso de las suspensiones acuosas, alcanzándose la formación de fases mucho más grandes (aproximadamente, el 10 % del volumen total de muestra para el Óptimo ①), incluso a tiempos de estudio mucho más cortos. Esto podría atribuirse principalmente a la inestabilidad inherente del producto comercial, que también presentó una elevada inestabilidad (Figura 6.9), y para la cual se indica un



consumo preferente dentro de las 24 horas posteriores a la preparación. En efecto, en un tiempo inferior a 3 horas luego de la preparación, esta muestra mostró la formación del precipitado que abarcó aproximadamente el 3 % del volumen total de la muestra. De acuerdo a los resultados de esta zona, la dispersión del polvo en la bebida tuvo un efecto positivo sobre su estabilidad, dado que extendió el tiempo de demora para la observación del precipitado a 17 horas, aproximadamente para el Óptimo ①, y a tiempos superiores a una semana para el Óptimo ②.

Por otro lado, en la Figura 6.11 se observa además que la inestabilidad más pronunciada se debió a la formación de la fase de cremado durante las primeras horas del día. La oscilación en el porcentaje de volumen de cremado sugirió que esta fase recientemente formada fue lábil, pero se consolidó con el transcurso del tiempo. A pesar de esta fase observada, su labilidad no amenaza la utilización de estos puntos óptimos en el polvo comercial, ya que esta fase podría ser dispersada nuevamente por simple agitación.

La diferencia en los comportamientos observados entre el agua y la bebida formada en base al polvo instantáneo Clight pudo deberse a la presencia de otros agentes presentes en el medio de dispersión, ajenos a la formulación del polvo de microcápsulas. En efecto, el producto comercial Clight contiene maltodextrina, anticoagulantes (fosfato tricálcico), espesantes (goma xantánica, carboximetilcelulosa sódica, goma arábica) y demás componentes que pudieron interactuar positiva o negativamente sobre las micropartículas redispersadas y modificar la estabilidad de la bebida funcionalizada.

6.4. Conclusiones

De acuerdo con los resultados observados, es posible concluir que los óptimos globales obtenidos proveyeron resultados satisfactorios respecto su aplicación en agua y en la bebida artificial instantánea preparada a partir de polvo sabor naranja (Clight) a temperatura ambiente (21 °C).



La redispersabilidad en ambos sistemas fue lograda en tiempos considerablemente inferiores a los que se obtuvieron en capítulos precedentes, indicando una aplicación sin dificultades y dejando a un lado la necesidad de incorporar ingredientes que favorecieran las propiedades de flujo del producto de microcápsulas.

Respecto a la estabilidad, ambos óptimos también presentaron resultados satisfactorios dentro del período de estudio, establecido acorde a los tiempos de aplicación de los sistemas analizados. En particular, los sistemas basados en agua a temperatura ambiente proveyeron una estabilidad superior, alcanzando separaciones de fase más retardadas (entre 2 y 3 días para el tope y entre 5 y 6 días para el fondo), mientras que en el polvo saborizado la formación de fases fue más inmediata, con un tiempo de demora inferior a un día para notar las fases en formación.

Para el Óptimo ②, la aplicación del polvo de microcápsulas en cualquiera de los medios estudiados (agua y bebida artificial) resultó satisfactoria. Si bien la separación de fases observada en el agua estuvo retrasada respecto al otro medio, en tiempos prolongados de estudio (15 días), los espesores de fase obtenidos fueron similares. En este sentido, la muestra obtenida a partir del Óptimo ② resultó apropiada para cualquiera de los medios de dispersión estudiado.

Por otro lado, para el Óptimo ① se observaron resultados diferentes, siendo más efectiva su aplicación en agua, debido a que los tiempos de demora para la aparición de fases fueron menores, así como los espesores obtenidos en este medio en tiempos de estudio prolongados.

Se puede concluir entonces que las microcápsulas correspondientes al Óptimo ① se podrían aplicar en aguas cuyo consumo preferencial sea a tiempos prolongados luego de la preparación, por ejemplo: aguas envasadas de distribución masiva (supermercados). Por otra parte, en aguas y jugos orientados a un consumo inmediato, la aplicación más apropiada parecería ser las microcápsulas correspondientes a los Óptimos ② y ①, respectivamente, ya que la demora en la aparición de las fases fue mayor respecto al otro punto óptimo.



Capítulo VII

**CONCLUSIONES
GENERALES y PERSPECTIVAS
FUTURAS**



CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En la presente tesis se planteó como objetivo general la microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización, con el propósito de lograr su incorporación en alimentos líquidos y bebidas de base acuosa. En este contexto, se realizaron ensayos tendientes a establecer los agentes encapsulantes, considerando la posibilidad de incorporar otros materiales que mejorasen las propiedades de las microcápsulas (tales como el tamaño medio de partícula) y la eficiencia del proceso de microencapsulación.

El estudio cromatográfico de los fitoesteroles utilizados como materia prima mostró una mezcla multicomponentes, compuesta principalmente por un 36.4 % de β -sitosterol, 24.6 % de campesterol y 23.7 % de estigmasterol. A pesar de estar compuesta por varios esteroides, las propiedades fisicoquímicas de la mezcla no evidenciaron la individualidad de sus componentes (perfiles cristalográficos, térmicos e infrarrojo).

El uso de goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes presentó ventajas sobre otros materiales estudiados, en términos de tamaño medio de partículas tanto en suspensión como en producto, rendimiento de proceso y eficiencia de encapsulación. Además, mediante estudios térmicos, de infrarrojo y difracción de rayos X, se pudo asegurar la estabilidad de estos agentes encapsulantes frente al proceso de secado, razón por la cual fueron seleccionados. En efecto, no mostraron evidencias de degradación en el rango de temperaturas estudiado.

Para estos sistemas encapsulantes, la viscosidad de sus soluciones acuosas resultó ser uno de los parámetros más influyentes sobre el rendimiento de secado y el tamaño de partículas obtenido (tanto en suspensión como del producto particulado). De hecho, las elevadas viscosidades provistas por la goma guar y la carboximetilcelulosa no sólo impidieron la dispersión apropiada de los fitoesteroides, sino que además dificultaron el proceso de homogeneización posterior; motivos por los cuales fueron descartados estos materiales.



A pesar de que ninguno de los dos agentes encapsulantes seleccionados (goma arábica y maltodextrina) presentó buenas propiedades de mojado sobre los fitoesteroles, su combinación condujo a menores tamaños de partícula que el uso independiente de cada uno de ellos. De esta manera, la definición del sistema de encapsulación para los fitoesteroles implicó el uso de agentes tensoactivos en bajas concentraciones que fomentaran las propiedades de mojado a través de una reducción en la tensión superficial.

El uso de un surfactante no iónico (Tween 20) y otro iónico (dodecilsulfato de sodio, SDS) condujo a mejores eficiencias de encapsulación y menores tamaños de partícula, siendo más efectiva la utilización del SDS en un 2 % m/v. Se identificaron y relacionaron las propiedades de las soluciones y las suspensiones (en especial el mojado sobre los fitoesteroles y la tensión superficial, el tamaño medio de las partículas obtenido y la viscosidad, tanto de las soluciones como de las suspensiones) con el rendimiento de secado, la eficiencia de encapsulación y la retención de fitoesteroles. Aunque se obtuvieron mejores rendimientos de secado utilizando Tween 20 en la formulación, la adición del SDS condujo a eficiencias de encapsulación satisfactorias y retención de fitoesteroles más altas, menores tamaños de partícula y rendimientos de proceso adecuados para la escala laboratorio. La mejor performance provista por el SDS, con respecto al Tween 20, fue explicada en términos de una mayor afinidad entre los fitoesteroles y las soluciones de agente encapsulante. Más aún, el tamaño medio de todas las micropartículas obtenidas utilizando SDS satisficieron el límite de tamaño más estricto de 25 μm , requerido para asegurar la incorporación de los fitoesteroles en la fase micelar del intestino.

Las microcápsulas obtenidas también fueron caracterizadas. Se verificó el estado sólido de los fitoesteroles dentro de la micropartícula (por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido), como así también la ausencia de interacciones químicas entre los materiales (mediante espectroscopía infrarroja), indicando que se conserva la identidad de cada uno de ellos. Las microcápsulas fueron sometidas a redispersión de manera satisfactoria, sin presentar inconvenientes (*i.e.* sin formación de agregados) y cambios el tamaño medio de partícula durante períodos de tiempo prolongados.



Posteriormente, se establecieron las condiciones operativas y las variables de formulación óptimas para la microencapsulación de los fitoesteroles mediante secado por atomización a través de un estudio exhaustivo que incluyó el uso de un diseño de experimentos.

En primer lugar, el diseño permitió conocer la influencia de factores: de formulación (concentración de fitoesteroles, contenido total de sólidos, relación entre los agentes encapsulantes) y operativas (temperatura de secado, caudal de atomización y caudal de alimentación) sobre las respuestas más relevantes del proceso de microencapsulación de interés (tamaño de partícula del producto, rendimiento de proceso, eficiencia de encapsulación y retención de fitoesteroles).

A partir del reconocimiento de los factores más influyentes, se establecieron modelos cuadráticos con interacciones entre los factores, que fueron apropiados para ajustar cada una de las respuestas mencionadas. Finalmente, se encontraron los óptimos de cada factor mediante estrategias de optimización para cada respuesta individual.

Un aporte importante en ese aspecto fue la utilización de la herramienta “deseabilidad”, otro recurso estadístico no explorado exhaustivamente en el campo de la microencapsulación mediante secado por atomización. A través de esta herramienta se identificaron dos conjuntos de condiciones que optimizaron en forma simultánea todas las respuestas consideradas en este diseño.

Las microcápsulas obtenidas bajo las condiciones óptimas fueron efectivamente incorporadas en sistemas acuosos (agua y bebida artificial) presentando buenas propiedades de redispersión y generando suspensiones estables por períodos de tiempo adecuados en diferentes aplicaciones (de consumo inmediato o diferido, respectivamente).

La microencapsulación de los fitoesteroles mediante secado por atomización se realizó de manera efectiva, alcanzándose no sólo rendimientos de proceso y eficiencias de encapsulación hasta un 86 % y 68 %, respectivamente, sino que además los tamaños de partículas fueron reducidos de manera considerable respecto a la materia prima,



logrando así incrementar eficientemente la retención de los fitoesteroles en el producto final.

Los productos obtenidos resultan atractivos para la aplicación en otros sistemas acuosos, no abordados en este trabajo de Tesis. Aunque existe una gran variedad de alimentos que pueden ser funcionalizados con fitoesteroles microencapsulados, la gran mayoría de ellos presentan viscosidades más altas a las estudiadas en este trabajo, incrementando las expectativas respecto a la estabilidad que presentaría el producto funcionalizado.

Respecto a los materiales utilizados, si bien fueron estudiados diversos agentes encapsulantes (algunos en más profundidad que otros), se podría a futuro evaluar la incorporación de otros materiales que agreguen una funcionalidad adicional al sistema. En este sentido, la combinación de los agentes encapsulantes con inulina, una fibra que presenta actividad prebiótica y mejora la biodisponibilidad del Calcio en el organismo, parece ser una alternativa funcional llamativa y compatible con este tipo de materiales, que no ha sido abordada en la microencapsulación de fitoesteroles.

Del mismo modo, la co - encapsulación de los fitoesteroles con vitaminas y lípidos con características similares podría incrementar el valor agregado del producto formulado. El resveratrol, por ejemplo, es un polifenol poco soluble en agua obtenido como subproducto de la industria vitivinícola y que posee propiedades antiartríticas y reductoras de los niveles de azúcar en sangre, además de otras funcionalidades similares a las de los fitoesteroles. Su co-encapsulación podría potenciar el producto finalizado.

A pesar de presentar buenas propiedades de redispersabilidad, el producto formulado podría ser modificado mediante el agregado de agentes mejoradores del flujo (tal como el dióxido de Silicio coloidal, en bajas proporciones) con el objeto facilitar la incorporación en productos de escala industrial o como nutracéutico en forma de comprimidos o cápsulas.

Otra contribución importante al campo de la microencapsulación podría ser la exploración de otras técnicas para determinar la eficiencia de encapsulación. A pesar de ser extensamente determinada mediante la técnica utilizada en esta Tesis, aún



existen limitaciones respecto al error experimental involucrado. En este sentido, se abordó la determinación del contenido total de fitoesteroles en las fases orgánicas recuperadas (mediante técnica de espectrofotometría UV) (tanto de la fracción libre como encapsulada), obteniéndose resultados similares a los estudiados mediante la técnica tradicional. Esto sugiere que la etapa limitante en la determinación de la eficiencia de encapsulación es la separación de los fitoesteroles libres desde el producto de secado.

Por otra parte, un estudio de la liberación del ingrediente activo bajo condiciones de agitación o estacionarias podría brindar información acerca de la composición de las fases depositadas y cremadas en los ensayos de turbidez.

Si bien se obtuvieron resultados muy satisfactorios en la microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización, estos aportes permitirían un mayor conocimiento de los fenómenos involucrados en las etapas que conforman el proceso; como así también la exploración de nuevos sistemas de encapsulación de características similares o incluso diferentes.



APÉNDICES



APÉNDICE CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

APÉNDICE 2.1. Características Técnicas del secadero Büchi B - 290

A continuación se presentan algunas características técnicas relevantes del secadero utilizado.

El rotámetro es un indicador para el flujo de gas de atomización. La Tabla A.2.1 reporta la correlación entre la altura del rotámetro y el caudal de aire de atomización.

Tabla A.2.1. Medidor de flujo del aire de atomización (rotámetro) (Adaptado desde el Manual de Usuario - Büchi B - 290).

Altura [mm]	Caudal [L/h]	Altura [mm]	Caudal [L/h]
5	84	40	473
10	138	45	536
15	192	50	601
20	246	55	670
25	301	60	742
30	357	65	819
35	414		

En la Figura A.2.1 se presenta la relación entre el caudal de la alimentación líquida al secadero por atomización y el porcentaje que se establece en la bomba peristáltica, mientras que en la Figura A.2.2 se reporta el caudal de aire de secado que provee el aspirador de acuerdo a su porcentaje de aspiración.

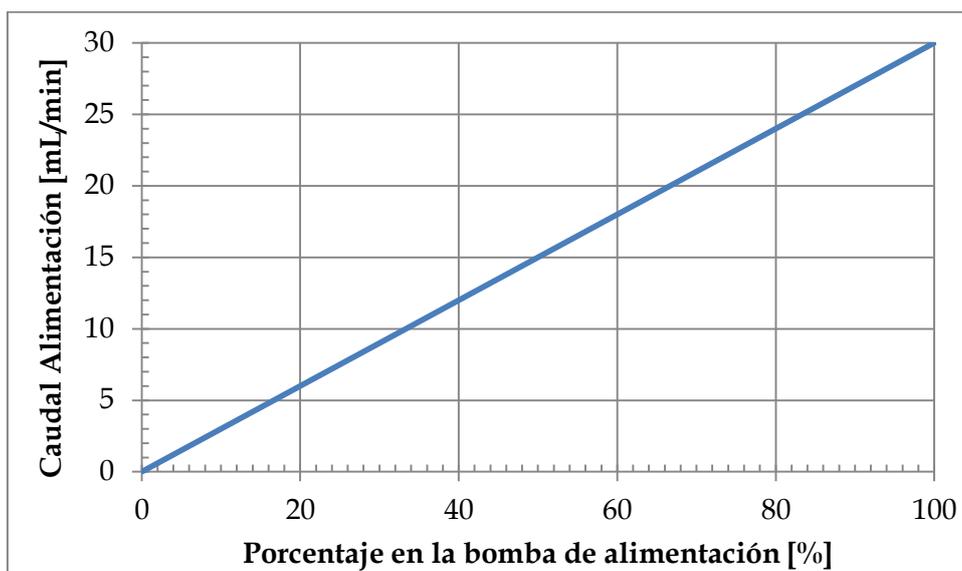


Figura A.2.1. Caudal de alimentación líquida en función del porcentaje establecido en la bomba peristáltica (Adaptado desde el Manual de Usuario - Büchi B - 290).

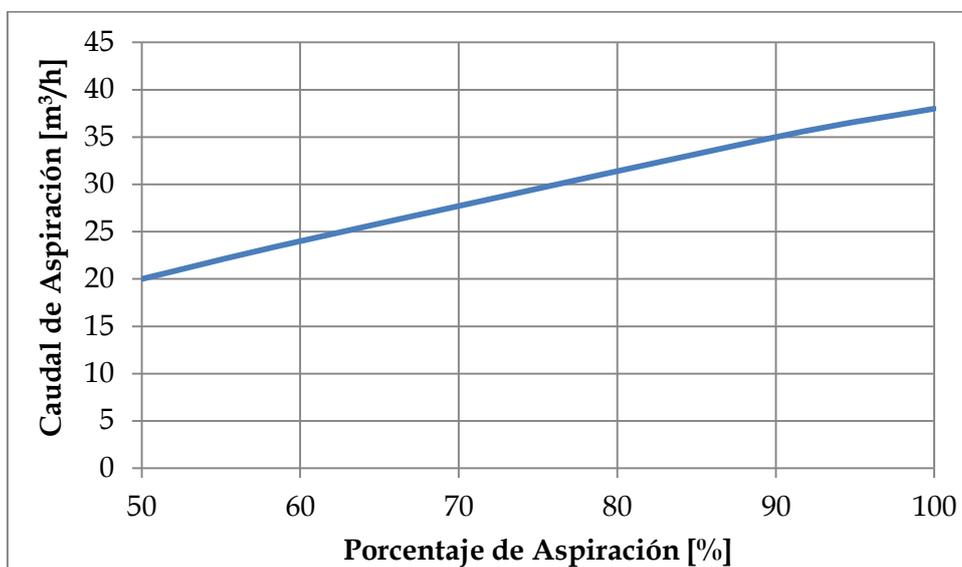


Figura A.2.2. Caudal de aire de secado en función del porcentaje de aspiración (Adaptado desde el Manual de Usuario - Büchi B - 290).



APÉNDICE CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FITOESTEROLES Y ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA LA SELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES

APÉNDICE 3.1. Reducción del tamaño medio: Homogeneización en suspensión acuosa

De acuerdo a la Figura 3.6, el tamaño medio de la mezcla de fitoesteroles fue muy superior a $25 \mu\text{m}$, tamaño requerido para ejercer efectos hipocolesterolémicos. Menos del 10 % de la población permaneció por debajo de este valor, dado que $D[v, 0.10]$ fue aproximadamente $27 \mu\text{m}$. La discriminación de esta pequeña fracción para su utilización implicaba una gran pérdida de material, por lo que surgió la necesidad de reducir el tamaño de las partículas por medio de la aplicación de etapas de homogeneizado.

En este contexto, los fitoesteroles fueron suspendidos en una concentración de 6.66 % m/v en agua y sometidos a sucesivas etapas de homogeneización con el objeto de determinar el tiempo requerido para alcanzar un tamaño medio inferior a $25 \mu\text{m}$.

La Figura A.3.1 muestra la distribución de tamaño de partículas para cada tiempo de homogeneización junto con el tamaño medio $D[4,3]$ de los fitoesteroles dispersados en agua y los tamaños $D[v, 0.10]$ y $D[v, 0.90]$ (Figura A.3.1). Es posible notar que inicialmente tanto $D[4,3]$ como $D[v, 0.10]$ y $D[v, 0.90]$ fueron inferiores a los valores presentados en la Figura 3.6 (de $83.92 \mu\text{m}$, $27.23 \mu\text{m}$ y $160.55 \mu\text{m}$, respectivamente), producto de la dispersión en el medio acuoso que permitió la ruptura de los aglomerados presentes.

A medida que aumentó el tiempo de homogeneización, $D[4,3]$ y los correspondientes $D[v, 0.10]$ y $D[v, 0.90]$ disminuyeron gradualmente, acompañados de distribuciones más estrechas. Un tamaño medio inferior a $25 \mu\text{m}$ se obtuvo luego de 6 minutos de homogeneización. A partir de entonces, no se observó una mayor reducción en este valor.

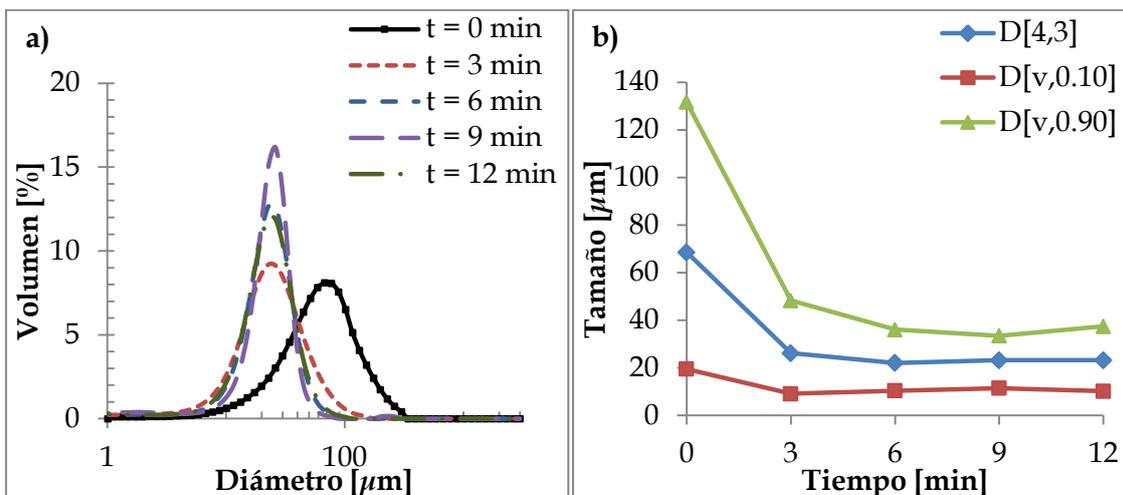


Figura A.3.1. a) Distribución de tamaño de partículas a diferentes tiempos de homogeneización; **b)** Tamaño medio de partícula $D[4,3]$ y $D[v, 0.10]$ y $D[v, 0.90]$ en función del tiempo de homogeneización.

La reducción más pronunciada se observó en $D[v, 0.90]$ (Figura A.3.1b), mientras que $D[v, 0.10]$ no estuvo afectado significativamente por el proceso de homogeneización. Esto sugirió una reducción preferencial en el tamaño de las partículas más grandes.

A pesar de esta gran disminución de tamaños, $D[v, 0.90]$ permaneció por encima de $25 \mu\text{m}$, incluso para tiempos superiores a 12 minutos de homogeneización. Sin embargo, al cabo de 9 minutos, no sólo el tamaño medio $D[4,3]$ de las partículas se mantuvo por debajo de $25 \mu\text{m}$, sino que la distribución de tamaño se hizo más estrecha. En este tiempo, aproximadamente el 62.22 % de la población se encontró por debajo de $25 \mu\text{m}$.

Si bien se obtuvieron suspensiones acuosas sumamente inestables, con la formación instantánea de agregados que ascendieron a la superficie, este análisis permitió establecer un tiempo estandarizado de homogeneización de 9 minutos a 25000 – 35000 rpm para alcanzar suspensiones con tamaños de partícula medios inferiores a $25 \mu\text{m}$ y distribuciones más homogéneas que puedan ser atomizadas en el secadero.



APÉNDICE 3.2. Estudio de la estabilidad de las suspensiones como función del tamaño de partícula: Efecto del tiempo de homogeneización

Las suspensiones son mezclas heterogéneas constituidas por una fase sólida no soluble que se encuentra dispersa dentro de una fase continua, habitualmente líquida (no necesariamente acuosa). Generalmente, estos sistemas son termodinámicamente inestables y en el transcurso del tiempo tienden a la formación de dos fases claramente definidas. La cinética de separación de estas fases depende de distintas propiedades de las partículas dispersas, tales como la composición química, la distribución de tamaño y forma y la presencia de cargas eléctricas en su superficie (Schramm, 2005).

La estabilidad de la suspensión antes y/o durante el secado es esencial para lograr una buena eficiencia del proceso de microencapsulación (Vilstrup, 2001). En este contexto, suele ser necesaria la adición de tensoactivos con propiedades interfaciales que permitan incrementar la estabilidad de las suspensiones (Schramm, 2005).

En forma simultánea a los estudios de encapsulación con goma arábica, se analizó la estabilidad de las suspensiones de fitoesteroles en esta solución y la influencia del tamaño de las partículas dispersas. Los objetivos principales fueron determinar la estabilidad de las suspensiones en el tiempo a fin de garantizar una atomización uniforme, y determinar el tiempo de homogeneización requerido para lograr tamaños de partícula apropiados y facilitar la acción en el organismo sin percibir sensaciones arenosas en el paladar (Thakkar & Diller, 1975).

Se prepararon entonces tres suspensiones de fitoesteroles, conteniendo 20 % m/v de GA y 6.66 m/v de FE, cada una de ellas utilizando un corte de fitoesteroles tamizados diferente: S1 (corte entre mallas #200 y #140), S2 (corte entre mallas #100 y plato ciego, es decir, el corte base descrito en la Sección 2.2.2. *Tamizado de los fitoesteroles*) y S3 (corte entre mallas #140 y #100).

Complementariamente, se prepararon dos series de suspensiones de igual composición, las cuales se sometieron a homogeneización a 14000 - 17000 rpm (Sección 2.2.3.1. *Homogeneización y sonicado*). Una de las series se homogeneizó durante 3 minutos y la otra durante 9 minutos. Para ambas series se determinó la altura de separación entre fases en función del tiempo según el procedimiento descrito



previamente (Sección 2.2.4.5. *Estabilidad*). La estabilidad se evaluó mediante la observación de dos parámetros que caracterizan la cinética de separación de fases: el “tiempo de demora” (o tiempo durante el cual cada sistema permanece en estado homogéneo sin separación de fases) y el “volumen de cremado porcentual” (igual a 100 veces el cociente entre el volumen dado por las Ecuaciones (2.1) y (2.2) del Capítulo II).

En la Figura A.3.2 se presenta la distribución de tamaño de partículas como frecuencia en volumen en función del tamaño para las suspensiones S1, S2 y S3 sin homogeneizar.

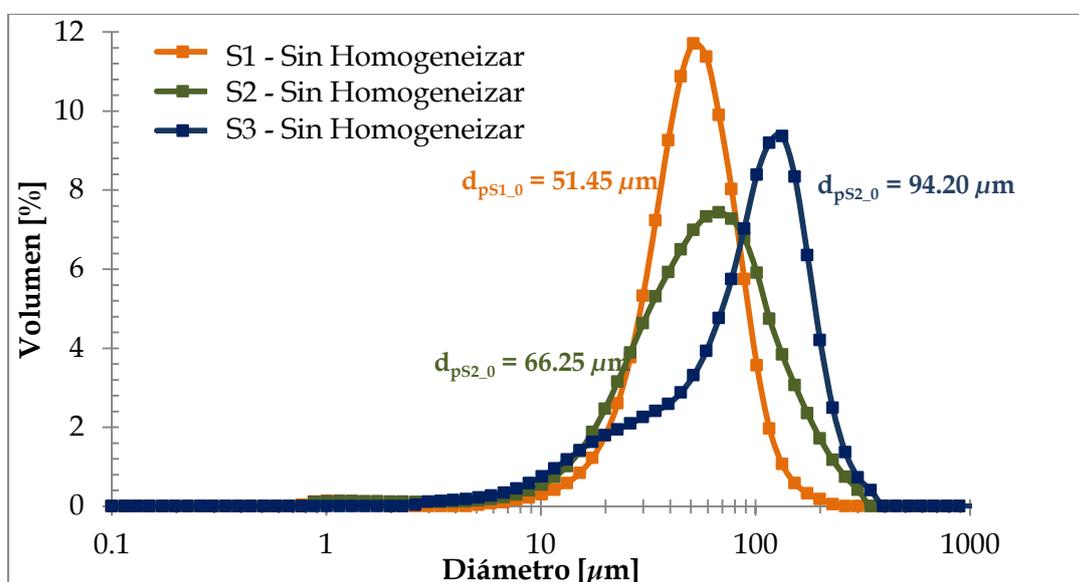


Figura A.3.2. Distribución de tamaño de partículas para las suspensiones S1, S2 y S3 sin homogeneizar.

Como era de esperar, los tamaños medios aritméticos en volumen fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$). La suspensión S1 presentó una distribución de tamaño aproximadamente *log* - normal con un diámetro medio de $51.45 \pm 1.19 \mu\text{m}$, mientras que la suspensión S3 presentó los tamaños de partícula más grandes con un diámetro medio igual a $94.20 \pm 1.81 \mu\text{m}$. Obviamente, la suspensión S2 mostró un



diámetro medio entre los correspondientes a las suspensiones S1 y S3 ($66.25 \pm 0.96 \mu\text{m}$) y una distribución de tamaño más amplia.

Por otra parte, las distribuciones de tamaño medidas por difracción láser para cada suspensión fueron menores a las previstas de acuerdo a las mallas de tamices utilizadas. En efecto, la malla #100 tiene una apertura de $149 \mu\text{m}$ (retiene las partículas cuyos tamaños son superiores), y las mallas #140 y #200 poseen aperturas de $105 \mu\text{m}$ y $74 \mu\text{m}$, respectivamente. Por ende, para la suspensión S1, se esperaba un corte comprendido entre 74 y $105 \mu\text{m}$, mientras que la para la S3, otro entre 105 y $149 \mu\text{m}$. La diferencia encontrada podría atribuirse a que los fitoesteroles se encuentran aglomerados durante el proceso de tamizado como consecuencia de la cohesividad que exhibe su fino polvo. Aparentemente, el proceso de tamizado no fue capaz de lograr la desintegración de dichos aglomerados, mientras que el proceso de suspensión para la medición por difracción láser permitió la desagregación de las partículas dando lugar a tamaños más pequeños que los esperados.

En la Figura A.3.3 se muestra, para las suspensiones S1, S2 y S3 sin homogeneizar, la evolución del volumen de cremado porcentual en el tiempo, conocida como “perfil de cremado”.

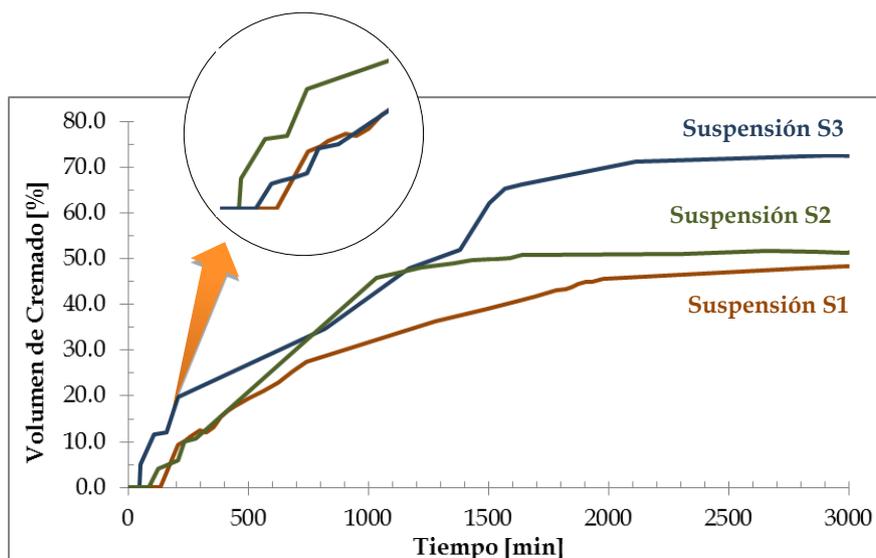


Figura A.3.3. Perfil de cremado para las suspensiones S1, S2 y S3 sin homogeneizar.



Las tres suspensiones se desestabilizaron en tiempos inferiores a 4 horas (240 minutos), siendo menor el tiempo para la suspensión S3 con mayor tamaño medio de partículas (aproximadamente 50 minutos) y mayor para la suspensión S1 con menor tamaño de partículas (210 minutos). Además, se observó que el valor de estado estacionario del volumen de cremado porcentual aumentó con el tamaño de partícula. La suspensión S2, que abarca los cortes de tamaño de las suspensiones S1 y S3, mostró un comportamiento intermedio pero más parecido al de la suspensión S1 de acuerdo con sus respectivas distribuciones de tamaño.

En la Figura A.3.4 se muestra la distribución de tamaño de partículas para las tres series de suspensiones, sin homogeneizar y homogeneizadas por 3 o 9 minutos. Se evidencia una disminución significativa en el tamaño de partícula a medida que se incrementa el tiempo de homogeneización ($p < 0.05$) (Figura A.3.4b y c). Sin embargo, para la suspensión S1, (Figura A.3.4a), que contenía las partículas de menor tamaño, la disminución significativa se produce durante los primeros 3 minutos de homogeneización ($p < 0.03$) y luego de homogeneizar 9 minutos la muestra no presenta variaciones significativas en el tamaño ($p < 0.03$).

Luego de 3 minutos de homogeneización, todas las suspensiones mostraron distribuciones más dispersas y hacia menores tamaños de partícula. Al cabo de 9 minutos, las suspensiones S1 y S2 presentaron distribuciones de tamaño más angostas que las correspondientes a los 3 minutos y localizadas en menores tamaños de partícula. La suspensión S3 no exhibió el mismo comportamiento; su distribución de tamaño fue claramente bimodal, con un pico alrededor de $23 \mu\text{m}$ y otro en torno a $77 \mu\text{m}$. Es probable que 9 minutos de homogeneización hayan sido insuficientes para lograr el desplazamiento de toda la distribución hacia tamaños menores.

La máxima reducción en tamaño que se consiguió con la velocidad de homogeneización escogida (14000 a 17000 rpm) condujo a partículas por encima de $40 \mu\text{m}$. Dado que no se cumplió el requerimiento más estricto en tamaño de $25 \mu\text{m}$ (para producir un polvo de fitoesteroles que no otorgue sensación arenosa en el paladar humano y pueda ejercer su efecto en el organismo), se planteó estudiar la homogeneización de suspensiones que incluyeran en su formulación agentes tensoactivos.

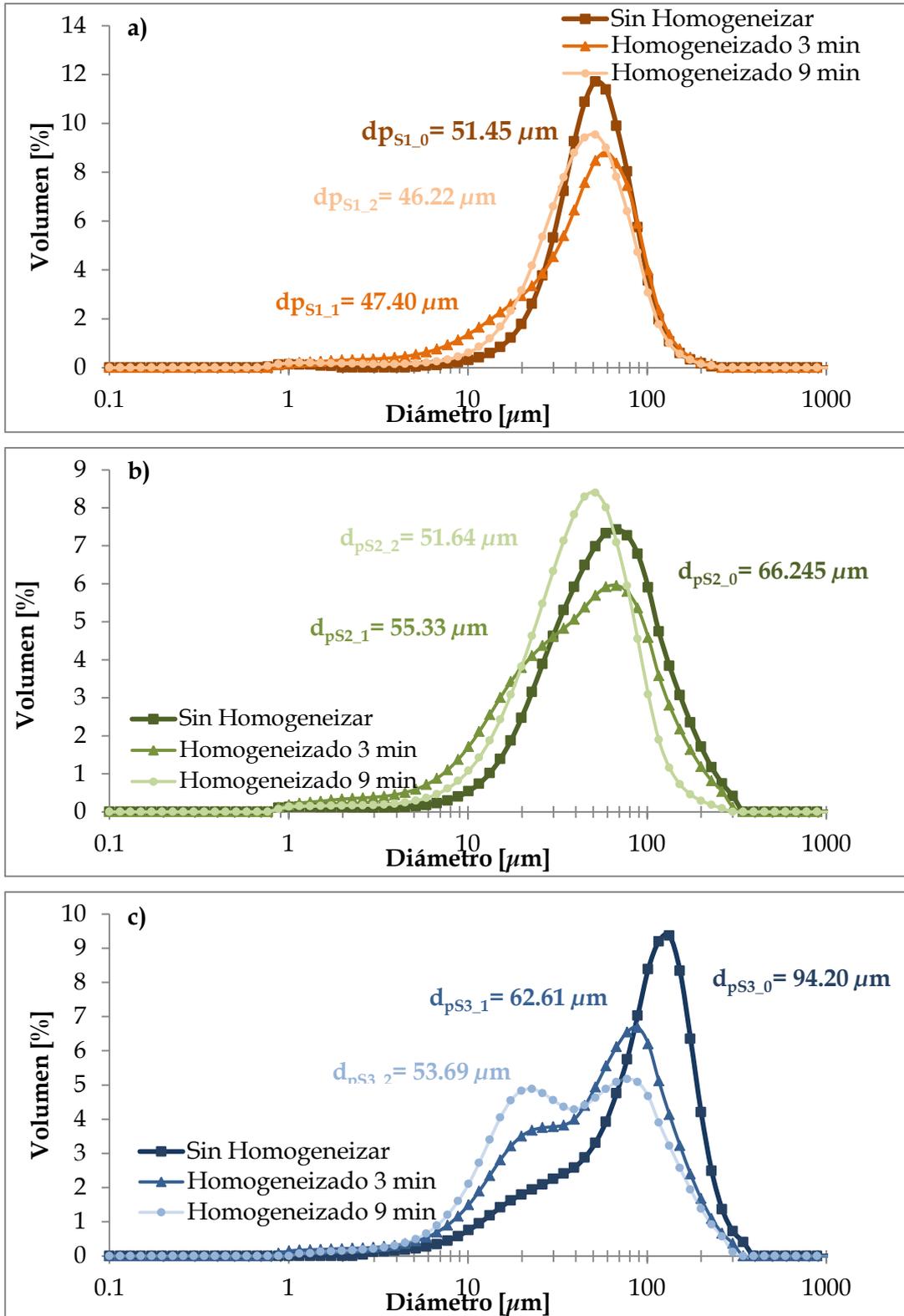


Figura A.3.4. Distribuciones de tamaño de partículas. a) Suspensiones S1; b) Suspensiones S2; c) Suspensiones S3.



Un estudio más detallado del uso de tensoactivos se presenta en el Capítulo IV de esta tesis. Cabe destacar que el uso de mayores tiempos de homogeneización no condujo a variaciones significativas en el tamaño medio ni en la distribución (resultados no mostrados).

En la se presentan los perfiles de cremado para las tres suspensiones, sin homogeneizar y homogeneizadas durante 3 y 9 minutos. Este proceso ocasionó generalmente un retardo en la separación de las fases, reflejado en un incremento en los tiempos de demora, acorde al menor tamaño de partículas.

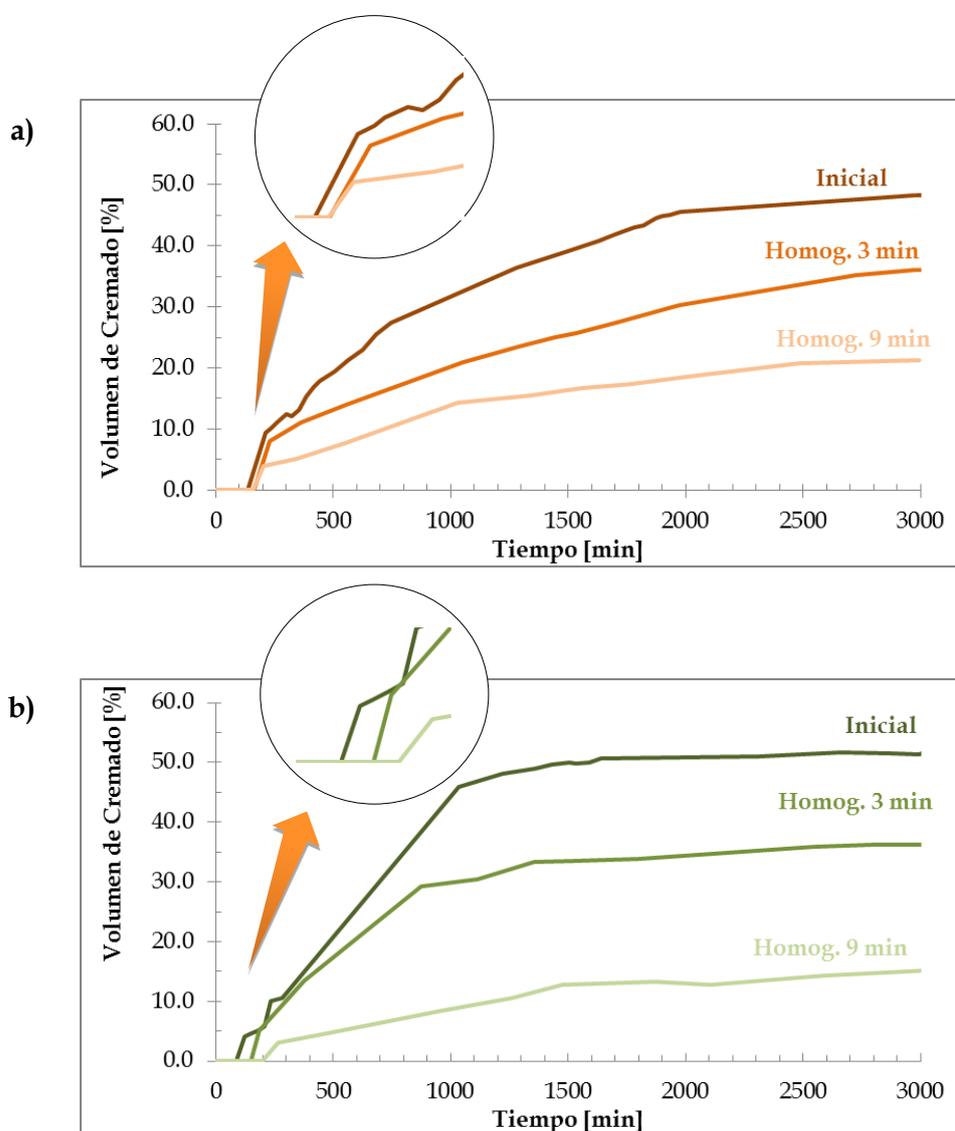


Figura A.3.5. Perfiles de cremado antes y después de los procesos de homogeneización:

a) Suspensión S1; b) Suspensión S2; c) Suspensión S3.

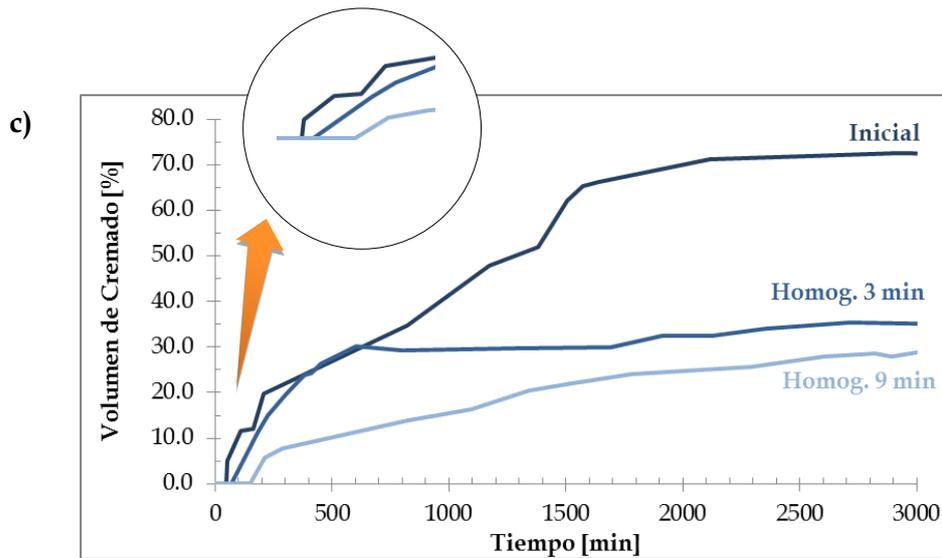


Figura A.3.5. (Cont.). Perfiles de cremado antes y después de los procesos de homogeneización: a) Suspensión S1; b) Suspensión S2; c) Suspensión S3.

Los parámetros cinéticos de la separación de fases se presentan en la Tabla A.3.1. La homogeneización de la suspensión S1 condujo a una reducción considerable en el valor de estado estacionario del volumen de cremado porcentual sin modificar apreciablemente el tiempo de demora, en concordancia con el efecto de la homogeneización sobre el tamaño de partícula. Para las suspensiones S2 y S3 la homogeneización produjo además una importante disminución no sólo en el tiempo de demora sino también en el volumen de cremado de estado estacionario, aumentando la estabilidad con el tiempo de homogeneización.

La forma de los perfiles de cremado se corresponde con la cinética de separación de fases característica de sistemas polidispersos. En estos sistemas, donde no existe un único tamaño de partícula sino una distribución alrededor de un valor medio, la curva de volumen de separación entre fases en función del tiempo exhibe tres zonas claramente definidas: una de aceleración, una de transición y finalmente, una de equilibrio donde la velocidad del cremado se hace nula (Robins, 2000). Este tipo de evolución responde a las diferentes velocidades de ascenso hacia la superficie que poseen las partículas por su diferencia en tamaño. El movimiento Browniano contribuye a este comportamiento, induciendo la formación de aglomerados como



consecuencia de las colisiones entre las partículas más grandes y las más pequeñas. Dado que estos agregados suelen poseer un tamaño mayor que las demás partículas, los mismos ascienden más rápidamente dejando atrás a las partículas más pequeñas. Cuando el tamaño de los aglomerados alcanza su máximo valor, la velocidad de cremado desaparece y, por lo tanto, el proceso culmina (Jeelani *et al.*, 2005).

Tabla A.3.1. Resultados del estudio de separación de fases por cremado para las suspensiones S1, S2 y S3.

Suspensión S1	Tiempo de Homogeneización [min]		
	0	3	9
D[4,3] [μm]	51.45 \pm 1.19	47.40 \pm 1.16	46.22 \pm 1.18
Tiempo de Demora [min]	210	232	204
Volumen Cremado [%]	50 %	42 %	23 %

Suspensión S2	Tiempo de Homogeneización [min]		
	0	3	9
D[4,3] [μm]	66.25 \pm 0.79	55.33 \pm 1.23	51.64 \pm 0.01
Tiempo de Demora [min]	124	186	265
Volumen Cremado [%]	52 %	37 %	18 %

Suspensión S3	Tiempo de Homogeneización [min]		
	0	3	9
D[4,3] [μm]	94.20 \pm 1.81	62.61 \pm 5.19	53.69 \pm 1.66
Tiempo de Demora [min]	50	181	212
Volumen Cremado [%]	72 %	34 %	31 %



Los resultados obtenidos sugirieron a la suspensión S2 (formulada con el corte base) (con tamaños de partícula intermedios entre S1 y S3), homogeneizada durante 9 minutos, como la más adecuada para someter al proceso de secado por atomización para encapsulación de los fitoesteroles. En efecto, de todas las suspensiones ensayadas fue la más estable presentado el mayor tiempo de demora y menor volumen de cremado de estado estacionario.

Aunque la suspensión S1 mostró menor estabilidad, su tiempo de demora fue casi invariante con el tiempo de homogeneización. Este resultado podría proveer un fundamento para elegir la suspensión S1 sin necesidad de recurrir a etapas de homogeneización. Sin embargo, el proceso de tamizado del polvo de fitoesteroles (como se recibe del proveedor) condujo a cortes en masa de S1 alrededor del 12 %, implicando un mayor desaprovechamiento de materia prima.

Pese a las propiedades interfaciales de la goma arábica, dadas por la presencia de proteínas, la elevada hidrofobicidad de los fitoesteroles resulta en suspensiones acuosas de relativa baja estabilidad. Efectivamente, todas las suspensiones estudiadas exhibieron separación de fases.

Aunque muchos alimentos estén desarrollados para prevenir el cremado, este fenómeno es usualmente inevitable a menos que se reduzcan las partículas a tamaños del orden de submicrones. En este sentido, los resultados obtenidos sugirieron además la necesidad de evaluar la combinación de la goma arábica con otros agentes de cobertura (tales como maltodextrina) que permitan mejorar la estabilidad de las suspensiones y eventualmente proveer al producto final propiedades funcionales adicionales.



APÉNDICE CAPÍTULO 4. SELECCIÓN DEL TENSOACTIVO Y ESTUDIO DEL SECADO POR ATOMIZACIÓN

APÉNDICE 4.1. Estabilidad de los materiales durante el secado

4.1.1. Dodecilsulfato de sodio

La Figura A.4.1 muestra el perfil de rayos X, junto a los espectros FTIR y el perfil térmico desde 30 °C hasta aproximadamente 210 °C para el SDS, antes y después de ser atomizado.

En ambos casos se presentó como un sólido de elevada cristalinidad (Figura A.4.1a). Sin embargo, debido al proceso de secado, aparecieron cambios en la configuración de su estructura cristalina y el material resultó más amorfo. Esto podría ser atribuido a cambios a nivel molecular o bien a cambios conformacionales en la estructura cristalina (cambio de fases cristalinas). Resulta importante destacar que el SDS presenta diversas fases cristalinas según el grado de hidratación del cristal (Como, Manigrasso, Mazza & Pocheiti, 1987; Smith *et al.*, 2004) y que, en general, el secado por atomización produce cambios en la conformación cristalina de los materiales (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley & Saurel, 2007; Paudel, Worku, Meeus, Guns & Van den Mooter, 2013).

La espectroscopía infrarrojo es una técnica que permite identificar la presencia de cambios a nivel molecular durante el proceso de secado. Diversos autores investigaron el espectro infrarrojo del SDS, obteniendo resultados similares (Bhardwaj, Sharma, Chauhan & Chauhan, 2013; Dai & Dong, 2007; Mehta, Chaudhary, Bhasin, Kumar & Aratono, 2007; Viana, Da Silva & Pimentel, 2012).

Los espectros FTIR del SDS antes y después de ser atomizado no revelaron cambios significativos (Figura A.4.1b). Aunque la superposición de los espectros no fue exacta, no se observaron corrimientos de los picos y bandas, ni cambios considerables en sus intensidades relativas, por lo que podría asumirse que no existieron cambios



químicos durante el secado por atomización de este compuesto. Por ende, fue posible afirmar que los cambios observados en el patrón de difracción de rayos X se debieron a cambios en la estructura cristalina de material y no a modificaciones químicas ocurridas durante el secado.

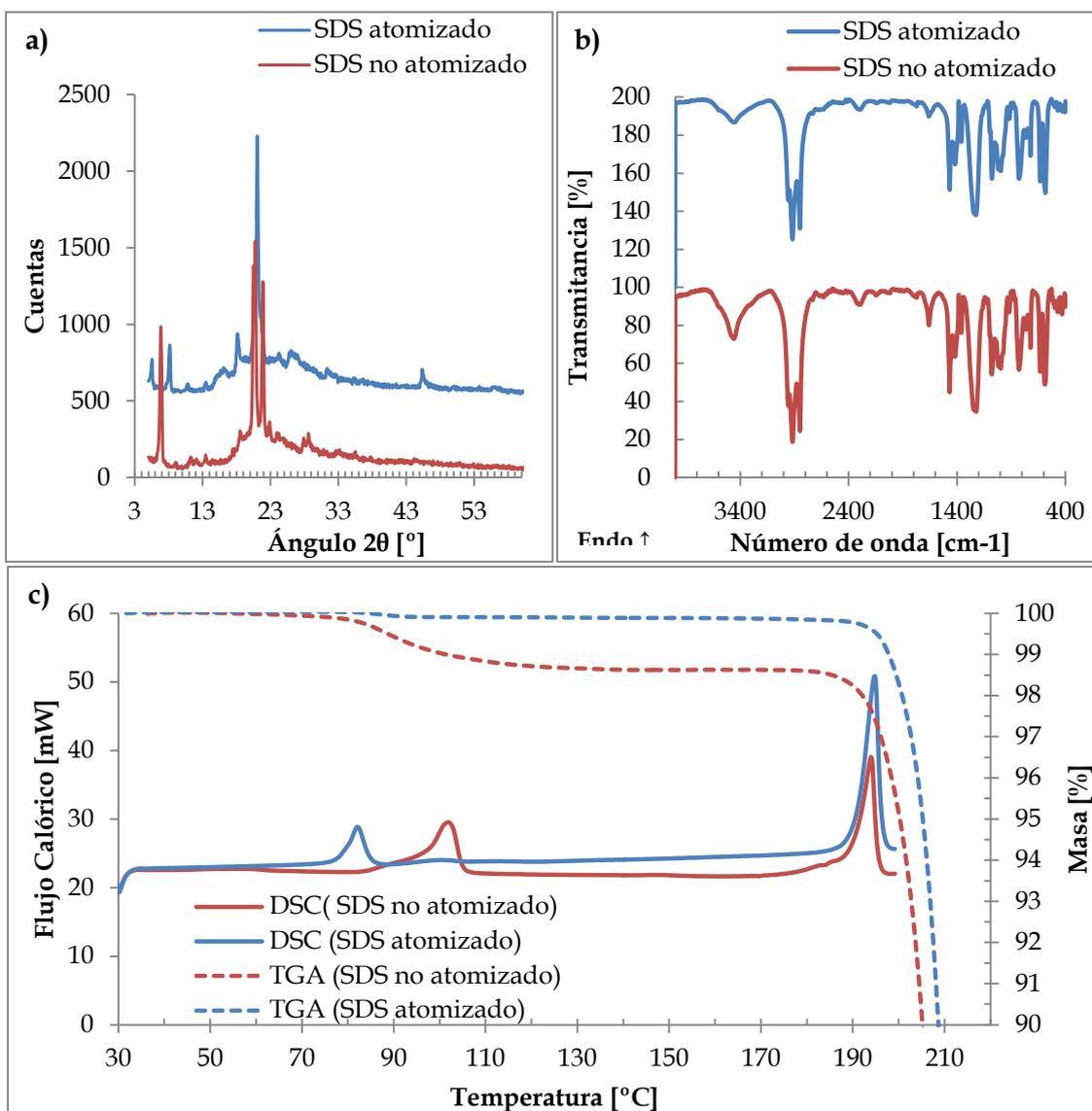


Figura A.4.1. Caracterización del dodecilsulfato de sodio: **a)** Patrón de difracción de rayos X atomizado (esta serie se encuentra elevada 500 cuentas para mejorar su visualización) y no atomizado; **b)** Espectros FTIR atomizado (esta serie se encuentra elevada en un 100 % para mejorar la visualización) y no atomizado; **c)** TGA y primer calentamiento de DSC (explicados sobre los ejes izquierdo y derecho, respectivamente).



Por otra parte, de acuerdo al perfil térmico presentado en la Figura A.4.1c fue posible distinguir dos eventos endotérmicos. El primero de ellos ocurrió alrededor de 100 °C para el SDS no atomizado y cerca de 80 °C para el SDS secado; mientras que el segundo apareció en ambos casos a 200 °C, aproximadamente.

El primer pico agudo podría estar asociado a una pequeña pérdida de peso por evaporación del agua contenida en la muestra, junto con la existencia de un proceso de fusión. En efecto, el fenómeno de evaporación se observó también en el perfil de TGA, a través del cual se estimó una pérdida de peso de aproximadamente 1.4 % respecto a la masa inicial incorporada para el SDS no atomizado y de 0.1 % en el caso del SDS atomizado. Sin embargo, para el material atomizado, este pico se encontró desplazado hacia aproximadamente 80 °C, presentando una forma más aguda. Esto ratificó la hipótesis planteada sobre la conjunción de los eventos de evaporación y fusión. En el caso del SDS no atomizado, su mayor contenido acuoso debilita la estructura del material y, a su vez, las fuerzas de van der Waals que existen entre las cadenas, por lo que el material podría fundir a temperaturas dependiente del contenido acuoso.

Por otra parte, el pico encontrado hacia 210 °C se corresponde con la fusión de las bicapas iónicas acoplado al proceso de descomposición del material.

Chantraine *et al.* (2007) encontraron un perfil similar en la comparación del comportamiento térmico de SDS en polvo y en comprimidos, a través de estudios de DSC y TGA. Observaron un pico a aproximadamente 100 °C (sin pérdida de masa considerable) y otro hacia 200 °C, asociado al proceso de descomposición.

La demostración de los eventos de fusión se refleja en la Figura A.4.2 que muestra el comportamiento del polvo en función de la temperatura obtenido por microscopía de platina calefaccionante (HSM). Esta técnica se desarrolló empleando la misma tasa de calentamiento que la utilizada en los ensayos de DSC y TGA. Para cada temperatura se presentan dos imágenes que corresponden a la vistas con y sin placa de retardación (imagen clara y oscura, respectivamente), siendo esta última vista la que facilitó la identificación de zonas cristalinas en la muestra.

El SDS no atomizado presentó un leve pero observable cambio en el aspecto entre 70 y 110 °C, que se vio opacado por la evaporación de agua. Para el SDS



atomizado, no se detectó el evento equivalente utilizando la placa de retardación (imagen clara) entre 70 y 90 °C, posiblemente debido a que el polvo era más fino. En efecto, sí se observaron cambios cuando no se usó la placa de retardación (imagen oscura).

Al alcanzar una temperatura de 190 °C los cristales se orientaron de forma tal que se tornaron más brillosos (tanto con la placa de retardación, como sin ella) e inmediatamente fundieron. Entonces, se obtuvo una imagen totalmente negra (sin placa de retardación), típica de materiales no cristalinos. Respecto a las imágenes tomadas utilizando la placa de retardación, la presencia de material fundido fue claramente notable. Asimismo, debido a la degradación del material, la pérdida de masa en el portaobjeto fue evidente.

La diferencia observada en los perfiles de DSC para el SDS atomizado y no atomizado sugirió la existencia de estructuras cristalinas diferentes, como así también la posible presencia de otros compuestos desconocidos que pudieran ser producidos durante el secado. Estas estructuras cristalinas diferentes fueron efectivamente corroboradas por los ensayos de difracción de rayos X. La espectroscopía infrarroja no evidenció la presencia de otros compuestos, por lo que se infirió que no existieron cambios químicos inducidos por el secado por atomización.

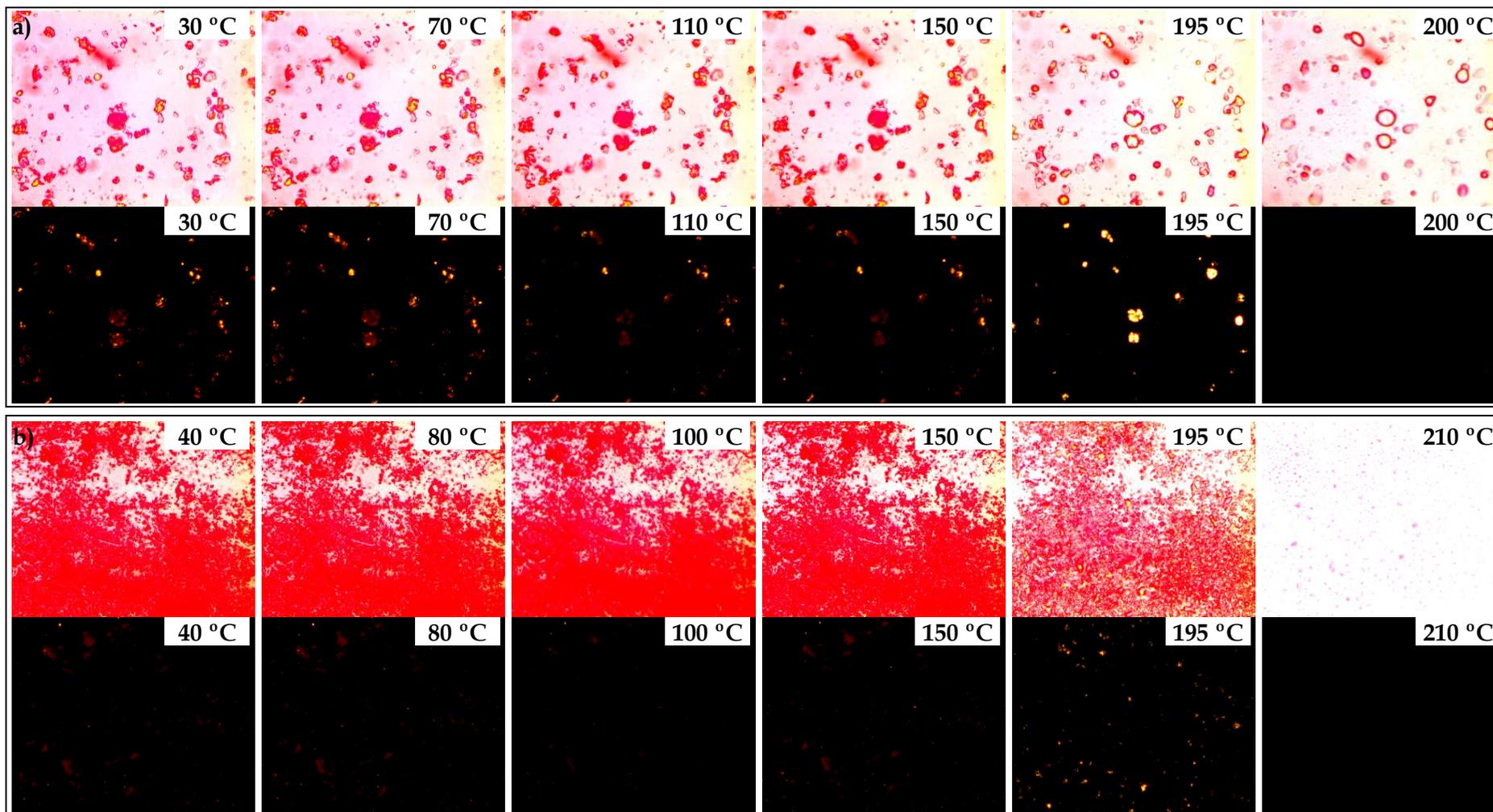


Figura A.4.2. Microscopía de platina calefaccionante, con y sin placa de retardación (imagen clara y oscura, respectivamente): **a)** SDS no atomizado; **b)** SDS atomizado.

4.1.2. Tween 20

El Tween 20 es líquido a temperatura ambiente. Por este motivo, sólo se llevaron a cabo espectroscopía infrarroja y análisis termogravimétrico del material sin secar, presentados en la Figura A.4.3. En efecto, no se esperaba observar transiciones térmicas en el líquido dentro del rango de temperaturas de estudio.

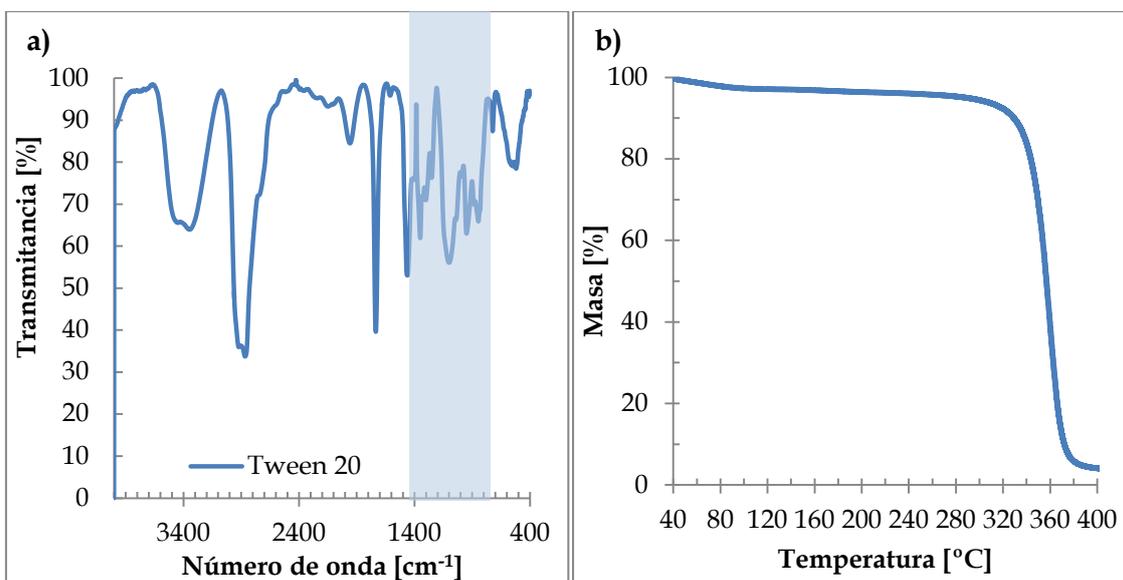


Figura A.4.3. Caracterización del Tween 20: **a)** Espectro infrarrojo; **b)** Perfil de TGA.

De acuerdo a la estructura química del tensoactivo (Figura 2.12), se esperaba encontrar bandas de absorción referentes a los grupos CH_2 , CH_3 (terminal del ácido graso), éster y éter en el perfil de FTIR (Figura A.4.3.a). La revisión bibliográfica evidenció diversos espectros comparables con los obtenidos en este estudio (Borges *et al.*, 2012; Ratanajajaroen, Watthanaphanit, Tamura, Tokura & Rujiravanit, 2012; Trentin, Güell, Gelaw, de Lamo & Ferrando, 2012). Se destacaron como picos característicos del Tween 20 a los ubicados en 3450 cm^{-1} (tensión del OH) (Borges *et al.*, 2012; Ratanajajaroen *et al.*, 2012; Yu, Suyambrakasam, Wu & Chavali, 2012); 2906 , 2860 , 1730 cm^{-1} (tensión del enlace $\text{C} = \text{O}$ del grupo éster) (Borges *et al.*, 2012; Ya-jie, Hai-yin, Shu-yuan & Zhi-kang, 2007), 1450 cm^{-1} (deformación de tijera del grupo CH_2),



1346 cm^{-1} (flexión del enlace H - C = O), 1050 - 1200 cm^{-1} (tensión del C - O) (Ya-jie *et al.*, 2007) y 724.4 cm^{-1} (deformación del CH_2) (Ya-jie *et al.*, 2007).

Por otro lado, el perfil del análisis termogravimétrico realizado (Figura A.4.3.b) mostró un proceso de degradación del tensoactivo alrededor de 340 °C, por lo que se esperaba que el material permaneciera estable térmicamente dentro del rango de temperaturas de estudio. Kishore *et al.* (2011) encontraron un perfil similar de TGA, con el proceso de degradación iniciado hacia alrededor de 350 °C.

4.1.3. Goma arábica, maltodextrina y fitoesteroles

La Figura A.4.4 muestra los resultados de FTIR, DSC (primer calentamiento), TGA y DRX para los agentes encapsulantes y los fitoesteroles, antes y después de ser sometidos en forma individual al secado por atomización.

Los perfiles de DSC y TGA en ambas muestras de goma arábica (atomizada y no atomizada), presentaron una apariencia similar, típica de materiales amorfos, sin picos y con abundante absorción de agua (Figura A.4.4.a1). En efecto, el perfil de TGA, que muestra la evolución del peso de las muestras estudiadas en función de la temperatura, corroboró esta pérdida de masa de aproximadamente el 10 % en ambos casos. Estas muestras no revelaron transiciones térmicas asociadas a fenómenos de fusión y, transición vítrea o descomposición, indicando la ausencia de degradaciones térmicas de importancia dentro de este rango de temperaturas.

Tampoco se observaron diferencias en los perfiles de FTIR entre la goma arábica atomizada y no atomizada. De acuerdo a la Figura A.4.4.b1., las bandas encontradas se correspondieron con perfiles encontrados en la literatura (Al-Assaf, Phillips, Aoki & Sasaki, 2007; Gils, Ray & Sahoo, 2010; Nayak, Das & Maji, 2012).

De acuerdo a la Figura A.4.4.c1, la goma arábica se presentó como un material mayoritariamente amorfo, sin picos cristalográficos definidos. La muestra atomizada mostró un halo amorfo más importante, en concordancia con el mayor contenido acuoso mostrado en el perfil de DSC: Resultados similares obtuvieron Cozic, Picton, Garda, Marlhoux & Le Cerf (2009).



La Figura A.4.4.a2, que presenta los resultados de DSC y TGA de la maltodextrina (atomizada y no atomizada), también mostró el perfil típico de materiales amorfos, sin picos y con abundante absorción de agua (entre 5.5 % y 7 % de acuerdo a lo determinado por TGA). En ninguno de los dos casos (no atomizada y atomizada), dentro del rango operativo del secado no se detectó la presencia de eventos de degradación como tampoco de fusión y transición vítrea, sugiriendo una alta estabilidad del material frente al secado.

La Figura A.4.4.b2 muestra los espectros FTIR de la maltodextrina atomizada y no atomizada. Cilurzo, Cupone, Minghetti, Selmin & Montanari (2008), Garcia, Barros, Gonçalves, Gama & Gil (2008) y Krishnaiah, Sarbatly & Nithyanandam (2012) encontraron perfiles similares a los obtenidos en esta tesis, con la aparición de las mismas bandas de absorción e intensidades relativas similares. No se evidenciaron cambios en los grupos funcionales luego del secado, corroborando así la estabilidad de la maltodextrina frente al proceso de secado. El difractograma de rayos X puso en evidencia una estructura mayoritariamente amorfa (Figura A.4.4.c2), más importante en el caso de la maltodextrina atomizada. En este sentido, Gurrapu, Jukanti, Bobbala, Kanuganti & Jeevana (2012) y Smrčková *et al.* (2013) también encontraron perfiles similares en la difracción de rayos X de maltodextrina.

La caracterización fisicoquímica de los fitoesteroles fue presentada anteriormente en el *CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FITOESTEROLES Y ENSAYOS EXPLORATORIOS PARA LA SELECCIÓN DE LOS AGENTES ENCAPSULANTES*. Su posterior secado por atomización individual no mostró cambios en la estructura química (Figura A.4.4.b3), como tampoco en los perfiles de DSC y TGA (Figura A.4.4.a3) y en el difractograma de rayos X (Figura A.4.4.c3).

En síntesis, ninguno de estos materiales sufrió modificaciones químicas al ser atomizado. En efecto, los perfiles de FTIR fueron solapables casi de manera exacta entre el material no atomizado y atomizado, indicando que no existieron cambios en los grupos funcionales presentes. Por otra parte, a pesar de presentar un aspecto más amorfo en el material secado, los patrones de DRX no revelaron grandes diferencias entre ambas situaciones. Estos resultados garantizaron el correcto procesamiento mediante secado por atomización.

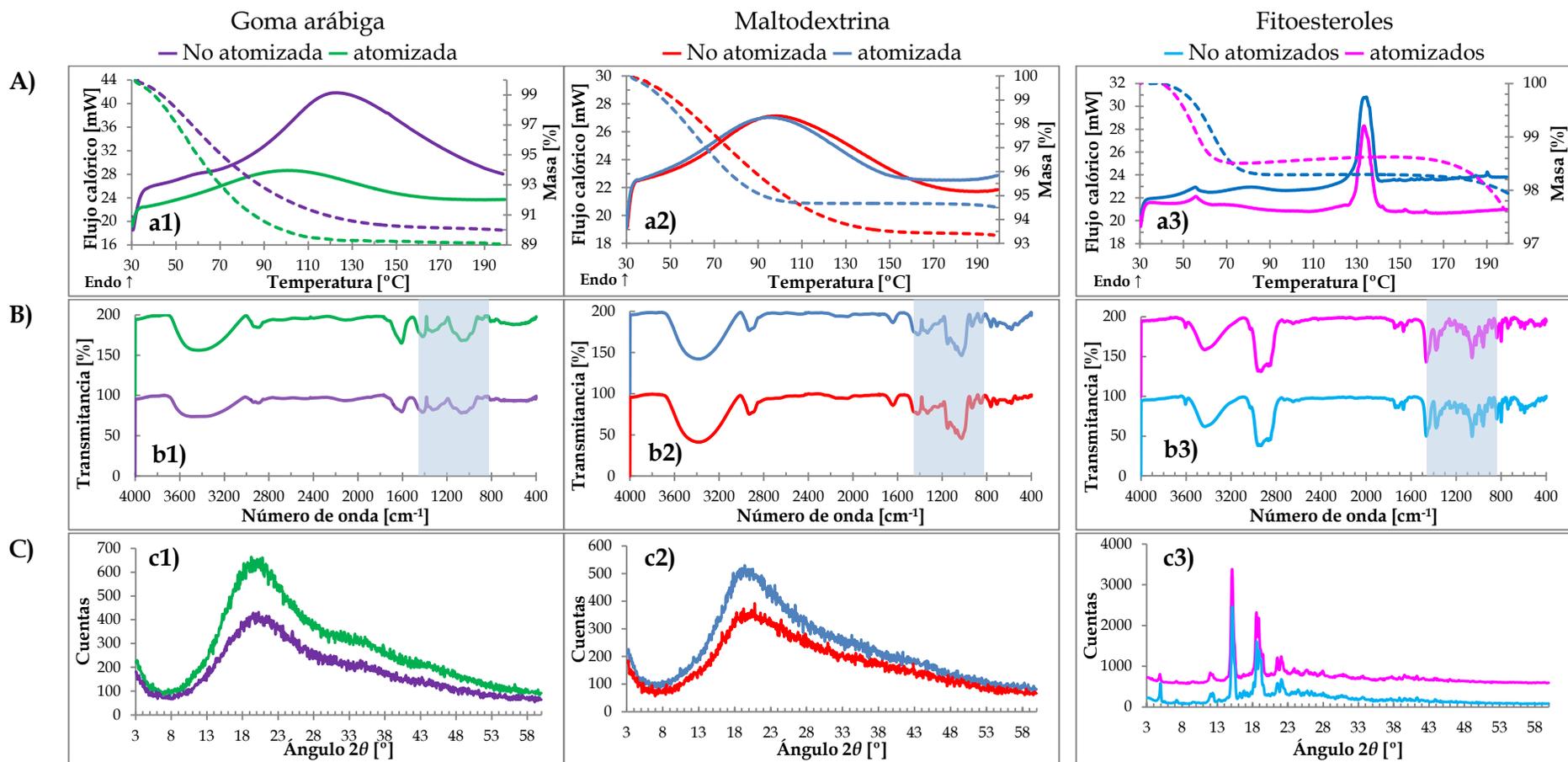


Figura A.4.4. Comparación de los materiales antes y después del secado. **A)** Perfiles del primer calentamiento de DSC (línea llena) y TGA (línea punteada): **a1)** Goma arábica; **a2)** Maltodextrina; **a3)** Fitoesteroles; **B)** Espectros FTIR: **b1)** Goma arábica; **b2)** Maltodextrina; **b3)** Fitoesteroles; **C)** Difracción de rayos X: **c1)** Goma arábica; **c2)** Maltodextrina; **c3)** Fitoesteroles.



APÉNDICE CAPÍTULO 5. DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA y OPTIMIZACIÓN

En este Apéndice se presentan todas tablas de análisis de la varianza para las respuestas de interés en el diseño de experimentos tipo Box – Behnken. Asimismo, se presentan los gráficos de diagnóstico para todos los modelos ajustados.

APÉNDICE 5.1. Ajuste de Rendimiento de Secado

Tabla A.5.1. Análisis de la Varianza – Rendimiento de secado.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_1	344.443	1	344.443	36.42	0.0000
X_2	3247.86	1	3247.86	343.44	0.0000
X_3	254.736	1	254.736	26.94	0.0000
X_4	76.7085	1	76.7085	8.11	0.0094
X_5	740.751	1	740.751	78.33	0.0000
X_6	144.03	1	144.03	15.23	0.0008
X_1X_1	128.957	1	128.957	13.64	0.0013
X_1X_2	40.2539	1	40.2539	4.26	0.0511
X_1X_3	19.027	1	19.027	2.01	0.1701
X_1X_4	24.8662	1	24.8662	2.63	0.1191
X_1X_5	17.9774	1	17.9774	1.90	0.1818
X_1X_6	57.103	1	57.103	6.04	0.0224
X_2X_2	2324.09	1	2324.09	245.76	0.0000



Tabla A.5.1. (Cont.). Análisis de la Varianza – Rendimiento de secado.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_2X_3	9.25219	1	9.25219	0.98	0.3334
X_2X_4	3.74694	1	3.74694	0.40	0.5355
X_2X_5	28.8422	1	28.8422	3.05	0.0947
X_2X_6	9.85114	1	9.85114	1.04	0.3185
X_3X_3	2.05226	1	2.05226	0.22	0.6459
X_3X_4	0.129877	1	0.129877	0.01	0.9078
X_3X_5	14.8068	1	14.8068	1.57	0.2240
X_3X_6	0.0625946	1	0.0625946	0.01	0.9359
X_4X_4	353.412	1	353.412	37.37	0.0000
X_4X_5	242.74	1	242.74	25.67	0.0000
X_4X_6	480.968	1	480.968	50.86	0.0000
X_5X_5	22.9567	1	22.9567	2.43	0.1335
X_5X_6	70.1789	1	70.1789	7.42	0.0124
X_6X_6	406.833	1	406.833	43.02	0.0000
Falta de ajuste	336.743	18	18.7079	1.98	0.0647
Error Puro	208.049	22	9.45679		
Total (corr.)	14096.0	67			

* Los valores resaltados en **negrita** corresponden a factores que afectaron significativamente a la respuesta de interés ($p < 0.05$); mientras que el valor en *itálica* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

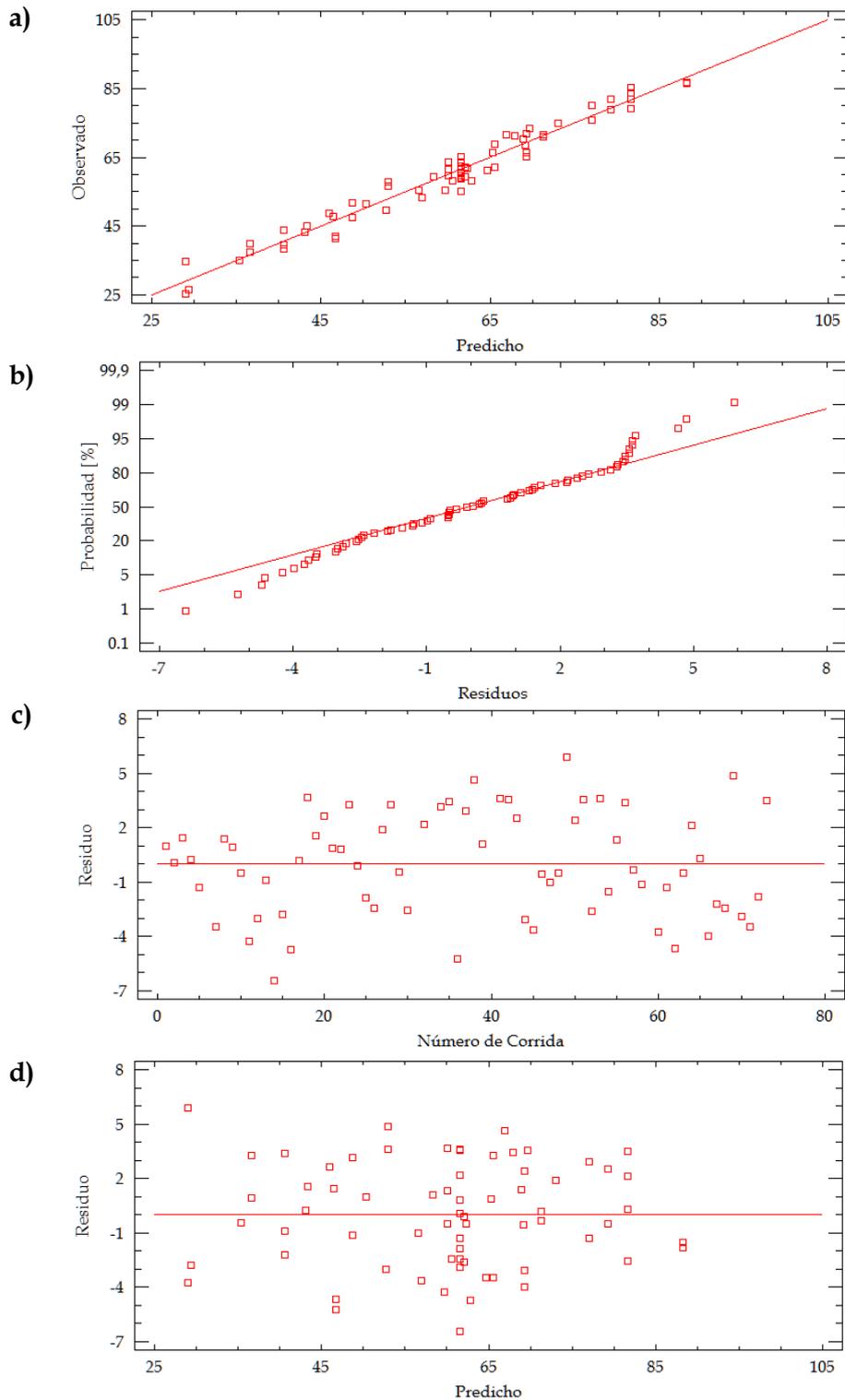


Figura A.5.1. Evaluación de ajuste del Rendimiento de Secado: **a)** valores observados contra valores predichos; **b)** probabilidad normal de los residuos; **c)** residuos contra número de corrida; **d)** residuos contra valores predichos.

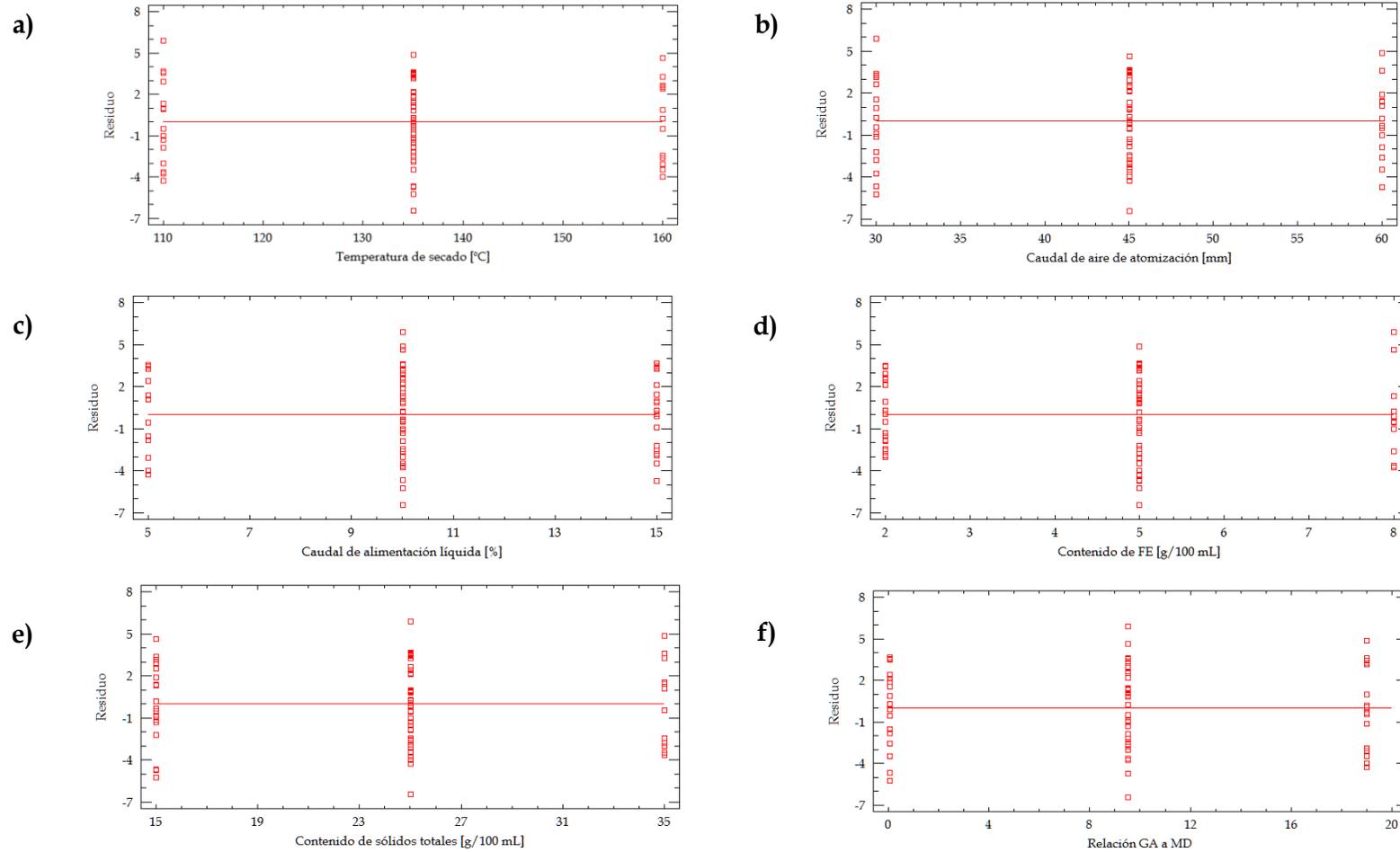


Figura A.5.2. Variación de los residuos de Rendimiento de secado en función de: **a)** temperatura de secado; **b)** caudal de atomización; **c)** caudal de alimentación líquida; **d)** contenido de FE; **e)** contenido de sólidos totales; **f)** relación GA a MD.

**APÉNDICE 5.2. Ajuste Tamaño de Partícula - Suspensión****Tabla A.5.2.** Análisis de la Varianza - Tamaño de Partícula - Suspensión.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_4	1100.87	1	1100.87	437.83	0.0000
X_5	3.05933	1	3.05933	1.22	0.2778
X_6	214.833	1	214.833	85.44	0.0000
X_4X_4	286.51	1	286.51	113.95	0.0000
X_4X_5	122.266	1	122.266	48.63	0.0000
X_4X_6	720.088	1	720.088	286.39	0.0000
X_5X_5	48.9551	1	48.9551	19.47	0.0001
X_5X_6	5.79789	1	5.79789	2.31	0.1381
X_6X_6	179.347	1	179.347	71.33	0.0000
Falta de ajuste	37.3115	9	4.14572	1.65	<i>0.1408</i>
Error Puro	85.4895	34	2.5144		
Total (corr.)	2564.54	52			

* Los valores resaltados en **negrita** corresponden a factores que afectaron significativamente a la respuesta de interés ($p < 0.05$); mientras que el valor en ***itálica*** indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

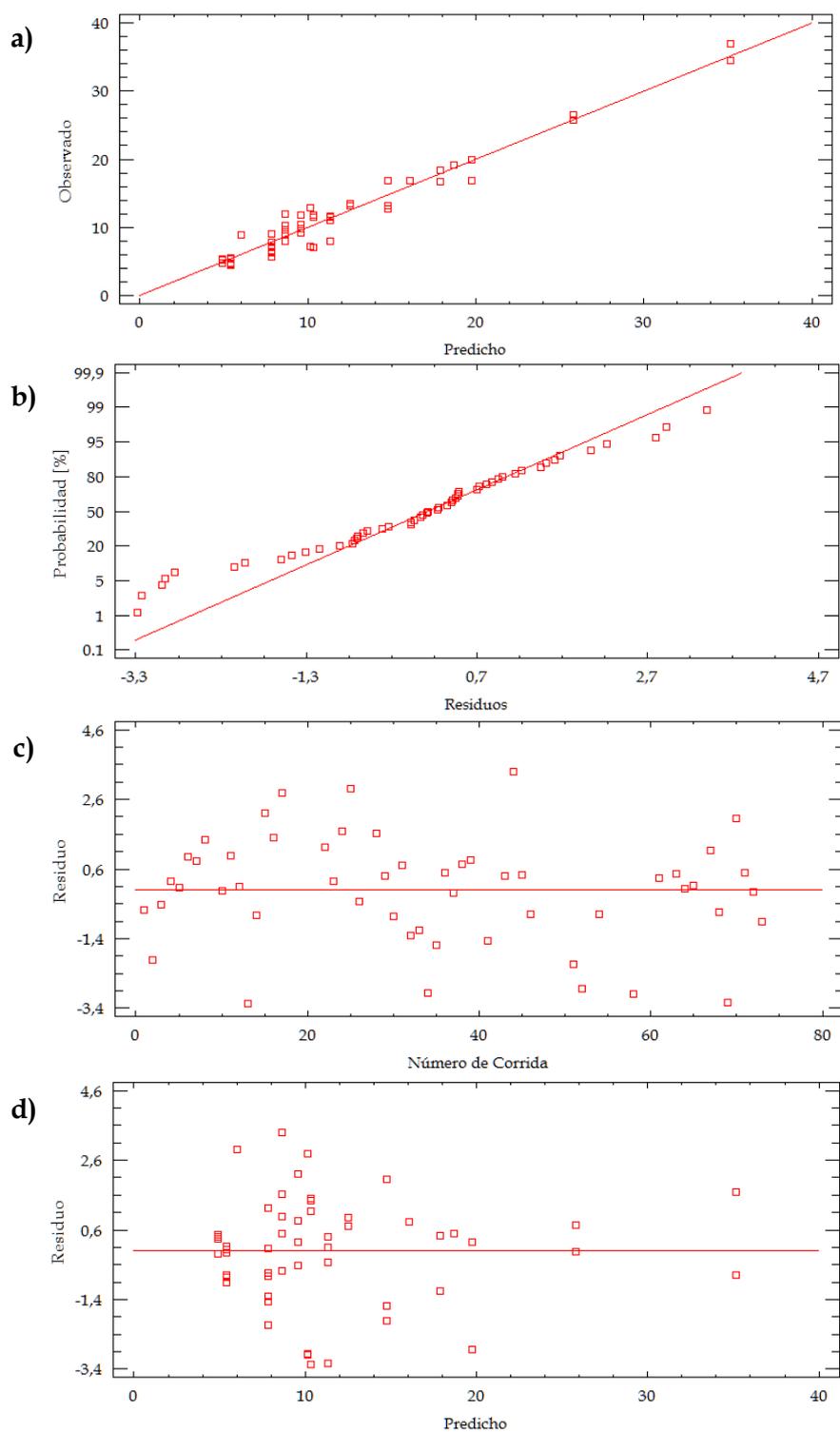


Figura A.5.3. Evaluación de ajuste del Tamaño de Partícula en Suspensión: **a)** valores observados contra valores predichos **b)** probabilidad normal de los residuos; **c)** residuos contra número de corrida; **d)** residuos contra valores predichos.

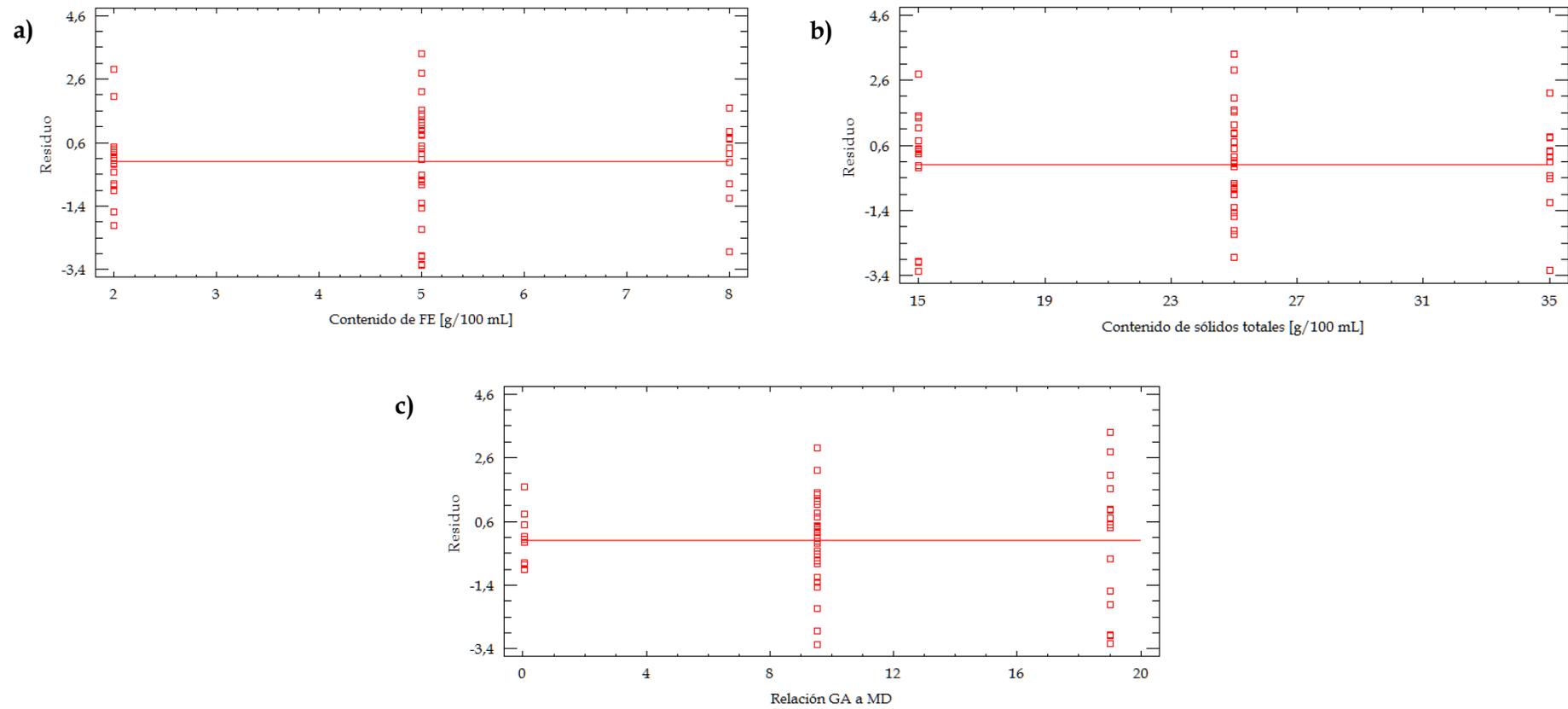


Figura A.5.4. Variación de los Residuos de Tamaño de Partícula – Suspensión en función de: **a)** contenido de FE; **b)** contenido de sólidos totales; **c)** relación GA a MD



APÉNDICE 5.3. Ajuste Tamaño de Partícula - Producto

Tabla A.5.3. Análisis de la Varianza - Tamaño de Partícula - Producto.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_1	4.5346	1	4.5346	11.26	0.0030
X_2	24.4053	1	24.4053	60.58	0.0000
X_3	0.00150598	1	0.00150598	0.00	0.9518
X_4	79.7804	1	79.7804	198.04	0.0000
X_5	5.98583	1	5.98583	14.86	0.0009
X_6	3.84972	1	3.84972	9.56	0.0055
X_1X_1	2.97759	1	2.97759	7.39	0.0129
X_1X_2	10.0964	1	10.0964	25.06	0.0001
X_1X_3	0.313786	1	0.313786	0.78	0.3875
X_1X_4	1.64111	1	1.64111	4.07	0.0565
X_1X_5	0.0186601	1	0.0186601	0.05	0.8317
X_1X_6	7.76472	1	7.76472	19.27	0.0003
X_2X_2	26.0556	1	26.0556	64.68	0.0000
X_2X_3	2.17559	1	2.17559	5.40	0.0302
X_2X_4	6.58671	1	6.58671	16.35	0.0006
X_2X_5	3.83873	1	3.83873	9.53	0.0056



Tabla A.5.3. (Cont.). Análisis de la Varianza – Tamaño de Partícula – Producto.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_2X_6	13.2697	1	13.2697	32.94	0.0000
X_3X_3	1.54113	1	1.54113	3.83	0.0639
X_3X_4	2.17149	1	2.17149	5.39	0.0304
X_3X_5	3.17567	1	3.17567	7.88	0.0105
X_3X_6	1.34114	1	1.34114	3.33	0.0823
X_4X_4	0.269966	1	0.269966	0.67	0.4222
X_4X_5	2.65449	1	2.65449	6.59	0.0180
X_4X_6	9.54957	1	9.54957	23.70	0.0001
X_5X_5	10.6731	1	10.6731	26.49	0.0000
X_5X_6	3.66835	1	3.66835	9.11	0.0066
X_5X_6	0.0462573	1	0.0462573	0.11	0.7381
Falta de ajuste	12.1788	17	0.7164	1.78	0.1054
Error Puro	8.45995	21	0.402855		
Total (corr.)	334.298	65			

* Los valores resaltados en **negrita** corresponden a factores que afectaron significativamente a la respuesta de interés ($p < 0.05$); mientras que el valor en *itálica* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

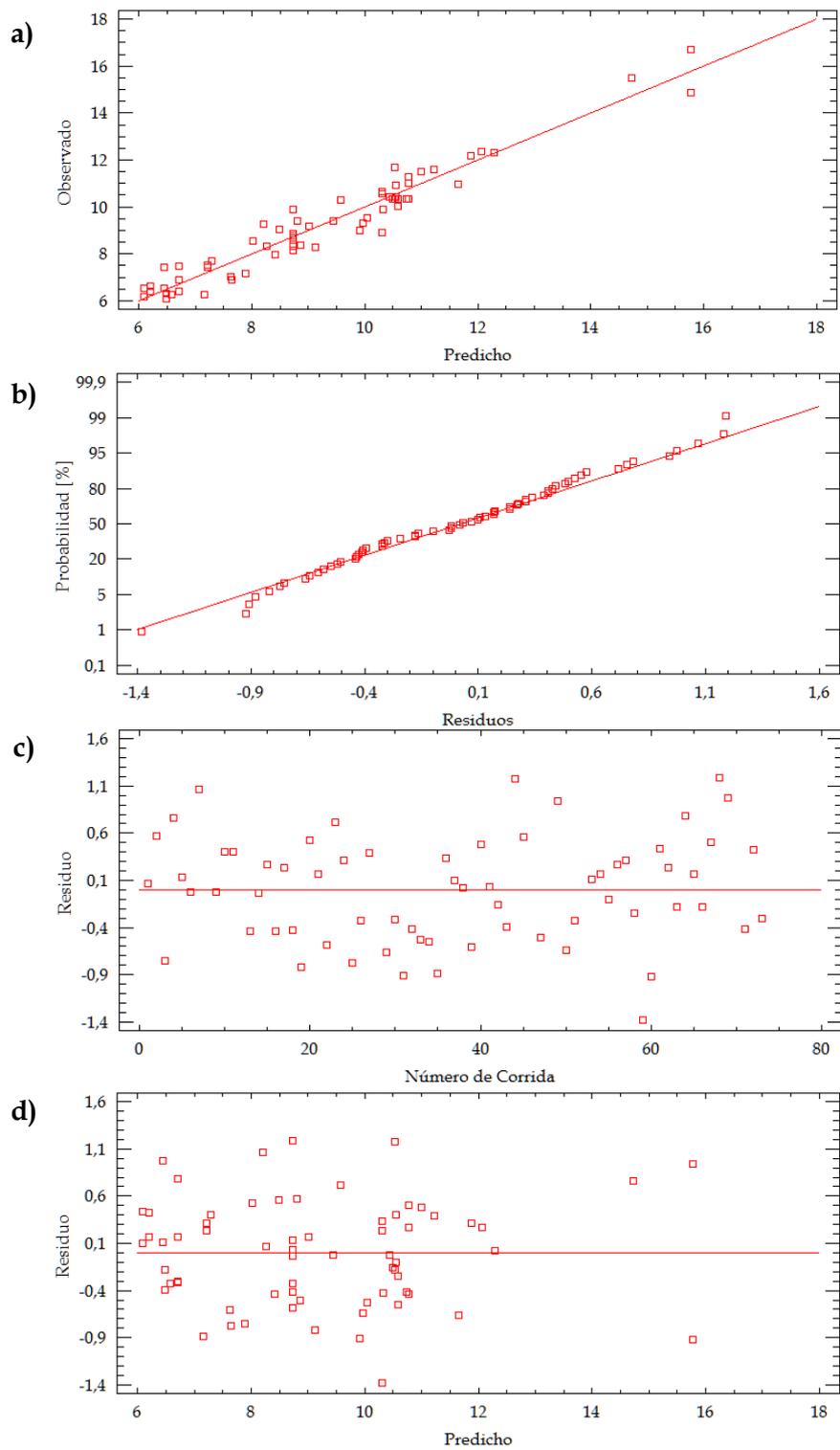


Figura A.5.5. Evaluación de ajuste del Tamaño de Partícula del Producto: **a)** valores observados contra valores predichos; **b)** probabilidad normal de los residuos; **c)** residuos contra número de corrida; **d)** residuos contra valores predichos.

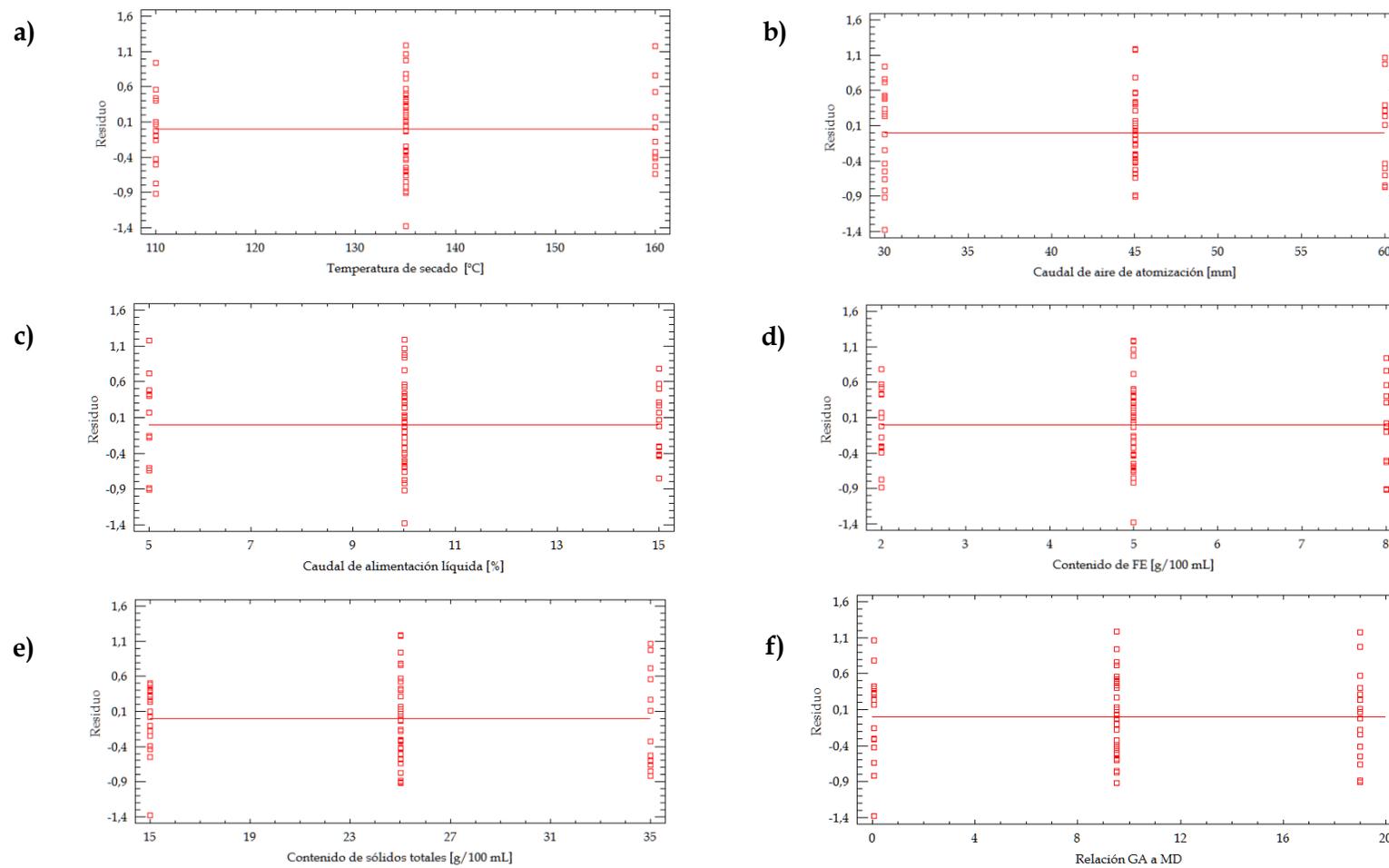


Figura A.5.6. Variación de los Residuos de Tamaño de Partícula – Producto en función de: **a)** temperatura de secado; **b)** caudal de atomización; **c)** caudal de alimentación líquida; **d)** contenido de FE; **e)** contenido de sólidos totales; **f)** relación GA a MD.



APÉNDICE 5.4. Ajuste Retención de FE

Tabla A.5.4. Análisis de la Varianza - Retención de FE.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_1	560.4	1	560.4	6.05	0.0276
X_2	1129.58	1	1129.58	12.19	0.0036
X_3	315.088	1	315.088	3.40	0.0864
X_4	1040.46	1	1040.46	11.23	0.0048
X_5	1107.12	1	1107.12	11.95	0.0039
X_6	14.2489	1	14.2489	0.15	0.7009
X_1X_1	23.501	1	23.501	0.25	0.6224
X_1X_2	2.14502	1	2.14502	0.02	0.8812
X_1X_3	16.705	1	16.705	0.18	0.6776
X_1X_4	0.597138	1	0.597138	0.01	0.9372
X_1X_5	8.89803	1	8.89803	0.10	0.7612
X_1X_6	212.308	1	212.308	2.29	0.1524
X_2X_2	1609.1	1	1609.1	17.36	0.0009
X_2X_3	0.160991	1	0.160991	0.00	0.9673
X_2X_4	10.1443	1	10.1443	0.11	0.7456
X_2X_5	76.0075	1	76.0075	0.82	0.3804



Tabla A.5.4. (Cont.). Análisis de la Varianza - Retención de FE.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_2X_6	2.2822	1	2.2822	0.02	0.8775
X_3X_3	70.9382	1	70.9382	0.77	0.3964
X_3X_4	26.3642	1	26.3642	0.28	0.6021
X_3X_5	74.4841	1	74.4841	0.80	0.3851
X_3X_6	489.846	1	489.846	5.29	0.0374
X_4X_4	0.0971556	1	0.0971556	0.00	0.9746
X_4X_5	159.703	1	159.703	1.72	0.2104
X_4X_6	385.2	1	385.2	4.16	0.0608
X_5X_5	25.0249	1	25.0249	0.27	0.6114
X_5X_6	4.20377	1	4.20377	0.05	0.8344
X_5X_6	17.0897	1	17.0897	0.18	0.6741
Falta de ajuste	1407.84	21	67.04	0.72	0.7556
Error Puro	1297.29	14	92.6637		
Total (corr.)	12223.3	62			

* Los valores resaltados en **negrita** corresponden a factores que afectaron significativamente a la respuesta de interés ($p < 0.05$); mientras que el valor en *italica* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

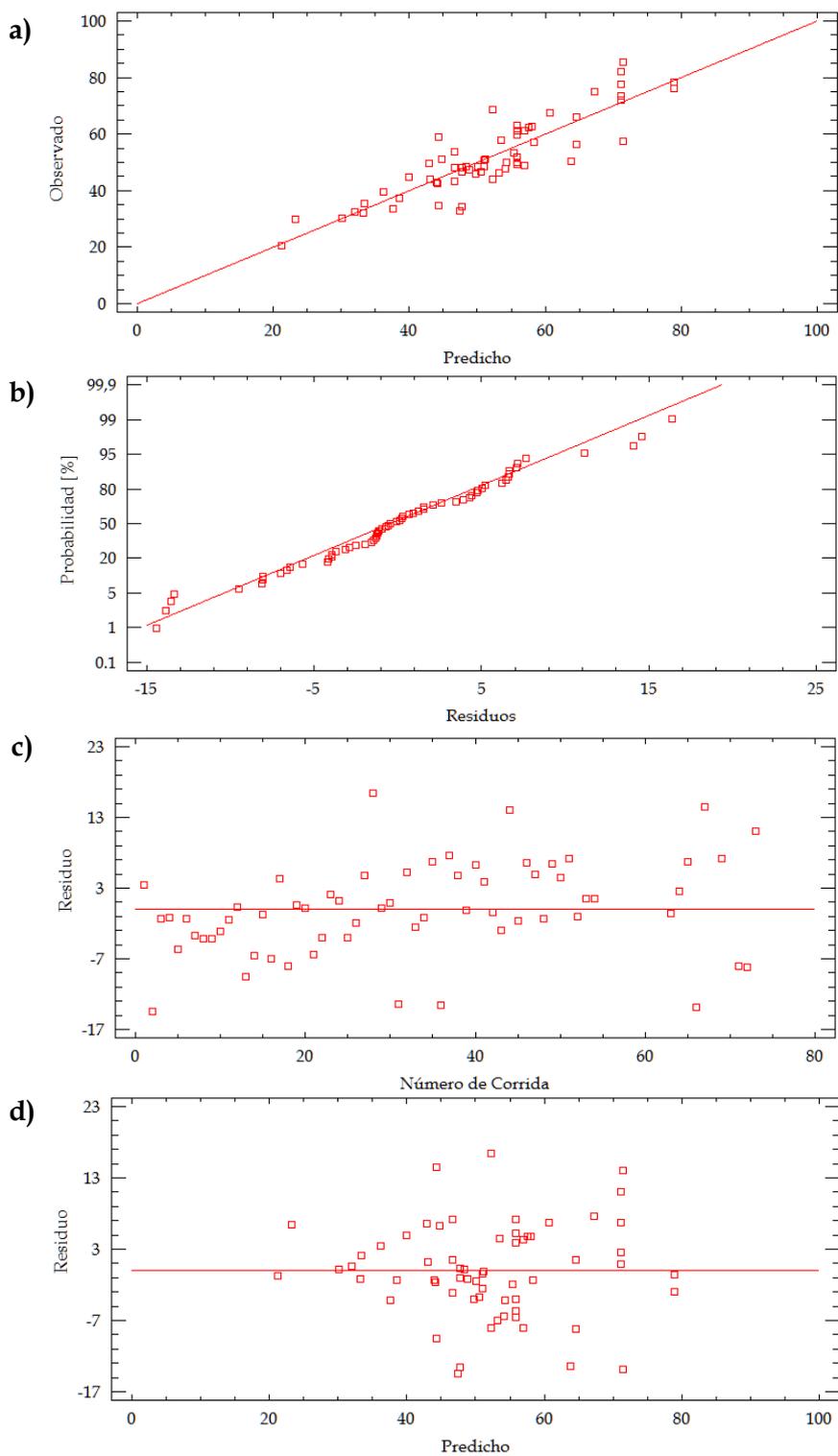


Figura A.5.7. Evaluación de ajuste de la Retención de FE: **a)** valores observados contra valores predichos; **b)** probabilidad normal de los residuos; **c)** residuos contra número de corrida; **d)** residuos contra valores predichos.

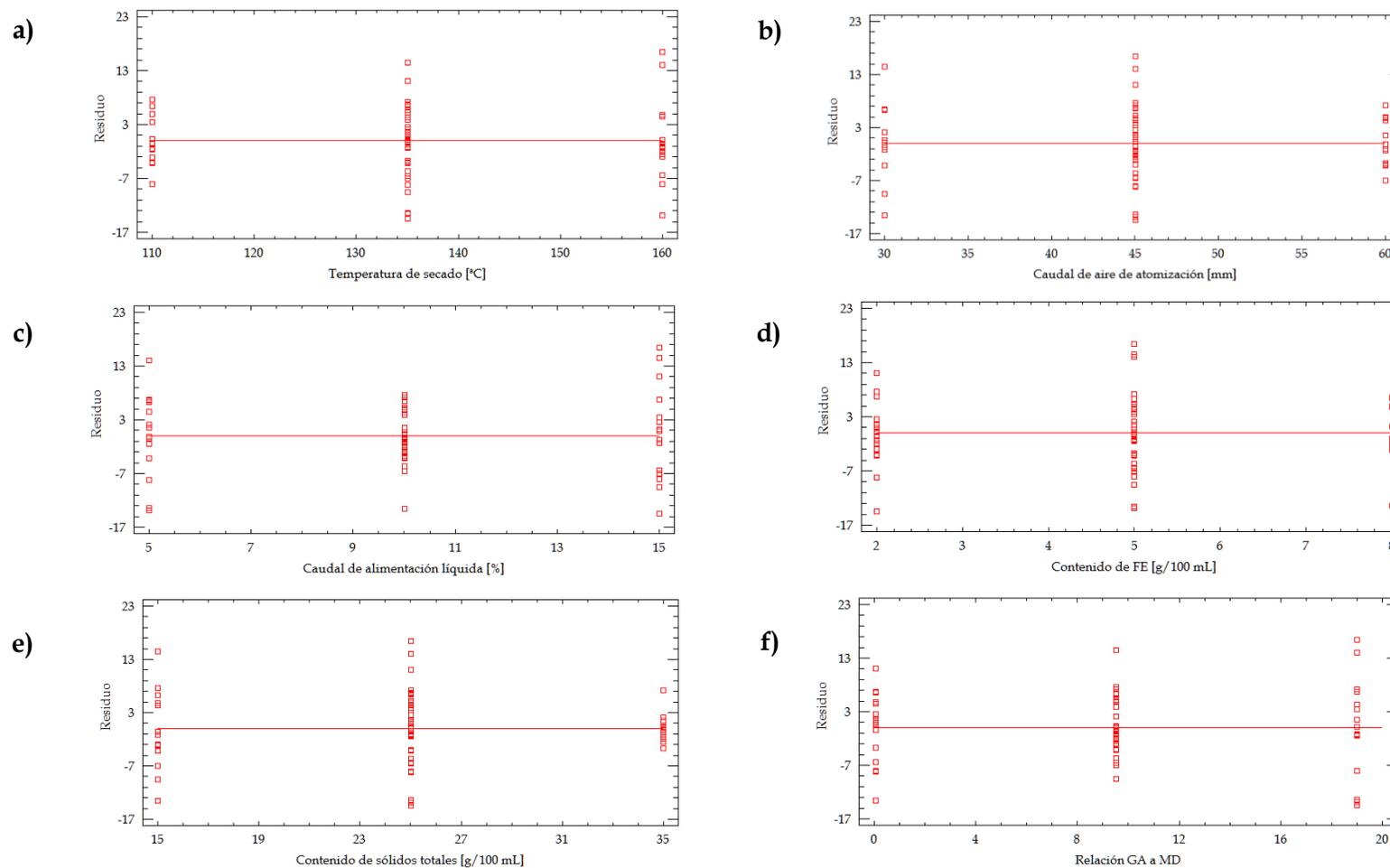


Figura A.5.8. Variación de los Residuos de Retención de FE en función de: **a)** temperatura de secado; **b)** caudal de atomización; **c)** caudal de alimentación líquida; **d)** contenido de FE; **e)** contenido de sólidos totales; **f)** relación GA a MD.



APÉNDICE 5.5. Ajuste Eficiencia de Encapsulación

Tabla A.5.5. Análisis de la Varianza - Eficiencia de Encapsulación.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_1	35.713	1	35.713	0.52	0.4851
X_2	94.2265	1	94.2265	1.36	0.2641
X_3	833.31	1	833.31	12.05	0.0041
X_4	2040.86	1	2040.86	29.51	0.0001
X_5	205.887	1	205.887	2.98	0.1082
X_6	50.2075	1	50.2075	0.73	0.4096
X_1X_1	34.0224	1	34.0224	0.49	0.4955
X_1X_2	93.673	1	93.673	1.35	0.2655
X_1X_3	51.7441	1	51.7441	0.75	0.4028
X_1X_4	288.842	1	288.842	4.18	0.0618
X_1X_5	32.1049	1	32.1049	0.46	0.5076
X_1X_6	31.1001	1	31.1001	0.45	0.5143
X_2X_2	33.7322	1	33.7322	0.49	0.4973
X_2X_3	114.467	1	114.467	1.65	0.2207
X_2X_4	297.064	1	297.064	4.29	0.0587
X_2X_5	19.4347	1	19.4347	0.28	0.6050



Tabla A.5.5. (Cont.). Análisis de la Varianza - Eficiencia de Encapsulación.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrados Medios</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor p*</i>
X_2X_6	7.77043	1	7.77043	0.11	0.7428
X_3X_3	13.7726	1	13.7726	0.20	0.6628
X_3X_4	136.904	1	136.904	1.98	0.1829
X_3X_5	0.30883	1	0.30883	0.00	0.9477
X_3X_6	99.9256	1	99.9256	1.44	0.2508
X_4X_4	2344.14	1	2344.14	33.89	0.0001
X_4X_5	690.373	1	690.373	9.98	0.0075
X_4X_6	153.213	1	153.213	2.22	0.1605
X_5X_5	134.472	1	134.472	1.94	0.1866
X_5X_6	303.078	1	303.078	4.38	0.0565
X_5X_6	59.487	1	59.487	0.86	0.3706
Falta de ajuste	2991.72	21	142.463	2.06	0.0909
Error Puro	899.202	13	69.1694		
Total (corr.)	14227.4	61			

* Los valores resaltados en **negrita** corresponden a factores que afectaron significativamente a la respuesta de interés ($p < 0.05$); mientras que el valor en *itálica* indica la ausencia de falta de ajuste del modelo.

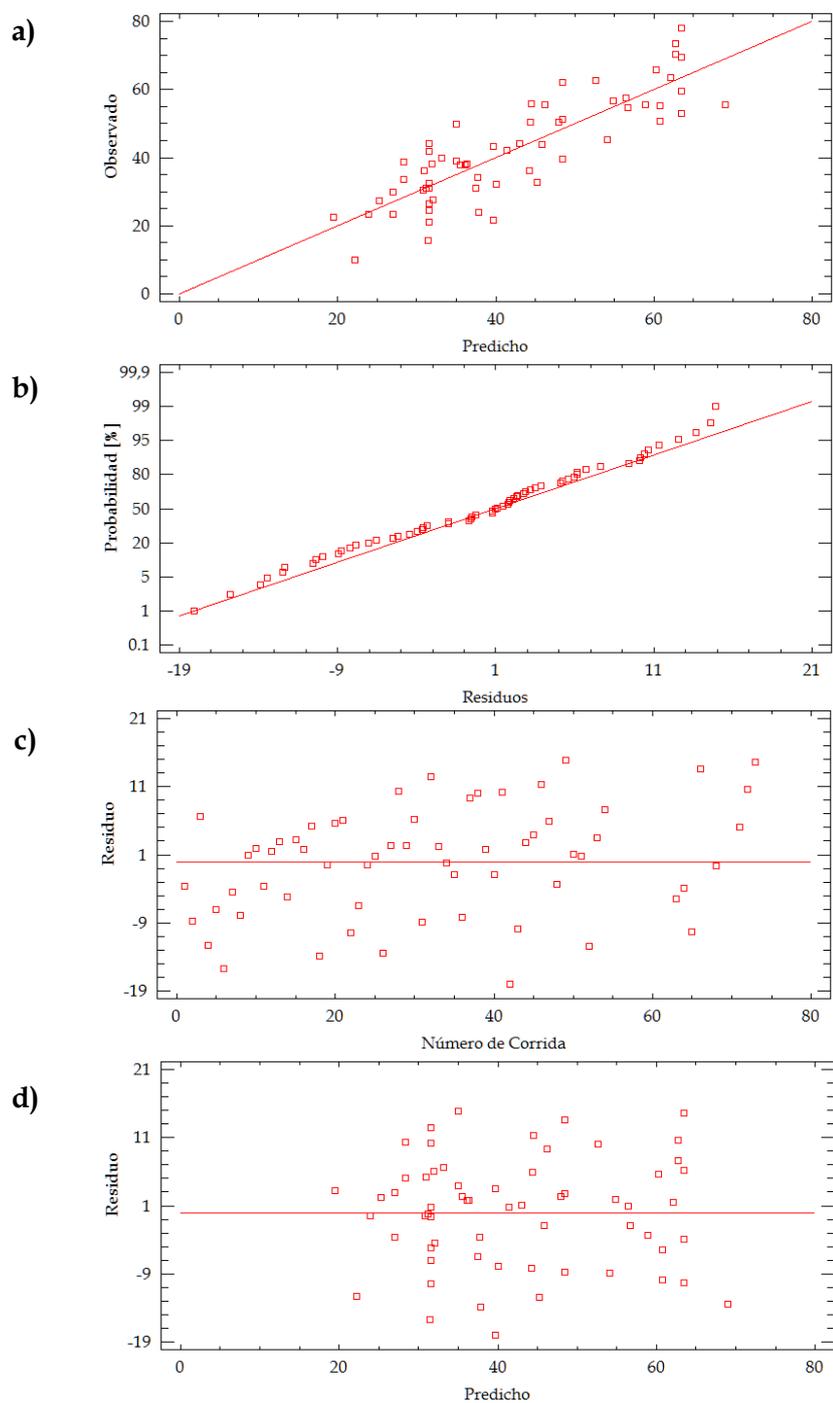


Figura A.5.9. Evaluación de ajuste de la Eficiencia de Encapsulación: **a)** valores observados contra valores predichos; **b)** probabilidad normal de los residuos; **c)** residuos contra número de corrida; **d)** residuos contra valores predichos.

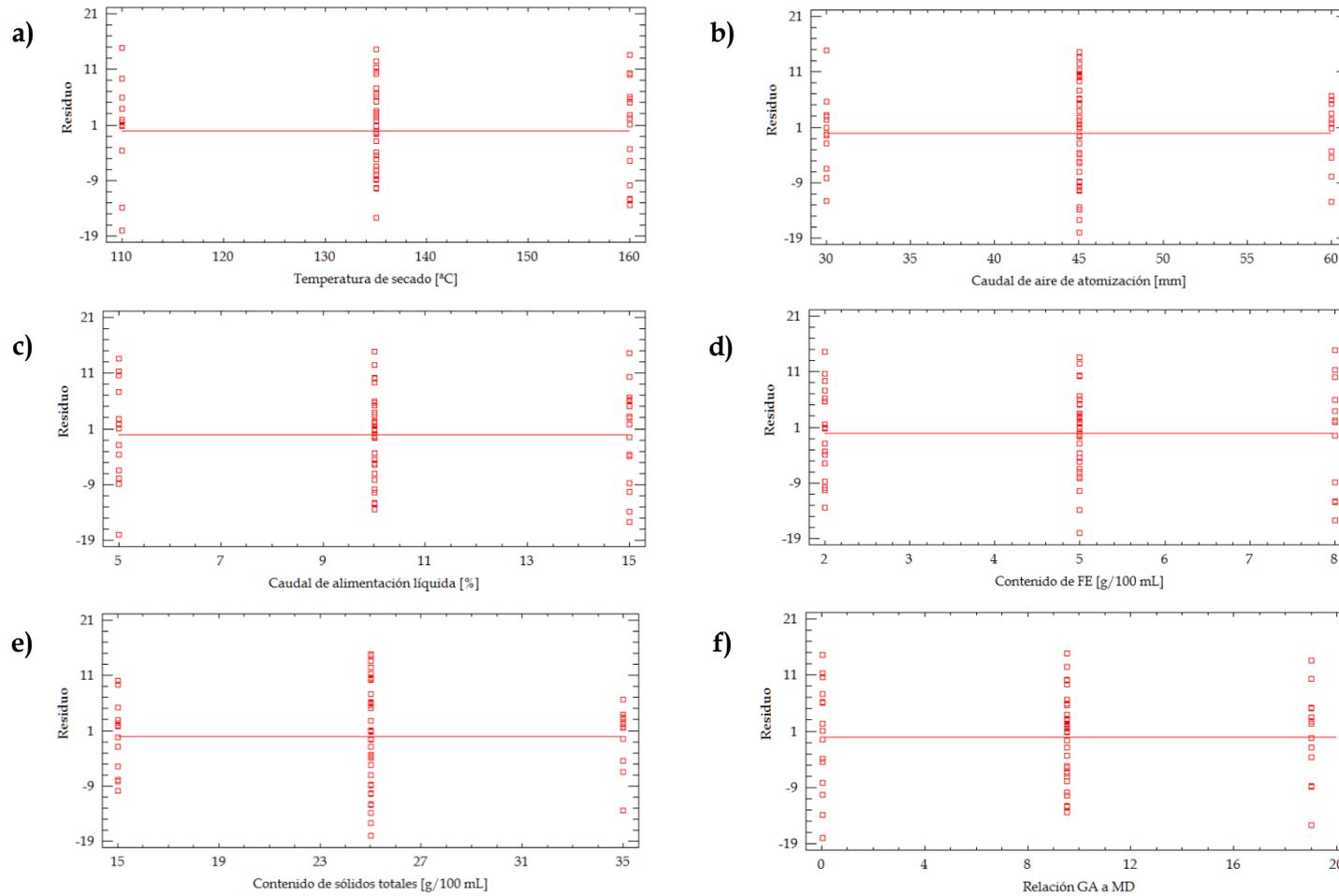


Figura A.5.10. Variación de los Residuos de Eficiencia de Encapsulación en función de: **a)** temperatura de secado; **b)** caudal de atomización; **c)** caudal de alimentación líquida; **d)** contenido de FE; **e)** contenido de sólidos totales; **f)** relación GA a MD.



APÉNDICE 5.6. Intervalos de Confianza

Tabla A.5.6. Límite inferior (LI) y superior (LS) de los intervalos de confianza de cada respuesta ajustada para cada corrida experimental.

N°	Y ₁ [%]		Y ₂ [μm]		Y ₃ [μm]		Y ₅ [%]		Y ₆ [%]	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS
1	45.49	55.20	7.654	9.587	7.258	9.259	20.74	51.48	13.61	40.42
2	57.81	65.28	13.246	16.332	7.665	9.952	32.48	62.27	35.48	61.45
3	41.02	52.00	8.515	10.665	6.924	8.869	23.37	53.55	19.78	46.56
4	38.09	48.00	18.520	20.931	13.749	15.698	17.82	48.52	8.82	35.60
5	59.15	63.97	6.825	8.854	8.227	9.225	47.46	64.32	24.80	38.39
6	66.37	79.04	10.795	14.198	8.489	10.391	29.75	58.32	19.01	43.94
7	60.16	69.21	13.985	18.199	7.270	9.136	35.13	65.93	18.65	45.46
8	64.06	73.72	9.299	11.340	9.426	12.341	38.89	69.59	26.70	53.48
9	31.93	41.30	4.853	7.142	9.256	11.616	22.29	53.00	43.09	69.87
10	56.29	63.84	24.023	27.577	9.754	11.323	31.28	61.86	41.48	68.16
11	54.82	64.67	7.654	9.587	6.285	8.290	34.62	65.41	24.35	51.20
12	47.78	57.55	9.558	13.126	4.879	7.895	32.33	63.10	48.72	75.56
13	37.33	43.82	9.299	11.340	10.096	11.435	31.95	56.62	13.63	40.42
14	59.15	63.97	6.825	8.854	8.227	9.225	47.46	64.32	24.80	38.39



Tabla A.5.6. (Cont.). Límite inferior (LI) y superior (LS) de los intervalos de confianza de cada respuesta ajustada para cada corrida experimental.

N°	Y ₁ [%]		Y ₂ [μm]		Y ₃ [μm]		Y ₅ [%]		Y ₆ [%]	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS
15	24.63	34.06	8.515	10.665	10.936	13.206	5.94	36.47	6.04	32.82
16	58.15	67.45	9.299	11.340	7.454	9.389	37.91	68.46	22.96	49.74
17	67.52	75.15	8.590	11.730	6.391	8.020	41.66	72.22	17.52	44.34
18	55.57	64.52	13.915	16.650	9.390	11.250	42.83	71.06	25.53	50.17
19	38.83	47.90	13.985	18.199	8.185	10.060	16.61	47.34	10.51	37.32
20	41.25	50.69	4.853	7.142	7.045	8.996	33.14	63.57	47.05	73.57
21	60.76	69.97	13.915	16.650	8.042	9.999	39.28	68.95	19.01	44.86
22	59.15	63.97	6.825	8.854	8.227	9.225	47.46	64.32	24.80	38.39
23	31.77	41.51	8.515	10.665	8.553	10.600	18.07	48.76	24.13	50.91
24	57.17	67.00	33.278	37.080	10.868	12.890	27.61	58.38	17.45	44.29
25	56.85	66.30	4.853	7.142	6.607	8.689	34.43	65.13	28.02	54.80
26	56.01	65.18	9.558	13.126	5.593	7.559	39.99	70.75	55.56	82.38
27	68.27	77.89	16.517	20.892	10.172	12.271	42.65	73.37	34.53	61.35
28	61.65	69.40	7.654	9.587	9.755	11.724	39.99	64.56	17.66	39.07
29	30.60	40.09	9.518	13.106	10.670	12.625	14.88	45.46	22.06	48.88
30	78.63	84.78	4.192	6.668	6.108	7.315	61.69	80.50	55.28	71.67
31	73.75	85.31	10.795	14.198	8.994	10.821	50.18	77.30	42.23	65.92



Tabla A.5.6. (Cont.). Límite inferior (LI) y superior (LS) de los intervalos de confianza de cada respuesta ajustada para cada corrida experimental.

N°	Y ₁ [%]		Y ₂ [μm]		Y ₃ [μm]		Y ₅ [%]		Y ₆ [%]	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS
32	59.15	63.97	6.825	8.854	8.227	9.225	47.46	64.32	24.80	38.39
33	63.27	76.08	16.153	19.611	9.043	11.037	35.62	66.40	11.83	38.66
34	44.84	52.59	8.590	11.730	9.792	11.367	33.68	63.90	17.74	44.55
35	63.32	72.44	13.246	16.332	6.195	8.122	45.85	75.65	43.65	69.63
36	42.92	50.49	16.517	20.892	9.651	10.971	33.54	62.08	30.80	57.62
37	72.92	81.30	3.478	6.289	5.302	6.871	52.01	82.62	32.92	59.60
38	62.32	71.67	24.023	27.577	11.111	13.472	42.22	72.80	39.35	66.02
39	54.02	62.69	8.515	10.665	6.710	8.544	36.98	65.46	22.73	49.52
40	35.36	48.88	9.299	11.340	10.019	11.986	29.41	60.18	32.51	59.29
41	59.15	63.97	6.825	8.854	8.227	9.225	47.46	64.32	24.80	38.39
42	65.19	74.16	13.915	16.650	9.483	11.514	36.79	65.31	27.22	52.11
43	75.49	83.08	3.478	6.289	5.669	7.281	66.68	91.35	50.03	71.52
44	65.40	73.18	7.654	9.587	9.732	11.326	59.15	83.74	37.67	59.10
45	52.40	61.56	16.153	19.611	7.520	9.454	29.67	58.55	22.45	47.67
46	64.51	73.76	33.278	37.080	11.993	14.999	27.50	58.28	31.10	57.94
47	51.80	61.24	18.520	20.931	7.845	9.877	24.47	55.24	30.93	57.75
48	57.84	66.82	4.853	7.142	9.307	11.975	43.22	73.62	45.67	72.19



Tabla A.5.6. (Cont.). Límite inferior (LI) y superior (LS) de los intervalos de confianza de cada respuesta ajustada para cada corrida experimental.

N°	Y ₁ [%]		Y ₂ [μm]		Y ₃ [μm]		Y ₅ [%]		Y ₆ [%]	
	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS	LI	LS
49	25.13	32.74	18.520	20.931	14.890	16.660	7.84	38.59	21.62	48.44
50	64.73	73.98	13.915	16.650	8.934	10.983	38.53	68.43	29.98	56.04
51	59.15	63.97	6.825	8.854	8.227	9.225	47.46	64.32	24.80	38.39
52	57.06	67.00	18.520	20.931	11.676	14.761	32.38	63.10	31.81	58.59
53	49.22	56.59	9.518	13.106	5.693	7.193	34.33	59.02	26.26	53.07
54	84.09	92.45	4.192	6.668	5.424	6.999	52.40	76.92	52.02	73.39



NOMENCLATURA

(-)	Nivel inferior del factor
(+)	Nivel superior del factor
(0)	Nivel medio del factor
2θ	Ángulo de barrido de rayos X
a_0	Coefficiente de ajuste de orden 0 (cero)
A_{Esterol}	Área del pico cromatográfico del esteroles de interés [cuentas]
a_i	Coefficiente de ajuste de orden 1 (uno) para el factor i
a_{ii}	Coefficiente de ajuste de orden 2 (dos) para el factor i
a_{ij}	Coefficiente de ajuste de interacción entre los factores i y j
ANOVA	Análisis de la Varianza
ASTM	Norma Internacional para el tamaño de apertura de la malla
$A_{\alpha\text{-colestanol}}$	Área del pico cromatográfico del α -colestanol [cuentas]
CC	Carboximetil celulosa
C_{Esterol}	Concentración del esteroles de interés en la muestra [$\text{mg}/\text{kg}_{\text{muestra}}$]
CR	Micropartículas de referencia (sin tensoactivo) colectadas en la cámara de secado
CS5	Micropartículas de FS5 (2.0 % m/v) colectadas en la cámara de secado
CT5	Micropartículas de FT5 (2.0 % m/v) colectadas en la cámara de secado
D	Deseabilidad global
D [4,3]	Diámetro medio aritmético en volumen [μm]
D [v,0.10]	Diámetro por debajo del cual se encuentra el 10 % de la población
D [v,0.90]	Diámetro por debajo del cual se encuentra el 90 % de la población
DE	Dextrosa Equivalente
DensE	Densidad empaquetada [g/cm^3]
DensG	Densidad a granel [g/cm^3]
d	Función deseabilidad
d_i	Deseabilidad individual para el factor i



$d_{i,m\acute{a}x}$	Funci3n deseabilidad para maximizar la respuesta Y_i
$d_{i,m\acute{i}n}$	Funci3n deseabilidad para minimizar la respuesta Y_i
$d_{i,obj}$	Funci3n deseabilidad para un valor objetivo en la respuesta Y_i
dpS1_0	Tama1o medio de la suspensi3n S1 [μm] (Sin homogeneizar)
dpS2_0	Tama1o medio de la suspensi3n S2 [μm] (Sin homogeneizar)
dpS3_0	Tama1o medio de la suspensi3n S3 [μm] (Sin homogeneizar)
dpS1_1	Tama1o medio de la suspensi3n S1 [μm] (Homogeneizada 3 min)
dpS2_1	Tama1o medio de la suspensi3n S2 [μm] (Homogeneizada 3 min)
dpS3_1	Tama1o medio de la suspensi3n S3 [μm] (Homogeneizada 3 min)
dpS1_2	Tama1o medio de la suspensi3n S1 [μm] (Homogeneizada 9 min)
dpS2_2	Tama1o medio de la suspensi3n S2 [μm] (Homogeneizada 9 min)
dpS3_3	Tama1o medio de la suspensi3n S3 [μm] (Homogeneizada 9 min)
DRX	Difracci3n de Rayos X
DS	Grado de Sustituci3n (Degree of Substitution)
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EE	Eficiencia de Encapsulaci3n [%]
F_0	Estadística F para la falta de ajuste
f_{acum25}	Frecuencia acumulada a 25 μm
FE	Fitoesteroles, Esteroles Vegetales, Esteroles Plantarios
FE _E	Contenido de Fitoesteroles Encapsulados en el producto [m/m %]
FE _L	Contenido de Fitoesteroles Libres en el producto [m/m %]
FE _T	Contenido de Fitoesteroles Totales en el producto [m/m %]
FID	Detector de Ionizaci3n de Llama
FR	Suspensi3n de cobertura de referencia (sin tensoactivo)
FS1	Suspensi3n a secar con 0.1 % m/v de SDS
FS2	Suspensi3n a secar con 0.5 % m/v de SDS
FS3	Suspensi3n a secar con 1.0 % m/v de SDS
FS4	Suspensi3n a secar con 1.5 % m/v de SDS
FS5	Suspensi3n a secar con 2.0 % m/v de SDS
FS6	Suspensi3n a secar con 2.65 % m/v de SDS
FT1	Suspensi3n a secar con 0.1 % m/v de T20



FT2	Suspensión a secar con 0.5 % m/v de T20
FT3	Suspensión a secar con 1.0 % m/v de T20
FT4	Suspensión a secar con 1.5 % m/v de T20
FT5	Suspensión a secar con 2.0 % m/v de T20
FT6	Suspensión a secar con 2.65 % m/v de T20
FTIR	Espectrofotometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier
GA	Goma Arábiga, Goma Acacia
GG	Goma Guar
GRAS	Generalmente Reconocidos Como Seguros
H	Altura de separación de fases [mm]
H*	Altura total de suspensión [mm]
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HDL - C	Lipoproteínas de alta densidad enlazadas al colesterol
HLB	Balance Hidrofílico - Lipofílico
HR	Humedad Residual [m/m %]
HSM	Microscopía de Platina Calefaccionante
IC	Índice de Carr
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
I _i	Coefficiente de Impacto de una dada respuesta
k	Número de factores evaluados
L	Límite inferior del intervalo de optimización de una dada respuesta
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL - C	Lipoproteínas de baja densidad enlazadas al colesterol
LI	Límite Inferior de intervalo de confianza
LS	Límite superior de intervalo de confianza
m	Masa de muestra incorporada al ensayo [g]
MD	Maltodextrina
MR	Microcápsulas de referencia (sin tensoactivo)
MS1	Micropartículas de FS1 (0.1 % m/v de SDS)
MS2	Micropartículas de FS2 (0.5 % m/v de SDS)
MS3	Micropartículas de FS3 (1.0 % m/v de SDS)
MS4	Micropartículas de FS4 (1.5 % m/v de SDS)



MS5	Micropartículas de FS5 (2.0 % m/v de SDS)
MS6	Micropartículas de FS6 (2.65 % m/v de SDS)
MT1	Micropartículas de FT1 (0.1 % m/v de T20)
MT2	Micropartículas de FT2 (0.5 % m/v de T20)
MT3	Micropartículas de FT3 (1.0 % m/v de T20)
MT4	Micropartículas de FT4 (1.5 % m/v de T20)
MT5	Micropartículas de FT5 (2.0 % m/v de T20)
MT6	Micropartículas de FT6 (2.65 % m/v de T20)
$m_{\alpha\text{-colestanol}}$	Masa de α -colestanol incorporada al ensayo [mg]
n	Número de respuestas involucradas en la Deseabilidad Global
Nº CAS	Número de Identificación del compuesto
p	Probabilidad de no cumplir con la hipótesis planteada
PC	Recolectado en la cámara de secado [%]
p_{LOF}	Valor p de falta de ajuste
p_{MOD}	Valor p para el modelo
R'	Ácido graso esterificado en polisorbatos
r^*	Radio del casquete esférico [mm]
R^2	Coefficiente de determinación de ajuste
RFE	Retención de Fitoesteroles [%]
RS	Rendimiento de Secado [%]
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
s, s_1, s_2	Factor de peso de la función deseabilidad
S1	Suspensión con fitoesteroles tamizados (Mallas #200 - #140)
S2	Suspensión con fitoesteroles tamizados (Malla #100 - plato ciego)
S3	Suspensión con fitoesteroles tamizados (Mallas #140 - #100)
SDS	Sodio Laurilsulfato, Sodio Dodecilsulfato, Dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopía de Barrido Electrónico
Subíndice Part	Producto Particulado
Subíndice Susp	Suspensión
t	Tiempo [min]
T	Transmitancia [%]
t^*	Valor objetivo de optimización



t_0	Tiempo inicial de contacto (ángulo de contacto) ($t_0 = 0$ minutos)
t_1	Tiempo final de contacto (ángulo de contacto) ($t_1 = 5$ minutos)
T20	Tween 20
$T_{entrada}$	Temperatura de entrada del aire de secado [°C]
TGA	Análisis Termogravimétrico
TRD	Tiempo de redispersión de las micropartículas [s]
TRR	Tiempo de retención relativo [min]
T_{salida}	Temperatura de salida del secadero [°C]
U	Límite superior del intervalo de optimización de una dada respuesta
USFDA / FDA	Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos
V	Volumen de cremado [%]
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WR	Solución de cobertura de referencia (sin tensoactivo)
WS1	Solución de cobertura con 0.1 % m/v de SDS
WS2	Solución de cobertura con 0.5 % m/v de SDS
WS3	Solución de cobertura con 1.0 % m/v de SDS
WS4	Solución de cobertura con 1.5 % m/v de SDS
WS5	Solución de cobertura con 2.0 % m/v de SDS
WS6	Solución de cobertura con 2.65 % m/v de SDS
WT1	Solución de cobertura con 0.1 % m/v de T20
WT2	Solución de cobertura con 0.5 % m/v de T20
WT3	Solución de cobertura con 1.0 % m/v de T20
WT4	Solución de cobertura con 1.5 % m/v de T20
WT5	Solución de cobertura con 2.0 % m/v de T20
WT6	Solución de cobertura con 2.65 % m/v de T20
X_1	Temperatura de secado ($T_{entrada}$)
X_2	Caudal de aire de atomización (Q_{atom})
X_3	Caudal de alimentación líquida (Q_{bomba})
X_4	Contenido de FE ($Cont_{FE}$)
X_5	Contenido de sólidos totales ($Cont_{sólTot}$)
X_6	Relación GA a MD (GA/MD)



X_i	Factor o variable independiente
Y'	Superficie de respuesta ajustada
Y_1	Rendimiento de Secado (RS)
Y_2	Tamaño de Partícula - Suspensión ($D[4,3]_{Susp}$)
Y_3	Tamaño de Partícula - Producto ($D[4,3]_{Part}$)
Y_4	Humedad Residual (HR)
Y_5	Humedad Residual (HR)
Y_6	Eficiencia de Encapsulación (EE)
Y_7	Índice de Carr (IC)
α	Nivel de significancia
γ	Tensión superficial
ΔBS	Retrodispersión relativa al tiempo de referencia (0 minutos) [%]
ΔT	Transmitancia relativa al tiempo de referencia (0 minutos) [%]
θ	Ángulo de contacto [°]
φ	Concentración volumétrica de sólidos en análisis de turbidez
φ_c	Concentración volumétrica de sólidos crítica en análisis de turbidez
φ_s	Concentración volumétrica de sólidos de saturación en análisis de turbidez



Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

A

- Adhikari, B., Howes, T., Wood, B. J. & Bhandari, B. R. (2009). The effect of low molecular weight surfactants and proteins on surface stickiness of sucrose during powder formation through spray drying. *Journal of Food Engineering*, 94(2), 135-143.
- Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A. & Rafiee, S. (2012). The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. *Food Research International*, 49(1), 379-388.
- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J. C. & Eun, J. B. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1307-1312.
- Ahn, J.-H., Kim, Y.-P., Lee, Y.-M., Seo, E.-M., Lee, K.-W. & Kim, H.-S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98-105.
- Ai, J. (1997). Rapid Measurement of Free Phytosterols in Tobacco by Short-Column GC/MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3932-3935.
- Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Aoki, H. & Sasaki, Y. (2007). Characterization and properties of Acacia senegal (L.) Willd. var. senegal with enhanced properties (Acacia (sen) SUPER GUM™): Part 1 – Controlled maturation of Acacia senegal var. senegal to increase viscoelasticity, produce a hydrogel form and convert a p. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 319-328.
- Alexander, M., Acero Lopez, a., Fang, Y. & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 427-436.



- Alghunaim, A., Kirdponpattara, S. & Newby, B. M. Z. (2016). Techniques for determining contact angle and wettability of powders. *Powder Technology*, 287, 201-215.
- Ali, A., Maqbool, M., Ramachandran, S. & Alderson, P. G. (2010). Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 58(1), 42-47.
- Alloue, W. A. M., Destain, J., Amighi, K. & Thonart, P. (2007). Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives. *Process Biochemistry*, 42(9), 1357-1361.
- Álvarez Cerimedo, M. S., Cerdeira, M., Candal, R. J. & Herrera, M. L. (2008). Microencapsulation of a Low-trans Fat in Trehalose as Affected by Emulsifier Type. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(9), 797-807.
- Alvim, I. D., Souza, F. D. S., Koury, I. P., Jurt, T. & Dantas, B. F. H. (2013). Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components: physical characterization of microparticles. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33, 34-39.
- Anal, A. K. & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240-251.
- Anekella, K. & Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 17-24.
- Annamalai, J., Dushyant C, K. & Gudipati, V. (2015). Oxidative Stability of Microencapsulated Fish Oil during Refrigerated Storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1944-1955.
- Apprich, S. & Ulberth, F. (2004). Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products. *Journal of Chromatography A*, 1055(1-2), 169-176.
- Auriou, N. (2003). Water-dispersible encapsulated sterols. United States. US 2003/0165572 A1.



- Auriou, N. & Ferreres, V. (2002). Emulsions and aqueous dispersions of phytosterols. WO 02/065859 A1.
- Auweter, H., Bohn, H., Hasselwander, O. & Runge, F. (2009). Process for producing pulvurulent phytosterols formulations. US 2009/0047355 A1.
- Avaltroni, F., Bouquerand, P. E. & Normand, V. (2004). Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, 58(3), 323–334.
- Azadmard-Damirchi, S. & Dutta, P. C. (2006). Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils. *Journal of chromatography. A*, 1108(2), 183–187.

B

- Balasubramani, P., Palaniswamy, P. T., Visvanathan, R., Thirupathi, V., Subbarayan, A. & Prakash Maran, J. (2015). Microencapsulation of garlic oleoresin using maltodextrin as wall material by spray drying technology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 210–217.
- Balasubramani, P., Viswanathan, R. & Vairamani, M. (2013). Response surface optimisation of process variables for microencapsulation of garlic (*Allium sativum* L.) oleoresin by spray drying. *Biosystems Engineering*, 114(3), 205–213.
- Bao, S.-S., Hu, X.-C., Zhang, K., Xu, X.-K., Zhang, H.-M. & Huang, H. (2011). Characterization of spray-dried microalgal oil encapsulated in cross-linked sodium caseinate matrix induced by microbial transglutaminase. *Journal of food science*, 76(1), E112-E118.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P. & Yan, H. (2005). *Food poders: Physical Properties, Processing and Functionality*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Barnes, H. A. (1994). Rheology of emulsions - A review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 89–95.



- Beleggia, R., Platani, C., Papa, R., Di Chio, A., Barros, E., Mashaba, C., Wirth, J., *et al.* (2011). Metabolomics and food processing: from semolina to pasta. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(17), 9366–9377.
- Benita, S. (2006). *Microencapsulation - Methods and Industrial Applications* (2nd ed.). Taylor & Francis. Boca Raton.
- Beveridge, T. H. J., Li, T. S. C. & Drover, J. C. G. (2002). Phytosterol content in American ginseng seed oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(4), 744–750.
- Bezelgues, J.-B., Serieye, S., Crosset-Perrotin, L. & Leser, M. E. (2008). Interfacial and foaming properties of some food grade low molecular weight surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 331, 56–62.
- Bhandari, B. R., Dumoulin, E. D., Richard, H. M. J., Noleau, I. & Lebert, A. M. (1992). Flavor Encapsulation by Spray Drying: Application to Citral and Linalyl Acetate. *Journal of Food Science*, 57(1), 217–221.
- Bharate, S. S., Bharate, S. B. & Bajaj, A. N. (2010). Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *Journal of Excipients and Food Chemistry*, 1(3), 3–26.
- Bhardwaj, V., Sharma, P., Chauhan, M. S. & Chauhan, S. (2013). Thermodynamic, FTIR, ¹H-NMR, and acoustic studies of butylated hydroxyanisole and sodium dodecyl sulfate in ethanol, water rich and ethanol rich solutions. *Journal of Molecular Liquids*, 180, 192–199.
- Bi, Y., Yang, G., Li, H., Zhang, G. & Guo, Z. (2006). Characterization of the chemical composition of lotus plumule oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(20), 7672–7677.
- Binder, T. P. & Gottemoller, T. V. (2004). Hydrothermally processed compositions containing phytosterols. US2004/0014733 A1.
- Bird, R. B., Stewart, W. E. & Lightfoot, E. N. (2002). *Transport Phenomena* (2nd ed.). I. John Wiley & Sons, Ed. New York.



- Borges, A. C., Jayakrishnan, A., Bourban, P.-E., Plummer, C. J. G., Pioletti, D. P. & Månson, J.-A. E. (2012). Synthesis and Photopolymerization of Tween 20 Methacrylate/N-vinyl-2-Pyrrolidone Blends. *Materials Science and Engineering: C*, 32(8), 2235–2241.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R. & Cesàro, a. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416–423.
- Bosio, V. E., Basu, S., Abdullha, F., Elizabeth Chacon Villalba, M., Güida, J. A., Mukherjee, A. & Castro, G. R. (2014). Encapsulation of Congo Red in carboxymethyl guar gum-alginate gel microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 82, 103–110.
- Bule, M. V., Singhal, R. S. & Kennedy, J. F. (2010). Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improved stability. *Carbohydrate Polymers*, 82, 1290–1296.
- Burgardt, V. C. F., Züge, L. C. B., de Bonna Sartor, G., Waszczynskij, N., Silveira, J. L. M. & Haminiuk, C. W. I. (2015). The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropetide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics. *Food Hydrocolloids*, 49, 11–17.
- Bustos-Garza, C., Yáñez-Fernández, J. & Barragán-Huerta, B. E. (2013). Thermal and pH stability of spray-dried encapsulated astaxanthin oleoresin from *Haematococcus pluvialis* using several encapsulation wall materials. *Food Research International*, 54(1), 641–649.
- Butstraen, C., Salaün, F. & Devaux, E. (2015). Sol–gel microencapsulation of oil phase with Pickering and nonionic surfactant based emulsions. *Powder Technology*, 284, 237–244.
- BÜCHI Labortechnik AG, www.buchi.com. Acceso: 01 de Marzo 2016.



C

- Cai, Y. Z. & Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of food science*, 65(6), 1248-1252.
- Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M. & González-Gómez, D. (2010). Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 852-858.
- Calvo, P., Lozano, M., Espinosa-Mansilla, A. & González-Gómez, D. (2012). In-vitro evaluation of the availability of ω -3 and ω -6 fatty acids and tocopherols from microencapsulated walnut oil. *Food Research International*, 48(1), 316-321.
- Carmona, P. A. O., Tonon, R. V., da Cunha, R. L. & Hubinger, M. D. (2013). Influence of Emulsion Properties on the Microencapsulation of Orange Essential Oil by Spray Drying. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, 2(2), 130-139.
- Carvalho, A. G. S., Silva, V. M. & Hubinger, M. D. (2014). Microencapsulation by spray drying of emulsified green coffee oil with two-layered membranes. *Food Research International*, 61, 236-245.
- Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E. & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 242-248.
- Centers for Disease Control and Prevention, www.cdc.gov. Acceso: 5 de abril 2016.
- Cercaci, L., Rodríguez-Estrada, M. T., Lercker, G. & Decker, E. a. (2007). Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, 102(1), 161-167.
- Cerdeira, M., Martini, S. & Herrera, M. L. (2005). Microencapsulating Properties of Trehalose and of its Blends with Sucrose and Lactose. *Journal of food science*, 70(6).



- Chan, Y.-H., Chen, B.-H., Chiu, C. P. & Lu, Y.-F. (2004). The influence of phytosterols on the encapsulation efficiency of cholesterol liposomes. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(9), 985–995.
- Chantraine, F., Viana, M., Cazalbou, S., Brielles, N., Mondain-Monval, O., Pouget, C., Branlard, P., *et al.* (2007). From compressibility to structural investigation of sodium dodecyl sulphate – Part 2: A singular behavior under pressure. *Powder Technology*, 177(1), 41–50.
- Chatterjee, S., Salaün, F., Campagne, C., Vaupre, S. & Beirão, A. (2012). Preparation of microcapsules with multi-layers structure stabilized by chitosan and sodium dodecyl sulfate. *Carbohydrate polymers*, 90(2), 967–975.
- Chaudhari, A., Pan, Y. & Nitin, N. (2015). Beverage emulsions: Comparison among nanoparticle stabilized emulsion with starch and surfactant stabilized emulsions. *Food Research International*, 69, 156–163.
- Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F. & Quek, S. Y. (2013). Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 505–512.
- Chen, Q., Zhong, F., Wen, J., McGillivray, D. & Quek, S. Y. (2013). Properties and Stability of Spray-Dried and Freeze-Dried Microcapsules Co-Encapsulated with Fish Oil, Phytosterol Esters, and Limonene. *Drying Technology*, 31(6), 707–716.
- Christiansen, L., Karjalainen, M., Seppänen-Laakso, T., Hiltunen, R. & Yliruusi, J. (2003). Effect of β -sitosterol on precipitation of cholesterol from non-aqueous and aqueous solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 254(2), 155–166.
- Chung, D.-W., Noh, S.-K. & Kim, K.-S. (2000). Method for manufacturing fat-soluble phytosterol or phytostanol ester of unsaturated fatty acid. WO 00/61694.
- Cilurzo, F., Cupone, I. E., Minghetti, P., Selmin, F. & Montanari, L. (2008). Fast dissolving films made of maltodextrins. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 70(3), 895–900.
- Clement, K., Heuer, M. A., Thomas, M. & Mason, E. (2008). Composition for improving blood cholesterol levels. US 2008/0103118 A1



- Coiro, B. Y. V. M., Manigrasso, M., Mazza, F. & Pocheiti, G. (1987). Structure of a Triclinic Phase of Sodium Dodecyl Sulfate Monohydrate. A Comparison with Other Sodium Dodecyl Sulfate Crystal Phases. *Acta Crystallographica*, 4(1985), 2561-2564.
- Consejo Oleícola Internacional (2009). Determinación de la composición y del contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos mediante cromatografía de gases con columna capilar. COI/ T.20/ Doc. n° 10/2009.
- Coronel-Aguilera, C. P. & San Martín-González, M. F. (2015). Encapsulation of spray dried β -carotene emulsion by fluidized bed coating technology. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 187-193.
- Cozic, C., Picton, L., Garda, M.-R., Marlhoux, F. & Le Cerf, D. (2009). Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1930-1934.

D

- da Costa, P. A., Ballus, C. A., Teixeira-Filho, J. & Godoy, H. T. (2010). Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, 43(6), 1603-1606.
- Dai, W.-G. & Dong, L. C. (2007). Characterization of physicochemical and biological properties of an insulin/lauryl sulfate complex formed by hydrophobic ion pairing. *International journal of pharmaceuticals*, 336(1), 58-66.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M. & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Delaney, B., Stevens, L. A., Schmelzer, W., Haworth, J., McCurry, S., Hilfinger, J. M., Kim, J. S., *et al.* (2004). Oral absorption of phytosterols and emulsified phytosterols by Sprague-Dawley rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(5), 289-295.



- Desai, K. G. H. & Park, J. H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394.
- Di Battista, C. A., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V. & Piña, J. (2015). The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 286, 193–201.
- Drusch, S. (2007). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1223–1228.
- Drusch, S. & Schwarz, K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research and Technology*, 222(1–2), 155–164.
- Dudášová, D., Flåten, G. R., Sjöblom, J. & Øye, G. (2009). Study of asphaltenes adsorption onto different minerals and clays. Part 2. Particle characterization and suspension stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 335(1–3), 62–72.
- Duquemin, S.-J. & Nixon, J. R. (1986). The effect of surfactants on the microencapsulation and release of phenobarbitone from gelatin-acacia complex coacervate microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, 3(2), 89–93.
- Dutta, P. C. (2004). *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Dutta, P. C. & Normen, L. (1998). Capillary column gas - liquid chromatographic separation of Δ^5 - unsaturated and saturated phytosterols. *Journal of Chromatography A*, 816, 177–184.
- Dyer, R. G., Hetherington, C. S., Alberti, K. G. & Laker, M. F. (1995). Simultaneous measurement of phytosterols (campesterol and beta-sitosterol) and 7-ketocholesterol in human lipoproteins by capillary column gas chromatography. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 663(1), 1–7.



E

- Elmizadeh, H., Khanmohammadi, M., Ghasemi, K., Hassanzadeh, G., Nassiri-Asl, M. & Garmarudi, A. B. (2013). Preparation and optimization of chitosan nanoparticles and magnetic chitosan nanoparticles as delivery systems using Box-Behnken statistical design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80, 141–146.
- Engel, R. & Schubert, H. (2005). Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2), 233–237.
- Erinç, H., Tekin, A. & Musa Özcan, M. (2009). Determination of fatty acid, tocopherol and phytosterol contents of the oils of various poppy (*Papaver somniferum* L.) seeds. *Grasas y Aceites*, 60(4), 375–381.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L. & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 31(2), 138–155.
- Evans, M., Ratcliffe, I. & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(4), 272–282.

F

- Fältdt, P. & Bergenståhl, B. (1996). Spray-dried whey protein/lactose/soybean oil emulsions. 2. Redispersability, wettability and particle structure. *Food Hydrocolloids*, 10(4), 431–439.
- Fekete, T., Borsa, J., Takács, E. & Wojnárovits, L. (2016). Synthesis of carboxymethylcellulose/acrylic acid hydrogels with superabsorbent properties by radiation-initiated crosslinking. *Radiation Physics and Chemistry*, 124, 135–139.



- Fernandes, L. P., Candido, R. C. & Oliveira, W. P. (2012). Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 425–432.
- Fernandes, P. & Cabral, J. M. S. (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresource technology*, 98(12), 2335–2350.
- Fernandes, R. V. D. B., Borges, S. V. & Botrel, D. A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 524–532.
- Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M. R., Rubiolo, A. C. & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of Food Engineering*, 156, 31–38.
- Formulation (2000). *Turbiscan CLASSIC MA 2000– User Guide*. L'Union, France.
- Franke, W. C. (2006). Compositions and methods to deliver consumable water dispersible phytosterols. United States. WO 2006/062699.
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V & Hubinger, M. D. (2011). Physicochemical properties of coffee oil microcapsules produced by spray drying. *III Jornadas Internacionais sobre avanos na tecnologia de filmes e coberturas funcionais em alimentos*.
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V. & Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 413–424.
- Frayn, K. (2005). *Cardiovascular Disease. Diet, Nutrition and Emerging Risk Factors. The Report of a British Nutrition Foundation Task Force*. Blackwell Publishing Ltd. United Kingdom.
- Frey, D. D. & King, C. J. (1986). Effects of Surfactants on Mass Transfer During Spray Drying. *AIChE*, 32(3), 437–443.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N. & Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray



drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 27–35.

G

Gajewski, M., Przybył, J. L. & Szymczak, P. (2007). broccoli as the source of phytosterols in nutrition. *Buletinul USAMV-CN*, 2007(64), 229–233.

Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., Pedroza-Islas, R., *et al.* (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473–482.

Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., Gomez-Aldapa, C. A., Ochoa-Martínez, L. A., Martínez-Sánchez, C. E., *et al.* (2013). Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying. *Food Bioscience*, 2, 31–38.

Gallo, L. (2013). Desarrollo de nuevos procesos tecnológicos para la obtención de extractos vegetales secos con propiedades biofarmacéuticas mejoradas. *Tesis Doctoral*. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Gallo, L., Llabot, J. M., Allemandi, D., Bucalá, V. & Piña, J. (2011). Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technology*, 208(1), 205–214.

Gamboa, O. D., Gonçalves, L. G. & Grosso, C. F. (2011). Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. *Procedia Food Science*, 1, 1732–1739.

Gao, J., Ren, Y. & Ge, W. (2009). Molecular Dynamics Simulation of Effect of Salt on the Compromise of Hydrophilic and Hydrophobic Interactions in Sodium Dodecyl Sulfate Micelle Solutions. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(4), 654–660.

Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R. & Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide*. Elsevier. San Diego.



- Garcia, H., Barros, A. S., Gonçalves, C., Gama, F. M. & Gil, A. M. (2008). Characterization of dextrin hydrogels by FTIR spectroscopy and solid state NMR spectroscopy. *European Polymer Journal*, 44(7), 2318–2329.
- Geng, X., Cui, B., Li, Y., Jin, W., An, Y., Zhou, B., Ye, T., *et al.* (2014). Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation. *Food Hydrocolloids*, 37, 86–92.
- Genovese, D. B. (2012). Shear rheology of hard-sphere, dispersed, and aggregated suspensions, and filler-matrix composites. *Advances in colloid and interface science*, 171–172, 1–16.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I. & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*, 50(3), 213–224.
- Gils, P. S., Ray, D. & Sahoo, P. K. (2010). Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. *International journal of biological macromolecules*, 46(2), 237–244.
- González-Larena, M., García-Llatas, G., Vidal, M. C., Sánchez-Siles, L. M., Barberá, R. & Lagarda, M. J. (2011). Stability of plant sterols in ingredients used in functional foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3624–3631.
- Gottmoller, T. V. (2004). Phytosterol and phytostanol compositions. US 6677327 B1.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 330–347.
- Goula, A. M. & Adamopoulos, K. G. (2003). Spray Drying Performance of a Laboratory Spray Dryer for Tomato Powder Preparation. *Drying Technology*, 21(7), 1273–1289.



- Govender, S., Pillay, V., Chetty, D. J., Essack, S. Y., Dangor, C. M. & Govender, T. (2005). Optimisation and characterisation of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 306(1-2), 24-40.
- Guadarrama-Lezama, A. Y., Dorantes-Alvarez, L., Jaramillo-Flores, M. E., Pérez-Alonso, C., Niranjana, K., Gutiérrez-López, G. F. & Alamilla-Beltrán, L. (2012). Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annuum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112(1-2), 29-37.
- Guan, Y. & Zhong, Q. (2015). The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum arabic. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 706-712.
- Gurrapu, A., Jukanti, R., Bobbala, S. R., Kanuganti, S. & Jeevana, J. B. (2012). Improved oral delivery of valsartan from maltodextrin based proniosome powders. *Advanced Powder Technology*, 23(5), 583-590.

H

- Haarasilta, S., Reinikainen, T. & Sulanto, S. (1998). Product, method for its manufacture, and its use. WO 98/58554.
- Haidong, L., Fang, Y., Zhihong, T., Huanwei, S. & Tiehui, Z. (2012). Use of combinations of gum arabic, maltodextrin and soybean protein to microencapsulate ginkgo leaf extracts and its inhibitory effect on skeletal muscle injury. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 435-440.
- Han, J.-H., Yang, Y.-X. & Feng, M.-Y. (2008). Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 21(6), 449-453.
- Harrabi, S., St-Amand, A., Sakouhi, F., Sebei, K., Kallel, H., Mayer, P. M. & Boukhchina, S. (2008). Phytosterols and phytosterols distributions in corn kernel. *Food Chemistry*, 111(1), 115-120.



- Harting Glade, T. F., Días Fuenzalida, M. A. & Markovits Rojas, A. (2010). Dispersion of Phytosterols. Chile. WO 2010/095067 A1.
- Hejazi, S. M., Erfan, M. & Alireza Mortazavi, S. (2013). Precipitation reaction of SDS and potassium salts in flocculation of a micronized megestrol acetate suspension. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3), 239-246.
- Herchi, W., Harrabi, S., Sebei, K., Rochut, S., Boukhchina, S., Pepe, C. & Kallel, H. (2009). Phytosterols accumulation in the seeds of *Linum usitatissimum* L. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, 47(10), 880-885..
- Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of colloid and surface chemistry*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R. P. & Trautwein, E. A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Progress in lipid research*, 47(1), 37-49.
- Hoving, E. B. (1995). Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids Mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 671, 341-362.

I, J

- Iafelice, G., Verardo, V., Marconi, E. & Caboni, M. F. (2009). Characterization of Total , Free and Esterified Phytosterols in Tetraploid and Hexaploid Wheats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 2267-2273.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, www.indec.mecon.ar. Acceso: 20 de marzo 2016.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., Bhandari, B. & He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41(2), 172-183.
- Jayasundera, M., Adhikari, B., Adhikari, R. & Aldred, P. (2011). The effects of proteins and low molecular weight surfactants on spray drying of model sugar-rich



- foods: Powder production and characterisation. *Journal of Food Engineering*, 104(2), 259–271.
- Jeelani, S. a. K., Benoist, G., Joshi, K. S., Gunde, R., Kellenberger, D. & Windhab, E. J. (2005). Creaming and aggregation of particles in suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 263(1–3), 379–389.
- Jimenez, M., Garcia, H. S. & Beristain, C. I. (2008). Sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1047–1052.
- Johnsson, L. & Dutta, P. C. (2005). Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns. *Journal of Chromatography A*, 1064(2), 213–217.
- Jun-xia, X., Hai-yan, Y. & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125(4), 1267–1272.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S. & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27(3), 187–197.

K

- Kamal-Eldin, A. & Moazzami, A. (2009). Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 1(1), 1–14.
- Kanakdande, D., Bhosale, R. & Singhal, R. S. (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 536–541.
- Kaur, P., Singh, S. K., Garg, V., Gulati, M. & Vaidya, Y. (2015). Optimization of spray drying process for formulation of solid dispersion containing polypeptide-k powder through quality by design approach. *Powder Technology*, 284, 1–11.



- Kaushik, P., Dowling, K., Barrow, C. J. & Adhikari, B. (2015). Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of Functional Foods*, 19, 868–881.
- Kaushik, V. & Roos, Y. H. (2007). Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), 1381–1391.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D. & Stathopoulos, C. E. (2014). Microencapsulation of Gac oil: Optimisation of spray drying conditions using response surface methodology. *Powder Technology*, 264, 298–309.
- Khaliq, G., Muda Mohamed, M. T., Ghazali, H. M., Ding, P. & Ali, A. (2016). Influence of gum arabic coating enriched with calcium chloride on physiological, biochemical and quality responses of mango (*Mangifera indica* L.) fruit stored under low temperature stress. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 362–369.
- Kishore, R. S. K., Pappenberger, A., Dauphin, I. B., Ross, A., Buergi, B., Staempfli, A. & Mahler, H. (2011). Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis, 100(2), 19–22.
- Kluetz, M., Klein, R., Snyder, S., Goulson, M. & Cavallini, V. (2005). Particulate plant sterol compositions. US 2005/0175672 A1.
- Knopp, R. H. (1988). Cardiovascular effects of endogenous and exogenous sex hormones over a woman's lifetime. *American journal of obstetrics and gynecology*, 158, 1630–1643.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. (2012). Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(5), 622–632.
- Krishnan, S., Bhosale, R. & Singhal, R. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61(1), 95–102.
- Krishnan, S., Kshirsagar, A. & Singhal, R. (2005). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 309–315.



- Kuck, L. S. & Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194, 569–576.
- Kuhn, M. (2009). The desirability Package <https://cran.r-project.org/web/packages/desirability/vignettes/desirability.pdf>. Acceso: 10 de marzo 2016.
- Kurozawa, L. E., Park, K. J. & Hubinger, M. D. (2009). Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, 91(3–4), 326–333.

L

- Lagarda, M. J., García-Llatas, G. & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1486–1496.
- Lassalle, V. L., Failla, M. D. & Vallés, E. M. (2006). Grafting of N-carbamyl maleamic acid onto a styrene–butadiene–styrene copolymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 102(5), 4468–4477.
- Lee, S. W., Kim, M. H. & Kim, C. K. (1999). Encapsulation of ethanol by spray drying technique: Effects of sodium lauryl sulfate. *International Journal of Pharmaceutics*, 187(2), 193–198.
- Lee, Y.-K., Ahn, S.-I. & Kwak, H.-S. (2013). Optimizing microencapsulation of peanut sprout extract by response surface methodology. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 307–314.
- Lerchenfeld, E. P. & Striegel, D. E. (2008). Beverages containing phytosterols. United States. US 7335389 B2.
- Li, M., Rouaud, O. & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *International journal of pharmaceutics*, 363(1–2), 26–39.



- Li, W., Wu, G., Chen, H. & Wang, M. (2009). Preparation and characterization of gelatin/SDS/NaCMC microcapsules with compact wall structure by complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 333(1-3), 133-137.
- Li, Z., Wang, Y., Pei, Y., Xiong, W., Zhang, C., Xu, W., Liu, S., *et al.* (2015). Curcumin encapsulated in the complex of lysozyme/carboxymethylcellulose and implications for the antioxidant activity of curcumin. *Food Research International*, 75, 98-105.
- Liang, Zhiyong; Wang, B. (2004). Experimental design and optimization. *International Journal of Nanoscience*, 293(1-2), 3-40.
- Lin, C.-C., Lin, S.-Y. & Hwang, L. S. (1995). Microencapsulation of Squid Oil with Hydrophilic Macromolecules for Oxidative and Thermal Stabilization. *Journal of Food Science*, 60(1), 36-39.
- Litster, J., Ennis, B. & Liu, L. (2004). *The science and Engineering of granulation processes* (1st ed.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Liu, C. H. & Wu, C. T. (2010). Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 353(2-3), 149-156.
- Liu, C., Yang, M. & Huang, F. (2011). Influence of Extraction Processing on Rheological Properties of Rapeseed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(1), 73-78.
- Liu, H., Wang, K., Schlindwein, W. & Li, M. (2013). Using the Box-Behnken experimental design to optimise operating parameters in pulsed spray fluidised bed granulation. *International journal of pharmaceutics*, 448(2), 329-338.
- Liu, T. T. & Yang, T. S. (2011). Optimization of Emulsification and Microencapsulation of Evening Primrose Oil and Its Oxidative Stability During Storage By Response Surface Methodology. *Journal of Food Quality*, 34(1), 64-73.
- Liu, W.-H., Ding, B., Ruan, X.-M., Xu, H.-T., Yang, J. & Liu, S.-M. (2007). Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas



chromatography-flame ionization detection. *Journal of chromatography. A*, 1163(1-2), 304-11.

Lu, B., Zhang, Y., Wu, X. & Shi, J. (2007). Separation and determination of diversiform phytosterols in food materials using supercritical carbon dioxide extraction and ultraperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 588(1), 50-63.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J. & Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1-2), 3-40.

M

Ma, F., Bell, A. E., Davis, F. J. & Chai, Y. (2015). Effects of high hydrostatic pressure and chemical reduction on the emulsification properties of gum arabic. *Food Chemistry*, 173, 569-576.

Masters, K. (1979). *Spray Drying Handbook* (3rd. ed.). George Godwin Limited. London.

Maton, A., Hopkins, J., McLaughlin, C. W., Johnson, S., Warner, M. Q., LaHart, D. & Wright, J. D. (1993). *Human Biology and Health*. Prentice Hall. New Jersey.

Matsumiya, K., Inoue, T., Niida, J., Katagiri, T., Nishizu, T. & Matsumura, Y. (2014). Evaluation of long-term stability of milk beverages by a novel method for rapid determination of aggregation forces between colloidal particles. *Food Hydrocolloids*, 34, 177-183.

Matsuno, R. & Adachi, S. (1993). Lipid encapsulation technology - techniques and applications to food. *Trends in Food Science & Technology*, 4, 256-261.

McClements, D. J. (1999). *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. CRC Press LLC. Florida.

McClements, D. J., Decker, E. a & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of food science*, 72(8), R109-R124.



- McNamee, B. F., White, L. E., O'Riordan, E. D. & O'Sullivan, M. (2001). Effect of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(7), 3385–3388.
- Mehta, S. K., Chaudhary, S., Bhasin, K. K., Kumar, R. & Aratono, M. (2007). Conductometric and spectroscopic studies of sodium dodecyl sulfate in aqueous media in the presence of organic chalcogen. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 304(1–3), 88–95.
- Mel'nikov, S. M., Seijen ten Hoorn, J. W. . & Bertrand, B. (2004). Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism? *Chemistry and Physics of Lipids*, 127(1), 15–33.
- Menéndez-Carreño, M., Ansorena, D. & Astiasarán, I. (2008). Stability of sterols in phytosterol-enriched milk under different heating conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 9997–10002.
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K. & Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: The TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1–2), 111–123.
- Miettinen, T., Vanhanen, H. & Wester, I. (1996). Use of a stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level. US 5502045.
- Milstein, N., Biermann, M., Leidl, P. & Von Kries, R. (2008). Food additive compositions containing sterol esters, solubilizing agents, dispersants and antioxidants. US 7387786 B2.
- Mishra, P., Mishra, S. & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 252–258.
- Molina Ortiz, S. E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. a., Santana, A. S. & Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 919–923.



Montgomery, D. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos* (7th Ed.). Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F.

Monu, E., Blank, G., Holley, R. & Zawistowski, J. (2008). Phytosterol effects on milk and yogurt microflora. *Journal of Food Science*, 73(3), 121-126.

Moreau, R. A., Whitaker, B. D. & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in lipid research*, 41(6), 457-500.

N

Nayak, A. K., Das, B. & Maji, R. (2012). Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: development and in vitro characterization. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 1070-1078.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F. & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.

Nolasco, S. M., Izquierdo, N., Carelli, A. A., Cocconi, M., Quiroz, F. & Aguirrezábal, L. A. N. (2010). Fitoesteroles en el aceite de híbridos de girasol cultivados en Argentina. *Aceites y Grasas*, 1(78 Tomo XX), 104-111.

O

Okuro, P. K., Eustáquio, F., Junior, D. M. & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, 51(2), 171-182.

Oliveira, R. L. de, Barud, H. da S., De Salvi, D. T. B., Perotti, G. F., Ribeiro, S. J. L. & Constantino, V. R. L. (2015). Transparent organic-inorganic nanocomposites



- membranes based on carboxymethylcellulose and synthetic clay. *Industrial Crops and Products*, 69, 415–423.
- Onesippe, C. & Lagerge, S. (2008). Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 317(1-3), 100–108.
- Orozco, M. I., Priego-Capote, F. & Luque de Castro, M. D. (2011). Influence of deep frying on the unsaponifiable fraction of vegetable edible oils enriched with natural antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(13), 7194–7202.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P. & Chiralt, A. (2014). Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids*, 38, 66–75.
- Osorio, C., Forero, D. P. & Carriazo, J. G. (2011). Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. *Food Research International*, 44(5), 1174–1181.
- Ostlund, R. E. J. (1999). Sitostanol formulation to reduce cholesterol absorption and method for preparing and use of same. US 5932562.
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A. & Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 187, 174–181.

P

- Panizzon, G. P., Bueno, F. G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V. & Filho, B. P. D. (2014). Preparation of spray-dried soy isoflavone-loaded gelatin microspheres for enhancement of dissolution: Formulation, characterization and in vitro evaluation. *Pharmaceutics*, 6(4), 599–615.
- Paquin, P. (2009). *Functional and speciality beverage technology*. CRC Press. Cambridge.



- Patel, J. J., Karve, M. & Patel, N. K. (2014). Guar gum: a versatile material for pharmaceutical industries. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8), 13-19.
- Paudel, A., Worku, Z. A., Meeus, J., Guns, S. & Van den Mooter, G. (2013). Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations. *International journal of pharmaceutics*, 453(8), 253-284.
- Pauletti, M. S. & Amestoy, P. (1999). Butter Microencapsulation as Affected by Composition of Wall Material and Fat. *Journal of Food Science*, 64(2), 279-282.
- Pennisi Forell, S. C., Ranalli, N., Zaritzky, N. E., Andrés, S. C. & Califano, a N. (2010). Effect of type of emulsifiers and antioxidants on oxidative stability, colour and fatty acid profile of low-fat beef burgers enriched with unsaturated fatty acids and phytosterols. *Meat science*, 86(2), 364-370.
- Pérez-Alonso, César, Fabela-Morón, M. F., Guadarrama-Lezama, a. Y., Barrera-Pichardo, J. F., Alamilla-Beltrán, L. & Rodríguez-Huezo, M. E. (2009). Interrelationship between the structural features and rehydration properties of spray dried manzano chilli sauce microcapsules. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(2), 187-196.
- Petrovic, L. B., Sovilj, V. J., Katona, J. M. & Milanovic, J. L. (2010). Influence of polymer-surfactant interactions on o/w emulsion properties and microcapsule formation. *Journal of colloid and interface science*, 342(2), 333-9.
- Pfriege, F. (2003). Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610, 271-280.
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., Toivo, J. I., Swank, M. a. & Simpkins, A. H. (2002). Free and Esterified Sterol Composition of Edible Oils and Fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(2), 123-142.
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., de Pascual-Teresa, S., de Ancos, B. & Cano, M. P. (2009). Fatty acids, sterols, and antioxidant activity in minimally processed avocados during refrigerated storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(8), 3204-3209.



- Ponec, M., Kempenaar, J. A., Havekes, L., Van der Schroeff, J. G., Emeis, J. J. & Vermeer, B. J. (1981). Effects of LDL, HDL and their combination on the endogenous cholesterol synthesis in monocyte-macrophages. *Biochimica et biophysica acta*, 666, 405–410.
- Prabaharan, M. (2011). Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(2), 117–124.
- Prajapat, A. L. & Gogate, P. R. (2015). Depolymerization of guar gum solution using different approaches based on ultrasound and microwave irradiations. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 88, 1–9.
- Prajapat, A. L., Subhedar, P. B. & Gogate, P. R. (2016). Ultrasound assisted enzymatic depolymerization of aqueous guar gum solution. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 84–92.

Q, R

- Quílez, J., Ruiz, J. a., Brufau, G. & Rafecas, M. (2006). Bakery products enriched with phytosterols, α -tocopherol and β -carotene. Sensory evaluation and chemical comparison with market products. *Food Chemistry*, 94(3), 399–405.
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. a. & Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1880–1887.
- Raissi, S. & Farsani, R.-E. (2009). Statistical process optimization through multi-response surface methodology. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 51(46), 267–271.
- Ramakrishnan, A., Pandit, N., Badgular, M., Bhaskar, C. & Rao, M. (2007). Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer Gum Arabic for its controlled release. *Bioresource Technology*, 98(2), 368–372.
- Ratanajajaroen, P., Watthanaphanit, A., Tamura, H., Tokura, S. & Rujiravanit, R. (2012). Release characteristic and stability of curcumin incorporated in β -chitin



- non-woven fibrous sheet using Tween 20 as an emulsifier. *European Polymer Journal*, 48(3), 512–523.
- Rattes, A. L. R. & Oliveira, W. P. (2007). Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology*, 171(1), 7–14.
- Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology: An International Journal*, 16(6), 1195–1236.
- Righetto, A. M. & Netto, F. M. (2005). Effect of Encapsulating Materials on Water Sorption, Glass Transition and Stability of Juice From Immature Acerola. *International Journal of Food Properties*, 8(2), 337–346.
- Risch, S. I. & Reineccius, C. A. (1996). Book Reviews Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients (ACS Symposium Series 590) *Trends in Food Science & Technology*, 71, 274-275.
- Robins, M. M. (2000). Emulsions - creaming phenomena. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 265–272.
- Roccia, P., Martínez, M. L., Llabot, J. M. & Ribotta, P. D. (2014). Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powder Technology*, 254, 307–313.
- Rocco, A. & Fanali, S. (2009). Analysis of phytosterols in extra-virgin olive oil by nano-liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1216(43), 7173–7178.
- Rocha, G. A., Fávaro-Trindade, C. S. & Grosso, C. R. F. (2011). Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 37–42.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J. & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102–109.
- Rosenson, R. S. (2015). Lipoprotein classification, metabolism, and role in atherosclerosis, www.uptodate.com. Acceso: 29 de enero 2015



- Rowe, R. C., Sheskey, P. J. & Owen, S. C. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (5th. ed.). Pharmaceutical Press. London.
- Rozner, S. & Garti, N. (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 282-283, 435-456.
- Rozner, S., Popov, I., Uvarov, V., Aserin, A. & Garti, N. (2009). Templated cocrystallization of cholesterol and phytosterols from microemulsions. *Journal of Crystal Growth*, 311(16), 4022-4033.
- Ruckenstein, E. (1999). Thermodynamic insights on macroemulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(1), 59-76.

S

- Saenz, C., Tapia, S., Chavez, J. & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616-622.
- Salinas Botrán, A., Ramos Rincón, J. M. & de Górgolas Hernández-Mora, M. (2013). Enfermedad cardiovascular: una visión desde la salud global. *Medicina clínica*, 141(5), 210-216.
- Salmerón, I., Thomas, K. & Pandiella, S. S. (2015). Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods*, 15, 106-115.
- Salopek, B., Krasic, D. & Filipovic, S. (1992). Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-geolosko-naftni zbornik*, 4, 147-151.
- Sansone, F., Mencherini, T., Picerno, P., d'Amore, M., Aquino, R. P. & Lauro, M. R. (2011). Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 468-476.
- Santos, R., Limas, E., Sousa, M., da Conceição Castilho, M., Ramos, F. & da Silveira, M. I. N. (2007). Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of



- phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Food Chemistry*, 102(1), 113–117.
- Saraiva, D., Conceição Castilho, M., Rosário Martins, M., Silveira, M. I. N. & Ramos, F. (2010). Evaluation of Phytosterols in Milk and Yogurts Used as Functional Foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 4(1), 28–34.
- Saraiva, D., Semedo, R., Castilho, M. D. C., Silva, J. M. & Ramos, F. (2011). Selection of the derivatization reagent--the case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC-MS analyses. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 879(32), 3806–3811.
- Sarika, P. R., James, N. R., Kumar, P. R. A., Raj, D. K. & Kumary, T. V. (2015). Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 134, 167–174.
- Sarkar, S. & Singhal, R. S. (2011). Esterification of guar gum hydrolysate and gum Arabic with n-octenyl succinic anhydride and oleic acid and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1723–1731.
- Sarkar, S., Gupta, S., Variyar, P. S., Sharma, A. & Singhal, R. S. (2012). Irradiation depolymerized guar gum as partial replacement of gum Arabic for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1685–1694.
- Sarkar, S., Gupta, S., Variyar, P. S., Sharma, A. & Singhal, R. S. (2013). Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 177–182.
- Schramm, L. L. (2005). *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.
- Schüssele, A. & Bauer-Brandl, A. (2003). Note on the measurement of flowability according to the European Pharmacopoeia. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 301–304.
- Scopus, www.scopus.com. Acceso: 5 de abril 2016.



- Shiga, H., Yoshii, H., Ohe, H., Yasuda, M., Furuta, T., Kuwahara, H., Ohkawara, M., *et al.* (2004). Encapsulation of Shiitake (*Lentinus Edodes*) Flavors by Spray Drying. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(1), 66–71.
- Shin, E.-C., Pegg, R. B., Phillips, R. D. & Eitenmiller, R. R. (2010). Commercial Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Cultivars in the United States: Phytosterol Composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, (8), 9137–9146.
- Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. & Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76(4), 664–669.
- Smith, J. & Charter, E. (2010). *Functional Food Product Development*. Wiley-Blackwell. United Kingdom.
- Smith, L. A., Duncan, A., Thomson, G. B., Roberts, K. J., Machin, D. & McLeod, G. (2004). Crystallisation of sodium dodecyl sulphate from aqueous solution: phase identification, crystal morphology, surface chemistry and kinetic interface roughening. *Journal of Crystal Growth*, 263(1–4), 480–490.
- Smrčková, P., Horský, J., Šárka, E., Koláček, J., Netopilík, M., Walterová, Z., Kruliš, Z., *et al.* (2013). Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated maltodextrin. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 43–49.
- Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M. & Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 107–114.
- Soottitantawat, A., Takayama, K., Okamura, K., Muranaka, D., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., *et al.* (2005). Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2), 163–170.
- Sosińska, E., Przybylski, R., Hazendonk, P., Zhao, Y. Y. & Curtis, J. M. (2013). Characterisation of non-polar dimers formed during thermo-oxidative degradation of β -sitosterol. *Food chemistry*, 139(1–4), 464–74.



- Sosnik, A. & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40–54.
- Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A.-M. & Piironen, V. (2005). Oxidative stability of phytosterols in some food applications. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 266–273.
- Stevens, L. A. & Schmelzer, W. N. (2003). Aqueous dispersible sterol product. US 6623780 B1.
- Stewart, D. J. (2006). Nuevos compuestos cristalinos que comprenden fitoesteroles y fitostanoles o sus derivados. ES 2262655 T3.
- Stewart, D. J., Milanova, R., Zawistowski, J. & Wallis, S. H. (2000). Phytosterols compositions and use thereof in foods, beverages, pharmaceuticals, nutraceuticals and the like. US 6087353.
- Svetlana, P. L. & Segal, R. (2007). Researches on solvent extraction of phytosterols from tall oil in a view of functional food supplementation. *Bulletin USAMV – CN*, 2007(63), 529–533.
- Susana, L., Campaci, F. & Santomaso, A. C. (2012). Wettability of mineral and metallic powders: Applicability and limitations of sessile drop method and Washburn's technique. *Powder Technology*, 226, 68–77.

T

- Tadros, T. (2011). Interparticle interactions in concentrated suspensions and their bulk (Rheological) properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 168(1–2), 263–277.
- Tan, Z. & Shahidi, F. (2013). Phytosteryl sinapates and vanillates: chemoenzymatic synthesis and antioxidant capacity assessment. *Food chemistry*, 138(2–3), 1438–1447.



- Taubner, T., Synytsya, A. & Čopíková, J. (2015). Preparation of amidated derivatives of carboxymethylcellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 11–18.
- Tewa-Tagne, P., Briançon, S. & Fessi, H. (2007). Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: development and characterisation. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 124–135.
- Thakkar, A. L. & Diller, E. R. (1975). Pharmaceutical dispersible powder of sitosterols and a method for the preparation thereof. US 3881005.
- Thevenet, F. (1995). Acacia gums: natural encapsulation agent for food ingredients. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, 37–59.
- Thevenet, F. (2012). Acacia gum. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 10, 205–212.
- Tinke, A. P., Govoreanu, R., Weuts, I., Vanhoutte, K. & De Smaele, D. (2009). A review of underlying fundamentals in a wet dispersion size analysis of powders. *Powder Technology*, 196(2), 102–114.
- Toivo, J., Phillips, K., Lampi, A.-M. & Piironen, V. (2001). Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(6), 631–643.
- Tonon, R. V., Brabet, C. & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411–418.
- Tonon, R. V., Grosso, C. R. F. & Hubinger, M. D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44(1), 282–289.
- Tontul, I. & Topuz, A. (2014). Influence of emulsion composition and ultrasonication time on flaxseed oil powder properties. *Powder Technology*, 264, 54–60.
- Trentin, A., Güell, C., Gelaw, T., de Lamo, S. & Ferrando, M. (2012). Cleaning protocols for organic microfiltration membranes used in premix membrane emulsification. *Separation and Purification Technology*, 88, 70–78.



- Turasan, H., Sahin, S. & Sumnu, G. (2015). Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 112-119.
- Turchiuli, C., Fuchs, M., Bohin, M., Cuvelier, M. E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M. N. & Dumoulin, E. (2005). Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 29-35.
- Türk, M., Upper, G. & Hils, P. (2006). Formation of composite drug-polymer particles by co-precipitation during the rapid expansion of supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), 253-263.
- Türk, M. & Lietzow, R. (2004). Stabilized nanoparticles of phytosterol by rapid expansion from supercritical solution into aqueous solution. *AAPS PharmSciTech*, 5(4), 1-10.

U, V

- United States Pharmacopeia and National Formulary. USP 30-NF 25. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2007.
- Velasco, J., Holgado, F., Dobarganes, C. & Márquez-Ruiz, G. (2009). Antioxidant Activity of Added Phenolic Compounds in Freeze-Dried Microencapsulated Sunflower Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 445-452.
- Vera Candiotti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S. & Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.
- Verleyen, T., Verhe, R., Garcia, L., Dewettinck, K., Huyghebaert, a & De Greyt, W. (2001). Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate. *Journal of chromatography. A*, 921(2), 277-285.
- Viana, R. B., Da Silva, A. B. F. & Pimentel, A. S. (2012). Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants. *Advances in Physical Chemistry*, 2012, 1-14.



- Vilstrup, P. (2001). *Microencapsulation of food ingredients* (1st. ed.). Food RA Leatherhead Publishing. London.
- Vinetsky, Y. & Magdassi, S. (1997). Formation and surface properties of microcapsules based on gelatin-sodium dodecyl sulphate interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 122(1-3), 227-235.
- Von Borries-Medrano, E., Jaime-Fonseca, M. R. & Aguilar-Méndez, M. A. (2016). Starch-guar gum extrudates: Microstructure, physicochemical properties and in-vitro digestion. *Food Chemistry*, 194, 891-899.
- Vučić, V. & Cvetković, Z. (2016). Cholesterol: Absorption, Function and Metabolism. *Encyclopedia of Food and Health*, 47-52.

W

- Walton, D. E. & Mumford, C. J. (1999). Spray Dried Products—Characterization of Particle Morphology. *Chemical Engineering Research and Design*, 77(1), 21-38.
- Wang, W., Lee, Y. & Lee, C. H. (2013). Review: The physiological and computational approaches for atherosclerosis treatment. *International Journal of Cardiology*, 167(5), 1664-1676.
- Wang, Y., Lu, Z., Lv, F. & Bie, X. (2009). Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *European Food Research and Technology*, 229(3), 391-396.
- Wang, Z., Narsimhan, G. & Kim, D. (2008). Characterization of the effect of food emulsifiers on contact angle and dispersibility of lipid coated neutrally buoyant particles. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1232-1238.
- Wester, I. (2000). Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, (Raisionkaari 60), 37-44.
- Williams, P. A. & Phillips, G. O. (2000). *Gums and Stabilisers for the Food Industry*. The Royal Society of Chemistry. United Kingdom.



World Health Organization, www.who.int. Acceso: 5 de abril 2016.

Wu, G., Dai, R. Y., Li, W. G., Yin, P. P., Chen, H. Z. & Wang, M. (2011). Preparation of stable gelatin/sodium carboxymethylcellulose/sodium lauryl sulfonate microcapsules with ultra-thin capsule wall for electrophoretic displays. *Current Applied Physics*, 11(3), 321-326.

X, Y, Z

Xiao, D. & Zhong, Q. (2011). In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 65-73.

Xu, G., Guan, L., Sun, J. & Chen, Z.-Y. (2009). Oxidation of Cholesterol and β -Sitosterol and Prevention by Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9284-9292.

Xu, X., Skands, a. R. H., Høy, C.-E., Mu, H., Balchen, S. & Adler-Nissen, J. (1998). Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(9), 1179-1186.

Ya-jie, X., Hai-yin, Y., Shu-yuan, W. & Zhi-kang, X. (2007). Improvement of antifouling characteristics in a bioreactor of polypropylene microporous membrane by the adsorption of Tween 20. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 1461-1465.

Yölmaz, G., Jongboom, R. O. J., Feil, H. & Hennink, W. E. (2001). Encapsulation of sunflower oil in starch matrices via extrusion: effect of the interfacial properties and processing conditions on the formation of dispersed phase morphologies. *Carbohydrate Polymers*, 45, 403-410.

Yoo, S.-H., Song, Y.-B., Chang, P.-S. & Lee, H. G. (2006). Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International journal of biological macromolecules*, 38(1), 25-30.



- Yu, M.-R., Suyambrakasam, G., Wu, R.-J. & Chavali, M. (2012). Preparation of organic-inorganic (SWCNT/TWEEN-TEOS) nano hybrids and their NO gas sensing properties. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161(1), 938-947.
- Zawistowski, J. (2002). Method of preparing microparticles of one or more phytosterols, phytostanols or mixtures of both. US 2002/0048606 A1.
- Zawistowski, J. (2007). Compositions comprising one or more phytosterols and-or phytostanols, or derivatives thereof, and high HLB emulsifiers. US 2007/0141224 A1.
- Zhang, H., Vasanthan, T. & Wettasinghe, M. (2007). Enrichment of tocopherols and phytosterols in canola oil during seed germination. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(2), 355-359.
- Zhang, T. & Youan, B.-B. C. (2010). Analysis of process parameters affecting spray-dried oily core nanocapsules using factorial design. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1422-1431.
- Zidan, A. S., Sammour, O. A., Hammad, M. A., Megrab, N. A., Habib, M. J. & Khan, M. A. (2007). Quality by design: understanding the formulation variables of a cyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function. *International journal of pharmaceuticals*, 332(1-2), 55-63.
- Zuidam, N. J. & Nedovic, V. (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer. London.