



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

**ESTEROLES VEGETALES EN MATRICES  
LÍQUIDAS: OBTENCIÓN E INCORPORACION  
EN UNA BEBIDA DE FRUTAS**

**María Victoria Álvarez Henao**

**Universidad de Antioquia**

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**

**Medellín, Colombia**

**2022**

Esteroles vegetales en matrices líquidas: Obtención e incorporación en una bebida de frutas

**María Victoria Álvarez Henao**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**

Asesores:

Claudio Jiménez Cartagena

Químico Farmacéutico. MSc en Ciencias Básicas Biomédicas-Bioquímica. Doctor en Ingeniería-  
Ambiental

Julián Londoño-Londoño

Químico Farmacéutico, Doctor en Ciencias Químicas

Katalina Muñoz

Química Farmacéutica, Doctora en Ciencias Químicas

Línea de Investigación:

Alimentos

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias.

Medellín, Colombia

2022

*A Dios por todas las oportunidades que me brinda...*

*A mi familia y amigos por su apoyo....*

*Y al ser del que casi siempre me olvido, mi yo interior...*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar hasta este punto en el que me encuentro, por la vida que me ha regalado para cumplir mis metas y las personas que ha colocado en mi camino para apoyarme desde los diferentes pilares de mi vida.

A mis padres, Isabel y Nicolás, quienes con sus cuidados y consejos me brindan todo su apoyo incondicional.

A mis hermanitos, Jose y Leo, que de alguna manera con el solo verlos luchar por sus objetivos me impulsaron a seguir con los míos.

A mi tía luz y a mi abuelita (aunque ya no esté), quienes aumentaron mi propia confianza.

A mis asesores de tesis, Claudio Jiménez Cartagena y Julián Londoño-Londoño, por confiar en mí, compartir sus puntos de vista y brindarme las herramientas no solo para culminar esta etapa formativa en la academia sino también para mi vida personal.

A Katalina Muñoz, como miembro de mi comité tutorial, a quien realmente admiro y con sus opiniones me ayudó a conocer diferentes perspectivas.

A Minciencias, el cual, mediante la convocatoria de doctorados nacionales 727 de 2015, me brindó todos los recursos económicos para lograr llevar a cabo esta investigación.

A la Universidad de Antioquia (UdeA), por acogerme y permitirme ser parte de esta gran institución.

A mis compañeros de doctorado, quienes no me dejaron de sorprender con sus puntos de vista para afrontar sus propios proyectos.

A todo el personal administrativo de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la UdeA, quien de una u otra forma, permitieron que el proceso formativo e investigativo fluyera de la mejor forma, tanto en tiempos como en ejecución de recursos.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria -Intal (Medellín, Colombia)- por la oportunidad de trabajar con sus diferentes equipos para los resultados de esta tesis, al igual por permitirme interactuar con personas maravillosas como Sandra, Andrés, Carolina, Alejandras, Mabel y en general todos los que allí laboran, que compartieron sus conocimientos y compañía conmigo.

Al Tecnoparque nodo Rionegro-Sede Guarne- y todos sus instructores e investigadores, por el acompañamiento en el uso de sus diferentes equipos para la obtención de los resultados buscados en esta tesis.

Al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación -CIAL (Madrid, España), en especial a la PhD. Diana Martín, por permitirme hacer la pasantía en su grupo de investigación y compartir sus conocimientos conmigo. Al igual que al PhD. Joaquín Navarro, quien me acompañó en mi estancia en el laboratorio, para lograr los objetivos planteados. A ellos que me abrieron las puertas para continuar con uno de mis sueños, mil gracias.

De forma muy especial a Honoria, Valerio, Marisol, Diegos, Magaly, Alba, Silvia y todas las personas con las que compartí en mi pasantía, que hicieron de esta no solo un mar de infinito conocimiento, sino también una compañía inigualable, quienes con solo recordarlos me roban una sonrisa.

A mis estimados amigos, quienes, con estar presentes en esta etapa de mi vida, para escucharme y aconsejarme, me dieron un gran apoyo, Sara, Julieta, Ana, Duban, Danilo, Daniel, Natalia, Vanesa, Carlos, Nataly, Jeni.

Muchas gracias a todos, desde lo más profundo de mi ser, por haber hecho parte de este proceso en mi vida.



1.3.7.	Optimización del rendimiento de extracción y cantidad de fitoesteroles .....	66
1.3.8.	Composición química del bagazo de caña de azúcar obtenido por fluidos supercríticos..	68
1.4.	CONCLUSIONES PARCIALES .....	72
<b>2.</b>	<b>ENCAPSULACIÓN DE FITOESTEROLES.....</b>	<b>73</b>
2.1.	MARCO TEÓRICO .....	73
2.1.1.	Solubilización de fitoesteroles .....	73
2.1.2.	Técnicas de encapsulación .....	74
2.1.3.	Agentes encapsulantes empleados en secado por aspersión.....	79
2.2.	METODOLOGÍA.....	83
2.2.1.	Preparación de la emulsión de alimentación .....	83
2.2.2.	Diseño de experimentos-producción de micropartículas .....	84
2.2.3.	Caracterización de micropartículas obtenidas por secado por aspersión .....	85
2.2.4.	Optimización.....	87
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	89
2.3.1.	Caracterización de las micropartículas.....	89
2.3.2.	Optimización de los agentes encapsulantes.....	99
2.4.	CONCLUSIONES PARCIALES .....	106
<b>3.</b>	<b>INCORPORACIÓN DE FITOESTEROLES EN MATRICES LIQUIDAS -BEBIDAS DE FRUTAS .....</b>	<b>107</b>
3.1.	MARCO TEÓRICO.....	107
3.1.1.	Alimentos funcionales.....	107
3.1.2.	Bebidas de frutas y su crecimiento.....	108
3.1.3.	Estabilidad de los fitoesteroles en matrices alimentarias .....	109
3.1.4.	Normativa.....	112
3.1.5.	Estudios Clínicos de fitoesteroles en matrices alimentarias y farmacéuticas.....	114
3.2.	METODOLOGÍA .....	119
3.2.1.	Preparación de bebida de naranja con fitoesteroles.....	119
3.2.2.	Caracterización microbiológica y sensorial del jugo de naranja con fitoesteroles .....	120
3.2.3.	Estimación de la vida útil de jugo de naranja con fitoesteroles encapsulados .....	121
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
3.3.1.	Caracterización microbiológica y sensorial de la bebida de naranja con fitoesteroles....	125

3.3.2.	Determinación de vida útil .....	130
3.4.	CONCLUSIONES PARCIALES .....	141
<b>4.</b>	<b>BIOACCESIBILIDAD DE FITOESTEROLES EN MATRIZ LIQUIDA.....</b>	<b>142</b>
4.1.	MARCO TEÓRICO.....	142
4.1.1.	Colesterol y su importancia en el organismo .....	142
4.1.2.	Mecanismos de acción de fitoesteroles .....	146
4.1.3.	Métodos para la evaluación de compuestos funcionales.....	149
4.1.4.	Bioaccesibilidad .....	152
4.2.	METODOLOGÍA .....	155
4.2.1.	Reactivos a emplear y preparación de soluciones .....	155
4.2.2.	Muestras para digestión in vitro .....	156
4.2.3.	Modelo de digestión in vitro .....	156
4.2.4.	Determinación de bioaccesibilidad .....	158
4.2.5.	Extracción lipídica.....	159
4.2.6.	Análisis GC-MS .....	159
4.2.7.	Análisis estadístico.....	160
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	161
4.3.1.	Bioaccesibilidad del colesterol en presencia de muestras de FE.....	161
4.3.2.	Bioaccesibilidad del colesterol y las sales biliares .....	166
4.3.3.	Bioaccesibilidad del colesterol en muestras de jugo de naranja.....	168
4.4.	CONCLUSIONES PARCIALES .....	172
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>175</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>176</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>228</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A.S.T.M.:** Sociedad Americana para Pruebas y Materiales

**ABCG5/ABCG8:** Transportadores dependientes de ATP

**ACAT:** acil-coenzima A-Colesterol aciltransferasa

**AR:** Angulo de reposo

**Aw:** Actividad acuosa

**BA:** Bioaccesibilidad

**CE:** conductividad eléctrica

**CER:** Periodo de extracción a velocidad constante

**cm:** centímetro

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**CT:** Colesterol total

**Da:** densidad aireada

**De:** Densidad empacada

**DE:** Equivalentes de dextrosa

**DOD:** destilado de la desodorización de los aceites vegetales

**E:** Esterificado

**E\_A:** Encapsulados en agua

**ECV:** Enfermedades cardiovasculares

**EE:** Eficiencia de encapsulación

**EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

**ENA:** Encuesta Nacional Agropecuaria

**Est:** Esterificado

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos

**FE:** Fitoesteroles

**FER:** Periodo de extracción a velocidad descendiente

**FSC:** Fluidos supercríticos

**g:** gramo

**GA:** Goma arábica

**GC-MS:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

**h:** hora

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HMG-CoA reductasa:** 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A-reductasa

**ICONTEC:** Instituto Colombiano de Normas Técnicas

**ILD:** lipoproteínas de densidad intermedia

**JFE :** Jugo de naranja con fitoesteroles

**JNC:** Jugo de naranja control

**L:** Libre

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LER:** Periodo de velocidad baja o controlada por difusión

**m.o.:** microorganismos

**M:** Maltodextrina

**mg:** miligramo

**min:** minuto

**mL:** mililitro

**MPa:** Megapascal

**nm:** nanómetros.

**NPC1L1:** proteína Nieman Pick C1 Like 1

**NTC:** Norma Técnica Colombiana.

**OCDE:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ONS:** Observatorio Nacional de Salud

**PAS:** Proteína aislada de soya

**PI:** Punto isoeléctrico

**POPs:** Producto de oxidación de fitoesteroles

**ppm:** partes por millón

**QDA:** análisis descriptivo cuantitativo

**RD:** República Dominicana

**RS:** Rendimiento de secado

**SDS:** dodecilsulfato de sodio

**SDT:** sólidos disueltos totales

**SEM:** Microscopia Electrónica de Barrido

**SPCR:** Alta sensibilidad a proteína C- reactiva

**TG :** Triglicéridos

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad

**$\alpha$ -T:**  $\alpha$ -tocoferol

**$\beta$  – C:**  $\beta$ -caroteno

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Métodos de obtención de FE a partir de diferentes matrices vegetales .....	35
<b>Tabla 2.</b> Extracción de FE de diversas matrices vegetales mediante la tecnología de FSC .....	39
<b>Tabla 3.</b> Diseño factorial – extracción de FE por FSC .....	45
<b>Tabla 4.</b> Análisis granulométrico de bagazo de caña de azúcar en polvo.....	46
<b>Tabla 5.</b> Diseño de experimentos para la extracción de FE por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar .....	62
<b>Tabla 6.</b> Caracterización del extracto de bagazo de caña de azúcar obtenido por FSC.....	69
<b>Tabla 7.</b> Métodos de encapsulación más comunes, ventajas y desventajas de su uso .....	75
<b>Tabla 8.</b> Técnicas empleadas para la encapsulación de FE, comparación entre sus eficiencias y tamaños de partícula .....	77
<b>Tabla 9.</b> Diseño de mezcla simplex-centroide de la composición de agentes encapsulantes para las emulsiones de alimentación en secado por atomización de FE .....	84
<b>Tabla 10.</b> Caracterización de las micropartículas de FE del diseño de mezcla simplex-centroide .....	89
<b>Tabla 11.</b> Condiciones óptimas para la encapsulación de FE a partir del bagazo de caña de azúcar. Valores teóricos y reales. ....	101
<b>Tabla 12.</b> Valores de referencia de Colesterol total y LDL .....	117
<b>Tabla 13.</b> Caracterización nutricional y fisicoquímica de bebida de naranja comercial por cada 100mL.....	119
<b>Tabla 14.</b> Análisis microbiológicos de la bebida de naranja control y con adición de FE .....	126
<b>Tabla 15.</b> Energías de activación y constantes de velocidad de deterioro de jugo control y con encapsulados de FE.....	137

<b>Tabla 16.</b> Energía de activación de algunas matrices alimentarias .....	138
<b>Tabla 17.</b> Factor $Q_{10}$ de las bebidas sin y con FE encapsulados .....	139
<b>Tabla 18.</b> Comparación ventajas y desventajas de métodos <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e intervenciones en humanos .....	150
<b>Tabla 19.</b> Muestras de FE para modelo de digestión <i>in vitro</i> .....	156
<b>Tabla 20.</b> Promedio de valores experimentales de las variables pH, solidos disueltos, conductividad y aceptación sensorial.....	238
<b>Tabla 21.</b> Coeficientes de determinación ( $r^2$ ) de las variables analizadas y orden de la reacción .....	239
<b>Tabla 22.</b> Linealización de datos obtenidos en cada uno de los parámetros, según el orden de la reacción (primer orden $\ln A_t$ , segundo orden $1/A_t$ ) .....	240
<b>Tabla 23.</b> Constantes de Velocidad (de deterioro) para cada uno de los parámetros analizados ( $k = m$ ).....	243
<b>Tabla 24.</b> $\ln k$ de cada uno de los parámetros .....	243
<b>Tabla 25.</b> Energías de activación ( $E_a$ ) de cada uno de los parámetros evaluados para jugo control y encapsulado.....	245
<b>Tabla 26.</b> Factor $Q_{10}$ de las bebidas sin y con fitoesteroles encapsulados .....	245

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferencias estructurales entre el colesterol y los principales fitoesteroles encontrados en la naturaleza .....	28
<b>Figura 2.</b> Fitoesteroles con ácidos grasos, glicosilados e hidroxinámicos.....	30
<b>Figura 3.</b> Sistema general de equipo de extracción por FSC .....	37
<b>Figura 4.</b> Ángulo de reposo. Embudo fijo .....	42
<b>Figura 5.</b> Efecto de la saponificación sobre los FE del extracto obtenido por solvente orgánico	52
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de identificación de los FE cuantificados (Estigmasterol, Campesterol y $\beta$ -Sitosterol) en una solución de mezcla de estándares y en una de las muestras de extracto del bagazo de caña de azúcar analizada.....	53
<b>Figura 7.</b> Cinéticas de rendimiento de extracción de lípidos presentes en el bagazo de caña de azúcar, mediante FSC a 200 bar, 40°C, sin y con cosolvente (5% etanol).....	54
<b>Figura 8.</b> Cinética de extracción de FE (campesterol, estigmasterol y $\beta$ -sitosterol) a partir del bagazo de caña de azúcar, mediante la FSC a 200 bar, 40°C, sin y con cosolvente (etanol 5%).	56
<b>Figura 9.</b> Efecto de la temperatura sobre la cantidad de FE extraídos del bagazo de caña de azúcar (  ) y el rendimiento de extracción (  ).....	58
<b>Figura 10.</b> Efecto del flujo de CO <sub>2</sub> sobre la cantidad de FE extraídos del bagazo de caña de azúcar (  ) y el rendimiento de extracción (  ) .....	59
<b>Figura 11.</b> Extractos obtenidos del diseño de experimentos reconstituidos con cloroformo .....	61
<b>Figura 12.</b> Superficies de respuesta del efecto de la presión (bar) y cantidad de cosolvente (% etanol) sobre a) rendimiento de extracción y b) cantidad de FE totales obtenidos del bagazo de caña de azúcar .....	63

<b>Figura 13.</b> Superficies de respuesta de la cantidad de FE individuales obtenidos por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar; a) Campesterol, b) Estigmasterol y c) $\beta$ -Sitosterol en mg/g de extracto.....	65
<b>Figura 14.</b> Superficie de respuesta estimada para a) rendimiento de secado y b) eficiencia de encapsulación de las formulaciones en polvo según el diseño de experimentos propuesto con los agentes encapsulantes PAS (Proteína aislada de soya), GA (Goma arábica) y M (maltodextrina) .....	90
<b>Figura 15.</b> Superficie de respuesta estimada para la solubilidad (a) y tamaño de partícula (b), de las formulaciones secas.....	97
<b>Figura 16.</b> Superficie de respuesta para la optimización de las variables independientes.....	100
<b>Figura 17.</b> Emulsión de alimentación antes de ingresar al secador por atomización extracto: agentes encapsulantes (a) y producto seco (b).....	101
<b>Figura 18.</b> Micrografías SEM de agentes encapsulantes empleados en el secado de extracto de FE y formulación óptima secada por aspersión. a) GA; b) M; c) PAS y d) Formulación óptima. ..	103
<b>Figura 19.</b> Difractogramas de los agentes encapsulantes y la formulación óptima.....	105
<b>Figura 20.</b> Estructuras de productos de oxidación de FE a partir del $\beta$ -sitosterol.....	111
<b>Figura 21.</b> Tabla nutricional de jugo de naranja con fitoesteroles.....	124
<b>Figura 22.</b> Intensidades de los descriptores sensoriales para las muestras de JNC (Jugo de naranja control) y JFE (Jugo de naranja con fitoesteroles).....	127
<b>Figura 23.</b> Paleta de colores Pantone-Amarillo (Color-paints, 2021).....	128
<b>Figura 24.</b> Bebidas analizadas, Jugo de naranja control y con adición de fitoesteroles encapsulados .....	129

<b>Figura 25.</b> Evaluación de diferentes parámetros fisicoquímicos de las bebidas en el tiempo. a) pH, b) sólidos disueltos y c) conductividad, (—) jugo con encapsulado 10°C, (—) jugo control 10°C, (—) jugo con encapsulado 20°C y (—) jugo control 20°C.....	131
<b>Figura 26.</b> Correlación entre los parámetros pH y conductividad de las bebidas analizadas ....	134
<b>Figura 27.</b> Evaluación de parámetros sensoriales de las bebidas en el tiempo. a) sabor y b) aceptación general de bebidas (—) jugo con encapsulado a 20°C; (—) jugo control a 10°C; (—) jugo con encapsulado a 10°C; (—) jugo control a 20°C; (---) límite mínimo de aceptación .....	135
<b>Figura 28.</b> Compuestos derivados del colesterol .....	143
<b>Figura 29.</b> Ruta biosintética del colesterol. Modificado de Koolman y Röhm (2004).....	144
<b>Figura 30.</b> Mecanismos de acción de los FE en la inhibición del colesterol a nivel intestinal..	148
<b>Figura 31.</b> Modelo explicativo de digestión in vitro. Órganos del sistema digestivo, tomada y modificada de CK-12 Foundation, (2021) .....	157
<b>Figura 32.</b> Separación del medio de digestión total y fase micelar .....	158
<b>Figura 33.</b> Evaluación de bioaccesibilidad de muestras de FE y controles durante la digestión <i>in vitro</i> . a) Bioaccesibilidad del colesterol, b) bioaccesibilidad del $\beta$ -sitosterol y c) correlación entre la bioaccesibilidad del colesterol y los FE.....	162
<b>Figura 34.</b> Efecto de las muestras y controles evaluados sobre a) la bioaccesibilidad de los ácidos biliares y b) la correlación entre la bioaccesibilidad del colesterol y los ácidos biliares.....	167
<b>Figura 35.</b> Efecto de las muestras: E (Encapsulados), E_A (Encapsulados en agua), JNC (jugo de naranja control) y JFE (Jugo de naranja con FE) sobre la a) bioaccesibilidad del colesterol y b) bioaccesibilidad de los ácidos biliares. ....	169
<b>Figura 36.</b> Linealización de parámetros, según su orden de reacción, contra el tiempo, para bebida control y bebida con encapsulados de fitoesterol a 10 y 20°C. a) pH, b) sólidos disueltos, c) control	

a 10°C de solidos disueltos y conductividad. d) conductividad, e) aceptación sensorial de las bebidas. .... 242

**Figura 37.** Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción en cada uno de los parámetros evaluados, a) pH, b) solidos disueltos, c) conductividad y d) aceptación sensorial de las bebidas. .... 244

**Figura 38.** Actividad antioxidante por el método DPPH, para cada muestra con FE en les diferentes etapas de la digestión *in vitro*. .... 249

## ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Principales materias primas cultivadas en Colombia, como posibles fuentes de fitoesteroles.....	227
<b>Anexo B.</b> Matrices alimentarias adicionadas con fitoesteroles y sus efectos sobre el perfil lipídico.....	229
<b>Anexo C.</b> Formas farmacéuticas de suplementación con fitoesteroles y sus efectos sobre el perfil lipídico .....	235
<b>Anexo D.</b> Metodología para la estimación de vida útil de bebida de naranja con y sin fitoesteroles encapsulados.....	237
<b>Anexo E.</b> Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH durante la digestión <i>in vitro</i> ..	246

## RESUMEN

Los fitoesteroles (FE), son metabolitos secundarios que se encuentran en la naturaleza, similares al colesterol, tanto en función como en estructura, presentando modificaciones en la cadena lateral del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno e importantes por su asociación con la reducción del colesterol en sangre. En este trabajo, la extracción de FE se hizo a partir del bagazo de caña de azúcar, mediante la tecnología de fluidos supercríticos con variaciones en la presión y adición de cosolvente. El extracto obtenido fue encapsulado mediante secado por atomización empleando diferentes agentes encapsulantes (maltodextrina, proteína aislada de soya y goma arábica). Los encapsulados obtenidos se incorporaron en un jugo de naranja, evaluando el cambio de variables como: pH, sólidos disueltos totales (SDT), conductividad y aceptación sensorial en el tiempo a dos temperaturas (10 y 20°C). La inhibición del colesterol en micelas mixtas de materias primas (extracto de fluidos supercríticos -FSC- y las micropartículas) como la bebida de naranja con adición de FE en micropartículas, fueron evaluadas mediante un estudio de bioaccesibilidad con un modelo de digestión *in vitro* simulado. Como conclusión, se presenta que la bebida con adición micropartículas de FE, proporciona una inhibición del 80% del colesterol presente en las micelas de la digestión simulada, sugiriendo que es posible contar con una alternativa de alimento funcional con FE en una matriz acuosa para la población en general.

**Palabras clave:** Fitoesteroles, fluidos supercríticos, encapsulación, bioaccesibilidad

## ABSTRACT

Phytosterols (PS) are secondary metabolites found in nature, similar to cholesterol, both in function and structure. They present modifications with the cholesterol in the side chain of the cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus and are important due to their association with the reduction of cholesterol in the blood. Its extraction was made from sugarcane bagasse, using supercritical fluid extraction with pressure and addition of co-solvent variations. The extract obtained was encapsulated by spray drying using different encapsulating agents (maltodextrin, isolated soy protein and arabic gum). The encapsulates obtained were incorporated into orange juice, evaluating the change of variables such as: pH, total dissolved solids (TDS), conductivity and sensory acceptance over time at two temperatures (10 and 20 °C). Cholesterol inhibition in mixed micelles of raw materials (supercritical fluid extract and microparticles) such as orange beverage with addition of PS in microparticles, were evaluated by a bioaccessibility study with a simulated in vitro digestion model. As a conclusion, it is presented that the drink with the addition of PS microparticles provides 80% inhibition of the cholesterol present in the micelles of the simulated digestion, suggesting that it is possible to have a functional food alternative with PS in an aqueous matrix for the population.

**Keywords:** Phytosterols, supercritical fluids extraction, encapsulation, bioaccessibility

## INTRODUCCIÓN

Los esteroides vegetales (fitoesteroides- FE) son compuestos bioactivos obtenidos de las plantas, similares al colesterol tanto en estructura (núcleo esteroide con un grupo hidroxilo en el carbono  $3\beta$ , y doble enlace en posición 5) como en función; sin embargo, difieren de este último por la estructura de su cadena lateral (Gylling et al., 2014), la cual podría contener grupos etilo o metilo o la presencia de insaturaciones. A pesar de que se han descrito más de 200 fitoesteroides (FE), los de mayor abundancia en la naturaleza son el  $\beta$ -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol (García-Llatas et al., 2015). Estos compuestos han ido ganando importancia, ya que se estima que un consumo aproximado de 1,5 a 3 g FE/día, logra una disminución en los niveles de colesterol en plasma entre un 7-12% (Lin et al., 2017; Meng, Pan, & Liu, 2012), contribuyendo así a una reducción en el riesgo de enfermedad cardiovascular, dado que se considera el colesterol LDL alto como un factor importante en el desarrollo de ésta (Álvarez-Sala et al., 2016). Cabe destacar que los FE no pueden ser sintetizados por el hombre, por lo que su ingesta depende de la dieta (De Jong et al., 2003), siendo alimentos de origen vegetal (Gylling et al., 2014), como aceites, granos, semillas, frutas y verduras (Normén et al., 2007) su fuente.

Es de resaltar que la Administración de Alimentos y Medicamentos (“Food and Drug Administration” FDA por sus siglas en inglés) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority- EFSA, por sus siglas en inglés), han aprobado los FE como ingredientes funcionales mediante declaraciones de la relación de estos con un efecto en la salud “los ésteres de esteroides o de estanoles de origen vegetal con la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular (Food and Drug Administration, 2016) y de disminución de colesterol en sangre”(EFSA -European Food Safety Authority-, 2006), siendo uno de los mecanismos por el

cual los FE ejercen su función, la competición con el colesterol a nivel intestinal (Alemany-Costa et al., 2013).

A pesar de los beneficios reportados por los FE en la salud, su uso ha sido limitado debido a sus altos puntos de fusión y baja solubilidad tanto en agua como en aceite (Meng et al., 2012). Importante tener en cuenta que los FE libres (o no esterificados) son insolubles en agua y poco solubles en grasas y aceites, pero cuando estos se esterifican con ácidos grasos, aumenta su solubilidad en grasa, haciendo posible su incorporación en diferentes productos alimenticios (Nieminen et al., 2016), como margarinas (Lin et al., 2017), productos lácteos, barras de snacks, panes (Bano, 2013; Barriuso, Astiasarán, & Ansorena, 2016), entre otros. Es significativo considerar que las anteriores categorías de alimentos son de naturaleza lipídica, lo que facilita la incorporación de estos ingredientes; sin embargo, el consumo de estos productos cada vez es más cuestionado, por lo que lograr la adecuada dispersión de fitoesteroles en matrices acuosas, empieza a generar gran interés comercial y a convertirse en todo un reto para el diseño y formulación de productos.

La aplicación de técnicas como secado por aspersion contribuye a aumentar la dispersión de los FE en matrices alimentarias acuosas, mejorando su solubilidad (Chen et al., 2013; Di-Batista et al., 2017; Nosari et al., 2015), atributos sensoriales, propiedades de funcionalidad (Alvim et al., 2013) y aplicación a otras matrices, en las cuales algunos estudios han demostrado las propiedades de los FE en la salud del consumidor a través del consumo de bebidas (Abumweis et al., 2008; Devaraj et al., 2006; Katan et al., 2003); ofreciendo resultados comparables a los obtenidos con matrices grasas.

Por lo anterior, la presente tesis se estructura en cuatro capítulos, los cuales hacen referencia a cada uno de los objetivos específicos planteados.

En el capítulo 1: “Extracción de fitoesteroles”, se abordaron los métodos empleados para la extracción de FE en diferentes matrices; destacando, la extracción por fluidos supercríticos para la obtención de FE a partir del bagazo de caña de azúcar, previa a la caracterización del material vegetal para su optimización. El capítulo 2: “Encapsulación de fitoesteroles”, como alternativa tecnológica para garantizar su estabilidad y mejorar la solubilidad de los FE, permitiendo ampliar la aplicación de éstos en diferentes matrices alimentarias acuosas. En este capítulo, se garantiza el secado de los compuestos bioactivos mediante la técnica de “secado por aspersion” y la caracterización de las micropartículas que permitió determinar si la formulación seleccionada cumplía con mejorar la solubilidad de los FE.

En el capítulo 3: “Incorporación de fitoesteroles en productos alimenticios”, se llevó a cabo la incorporación del ingrediente desarrollado para la obtención de una bebida tipo jugo de naranja. En esta sección se evaluaron los cambios en la aceptación sensorial, pH, sólidos disueltos totales y conductividad eléctrica como parámetros de seguimiento a la estabilidad del producto desarrollado. Se resalta que no solo por el hecho de adicionar un ingrediente con características funcionales a un alimento, este se convierte en funcional; por lo que en el capítulo 4, “Bioaccesibilidad de compuestos bioactivos”, se hizo la aproximación mediante la metodología de digestión *in vitro*, al extracto, micropartículas y bebida obtenidas sobre su posible funcionalidad, a través de la fracción disponible después de pasar un proceso digestivo para ser aprovechable por el organismo.

## Planteamiento del problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de las principales causas de muerte en el mundo se asocia a enfermedades cardiovasculares (ECV), en donde para el año 2016, representaron un promedio de 15,2 millones de muertes a nivel mundial, y ha sido una de las principales causas de muerte en los últimos 15 años (OMS, 2018). Colombia no es ajena a esta situación, el Observatorio Nacional de Salud (ONS), registró que el 23,5% del total de las muertes se deben por ECV, situándose en la primer causa de muerte; de las cuales el 56,3% se debieron a enfermedad cardíaca isquémica, 30,6% a cerebrovascular, 12,4% a hipertensiva y 0,5% a cardíaca reumática crónica (Instituto Nacional de Salud, 2013). Por otra parte, la carga económica que imponen estas enfermedades para el país es particularmente alarmante, ya que las cardiopatías, los accidentes vasculares cerebrales y la diabetes mellitus reducen entre 1% y 5% el producto interno bruto en los países de ingresos bajos y medianos que pasan por un crecimiento económico rápido, pues muchas personas mueren de manera prematura (Gómez, 2012).

Una de las estrategias que se plantean para prevenir y controlar las enfermedades cardiovasculares, es una alimentación saludable, la cual puede incluir el consumo de frutas, verduras (Ministerio de Salud y Protección Social, 2020) y alimentos funcionales que ayuden a reducir el colesterol con compuestos bioactivos como fibra soluble, ácidos grasos omega 3, isoflavonas de soya y esteroides vegetales-FE (Abuajah et al., 2015), siendo estos últimos aprobados por la FDA y EFSA como ingrediente que contribuye a reducir el colesterol LDL (Lipoproteínas de baja densidad, por sus siglas inglés “low-density lipoprotein”).

A pesar que, los FE se encuentran en todas las matrices vegetales, las principales materias primas para su obtención son las resinas de árboles de coníferas o “tall oil” (subproductos

obtenidos del proceso de fabricación del papel) y destilados de aceites vegetales (Cantrill & Kawamura, 2008). Por lo que, en el caso propiamente de Colombia, tanto el cultivo de coníferas como la destilación de aceites vegetales es poco, en comparación con otras plantas y subproductos nacionales, que pueden ser empleados para la obtención de FE (ver Anexo A. Principales materias primas cultivadas en Colombia, como posibles fuentes de fitoesteroles), destacando la caña de azúcar, la cual cuenta con el mayor volumen en el territorio colombiano; a pesar de que su contenido de FE no es el más alto, su producción y condiciones de siembra y cosecha, permiten contar con este cultivo durante todo el año (Asocaña, 2020), ventajas que no tienen las otras fuentes. Sin embargo, con el fin de no competir con los usos que se le da a la caña de azúcar, se plantea trabajar con un subproducto de esta, el bagazo, como alternativa de aprovechamiento.

La extracción de FE se lleva a cabo con solventes orgánicos, por lo que es imperante la búsqueda de técnicas alternativas limpias como el empleo de los fluidos supercríticos, que presentan ventajas sobre las extracciones convencionales en cuanto a que no utiliza solventes. No obstante, uno de los aspectos más relevantes que se tuvo en cuenta en este estudio, está asociado a la naturaleza lipídica y cristalina de los FE, ya que ésta limita la incorporación del ingrediente en alimentos de naturaleza acuosa; y para mejorar este aspecto, se propuso la integración de las técnicas de extracción y encapsulación para el desarrollo de productos alimenticios novedosos, que fuesen de fácil acceso y permitiesen aportar beneficios para la disminución de niveles de colesterol sérico y por ende del riesgo cardiovascular.

Se ha visto que en Colombia, hay una tendencia creciente al consumo de bebidas saludables como jugos naturales, debido a la preferencia del consumidor a reducir el consumo de azúcar y aumentar el de fibra (Euromonitor Internacional, 2017b; Salazar, 2017). Esto, abre una

oportunidad en la cadena frutícola, para aprovechar el cultivo naranja, el cual ocupa más del 47% de participación en plazas de mercado (Ministerio De Agricultura y Desarrollo Rural, 2019) y se prefiere consumir en bebidas (Orduz- Rodriguez, 2020), lo que permite que más personas puedan consumirlo. Por ello, se define que el mayor reto de este trabajo es lograr la dispersión de los FE en matrices acuosas como el jugo de naranja.

Para esto, se cuenta con técnicas como la encapsulación que permitirá incorporar los compuestos bioactivos (FE) de forma fácil en matrices líquidas y además los protegerá de la oxidación; adicional a la incorporación de los FE en matrices acuosas, se debe asegurar la estabilidad de ésta en el tiempo, manteniendo su calidad sensorial , evitando la posible separación de fases en la bebida, disminuyendo la sensación grasosa al consumir el producto y logrando el cumplimiento de la legislación vigente para bebidas.

Por lo anterior se ha planteado la siguiente pregunta,

¿la obtención de esteroides vegetales a partir del bagazo de la caña de azúcar y su posterior aplicación a jugo de naranja comercial, permite calidad sensorial, fisicoquímica y algún efecto sobre la inhibición del colesterol a nivel micelar?

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Obtener fitoesteroles dispersables en matrices acuosas para su incorporación en una bebida de frutas evaluando su estabilidad y funcionalidad *in vitro*

### Objetivos Específicos

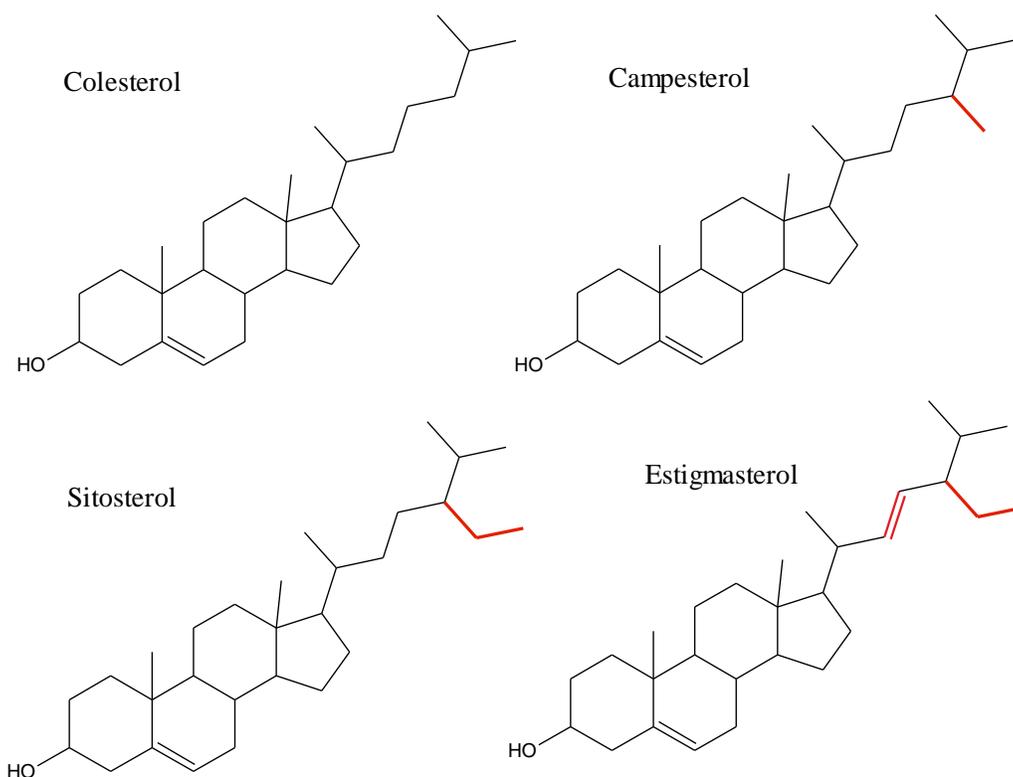
- Extraer fitoesteroles a partir del bagazo de la caña de azúcar cultivada en Colombia a través de la tecnología de fluidos supercríticos como alternativa de extracción.
- Solubilizar fitoesteroles mediante secado por atomización para su incorporación en matrices acuosas.
- Incorporar fitoesteroles en una bebida de naranja comercial pasteurizada evaluando su estabilidad y calidad sensorial.
- Aproximar la funcionalidad de la bebida con fitoesteroles mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

# 1. EXTRACCION DE FITOESTEROLES A PARTIR DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR POR FLUIDOS SUPERCRITICOS

## 1.1. Marco Teórico

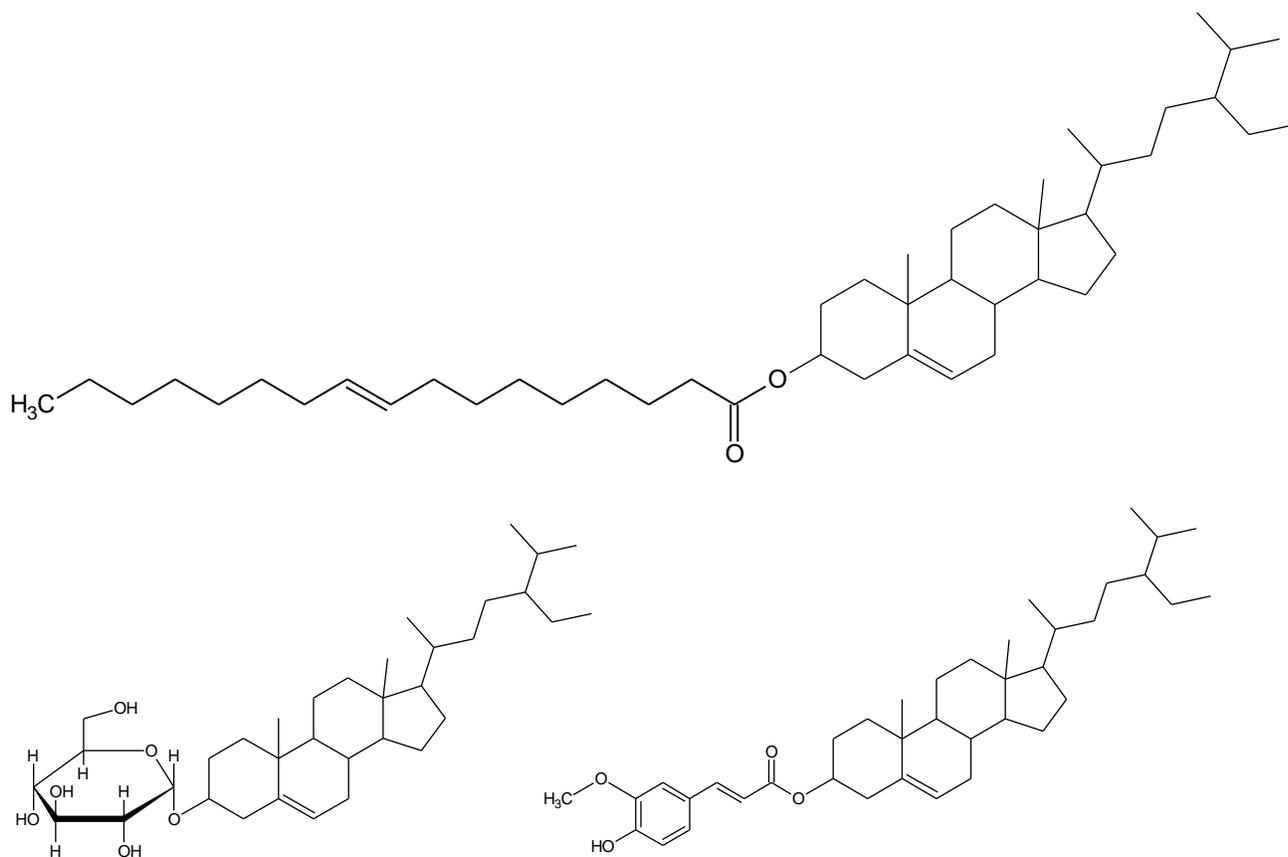
### 1.1.1. Fitoesteroles

Los fitoesteroles -FE- (esteroles vegetales) pertenecen al grupo de los triterpenos, son alcoholes constituidos por 28 o 29 carbonos, similares al colesterol tanto en estructura (núcleo esteroideo, grupo hidroxilo en el C3 y un doble enlace en el C5) como en función (estabilización de las membranas celulares) (Lagarda et al., 2006; Uddin et al., 2015; Moreau et al. 2018); sin embargo, difieren de éste estructuralmente por su cadena lateral (Gylling et al., 2014), la cual puede ser insaturada o contener un grupo metilo o etilo (Figura 1).



**Figura 1.** Diferencias estructurales entre el colesterol y los principales fitoesteroles encontrados en la naturaleza

Aunque se han descrito más de 200 FE, los más abundantes en la naturaleza son el  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol (Feng, Luo, Zhong, et al., 2014; Garcia-Llatas et al., 2015; Lagarda et al., 2006), los cuales representan cerca del 90% de los esteroides presentes en las plantas (Garcia-Llatas et al., 2015). También es posible encontrar fitoestanoles, los cuales son la forma saturada de los fitoesteroides, ya que carecen del doble enlace en la estructura del núcleo esteroidal, son menos abundantes y se encuentran en menor concentración que los FE (Hung Llamas et al., 2008; Katan et al., 2003; Lagarda et al., 2006). Los FE además, se pueden encontrar en forma libre, o conjugada en el C-3 a un ácido graso, ácido hidroxicinámico o glicosilados (Figura 2) (Ferrer et al., 2017; Han et al., 2008; Moreau et al., 2018; Moreau & Hicks, 2004; Nyström, 2012; Racette et al., 2015), estos últimos son más comunes en cereales (Lagarda et al., 2006).



**Figura 2.** Fitoesteroles con ácidos grasos, glicosilados e hidroxinamicos

La importancia de los FE está asociada a sus propiedades anti-inflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, anti ateroscleróticas y de reducción de niveles de colesterol (Uddin et al., 2018), siendo esta última, la más estudiada y aprobada para su uso, ya que se ha estimado que un consumo aproximado de 1,5 a 3 g FE/día, logra reducir la concentración de colesterol en sangre entre 7 -12% (Lin et al., 2017; Meng et al., 2012), disminuyendo la cantidad de colesterol presente en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y contribuyendo a una reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Álvarez-Sala et al., 2016; Lin et al., 2017; Meng et al., 2012; Uddin et al., 2018).

### ***1.1.2. Fuentes de fitoesteroles***

Los FE no pueden ser sintetizados por el organismo humano, así que su consumo depende de la dieta (De Jong et al., 2003). Estos son ampliamente distribuidos en diferentes alimentos de origen vegetal (Gylling et al., 2014), tales como aceites (de maíz, canola, soya, girasol, entre otros), semillas, frutos secos y cereales (Gylling & Simonen, 2015; Lin et al., 2016; Normén et al., 2007); y su cantidad depende de la naturaleza del alimento.

A nivel general, las concentraciones más altas de FE se encuentran en los aceites vegetales y margarinas; las semillas y nueces tienen niveles moderados y las frutas y verduras el menor contenido de estos compuestos (Racette et al., 2015; Taşan et al., 2006). Esto se puede apreciar en algunos estudios realizados en diferentes países como China (Han et al., 2008), Suecia (Normén et al., 1999) y Países Bajos (Normén et al., 2002), donde se determinó el contenido aproximado de FE presentes en los alimentos normalmente consumidos en estos lugares. Es importante resaltar que las variaciones entre los resultados obtenidos en estos trabajos, se pueden atribuir al procesamiento de los alimentos y a los diferentes factores abióticos propios de la región (Rogowska & Szakiel, 2020) donde se evaluó el contenido de FE de frutas y verduras, por colocar un ejemplo.

Entre las fuentes comerciales para la obtención de FE sobresalen el “*Tall oil*” y el destilado de aceites vegetales (Cantrill & Kawamura, 2008). El “*Tall oil*” o licor negro, hace referencia a un subproducto derivado del proceso de obtención de pasta celulósica a partir de madera de coníferas (*Pinus elliottii* y *Pinus taeda*), y la otra fuente es el destilado de la desodorización (DOD), subproducto en la refinación de aceites vegetales, este destilado contiene entre 8-20% de esteroides dependiendo del aceite (Carmona et al., 2010; Christie, 2012; Hung Llamas et al., 2008).

### 1.1.2.1. Producción de caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los cultivos que se encuentra más distribuido en todo el mundo y la principal material prima para la producción de azúcar (De Palma et al., 2019; Zhao et al., 2018). Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se prevé que la producción de caña aumentará en muchas partes del mundo, debido a los rendimientos rentables en comparación con otros cultivos y al fortalecimiento de las inversiones para la renovación de las plantaciones de caña de azúcar que se han fortalecido (OCDE/FAO, 2017).

Colombia, se encuentra entre los primeros 10 productores de caña de azúcar a nivel mundial (34 638 019 toneladas) (FAO, 2018), siendo importante resaltar que debido a su posición geográfica, la temperatura promedio durante todo el año, los ciclos de invierno y verano intercalados por tiempos uniformes de tres meses y los niveles de precipitación en temporadas de lluvia, hacen que el cultivo de la caña sea el más eficiente que el promedio mundial, dándole así a este cultivo importancia agrícola y diferencial (DANE, 2015). Estadísticas presentadas por FAO en el 2017, destacan que la caña de azúcar es el cultivo de mayor producción en Colombia, seguido por el banano (3 786 672 ton), café (754 376 ton), aguacate (314 275 ton) y cacao en grano (56 808 ton) (FAO, 2018).

Según la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) correspondiente al año 2017, si se clasifica la producción agrícola de Colombia por grupo de cultivos, las categorías corresponderían a agroindustriales, tubérculos y plátano, cereales, frutales, hortalizas, verduras y legumbres, árboles frutales dispersos; de las cuales la de mayor producción corresponde a la categoría agroindustrial

y de esta categoría se destaca la participación de la caña de azúcar en este sector de un 68%, seguido de la palma de aceite con un 24,3% de producción, lo que reafirma que la caña de azúcar es uno de los productos de mayor producción en Colombia (DANE, 2017).

Algunos estudios muestran que la caña de azúcar se ha convertido en una potencial fuente de producción de sustancias promotoras de la salud, debido a compuestos minoritarios presentes en ella tales como compuestos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico y ácido ferúlico) (Feng et al., 2015; Saska & Chou, 2006), antocianinas (Zhao et al., 2018), estilbenos (piceatanol y resveratrol) (Boue et al., 2013), hidroxí y cetosteroides (Georges et al., 2006; Singh et al., 2015), flavonas (Coutinho et al., 2016), triterpenoides, policosanoles, aldehídos y ácidos grasos saturados de cadena larga y FE (Feng, Luo, Zhang, et al., 2014; Georges et al., 2006; Singh et al., 2015; Asikin et al., 2012).

La concentración de FE en la caña de azúcar varía según la parte aprovechada como se puede observar en el estudio realizado por Feng et al., (2014), donde analizó mediante el método colorimétrico de Liebermann–Burchard el contenido total de FE en el anillo (438,71-457,22 mg/100g seco), punta (237,68-285,33 mg/100g seco), medula (41,39 a 240,86 mg/100g seco) y nudo (65,29 a 155,01 mg/100g seco), encontrando amplias variaciones.

#### **1.1.2.2. Bagazo de caña de azúcar**

Una gran producción de caña de azúcar está asociado a la generación de grandes cantidades de residuos (De Palma et al., 2019), tales como la cachaza, mieles finales, hojas y bagazo (Alarcón et al., 2006). De los cuales el bagazo es el mayor subproductos de la caña de azúcar generado en la industria del azúcar y el alcohol (Tyagi et al., 2019). El bagazo es uno de los mayores residuos agrícolas en el mundo y es obtenido después de triturar la caña de azúcar y extraer su jugo (Loh

et al., 2013). El volumen generado representa entre el 26 al 29% de peso de caña molida (Alarcón et al., 2006; Attard et al., 2015), por lo que, el bagazo de caña de azúcar se puede usar para la generación de vapor, hidrólisis (obtención de furfural, alimentación animal, lignina y etanol), combustible natural, pulpa para papel, celulosa y aglomerados (Cândida Rabelo et al., 2015), productos basados en la fermentación, obtención de químicos y metabolitos (alcoholes, alcaloides) (Parameswaran, 2009). Si bien, una de las transformaciones más económica es la generación de vapor en la industria azucarera y panelera, este solo aprovecha un 50%, abriendo una posibilidad para la obtención de bioactivos (Attard et al., 2015).

El bagazo de caña es económico y disponible como un residuo industrial, puede servir como materia prima para la obtención de productos de valor agregado de importancia farmacéutica (Parameswaran, 2009; Del Río et al., 2015); adicional a los aportes de celulosa, hemicelulosa y lignina, se sabe que contiene compuestos adicionales de interés para la industria de alimentos como los FE (libres o esterificados), policosanoles, (hexacosanol, octacosanol, triacontanol, dotriacontanol); aldehídos de cadena larga (hexacosanal, octacosanal, triacontanal, do y tetra-triacontanal); triacilgliceroles (trioleína), ácidos grasos saturados e insaturados (ácido lignocerico, ácido hexadecanoico, octadecanoico, eicosanoico, docosanoico, pentacosanoico, octacosanoico, tricontanoico) (Asikin et al., 2012; Attard et al., 2015; Del Río et al., 2015; Singh et al., 2015), entre otros.

### ***1.1.3. Extracción de fitoesteroles***

Una vez identificada la materia vegetal para la extracción de los FE, es necesario comprender que pueden ser extraídos por metodologías que incluyen la esterificación química, saponificación, destilación por vacío (Fernandes & Cabral, 2007), extracción con solventes (Del Río et al., 2015;

Feng, Luo, Zhong, et al., 2014; Hrabovski et al., 2012), hidrólisis enzimática, cristalización, cromatografía (Dikshit et al., 2020) y extracción por fluidos supercríticos (De Melo et al., 2014; Hrabovski et al., 2012; Martins, De Melo, Sarmento, et al., 2016; Sovová et al., 2010), entre otros.

En la Tabla 1, se identifican algunos de los métodos empleados para la obtención de FE, siendo la extracción por Soxhlet, debido a su simplicidad y rendimiento (Uddin et al., 2018) y con solventes orgánicos (hexano, acetona, cloroformo, metanol y algunas mezclas) (Lagarda et al., 2006) los más empleados.

**Tabla 1.** Métodos de obtención de FE a partir de diferentes matrices vegetales

Lugar	Fuente	Método de obtención	Rendimiento Total	Esterol	Contenido esteroides	Bibliografía
Portugal	<i>Eucalyptus grandis</i>	Extracción por Soxhlet y evaporación	0,33-0,39%	B-sitosterol	120,9 mg/100 g material seco	(Santos et al., 2017)
Brasil					43 mg/100 g material seco	
Suráfrica					71 mg/100 g material seco	
Portugal	<i>Moringa oleífera</i>	Fluidos supercríticos	2,50%	estigmasterol	50 mg/100 g extracto	(Martins, De Melo, & Silva, 2016)
				B-sitosterol	20 mg/100 g extracto	
Suráfrica	<i>Eucalyptus dunnii</i> Y <i>E. grandis</i>	Extracción por Soxhlet y evaporación	0,11-0,26%	Totales	12-22 mg/100 g material seco	(Kilulya et al., 2014)
Finlandia	Abedul mixto	Cristalización	10%	Totales	450 mg/100 g material seco	(Hamunen, 2013)
Canadá	Abedul amarillo	Extracción etanólica	1,70%	B-sitosterol	300 mg/100g material seco	(Hasegawa et al., 2016)
Portugal	Mango	Extracción por Soxhlet y evaporación	0,56-1,34%	$\beta$ -Sitosterol	23,7-69,2 mg/100g material seco	(Vilela et al., 2013)
				Campesterol	5,2-17,4 mg / 100g material seco	
				Estigmasterol	2,4-8,2 mg/ 100g material seco	

Lugar	Fuente	Método de obtención	Rendimiento Total	Esterol	Contenido esteroides	Bibliografía
Italia	Tomate	Extracción por Soxhlet y evaporación	19,80%	$\beta$ -Sitosterol	108 mg/100g material seco	(Giuffrè & Capocasale, 2016)
				Campesterol	10 mg/100g material seco	
				Estigmasterol	20 mg/100g material seco	
Francia	Higuerilla	Prensado en frío	47%	$\beta$ -Sitosterol	104 mg/100g material seco	(Pacheco-Palencia & Susanne Mertens-Talcott, 2015)
Suecia	Palma	Prensado	43%	Totales	29 mg/100g material seco	(Zou et al., 2012)
China	Caña de azúcar	Extracción por Soxhlet y evaporación	6,55%	$\beta$ -Sitosterol	44 mg/100 g material seco	(Feng, Luo, Zhong, et al., 2014)
Malasia	Semillas de kenaf	Extracción por Soxhlet y evaporación	NR	Totales	6510 mg/100g extracto	(Shy-Kai et al., 2013)

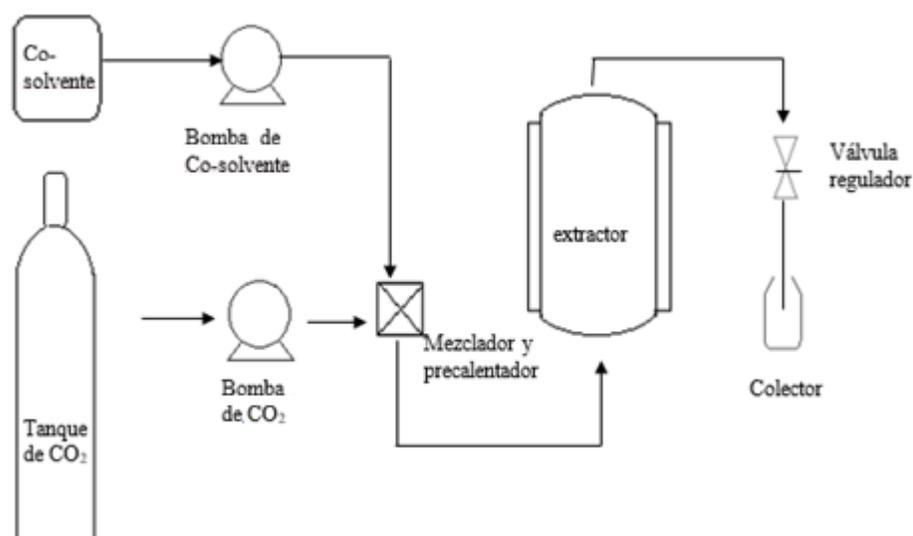
Para la extracción de FE a partir de las materias primas más comerciales (Tall oil y DOD), se emplean técnicas que permiten obtenerlos libres o esterificados (ácidos grasos). El tratamiento del Tall oil, para FE en forma libre se fundamenta en procesos de saponificación, evaporación, destilación neutra, cristalización, filtración y secado (Arboris LLC, 2008; Cantrill & Kawamura, 2008; Hamunen, 2013; Kamal-Eldin & Moazzami, 2009); la obtención de FE esterificados a partir de destilados de aceites vegetales emplean procesos de esterificación/transesterificación, que incluyen metanolisis, destilación, cristalización y filtración (Cantrill & Kawamura, 2008; Carmona et al., 2010; Sherazi et al., 2016).

Comercialmente se encuentran productos de FE como Benecol<sup>®</sup> (ésteres de fitoestanol, Rasio's Group), Take Control<sup>®</sup> (ésteres de fitoesterol, Lipton/Unilever), Phytrol<sup>®</sup> (FE libres de Forbes Meditech), Reducol<sup>®</sup> (FE libres de Novartis), Vegapure<sup>®</sup> (FE libres de Cognis), CardioAid<sup>®</sup> (FE esterificados de ADM - Archer Daniels Midland), entre otros (Hung Llamos et al., 2008).

### 1.1.3.1. Extracción de fitoesteroles por fluidos supercríticos-FSC

Un fluido supercrítico, es aquel que en condiciones de presión y temperatura por encima de su punto crítico, posee las propiedades tanto de un gas como de un líquido y su selectividad puede ser explicada basada en la densidad, difusividad y viscosidad (Uddin et al., 2015). En la extracción por fluidos supercríticos (FSC), se emplea normalmente, como solvente el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el cual tiene bajas condiciones de presión y temperatura que permiten garantizar el estado supercrítico con baja energía (Ahmad et al., 2019; Berk, 2013; Gil-Chávez et al., 2013), modificando su potencial de extracción.

Operacionalmente, en este proceso de extracción, el  $\text{CO}_2$  es comprimido hasta llegar a la presión de extracción deseada, y en presencia de un cosolvente, es mezclado para posteriormente ser calentado a la temperatura programada de extracción antes de entrar en contacto con la muestra por un tiempo específico para posterior despresurización y recuperación del extracto en el colector (Figura 3)



**Figura 3.** Sistema general de equipo de extracción por FSC

Es importante resaltar que no solo a través del fundamento operacional del equipo se puede lograr una adecuada extracción; se hace necesario tener en cuenta propiedades físicas de la matriz como su tamaño de partícula, ángulo de reposo y porosidad (Da Silva et al., 2016; De Melo et al., 2014); así como parámetros de extracción temperatura, presión, tiempo de extracción, flujo de solvente extractor y uso de cosolvente (Ahmad et al., 2019; Sharif et al., 2014; Sovová et al., 2010; Sovová & Stateva, 2011; Uddin et al., 2015). El diseño experimental con base en cada uno de los parámetros anteriores permite cambios en el rendimiento de la extracción, selectividad, densidad, difusividad, viscosidad y área superficial de contacto, entre otras.

Con respecto a la extracción de FE, si bien son varias las técnicas que se emplean para este propósito, la extracción por FSC proporciona varias ventajas frente a otras metodologías, debido a su reducción en el tiempo de extracción, poco consumo de solventes orgánicos, ser adecuada para sustancias termosensibles y producción de extractos amigables con el ambiente (Ahmad et al., 2019). Esta tecnología se ha empleado en diferentes matrices con el fin de brindar una alternativa a los métodos convencionales de extracción, asegurar la mínima cantidad de solvente orgánicos y mayor selectividad, tal como se muestra en la Tabla 2. Las condiciones de extracción varían ligeramente de un estudio a otro en algunas variables como la temperatura (35-65°C), pero de forma muy significativa en la presión (10-55 MPa) y el tiempo de extracción (2-9 h).

**Tabla 2.** Extracción de FE de diversas matrices vegetales mediante la tecnología de FSC

Material vegetal	Condiciones de extracción				Compuesto	Esteroles (mg / 100 g extracto)	Rend. Ext. (%)	Bibliografía
	Presión (MPa)	Temp. (°C)	Flujo de CO <sub>2</sub>	Tiempo ext. (h)				
Hojas de diente de león	15-45	35-65	35-53 g/g de muestra seca	--	$\beta$ -Sitosterol	3810	3,99%	(Simándi et al., 2002)
Semillas de uva	37	65	60 g/min	6	$\beta$ -Sitosterol	245,5-1120,3	5,85-13,6%	(Beveridge et al., 2005)
					Estigmasterol	43-106,4		
					Campesterol	40,6 -103,4		
Orquídea Anoectochilus	15-25	35-55	85 g/min	2	$\beta$ -Sitosterol	289	No reporta	(Huang et al., 2007)
					Estigmasterol	356		
					Ergosterol	296		
Maíz	45	55	8000 mL/min	2	$\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol Y Campesterol	90,9	No reporta	(Lu et al., 2007)
Avena						105,7		
Ajonjolí						620		
Maní						164,5		
Semillas de espin amarillo	15-60	40-80	0,8 g/min	9	$\beta$ -Sitosterol	40	10,8%	(Sovová et al., 2010)
Semillas de tomate	55,2	80	300 g/min	2	$\beta$ -Sitosterol	400	16 %	(Eller et al., 2010)
					Estigmasterol	136		
					Campesterol	59		
					Brasicasterol	3,6		
Semillas de roselle	20-40	40-80	10-20 mL/min; 2 mL/min etanol	3	Esteroles Totales	812,4	16,4 %	(Nyam et al., 2010)
Semillas de melón	20-40	40-80	10-20 mL/min	3	Esteroles Totales	836,5	24%	(Nyam et al., 2011)
Flor de Lotus	20-40	40-60	-	2,5	$\beta$ -Sitosterol	245	2,08 - 4,57%	(Xu et al., 2011)
					Estigmasterol	397		
					Campesterol	139		
Semillas de Calabaza	40	40	7,33 g/min	4	$\beta$ -Sitosterol	9,68	36,17 %	(Hrabovski et al., 2012)
					Estigmasterol	3,87		
					Campesterol	3,88		
					Espinasterol	75,3		

Material vegetal	Condiciones de extracción				Compuesto	Esteroles (mg / 100 g extracto)	Rend. Ext. (%)	Bibliografía
	Presión (MPa)	Temp. (°C)	Flujo de CO <sub>2</sub>	Tiempo ext. (h)				
Eucalipto	10-20	40-60	6 g/min	6	β -Sitosterol	<16	1,19 %	(Domingues et al., 2013)
<i>Eichornia crassipes</i> - lirio acuático	20-30	50	7,5g/min	NR	β -Sitosterol	16,6	1,25 %	(Martins, De Melo, Sarmento, et al., 2016)
					Estigmasterol	92		

Los rendimientos de extracción y la cantidad de FE extraídos dependen indiscutiblemente del tipo de matriz empleada, su contenido lipídico y acondicionamiento de material vegetal.

## **1.2. Metodología**

### ***1.2.1. Materia prima***

El bagazo de caña de azúcar (variedad RD 75-11) fue suministrado por el trapiche panelero el Beneficio (Frontino, Antioquia, Colombia), con una humedad inicial de  $67,10 \pm 10,74$  %. Para lograr una adecuada extracción de los FE, se procedió a hacer un acondicionamiento de la materia prima.

### ***1.2.2. Acondicionamiento de bagazo de caña de azúcar***

El bagazo de la caña de azúcar fue inicialmente desinfectado mediante la aspersión de una solución de Penta Quat® (amonio cuaternario de quinta generación) a 200 ppm y cortado de forma rectangular, para facilitar el proceso de secado. Este se llevó a cabo en un equipo de lecho fluidizado 0193-S002 (Actum, Rionegro-Colombia) a una temperatura de 50°C hasta alcanzar una humedad inferior al 5%, la cual fue determinada por termogravimetría mediante un analizador de humedad HB43-S (Mettler-Toledo, Melbourne-Australia) (Shanmukharadhya & Sudhakar, 2007). La reducción de tamaño del bagazo se realizó en un molino pulverizador de pines (Ateindus Ltda, Medellín-Colombia).

### ***1.2.3. Caracterización de las propiedades de los sólidos en polvo***

Esta caracterización se realizó según el documento de trabajo de Cardona Salazar (2011), con algunas modificaciones, para la determinación del tamaño de partícula, ángulo de reposo, densidades (aparente aireada y de empaque) y porosidad.

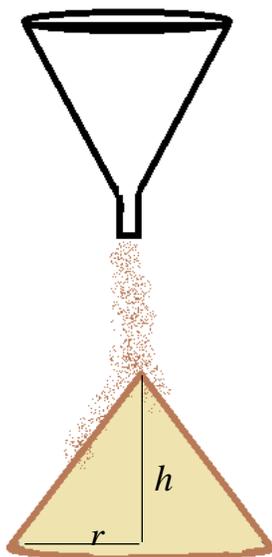
#### **1.2.3.1. Tamaño de partícula**

Este aspecto fue realizado con la ayuda de un tamizador con motor de vibración para facilitar la separación del material particulado. Para esto, 500 g de bagazo en polvo fueron colocados el

tamizador en durante 30 min. Los tamices empleados fueron del # 10 al # 100, de los estandarizados según la norma A.S.T.M. E11 (American Society for Testing and Materials).

### 1.2.3.2. Ángulo de reposo

Este parámetro se realiza por el método de embudo fijo (Figura 4). En el cual, se deja caer 20g de bagazo molido a través de un embudo en una superficie plana, hasta que la pila alcanza una altura aproximada de 5 cm, dejando 1 cm entre esta y el embudo. Su cálculo, se realiza según la ecuación 1



**Figura 4.** Ángulo de reposo. Embudo fijo

$$\alpha = \tan^{-1} \left( \frac{h}{r} \right). \text{ Ecuación 1}$$

Donde h: altura de la pila y r: radio de la base de la pila.

### 1.2.3.3. Densidad aparente aireada (Da) y empacada (De)

La densidad aparente aireada se lleva a cabo colocando 25 g de muestra en polvo en una probeta de 100 mL (sin hacerle ninguna fuerza), mirando posteriormente el volumen ocupado. En el caso

de la densidad empacada, se realiza el mismo procedimiento de la aireada, pero la probeta con el producto es golpeada 50 veces sobre una superficie plana, midiendo también el volumen ocupado por la muestra (Dopico-Ramírez et al., 2012). La densidad es determinada como la relación masa-volumen. Para la determinación de la  $D_a$  y  $D_e$ , las pruebas se hacen por triplicado.

#### **1.2.3.4. Porosidad**

Para determinar el volumen de aire ocupado en la muestra, se sigue la ecuación 2, donde se relacionan las densidades aparentes aireada ( $D_a$ ) y empacada ( $D_e$ ).

$$P = 1 - \frac{D_a}{D_e} \quad \text{Ecuación 2.}$$

#### ***1.2.4. Extracción con solvente del material vegetal***

Las muestras fueron extraídas según la metodología trabajada por Xu et al., (2011) con algunas modificaciones. Para esto, el bagazo en polvo estuvo en contacto con hexano por 6 horas mediante un equipo Soxhlet a una temperatura de 60°C. Pasado este tiempo, el solvente se evaporó a 40°C en un rota evaporador (R114 Büchi, Alemania), el rendimiento del extracto obtenido se determinó gravimétricamente en %p/p y la cantidad de FE obtenidos en mg/g de extracto mediante el método cromatográfico que se explica más adelante. El proceso se realizó por triplicado.

#### ***1.2.5. Saponificación del material vegetal***

El proceso de saponificación del material vegetal se realizó según la metodología planteada por Chen et al., (2015), con algunas modificaciones. Se pesó aproximadamente 1g del bagazo seco y molido, se adicionaron 15mL de una solución etanólica de hidróxido de potasio (KOH a 7,5% p/p), se colocó en reflujo durante 60 min y se extrajo el material graso con una mezcla hexano: éter de petróleo (50:50 v:v). Posteriormente, se lavó con agua destilada el material sólido, se adicionó de nuevo la mezcla hexano: éter de petróleo y la parte orgánica, se hizo pasar por sulfato

de sodio anhidro, luego por papel filtro y se evaporó a 40°C en un rota evaporador. Este proceso se realizó por triplicado. El extracto seco, fue almacenado en un cuarto con humedad controlada y en oscuridad.

#### ***1.2.6. Cinética de extracción por fluidos Supercríticos***

Con el fin de fijar el tiempo de extracción adecuado para los posteriores experimentos, se realizaron dos curvas de extracción, variando la adición de cosolvente (etanol) (200 bar, 40°C, flujo de CO<sub>2</sub> de 6mL/min, sin y con cosolvente -5% de etanol), por un tiempo total de 5 horas. Las extracciones se llevaron a cabo en un equipo de extracción por fluidos supercríticos de 100 mL de capacidad (Spe-ed SFE, Applied separations) con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente y empleando 10 g de material vegetal en el vaso extractor.

#### ***1.2.7. Extracción por fluidos supercríticos (FSC)***

El efecto de la temperatura y el flujo de CO<sub>2</sub>, fueron evaluados mediante dos diseños unifactoriales de 3 niveles con réplica al centro; los valores de temperatura fueron 40, 60 y 80°C y para el flujo fueron 6, 8 y 10 mL/min. En estos diseños se dejó constante la presión y no se adicionó cosolvente. En el punto central de cada uno de estos diseños se hicieron dos repeticiones y la cuantificación de los FE, se realizó por duplicado.

Para las variables presión (200, 300 y 400 bar) y cosolvente (0, 5 y 10%), se recurrió a un diseño factorial 3<sup>2</sup> con 3 réplicas al centro como se muestra en la Tabla 3. Las variables de temperatura, flujo y tiempo de extracción fueron constantes y se establecieron de acuerdo a los resultados obtenidos en los diseños del párrafo anterior. Las variables respuesta para los diseños realizados fueron rendimiento de extracción (%p/p), cantidad de campesterol, estigmasterol y β-sitosterol

(mg/g extracto), FE totales del extracto (sumatoria de 3 FE en mg/g extracto) y FE totales en el material vegetal seco (mg/100g bagazo seco y molido).

**Tabla 3.** Diseño factorial – extracción de FE por FSC

Presión (Bar)	200	300	300	400	300	300	400	200	400	300	200	300
Cosolvente (%)	0	5	10	10	0	0	5	5	0	5	10	5

### **1.2.8. Análisis cromatográfico GC-MS**

Las muestras obtenidas por FSC fueron reconstituidas en cloroformo, sin derivatización, como lo sugieren Yan-Zong et al., (2015). Estas fueron analizadas en un cromatógrafo de gases TRACE 1300, equipado con un auto muestreador AI/AS 1310 y un detector TSQ™ 8000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). La columna empleada para separar los compuestos (campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol) fue una Rxi®-5Sil MS (30 m  $\times$  0,25 mm id, 0,25  $\mu$ m, Restek, Estados Unidos). Las condiciones cromatográficas empleadas fueron: temperatura inicial de 250°C; y un gradiente de temperatura de 5 °C/min hasta llegar a 300 °C, allí se sostuvo por 2 min; después se usó un gradiente de temperatura de 15 °C/min hasta llegar a la temperatura final de 340 °C y se sostuvo por 1 min. El tiempo total de análisis fue de 15,67 min a un flujo del gas de arrastre a 1,4 mL/min.

El inyector se operó a una temperatura de 300 °C, un split de 1:5 y el volumen del inyector fue de 2  $\mu$ L. Los compuestos analizados fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con la inyección individual de cada estándar de esterol, empleando el software X-Calibur. El contenido total de FE fue calculado como la suma de los 3 FE individuales. Todas las cuantificaciones fueron realizadas por duplicado.

### 1.3. Resultados y discusión

#### 1.3.1. Caracterización de las propiedades del polvo del bagazo de caña de azúcar

Es importante conocer algunas características del material vegetal seco y molido antes de llevar a cabo cualquier proceso de extracción, ya que esta información proporciona una idea de cómo se puede comportar el material apilado en un recipiente de extracción; puesto que, si este es cohesivo y compacto, la extracción puede no ser óptima y puede formar canales en el lecho, impidiendo una adecuada interacción matriz-solvente. Por ello, la fluidez del material fue determinada con la ayuda del tamaño de partícula, ángulo de reposo, densidades aireada y empacada y porosidad.

##### 1.3.1.1. Tamaño de partícula

La humedad de la materia prima seca y molida fue de  $2,45 \pm 0,62\%$ , y la distribución del tamaño, mediante análisis granulométrico se pueden apreciar en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Análisis granulométrico de bagazo de caña de azúcar en polvo

# tamiz	tamaño de abertura de tamiz (mm)	% retenido	Tamaño promedio de partícula (mm)
10	2	0	1,700
14	1,400	16,847	1,125
20	0,850	52,484	0,725
30	0,600	12,743	0,513
40	0,425	6,695	0,363
50	0,300	6,048	0,275
60	0,250	1,728	0,231
70	0,212	2,160	0,181
100	0,150	0,432	0,112
Colector	0	0,864	

En la tabla anterior, se observan los resultados obtenidos del proceso de tamizaje del bagazo de caña previamente secado y pulverizado mediante un molino de martillos. El mayor porcentaje de

retención del polvo de bagazo se encontró en los tamices # 14, #20 y #30, siendo el tamiz # 20 el que retuvo el 52,48% del producto, permitiendo intuir que el 50% del material particulado tiene un tamaño entre 0,85-1,4mm. Adicionalmente, solo un 10% del tamaño de la muestra tiene un tamaño inferior a 0,300mm (correspondientes al tamiz #50). Este tipo de distribución para el tamizaje del bagazo de la caña de azúcar se considera normal, ya que, al emplearse un molino de martillos, la reducción de la partícula se realiza por fuerza de impacto, y dado que el bagazo es un material fibroso, al reducir el tamaño, es normal que su partícula tenga apariencia a largada y no uniforme. Esto hace que sea más difícil pasar por una malla, en especial cuando por la acción de la vibración del tamizador, la parte alargada queda ubicada de forma horizontal en la parte posterior del tamiz.

El bagazo de caña de azúcar, seco y molido presentó un tamaño de partícula promedio de 0,85 mm (entre 0,6 – 1,4 mm), en el cual se encuentra el 82% de la muestra. Este tamaño se halla acorde al rango trabajado en las diferentes matrices recopiladas por Uddin et al., (2015), en su estudio de obtención de FE mediante FSC (0,26-1,25 mm); además, en el rango general para productos naturales (0,25-1,80 mm) propuesto por Pereira & Meireles, (2010). Si bien, de acuerdo al trabajo realizado por Del Valle & Uquiche, (2002), sobre el efecto del tamaño de partícula en la extracción por FSC del aceite de las semillas de rosa de mosqueta, se concluye que las partículas con tamaño  $\leq 0,425$  mm, presentan mejores rendimiento de extracción por tener una mayor área superficial que las  $\geq 0,85$  mm compuestas principalmente por segmentos lignificados, se puede decir que todo dependerá de la matriz vegetal empleada para la extracción.

### 1.3.1.2. Ángulo de reposo (AR)

El ángulo de reposo se relaciona con el coeficiente de fricción estática y el ángulo de fricción interno, además indica la cohesividad de un material (Beakawi Al-Hashemi & Baghabra Al-Amoudi, 2018). En este caso, el bagazo de caña de azúcar empleado en la extracción por FSC presentó un ángulo de reposo de  $30^\circ$ , el cual, de acuerdo a la clasificación de fluidez de Car, un material entre  $30-38^\circ$  indican un flujo libre (Barbosa-Cánovas, Ortega-Rivas & Hong Yan, 2005; Beakawi Al-Hashemi & Baghabra Al-Amoudi, 2018). El valor obtenido permite identificar que el bagazo de caña de azúcar no sufrirá ningún proceso de aglomeración durante el tiempo de extracción; esto se debe a que algunos de los factores considerados como componentes potenciales de unión entre partículas secas, como la humedad, azúcares y almidones (De Palma et al., 2019), son bajos.

Comparando el resultado obtenido con otros materiales vegetales tales como las harinas de maíz y de trigo (AR  $30-45^\circ$ ) (Beakawi Al-Hashemi & Baghabra Al-Amoudi, 2018), harina de chalarina (AR  $20,3-37,7^\circ$ ) (Castañeda et al., 2010), harina de arroz, quinoa y lupino (AR de  $33,7^\circ$ ,  $31,3^\circ$  y  $32,3^\circ$ , respectivamente) (Mezquita Cerezal et al., 2011), se puede apreciar su similitud, por lo que incluso el proceso de reducción de tamaño aplicado en este trabajo para la materia prima utilizada, fueron adecuados, mostrando comportamientos similares a las harinas de otros productos.

### 1.3.1.3. Densidad aparente aireada (Da) y empacada (De)

La densidad aparente aireada y empacada del bagazo de caña de azúcar fueron  $97\pm 8 \text{ kg/m}^3$  y  $167\pm 12 \text{ kg/m}^3$ , respectivamente. Los valores obtenidos en este trabajo son diferentes a los reportados por Alarcón et al. (2006), con Da entre  $52-69 \text{ kg/m}^3$ , pero similares para la De entre  $123,3-173,7 \text{ kg/m}^3$ , para el bagazo de caña de azúcar con 10,6% de humedad y tamaño de partícula

entre 0,63-1,59 mm. Por lo que se puede atribuir las ligeras diferencias de  $D_a$  y  $D_e$  en la misma matriz a factores como el tamaño de partícula y la humedad.

Comparando estas densidades con otros productos tales como harinas de arroz, lupino, maíz y quinoa, las  $D_a$  fueron 670, 390, 640 y 460 kg/m<sup>3</sup>, respectivamente; mientras la  $D_e$  de estos mismo productos correspondieron a 740, 450, 750 y 580 kg/m<sup>3</sup> (Mezquita Cerezal et al., 2011). Los valores obtenidos de otros productos en polvo, distan mucho de lo encontrado en este trabajo, sin embargo, esto es posible dado que el bagazo de caña de azúcar es un material fibroso, escasamente denso, lo que conlleva a que la cantidad de material almacenado en el recipiente de extracción, sea mucho menor comparado con otras matrices.

#### **1.3.1.4. Porosidad**

En términos de la porosidad del bagazo de caña de azúcar molido, se obtuvo un valor de 0,42; inferior al obtenido por Alarcón et al., (2006) para este mismo material (porosidad 0,58-0,60). Este valor de porosidad hallado puede considerarse medio, dado que está estrechamente ligado a la forma, el tamaño de las partículas en polvo y su ajuste en un recipiente. El bagazo en cuanto a tamaño y forma de la partícula es heterogéneo, por contar con la presencia de tres componentes predominantes en su composición, celulosa, hemicelulosa y lignina (Cândida Rabelo et al., 2015), los cuales hacen que sea difícil ver procesos de aglomeración entre las partículas, lo que es bueno para el proceso de extracción, ya que no habrá formación de canales fijos, por los que pase el CO<sub>2</sub>.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que una alta porosidad en el lecho de extracción puede reducir el contacto entre el solvente y el componente a ser extraído, causando una pérdida en el rendimiento de extracción (Da Silva et al., 2016), por lo que se vería necesario, recurrir a una mayor reducción de tamaño para generar polvos más finos y así, asegurar menos espacio aireado

entre cada una ellos y lograr un mayor contacto. A pesar de esto, en el proceso de extracción por fluidos supercríticos, el material vegetal se verá sometido a altas presiones, lo que contribuye a reducir la porosidad, considerada como una condición indeseable (Loh et al., 2013).

Para este trabajo, no es necesario que la materia prima cuente con tamaños de partícula más pequeños, para así, reducir parámetros como  $D_p$ ,  $D_e$  y por lo tanto porosidad, ya que es posible que con tamaños más reducidos, haya un proceso de compactación el lecho de extracción debido a la presión, lo que implicaría incrementar la resistencia interna de transferencia de masa y canalización dentro del lecho (Hrabovski et al., 2012).

### ***1.3.2. Extracción de compuestos lipídicos por soxhlet a partir del bagazo de caña de azúcar***

Con el fin de hacer una caracterización inicial en términos de fitoesteroles (FE) presentes en el bagazo caña de azúcar y así conocer la cantidad de estos compuestos recuperados mediante la tecnología de fluidos supercríticos se realizó una extracción por solventes. El resultado obtenido en esta sección es importante, ya que la extracción por soxhlet es considerada un método de referencia con el cual se pueden comparar los otros métodos no convencionales que se empleen.

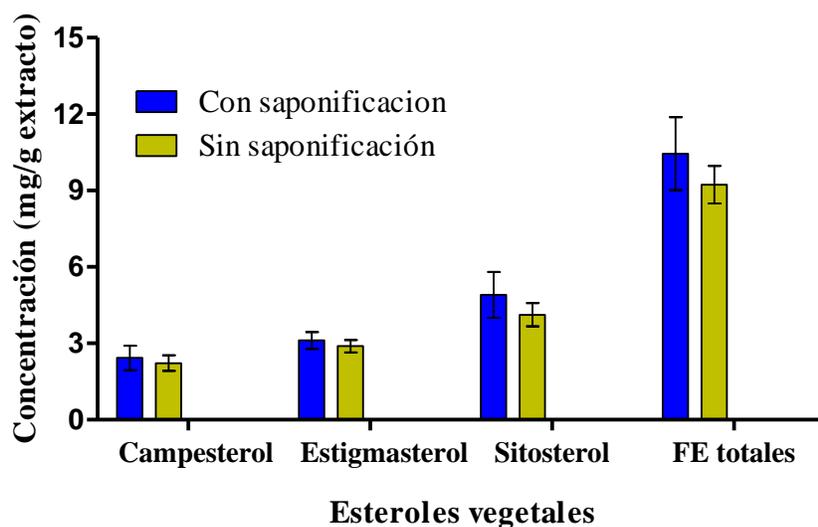
El rendimiento de extracción del bagazo de caña de azúcar obtenido en este trabajo fue de  $1,11 \pm 0,17\%$ , un valor superior al encontrado en el estudio de Attard et al., (2015) para el bagazo de caña de azúcar (0,53%) y cercano al de otros residuos de la caña de azúcar como las hojas (1,6%) y la corteza (0,8%). Otros autores como Del Río et al., (2015) en su estudio de extracción de fitoquímicos lipofílicos a partir del bagazo de caña de azúcar empleando acetona como solvente, presentó un rendimiento de  $0,9 \pm 0,1\%$ , ligeramente inferior al obtenido en este trabajo. Sin embargo, al comparar el rendimientos de extracción con otros subproducto de la caña de azúcar

como la corteza extraída con acetona (1,74%) (Del Río et al., 2015) y con etanol durante 6 horas (4,98%) (Feng, Luo, Zhong, et al., 2014), se pueden determinar que las variaciones de estos resultados reportados por otros autores con respecto a este trabajo, se debe a factores tales como la polaridad del solvente empleado, parte de la planta, tiempo y temperatura de extracción.

### ***1.3.3. Extracción de fitoesteroles con y sin saponificación a partir del bagazo de caña de azúcar***

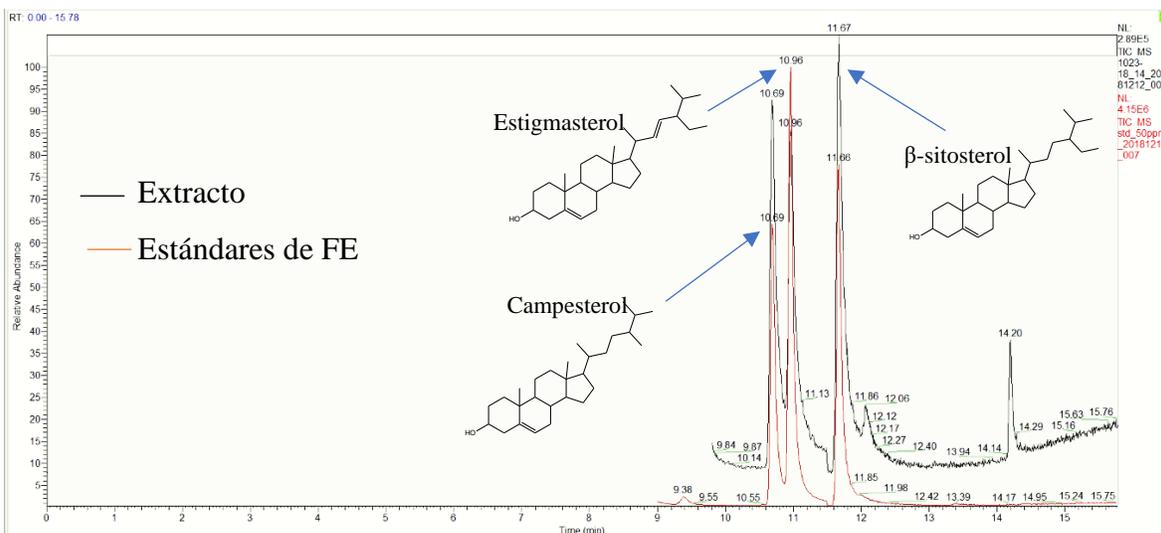
Debido a que los FE en la naturaleza se pueden encontrar de forma libre o esterificada (Ferrer et al., 2017; Valitova et al., 2016) y su proporción dentro de la planta analizada presenta altas variabilidades (Phillips et al., 2002) se hace necesario realizar este análisis, para clasificar si la mayoría de esteroles encontrados en el bagazo de caña de azúcar son esterificados o libres; y así definir metodologías analíticas y de incorporación posterior al alimento.

Por tal razón, en la Figura 5, se muestra el efecto que tiene la saponificación sobre cada uno de los esteroles analizados, encontrando que, al aplicar el ANOVA a los tratamientos con y sin saponificación del extracto obtenido por solventes, no hay diferencias significativas entre estos (valor  $P > 0,05$ ). Además, que la mayoría de FE del bagazo de caña de azúcar empleado en este estudio, están de forma libre y no se hace necesario contar con etapas de saponificación para los análisis posteriores de estos compuestos.



**Figura 5.** Efecto de la saponificación sobre los FE del extracto obtenido por solvente orgánico

La mayor diferencia numérica (pero no estadística) de la cantidad de FE, se aprecia en el  $\beta$ -sitosterol. Por lo que se puede deducir que en el bagazo de caña de azúcar el sitosterol se encuentra en forma esterificada y libre, siendo esta última la más abundante, y el FE mayoritario. Esto es posible identificarlo en la Figura 6, en la cual se logra apreciar un cromatograma típico de la identificación del campesterol, estigmasterol y sitosterol presentes en los extractos obtenidos a partir del bagazo de caña de azúcar, utilizando un GC-MS. Mediante esta identificación se procedió a la cuantificación de FE presentes en las muestras analizadas.

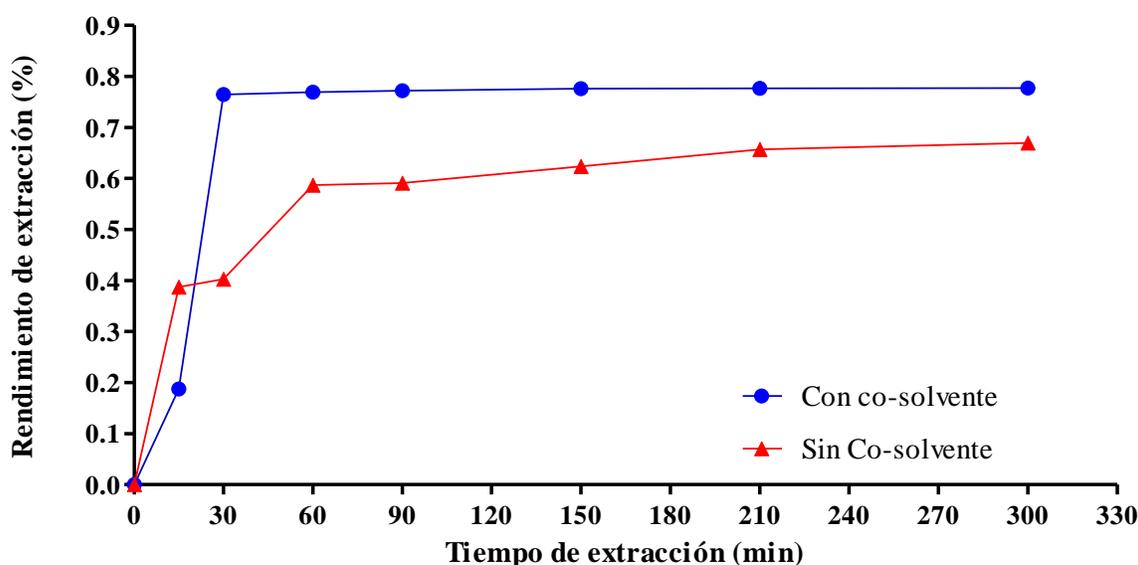


**Figura 6.** Cromatograma de identificación de los FE cuantificados (Estigmasterol, Campesterol y  $\beta$ -Sitosterol) en una solución de mezcla de estándares y en una de las muestras de extracto del bagazo de caña de azúcar analizada.

#### 1.3.4. Cinética de extracción de fitoesteroles a partir del bagazo de caña mediante fluidos supercríticos

En los procesos de extracción por FSC, uno de los parámetros más determinantes para encontrar un punto de equilibrio entre consumo de  $\text{CO}_2$  y la obtención del compuesto de interés es el tiempo. Por esta razón se hace necesario realizar una cinética de extracción de FE antes de continuar con las posteriores extracciones, fijando el tiempo. Además, debido a que los FE son ligeramente polares (grupo hidroxilo en el carbono 3), se desea analizar si se presentan cambios en el proceso de extracción, con y sin adición de cosolventes como etanol, ya que se ha reportado que la incorporación de un modificador favorece la extracción de compuestos lipídicos (Feng, Luo, Zhong, et al., 2014), en especial los FE como lo muestra Martins, De Melo, & Silva, (2016), a partir de la planta lirio acuático.

De forma general, las cinéticas de extracción se caracterizan por la presencia de tres períodos: un periodo de extracción a velocidad constante (CER- por sus siglas en ingles Constant Extraction Rate), uno de extracción a velocidad descendiente (FER- Por sus siglas en inglés, Falling Extraction Rate) y otro de velocidad baja o controlada por difusión (LER- Por sus siglas en ingles Low Extraction Rate, o DC- por sus siglas en ingles Diffusion-Controlled ) (Da Silva et al., 2015; Pereira & Meireles, 2010). Estos periodos, pueden ser visualizados en la Figura 7, en la que se aprecian dos curvas de extracción de FE a partir del bagazo de caña de azúcar, con y sin cosolvente a diferentes tiempos y su efecto sobre el rendimiento de extracción.



**Figura 7.** Cinéticas de rendimiento de extracción de lípidos presentes en el bagazo de caña de azúcar, mediante FSC a 200 bar, 40°C, sin y con cosolvente (5% etanol).

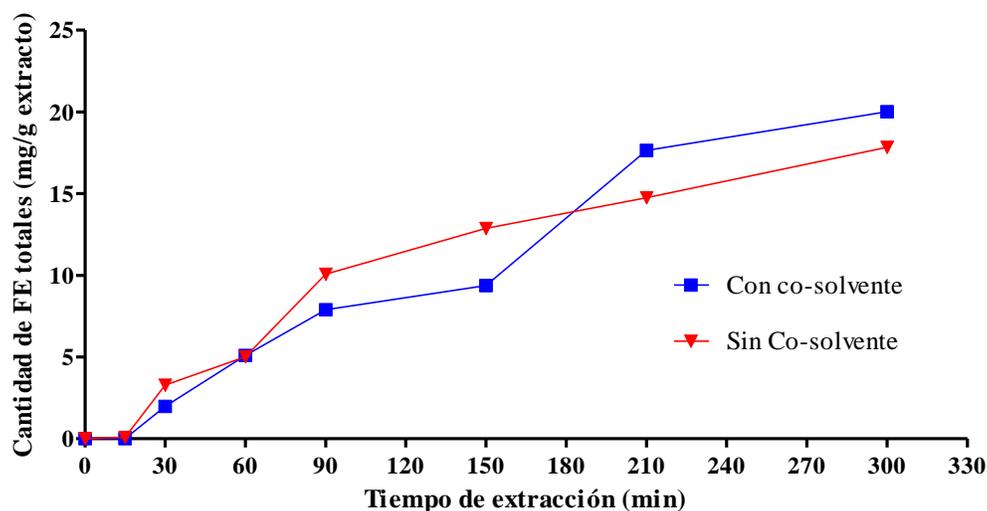
De acuerdo a la Figura 7, el periodo CER ocurre antes de la 1 hora de extracción, en la cual la mayoría de los analitos que están presentes en la superficie son extraídos (esto sucede debido a las células rotas del material vegetal después de la molienda). Por su parte, en el periodo FER, el cual es mucho más corto, se puede apreciar mejor en la cinética de extracción sin solvente; esta etapa

está regida por un equilibrio entre la solubilidad y la difusividad de los compuestos. Por último, se visualiza el periodo LER es cual es mucho más largo y continúa hasta finalizar las 5 horas.

La mayoría de los compuestos lipofílicos extraídos a partir del bagazo de caña de azúcar, se encontraron entre los 30 y 60 minutos para las muestras con y sin cosolvente respectivamente, en los que la transferencia de masa es debido a la solubilidad del extracto con el CO<sub>2</sub>. Varios autores reportan que en el período CER, se extrae entre el 50 al 90% de la cantidad total del extracto y muchos procesos de extracción finalizan después de este periodo (Pereira & Meireles, 2010). Sin embargo, ya que los FE se encuentran principalmente en la membrana celular, y son componentes de medio-alto peso molecular, se hace necesario continuar con el proceso de extracción para obtenerlos de formas mas selectiva. Según Pereira & Meireles, (2010), la extracción finaliza después del periodo CER, excepto en los casos donde un compuesto específico no sea muy soluble en el solvente o esté localizado en las estructuras celulares lo cual es mucho más difícil para acceder al solvente.

Por otra parte, en la Figura 8, se observan las curvas de extracción de FE a partir del bagazo de caña de azúcar a condiciones de presión y temperatura constante variando entre ellas la adición o no de cosolvente. La extracción de FE en ambas curvas con y sin etanol presenta un comportamiento similar, desde el minuto 30 de la extracción, los FE empiezan a aparecer en ambas curvas lo cual significa que antes de ese tiempo el rendimiento de extracción se debía a la obtención de compuestos de bajo peso molecular. Hasta el min 150, la extracción de FE fue favorecida por la ausencia de etanol, sin embargo, después del minuto 180 la adición de etanol favorece la extracción de FE. Esto último, puede ser explicado debido a que el grupo hidroxilo de los FE libres, puede interaccionar mucho mejor con la mezcla etanol:CO<sub>2</sub>, que solo con el CO<sub>2</sub>, por lo que la

adición de cosolventes favorece la extracción de este tipo de compuestos lipídicos (Feng, Luo, Zhong, et al., 2014), tal como es analizado por Martins et al., (2016), en su estudio de extracción de FE a partir de la planta lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).



**Figura 8.** Cinética de extracción de FE (campesterol, estigmasterol y sitosterol) a partir del bagazo de caña de azúcar, mediante la FSC a 200 bar, 40°C, sin y con cosolvente (etanol 5%).

Es así, como comparando la Figura 7 y Figura 8, es posible observar que los FE no son extraídos durante el período CER, en la cual la transferencia de masa ocurre principalmente por convección, si no principalmente en los períodos FER y LER, etapas caracterizadas por un proceso de transferencia de masa por difusión los cuales son más largos y dan un proceso de extracción a menor velocidad que en el período CER. Además, la presencia de cosolventes como etanol mejora tanto el rendimiento de extracción, como el contenido total de FE, por lo que, al hacer un balance entre el rendimiento total y la obtención de FE, se considera que el tiempo de extracción óptimo en este estudio corresponde a 210 min, tiempo donde el rendimiento de extracción se hace ligeramente constante y el incremento en la cantidad de FE extraídos comienza a detenerse.

### ***1.3.5. Determinación de parámetros de extracción sobre el rendimiento de extracción y los fitoesteroles totales.***

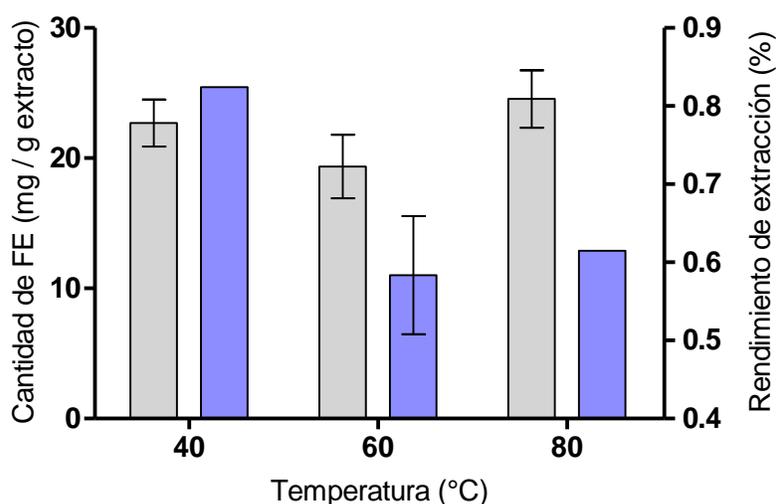
#### **1.3.5.1. Efecto de la temperatura.**

La temperatura es uno de los parámetros que brinda las características a los fluidos supercríticos y pequeños cambios en esta, después de su temperatura crítica, afectan la densidad, difusividad y viscosidad del fluido (Berk, 2013; Uddin et al., 2015), influyendo así, sobre el rendimiento de extracción y la selectividad de un compuesto.

A una presión constante de 300 bar, sin adición de cosolvente y durante 3,5 horas de extracción, se evaluó el efecto de las temperaturas de 40, 60 y 80 °C sobre el rendimiento de extracción y los FE totales (Figura 9). Con respecto a la cantidad de FE obtenida por la variación de la temperatura (Figura 9), esta estuvo en el rango de 17,6 – 25,3 mg/g extracto; en este caso, las altas temperaturas mejora la extracción de FE, esto se debe a que la difusividad aumenta con la temperatura (Uddin et al., 2015), causando que la transferencia de FE propiamente desde las membranas celulares del material vegetal sea mucho mejor. La cantidad de FE obtenidos en nuestro estudio fue más alto que el encontrado en otras matrices extraídas por esta misma tecnología, como en el polen de la flor de Lotus (7,81 mg/g a 300 bar y 50 °C) (Xu et al., 2011), las semillas de melón de Kalahari (6,65-7,83 mg/g a 300 bar y con variación de temperatura) (Nyam et al., 2011), semillas de rosella (4,55- 8,12 mg/g a 300 bar y diferentes temperaturas) (Nyam et al., 2010), entre otras; considerando el bagazo de caña de azúcar un subproducto de la industria azucarera, como una materia prima promisoría para la extracción de compuestos tales como los FE .

A pesar que la temperatura mejora la extracción de FE, algunos autores como Martins et al., (2016), Xu et al., (2011) y Nyam, Tan, Lai, Long, et al., (2011), sugieren el uso de temperaturas

bajas con el fin de evitar la degradación de otros compuestos que se encuentran dentro de la matriz; además las variaciones de temperatura normalmente no tienen una influencia significativa en el proceso de extracción de compuestos minoritarios como los FE, tal y como se aprecia también en este estudio, ya que se encuentran ligeras diferencias en la cantidad de FE extraídos pero no son significativas estadísticamente.



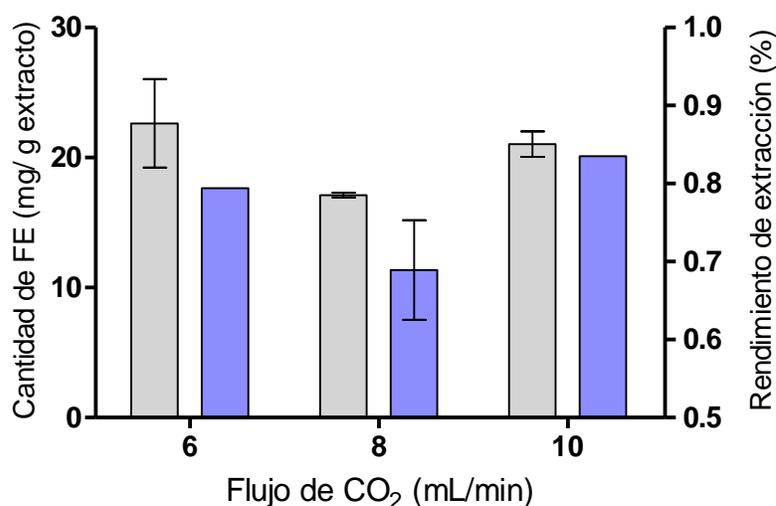
**Figura 9.** Efecto de la temperatura sobre la cantidad de FE extraídos del bagazo de caña de azúcar (■) y el rendimiento de extracción (■)

Con respecto al rendimiento de extracción, este se encuentra entre el 0,53 - 0,82% (Figura 9), siendo la temperatura más baja (40 °C) la de mayor rendimiento. Este comportamiento es similar al estudio realizado por Xu et al., (2011) en la extracción de FE a partir del polen de la flor de Lotus, a una presión constante (300 bar) y variando la temperatura, en el cual el rendimiento de extracción disminuía con el incremento de temperatura. Este efecto se debe a que al aumentar la temperatura, la densidad del CO<sub>2</sub> disminuye, así como su poder solvatación y solubilidad con el extracto (Uddin et al., 2015).

A la temperatura de 60°C, es posible observar la desviación en el proceso de extracción, el cual se puede deber a la heterogeneidad del material vegetal molido (el polvo obtenido no fue homogéneo, teniendo en algunas partes aún más porción celulósica que grasa) y a la cantidad de muestra para hacer la extracción, ya que entre menos cantidad de muestra se requiera para un proceso, más notorias serán las diferencias a las mismas condiciones. Esto nos permite inducir que a pesar de que el material vegetal a extraer sea molido se requiere de una rigurosa etapa de mezclado, para asegurar que las desviaciones del proceso no sean tan evidentes.

### 1.3.5.2. Efecto del flujo de CO<sub>2</sub> sobre el proceso de extracción

El flujo de CO<sub>2</sub> es una variable que no influye sobre los parámetros termodinámicos del solvente pero sí sobre la transferencia de masa convectiva, así como en los rendimientos de extracción (De Melo et al., 2014). La Figura 10, muestra el efecto del flujo del solvente (6, 8 y 10 mL/min) sobre la cantidad de FE y el rendimiento de extracción a los tres niveles evaluados.



**Figura 10.** Efecto del flujo de CO<sub>2</sub> sobre la cantidad de FE extraídos del bagazo de caña de azúcar (■) y el rendimiento de extracción (■).

El contenido total de FE estuvo entre 13,99 - 28,22 mg/g extracto, (Figura 10), valores superiores a los encontrados por otros autores como Dąbrowski et al., (2019), los cuales extrajeron a partir de las semillas de linaza a 45°C durante 4 h y variando el flujo de CO<sub>2</sub> entre 6-12 mL/min, obteniendo una cantidad de FE entre 4,72-7,55 mg/g de aceite; y Nyam et al., (2010) en la extracción de estos compuestos a partir de semillas de rosella, con la variación del flujo (10, 15 y 20 mL/min) alcanzando cantidades de FE de 5,0 – 5,30 mg/g de extracto. En nuestro caso a un flujo de 6mL/min, la cantidad de FE fue de 20,22 mg/g extracto, la mayor cantidad de esteroides vegetales extraídos, debido a que, a menor flujo, se presenta mayor interacción entre el solvente empleado y los analitos de interés.

Por otra parte, el rendimiento de extracción con la variación del flujo de CO<sub>2</sub>, estuvo entre 0,64-0,83% (Figura 10), valores similares a los encontrados en este estudio con el cambio de las temperaturas. Los altos flujos del solvente favorecen el rendimiento de extracción, dado que el periodo CER puede ser acelerado al agotar el extracto que se encuentra en la superficie de la partícula más rápido y teniendo tiempos más largos en los otros períodos de extracción que dependen de la difusión.

De acuerdo a la Figura 10, no hay correlación entre los flujos altos y bajos de CO<sub>2</sub> sobre las variables de rendimiento de extracción y cantidad de FE totales; ya que los valores extremos favorecen esas respuestas, mientras que los intermedios dan una menor respuesta. Este comportamiento es reportado por otros autores, en el que los niveles intermedios de flujo de CO<sub>2</sub> fue el menos adecuado y la variación en este parámetro sólo produce ligeros cambios en los FE (Dąbrowski et al., 2019; Nyam et al., 2010). Aunque los valores obtenidos de las variables respuesta analizadas son ligeramente diferentes, estos no presentan diferencias significativas, por

lo que el trabajar con un flujo de 6mL/min, puede ser adecuado por presentar mayor viabilidad económica especialmente para procesos industriales.

### ***1.3.6. Extracción por fluidos supercríticos de fitoesteroles (presión y cosolvente)***

El diseño de experimentos fue realizado en los rangos de 200 - 300 bar y de 0 a 10% de cosolvente (etanol). Los otros parámetros como tiempo, temperatura y flujo de CO<sub>2</sub>, se mantuvieron constantes, según lo encontrado en los análisis previos (3,5 h, 40°C y 6mL/min, respectivamente). En la Figura 11, se muestran los extractos del bagazo de caña de azúcar (organizados de izquierda a derecha según las condiciones del diseño de experimentos propuesto) antes de ser analizados en el GC-MS. En la Tabla 5, se resumen los resultados obtenidos del proceso de extracción, para cada una de las condiciones evaluadas.

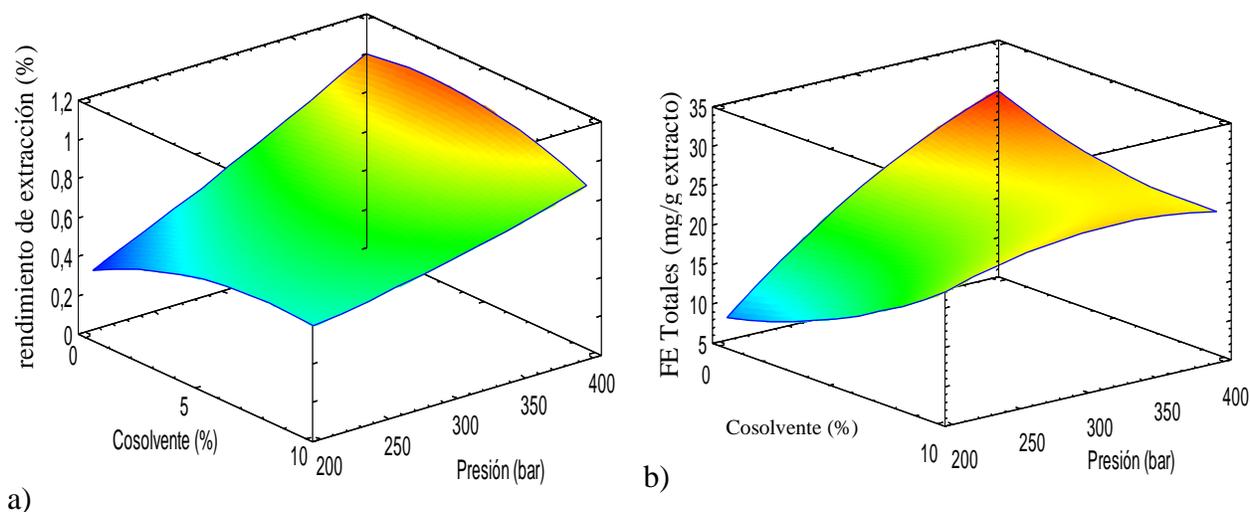


**Figura 11.** Extractos obtenidos del diseño de experimentos reconstituidos con cloroformo

**Tabla 5.** Diseño de experimentos para la extracción de FE por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar

Presión (Bar)	Cosolvente (%)	Rendimiento de extracción (% p/p)	Campesterol (mg/g extracto)	Estigmasterol (mg/g extracto)	Sitosterol (mg/g extracto)	FE totales (mg/g extracto)	FE totales (mg/100g bagazo)
200	0	0,369	2,821	3,336	4,583	10,740	3,960
300	5	0,721	5,290	6,876	12,168	24,333	17,542
300	10	0,636	6,221	7,877	13,927	28,024	17,819
400	10	0,820	4,794	6,181	10,938	21,913	17,966
300	0	0,734	3,742	4,735	8,583	17,059	12,525
300	0	0,835	3,966	5,025	9,953	18,943	15,809
400	5	1,193	5,347	6,863	12,689	24,900	29,714
200	5	0,413	3,130	3,716	5,185	12,030	4,971
400	0	0,916	6,423	8,361	16,091	30,875	28,275
300	5	0,674	5,011	6,309	12,498	22,369	16,644
200	10	0,662	4,511	5,586	10,195	20,292	13,436
300	5	0,824	4,537	5,681	10,002	20,221	16,666

El rendimiento de extracción del bagazo de la caña de azúcar estuvo entre el rango de 0,37 – 1,19% correspondiendo a las condiciones de 200 bar sin cosolvente y 400 bar con 5% etanol respectivamente. Las altas presiones mejoran el rendimiento de extracción (Figura 12a), ya que un aumento en esta variable permite que la solubilidad del extracto en CO<sub>2</sub> sea mucho más favorable (Xu et al., 2011) y la densidad aumente, interactuando mejor con todo el material vegetal que está en el reservorio. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por Martins et al., (2016), en el que los rendimientos más bajos correspondieron a presiones bajas (0,72%) bajo las mismas condiciones de nuestro estudio (200 bar y 0% etanol).



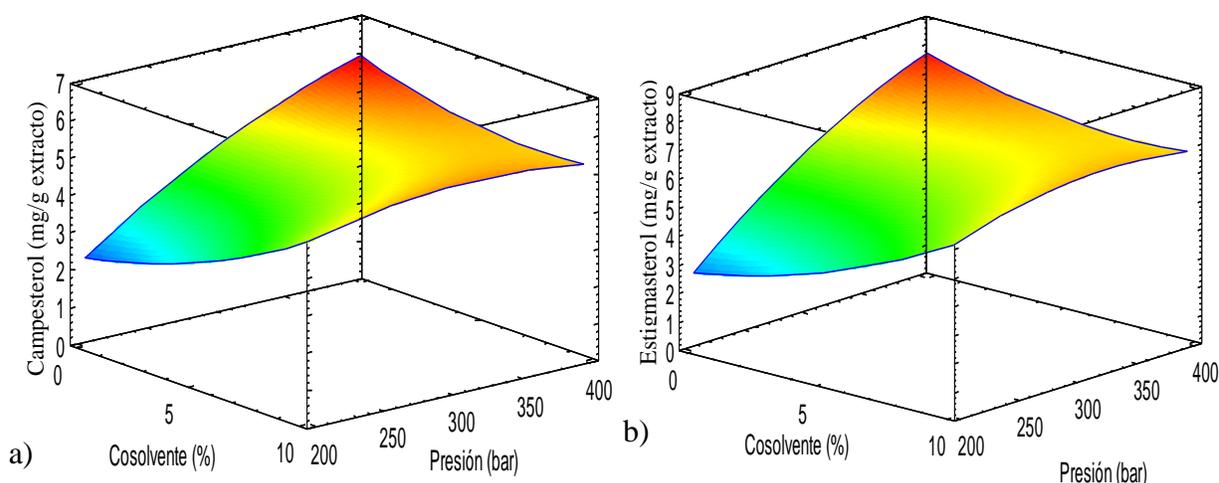
**Figura 12.** Superficies de respuesta del efecto de la presión (bar) y cantidad de cosolvente (% etanol) sobre a) rendimiento de extracción y b) cantidad de FE totales obtenidos del bagazo de caña de azúcar

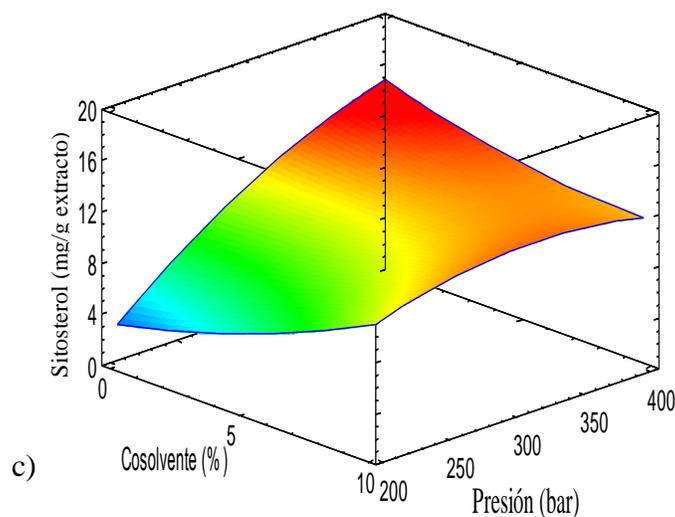
Con respecto al cosolvente, la adición de etanol no presenta un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción a nivel general. Sin embargo, a baja presión con el aumento de cosolvente, se observan ligeros incrementos sobre el rendimiento de extracción pero en altas presiones, este comportamiento es inverso; este efecto es similar al ocurrido en el estudio de Martins et al., (2016) en el que encontraron que los altos rendimientos de extracción correspondieron a las mayores presiones y niveles de etanol evaluados (300 bar y 5% etanol) (Martins, De Melo, Sarmento, et al., 2016) en nuestro caso el 5% de etanol y 400 bar fue la mejor condición de extracción.

En cuanto al contenido total de FE obtenidos del bagazo de caña de azúcar, los valores se encontraron en el rango de 10,74 a 30,87 mg/g extracto, correspondiente a las condiciones de 200 bar 0% etanol y 400 bar y 0% etanol, respectivamente. El contenido de FE obtenido por la tecnología de FSC, concentró aproximadamente tres veces el contenido de FE encontrado por el

método convencional de extracción con solvente, esto permite confirmar que, en este estudio, la extracción por FSC, es más selectiva que la convencional.

Por otra parte, en la Figura 12b es evidente el efecto positivo del cosolvente a bajas presiones proponiendo que la adición del cosolvente influye ligeramente, sobre la cantidad de FE extraídos; esto se debe a que el poder de disolución del CO<sub>2</sub> en estado supercrítico aumenta por adición de pequeñas cantidades de cosolvente, modificando su polaridad y aumentando la solubilidad de las sustancias más polares (Berk, 2013), tal como los FE en su forma libre. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que las altas densidades son necesarias para la extracción de compuestos grandes, ligeramente polares y poco volátiles (Ahmad et al., 2019) y esto puede ser logrado aumentando la proporción de etanol en el CO<sub>2</sub>, pero en este estudio, ese comportamiento no fue detectado en la extracción de FE a partir del bagazo de caña de azúcar ya que a altas presiones y alto contenido de etanol, las cantidades de FE extraídos fue reducido. Esto sucede ya que, al aumentar la densidad del CO<sub>2</sub> durante el proceso de extracción, otros compuestos de mayor peso molecular que los FE son separados selectivamente, reduciendo así la concentración de los analitos de interés.





**Figura 13.** Superficies de respuesta de la cantidad de FE individuales obtenidos por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar; a) Campesterol, b) Estigmasterol y c) Sitosterol en mg/g de extracto

El comportamiento de cada uno de los FE analizados, campesterol, estigmasterol y sitosterol, se muestran en las Figura 13a, Figura 13b y Figura 13c, respectivamente. El contenido de campesterol estuvo entre 2,82 - 6,42 mg/g, estigmasterol 3,34 - 8,36 mg/g y sitosterol en 4,58 a 16,09 mg/g de extracto. En todos los esteroides vegetales evaluados, la mejor condición de extracción fue a 400bar y 0% etanol, mientras la menos recomendada correspondió a 200 bar y 0% etanol. A nivel general, las condiciones menos recomendadas para extracción de FE son las bajas presiones, sin embargo es posible mostrar que se presenta un aumento significativo tras la adición de cosolvente, esto puede ser debido al incremento de la solubilidad particularmente de compuestos más polares (Sapkale et al., 2010; Uddin et al., 2015). Sin embargo este efecto no es detectado a altas presiones, donde la adición de etanol tiene un efecto negativo sobre los FE, lo cual se puede ser explicado por el estudio de Martins et al., (2016), quien al adicionar 5% de cosolvente, pudo determinar que la solubilidad de compuestos polares son significativamente incrementados, pero la concentración de FE es reducida.

También se observa que los tres FE analizados muestran alta afinidad a la adición de etanol a baja presión, siendo el sitosterol el compuesto mayormente extraído, seguido por el estigmasterol y finalmente el campesterol. La composición de FE en los extractos obtenidos, describe ligeras variaciones entre los porcentajes de estos, el sitosterol fue el más abundante (42,67-55,87%), luego estigmasterol (26,52-30,88%) y campesterol (20,80-26,01%), participación similar a la presentada por varios autores (Attard et al., 2015; Feng, Luo, Zhang, et al., 2014; Feng, Luo, Zhong, et al., 2014; Georges et al., 2006) para la caña de azúcar.

Aunque algunos estudios reportan que la adición del 5% de etanol en los procesos de extracción para matrices como el aceite de canola y el lirio acuático, mejora la extracción de FE (Jafarian Asl et al., 2020; Martins, De Melo, Sarmiento, et al., 2016), en este estudio no es posible concluir este comportamiento en todas las presiones evaluadas, eso puede también deberse al tipo de matriz usada en este estudio. El bagazo de caña de azúcar es caracterizado por ser una matriz con poca cantidad de grasa, alto contenido en azúcar y fibra (Loh et al., 2013), por lo que la adición de etanol dentro de la extracción, permite una interacción mediante puentes de hidrógeno, formación de complejos de transferencia de carga y uniones dipolo-dipolo, impactando así la solubilidad positivamente (Ahmad et al., 2019), de los otros compuestos que forman la matriz y no de los FE propiamente.

### ***1.3.7. Optimización del rendimiento de extracción y cantidad de fitoesteroles***

La optimización para la extracción por FSC de FE a partir del bagazo de caña de azúcar, permitió encontrar los mejores niveles de presión y cosolvente para maximizar el rendimiento de

extracción (%) y los FE totales (campesterol, estigmasterol y sitosterol) en mg/g de extracto, mediante la función deseabilidad.

Las condiciones de extracción óptimas corresponden a presión 400 bar y sin adición de cosolvente (valor óptimo de la función deseabilidad 0,92), con un rendimiento de extracción de  $0,92 \pm 0,09$  % y  $30,87 \pm 2,21$  mg de FE totales/ g extracto. Attard et al., (2015) a sus condiciones de extracción (350 bar, 50 ° C, 0% etanol y 4 h) extrajo 50 mg de FE/ g extracto a partir del bagazo de caña de azúcar (cultivado en Brasil), un valor mayor que al obtenido en este estudio; estas diferencias pueden ser explicadas por condiciones climáticas y agronómicas entre los cultivos, ya que la cantidad de FE cambia con la variedad de la planta y las condiciones de estrés abiótico (Rogowska & Szakiel, 2020). Por otra parte, al comparar nuestro estudio con la cantidad de FE obtenidos en otros trabajos se encuentran que Del Río et al., (2015), reportó 4,44 mg / g extracto a partir del bagazo de azúcar con extracción con acetona, Asikin et al., (2012) 2,37 - 3,33mg/ g extracto a partir de la corteza y anillo de la caña de azúcar extraídos con hexano:metanol y Feng et al., (2014) 13,50 mg/g extracto a partir de la corteza de la caña de azúcar extraídos con etanol. Los valores encontrados en nuestro estudio fueron mayores con respecto a estos últimos autores estas diferencias son posibles debido a factores como parte de la caña de azúcar, método de extracción empleado, condiciones climáticas y solventes empleados, por mencionar algunos.

Con respecto a otras matrices como semillas de rosella (4,97 mg/ g de aceite) (Nyam et al., 2010), aceite de salvado de arroz (8,78 – 11,21 mg / g)(Mingyai et al., 2018), semillas de tomate (20,30 mg/g aceite) (Eller et al., 2010), aceite de semilla de kenaf (6,37mg/g) (Mariod, Matthäus, e Ismail 2011) extraídas por la tecnología de FSC , para la obtención de FE, se encuentra una

mayor cantidad que estas, con lo que se puede proponer que el bagazo de caña de azúcar es una buena fuente para obtener metabolitos secundarios como los FE.

### ***1.3.8. Composición química del bagazo de caña de azúcar obtenido por fluidos supercríticos.***

La Tabla 6, muestra la caracterización lipídica del extracto obtenido a las condiciones óptimas de extracción. Se identifica que el principal grupo de componentes del extracto son los ácidos grasos (saturados e insaturados), en ácidos grasos insaturados, los compuestos de mayor participación corresponden al ácido linoleico y oleico. La presencia de estos ácidos grasos dentro del extracto tiene un gran interés en la promoción cardiovascular de la salud debido a su función antioxidante y efectos de reducción de colesterol. La cantidad de ácidos grasos insaturados presentes en este estudio fue mayor que los reportados por Attard et al., (2015) y Del Río et al., (2015) en los que se presentaron cantidades casi despreciables. Por su parte los ácidos grasos saturados fueron encontrados en menores proporciones que los insaturados y siendo los ácidos hexadecanoico octadecanoico y eicosanoico los mayoritarios, y también encontrados en otros estudios de componentes lipídicos del bagazo de caña de azúcar (Attard et al., 2015; Del Río et al., 2015), sin embargo, la presencia de los ácidos octacosanoico y triacontanoico que fueron relevantes en otras investigaciones, no fueron detectados en este estudio.

**Tabla 6.** Caracterización del extracto de bagazo de caña de azúcar obtenido por FSC

Clasificación/Compuesto	Sinónimo	Fórmula química	Área	% Área
<b>Ácidos grasos saturados</b>				
Ácido Octanoico	Ácido caprílico	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	631870	21,80
Ácido Nonanoico	Ácido pelargónico	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	886793	
Ácido Undecanoico	Ácido undecílico	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	693900	
Ácido Dodecanoico	Ácido laurico	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	3621509	
Ácido Tetradecanoico	Ácido mirístico	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	4117495	
Ácido Pentadecanoico	Ácido pentadecílico	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	5337689	
Ácido Hexadecanoico	Ácido palmitico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	130231688	
Ácido Heptadecanoico	Ácido margárico	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	4615711	
Ácido Octadecanoico	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	83986999	
Ácido Eicosanoico	Ácido araquídico	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	14915269	
Ácido Docosanoico	Ácido behénico	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	4705061	
Ácido Tetracosanoico	Ácido lignocérico	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	5600866	
<b>Ácidos Grasos Insaturados</b>				
Ácido Hexadecenoico	Ácido palmitoleico	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	15010492	65,38
Ácido Heptadecenoico	Ácido margaroleico	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2630326	
Acido 9- Octadecenoico	Ácido oleico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	49981554	
Ácido 9,12-Octadecadienoico	Ácido linoleico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	706938261	
Ácido Nonandecenoico		C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3296014	
<b>Ácidos grasos di-carboxílicos</b>				
Ácido Nonanedioico	Ácido azelaico	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	1817806	0,25
Ácido Decanedioico	Ácido sebácico	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	1100668	
<b>Policosanoles</b>				
Hexadecanol	alcohol palmitílico	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	13641071	7,26
Octadecanol	alcohol estearílico	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	2162528	
1-nonadecanol	alcohol nonadecílico	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O	5775320	
Eicosanol	alcohol araquidílico	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O	12034620	
Docosanol	-	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	5779692	
Tetraconasol	-	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	2110165	
Hexacosanol	-	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O	4417336	
Octacosanol	Alcohol octacosanólico	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	40477827	

<b>Aldehídos</b>				
Hexadecanal	Palmitaldehido	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O	13094983	2,26
Docosanal	Docosil aldehido	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	1999906	
Tetracosanal		C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O	532696	
Hexacosanal	Ceraldehido	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O	3192728	
Octacosanal	Montanaldehido	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> O	7235217	
Triacontanal		C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O	833155	
<b>Fitoesteroles</b>				2,96
Campesterol	Campest-5-en-3-beta-ol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	7593798	
Estigmasterol	Estigmasta-5,22-dien-3-beta-ol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	9474981	
β-Sitosterol	Estigmast-5-en-3-beta-ol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	18154412	0,09
<b>Cetonas esteroides</b>				
Stigmast-4-en-3-ona	Sitostenona	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	1070553	

Otro de los compuestos predominantes en el extracto fueron los policosanoles, con una participación del 7,25%, valor que se encuentra entre el rango reportado en la revisión de Singh et al., (2015) de 2,5 a 80% sobre el perfil fitoquímico de la caña de azúcar. El octacosanol es el principal policosanol de la caña de azúcar, en el estudio de Asikin et al., (2012) su participación estuvo entre 50 al 80% dentro de este grupo. Es de destacar, que los policosanoles son ampliamente buscados, ya que tienen varias aplicaciones potenciales y la más notable es la prevención y el tratamiento de varias condiciones relacionadas al sistema cardiovascular (Attard et al., 2015), demostrando efectos antihipercolesterolemicos y actividad antitrombótica (Singh et al., 2015).

En general la composición del extracto obtenido en este trabajo difiere un poco al reportado por otros autores con respecto a la participación de diferentes grupos de compuestos. En el caso del estudio presentado Attard et al., (2015), en la extracción de bagazo por FSC (50 °C, 350 bar, flujo de 40g/min durante 4 horas) se identificaron ácidos grasos (11%), alcoholes (29,4%), aldehídos (41,2%) y fitoesteroles (7,3%). Sin embargo la composición de los principales lípidos identificados

en el extracto de acetona del bagazo de caña de azúcar por Del Río et al., (2015), fueron dominados por aldehídos (48%) y alcoholes grasos (23%) con menores cantidades de ácidos grasos (10%) y cetonas esteroides (14%). El contenido de los compuestos, varía dependiendo del solvente empleado, condiciones ambientales, del cultivo (variedad, ubicación, tiempo de cosecha, temporada de cultivo y cosecha)(Del Río et al., 2015) y método de extracción.

#### 1.4. Conclusiones parciales

La caracterización inicial del bagazo de caña de azúcar seco y molido, presentó un tamaño de partícula promedio de 0,85 mm; ángulo de reposo de 30° y porosidad 0,42, lo que determina que este material no presenta propiedades de aglomeración y cohesividad, teniendo adecuado comportamiento para el proceso de extracción por FSC.

Al realizar el proceso de saponificación se encuentra que, las diferencias entre la cantidad de FE de formas libre y esterificada ( $9,23 \pm 0,74$  y  $10,45 \pm 1,43$  mg/g, respectivamente) del bagazo de la caña de azúcar no son significativas, por lo que el extracto es tratado como una fuente de FE en forma libre, omitiendo etapas de saponificación para la cuantificación de FE.

De los parámetros analizados para la extracción por FSC, se plantea que el tiempo de extracción de 210 min (3,5 h), es apropiado para un equilibrio entre el rendimiento de extracción y la cantidad de FE extraídos; además, tanto la temperatura como el flujo de CO<sub>2</sub> no afectaron de manera significativa las variables respuesta de este estudio.

El uso de cosolvente, mostró tener un efecto positivo sobre los FE (individuales y totales), solo a las bajas presiones estudiadas (200bar); ya que a la mayor presión (400 bar), el etanol, tuvo un comportamiento negativo, reduciendo la selectividad de los mismos.

La interesante composición química del extracto obtenido por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar (FE, policosanoles y ácidos grasos insaturados), lo hace una fuente promisoría para la salud cardiovascular; además, dada la abundancia del subproducto, su bajo costo como materia prima y propiedades encontradas, puede ser usado como ingrediente de valor añadido en las industrias cosmética, farmacéutica y de alimentos.

## 2. ENCAPSULACIÓN DE FITOESTEROLES

### 2.1. Marco Teórico

#### 2.1.1. *Solubilización de fitoesteroles*

Los esteroides vegetales (fitoesteroides), se encuentran en todas las plantas y productos vegetales, su mayor concentración se halla en aceites y sus derivados (Lin et al., 2016), pero la importancia de su estudio radica en los beneficios en la salud que han sido demostrados con evidencias epidemiológicas, y el principal está relacionado a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que un consumo de 0,5-3 g/día de FE permite disminuir entre el 8-15% el colesterol LDL en las personas (Ferguson et al., 2016; Katan et al., 2003; Köhler et al., 2017; Ras et al., 2013; Rocha et al., 2016).

A pesar que los FE, presentan propiedades en la reducción de la absorción del colesterol, su uso en diferentes matrices ha sido limitado por sus altos puntos de fusión, baja solubilidad y un sabor cálcico (Chaudhari et al., 2014; Izadi et al., 2012; Meng et al., 2012; Tolve et al., 2019) afectando no solo las características organolépticas del producto final (Vaikousi et al., 2007), sino también restringiendo su adecuada funcionalidad en el organismo ya que la estructura cristalina de los FE (en forma libre)(Bernal et al., 1940; Izadi et al., 2012; Ostlund, 2004), reduce su solubilidad en medio gastrointestinal y por ende su biodisponibilidad (McClements, 2012).

Algunas estrategias empleadas para mejorar la solubilidad de los FE en diferentes matrices se apoya en procesos de esterificación, lo que reduce su punto de fusión y aumenta la solubilidad en aceites (Chaudhari et al., 2014; Morán-Valero et al., 2012); molienda, la cual reduce el tamaño de los cristales y mejora su dispersión (Perlman, 2009) y encapsulación (Di Battista, Ramírez-Rigo, & Piña 2018; Comunian & Favaro-Trindade 2016; Tolve et al. 2020). En estos dos últimos

procesos, los cambios físicos de los FE libres afectan su estructura, haciéndolos amorfos y/o rompiendo la cristalinidad. Algunos autores citados en el VII Congreso Argentino de Ingeniería Química por Di-Battista et al., (2013) indican que cuando las formulaciones en polvo de FE poseen tamaños  $< 50 \mu\text{m}$  no otorgan sensación arenosa en el paladar, además cuando son  $< 25 \mu\text{m}$  favorecen la absorción en las micelas intestinales.

### ***2.1.2. Técnicas de encapsulación***

El principal objetivo de la encapsulación en tecnología de los alimentos es proteger compuestos sensibles de la humedad, oxidación, temperaturas o a condiciones extremas durante el procesamiento, con el fin de mejorar su vida útil (Fang & Bhandari, 2010), controlar la liberación de compuestos activos (Gonnet et al., 2010), enmascarar diferentes atributos, como sabores indeseables, contribuyendo con la calidad organoléptica y funcional (Santos & Meireles, 2010, Nedovic, Kalusevic, Manojlovic, Petrovic, & Bugarski, 2013) y/o mejorar la solubilidad de diferentes ingredientes, los cuales debido a su estructura cristalina, no son dispersables fácilmente en algunas matrices (Dima et al., 2015; McClements, 2012). Entre las diferentes técnicas para encapsular se encuentran secado por atomización, gelación iónica, coacervación, complejos (Comunian & Favaro-Trindade, 2016), liposomas y emulsificación, entre otras (Parra Huertas, 2010); un breve compendio se presenta en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Métodos de encapsulación más comunes, ventajas y desventajas de su uso

Métodos de encapsulación	Agentes encapsulantes	Principio activo	Factores a tener en cuenta	Ventajas	Desventajas	Referencias
Secado por aspersión	Gomas (goma arábica), almidones modificados o hidrolizados y proteínas (gelatina)	Polifenoles, aceites, proteínas, carotenoides, probióticos, sabores, olores	Temperaturas, condiciones de operación del equipo, emulsiones, relación principio activo: encapsulantes	Rápido Bajo costo de operación Aumento de la vida útil del producto Fácil de operar y escalar Control de forma y tamaño	Compuesto a encapsular en la superficie, haciéndolo susceptible a la degradación Costo del equipo	(Celli et al., 2015; Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi et al., 2013)
Enfriamiento por aspersión	Basados en lípidos (sólidos o líquidos)	Vitaminas, proteínas, probióticos	Parámetros de operación del equipo, temperatura de fusión	Fácil de operar y escalar Rápido y seguro Reproducibile Económico Alto rendimiento	Expulsa el compuesto encapsulado durante el almacenamiento. El producto obtenido es insoluble en agua, limitando aplicación.	(Celli et al., 2015; Dordevic et al., 2014; Nedovic et al., 2013)
Liofilización	-No Aplica-	Compuestos termo sensibles y aromas	Temperaturas y presiones	Alta retención de volátiles Rehidratación del producto Mayor vida útil	Alto consumo de energía Largos tiempos de procesamiento Formación de estructuras porosas Costoso	(Celli et al., 2015; Ezhilarasi et al., 2013; Nedovic et al., 2013)
Recubrimiento por lecho fluidizado	Celulosa, almidones, proteínas y gomas. Alta viscosidad, térmicamente estables	Pigmentos, sabores, conservantes, vitaminas y minerales	Velocidad de pulverización, el contenido de agua, el flujo, humedad y	Flexibilidad con diferentes materiales a encapsular.	Requiere un proceso previo (partículas ya en polvo), esféricas y con buena fluidez.	(Celli et al., 2015; Dordevic et al., 2014)

	con capacidad de formación de película.		temperatura del aire	Trabaja a bajas temperaturas	Aglomeración de partículas	
Coacervación	Polímeros	Sales y alcoholes, compuestos hidrosolubles	Tipo y cantidad de polímeros	Fácil de elaborar Eficiente Usado para productos de alto valor agregado	Proceso costoso Requiere secado previo	(Celli et al., 2015; Ezhilarasi et al., 2013; Nedovic et al., 2013)
Liposomas	Lípidos (fosfolípidos)	Compuestos lipo e hidrofílicos	Temperaturas de transición, tipo de lípido	Biodegradables Biológicamente inertes	Inestabilidad durante el almacenamiento Bajo rendimiento de encapsulación	(Celli et al., 2015; Gonnet et al., 2010)
Complejos de inclusión	Ciclodextrinas	Compuestos lipofílicos, sensibles al calor	Agitación, temperatura y pH	Aumenta la solubilidad de moléculas lipofílicas	Costoso Poco empleado	(Nedovic et al., 2013; Parra Huertas, 2010)
Emulsificación	Lípidos	Compuestos lipo e hidrofílicos, aromas, sabores	Tipo de emulsión, velocidad de agitación	Encapsulan grandes concentraciones de compuestos. Alta estabilidad Tamaño de gotas pequeñas Se puede escalar	Puede requerir un proceso de secado. Proceso difícil de controlar Costoso	(Dordevic et al., 2014; Ezhilarasi et al., 2013; Nedovic et al., 2013)
Extrusión	Polímeros con alta viscosidad	Compuestos hidrofílicos, bacterias, levaduras, enzimas	Parámetros de operación, viscosidad, tensión superficial	No usa temperaturas ni solventes Económico	Baja producción Poca estabilidad química y mecánica	(Dordevic et al., 2014), (Yanniotis et al., 2013)
Fluidos supercríticos	Polímeros con ayuda del fluido supercrítico (CO <sub>2</sub> )	Compuestos termo sensibles	Presión, temperatura	Bajas temperaturas Poco uso de solventes orgánicos	Rendimientos y eficiencias bajas, poco control de tamaño y morfología	(Ezhilarasi et al., 2013, Santos & Meireles, 2010)

A pesar que son varias las metodologías existentes para encapsular tanto compuestos lipofílicos como hidrofílicos, en la Tabla 8, se muestran las técnicas que se han empleado para la encapsulación específica de los FE.

**Tabla 8.** Técnicas empleadas para la encapsulación de FE, comparación entre sus eficiencias y tamaños de partícula

Técnica	País	Agentes encapsulantes	EE (%)	Tamaño Partícula (µm)	Referencias
Complejo de inclusión	China	Mezcla de FE Hidroxi-propil-beta-ciclodextrina Etanol	47 – 98	-	(Meng et al., 2012)
Gelación iónica	Brasil	Alginato de sodio Almidón de maíz Quitosano Estigmasterol (aceite de canola)	90	1400	(Fujiwara et al., 2013)
Emulsión	Irán	Mono y diglicéridos de esteres de ácido láctico FE-comerciales Aceite	NR	11,18	(Izadi et al., 2012)
	Grecia	Fitoesterol (Vegapure) Aceite de girasol Tween 20	NR	2 – 3	(Moschakis et al., 2017)
	Italia	Aceite de maíz Polioxietileno lauril éter Estándar de fitoesterol	NR	0,2-0,3	(Cercaci et al., 2007)
	España	Lecitina de soya Proteína aislada de soya Proteínas lácteas Grasa láctea Fitoesterol (Liphytol®)	NR	NR	(Álvarez-Sala et al., 2016)
	China	Caseinato de sodio Almidón de maíz Octenil succinato Aceite de girasol B-sitosterol	NR	0,26-0,38	(Chen et al., 2016)
Liposomas	Estados Unidos	Lecitina soya o huevo Mezcla de FE Ciclosporina Maltodextrina	20	4 – 45	(Spilburg, 2006)

	Canadá	Lecitina de soya esterol (aceite de girasol)	15-35	0,15-0,4	(Wang et al., 2017)
	China	Esfingomielina Sitosterol	87	0,2	(Yu et al., 2014)
	China	Ergosterol (hongo <i>Flammulina velutipes</i> ) Lecitina de soya	71	0,1	(Yi et al., 2013)
Secado por enfriamiento	Brasil	Material encapsulante: mezcla de grasa vegetal hidrogenada y ácido esteárico. Mezcla de FE (Vegapure)	NR	13,8-32,2	(Alvim et al., 2013)
Secado por aspersión	Argentina	FE en polvo Goma arábiga Maltodextrina Lauril sulfato de sodio y Tween 20	20 - 50	5,1 - 13,1	(Di-Batista et al., 2017; Di-Battista et al., 2013, 2015)
	China-Nueva Zelanda	Proteína aislada de soya Fibra de maíz soluble Aceite de pescado Esteres de fitoesterol Limoneno	98	10	(Chen et al., 2013)
	Malasia	Caseinato de sodio Maltodextrina Lecitina de soya FE (semillas de Kenaf)	97	NR	(Shy-Kai et al., 2013)
	Italia	FE (Phytopin) Proteína aislada de suero Inulina Quitosano Tween 80	3,9-25,8	25	(Tolve et al., 2019)
	Malasia	Carboximetilcelulosa Maltodextrina Lecitina de soya FE (semillas de Kenaf)	51,1	NR	(Lim & Nyam, 2016)

EE: Eficiencias de encapsulación; NR: No reporta

De la tabla anterior, se pueden observar que varias técnicas de encapsulación se han podido adaptar para ser empleadas con compuestos como los FE, de las cuales las que más se han empleado, son la encapsulación por liposomas, emulsión y secado por aspersión; destacando los

liposomas para un uso cosmético y farmacéutico; mientras que las emulsiones y el secado por aspersión con aplicaciones directamente en alimentos.

### **2.1.2.1. Secado por aspersión**

El secado por aspersión es una operación unitaria por la que una solución líquida se convierte en un polvo ligero y poroso en poco tiempo; este proceso involucra etapas de concentración, atomización (condiciones de evaporación), contacto de las gotas de la emulsión con el aire, secado de las gotas (evaporación del agua) y la separación del producto final (Berk, 2013; Dordevic et al., 2014; Li & Jasti, 2006; Patel et al., 2009). El resultado es un producto en polvo, de buena calidad, baja actividad acuosa (microbiológicamente estable), fácil de transportar, almacenar y soluble en agua (Ezhilarasi et al., 2013; Murugesan & Orsat, 2012; Patel et al., 2009; Tonon et al., 2008).

Es una de las técnicas de encapsulación más empleada en la industria de los alimentos, para proteger compuestos lipofílicos (Celli et al., 2015; Murugesan & Orsat, 2012; Parra Huertas, 2010), tales como FE (Comunian & Favaro-Trindade, 2016; Di Battista et al., 2018), dado que puede emplear agentes encapsulantes naturales, económicos y su velocidad de producción es rápida (Dordevic et al., 2014). Entre los aspectos relevantes a controlar en el secado por aspersión de FE, se han destacado el uso de surfactantes, proporciones de agentes encapsulantes y condiciones de operación, como temperatura de secado, las cuales afectan el rendimiento del proceso, la eficiencia de encapsulación y el tamaño de partícula (Di-Battista et al., 2015; Shy-Kai et al., 2013; Tolve et al., 2019).

### ***2.1.3. Agentes encapsulantes empleados en secado por aspersión***

Los más empleados en la industria de los alimentos corresponden a gomas, lípidos, almidones modificados, proteínas, dextrinas, entre otros. La variedad de agentes encapsulantes varía como se

pudo apreciar en la Tabla 8, en la segunda columna, proporcionando diferentes eficiencias de encapsulación y para diferentes componentes de mezcla.

Para la presente tesis se utilizaron: Goma arábica, maltodextrina y proteína aislada de soya.

- Goma arábica, es un complejo heteropolisacárido, con una estructura altamente ramificada (cadena principal de unidades de D-galactopiranosas unido por enlaces  $\beta$ -D-glicosídico y cadena lateral formada con estructuras químicas variables desde D-galactopiranosas, L-ramnosa, L-arabinofuranosa y ácido D-galacturónico unidos a enlaces  $\beta$  de la cadena principal) (Gabas et al., 2007). La goma arábica es muy empleada para la encapsulación de compuestos hidrofóbicos por sus propiedades de capacidad emulsificante, estabilizadora, formadora de película, retención de sustancias volátiles, efectiva protección contra la oxidación, baja viscosidad en alta concentración (importante para facilitar el bombeo y mejorar la productividad del proceso) (Comunian and Favaro-Trindade 2016; Gabas et al. 2007). La goma arábica es caracterizada por que posee un comportamiento de fluido Newtoniano (Tonon et al., 2011).
- Maltodextrinas: Son obtenidas por hidrólisis ácida y/o enzimática del almidón, compuestas por unidades de D-glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1-4 glucosídicos (Gabas et al., 2007). El nivel de hidrólisis es el indicativo del valor de equivalentes de dextrosa-DE-, entre mayor sea el valor DE más alto es el nivel de hidrólisis, menor peso molecular y mayor carácter higroscópico (Nurhadi et al., 2016; Castro et al., 2016). Con respecto a sus propiedades tecnológicas, las maltodextrinas son formadoras de películas y agentes texturizantes, las cuales retardan la cristalización, mejora la estabilidad de la vida útil, son altamente solubles en agua (Castro et al., 2016), reducen la higroscopicidad de los polvos y son adicionados

como ayudantes para el proceso de secado (Gadelha-Moreira et al., 2009) con las ventajas económicas, alta solubilidad y baja higroscopicidad (Caliskan & Dirim, 2016); sin embargo, algunas veces suele ser limitada por sus características hidrofílicas y débiles propiedades mecánicas y de barrera (Zhang et al., 2019).

- **Proteínas:** Entre sus propiedades tecnológicas se destacan la capacidad de emulsificación y gelificación, haciéndolas adecuadas para la encapsulación de compuestos bioactivos (Chen et al., 2006; Xue et al., 2020; Reineccius, 2019); ya que las proteínas globulares (huevo, soya y suero), son rápidamente absorbidas en la interfase de la emulsión, donde son semi-agregadas y forman membranas continuas y homogéneas alrededor de las gotas de aceite a través de interacciones intramoleculares de lámina  $\beta$ , haciendo que se proporcione una barrera electrostática contra la floculación y coalescencia (Chen et al., 2006). Particularmente con la proteína de soya, se cuenta con grandes ventajas como su bajo aporte de sabor, bajo costo, alto valor nutricional y propiedades hipocolesterolémicas (Acosta-Domínguez et al., 2016), además de ser considerado como seguro (GRAS) (Chen et al., 2006); es un componente alimenticio natural que es degradable por las enzimas digestivas (Molina Ortiz et al., 2009). Para la proteína de soya aislada (PAS) (contiene un 90% de proteína), sus mayores componentes son la globulina 7s o  $\beta$ -conglucina y la globulina 11s o glicina (Acosta-Domínguez et al., 2016; Mansour Hefnawy & Ramadan, 2011), lo que hace que en el proceso de secado el calentamiento despliegue la proteína para posterior gelificación con el enfriamiento (Xue et al., 2020), facilitando la incorporación de FE. Sin embargo, a pesar que las películas de PAS son buena barrera contra el oxígeno y el dióxido de carbono, con alta permeabilidad al vapor de agua, son hidrofílicas y con tendencia a absorber agua (Lee et al., 2005).

El mejoramiento de las características poco favorables de la PAS, han sido estudiada por diferentes autores, quienes han demostrado que mediante la mezcla de polisacáridos como la goma fenogreco (Mansour Hefnawy & Ramadan, 2011), goma arábica (Lia et al., 2015), dextrinas (Diftis & Kiosseoglou, 2006), o hemicelulosa (Wang et al., 2017) las interacciones formadas entre proteínas-polisacáridos mejoran las propiedades de ambos, por lo que la mezclas de estos agentes encapsulantes ha sido sugerida durante la microencapsulación (Lia et al., 2015).

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Preparación de la emulsión de alimentación

El tipo de emulsión a secar corresponde a aceite en agua (O/W), en la cual, la fase dispersa está constituida por el extracto obtenido por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar y por aceite de soya comercial (vehículo con FE:  $\beta$ -sitosterol 62%, campesterol 18% y estigmasterol 19%); la proporción empleada corresponde a una relación 1:1 (extracto:aceite). La mezcla de la fase dispersa fue homogenizada en un ultraturrax T 50 basic (IKA, Campinas, Brasil), en tres ciclos de 1 min a 3500 rpm cada uno.

Los agentes encapsulantes empleados fueron maltodextrina Maltrin® M200 (Grain Processing Corporation (GPC)), goma arábica (Willy Benecke) y proteína aislada de soya (Cargill®), con los cuales se realizó un diseño de mezclas simplex-centroide (Tabla 9), para conocer así las proporciones adecuadas para el estudio.

A partir del procedimiento de Di Battista, Constenla, Ramírez-Rigo, & Piña, (2015) con algunas modificaciones, se mantuvo la proporción de agentes encapsulantes: mezcla aceite-extracto 3:1, los agentes encapsulantes fueron dispersados en 200 mL de agua destilada a 50°C, bajo agitación magnética por 30 min. Posteriormente, en agitación constante se adicionó como surfactante 1% de Tween 20® y la fase oleosa, manteniendo este movimiento durante 5 min más. Pasado este tiempo, la emulsión formada fue homogenizada mediante un ultraturrax a 5000 rpm, por 10 min y llevada al secador por aspersión.

**Tabla 9.** Diseño de mezcla simplex-centroide de la composición de agentes encapsulantes para las emulsiones de alimentación en secado por atomización de FE

<b>Formulaciones</b>	<b>PAS (%)</b>	<b>GA (%)</b>	<b>M (%)</b>
Formulación 1 (F1)	100	0	0
Formulación 2 (F2)	50	50	0
Formulación 3 (F3)	16,67	66,67	16,67
Formulación 4 (F4)	50	0	50
Formulación 5 (F5)	0	50	50
Formulación 6 (F6)	0	100	0
Formulación 7 (F7)	33,33	33,33	33,33
Formulación 8 (F8)	0	0	100
Formulación 9 (F9)	16,67	16,67	66,67
Formulación 10 (F10)	66,67	16,67	16,67
Formulación 11 (F11)	100	0	0
Formulación 12 (F12)	0	100	0
Formulación 13 (F13)	0	0	100
Formulación 14 (F14)	50	50	0
Formulación 15 (F15)	50	0	50

PAS: Proteína aislada de soya, GA: Goma arábica; M: Maltodextrina

### ***2.2.2. Diseño de experimentos-producción de micropartículas***

El proceso de secado fue realizado en un secador por aspersion Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik) en co-corriente y las condiciones de operación fueron tomadas de Di-Batista, Constenla, Ramírez Rigo, & Piña, (2017), con algunas modificaciones: temperatura de entrada 165°C, flujo de aire de atomización 42mm, flujo de alimentación 10% y aspirador 80%. Durante la aspersion, la emulsión estuvo en agitación magnética constante a 500 rpm. Una vez terminado el proceso las micropartículas fueron guardadas en bolsas con selle hermético, en oscuridad y en un cuarto de humedad y temperatura controlada hasta sus análisis.

### **2.2.3. Caracterización de micropartículas obtenidas por secado por aspersión**

Una vez realizado el secado de todas las formulaciones propuestas en el diseño de mezclas, se hizo una caracterización que incluyó rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación, humedad, actividad de agua, solubilidad en agua y tamaño de partícula; para de esta forma, encontrar las proporciones más adecuadas de los agentes encapsulantes.

#### **2.2.3.1. Rendimiento de secado (%RS)**

Se realizó por gravimetría y fue calculado como la relación entre el producto recuperado y la cantidad de sólidos que contenía la emulsión antes del proceso de secado (Ecuación 3).

Ecuación 3. Rendimiento de secado

$$\%RS = \frac{\text{Cantidad de producto en polvo recuperado despues del secado (g)}}{\text{Cantidad de sólidos en la emulsión (g)}} \times 100$$

#### **2.2.3.2. Eficiencia de encapsulación (%EE)**

Para conocer este valor se tuvo en cuenta la más adelanteexpresión

Ecuación 4. Eficiencia de encapsulación

$$\% EE = \frac{\text{Contenido de FE incorporado en las microparticulas (mg)}}{\text{Contenido de FE presentes en el extracto oleoso antes del secado (mg)}} \times 100$$

El contenido de FE incorporado en las micropartículas, se determinó de la siguiente forma: se tomaron aproximadamente 250 mg del polvo y se suspendieron en 1mL de la mezcla hexano:éter de petróleo (1:1), la cual fue agitada por 1 min en vortex a 3000 rpm. La fase orgánica fue separada por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante almacenado en un recipiente aparte (el proceso de lavado se realizó por duplicado, para asegurar que no hubiese presencia FE en la superficie de las partículas). El precipitado de las micropartículas lavadas fue secado bajo

corriente de nitrógeno, se adicionó 1 mL de agua destilada caliente (70°C), se agitó por 1 min y fue llevado a baño ultrasónico (60 °C durante 20 minutos) para asegurar la ruptura de las cápsulas. El proceso de extracción de los lípidos se realizó con la mezcla hexano:éter de petróleo (1:1), de forma similar que el proceso de lavado, se tomó la fase orgánica y fue secada con nitrógeno. Los lípidos extraídos, fueron almacenados a 4°C, en oscuridad hasta su posterior análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

#### **2.2.3.3. Humedad**

Un gramo del producto en polvo fue colocado en un analizador de humedad (HB43-S, Mettler Toledo International Inc.), como fue propuesto por Bustos-Garza et al., (2013).

#### **2.2.3.4. Determinación de la actividad de agua ( $A_w$ )**

Esta medida fue realizada mediante la técnica de sensor de punto de rocío, usando un Aqualab-3 3 (Decagon Devices Inc., Pullman) a 24 °C y por duplicado.

#### **2.2.3.5 Solubilidad**

La solubilidad, según European Pharmacopeia, (2014) se refiere a un volumen aproximado de solvente (mL) por masa de soluto (g). Para este parámetro, un gramo de cada formulación evaluada, se dispersó en agua destilada (pH 7,0 a temperatura ambiente) bajo agitación constante de 100 rpm y cada 5 min se adicionaron 100 µL de agua hasta completar su disolución (si después de 5 min había precipitación, se adicionaban otros 100 µL, hasta solubilizar completamente la formulación en polvo). El resultado se expresó como g de polvo/mL de agua.

#### **2.2.3.6. Tamaño de partícula**

Mediante la técnica de difracción de luz dinámica, empleando un equipo mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd.), se determinó la distribución del tamaño de partícula de las formulaciones.

#### **2.2.4. Optimización**

La función deseabilidad fue usada para la optimización de múltiples respuestas, encontrando así, el valor deseado para cada una de las variables dependientes analizadas (rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación, actividad de agua, humedad, solubilidad y tamaño de partícula), maximizando o minimizando sus valores, de acuerdo a la mejor mezcla de agentes encapsulantes. Una vez, la predicción de la mezcla se realizó, se hizo un nuevo secado el cual fue caracterizado, con todos los parámetros anteriormente mencionados, además de analizarle su morfología y cristalinidad.

##### **2.2.4.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

La morfología de los agentes encapsulantes y formulación óptima se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-por sus siglas en inglés–Scanning Electron Microscopy) usando un JSM 6490 LV (Jeol, Japón) a 20kV. Las muestras se fijaron en una cinta de grafito, las cuales fueron recubiertas con una delgada capa de oro (Au) (Denton vacuum Desk IV) y se emplea el detector de electrones secundarios para evaluar la topografía de las muestras.

##### **2.2.4.2. Difracción de rayos X**

Los ensayos se realizaron en el difractómetro de Rayos X (DRX) Malvern-PANalytical Modelo Empeyan 2012, con detector Pixel 3D y fuente de Cu ( $\lambda=1.541874$ ) a 45kV y 40mA; Goniómetro:

Omega/2 theta y configuración de la plataforma: Reflexión Transmisión Spinner con giros de 4s. El paso fue de  $0,05^\circ$  y un tiempo por paso de 52s. El rango de análisis fue de  $5-80^\circ$ .

### **2.3.5. Análisis estadísticos**

Estos fueron llevados a cabo en el software Statgraphics Centurion, utilizando la comparación múltiple de la prueba de Tukey, se estableció como significancia estadística un valor  $p < 0,05$  con un porcentaje de confianza del 95%.

## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1 Caracterización de las micropartículas

La Tabla 10, recopila la caracterización realizada a las formulaciones en polvo obtenidas según el diseño de experimentos planteado, para este objetivo.

**Tabla 10.** Caracterización de las micropartículas de FE del diseño de mezcla simplex-centroide

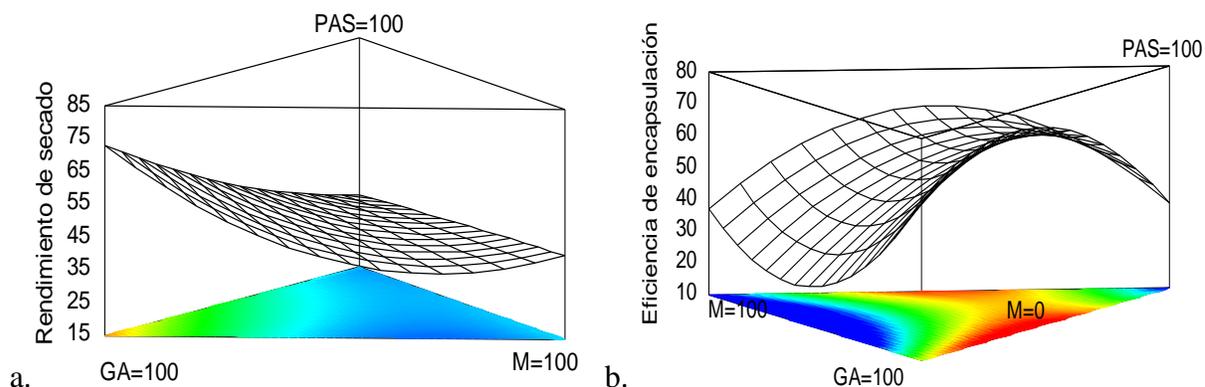
Formulación	RS (%)	EE (%)	A <sub>w</sub>	Humedad (%)	Solubilidad (g/mL)	Tamaño de partícula (µm)
F1	40,67	48,85±3,15ab	0,439±0,021abcde	10,240±1,736a	0,19±0,002ab	28,10±5,66a
F2	54,09	83,56±6,96ac	0,370±0,016a	8,990±0,389abc	0,96±0,046c	23,10±1,55abc
F3	60,02	66,62±2,99ad	0,378±0,015a	8,580±0,113abc	0,94±0,086c	28,50±2,97a
F4	41,66	92,34±1,7cdef	0,474±0,005bc	7,850±0,389bc	0,47±0,020d	26,90±0,71a
F5	28,03	23,180 ±9,10bf	0,408± 0,006ac	7,740±0,177abc	0,98±0,039c	11,90±1,13bc
F6	76,92	64,03±9,10aeg	0,402±0,002a	9,560±0,148ad	0,99±0,048c	21,90±2,83abc
F7	55,74	49,66±9,28afh	0,438±0,002a	8,320±0,120a	0,97±0,034c	15,50±0,79c
F8	41,08	32,46±8,83bdgh	0,581±0,062d	6,020±0,336bc	1,05±0,035c	24,00±1,27ac
F9	38,17	50,33±10,12af	0,364±0,009a	6,420±0,081c	0,98±0,020c	24,80±1,13ac
F10	29,19	27,56±8,08bh	0,457±0,001c	9,200±0,237a	0,50±0,005d	18,00±4,18abc
F11	38,78	33,23±14,76bdgh	0,485±0,035e	8,480±0,230a	0,19±0,010a	26,50±4,38ac
F12	68,01	50,42±12,81bg	0,369± 0,013ac	9,630±0,615a	0,97±0,020c	25,40±4,24ac
F13	41,14	37,33±6,69bdgh	0,390±0,002a	6,210±0,039bc	1,12±0,102c	21,50±1,13abc
F14	41,30	74,01±3,21ae	0,420±0,006a	1,780±0,202	0,81±0,098c	21,30±1,84abc
F15	32,74	60,61±3,80bdgh	0,511±0,013b	8,310±0,940bd	0,41±0,008bd	27,80±1,63 <sup>a</sup>

RS: Rendimiento de secado, EE: Eficiencia de encapsulación, A<sub>w</sub>: actividad de agua. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar. Letras iguales, indican no hay diferencias significativas, según la prueba de Tukey por comparaciones múltiples (P<0,05)

#### 2.3.1.1. Rendimiento del proceso de secado (%RS)

Las formulaciones secas presentaron rendimiento entre el 28 al 76%, donde el más bajo correspondió a F5 (GA:M – 50:50) y la más alta a F6 (100% GA). Con respecto al uso de la PAS, esta no tiene un efecto significativo sobre el parámetro evaluado, como se aprecia en las formulaciones 2 y 14 (F2 y F14) las cuales además son réplicas del diseño. El efecto de cada uno

de los agentes encapsulantes empleados sobre la variable rendimiento de secado es posible visualizarlo en la superficie de respuesta estimada de la Figura 14a.



**Figura 14.** Superficie de respuesta estimada para a) rendimiento de secado y b) eficiencia de encapsulación de las formulaciones en polvo según el diseño de experimentos propuesto con los agentes encapsulantes PAS (Proteína aislada de soya), GA (Goma arábica) y M (maltodextrina)

En el trabajo realizado por Di Battista, Constenla, Ramírez-Rigo, & Piña, (2015), la encapsulación de FE empleando GA y M en relación 3:1, obtuvo un rendimiento del proceso de aproximadamente 65%, un valor superior al compararlo con los resultados de este estudio, ya que la formulación donde se emplearon estos únicos agentes encapsulantes (F5, GA:M, proporción 1:1) presentó el más bajo rendimiento (28,03%), resultado que no se esperaba dado que la adición de la M durante el proceso de secado puede mejorar el rendimiento del proceso (Zhang et al., 2018), pero esto no se vio reflejado.

Con respecto a las formulaciones que contienen goma arábica (GA), se observó que su incorporación mejora el rendimiento cuando se adiciona en cualquier porcentaje (incluso más del 16%), como es el caso de las formulaciones F2, F3, F6, F7, F12 y F14 (estas dos últimas como réplicas del diseño de experimentos) con rendimientos de 54,09; 60,02; 76,92; 55,74; 68,08 y

41,4%, respectivamente. Estos rendimientos, se pueden explicar por el hecho de que la GA forma soluciones con baja viscosidad en altas concentraciones, facilitando el bombeo en el equipo y mejorando la eficiencia del proceso (Comunian & Favaro-Trindade, 2016), caso contrario de lo que sucede con la PAS (proteína aislada de soya), la cual provee alta viscosidad haciendo el proceso de secado menos eficiente (tanto en rendimiento como en tiempo).

### **2.3.1.2. Eficiencia de encapsulación (%EE)**

La EE de las formulaciones (Tabla 10) se encontraron entre  $23,18 \pm 9,10\%$  (F5) y  $92,34 \pm 1,7\%$  (F4). Comparando estos valores con el estudio de Di-Batista et al., (2017), al emplear M y GA como materiales encapsulantes, a condiciones similares de secado, ellos tuvieron EE entre 53,65–91,03%, valores superiores a los obtenidos en este estudio. A pesar que se considera que la M es buena como ayudante para el secado, grandes cantidades de este material no mejora la EE, ya que no tiene buena capacidad para formación de películas ni buena capacidad emulsificante, tal como la GA y la PAS. Esta puede ser una de las razones del porqué la EE de las formulaciones que contienen M son menores, en este estudio.

Las formulaciones con mayor EE corresponden a F2, F3, F4, F6, F14 y F15 con  $83,56 \pm 6,96$ ;  $66,62 \pm 2,99$ ;  $92,34 \pm 1,7$ ;  $64,03 \pm 9,10$ ;  $74,01 \pm 3,21$  y  $60,61 \pm 3,80\%$ , respectivamente. Si bien, estas formulaciones presentan diferencias numéricas, no son estadísticamente diferentes entre ellas; además se puede determinar que las formulaciones con mayor EE, tienen en común el agente encapsulante PAS (excepto F6 con 100% GA); lo cual sugiere que la PAS posee buena capacidad de emulsificación, solubilidad en agua y formación de película (Molina Ortiz et al., 2009), características importantes para que un material pueda retener en su interior compuestos como los FE.

Según la Figura 14b, no se aprecia ningún comportamiento claro entre la EE y los agentes encapsulantes evaluados; sin embargo, se puede observar que la interacción entre la PAS y la GA parecen tener un mejor efecto sinérgico con respecto a las otras mezclas. Esto se debe a que cuando se mezclan las propiedades tanto de la PAS como de la GA en una solución, el producto resultante puede tener características de ambos encapsulantes, tal como se evalúa en el estudio de Mansour Hefnawy & Ramadan, (2011), en el que las propiedades fisicoquímicas de la PAS y de la goma de alholva, interaccionan entre sí, mejorando la actividad estabilizante y emulsificante, permitiendo así incrementar la calidad de la emulsión de alimentación antes del proceso de secado. Además en el proceso de solidificación, las mezclas de proteína-goma, forman enlaces covalentes e interacciones electrostáticas polianión – polication entre estos 2 polímeros (Mansour Hefnawy & Ramadan, 2011), lo que podría explicar que en la red formada con estos materiales, se pueda almacenar una mayor cantidad de FE (mejorando la EE).

Un factor a tener en cuenta tanto en los parámetros de RS y EE, es la adición de surfactantes, debido a que, al reducir la tensión superficial, mejora la dispersión de la fase oleosa y con ello, la estabilidad de la emulsión. Este comportamiento es posible verlo en el trabajo de Di-Battista et al., (2015), en el que la EE obtenida con M y GA estuvo en el rango de 10-50%, siendo la mejor cuando se adiciona un 2% de SDS (siglas en inglés, Sodium Dodecyl Sulfate – dodecilsulfato de sodio) como surfactante; y el RS disminuye cuando las proporciones de surfactante es bajo. Eso podría sugerir que la adición de 1% de Tween fue poco para este trabajo y la incorporación de agentes encapsulantes con baja capacidad emulsificante tal como la M pudo haber afectado el RS y EE (la insuficiente cantidad de surfactantes adicionados en la emulsión, no redujo lo suficiente la tensión interfacial en las fases preparadas); además al poseer mayor cantidad de surfactantes dentro de la emulsión de alimentación, se reduce el tamaño de partícula en esta, favoreciendo

procesos de encapsulación, debido a la relación inversa que se presenta entre EE y tamaño de gota en suspensión (Di-Battista et al., 2015).

### **2.3.1.3. Actividad de agua y humedad**

Estos dos parámetros son importantes porque contribuyen a determinar condiciones de almacenamiento y estabilidad en los productos secos. El  $A_w$  (actividad de agua, sigla en inglés “activity of water”), se define como la cantidad de agua disponible para que un microorganismo (m.o.) pueda crecer y hace referencia a la estabilidad microbiológica de un producto, así que valores por debajo de 0,6 (Comunian & Favaro-Trindade, 2016) permiten asegurar una mayor vida útil, con respecto a la calidad microbiológica. Todas las formulaciones evaluadas estuvieron entre el rango de  $0,364 \pm 0,009$  a  $0,581 \pm 0,062$ , encontrándose en el rango de poca cantidad de agua disponible para que los microorganismos se reproduzcan fácilmente. El valor más alto de  $A_w$ , corresponde a la F8 (100% M), lo que representa que es posible que esta formulación con el tiempo, pueda presentar un mayor crecimiento microbiano con respecto a las otras. Por otra parte, la F9 (PAS:M:GA) corresponde al menor valor de  $A_w$  determinado en este estudio ( $0,364 \pm 0,009$ ), con valores similares estadísticamente a F1, F2, F3, F5, F7 y sus respectivas replicas.

El porcentaje de humedad de las muestras evaluadas se encuentran entre  $1,780 \pm 0,202$  y  $10,240 \pm 1,736\%$ , valores que corresponden a F14 y F1, respectivamente. En este parámetro, la maltodextrina posee un papel muy importante, debido a su poca capacidad de absorción del agua comparada con las proteínas y las gomas. Se hace importante resaltar que la cantidad de equivalentes de dextrosa (DE), presentes en la M es fundamental tanto para los parámetros de  $A_w$  como de humedad (el carácter higroscópico de la M aumenta cuando lo hacen los DE), por la presencia de un gran número de polisacáridos de alto peso molecular (Castro et al., 2016). También, las maltodextrinas según su DE, tiene un gran número de ramificaciones con grupos

hidrofílicos, y puede absorber fácilmente la humedad del ambiente (Negrao-Murakami et al., 2017).

En el caso de las formulaciones con PAS, estas presentan un alto contenido de humedad, ya que las películas formadas con este material proporcionan limitada resistencia a la transferencia del vapor de agua debido su conformación hidrofílica (Lee et al., 2005). Se conoce además que, el mecanismo predominante de la penetración de líquidos dentro de alimentos en polvo es mediado por las fuerzas capilares, sin embargo la absorción del agua puede ocurrir por mecanismos de fuerzas electrostáticas, fuerzas osmóticas y fuerzas capilares (Acosta-Domínguez et al., 2016).

Al comparar el resultado del proceso de secado de los FE con otros compuestos bioactivos como la luteína, encapsulada con M, GA y almidón modificado (AM), a una temperatura de aire de secado de 185°C, se encuentra que los valores de  $A_w$  estuvieron entre 0,12 a 0,33 y la humedad entre 4,21 a 9,01%, (Álvarez-Henao et al., 2018). La diferencia de valores con los obtenidos en este trabajo se deben a varios factores, como los agentes encapsulantes empleados y la alta temperatura de secado, ya que al presentarse un gradiente alto de temperatura ( $T^\circ$  de secado y de alimentación), se genera una gran fuerza de evaporación (Tonon et al., 2008), haciendo más efectiva la eliminación de agua, en el producto final. También, Negrao-Murakami et al., (2017) evaluaron el efecto de los DE de la M sobre las propiedades fisicoquímicas del extracto de yerba mate concentrado secado por aspersión a temperaturas de 150°C y obtuvieron que la M con 20 DE, presentó un  $A_w$  de  $0,126 \pm 0,004$  y humedad de  $3,33 \pm 0,10\%$ , valores por bajo de todas las formulaciones presentadas en este estudio, sin embargo esta diferencia es posible debido al tipo de extracto empleado, el cual es más acuoso y a la humedad del ambiente trabajado (~ 79%).

#### 2.3.1.4. Solubilidad.

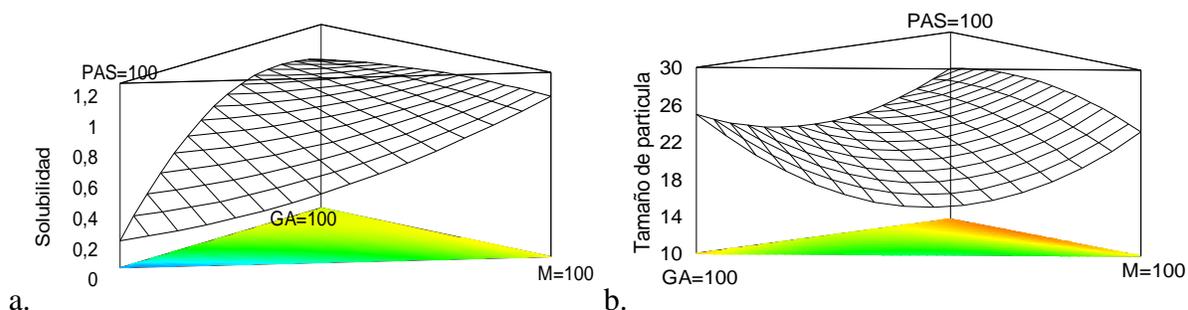
Los valores de solubilidad encontrados en este estudio están en el rango de  $0,19 \pm 0,002$  g/ mL (F11, 100% PAS) a  $1,12 \pm 0,102$  g/mL (F8, 100% M), lo cual muestra que la PAS, requiere más cantidad de agua que las otras formulaciones para poder solubilizarse totalmente. Dado que el PI (punto isoeléctrico) de la proteína se encuentra entre un pH de 4,3 a 4,8 (Vingerhoeds & Harmsen, 2004), y el solvente empleado para esta prueba tiene un pH de 7,0, su solubilidad debería ser alta; sin embargo, hay que tener en cuenta que las proteínas forman geles, en los cuales retienen agua, y la capacidad de retención del agua para la PAS varía entre 30-50g agua/ 100g proteína (De Luna Jiménez, 2006), lo que implica que inicialmente el agua adicionada formará una red tridimensional que permite retener diferentes compuestos, que posteriormente deberá hinchar hasta el punto de romper el gel para solubilizar adecuadamente la PAS.

Según la Farmacopea (European Pharmacopeia, 2014) en términos de solubilidad, las formulaciones realizadas se pueden clasificar en solubles (F1 y F11), fácilmente solubles (F5 = F9 = F7 = F12 = F2 = F6 = F3 = F14 > F10 > F4 > F15) y muy solubles (F8 y F13). Estas últimas, corresponden a aquellas en las que se requiere menos de 1 mL de agua para solubilizarse completamente y además en su composición presentan 100% M; esto era de esperarse debido a que este agente encapsulante tiene la más alta capacidad de dispersión en agua (con respecto a los otros dos agentes encapsulantes empleados), por estar constituida de polímeros de glucosa, los cuales son muy solubles en agua. En general, la alta solubilidad de la M contribuye a una significativa disminución de la viscosidad de las gotas favoreciendo el proceso del secado desde la emulsión (Zhang et al., 2018).

En el resultado obtenido por Molina Ortiz et al., (2009), en la encapsulación de caseína hidrolizada con PAS, la solubilidad estuvo entre  $0,867 \pm 0,059$  y  $0,949 \pm 0,011$  g/g de agua, resultados similares a las formulaciones que estaban constituidas con PAS y GA, en alguna proporción, como lo son F2, F3, F7, F9, F10 y F14 que mostraron una solubilidad entre  $0,81 \pm 0,098$  a  $0,98 \pm 0,020$  g/ mL de agua.

En la Figura 15a, es posible determinar que la PAS juega un papel importante en la solubilidad de las micropartículas, ya que cuando la cantidad de PAS aumenta, la variable solubilidad es afectada; sin embargo, se presenta un aumento en la solubilidad de las partículas de PAS al estar mezclada con la M y GA, esto se debe a que al reducir la cantidad de PAS, también lo hace su capacidad de retención de agua, además es de esperar que ocurran cambios en la conformación de la proteína, haciendo que sea mucho más hidrofílica. Si bien, en las formulaciones donde sólo la PAS y M fueron usados la solubilidad tuvo un valor medio, las mezclas de PAS con GA proporcionaron una mayor solubilidad; lo que sugiere que hay mayores interacciones entre la PAS con GA y el extracto encapsulado que con la M. Entre los estudios que ayudan a entender este fenómeno, se encuentra el realizado por Mansour Hefnawy & Ramadan, (2011), en el cual, la mezcla de la goma de fenogreco y la PAS, mejoró la solubilidad de la proteína inhibiendo su precipitación y también permitió aumentar la estabilidad en pH de 3 a 9 mediante la formación de enlaces covalentes. Otro estudio, fue el realizado por Diftis & Kiosseoglou, (2006), en el cual uno de los objetivos de su trabajo consistió en evaluar de la capacidad de emulsificación de la proteína de soya y su mezcla con dextrinas en diferentes proporciones, como resultado se obtuvo que la formación de enlaces covalentes tales como los enlaces disulfuro entre los agentes usados permitieron mejorar la solubilidad de las proteínas así como la estabilidad de la emulsión O/W posteriormente preparada; sin embargo la inadecuada incorporación de la proteína y polisacáridos

dentro de la mezcla hacía que la solubilidad de la proteína no fuera buena, apareciendo problemas de floculación con la proteína o de cremación en presencia solamente de polisacáridos.



**Figura 15.** Superficie de respuesta estimada para la solubilidad (a) y tamaño de partícula (b), de las formulaciones secas

### 2.3.1.5. Tamaño de partícula

Este es uno de los parámetros más importantes cuando se realiza un proceso de secado, ya que contribuye a la caracterización de procesos de encapsulación, comportamiento en almacenamiento, fácil manipulación, incorporación dentro de matrices alimentarias y subsecuentemente a las evaluaciones de biodisponibilidad. De acuerdo a la Tabla 10, las micropartículas obtenidas estuvieron en un rango de  $11,90 \pm 1,13$  a  $28,50 \pm 2,97$   $\mu\text{m}$ , correspondientes a la F5 (GA:M) y F3 (PAS:GA:M), respectivamente. Los tamaños obtenidos, fueron mayores que los encontrados en los trabajos de Di Battista et al., (2015), que estuvieron entre 6,8 - 8,9  $\mu\text{m}$ , cuando usaban GA:M (relación 3:1), con 1% de Tween 20 y en el de Di-Batista et al., (2017), con variación de 6,1 – 16,7  $\mu\text{m}$ , empleando los mismos agentes encapsulantes de su estudio anterior (M:GA proporción 1:3) pero con adición de 2% de SDS; lo que podría sugerir que el tamaño de partícula de los productos en polvo, se afectan por la cantidad y el tipo de surfactante empleado.

En el caso de la F13 (M al 100% con 20 DE), el tamaño de partícula fue de  $21,50 \pm 1,13 \mu\text{m}$ , mientras en el estudio realizado por Negrao-Murakami et al., (2017), con el mismo agente encapsulante fue de  $12,37 \pm 1,57 \mu\text{m}$ , para el extracto de yerba mate; estas diferencias son posibles debido al tipo de extracto encapsulado, ya que el de yerba mate tiene una naturaleza más hidrofílica (polifenoles encapsulados) que con el extracto de bagazo de caña de azúcar, por lo que la emulsión de alimentación y por ende el secado, pudo haber sido mucho mejor optimizados en el estudio de Negrao-Murakami y colaboradores.

Por otra parte, la importancia de determinar el tamaño de partícula de los productos en polvo se asocia a que se pueden hacer mejores suposiciones de cómo podría comportarse un ingrediente en una matriz y en el cuerpo con el tiempo; puesto que las partículas de mayor tamaño liberan sus componentes encapsulados mucho más lento y por un periodo de tiempo prolongado, mientras que las partículas más pequeñas introducen mejoras en varios factores bioadhesivos, como una mayor fuerza adhesiva y tiempo de tránsito gastrointestinal (Chen et al., 2006). En el caso de la encapsulación con FE, los tamaños de partícula pequeños mejoran la dispersión en el medio acuoso, contribuyendo a mejorar la solubilidad, lo que es posible establecer una relación directa entre estos dos parámetros (solubilidad y tamaño de partícula); si el tamaño de partícula del extracto de FE encapsulados se reduce, su solubilidad mejora, debido a la gran capacidad de solvatación de las formulaciones con el medio acuoso.

De acuerdo a la Figura 15b, la presencia de PAS en la formulación permite obtener los mayores tamaños de partícula, por lo que su incorporación afecta visiblemente este parámetro. Esto se puede explicar, ya que las proteínas globulares (como la PAS) tienen la capacidad de formar partículas con tamaños entre 40 nm a 2 mm, dependiendo de las condiciones a las cuales son preparadas

(Chen et al., 2006). Los mayores tamaños de partícula, se presentan cuando la PAS interactúa con M (que cuando lo hace con la GA), el aumento en el tamaño de las formulaciones que contienen PAS, está relacionada con su propiedad de alta higroscopicidad, dado que, al aumentar la proporción de proteína, el tamaño también lo hace significativamente.

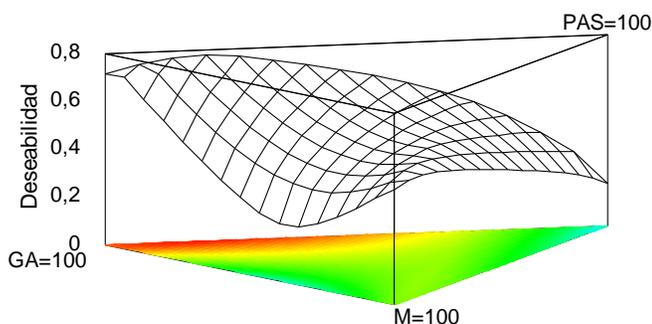
### ***2.3.2. Optimización de los agentes encapsulantes***

El objetivo de utilizar la metodología de superficie de respuesta para un proceso de encapsulación es encontrar entre las variables independientes definidas (agentes encapsulantes) la mezcla óptima de estas, que proporcionen los mejores valores para las variables respuesta, de acuerdo a lo que se desea. Específicamente, en el proceso de secado de FE hay pocos estudios que proveen lo que podría ser una mezcla óptima de agentes encapsulantes tales como PAS, GA y M, que brinden una caracterización adecuada de los productos en polvo en términos de RS, EE, Aw, humedad, solubilidad y tamaño de partícula.

Para encontrar la optimización de la función deseabilidad fue necesario maximizar el rendimiento de secado, eficiencia de encapsulación y solubilidad; y minimizar el resto (Aw, tamaño de partícula y humedad), debido a que el proceso de almacenamiento es importante en los productos en polvo y se requieren que sean las de menor valor para garantizar un adecuado tiempo de vida útil, evitando principalmente contaminación microbiológica.

En la Figura 16, es posible distinguir la interacción de cada uno de los agentes encapsulantes analizados con el fin de optimizar la función deseabilidad. La M dentro de la formulación no proporciona una ventaja para optimización de los parámetros, por lo que se puede inferir que éste podría ser el menor componente con las condiciones de optimización de los agentes encapsulantes. En cuanto a la proporción de solo proteína con M, parecen ser la menos favorable. Sin embargo,

una relación cercana entre el valor de deseabilidad es encontrado cuando se trabaja con goma arábica y bajas proporciones de proteína.



**Figura 16.** Superficie de respuesta para la optimización de las variables independientes

La Tabla 11, muestra la proporción de los agentes encapsulantes a emplear que maximizan la función deseabilidad para el proceso de secado por aspersión de FE extraídos a partir del bagazo de caña de azúcar, en el que el modelo propuesto para la optimización con respecto a la función deseabilidad, se adapta en un 76,33%. Por otra parte se puede apreciar en la misma tabla, los valores predichos para la función según la optimización y los valores reales obtenidos, después del proceso de secado con la mezcla de agentes encapsulantes propuesta, encontrando que el valor real obtenido del parámetro evaluado después del proceso de optimización, es similar al de predicción, lo cual permite determinar que el ajuste por el software estadístico fue adecuado y los resultados obtenidos después del análisis de cada una de las variables es relevante.

**Tabla 11.** Condiciones óptimas para la encapsulación de FE a partir del bagazo de caña de azúcar. Valores teóricos y reales.

Variables	Valores Teóricos	Valores Reales
Proteína aislada de soya (%)	21	-
Goma arábica (%)	78	-
Maltodextrina (%)	1	-
Rendimiento de secado (%)	62,40	65,51
Eficiencia de Encapsulación (%)	71,30	73,64
Actividad de agua	0,389	0,390
Humedad (%)	7,219	9,275
Solubilidad (g/mL)	1,017	0,98
Tamaño de Partícula ( $\mu\text{m}$ )	22,9	23,7

En las Figura 11 a y 17 b se pueden observar la apariencia del extracto de FE tanto en emulsión como el producto ya seco, con las proporciones optimas de agentes encapsulantes determinadas en la tabla 11.



**Figura 17.** Emulsión de alimentación antes de ingresar al secador por atomización extracto: agentes encapsulantes (a) y producto seco (b)

La optimización permite verificar que el uso de PAS en la formulación puede mejorar algunas características evaluadas y su uso fue necesario para la el proceso de encapsulación de compuestos lipofílicos como FE; sin embargo, debido a que las proteínas de soya son compuestas de una

mezcla de albuminas y globulinas, el 90% de las cuales son proteínas con estructura globular y contienen 18 aminoácidos, incluyendo aquellos de grupos funcionales polares tales como, carboxilos, aminos e hidroxilos (Tian et al., 2018), ellos pueden ser capaz de reaccionar químicamente con la estructura de la GA, mejorando la solubilidad de los FE en agua y permitiendo una mejor incorporación de estos dentro de la red creada.

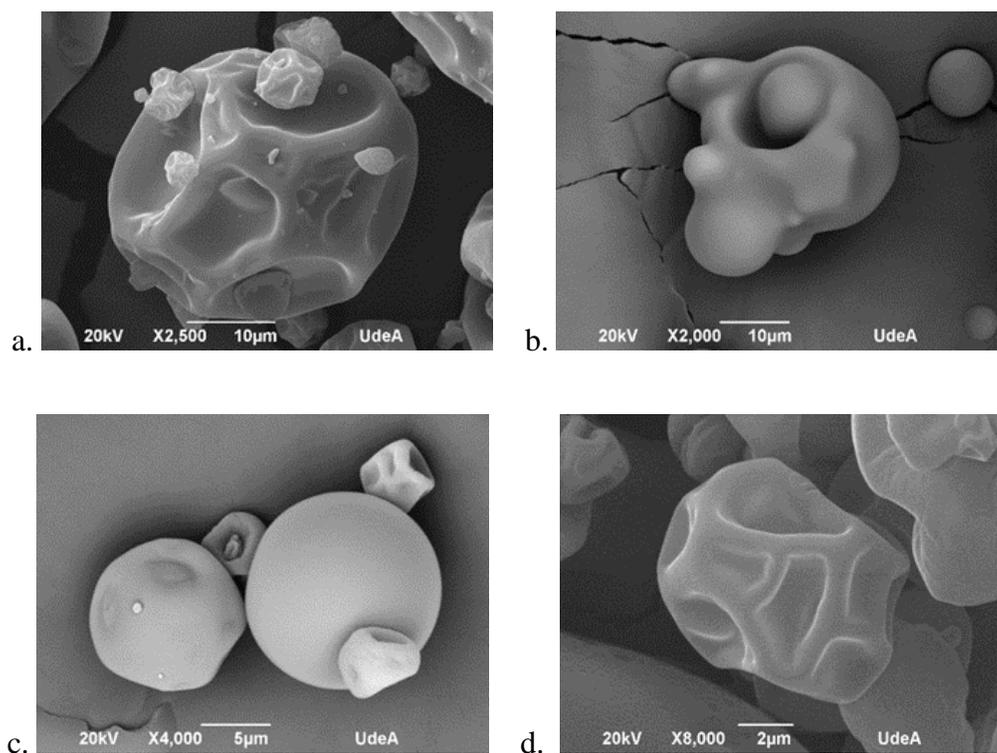
Una ventaja de la optimización, es la participación de la PAS debido a que las proteínas globulares son resistentes a la pepsina, la cual ataca principalmente enlaces peptídicos, pero es completamente degradada por la pancreatina, manteniendo el total liberado del compuesto bioactivo (Chen et al., 2006). Sin embargo, para un proceso de biodisponibilidad a futuro es muy adecuado contar con este material encapsulante, dado que este permite la completa liberación del extracto de FE (microencapsulado) en el intestino delgado, lugar donde ejercen su principal función.

Es de resaltar que con los parámetros de optimización encontrados, el tamaño de partícula fue de 23  $\mu\text{m}$ , menor al indicado para favorecer la biodisponibilidad de FE (25  $\mu\text{m}$ ) dentro de las micelas intestinales (Di-Battista et al., 2013, 2015) ya que estas partículas, pueden ser fácilmente atacadas por las sales biliares, favoreciendo procesos de bioactividad posteriores.

#### **2.3.3.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos-X**

La formulación óptima fue caracterizada con otros dos parámetros adicionales, los cuales corresponden a SEM para conocer su morfología y rayos X para conocer si hubo alguna modificación de la estructura cristalina lo cual permitirá justificar si hay una mejora en su solubilidad.

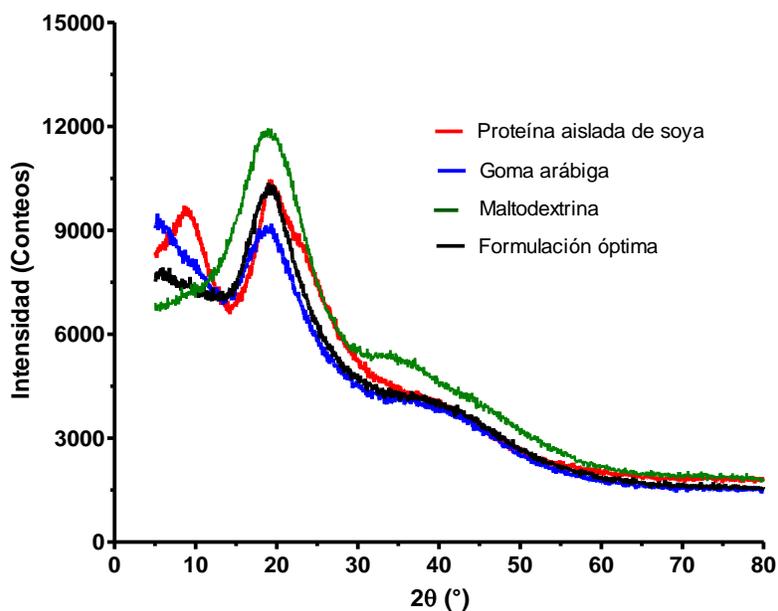
En las figuras 18a, 18 b y 18c, se aprecian la morfología de los agentes encapsulantes empleados en este trabajo, GA, M y PAS, respectivamente. La GA, presenta una superficie rugosa con hendiduras, pero sin rupturas y ligeramente redondeada; la M, posee una estructura completamente amorfa pero lisa; diferente a la superficie de la PAS, la cual presenta una forma esférica, no porosa y lisa (típica de las proteínas globulares). Sin embargo, al observar la figura 18d, correspondiente a la formulación óptima de extracto de FE secado por aspersión, se aprecia una forma amorfa, que no presenta características particulares de los agentes encapsulantes empleados, por lo que se puede indicar que hay una adecuada integración física entre los materiales encapsulantes y los FE que pudo haber ocurrido tanto en el proceso de emulsificación como en el de secado.



**Figura 18.** Micrografías SEM de agentes encapsulantes empleados en el secado de extracto de FE y formulación óptima secada por aspersión. a) GA; b) M; c) PAS y d) Formulación óptima.

También, se puede determinar que la presencia de hendiduras en la formulación óptima (figura 18d), se debe a la presencia de GA, y no a una temperatura elevada de secado o alta humedad en la muestra que permitiera que el alto vacío empleado en el equipo hiciera aparecer las formas con cavidades. Por otra parte, se puede resaltar que el proceso de secado por aspersión redujo el tamaño de las partículas, si se compara con el diámetro de los agentes encapsulantes solos.

Una parte importante es que los FE libres, poseen una estructura altamente cristalina, y de allí surge la dificultad de dispersarlos en matrices alimentarias, por lo que se sugieren diferentes técnicas para reducir su cristalinidad y aumentar la interacción con diferentes medios. En la figura 19, se aprecian los patrones de la difracción de rayos X de la formulación óptima y de los agentes encapsulantes, los cuales indican que no hay naturaleza cristalina en la formulación obtenida, ya que los patrones característicos de los FE corresponden a puntos fijos 4,96 °, 15,16 °, 18,6 °, 18,9°, 21,5° y 22° (Di Battista et al., 2018; Vaikousi et al., 2007); la no presencia de estos en el difractograma, ni de alguno otro fijo permite determinar que la formulación óptima tiene una estructura amorfa; lo cual se puede comparar con el resultado de la micrografía anteriormente obtenidas, desde su morfología. La cristalinidad de los FE y su baja solubilidad en aceite y en agua son factores limitantes para su incorporación en diferentes matrices alimentarias (Chaudhari et al., 2014); con lo cual al interrumpir la cristalinidad se mejora la dispersión de estos y permite tener más aplicación en alimentos (Moschakis et al., 2017).



**Figura 19.** Difractogramas de los agentes encapsulantes y la formulación óptima

Por otra parte, la formulación óptima al presentar las características de cada uno de los agentes encapsulantes, es posible inferir que el método encapsulación usado permite no solamente una integración física sino también una integración estructural entre los agentes encapsulantes empleados.

## 2.4. Conclusiones parciales

Las emulsiones de alimentación para el secado por aspersion elaboradas con los agentes encapsulantes (GA, PAS y M) y extracto de FE obtenido a partir del bagazo de caña de azúcar, presentaron una viscosidad inferior a 300 cps, lo que permitió que todas las emulsiones fueran secadas, contando con rendimientos en el proceso entre 28 -76%.

La interacción GA con M, proporcionaron las más bajas EE, mientras la mezcla de PAS con GA o M, ofrecían mejores EE, sugiriendo que la M en este estudio no es adecuado para la encapsulación del extracto a pesar de su capacidad de formación de película; sin embargo, la PAS, un agente emulsificante poco empleado en los secados, debido a su buena capacidad emulsificante, proporcionó mejor encapsulación del extracto.

Los parámetros de Aw y humedad, obtenidos en este estudio correspondieron a rangos de 0,36 a 0,58 y 1,7 a 10,2%, respectivamente; valores que, a pesar de ser ligeramente altos en comparación con otros estudios, permiten ser considerados microbiológicamente estables.

La solubilidad se vio altamente afectada no solo por el tamaño de partícula de los productos en polvo, sino también por el material encapsulante empleado, demostrando que las menores solubilidades correspondieron a la PAS, mientras que las que contenían GA y M, fueron las mejores debido a su capacidad de disolución y poca capacidad de formar gel.

Mediante el diseño de mezclas planteado, se logró maximizar la función deseabilidad en un 76%, indicando que la combinación de agentes encapsulantes que el programa propone ajusta la optimización de todas las variables respuesta analizadas en dicho porcentaje; el cual es corroborado al realizar un secado a las condiciones propuestas.

### **3. INCORPORACIÓN DE FITOESTEROLES EN MATRICES LIQUIDAS - BEBIDAS DE FRUTAS**

#### **3.1.Marco Teórico**

##### ***3.1.1. Alimentos funcionales***

En los últimos años, se ha visto la necesidad de ofrecer a las personas, alimentos que vayan más allá de solo satisfacer un requerimiento biológico de nutrir (Valenzuela et al., 2014); que puedan ayudar a la prevención de enfermedades relacionadas con la nutrición y el mejoramiento del bienestar físico y mental (Agriculture and Agri-Food Canada, 2009; Siró et al., 2008), generándose así un concepto que se encuentra ampliamente difundido, el de alimentos funcionales. Aunque no se encuentra una definición única aceptada para estos, se podría simplificar en que su consumo además de una nutrición básica, genera beneficios para la salud y/o reducción de riesgo de enfermedades (Gilbert, 1997; Sarmiento Rubiano, 2006; Siró et al., 2008). Lo anterior puede ser logrado mediante la adición de ingredientes funcionales que se emplean para dar valor agregado a los alimentos, entre los cuales se destacan los compuestos bioactivos, como ácidos grasos, carotenoides, tocoferoles, polifenoles, FE y vitaminas liposolubles (Marsanasco et al., 2015), minerales, prebióticos, probióticos y fibras, entre otros, los cuales se pueden encontrar e incorporar en alimentos como bebidas, cereales, productos de panadería, carnes, huevos (Siró et al., 2008), entre otros.

Una forma de prevenir el aumento de las enfermedades en la población es influyendo en su alimentación, proporcionándoles alternativas de productos que se encuentren en el mercado, y que puedan ayudar a prevenir, disminuir o controlar el riesgo de padecer alguna enfermedad. Revisando evidencias que muestren alternativas disponibles en el mercado de alimentos que promueven la salud, se encuentra un estudio realizado por Duran y Valenzuela, en el año 2010, de

cómo ha sido la distribución de los alimentos funcionales en el mercado (Durán C & Valenzuela B, 2010). Cabe destacar que la mayor proporción de estos que se encuentran en el mercado están dirigidos a una mejora en la salud gastrointestinal, mientras los alimentos relacionados a la prevención de enfermedades cardiovasculares pasan a segundo plano, destacando así, como solo un pequeño segmento del mercado se encuentra dirigido al control del colesterol; razón por la cual la presente investigación cobra relevancia en atención a la prevalencia del riesgo cardiovascular en el incidencia de muertes en el ámbito mundial.

### ***3.1.2. Bebidas de frutas y su crecimiento***

El consumo de bebidas refrescantes en el mundo ha venido en crecimiento en los últimos años, en esta categoría se resaltan el agua en botella, bebidas carbonatadas, energéticas y para deportistas, jugos, té y café. Productos que hasta el 2018, han proporcionado ventas de más de USD 805.7 billones y de las cuales los jugos se encuentran en el tercer lugar con ventas superiores a los USD 129 billones, precedidos del agua (USD 210 billones) y las bebidas carbonatadas (USD 296 billones) (Euromonitor, 2018). No obstante, la tendencia a la reducción de azúcares y calorías se hace cada vez más fuerte no solo a nivel mundial, sino también en Colombia, donde las tendencias, para el año 2016 analizando las preferencias de los consumidores se basaron en los productos 100% natural, aquellos con adición de vitaminas o fibra, bajas calorías y adición de azúcar (Euromonitor Internacional, 2017a, Euromonitor, 2018). Estas tendencias se puede estar marcando debido a las estrategias que ha implementado el gobierno para la reducción de algunos problemas de salud pública como la obesidad (Ministerio de Salud y Protección Social, 2005), que es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Además, en Colombia se estimó un aumento en el consumo de bebidas refrescantes del 28% (Euromonitor Internacional, 2017b), en especial en el segmento de jugos naturales, debido a las preferencias del consumidor por cuidar su salud (Euromonitor Internacional, 2017b; Salazar, 2017). En vista a esto, Colombia se ha destacado por la gran producción de frutas que se cultivan y exportan tales como las exóticas (gulupa, maracuyá, uchuva) y las tropicales (mango y piña) (Ruiz Rico, 2020), pero de estas frutas su consumo interno es bajo y puede ser costoso para que sea accesible a toda la población. No obstante, al mirar toda la cadena frutícola, es posible distinguir que el sector de los cítricos, ha venido en aumento y es uno de los más consumido en el país (Orduz- Rodriguez, 2020), a su vez, de estos, el cultivo naranja se ha destacado, ocupando más del 47% en plazas de mercado (Ministerio De Agricultura y Desarrollo Rural, 2019) y prefiriendo su consumo en fresco o en bebidas (Orduz- Rodriguez, 2020), a pesar de esta última se encuentre internamente poco tecnificado y no aporte valor agregado a la cadena frutícola. Por lo que adicionar ingredientes funcionales a estas bebidas puede ser beneficio para el desarrollo de la región.

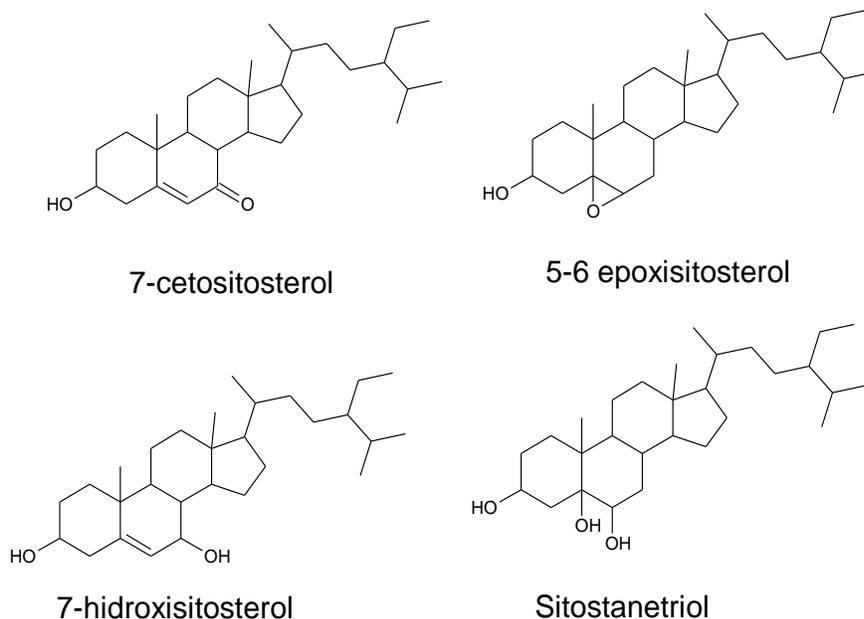
### ***3.1.3. Estabilidad de los fitoesteroles en matrices alimentarias***

Los FE son estables y microbiológicamente inertes; muestran estabilidad a diferentes valores de pH durante el almacenamientos en periodos mayores a 1 año (Chaudhari et al., 2014; Raju et al., 2013), sin embargo, son inestables a altas temperaturas ( $>100^{\circ}\text{C}$ ) y en presencia de oxígeno (Chaudhari et al., 2014; Soupas, 2006; Tolve et al., 2020). Esto se debe a la presencia de insaturaciones en el C-5 y en el ácido graso con el que fue esterificado el FE (Scholz et al., 2015).

La estabilidad de los FE en bebidas se muestran en algunos estudios como el presentado por González-Larena et al., (2012), quien evaluó el contenido de FE adicionados en 3 matrices líquidas

(bebida con leche y jugo de frutas, bebida de frutas y leche) durante 6 meses a diferentes temperaturas (4, 24 y 37 °C), concluyendo que no hubo ningún cambio en el contenido de FE durante el almacenamiento para las diferentes matrices. Resultado que difiere al encontrado por Menéndez-Carreño et al., (2008), donde una leche comercial con FE adicionados presentó una reducción del 4% en el contenido de éstos cuando se almacenó durante 1 mes a 25°C. Al igual, Alemany-Costa et al., (2012) también evaluaron el contenido de FE en dos bebidas (frutas y de fruta con leche), evaluando dos fuentes diferentes de FE encapsulados, libres y esterificados y el procesamiento de la muestra incluyó agitación a alta velocidad para su incorporación, homogenización a 150 bar y pasteurización a 90°C durante 30 s, con un llenado en caliente (80°C), a estas condiciones de procesamiento, se encontraron pérdidas de FE entre el 21-27% con respecto al valor teórico; esto es posible debido a que se haya presentado ruptura en las microcápsulas, exponiéndolos al oxígeno y a la temperatura de llenado.

Al presentar una estructura similar con el colesterol, es posible que los FE presenten las mismas reacciones de termo-oxidación, originando así productos de oxidación (Scholz et al., 2015). Los POPs- productos de oxidación de FE, han sido correlacionados a efectos aterogénicos, involucrando procesos inflamatorios y degenerativos (Julien-David et al., 2014; Scholz et al., 2015; Tolve et al., 2020), por lo que se hace necesario conocerlos, para evitar resultados adversos en su incorporación en diferentes matrices. Los POPs más comunes son los compuestos ceto, epoxi e hidroxil (Figura 20), formados a altas temperaturas de procesamiento, siendo los FE más estables que los ácidos grasos monoinsaturados, por su estructura (Tolve et al., 2020).



**Figura 20.** Estructuras de productos de oxidación de FE a partir del sitosterol

Los factores críticos para la formación de POPs, están asociados a la estructura de los FE (libre o esterificada), temperatura, tiempo de calentamiento y composición lipídica de la matriz (Soupas, 2006; Tolve et al., 2020). En el caso estructural, la esterificación afecta la estabilidad oxidativa, haciendo esta forma más reactiva que la libre en matrices saturadas a 100°C (González-Larena et al., 2012); pero los FE libres son más susceptibles a temperaturas de 180°C y a la auto-oxidación debido a que el grupo hidroxilo libre en C3, está más expuesto a las interfases aire o agua, incrementando su oxidación (Lin et al., 2017). Por lo anterior, un alimento con FE, con tratamiento térmico inferior a 100°C, almacenado a temperaturas de refrigeración y con presencia de compuestos antioxidantes, podría evitar la formación de POPs y mantener su contenido de FE en el tiempo (González-Larena et al., 2012).

La cantidad de POPs, generados en bebidas a condiciones de almacenamiento es baja como se aprecia en los estudio de González-Larena et al., (2015), en el que la bebida de frutas evaluada presentó niveles de oxidación <0,17%, (497 µg/100 g bebida) a condiciones de 37°C durante 6

meses; valor mucho mayor al obtenido por Alemany-Costa et al., (2012), al evaluar los POPs en una bebida también de frutas con FE (libres y esterificados), obteniendo una generación de POPs del 0,07% sin diferencias entre las formas del FE. Con respecto a un producto lácteo comercial enriquecido con FE y sometido a un calentamiento de 65°C durante 24 h, generó una oxidación de FE de un 0,37% (Menéndez-Carreño et al., 2008). Este valor ligeramente mayor que los otros estudios, puede interpretarse, como la presencia de antioxidantes previenen significativamente la aparición de POPs.

#### ***3.1.4. Normativa***

Con el objetivo de informar y proteger al consumidor sobre las propiedades nutricionales y funcionales de un alimento, se plantan diferentes regulaciones que pueden cambiar según el país y aplica también con adición de FE, en los cuales se debe especificar información sobre la matriz, el tamaño de porción, declaraciones que se pueden reportar en la etiqueta y máximas dosis permitidas en cada producto (Tolve et al., 2020). En algunas regiones del mundo como Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, se cuentan con declaraciones de salud, y mínimos de adición de FE, como se verá a continuación:

Los FE son considerados GRAS (generalmente reconocidos como seguros) en Estados Unidos (Chaudhari et al., 2014), entre las categorías de alimentos que han sido aprobadas para adicionarlos se encuentran margarinas, productos de panadería, lácteos, cereales, aceites, aderezos y jugos (Zawistowski & Jones, 2015) bajo la declaración de “los esteres de esteroides/estanoles vegetales puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca”, con un consumo de 1,3g/día de FE esterificados para reducir tal riesgo (Food and Drug Administration, 2016).

En la Unión Europea, un consumo diario mínimo de 0,8 g de FE libres, para declarar que “Los fitoesteroles (y estanoles), han mostrado que reducen el colesterol en sangre- El colesterol alto es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades coronarias” ((EU) No 432/2012 “List of Permitted Health Claims Made on Foods, Other than Those Referring to the Reduction of Disease Risk and to Children’s Development and Health,” 2012; Plant Stanol Esters and Blood Cholesterol - Scientific Substantiation of a Health Claim Related to Plant Stanol Esters and Lower/Reduced Blood Cholesterol and Reduced Risk of (Coronary) Heart Disease Pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006, 2006)), declaración aprobada para alimentos como margarinas, bebidas a base de leche, productos lácteos con adición de frutas y/o cereal, leche descremada y semi descremada, yogur, bebidas lácteas fermentadas, bebidas de soya, aderezos, salsas y quesos; pero no fue aprobada para alimentos cárnicos, de panadería, jugos y néctares (Zawistowski & Jones, 2015).

En Australia y Nueva Zelanda para que alimentos como aceites, margarinas, cereales para el desayuno, jugos de fruta, néctar leche, yogures y quesos bajos en grasa, (FSANZ -Food Standards Australia New Zealand, 2005), puedan incluir la declaración “reduce colesterol en sangre”, estos deben de contener al menos 0,8 g de FE (en forma libre) (Zawistowski & Jones, 2015).

En Canadá “los fitoesteroles pueden reducir el colesterol. El colesterol alto es un factor de riesgo para enfermedades del corazón” (Bureau of Nutritional Sciences Food Directorate, 2010) aprobado para alimentos como margarinas, mayonesa, aderezos para ensaladas, yogur, jugos de frutas y vegetales, enriquecidos con máximo 1g por porción, para un consumo de 2 g/día.

Con respecto a la legislación colombiana, entre las declaraciones de propiedades de salud relacionadas con reducción de riesgos de enfermedad, se pueden relacionar los esteres de esterol

o estanol de origen vegetal y el riesgo de enfermedad cardiovascular, la cual se puede declarar si se cumplen estos requisitos:

- El alimento debe contener al menos 0,65 g de ésteres de esteroides vegetales por porción, específicamente para el caso de esparcibles y aderezos para ensalada, o al menos 1,7 g de ésteres de estanoles vegetales por porción, específicamente para el caso de esparcibles, aderezos para ensaladas y pasabocas.
- El consumo diario de ésteres de esteroles o de estanol vegetal debe efectuarse en dos (2) porciones a diferentes horas del día y con otros alimentos.
- El alimento debe cumplir con los requisitos sobre contenido de nutrientes, para alimentos considerados como “bajos” en grasa saturada y “bajos” en colesterol conforme se define en el Capítulo V de la resolución 333 de 2011.
- El alimento no debe contener más de 13 g de grasa total por cantidad de referencia, por porción declarada en la etiqueta y por 50 g. Sin embargo, los esparcibles y aderezos de ensaladas no necesitan cumplir con el límite de grasa total por 50 g, si en la etiqueta del alimento se declara.

Conocer el impacto legislativo sobre los productos enriquecidos con FE, incluidos la selección de la matriz, tamaño de la porción, cantidad mínima declarable y dosis diaria máxima permitida, son algunos aspectos a tener en cuenta para la formulación de cualquier alimento.

### *3.1.5. Estudios Clínicos de fitoesteroides en matrices alimentarias y farmacéuticas*

Los FE son actualmente empleados como ingredientes de alimentos funcionales debido sus propiedades en la salud, principalmente por su conocida actividad de reducción del colesterol total

y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (González-Larena et al., 2012; Kamal-Eldin & Moazzami, 2009; Taşan et al., 2006). La forma en que se administran los FE (libres o esterificados) y fitoestanoles en los alimentos es importante, ya que, aunque libres y esterificados tienen el mismo efecto reductor sobre las lipoproteínas del plasma, su solubilidad o emulsificación adecuada influye de forma importante en su mecanismo de acción (Hung Llamas et al., 2008).

Las matrices en las que se encuentran los FE, corresponden a margarinas, chocolate, leche, yogur, bebidas bajas en grasas y jugo de naranja (Anexo B. Matrices alimentarias adicionadas con fitoesteroles y sus efectos sobre el perfil lipídico), de las cuales la mayoría se caracterizan por poseer algún contenido graso en su composición, y solo pocos estudios muestran FE dispersos en jugo de naranja. Por otra parte, es posible establecer que la mayor cantidad de estudios clínicos que se relacionan con alimentos ricos en FE, se centran en Europa, siendo Finlandia, el de mayor participación; y en Norte América, con Canadá como el país de mayor cantidad de estudios clínicos (compañías comercializadoras y más cantidad de alimentos funcionales orientados a la reducción del colesterol).

Por otra parte, la dosis de incorporación de los FE en equivalentes de forma libres (para productos con esteroles vegetales esterificados) se encuentran en el rango de 0,7 a 3 g FE/ día, y en fitoestanoles de 1,6- 8,8g/día, con una frecuencia de 1-3 porciones por día, siendo 1 vez al día, durante o inmediatamente después de una comida principal, la frecuencia de consumo más empleada (Anexo B). Los estudios clínicos recopilados en el anexo, permite determinar que las edades de intervención son de 6 a 80 años; siendo la edad infantil el rango de edades menos tratada durante la intervención, las cuales tienen duraciones entre 3- 12 semanas.

A pesar que se ha establecido un rango de las concentraciones de FE, para ser adicionados en los alimentos, según la legislación y así lograr el efecto deseado sobre el perfil lipídico, los estudios variando frecuencias, dosis y duración de intervención continúan en proceso. Esto es posible debido no solo a que la matriz alimentaria juega un papel muy importante en la adecuada funcionalidad de los ingredientes, sino también a que algunos estudios clínicos han demostrado que el efecto hipocolesterolémico no siempre se reproduce, dependiendo de las diferencias genéticas de los pacientes y en el metabolismo de los esteroides (Weingärtner et al., 2014).

Algunos estudios buscan que, con el consumo de alimentos con FE, se proporcione una alternativa profiláctica antes de consumir fármacos para la reducción del colesterol. Tal es el caso del trabajo de Jones et al., (2003a), en el que intervino a un grupo con hipercolesterolemia moderada (anexo B), brindando una bebida con bajo contenido graso, para un consumo de 1,8 g FE/día y logrando una reducción del colesterol total -CT- y LDL de aproximadamente 10%; con este mismo objetivo Thomsen et al., (2004), proporcionó una bebida láctea baja en grasa, variando la cantidad de FE libres entre 1,2 y 1,6 g FE/día, obteniendo en su grupo una reducción del CT del 4 y 7% y disminución en LDL del 7 y 9% (resaltando que la mayor adición de FE, presentó mejores beneficios). Estos resultados son similares, si se comparan con el estudio de Gomes et al., (2017) al proporcionar una cantidad de 1,8g FE libres/ día, en una forma farmacéutica de capsula blanda, logrando una disminución del CT y LDL-C de 8 y 9%, respectivamente, para pacientes con hipercolesterolemia moderada-alta.

**Tabla 12.** Valores de referencia de Colesterol total y LDL

<b>Condición</b>	<b>Colesterol total</b>	<b>Colesterol LDL</b>
Normo-colesterolemia	<200 mg/dL (<5,2mmol/L)	< 135 mg/dL (<3,5 mmol/L)
Hipercolesterolemia leve	200-250 mg/dL (5,2–6,5mmol/L)	135-175 mg/dL (3,5–4,5 mmol/L)
Hipercolesterolemia moderado	250-300 mg/dL (6,5-7,8 mmol/L)	175-215 mg/dL (4,5-5,6mmol/L)
Hipercolesterolemia Alta	>300 mg/dL (>7,8 mmol/L)	>215 mg/dL (>5,6mmol/L)

Tabla adaptada y modificada de Carretero Colomer, (2008)

Hay estudios en los que se hacen terapias combinadas de FE con estatinas y ezetimiba, dado que se pueden encontrar efectos sinérgicos, principalmente asociados a reducciones del LDL y CT (Malina et al., 2015). Sin embargo en el trabajo de Gomes et al., (2017) donde el grupo intervenido contaba con prescripción de tratamiento con estatinas, el consumo de este medicamento con FE incorporados en una matriz grasa (margarina), presentó una reducción de CT y LDL de 13 y 16%, respectivamente; ligeramente mayor que las disminuciones de otros estudios, no obstante, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con o sin FE.

Las matrices alimentarias a pesar de su complejidad contienen diferentes compuestos que ayudan a mejorar la reducción del colesterol en comparación de las formas farmacéuticas, las cuales pueden tener menor efecto que los alimentos (ver Anexo B y Anexo C). Tal es el caso de la intervención realizada por Maki et al., (2012), en el que, el consumo de tabletas con FE (1,8 g FE/día), logró una reducción en el CT del 3% y el LDL del 5%; sin embargo a la misma concentración de FE y condiciones de hipercolesterolemia leve a moderada de los paciente, con matrices alimentarias se logró una disminución del 11% en CT y 10% en LDL (Jones et al., 2003), proporcionando el alimento muchos mejores resultados.

Otro aspecto a tener en cuenta es que algunos autores consideran que los FE pueden afectar la absorción de vitaminas liposolubles y carotenoides (Chaudhari et al., 2014); esta tendencia se aprecia en mayor proporción en las formas esterificadas (Devaraj et al., 2006). En estudios realizados por Amir Shaghghi et al., (2014) y Devaraj et al., (2006), con productos como yogur y jugo de naranja (respectivamente), no se encontró ninguna reducción significativa sobre otros componentes liposolubles tales como vitaminas; pero este comportamiento no se reproduce en todos los alimentos, ya que al consumir 8,8 g/ día en una margarina, Gylling et al., (2010), encontró que se presentaron reducciones del 15% en las concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol y 45% en el  $\beta$ -caroteno. Este resultado en parte puede darse por la cantidad de estanoles incorporados, los cuales pueden afectar la concentración micelar en el intestino, impidiendo la adecuada formación de micelas y en ellas de otros compuestos para ser absorbidos.

### 3.2. Metodología

#### 3.2.1. Preparación de bebida de naranja con fitoesteroles

A una bebida de naranja comercial, 100% natural y sin conservantes (tabla 13), se le adicionaron microcápsulas de FE previamente obtenidas, hasta lograr una concentración de 0,4g de FE libres por porción. El jugo fue homogenizado manualmente, envasado en un ambiente aséptico, en botellas tipo bala de polietileno tereftalato (PET) de tapa rosca, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (concentración de 200ppm durante 10 min y enjuague con agua potable 2 veces).

La bebida comercial (Jugo de naranja control) y la adicionada con FE (Jugo con FE), fueron almacenadas en oscuridad y refrigeración, hasta la realización de análisis microbiológico, sensorial y fisicoquímico (este último para determinación de vida útil).

**Tabla 13.** Caracterización nutricional y fisicoquímica de bebida de naranja comercial por cada 100mL

<b>Nutriente/Aspecto</b>	<b>Cantidad</b>
Grasa total	0 g
Colesterol	0 mg
Sodio	0 mg
Carbohidratos totales	9 g
Proteína	0,5g
Calorías	35 cal
Fibra	0,2g
Vitamina C	22 mg
°Brix	10
pH	3,2
Acidez	1,0%

### ***3.2.2. Caracterización microbiológica y sensorial del jugo de naranja con fitoesteroles***

#### **3.2.2.1. Caracterización microbiológica de las bebidas**

Para la determinación de la calidad microbiológica de las bebidas con y sin microcápsulas de FE, se siguieron las metodologías planteadas por el ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas) para el recuento coliformes totales, fecales (*E. coli*), aerobios mesófilos, mohos y levaduras.

#### **3.2.2.2. Determinación de Coliformes totales y fecales (*E. coli*)**

Los coliformes son un grupo de bacterias con importancia relevante en los alimentos, ya que es un indicador de contaminación. Para la determinación de estos, se tuvo en cuenta la metodología empleada en la NTC 4458 (2018). A cada bebida, previamente homogenizada, se le realizan diluciones (hasta llegar a  $10^{-3}$ ) con agua de peptona 0,1%. De estas diluciones se toma 1 mL y se depositan en cajas de Petri estériles, en las que posteriormente se vierten 10 mL del medio selectivo (fluorogénico), se agita la mezcla, se deja solidificar, se incuban las cajas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 h y se hace el conteo de las colonias.

Para el caso de coliformes fecales, se emplea una lámpara de fluorescencia de 360nm, si fluoresce es positivo para este análisis. El resultado, se reporta como unidades formadoras de colonia por mL de muestra (UFC/mL).

#### **3.2.2.3. Recuento de aerobios mesófilos**

Este análisis se realiza de acuerdo a la NTC 4519 (2009). Se tomó 1 mL de las diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$  y se adicionó en cajas de Petri estériles vacías, a las cuales se les agregó 15 mL de

agar cuenta gérmenes. Esta mezcla fue agitada cuidadosamente, homogenizando toda la muestra, se dejó solidificar y posteriormente las cajas de Petri fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

#### **3.2.2.4. Determinación de mohos y levaduras**

Las muestras fueron sembradas en superficie; 0,1 mL de las diluciones anteriormente preparadas de las bebidas (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$ ), en cajas de Petri con agar selectivo para mohos y levaduras previamente solidificado, se dispersa cuidadosamente con un esparcidor estéril, se incuban a 25°C por 5 días. Pasado este tiempo se procede al conteo (NTC 5698-1, 2009).

#### **3.2.2.5. Evaluación sensorial-análisis descriptivo cuantitativo QDA**

La prueba sensorial QDA se realizó con 6 jueces entrenados según la GTC 280:2017. Las muestras (jugo control y con FE) fueron codificadas aleatoriamente, la identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por aproximación multidimensional fue realizado según NTC 3932:1996, GTC 232:2020–Metodología. Guía general para el establecimiento de un perfil sensorial; NTC 5328:2004 –Directrices para el uso de escalas de respuesta cuantitativas

Los descriptores sensoriales fueron calificados en una escala de intensidad de 10 puntos. Donde 0,0 es ausencia del atributo, 0,6-2,9 muy leve; 3,0-4,9 leve; 5,0-6,9 moderada, 7,0-8,9 marcado y 9,0-10,0 muy marcado el descriptor analizado.

#### ***3.2.3. Estimación de la vida útil de jugo de naranja con fitoesteroides encapsulados***

La vida útil de un alimento, está definida como el tiempo en el que se garantiza que el producto presenta sus características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales, aceptables según legislación o consumidor. Por lo que en este estudio, tanto el jugo control (JNC) como el

adicionado con fitoesteroides (JFE), fueron almacenados en dos condiciones controladas de temperatura (10 y 20°C), en ausencia de luz directa y evaluando algunas propiedades fisicoquímicas y sensoriales, cada cierto tiempo.

Los análisis fisicoquímicos llevados a cabo correspondieron a medición de pH (método potenciométrico), sólidos disueltos totales y conductividad (determinados con conductivímetro TDS/ EC) y evaluación sensorial. Este último correspondió a una prueba de aceptación realizada con 10 consumidores frecuentes de bebidas de naranja, entre 20-65 años; los cuales evaluaron el sabor y satisfacción general sobre las bebidas, usando una escala hedónica de 9 puntos (1 = me disgusta extremadamente, 2 = me disgusta mucho, 3 = me disgusta moderadamente, 4 = me disgusta un poco, 5 = no me gusta/ ni me disgusta, 6 = me gusta poco, 7 = me gusta moderadamente, 8 = me gusta mucho, 9 = me gusta extremadamente), como es sugerido por Janzanti et al., (2014).

### 3.3.3.1. Modelo matemático para estimación de vida útil

Para la modelación del efecto de la temperatura sobre las bebidas se empleó el cálculo de valor  $Q_{10}$  (ecuación 5) con respecto a la energía de activación.

$$\ln Q_{10} = \frac{E_a}{R} \left[ \frac{10}{T(T+10)} \right] \quad \text{Ecuación 5}$$

$E_a$ = Energía de activación de la reacción

$R$ = Constante de los gases ideales (8,314 J/mol\*K)

$T$ = Temperatura en °K (°C + 273,15)

### **3.3.Resultados y discusión**

La matriz seleccionada para adicionar los FE encapsulados (Jugo de naranja), cumple con los requisitos que se consideran necesarios para poder adicionar estos compuestos funcionales a un alimento: bajo contenido en grasa saturada y colesterol y no contener más de 13 g de grasa total por porción, según la resolución 333, (2011); por lo que se podría optar por contener la declaración de propiedades de salud relacionadas con reducción de riesgos de enfermedad (ésteres de esterol de origen vegetal y el riesgo de enfermedad cardiovascular). Sin embargo, dado que la declaración propuesta en la legislación colombiana hace referencia al consumo mínimo de 0,65g ésteres de esterol vegetal en dos porciones, las cantidades adicionada de FE fue corregida en termino de FE libres. La equivalencia para la conversión de FE esterificados a libre, corresponde al 60% del valor del FE esterificado (FSANZ, 2010).

En la Figura 21, se presenta la información nutricional de la bebida de naranja con adición de FE encapsulados, elaborada de acuerdo a los parámetros establecidos en la Resolución 333, (2011). De la tabla nutricional presentada se destacan varios aspectos asociados a la composición de los agentes encapsulantes (GA, PAS y M) empleados para el desarrollo.

<b>Información Nutricional</b>			
Tamaño por porción 250ml			
Porciones por envase 1			
<b>Cantidad por porción</b>			
<b>Calorías</b> 180	Calorías de grasa 0		
<b>Valor Diario*</b>			
<b>Grasa Total</b> 0g	0%		
Grasa Saturada 0g	0%		
Grasa Trans 0g			
<b>Colesterol</b> 0mg	0%		
<b>Sodio</b> 0mg	0%		
<b>Carbohidrato Total</b> 37g	12%		
Fibra dietaria 19g	76%		
Azúcares 15g (propios de la fruta)			
<b>Proteína</b> 7g	14%		
Vitamina A 0%	Vitamina C 90%		
Calcio 0%	Hierro 0%		
* Los porcentajes de Valores Diarios están basados en una dieta de 2000 calorías. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades calóricas.			
	Calorías	2000	2500
Grasa Total	Menos de	65g	80g
Grasa Sat.	Menos de	20g	25g
Colesterol	Menos de	300mg	300mg
Sodio	Menos de	2.400mg	2.400mg
Carb. Total		300g	375g
Fibra dietaria		25g	30g
Calorías por gramo:			
Grasa 9	Carbohidratos 4	Proteína 4	

**Figura 21.** Tabla nutricional de jugo de naranja con fitoesteroles

Como se puede apreciar la cantidad de fibra aumentó con respecto a la bebida control (comercial), esto se debe a la presencia de goma arábica, la cual es considerada como fibra dietaria de alto peso molecular (Vilcanqui-Pérez, Fulgencio Vílchez-Perales, 2017). El porcentaje de fibra reportado en la bebida, permite a su vez, declarar que es alta en fibra, ya que proporciona más del 20% del valor de referencia para este nutriente (Resolución Número 333, 2011); además, este

producto puede poseer otras declaraciones de propiedades de salud relacionadas con reducción de riesgos de enfermedad como: la fibra dietaria y la reducción del riesgo de cáncer, y la fibra dietaria con la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular. Esta última declaración también es posible resaltarla por la adición de proteína aislada de soya, a la que también se ha asociado con la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular (Zahid et al., 2020).

Con respecto a otros trabajos en los que se adicionó FE a bebidas, se encuentra que en los estudios de Devaraj et al., (2004, 2006), el jugo de naranja de 240 mL fue adicionado con 1g de FE libres al día, y presentaba solo 110 calorías; mientras que en el presente estudio se suman 70 calorías adicionales; las cuales son explicables por la adición de FE encapsulados con goma arábica, proteína aislada de soya y maltodextrina.

### ***3.3.1. Caracterización microbiológica y sensorial de la bebida de naranja con fitoesteroles***

#### **3.3.1.1 Análisis microbiológico**

Los resultados microbiológicos obtenidos (Tabla 14) fueron comparados con los límites permisibles para las frutas y las bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta, o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de estos que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio colombiano, según la resolución 3929, (2013), específicamente para Jugos (zumo) pasteurizados edulcorados o no.

**Tabla 14.** Análisis microbiológicos de la bebida de naranja control y con adición de FE

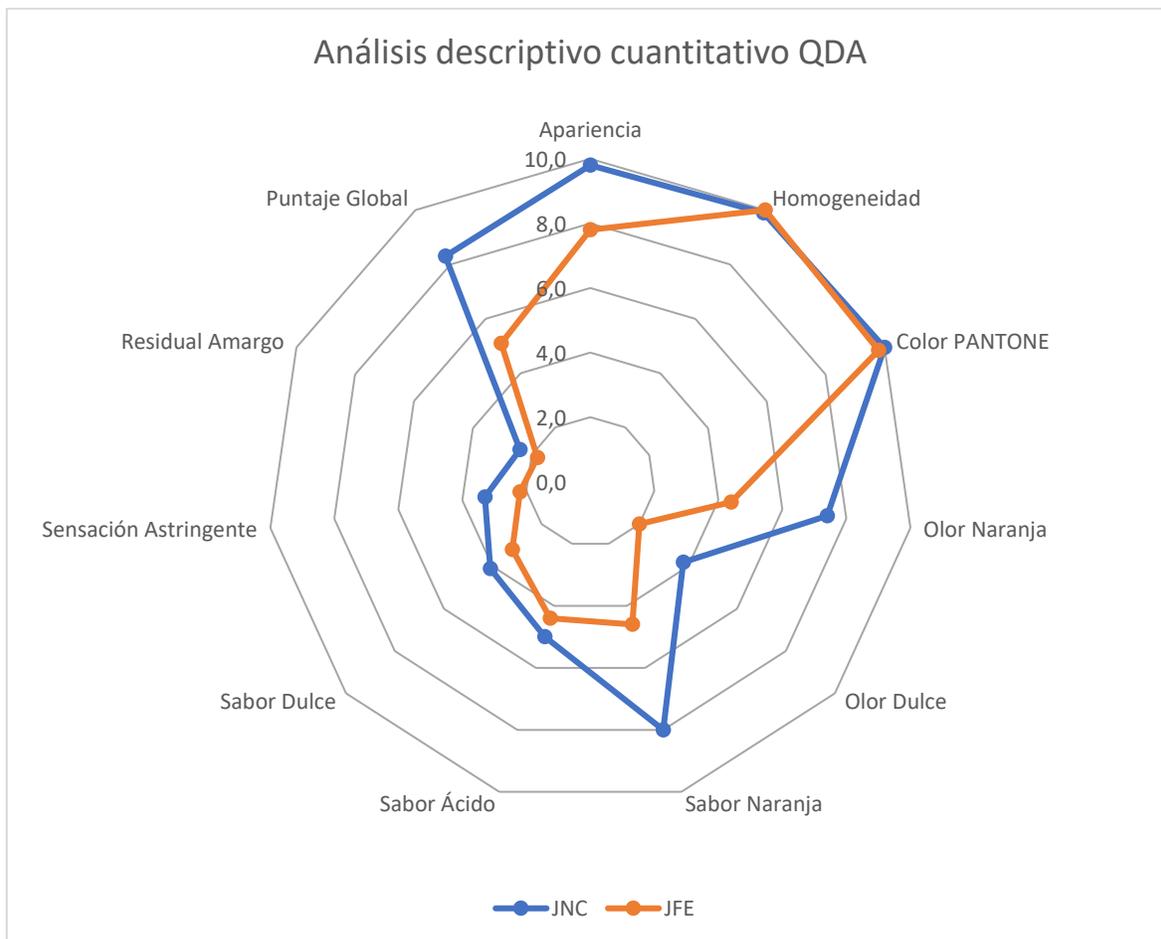
Análisis realizado	Jugo de naranja Control	Jugo de naranja con FE	Especificación
Recuento Coliformes totales	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	N/A
Recuento Coliformes fecales ( <i>E. coli</i> )	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL
Recuento Aerobios mesófilos	20 ufc/mL	45 ufc/mL	1000-3000 ufc/mL
Recuento Mohos y levaduras	<10 ufc/mL	<10 ufc/mL	100-200 ufc/mL

La calidad microbiológica del jugo de naranja con FE cumple con todas las especificaciones necesarias para ser considerado apto para el consumo. Sin embargo, al comparar el jugo de naranja control con el que contiene FE, es posible determinar una diferencia en el análisis de recuento de aerobios mesófilos, lo que refleja que es posible que en el proceso de secado por aspersión (específicamente en la recolección del material en polvo), las microcápsulas de FE necesiten mayor control, bien sea por la calidad de las materias primas, el proceso de limpieza y desinfección del equipo, la carga microbiana propia del ambiente en el que se hace el secado o el lugar de almacenamiento. Si bien, aun su cantidad está muy por debajo de las especificaciones máximas, la presencia de estas bacterias puede llevar a que se genere un deterioro microbiológico, mayor y más rápido, que en la bebida control. El recuento de aerobios mesófilos, es un indicador de la posible presencia de agentes patógenos, de manejos higiénicos deficientes, malas condiciones de almacenaje (en alimentos secos indican si la humedad se ha controlado), fuentes de contaminación (productos expuestos a ambientes no estériles) y de eficiencia germicida (Hernandez Urzúa, 2016).

### 3.3.1.2. Análisis sensorial

El propósito de la prueba sensorial, análisis descriptivo cuantitativo (QDA por sus siglas en inglés “Quantitive Descriptive Analysis”) es describir y cuantificar la intensidad de los atributos sensoriales de olor y sabor percibidos en los alimentos, en este caso en particular en los jugos de

naranja control (JNC) y con fitoesteroles (JFE). En la Figura 22, se aprecian los descriptores analizados en el análisis QDA para las dos bebidas.



**Figura 22.** Intensidades de los descriptores sensoriales para las muestras de JNC (Jugo de naranja control) y JFE (Jugo de naranja con fitoesteroles)

Para el JNC, los descriptores de apariencia, homogeneidad, olor naranja, sabor naranja y puntaje global, se percibieron con una intensidad alta (marcada o muy marcada), pero los atributos de olor dulce, sabor dulce, sensación astringente y residual amargo, en menor intensidad (leve o muy leve). El color de referencia en esta bebida correspondió a PANTONE® 113 C (Figura 23). Esta muestra

control, permite distinguir las propiedades iniciales del jugo de naranja antes de la adición de FE encapsulados y diferenciar cuales son los atributos que más se afectan.

Con respecto al JFE, la Figura 22 muestra que los descriptores de apariencia y homogeneidad, continúan presentándose en mayor intensidad; y el olor dulce, sabor ácido, sabor dulce, sensación astringente y residual amargo, se perciben en intensidad leve o muy leve, numéricamente menor que con el JNC. Además, se puede comparar que los descriptores de olor y sabor a naranja, fueron los atributos que más variaron al adicionar las micropartículas a la bebida. El color de referencia para el JPE fue el PANTONE® 127 C (Figura 23).

PANTONE 100 C	PANTONE 101 C	PANTONE 102 C	PANTONE Yellow C	PANTONE 103 C	PANTONE 104 C	PANTONE 105 C
PANTONE 106 C	PANTONE 107 C	PANTONE 108 C	PANTONE 109 C	PANTONE 110 C	PANTONE 111 C	PANTONE 112 C
PANTONE 113 C	PANTONE 114 C	PANTONE 115 C	PANTONE 116 C	PANTONE 117 C	PANTONE 118 C	PANTONE 119 C
PANTONE 120 C	PANTONE 121 C	PANTONE 122 C	PANTONE 123 C	PANTONE 124 C	PANTONE 125 C	PANTONE 126 C
PANTONE 1205 C	PANTONE 1215 C	PANTONE 1225 C	PANTONE 1235 C	PANTONE 1245 C	PANTONE 1255 C	PANTONE 1265 C
PANTONE 127 C	PANTONE 128 C	PANTONE 129 C	PANTONE 130 C	PANTONE 131 C	PANTONE 132 C	PANTONE 133 C
PANTONE 134 C	PANTONE 135 C	PANTONE 136 C	PANTONE 137 C	PANTONE 138 C	PANTONE 139 C	PANTONE 140 C
PANTONE 1345 C	PANTONE 1355 C	PANTONE 1365 C	PANTONE 1375 C	PANTONE 1385 C	PANTONE 1395 C	PANTONE 1405 C
PANTONE 141 C	PANTONE 142 C	PANTONE 143 C	PANTONE 144 C	PANTONE 145 C	PANTONE 146 C	PANTONE 147 C

**Figura 23.** Paleta de colores Pantone-Amarillo (Color-paints, 2021)

En la Figura 24. Bebidas analizadas, Jugo de naranja control y con adición de fitoesteroles encapsulados, se puede visualizar el producto final obtenido; dando una idea más real de la apariencia en general de las bebidas analizadas.



**Figura 24.** Bebidas analizadas, Jugo de naranja control y con adición de fitoesteroles encapsulados

La importancia del análisis sensorial de la bebida con FE, radica en que la selección de consumir o no un alimento por su valor nutricional, no es suficiente; es necesario tener en cuenta factores culturales y psicológicos de los consumidores, al igual que su percepción global del sabor (Fuentes et al., 2010), incluyendo en menor medida, pero sin ser menos importantes la visión, el olor y los sonidos que produce un alimento al ingerirlo. Es así como el sentido del gusto está relacionado con la toma de decisiones, sobre si un alimento será o no aceptado por el consumidor; y un factor que influye en este es la percepción de sustancias amargas (las cuales son rechazadas de forma innata) (Mizraji et al., 2011), por lo que la reducción de este descriptor en el JFE, se puede

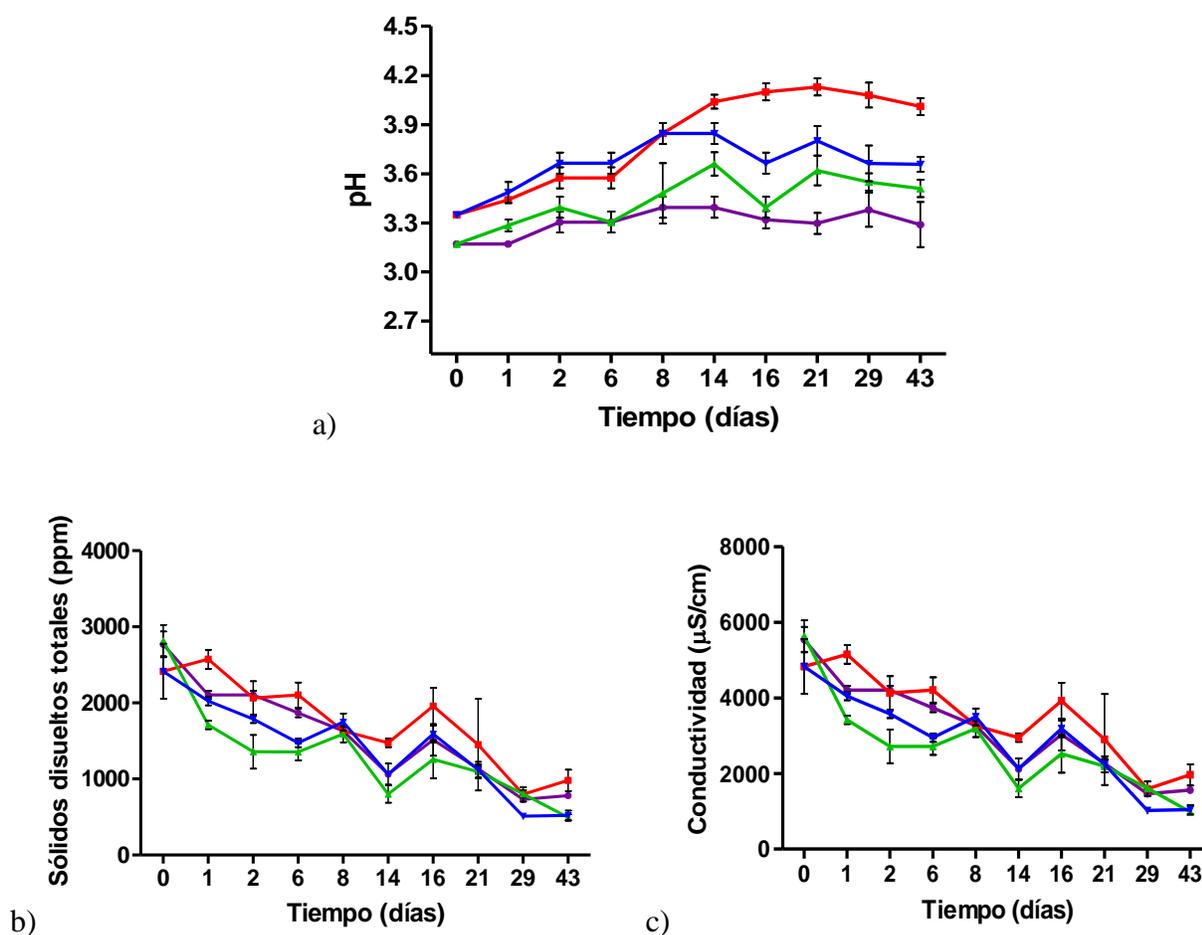
considerar favorable. Los polifenoles generan sabores amargos (naranja: naringina) (Villegas-Ruiz et al., 2010), los cuales en presencia de algunas fibras (goma arábica) pueden establecer interacciones polares, puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo, reduciendo así la interacción con las células receptoras de las proteínas de la saliva (Ares et al., 2009) y por ende la sensación amarga, en el jugo con encapsulados.

En cuanto al gusto ácido, el cual es producido por los hidrogeniones (ácido cítrico) (López-Ortiz, 2015; Mizraji et al., 2011), al incorporar los microencapsulados de FE que contienen proteína de soya, ésta aumenta ligeramente el pH en la bebida, lo que hace que no solo se reduzca la sensación ácido, si no también se disminuya la intensidad y duración de la percepción de astringencia; observándose que los ácidos orgánicos afectan la astringencia solo a través de su capacidad para modificar el pH del medio (Ramírez Torrealba, 2012). Por otra parte, la goma arábica disminuye la astringencia en bebidas, debido a que limita la formación de uniones entre sustancias astringentes y proteínas bucales, reduciendo la intensidad de este sabor (IOC -Institut Enologique de Champagne, 2020).

### ***3.3.2. Determinación de vida útil***

En las bebidas de fruta, una de las principales causas de deterioro es el crecimiento de microorganismos, los cuales se pueden desarrollar adecuadamente si encuentran condiciones favorables de pH, disponibilidad de agua y sustrato para descomponer (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2013); es por ello que después de hacer un seguimiento por aproximadamente 45 días a los jugos de naranja (JNC y JFE), se evaluaron los cambios de algunos parámetros químicos a través del tiempo (figura 25), que influyen directamente en la estabilidad del alimento, puesto que los sólidos totales y el pH son los parámetros químicos frecuentemente evaluados en las frutas

y sus jugos y son considerados como los indicadores críticos de la calidad sensorial (Schvab et al., 2013).



**Figura 25.** Evaluación de diferentes parámetros fisicoquímicos de las bebidas en el tiempo. a) pH, b) sólidos disueltos y c) conductividad, (—) jugo con encapsulado 10°C, (—) jugo control 10°C, (—) jugo con encapsulado 20°C y (—) jugo control 20°C.

En la figura 25a, se observa que JFE tanto a 10 como a 20°C, presentan un comportamiento similar hasta el día 14; después de este punto se encuentran diferencias estadísticas entre las muestras ( $p < 0,001$ ), debido a la temperatura que acelera los cambios de pH en esta muestra. Contrario a lo que pasa con el jugo control a 10 y 20°C; en el que solo se encuentran diferencias

en algunos puntos, pero sin una tendencia constante al cambio, mostrando menor dependencia a la temperatura en el parámetro evaluado. Esto sugiere, que la adición de micropartículas al jugo de naranja aparte de variar el pH de la bebida, acelera los cambios de este aspecto con la temperatura. Por otra parte, se detectan diferencias estadísticas entre el pH de JNC y JFE, desde el inicio del estudio.

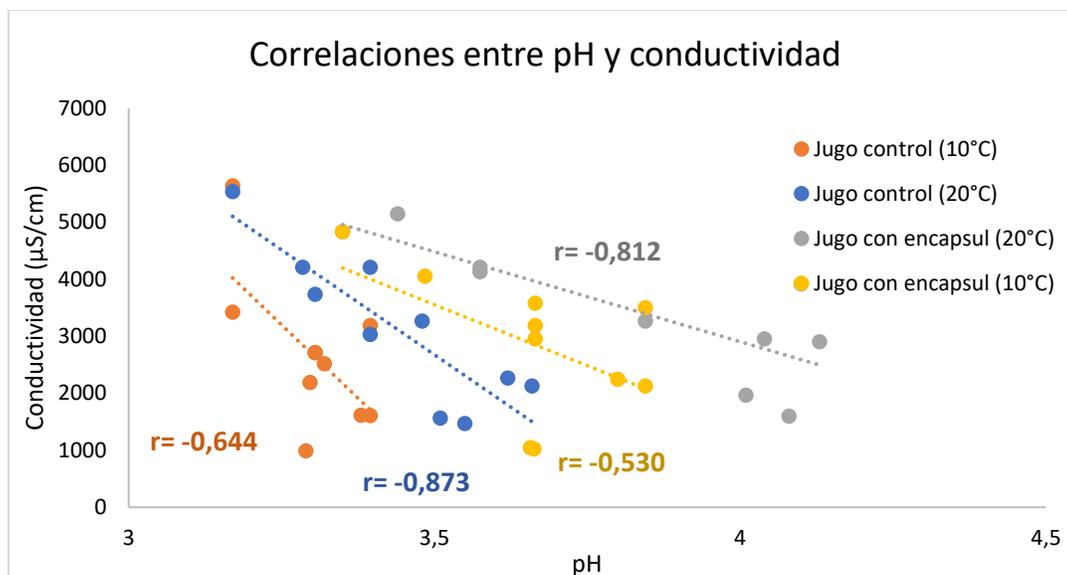
El pH de las bebidas encapsuladas fue mayor al control, debido a la adición de PAS presente en los encapsulados, observándose además cambios representativos en el encapsulado a 20°C, lo cual es posible a varios factores como la temperatura trabajada, la cantidad inicial de bacterias mesófilas y el desarrollo de hongos y levaduras que pueden crecer a pH inferiores a 4,0 y en alimentos con carbohidratos (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2013). El incremento de la temperatura permite que los microorganismos se reproduzcan rápidamente, deteriorando y alterando el producto; las reacciones químicas y enzimáticas de la célula son más rápidas y el crecimiento se acelera volviéndose adecuado para los microorganismos oportunistas presentes (Clavijo-Romero et al., 2016).

El pH inicial de las bebidas de naranja (3,17 y 3,35 para JNC y JFE, respectivamente), a pesar que cumple con el pH exigido por la legislación nacional (Resolución 3929, 2013), se encuentran fuera de los valores planteados por diferentes autores para este tipo de productos con un rango de pH de 3,5 a 4,40 (Elez-Martínez et al., 2005; Polydera et al., 2003, 2005; Rahman, 2007; Walkling-Ribeiro et al., 2009), e incluso del pH de otras bebidas como el jugo de manzana fresco (pH 3,69) y reconstituido (pH 3,70)(Evrendilek et al., 2000). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los posibles cambios de pH de las bebidas estudiadas, con respecto a trabajos de referencia,

corresponden a factores como la variedad del cultivo, maduración, condiciones de crecimiento, áreas geográficas, manipulación y procesamiento (Rahman, 2007) entre otras.

En cuanto a la tendencia similar (figuras 25b y 25c) que presentan tanto los sólidos disueltos totales (SDT) como la conductividad eléctrica (CE) es normal, ya que estos parámetros están estrechamente relacionados, mostrando que la CE estuvo directamente proporcional a SDT en relación  $2\mu\text{S}/\text{cm} : 1 \text{ ppm}$ . Aunque, se encuentran ligeras diferencias en los valores de SDT y conductividad, entre el JNC y el JFE, estas no son significativas ( $p < 0,05$ ) a una misma temperatura, pero si en algunos puntos con cambios de temperatura. Esto es entendible, dado que la temperatura afecta la viscosidad, y con ello, el movimiento iónico de la solución (jugo de naranja); el aumento de temperatura reduce la viscosidad, facilitando el transporte iónico, por lo que la medida de conductividad se aumenta (Hanna-instruments, 2020). La conductividad en algunos alimentos como jugo de manzana (2300 a 2600  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (Evrendilek et al., 2000), jugo de naranja tratado con termosonicación y pulsos eléctricos (4170  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (Walkling-Ribeiro et al., 2009), o jugo de naranja pasteurizado térmicamente (4390  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (Elez-Martínez et al., 2005), es mucho menor a las obtenidas en este estudio al momento inicial (mayor a 5000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), lo que sugiere indirectamente que nuestras bebidas contienen más sólidos disueltos (bien sea por el contenido de pulpa, de microcápsulas o por la ausencia de un proceso de filtración), que permite que la conductividad sea mayor. Debido a la alta conductividad presentada, sería necesario evaluar el tipo de proceso de pasteurización a emplear, ya que una alta conductividad sugiere una mayor cantidad de partículas en suspensión, lo que indica que la aplicación de tecnología no térmicas para aumentar la vida útil de la bebida, como los pulsos eléctricos de alta intensidad, no sean aconsejables; por lo que alimentos con elevada conductividad producen pequeños campos eléctricos, no siendo adecuados para este tipo de tratamiento (Odriozola Serrano, 2009).

Por otra parte, al buscar relacionar cada uno de los parámetros evaluados entre sí, se ha encontrado un resultado interesante, en cuanto a las variables pH y conductividad, mostrando que a medida que se reduce la conductividad aumenta el pH, en todas las muestras; esta relación inversa es más fuerte en las muestras que fueron almacenadas a 20°C (Figura 26).

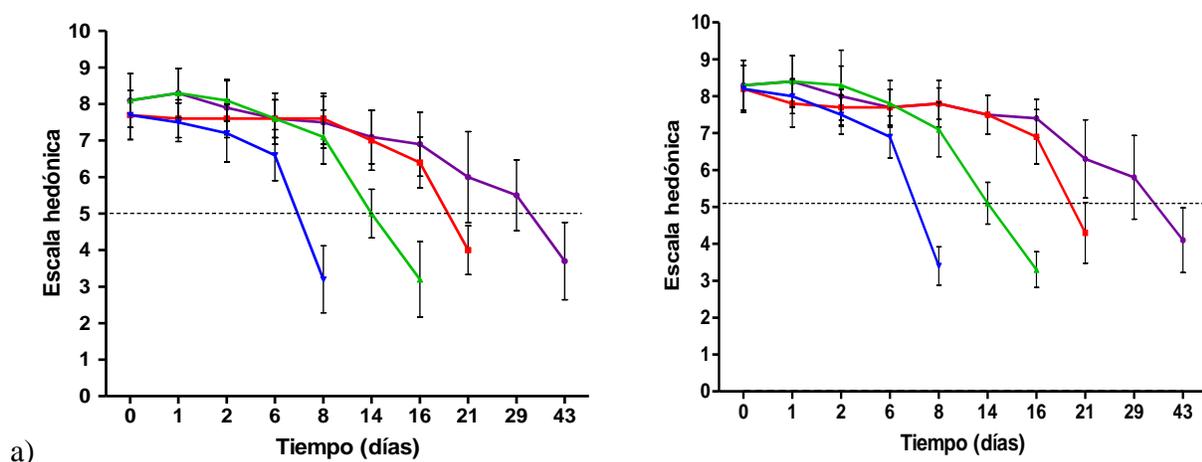


**Figura 26.** Correlación entre los parámetros pH y conductividad de las bebidas analizadas

Una posible teoría de esta correlación es que, a pesar del valor bajo pH de las bebidas, es posible encontrar hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas (Alzamora et al., 2004; Rahman, 2007), estos m.o. consumen los carbohidratos presentes en la bebida, reduciendo la cantidad de SDT y con ellos la conductividad. Además, dado que estos m.o. son mesófilos, la temperatura de 20°C, permite un mayor desarrollo de estos y por ende un mayor consumo de fuentes energéticas para su reproducción (disminución de sólidos disueltos), dando lugar a fermentación, con formación de alcohol y dióxido de carbono, productos que reducen la conductividad (Rahman, 2007).

Con respecto a la evaluación sensorial llevada por consumidores, en la Figura 27 (a y b), se puede determinar que la aceptación general de la bebida estuvo mayormente afectada por el

atributo de sabor; dado que se presentó un comportamiento similar en ambas graficas. Este aspecto, fue similar al obtenido con la evaluación sensorial de la pulpa de maracuyá pasteurizada y sin pasteurizar, donde se determinó que el sabor es el parámetro que más influye en la aceptación general del producto a los consumidores (Janzantti et al., 2014).



**Figura 27.** Evaluación de parámetros sensoriales de las bebidas en el tiempo. a) sabor y b) aceptación general de bebidas (—) jugo con encapsulado a 20°C; (—) jugo control a 10°C; (—) jugo con encapsulado a 10°C; (—) jugo control a 20°C; (---) límite mínimo de aceptación

Aplicando análisis de varianza para cada uno de los datos obtenidos en el atributo de sabor, no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el jugo control y el jugo con FE a la temperatura de 10°C hasta el día 16; después de este día el jugo con FE reduce notablemente su aceptación, por lo que empieza a tener una respuesta de ligero desagrado; a partir de este punto, solo se continúa haciendo sensorial a la bebida control. Con respecto a las muestras que estuvieron a 20°C, a partir del día 1, se presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para el sabor, las cuales se hacen más marcadas desde el día 6 ( $p < 0,01$ ). Al comparar el JFE respecto a las diferentes temperaturas, desde el día 6, se empiezan a marcar diferencias (resultados iguales para aceptación general de la bebida).

El rechazo de los consumidores a las bebidas a través del tiempo puede estar relacionado con el deterioro del jugo por aerobios mesófilos tales como hongos, levaduras, y bacterias ácido lácticas que son responsables del deterioro del jugo de naranja (Janzanti et al., 2014; Polydera et al., 2003, 2005) y que contribuyen a un aumento de la acidez en bebidas (Elez-Martínez et al., 2005), producto que se genera del proceso fermentativo. Además, aunque los análisis químicos son necesarios para establecer interacciones entre los componentes de los alimentos, con ellos no es posible evaluar todos los estímulos sobre los sentidos del consumidor (Schwab et al., 2013); lo que hace necesario que aparte de variables fisicoquímicas, se tengan en cuenta factores que intervienen en el rechazo de los alimentos, como lo son la temperatura, tipo de alimento, edad del consumidor y aspectos genéticos que afectan la respuesta hedónica de los consumidores (López-Ortiz, 2015).

### **3.3.2.1. Modelos matemáticos**

En el Anexo D, se muestra el procedimiento matemático para la hallar las variables correspondientes a la ecuación 5 (factor  $Q_{10}$ ), que permite la determinación de vida útil en función de la temperatura en °C, en la que la  $E_a$  (energía de activación) juega un papel importante. La energía de activación ( $E_a$ ) representa la sensibilidad de la velocidad de reacción a los cambios de temperatura (Berk, 2013), es así como a medida que aumenta la  $E_a$  incrementa la sensibilidad a la pérdida de un parámetro analizado; dicho de otra forma la  $E_a$  es la energía mínima que se necesita para iniciar una reacción química.

En la Tabla 15, se aprecia la  $E_a$  de los parámetros analizados para las bebidas, destacando que las variables de pH y aceptación sensorial son los que mayor energía requieren para iniciar su proceso de deterioro y a su vez presentan las mayores velocidades de deterioro, con respecto a las

otras variables. Esto puede sugerir que una vez inicia el proceso de cambio de pH y rechazo sensorial, es difícil revertirlo; siendo los parámetros evaluados más críticos. Por otra parte, es posible ver la dependencia que posee la velocidad de deterioro con la temperatura, ya que, de forma general, al aumentar la temperatura de estudio, su velocidad también lo hace.

**Tabla 15.** Energías de activación y constantes de velocidad de deterioro de jugo control y con encapsulados de FE

Parámetros analizados	Energías de activación (J/mol)		Velocidad de deterioro			
			Control		Encapsulados	
	Control	Encapsulados	10°C	20°C	10°C	20°C
pH	-7,58E+04	-3,53E+04	-2,00E-04	-6,00E-04	-6,00E-04	-1,00E-03
Sólidos disueltos	2,32E+04	-3,96E+04	2,80E-05	2,00E-05	1,13E-05	2,00E-05
Conductividad	4,78E+04	3,53E+04	2,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	6,00E-06
Aceptación sensorial	-9,16E+04	-1,10E+05	2,60E-03	9,79E-03	3,60E-03	1,76E-02

En el caso del pH, se requiere más  $E_a$ , para iniciar el proceso de aumento de pH en el control (JNC) que en los encapsulados (JFE); esto se puede deber a que la adición de micropartículas al jugo, reduce algunas fuerzas como las de repulsión dentro de la matriz, proporcionando menos gasto energético para iniciar el proceso de degradación; caso contrario sucede en el parámetro de aceptación sensorial, en el que la bebida con encapsulados necesita mayor  $E_a$ , que el control, para iniciar su proceso de deterioro.

A pesar que cada parámetro evaluado presenta una  $E_a$  diferente, al comparar los resultados obtenidos con algunos estudios plasmados en la Tabla 16, se puede ver que los diferentes jugos de fruta se encuentran dentro de un rango similar al presentado en este estudio.

**Tabla 16.** Energía de activación de algunas matrices alimentarias

<b>Producto</b>	<b>Ea (J/mol)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Indicador de deterioro</b>	<b>Referencia</b>
Pasta de tomate	9,5E+4	40 45 50	Color	(García Baldizón et al., 2011)
Coliflor	3, 5E+3	50 55 60 65	Sólidos solubles totales (°Brix)	(Khathir et al., 2019)
Jugo de naranja pasteurizado (calor)	5,3E+4	0 5 10 15 30	Acido ascórbico	(Polydera et al., 2005)
Jugo de naranja pasteurizado (Alta presiones)	6,8E+4	0 5 10 15 30	Ácido ascórbico	(Polydera et al., 2005)
Jugo de melocotón	3,4 E+4	-6 a 4	Viscosidad	(Ruiz et al., 2010)
Jugo de manzana	3,0E+4	-6 a 4	Viscosidad	(Ruiz et al., 2010)
Jugo de pera	3,7 E+4	-6 a 4	Viscosidad	(Ruiz et al., 2010)
Zumo de naranja	2,3 E+4	20 62 92	Ácido ascórbico	(Villacís Chiriboga, 2015)

Aunque las Ea, sean similares a otros estudios, para el parámetro de pH, se hace necesario contar con más temperaturas de evaluación para tener una mayor confianza del modelo, debido al poco ajuste que presenta y/o determinar otro parámetro diferente para hacer el estudio de estabilidad.

Para la estimación la dependencia de la temperatura sobre algún atributo de calidad específico (sensorial, microbiológico o fisicoquímico), se determina el factor  $Q_{10}$  (Rahman, 2007). Este factor, representa la razón obtenida por el aumento de la velocidad de las reacciones cuando la temperatura del sistema aumenta en  $10^{\circ}\text{C}$  (Espinoza Atencia, 2019). Así, la tabla 17 muestra el factor  $Q_{10}$  para los parámetros de pH, sólidos disueltos, conductividad y aceptación sensorial.

**Tabla 17.** Factor  $Q_{10}$  de las bebidas sin y con FE encapsulados

Parámetro	Muestra	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Temperatura (k)	$Q_{10}$
pH	Control	10	283,15	0,333
	Encapsulado	10	283,15	0,600
	control	20	293,15	0,358
	Encapsulado	20	293,15	0,620
Sólidos disueltos	control	10	283,15	1,400
	Encapsulado	10	283,15	0,563
	control	20	293,15	1,369
	Encapsulado	20	293,15	0,585
Conductividad	control	10	283,15	1,999
	Encapsulado	10	283,15	1,668
	control	20	293,15	1,910
	Encapsulado	20	293,15	1,612
Aceptación sensorial	control	10	283,15	0,265
	Encapsulado	10	283,15	0,203
	Control	20	293,15	0,289
	Encapsulado	20	293,15	0,226

Para el pH, se observa que la velocidad de cambio es mayor en la bebida con encapsulados que en la de control, y en efecto, a medida que aumenta la temperatura, la aceleración ( $Q_{10}$ ) de deterioro también lo hace. Con respecto a los sólidos disueltos y la conductividad, el factor  $Q_{10}$  es mayor para las muestras control; esto se debe principalmente a la adición de encapsulados, lo que hace que haya más presencia de sólidos y con ellos de conductividad, por lo que su reducción es menor. Por último, en la aceptación sensorial, el cambio de esta percepción, también es mayor con el

tiempo, pero en las bebidas control, esto puede ser porque la presencia de los agentes encapsulantes reduce ligeramente algunos sabores amargos propios de la bebida.

A pesar que el pH y aceptación sensorial de la bebida, presentan aceleraciones de deterioro bajas en el rango de 0,2 a 0,62 por aumento de 10°C, parece ser suficiente para que generen cambios altamente significativos en la calidad de la bebida con FE; pequeños cambios en el pH pueden provocar grandes cambios en el comportamiento de algunos componentes de los alimentos (De Icaza Tena, 2018), como lo es el favorecimiento de condiciones para que los microorganismos puedan alterar el sabor del producto. Si se comparan los valores de  $Q_{10}$  en este trabajo con los obtenidos en otros estudios para la pérdida de compuestos altamente sensibles al calor como fenoles (7,09-9,39), flavonoides (1 constante), betaxantinas (2,12-2,37) y betacianinas (10,95-15,42) a temperaturas de 11,3 a 31,3°C (Jimenez Herrera, 2018); o  $Q_{10} \sim 2$  para los cambios de color en el caqui en fruta (Choi et al., 2017), se puede determinar que los parámetros analizados no presentan tanta sensibilidad como algunos compuestos bioactivos.

### 3.4. Conclusiones parciales

La incorporación de FE encapsulados dentro de una bebida de naranja comercial, es una alternativa para proporcionar alimentos funcionales, que contribuyan específicamente a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares asociado no solo al extracto encapsulado, sino también a los agentes encapsulantes empleados, que proporcionan otros beneficios.

El jugo de naranja con FE adicionados, cumple con la legislación en cuanto a los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos establecidos para el territorio colombiano para las bebidas de frutas. De igual forma, se presenta una aceptación sensorial buena, brindada por jueces entrenados.

De acuerdo a los cambios presentados en los parámetros sensoriales se puede establecer que a una temperatura de 10°C, el JFE puede alcanzar una aceptación general por parte del consumidor antes de los 16 días y si se almacena a una temperatura de 20°C, la aceptación se reduce a 6 días, en los que no habría rechazo por parte de los consumidores.

Dentro de los parámetros evaluados el pH suele ser uno de los más críticos dado que un cambio en éste proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos, sin embargo, a la hora de conocer su orden de reacción se presenta un ajuste bajo, imposibilitando concluir de forma adecuada sobre esta variable.

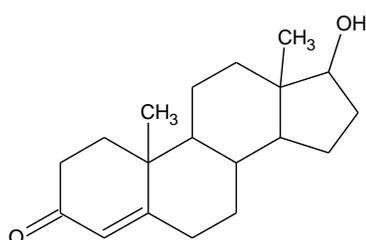
Para una aplicación comercial, con el fin de aumentar la vida útil del producto y la aceptación de los consumidores ante JFE, algunas estrategias como asegurar calidad microbiológica en el proceso de secado por aspersión, pasteurizar antes del envasado y usar un empaque con adecuadas barreras de protección al O<sub>2</sub>, podrían ser implementadas para mejorar algunos atributos presentados en este alimento.

## 4. BIOACCESIBILIDAD DE FITOESTEROLES EN MATRIZ LIQUIDA

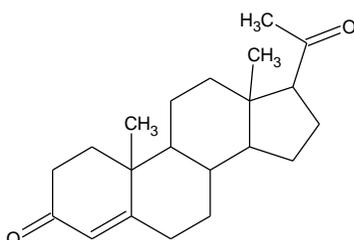
### 4.1. Marco Teórico

#### 4.1.1. Colesterol y su importancia en el organismo

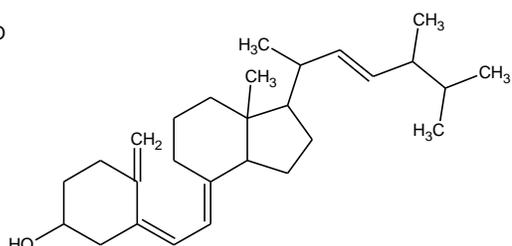
El colesterol es un lípido de estructura planar, que contiene un núcleo ciclopentano perhidrofenantreno, una cadena lateral y un grupo hidroxilo (Rozner & Garti, 2006; Sanchez Pozo & Gil Hernandez, 2017). Es un componente estructural de las membranas celulares (en mamíferos), que mantiene tanto la fluidez como la rigidez de la membrana y media la señalización celular a través de la formación de subdominios rígidos (Howe et al., 2016), es indispensable para mantener la permeabilidad de la membrana y es un sustrato principal para las moléculas derivadas del colesterol que son esenciales para los cuerpos de los mamíferos (Rozner & Garti, 2006), siendo el precursor de importantes moléculas como ácidos biliares, vitamina D y hormonas esteroidales (Figura 28. Compuestos derivados del colesterol) dentro del organismo humano (Félix et al., 2016), entre otras.



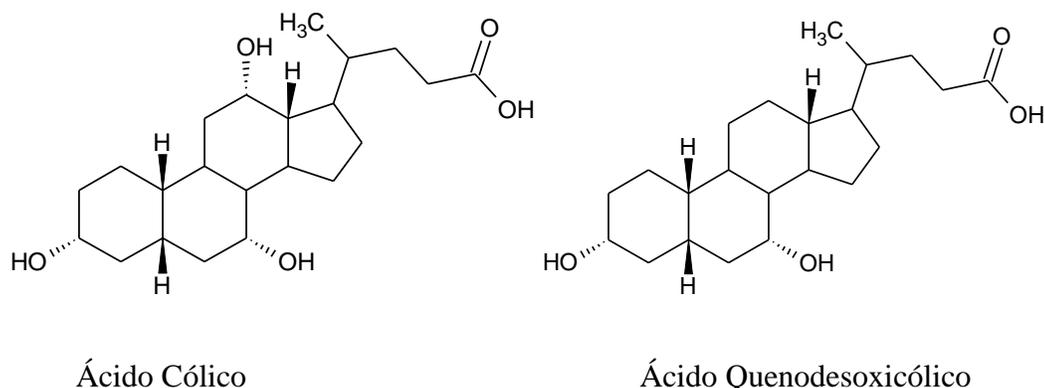
Testosterona



Progesterona



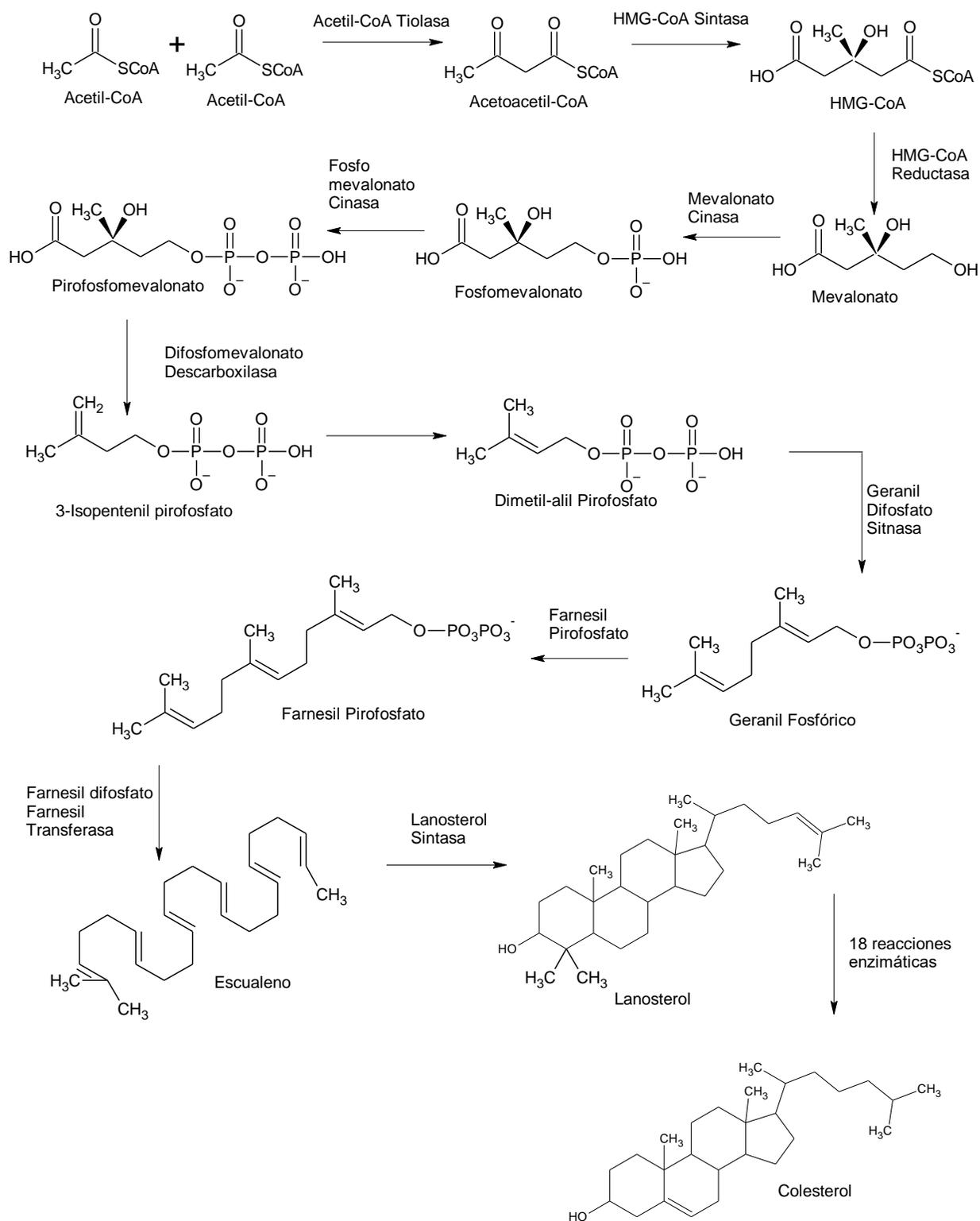
Vitamina D



**Figura 28.** Compuestos derivados del colesterol

La mayoría de los tejidos animales tienen la capacidad para la síntesis hepática del colesterol. Este es sintetizado a partir del mevalonato, el cual se forma desde la unión de 2 moléculas de Acetil-CoA (Sanchez Pozo & Gil Hernandez, 2017); ver Figura 29.

El colesterol también se puede obtener a través de la dieta, después de su proceso de digestión y absorción (solubilización en micelas intestinales, paso a través de la mucosa al enterocito, e incorporación en quilomicrones y transporte a través de la linfa al hígado). Una vez los quilomicrones llegan al hígado, se transforman en lipoproteínas y son transportadas en sangre. Las lipoproteínas se caracterizan en función de su densidad en VLDL-lipoproteínas de muy baja densidad, LDL-lipoproteínas de baja densidad, ILD- lipoproteínas de densidad intermedia y HDL-lipoproteínas de alta densidad (Deng, 2012), que vienen además condicionadas por su tamaño y relación lípido-proteína (Errico et al., 2013).



**Figura 29.** Ruta biosintética del colesterol. Modificado de Koolman y Röhm (2004)

Las LDL contienen principalmente colesterol esterificado, el cual es transportado a los tejidos periféricos. Por su parte las HDL debido a su tamaño almacenan poca cantidad de lípidos, pero extraen el exceso de colesterol presente en los tejidos, para transportarlo al hígado y allí, ser excretado en la bilis (Cofan Pujol, 2014; Palau Oliver et al., 2005; Sánchez-Pozo & Ortega de la Torre, 2010).

El alto consumo de colesterol está estrechamente relacionado con el aumento de colesterol en las LDL y con el riesgo de enfermedades cardiovasculares, las cuales son la principal causa de morbimortalidad en el mundo (Deng 2012; Han et al. 2016; Smet, Mensink, and Plat 2012; Cofan Pujol 2014). Por este motivo existen estrategias farmacológicas para reducir el colesterol en sangre, como el consumo de estatinas y ezetimiba (Jones et al., 2018; Rocha et al., 2016). Las estatinas más empleadas son atorvastatina, rosuvastatina, simvastatina, pravastatina, estas bloquean la enzima HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A-reductasa), evitando la formación del colesterol (Han et al., 2016; Wong, 2014). Por su parte, la ezetimiba, inhibe específicamente la absorción del colesterol intestinal, al bloquear la proteína NPC1L1 (Nieman Pick C1 Like 1), evitando su ingreso al enterocito (Escolà-Gil et al., 2014; Ikeda, 2015; Yoo, 2016). Dado que este último fármaco actúa a nivel intestinal reduce tanto el colesterol endógeno como el exógeno.

Willett, (2002) expone que más del 80% de las enfermedades cardiovasculares son potencialmente prevenibles con modificaciones en el estilo de vida e intervención en la alimentación (Devaraj et al., 2004), siendo además más rentables que las estrategias farmacológicas (Willett, 2002). Por lo que se promueve el consumo de alimentos funcionales dedicados a dicho fin; entre los que se destacan los que presentan contenidos de FE.

#### ***4.1.2. Mecanismos de acción de fitoesteroles***

En el capítulo anterior, se mostró que tanto los FE como los fitoestanoles, de forma libre o esterificada, reducen el colesterol total en suero y afectan el perfil lipídico de las personas. Normalmente, el colesterol presenta una absorción del 60%, los FE del 2 al 5% y los fitoestanoles son menos absorbidos que los FE (Lagarda et al., 2006). Aunque los mecanismos de acción por los cuales los FE reducen el colesterol en sangre no están completamente claro, se han establecido diferentes teorías que son aceptadas para comprender como interactúan con el organismo (Gylling & Simonen, 2015).

Una vez los esteroides se encuentran en su forma libre en el intestino delgado (duodeno), estos son solubilizados mediante las micelas de absorción formadas por sales biliares, para ingresar al enterocito y posteriormente a circulación. Por lo que el primer mecanismo de inhibición del colesterol en presencia de los FE, se produce al alterar la solubilidad del colesterol en las micelas (Ikeda, 2015), esto genera que haya una competición entre estos compuestos (colesterol y FE), por un espacio dentro de las micelas mixtas del intestino, dada su similitud estructural (Alemany-Costa et al., 2013; Gylling & Simonen, 2015; Jain & Bathla, 2015), al ocurrir tal desplazamiento, el colesterol precipita.

Anteriormente se pensaba que la incorporación de los esteroides dentro de las células intestinales era por difusión pasiva, sin embargo se ha evidenciado que este proceso se da es por medio de la proteína Nieman Pick C1 Like 1 (NPC1L1) (Ikeda, 2015). Por lo que otro de los mecanismos de inhibición de colesterol por FE por el transportador NPC1L1 (Proteína transmembranal ubicada en la membrana apical del enterocito responsable del ingreso de los esteroides a la célula) (Jain &

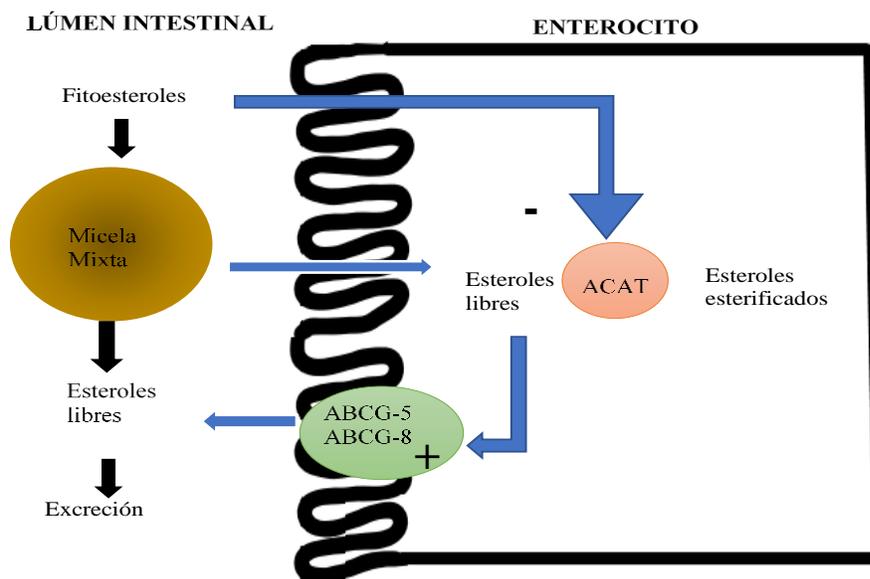
Bathla, 2015). La NPC1L1 tiene poca afinidad por los FE, pero más por el colesterol (Escolà-Gil et al., 2014; Yoo, 2016), reduciendo la velocidad en la que este es captado.

Una vez los esteroides ingresan al enterocito, estos deben ser esterificados mediante acil-coenzima A-Colesterol aciltransferasa (ACAT) (Gylling & Simonen, 2015), para que puedan ingresar en los quilomicrones y ser transportados al hígado (Yoo, 2016). Aunque aproximadamente entre el 50-60% del colesterol es esterificado, en presencia de FE este proceso ocurre a un ritmo más lento que el del colesterol (Jain & Bathla, 2015), dada la poca afinidad que presenta la ACAT por los FE (Escolà-Gil et al. 2014; Muñoz Jáuregui, Alvarado-Ortíz, and Encina Zelada 2011). Teniendo como resultado una reducción en la actividad de ACAT, además la activación del eflujo de esteroides del enterocito y la incorporación a menor velocidad en los quilomicrones.

Las proteínas ABCG5/G8-Transportadores dependientes de ATP-son los responsables del eflujo de los esteroides del enterocito al lumen intestinal; los FE y colesterol (Escolà-Gil et al., 2014; Jain & Bathla, 2015; Gylling & Simonen, 2015) particularmente de aquellos que no fueron esterificados (Ikeda, 2015; Yoo, 2016).

Los mecanismos anteriormente mencionados, se pueden apreciar en la Figura 30; en la que se muestran los diferentes mecanismos de acción de los FE sobre las micelas, esterificación por ACAT y eflujo por las ABCG 5/8, para reducir el colesterol a nivel intestinal (Calpe-Berdiel et al., 2006, 2009; Ikeda, 2015); como resultado se genera una disminución del colesterol endógeno y el exógeno (Jain & Bathla, 2015), lo que ocasiona la estimulación de la producción hepática de éste. Sin embargo, el incremento que se produce no es suficiente para compensar el efecto reductor que proporcionan los FE en los alimentos funcionales, haciendo que el hígado incremente el número

de receptores de LDL, a fin de captar colesterol para la síntesis de ácidos biliares, aumentando así la depuración de las LDL de la corriente sanguínea (Palau Oliver et al., 2005).



**Figura 30.** Mecanismos de acción de los FE en la inhibición del colesterol a nivel intestinal

Por otra parte, la mayoría de FE que ingresan al enterocito, son nuevamente regresados al lumen intestinal, por lo que la cantidad que puede llegar a sangre es baja, excepto en personas que sufren de sitosterolemia. La sitosterolemia o fitosterolemia es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, caracterizada por el aumento de los niveles de FE en el plasma (Falet, 2013; Ikeda, 2015; Yoo, 2016), la cual es causada por mutaciones en los transportadores ABCG5 y ABCG8 que se encuentran en hepatocitos y enterocitos (Escolà-Gil et al., 2014; Falet, 2013). La acumulación de FE en sangre influye en la estabilidad de las lipoproteínas, lo que favorece el aumento de FE en los tejidos, iniciando reacciones inflamatorias y causando aterosclerosis prematura (Escolà-Gil et al., 2014; Yoo, 2016).

#### ***4.1.3. Métodos para la evaluación de compuestos funcionales***

Adicionar un ingrediente con características saludables a un alimento no lo convierte automáticamente en alimento funcional, por lo que es necesario demostrar un efecto beneficioso debido a la transformación tecnológica que el producto haya sufrido. Estos efectos pueden analizados mediante experimentación *in vitro*, modelos animales y estudios de observación o de intervención en personas (Guarner & Azpiroz, 2005). En la tabla 18, se resumen las principales ventajas y desventajas brindadas por autores como Cilla et al., (2019), Carbonell-Capella et al., (2014), Etcheverry et al., (2012), Morán-Valero, (2014), sobre los métodos de experimentación para encontrar interacciones entre alimentos y órganos (sistemas o fluidos) que permitan orientar la funcionalidad de un producto.

**Tabla 18.** Comparación ventajas y desventajas de métodos *in vitro*, *in vivo* e intervenciones en humanos

Método	Ventaja	Desventaja
<i>In vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reproducibles</li> <li>- Rápidos</li> <li>- Sencillos para aplicar con material de laboratorio.</li> <li>- Son relativamente económicos</li> <li>- No tiene restricciones éticas.</li> <li>- Permite simular la secuencia de las fases gastrointestinales.</li> <li>- Control de condiciones de digestión humana.</li> <li>- Es posible analizar varias muestras.</li> <li>- Se puede validar con material de referencia.</li> <li>- Los mecanismos de acción pueden ser evaluados.</li> <li>- Es posible escalar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No es posible reproducir el ambiente dinámico del intestino ni regular procesos (hormonales, actividad de células mucosas, sistema inmune, etc).</li> <li>- Es necesario extrapolar para modelos <i>in vivo</i>.</li> <li>- Mecanismos homeostáticos no se presentan.</li> <li>- Las fases orales y de intestino grueso normalmente no son incluidas.</li> <li>- Bacterias intestinales y metabolismo hepático no siempre son consideradas.</li> </ul>
<i>In vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Selección específica de los sujetos.</li> <li>- Estudios fármaco-cinéticos se pueden llevar a cabo.</li> <li>- Valora las transformaciones metabólicas que sufren los nutrientes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Influencia de diferentes factores.</li> <li>- Extrapolación de estudios en humanos.</li> <li>- Falta de estándares de referencia certificados.</li> <li>- Alto costo de equipo y mano de obra.</li> <li>- Requiere de mucho tiempo.</li> <li>- Restricciones éticas.</li> <li>- Sistemas funcionales complejos.</li> <li>- Alta variabilidad de los resultados obtenidos su alto costo.</li> </ul>
Intervenciones con humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es el método ideal.</li> <li>- Resultados reales (sin necesidad de suponer condiciones fisiológicas).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Restricciones éticas.</li> <li>- Control en población intervenida.</li> <li>- Puede requerir gran número de voluntarios.</li> <li>- Costo del estudio alto.</li> <li>- Deserción de pacientes.</li> <li>- Equipos sofisticados / alta resolución.</li> </ul>

La intervención con humanos es el método más adecuado para lograr evaluar los efectos e interacciones entre el producto (alimento, ingrediente o fármaco) con el organismo, ya que se tiene en cuenta factores como edad, genotipo, estado fisiológico de la persona (obesidad, lactancia,

embarazo), estado de enfermedad, entre otros factores intrínsecos que son imposibles de medir con otras metodologías (Cilla et al., 2019; Etcheverry et al., 2012), sin embargo, debido a las limitantes que este tipo de estudio presenta, las alternativas que se plantean son los estudios en modelos animales (*in vivo*) y los modelos *in vitro*.

Los métodos *in vitro* son útiles para proporcionar conocimiento sobre posibles interacciones entre nutrientes y/o componentes alimentarios, efecto de factores luminales (pH y enzimas), preparación de alimentos, naturaleza de la matriz o el potencial para un nutriente ser absorbido. Adicionalmente, ofrecen mejor control de variables experimentales que con humanos o animales (Etcheverry et al., 2012), haciendo de estos una herramienta, que permite según los resultados obtenidos, escalar a los posteriores métodos (*in vivo* o invención), o replantear el diseño del ingrediente. Los métodos *in vitro*, son empleados para medir la bioaccesibilidad y/o biodisponibilidad (Etcheverry et al., 2012).

Los modelos de digestión simulada, hacen parte de los métodos *in vitro*, estos buscan simular las condiciones fisiológicas que ocurren en todo el proceso de digestión a nivel oral, gástrico e intestinal, que permitan evaluar el grado de hidrolisis y potencial bioaccesibilidad de un producto (Morán-Valero, 2014). Entre los factores que se deben tener en cuenta para el desarrollo de un modelo *in vitro* se consideran las relaciones enzima/sustrato, tiempo de digestión (en cada fase), pH del medio de digestión, composición mineral de los fluidos digestivos y simulación de movimientos peristálticos, entre otros (Morán-Valero, 2014); entre más factores se puedan tener en cuenta, mayor información proporciona el modelo.

#### **4.1.4. Bioaccesibilidad**

Desde los métodos *in vitro*, se ha estado incluyendo el concepto de bioaccesibilidad, generando confusiones con términos como biodisponibilidad y bioactividad.

- La bioactividad es el efecto específico de la exposición a una sustancia, incluye la captación tisular y la respuesta fisiológica (antioxidante, antiinflamatoria) y puede evaluarse *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* (Carbonell-Capella et al., 2014).
- La biodisponibilidad, se define como la cantidad de nutrientes ingeridos que se absorben (paso a través de una membrana) y están disponibles para funciones fisiológicas. Depende factores como la digestión, liberación de los componentes de interés de la matriz, absorción por células intestinales y transporte a células corporales (Etcheverry et al., 2012).
- Bioaccesibilidad, que es la cantidad de un compuesto que es liberado desde su matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal, para luego convertirse en disponible para la absorción intestinal (no incluye la absorción); depende únicamente de digestión y liberación de la matriz de alimentos (Cilla et al., 2019; Etcheverry et al., 2012). Un aspecto a destacar de la bioaccesibilidad, es que se puede utilizar como herramienta para evaluar la efectos positivos o negativos de la estructura de los alimentos (tamaño de partícula, adición de emulsionantes) y la composición de los alimentos (fortificación de alimentos, ingredientes de alimentos), con el objetivo de mejorar la formulación de un producto (Cilla et al., 2019). Es evaluada, mediante procedimientos de digestión *in vitro*, generalmente simulando la digestión gástrica y del intestino delgado (Carbonell-Capella et al., 2014).

#### 4.1.4.1. Bioaccesibilidad de fitoesteroles en bebidas

La acción de los FE como ingrediente funcional es reconocida; sin embargo, al adicionarlos a diferentes matrices, es posible determinar que su efecto se ve afectado. En los siguientes estudios la bioaccesibilidad (BA) de los FE fue evaluada mediante métodos de digestión simulada *in vitro*, para matrices líquidas enriquecidas con éstos.

Vaghini et al., (2016) evaluaron la BA en 4 bebidas lácteas comerciales: descremada y endulzada (BA 16%), solo endulzada (BA 16,6%), descremada con azúcar y jugo de naranja (BA 8,9%) y descremada sin azúcar (BA 11,2%), en las que las primeras dos bebidas contenían FE y su BA no presentó diferencias significativas y las dos últimas contenían fitoestanoles (BA sin diferencias), sugiriendo que tanto la matriz como el tipo de esteroles adicionados (esteroles o estanol) tiene una alta influencia sobre la eficacia y funcionalidad de las bebidas. Es posible corroborar que los fitoestanoles en estos métodos *in vitro*, también proporciona menos afinidad que los FE para ser incorporados en micelas.

García-Llatas et al., (2015) evaluaron la BA en bebidas de frutas a base de leche enriquecidas con FE con criptoxantina (BA 4,3%) y sin este carotenoide (BA 6,4%), determinando que la adición de otros componentes lipídicos (carotenoides) dentro de la matriz, reduce la BA de los FE. La interacción entre los FE y carotenoides resultan en la reducción de la bioaccesibilidad de los FE en las bebidas con naranja (Cilla et al., 2019).

Por otra parte, Alemany et al., (2013a) evaluaron la bioaccesibilidad en 4 tipos de bebidas, bebida láctea con fruta con jugo de mandarina (BA 4,3 %), bebida láctea con fruta sin jugo de mandarina (BA 6,4 %), leche (2,6 BA %) y bebida de fruta (BA 3%), concluyendo que la matriz

juega un papel importante para los valores obtenidos por lo que bebidas lácteas con fruta son la mejor opción para incorporar FE, además de que la presencia de jugo de mandarina reduce la BA.

En su estudio Alvarez-Sala et al., (2016) evaluaron el desarrollo de tres bebidas de frutas a base de leche enriquecidas con FE, estas bebidas sin adición de grasa (BA 8,7%), con adición de grasa láctea y proteína de soya (BA 31,4%), y con aceite de oliva y lecitina de soya (BA 28,2%), permitieron concluir que la adición de una fuente grasa y emulsionantes dentro de las bebidas mejora la BA de los FE notablemente. Incluso este estudio proporciona mejores valores de BA que los anteriores.

La importancia de hacer ensayos *in vivo* o *in vitro* antes de colocar los alimentos en el mercado puede proyectar una funcionalidad al alimento (Vaghini et al., 2016), a pesar que al ser comparados los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo*, se determinan valores que difieren a lo esperado según el método *in vitro*, por lo que ha de considerarse que la matriz, composición de ingrediente de FE, dosis de FE y período de consumo, pueden influir en los niveles séricos de FE y, por lo tanto, pueden ser importantes para la funcionalidad estos (Garcia-Llatas et al., 2015). De igual forma, la aproximación por medio de la bioaccesibilidad, en la funcionalidad proporciona un criterio valido para continuar mejorando una formulación de alimento funcional.

## 4.2. Metodología

### 4.2.1. Reactivos a emplear y preparación de soluciones

Los reactivos empleados en el montaje del modelo de digestión *in vitro*, fueron Tris base (tris(hidroximetil)aminometano), cloruro de calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ), cloruro de sodio anhidro ( $\text{NaCl}$ ), ácido maleico (ácido cis-butenodioico), amino Lipasa A (de *Aspergillus niger*), pepsina, pancreatina (páncreas porcino), sales biliares, fosfatidilcolina de huevo (lecitina), b-sitosterol (pureza >80%), colesterol ( $\geq 99\%$ ) y N,O- bis(Trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA).

Las soluciones a emplear fueron:

- Solución gástrica acuosa, 150 mM  $\text{NaCl}$ , 6mM  $\text{CaCl}_2$  y HCl hasta ajustar a pH 2,5.
- Extracto de enzimas gástricas: 50 mg de lipasa gástrica y 15 mg de pepsina en 3 mL de la solución gástrica previamente preparada. Esta solución se agita por 10 min antes de su uso.
- Solución buffer tris-maleato: Con el tris base y ácido maleico, solución de 100mM, pH 7,5.
- Secreción biliar: 50 mg de lecitina, 125 mg de sales biliares, 0,25 mL de solución de 325 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,75 mL de solución  $\text{NaCl}$  a 3,25 M y 5 mL de buffer tris-maleato. Agitación por 10 min antes de usar.
- Extracto de pancreatina: 0,5 g de pancreatina porcina en 3 mL de buffer tris-maleato, agitación por 10 min y centrifugación a 4000 rpm durante 15 min.

#### 4.2.2. Muestras para digestión *in vitro*

Las muestras analizadas correspondieron a: extracto obtenido por FSC a partir del bagazo de caña de azúcar; mezcla aceite: extracto FSC y micropartículas de extracto de FSC con GA, M y PAS (obtenidas en capítulos anteriores); además de la muestra de JFE para determinar si esta bebida contribuye a la inhibición del colesterol a nivel micelar. En la Tabla 19, se detallan las muestras a trabajar con la cantidad de FE totales (sumatoria de campesterol, estigmasterol y sitosterol) de cada una.

**Tabla 19.** Muestras de FE para modelo de digestión *in vitro*

Muestra	% camp.	%. estigm	% Sitost.	FE totales	Cantidad tomada para análisis	FE en muestra (mg) aproximados
Extracto FSC	21	26	51	34,0 mg/g	70 mg	2,4
Fase oleosa (extracto:aceite)	15	19	66	24,1 mg/g	100 mg	2,4
Micropartículas	14	16	70	17,3 mg/ g	140 mg	2,4
JFE	17	11	72	1,0 mg/ 0,61 mL	1,5 mL	2,4

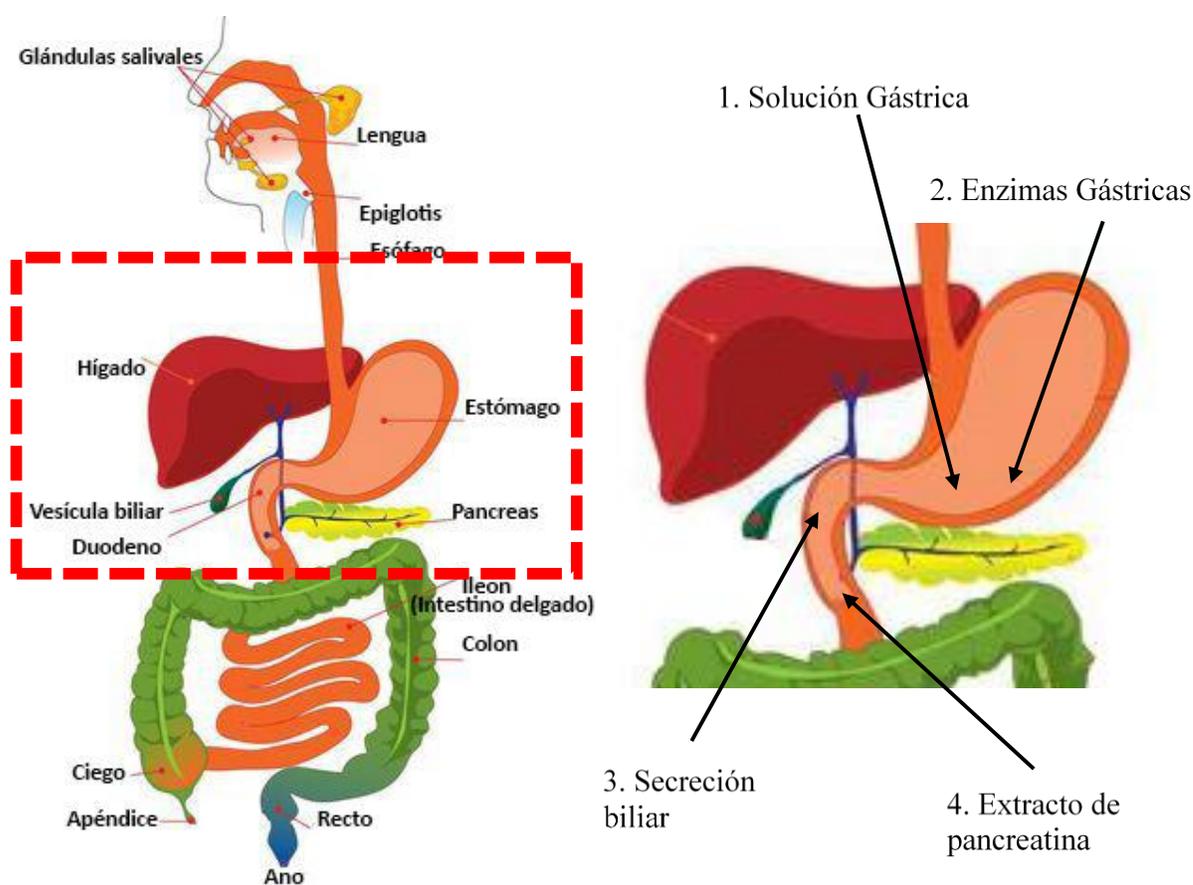
% = % participación del FE en la muestra; camp =Campesterol, estigm= Estigmasterol, sitost. =Sitosterol

#### 4.2.3. Modelo de digestión *in vitro*

El modelo de digestión *in vitro*, fue basado en la metodología planteada y desarrollada por Navarro del Hierro et al., (2018) y Morán-Valero et al., (2012), en su grupo de investigación; la cual se elaboró en las fases gástrica e intestinal, debido a la naturaleza de las muestras y al interés del compuesto a analizar (lipídico).

En la fase gástrica, las muestras (Tabla 19), fueron mezcladas con 3 mg de lecitina de soya, 8 mg de colesterol y aceite de soya (como vehículo y para simular la ingesta de colesterol en la dieta). Se adicionaron 2,2 mL de solución gástrica atemperada y la mezcla se agitó a 220 rpm durante 2 min, en una incubadora a 37°C con agitación orbital; pasado este tiempo se incorporaron

0,45 mL del extracto fresco de enzimas gástricas a la mezcla, dejando en agitación por 45 min en la incubadora a las condiciones previas. Pasado el tiempo se agregaron 1,9 mL de la secreción biliar simulada precalentada (37°C), se continuó en agitación por 2 min a 190 rpm y 37°C. La fase intestinal dio inicio con la adición de 0,45 mL de extracto de pancreatina fresco a la mezcla, la cual se dejó en agitación durante 60 min. Una idea gráfica del lugar de acción de este modelo en el sistema gastrointestinal, se puede visualizar en la Figura 31.



**Figura 31.** Modelo explicativo de digestión *in vitro*. Órganos del sistema digestivo, tomada y modificada de CK-12 Foundation, (2021)

En el caso de la bebida, esta fue previamente homogenizada antes de iniciar la digestión (1,5 mL de JFE), el procedimiento fue el mismo previamente explicado, para la fase gástrica e

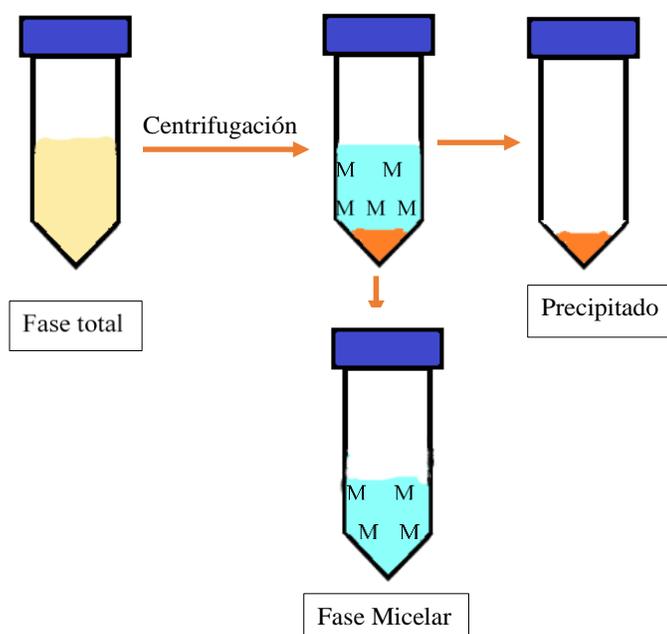
intestinal. La digestión *in vitro* para cada muestra fue realizada por triplicado. El control positivo, para las digestiones se hizo empleando un estándar de b-sitosterol como referencia, mientras el control negativo, se realizó en ausencia de la muestra (1,5 mL de agua destilada).

#### 4.2.4. Determinación de bioaccesibilidad

Una vez finalizada la fase intestinal, el medio fue sometido a centrifugación a 4000 rpm durante 40 min. La fase micelar (fase acuosa superior la cual contiene las micelas y los compuestos bioaccesibles) fue separada del precipitado, componentes sin solubilizar (Figura 32), y la bioaccesibilidad del colesterol, determinada como la fracción del colesterol total digerido que es considerado disponible para la absorción intestinal. La bioaccesibilidad fue calculada, según la siguiente ecuación:

Ecuación 6

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{Cantidad del compuesto en la fase micelar (mg)}}{\text{Cantidad del compuesto en el medio de digestión total (mg)}} \times 100$$



**Figura 32.** Separación del medio de digestión total y fase micelar

Los componentes del medio de digestión total (muestras + secreciones simuladas) y de la fase micelar fueron extraídos y analizados por GC-MS como se describe en el siguiente ítem.

#### ***4.2.5. Extracción lipídica***

El total de lípidos de las muestras fueron extraídos con la mezcla hexano: trimetilbutil éter (50:50 v:v), a una proporción 3:1 solvente: muestra. La mezcla fue agitada con vortex por 1 min y centrifugada a 3000 rpm durante 10 min. La fase orgánica fue separada y secada en un rota evaporador a 40°C. Una segunda extracción fue realizada con cloroformo:metanol (2:1 v:v), con las mismas condiciones que la primera extracción. La fase orgánica fue separada y colocada en el mismo recipiente de la primera extracción (ya evaporada). El solvente fue evaporado y el extracto obtenido guardado hasta ser analizado, según el protocolo de María Inés Morán-Valero, (2014), con algunas modificaciones.

#### ***4.2.6. Análisis GC-MS***

El extracto seco fue reconstituido con 2 mL de cloroformo:metanol (1:1). Una alícuota de 200µL fue tomada en un vial y evaporada bajo corriente de nitrógeno, después fueron adicionados 500µL de agente derivatizante (BSTFA), el cual fue calentado a 75°C, durante 1 h, agitando cada 15 min. Una vez finalizada esta etapa las muestras fueron inyectadas en el GC.

Los análisis GC fueron realizados de acuerdo a la metodología usada por Herrera et al., (2019), con algunas modificaciones. El equipo usado fue un cromatógrafo de gases Agilent 7890A, equipado con un inyector split/splitless, un auto muestreador G4513A y un espectrómetro de masas 5975C. La columna capilar Agilent HP-5MS (5%-fenil, 30 m, 0,25 mm id, 0,25 µm). La temperatura del inyector fue de 260°C. Como gas de arrastre se usó helio a un flujo de 2mL/min.

Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra en modo splitless. El horno tuvo el siguiente programa de temperatura: inició a 50°C por 3 min, aumentó a 310°C a una velocidad de 15 °C/min y allí, se mantuvo por 25 min. La fuente de ionización del espectrómetro de masa y la interfase, presentaron una temperatura de 230°C y 280°C, respectivamente. El rango de masas fue de 30–1000 m/z. La identificación de los compuestos fue realizada por comparación en los tiempos de retención de los estándares y el espectro de masas de la librería NIST. La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración de los estándares de colesterol y  $\beta$ -sitosterol.

#### ***4.2.7. Análisis estadístico***

Los análisis fueron realizados con el software GraphPad Prism 5, mediante ANOVA con el test de comparación múltiple de Tukey. Los valores presentados son el promedio  $\pm$  desviación estándar. La significancia estadística usada fue de  $p < 0,05$ .

### 4.3. Resultados y discusión

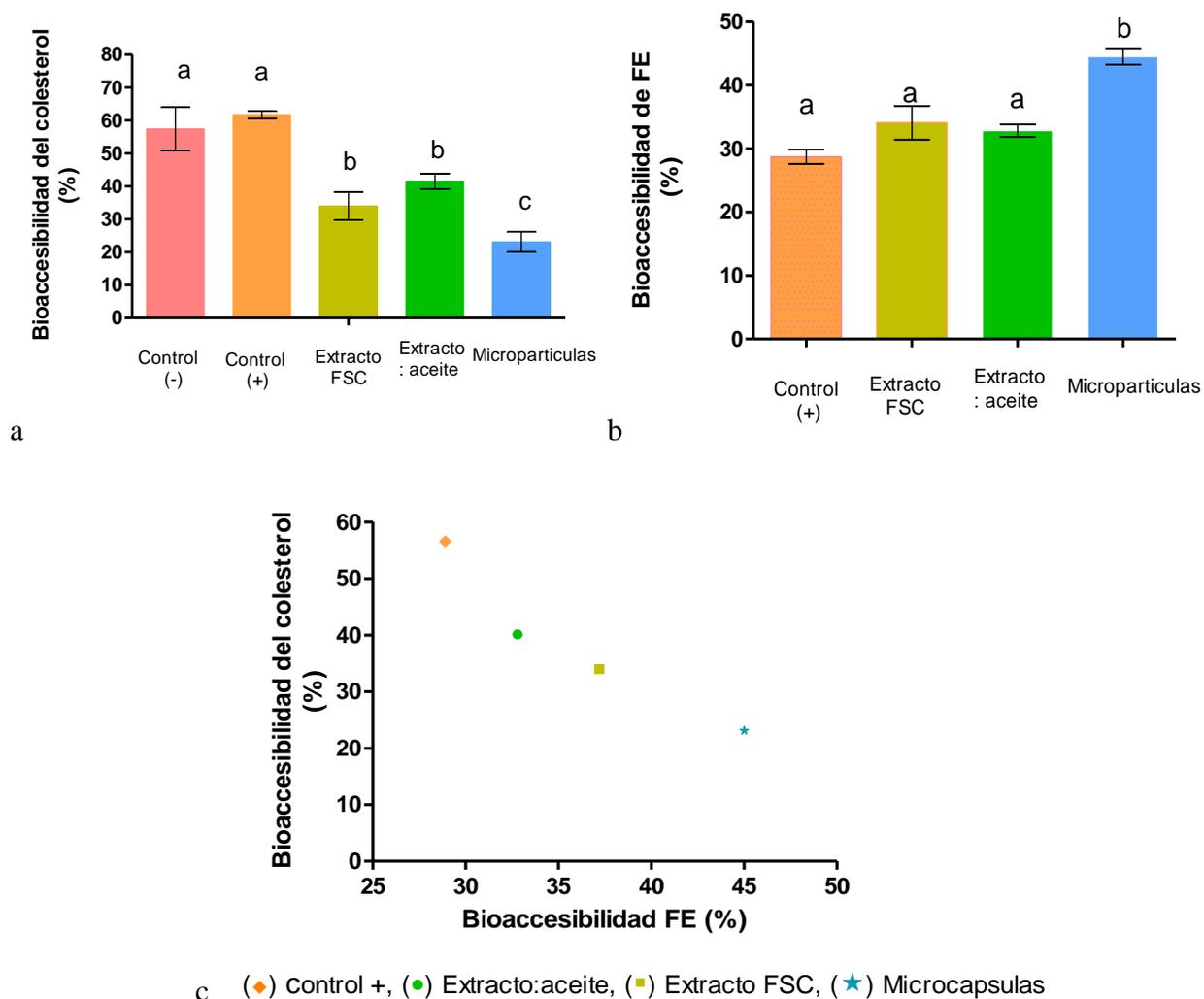
#### 4.3.1. Bioaccesibilidad del colesterol en presencia de muestras de FE

Las muestras seleccionadas para evaluación fueron escogidas, con el fin de determinar cómo su forma física puede afectar la incorporación del colesterol presente en las micelas mixtas, de acuerdo al modelo de digestión *in vitro*, haciendo énfasis en que a mayor % de bioaccesibilidad de un componente es porque mayor es su participación en las micelas (Figura 33).

De acuerdo a la Figura 33a, se muestra que la bioaccesibilidad del colesterol estuvo cerca al 60%, el cual es similar al valor de absorción fisiológica del colesterol en la dieta que varía entre 40-60% (Morán-Valero, 2014; Vaikousi et al., 2007), sin embargo, la presencia del estándar de b-sitosterol (control positivo), no mostró ninguna reducción en el colesterol, esto se debe a que la cantidad adicionada pudo haber sido insuficiente para evidenciar el efecto de los FE, a pesar de que sea una cantidad equivalente a la usada en las muestras y puede deberse a problemas de solubilidad, ya que en la producción de FE, normalmente para aumentar la pureza se involucran procesos de cristalización, y la forma cristalina, aumenta el punto de fusión, reduce la solubilidad en medio acuosos, dificultando la adecuada incorporación en las micelas, para desplazar el colesterol (McClements, 2012).

Por otra parte, es posible evidenciar que todas las muestras analizadas a partir del bagazo de caña de azúcar, muestran una reducción significativa sobre la bioaccesibilidad del colesterol. El extracto FSC y el extracto:aceite, mostraron efectos similares, logrando que el colesterol estuviera entre el 40%, lo que podría sugerir que la mezcla del extracto obtenido del bagazo con el aceite de soya no mejoró la dispersión y solubilidad del extracto en el medio de digestión, para favorecer el desplazamiento del colesterol. Con respecto a las micropartículas, estas presentaron un mayor

porcentaje de reducción de colesterol disponible (cerca al 30%), esto se explica debido a que la forma del extracto obtenido por FSC (en micropartículas), mejora la dispersión en la fase acuosa y por ende hay una inclusión eficiente de los compuestos en las micelas formadas en el proceso de digestión simulada, logrando un mejor desplazamiento del colesterol.



**Figura 33.** Evaluación de bioaccesibilidad de muestras de FE y controles durante la digestión in vitro. a) Bioaccesibilidad del colesterol, b) bioaccesibilidad del B-sitosterol y c) correlación entre la bioaccesibilidad del colesterol y los FE

En una extracción por FSC de una matriz vegetal, es posible tener un extracto con varios compuestos lipídicos diferentes a los de interés, contando con la presencia de ácidos grasos de

cadena larga y corta, los cuales mejoran la solubilidad de los FE en la matriz. Además, con respecto a los extractos que contienen FE son mejor disueltos en aceite y más estables a la cristalización, conclusión que obtiene Vaikousi et al., (2007) en su trabajo, en el que la presencia de aceite en dispersiones con FE presentaron modificaciones en los termogramas DSC, haciendo que en las muestras con contenido oleoso, los picos de fusión fueran más anchos (temperatura de fusión más baja) y menos simétricos, resultados que pueden relacionarse con los efectos sobre la solubilidad. En nuestro caso, cuando hay una dispersión, las pequeñas partículas formadas facilitan el proceso de solvatación a nivel intestinal, mejorando la solubilidad y la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos.

Otro aspecto a tener en cuenta es que, debido a la presencia de aceite en la preparación de las muestras, la temperatura y la agitación con la que se trabaja toda la digestión, pudo haber mejorado la solubilidad del extracto de FSC, solubilizándolo completamente con ayuda de las sales biliares, lo que hizo que se presentara un comportamiento similar al extracto con aceite y por esta razón, ninguna de las muestras presentó diferencias.

Las micropartículas presentaron un mejor efecto hipocolesterolemico, ya que su proceso de elaboración (microencapsulación), como se dijo anteriormente, es una técnica que no solo permite proteger ingredientes bioactivos de factores externos, si no también aumentar la solubilidad y dispersibilidad de compuestos lipofílicos (Comunian & Favaro-Trindade, 2016), mejorando así la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de metabolitos liposolubles, liberándolos fácilmente en el proceso de digestión, y haciendo que al ser partículas pequeñas las secreciones gástricas e intestinales que se llevan a cabo en el modelo, permita a los FE ser incluidos en las micelas mixtas (Gonnet et al., 2010) de una forma fácil, lo que sugiere concluir que la eficacia de los FE en la

reducción del colesterol dependerá del estado físico (Vaikousi et al., 2007) de los ingredientes que los contienen.

Por otra parte, la bioaccesibilidad de los FE es ligeramente mayor en las muestras con micropartículas ( $44,50 \pm 2,26\%$ ), comparado con las otras muestras analizadas ( $32,80 - 34,10\%$ ), como se muestra en la Figura 33b. Este comportamiento es posible dado a que las micropartículas, permiten una liberación más controlada y prolongada de los FE, logrando que por un mayor tiempo estos estén presentes en el medio de simulación gástrica y tengan una mayor interacción con las sales biliares, logrando así una incorporación más eficaz dentro de las micelas mixtas. También, se ha sido estudiado que tanto la proteína de soya como la goma arábiga contribuyen a retener aceites por más tiempo (Kong et al., 2017; Vingerhoeds & Harmsen, 2004), teniendo como consecuencia mayor contenido de FE en la digestión *in vitro*, inhibiendo que el colesterol ingrese a las micelas por más tiempo, sugiriendo que las micropartículas presentan mejores características que el resto de las muestras (extractos).

Por otra parte, al relacionar a nivel general los resultados anteriores (Bioaccesibilidad del colesterol y de los FE), es posible encontrar (como se ilustra en la Figura 33c), una correlación negativa entre ambas bioaccesibilidades ( $r = -0,9574$ ). La estrecha relación entre estas dos variables muestra que un aumento en la presencia del colesterol en la fase micelar se traduce en una reducción en la bioaccesibilidad de los FE. Esto se da debido a que tanto los FE como el colesterol tienen estructuras muy similares, por lo que hay una competición entre estos para la solubilización de las micelas mixtas, logrando que el colesterol sea desplazado por los FE (Jain & Bathla, 2015), además, la limitada solubilidad del colesterol a nivel micelar en presencia de FE podría ser una de las mayores causas de la inhibición en la absorción del colesterol (Ikeda,

2015). También, se puede resaltar que las micropartículas ofrecen mayor actividad antioxidante durante el tiempo de digestión (

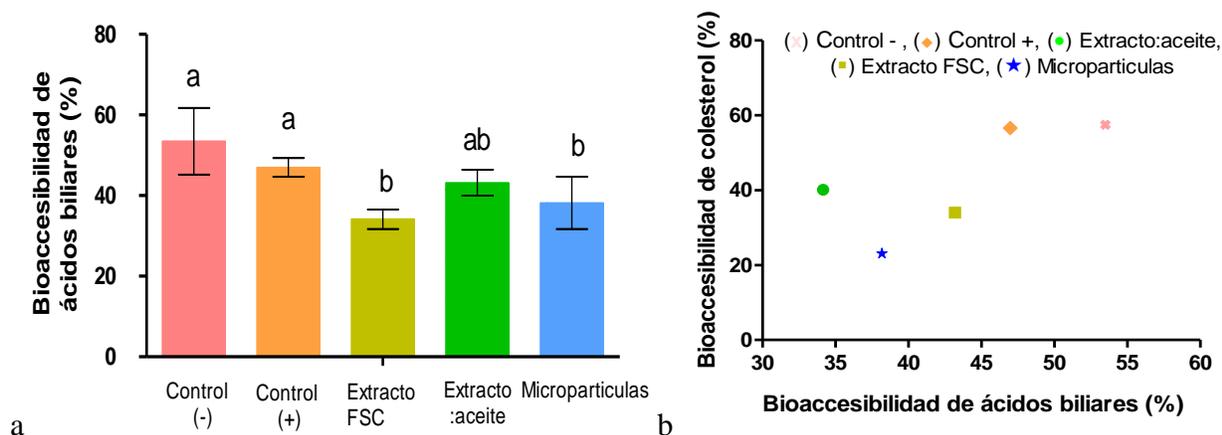
**Anexo E**), lo que rectifica que las micropartículas, son la opción de ingrediente adecuado para la posterior adición a una matriz acuosa.

La efectividad de los esteroides vegetales depende en gran medida de su estado físico, para lograr competir con el colesterol por la solubilización en las micelas mixtas del intestino, debido a que estos deben distribuirse uniformemente en el contenido intestinal y tener una alta superficie efectiva (Vaikousi et al., 2007). En la revisión realizada por Smet et al., (2012), también se puede ver la importancia de la forma física de los FE, ya que si estos forman cristales estables, las soluciones sólidas que son formadas, se caracterizan por una bioaccesibilidad extremadamente baja (Smet et al., 2012).

#### ***4.3.2. Bioaccesibilidad del colesterol y las sales biliares***

Debido a que las matrices vegetales son complejas, y sus extractos contienen varios compuestos, es necesario tratar de comprender si las muestras analizadas, que contienen otros metabolitos secundarios diferentes a los FE (caracterización realizada en el capítulo 1), poseen otro mecanismo que ayude a reducir la bioaccesibilidad del colesterol; como lo puede ser la precipitación de ácidos biliares.

La bioaccesibilidad de los ácidos biliares en controles negativos ( $53,50 \pm 8,25\%$ ) y positivos ( $46,97 \pm 2,34\%$ ) no presenta diferencias significativas (Figura 34a). Esto sugiere que con o sin un estándar de fitoesterol, los ácidos biliares en el medio no se ven afectados, retomando que el mecanismo más citado es la competencia entre el colesterol y los FE para su incorporación en micelas mixtas en el tracto intestinal, que es el primer paso para la absorción en los enterocitos (Vaghini et al., 2016) y no otro como relacionado con la reducción de sales biliares en el medio.



**Figura 34.** Efecto de las muestras y controles evaluados sobre a) la bioaccessibilidad de los ácidos biliares y b) la correlación entre la bioaccessibilidad del colesterol y los ácidos biliares. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

Las muestras de extracto FSC ( $43,20 \pm 3,25\%$ ), extracto con aceite ( $34,15 \pm 2,42\%$ ) y micropartículas ( $38,18 \pm 6,50\%$ ), no presentan diferencias significativas en la bioaccessibilidad entre ellas, con respecto a la precipitación de las sales biliares como mecanismo para la reducción del colesterol; pero si se observa una ligera diferencia con respecto a los controles. Esto sugiere que las muestras usadas contienen algunos componentes que pueden reducir la cantidad de ácidos biliares que son cuantificados desde la fase micelar, causando que la concentración micelar crítica pueda ser afectada y formar menos micelas que aquellas en los controles. También se puede determinar que al no presentarse diferencias entre las muestras analizadas, es posible determinar que la ligera reducción se debe al extracto y no al aceite o a los agentes encapsulantes empleados.

Como se observa en la Figura 34b, a pesar que se encuentra una correlación positiva entre la bioaccessibilidad del colesterol y de los ácidos biliares ( $r = 0,7317$ ), indicando una posible relación entre las variables analizadas, según el coeficiente de correlación no hay una relación cercana entre la bioaccessibilidad de sales biliares y la del colesterol. Lo que sugiere que no es posible asegurar que el mecanismo usado por las muestras analizadas de los extractos de FE a partir del bagazo para

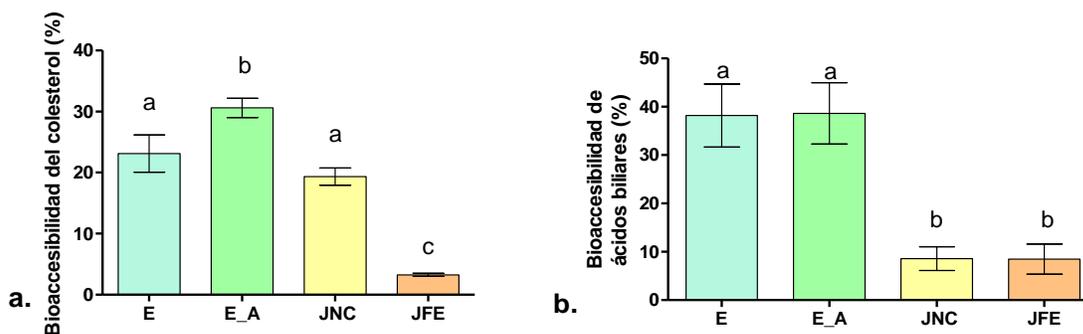
la reducción de la bioaccesibilidad del colesterol sea debido a algunas interferencias en la formación de las micelas de ácidos biliares, por esta razón es difícil elucidar el mecanismo exacto de la reducción del colesterol.

#### ***4.3.3. Bioaccesibilidad del colesterol en muestras de jugo de naranja***

Manteniendo la relación de jugo de naranja y FE encapsulados, con la que se trabajó el capítulo 3, y viendo en efecto que la mejor selección para poder elaborar un producto funcional era la adición de FE en forma de micropartículas por sus múltiples cualidades, se prosigue a identificar si la matriz alimenticia interfiere con el efecto inhibitor del colesterol que se busca.

Como se muestra en la Figura 35a, la bioaccesibilidad del colesterol en presencia de los FE encapsulados ( $23,10 \pm 3,05\%$ ) y el control de la encapsulación – E\_A (Encapsulado diluido en agua,  $30,60 \pm 1,59\%$ ), presenta una leve diferencia que podría indicar que la fase micelar se vio afectada por el volumen de agua añadido, lo que provocó una dilución de la cantidad de micelas mixtas (debido a la cantidad de sales biliares).

Por otro lado, la bioaccesibilidad del colesterol en presencia de los encapsulados ( $23,10 \pm 3,05\%$ ) y jugo de naranja ( $19,33 \pm 1,43\%$ ) no presenta diferencias estadísticas (Figura 35a), lo que indica que la reducción del colesterol sería equivalente a consumir solo jugo de naranja o el encapsulado de FE ofrecido en este trabajo, para lograr una disminución de aproximadamente 30% en la bioaccesibilidad del colesterol (de acuerdo con el modelo de digestión *in vitro* evaluado). Sin embargo, esta similitud en los valores puede deberse a que la capacidad de las micelas para solubilizar moléculas lipofílicas insolubles en agua es limitada (Smet et al., 2012).



**Figura 35.** Efecto de las muestras: E (Encapsulados), E\_A (Encapsulados en agua), JNC (jugo de naranja control) y JFE (Jugo de naranja con FE) sobre la a) bioaccesibilidad del colesterol y b) bioaccesibilidad de los ácidos biliares. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras.

Al adicionar las micropartículas de FE al jugo de naranja, se observa un efecto sinérgico, con una reducción en la bioaccesibilidad del colesterol de  $3,27 \pm 0,25\%$ ; este resultado es posible dada la presencia de otros compuestos minoritarios en el jugo, como lo son los carotenoides, los cuales también se absorben ingresando a la micela mixta (Fernández-García et al., 2012) y pueden reducir la cantidad de colesterol que ingrese en las micelas. De igual forma, debido a las propiedades del jugo de naranja, el cual es una fuente de vitaminas y otros nutrientes como carotenoides, flavonoides (hesperidina y narirutina), folato y vitamina C, los cuales hacen de esta bebida una excelente fuente de antioxidantes, que ha demostrado que reduce el colesterol total en personas normo-colesterolémicas (Aschoff et al., 2015, Devaraj et al., 2004), es posible que la reducción de colesterol mediante este modelo se deba a otros mecanismos diferentes a la solubilización en fase micelar. Además, como se vio anteriormente (capítulo 3), la bebida obtenida también contenía buena cantidad de fibra soluble, la cual impide el adecuado proceso de micelización ya que el contenido biliar se solubiliza fácilmente en los geles que se forman durante la digestión

(Fernández-García et al., 2012; Rodríguez-Roque, 2014), impidiendo formación de micelas, como se verá más adelante, con la afectación de la bioaccesibilidad de los ácidos biliares.

En la Figura 35b, entre las muestras de encapsulados ( $38,18 \pm 6,50\%$ ) y su control E\_A ( $38,65 \pm 6,33\%$ ), no hay diferencias estadísticas; indicando que la adición de agua no influye en la cantidad de ácidos biliares disponibles para la formación de las micelas. Sin embargo, las muestras correspondientes a JNC ( $8,60 \pm 2,44\%$ ) y JFE ( $8,49 \pm 3,11\%$ ), afectan la presencia de ácidos biliares, esto sugiere que la reducción de colesterol es debido a mecanismos que inhiben la acción de los ácidos biliares, bien sea por la reducción de la concentración micelar crítica o un impedimento físico, como aumento de viscosidad para formar las micelas. La solubilización en las micelas es crucial para la absorción de diferentes compuestos lipídicos en el intestino y la actuación de los ácidos biliares, por lo que una alteración en la concentración micelar y/o composición de los ácidos biliares pueden afectar la absorción de colesterol en el intestino (Tazuma & Takikawa, 2017). Por otra parte, se puede determinar que la reducción de los ácidos biliares, se debe principalmente a la matriz empleada (Jugo de naranja), ya que anteriormente se demostró que las micropartículas solas, no cuentan con ningún efecto en la disminución del carácter anfifílico de las sales biliares.

La baja bioaccesibilidad del colesterol en el JFE, podría sugerir que esta bebida tiene una buena capacidad de inhibición en la absorción del colesterol en las micelas mixtas, según el modelo de digestión simulado. Sin embargo, es importante aclarar que la determinación de la bioaccesibilidad por este método, es una herramienta la cual provee una aproximación en la eficacia de cualquier ingrediente bioactivo pero no es posible extrapolar estos resultados *in vivo* o resultados clínicos, como se aprecia en el estudio de Garcia-Llatas et al., (2015), donde el valor de bioaccesibilidad de

bebidas lácteas con fruta enriquecida con FE libres *in vitro* comparado con resultados *in vivo*, no reflejaron los resultados obtenidos en el análisis *in vivo*, diferencias que son explicadas porque los estudios *in vitro* solo evalúan el contenido de la fracción soluble del ingrediente de interés y no el paso a través del enterocito para su absorción (Garcia-Llatas et al., 2015).

Los modelos de digestión *in vitro* que miden la bioaccesibilidad de micro y macronutrientes en los alimentos imitando las condiciones fisiológicas en el tracto intestinal, se han convertido en una popular herramienta de investigación de bajo costo y alto rendimiento. Aunque presentan grandes inconvenientes en comparación con los estudios *in vivo*, los modelos *in vitro* permiten el cribado rápido y económico de un conjunto de muestras más grande, lo que sirve como base científica para continuar con más estudios *in vivo* (Aschoff et al., 2015).

#### 4.4. Conclusiones parciales

Se encuentra una estrecha relación entre el estado físico en el que se proporcionan las muestras analizadas, la reducción de la bioaccesibilidad del colesterol y el aumento de la bioaccesibilidad de FE, demostrando que las formas sólidas, en polvo con pequeños tamaños de partícula son fácilmente solubilizados e incorporados en las micelas, a diferencia de la muestra extraída directamente por FSC, sin ningún tratamiento previo.

Las muestras de ingredientes analizados no ofrecen una reducción significativa de las sales biliares en el proceso de digestión intestinal, sugiriendo que la inhibición en la fase micelar del colesterol no se debe a la precipitación de las sales biliares.

De acuerdo al efecto sinérgico que proporciona la bebida de naranja y los FE encapsulados al reducir el colesterol disponible en las micelas, por mecanismos de competición FE-colesterol, es posible considerar que el JFE, es una opción adecuada para la disminución de más del 80% del colesterol presente en las micelas, pudiendo considerarse como un alimento con alta probabilidad de ser hipocolesterolemico, según el modelo *in vitro* empleado.

## CONCLUSIONES

Con la extracción de FE a partir del bagazo de caña de azúcar mediante la tecnología de FSC a condiciones de 40°C, 400bar, 6 mL/min, 0% cosolvente, 210 min, se obtuvo un extracto de un rendimiento de 0,92% y una concentración de FE totales de 30,87 mg / g extracto, 3 veces mayor que la lograda con el método convencional de Soxhlet. Además, al comparar estos resultados con los encontrados en otras matrices es posible establecer que el bagazo de caña de azúcar puede ser considerado como una buena fuente de FE, que abre una alternativa para el aprovechamiento de este residuo a la vez de la obtención de ingredientes funcionales a nivel nacional.

Las micropartículas de FE extraídos por FSC y obtenidas mediante secado por aspersión, empleando como agentes encapsulantes M, PAS y GA (1:21:78) presentó un RS 65%, EE 73%, tamaño de partícula < 25µm y una estructura amorfa de acuerdo a los resultados obtenidos por SEM y difracción de rayos X, permitió mejorar la solubilidad del extracto encapsulado, aumentando las matrices alimentarias a las cuales podría ser incorporado.

La bebida de naranja comercial con adición de FE encapsulados, presentó una buena aceptación general a nivel sensorial, tanto para jueces entrenados como para los consumidores frecuentes quienes brindaron una calificación de “me gusta mucho” en la escala hedónica. Sin embargo, debido a los cambios en los parámetros de pH, SDT, CE y aceptación sensorial evaluados en el tiempo se puede considerar como un producto perecedero, que requiere de diferentes técnicas de conservación y envase para que pueda contar con una mayor vida útil.

El modelo de digestión gastrointestinal simulado permitió determinar que tanto las micropartículas de FE extraídos por FSC como su adición en un jugo de naranja comercial, proporcionan una buena reducción en la incorporación del colesterol dentro de las micelas de

absorción, demostrando que las micropartículas mejoran el efecto con respecto a las otras muestras analizadas y que al adicionarlo a la matriz seleccionada no pierde la efectividad si no que se potencializa debido a la composición química del jugo.

El producto final desarrollado en esta tesis, basado en un jugo de naranja con incorporación de microencapsulados de FE obtenidos del bagazo de caña de azúcar extraídos por la tecnología de FSC, se puede considerar una alternativa a tener en cuenta en el mercado para la población colombiana en general, que contribuya a la reducción del colesterol y por ende a la disminución en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, proporcionando de esta forma una opción disponible en el área de los alimentos funcionales.

## RECOMENDACIONES

Hacer un estudio de vida útil, con al menos otra temperatura para lograr la aplicación de la ecuación de Arrhenius, con mucha mayor precisión; a su vez, adicionar dentro de los parámetros a evaluar, análisis microbiológicos que permita garantizar la inocuidad del producto, análisis sensorial con mayor número de consumidores para contar con muestras representativas de la población.

Seleccionar otras matrices acuosas, tales como bebidas de otras frutas, para determinar el cambio en la calidad sensorial, estabilidad y bioaccesibilidad, al incorporar los encapsulados de FE obtenidos en este trabajo.

Para los estudios de bioaccesibilidad, ampliar el estudio del efecto que poseen compuestos minoritarios de la matriz, tales como vitamina C, flavanonas, carotenoides sobre el método *in vitro* de digestión simulada, en la reducción del colesterol desde las micelas, para mostrar sinergias entre el jugo de naranja y los encapsulados de FE, específicamente.

Determinar los cambios que sufren los encapsulados de FE (secos y en la bebida) a través del tiempo en parámetros como el tamaño, color, estabilidad de FE dentro de las partículas, ganancia de humedad, liberación de FE en bebida y cambios en la bioaccesibilidad.

Realizar un análisis de viabilidad económica, que incluya desde el proceso de transporte del bagazo de caña de azúcar del trapiche, hasta el proceso de empaque de la bebida, identificando así su rentabilidad.

Escalar las condiciones óptimas encontradas en los procesos de extracción y encapsulación, que permita determinar rendimientos a nivel industrial, para futuras aplicaciones de FE en matrices alimentarias.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2522–2529. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1396-5>
- Abumweis, S. S., Barake, R., & Jones, P. J. H. (2008). Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food and Nutrition Research*, 52, 1–17. <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1811>
- Acosta-Domínguez, L., Hernández-Sánchez, H., Gutiérrez-López, G. F., Alamilla-Beltrán, L., & Azuara, E. (2016). Modification of the soy protein isolate surface at nanometric scale and its effect on physicochemical properties. *Journal of Food Engineering*, 168, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.031>
- Agriculture and Agri-Food Canada. (2009, December). Consumer Trends: Functional Foods. *Market Analysis Report, December*, 1–10.
- Agronet-Minagricultura. (2017). *Estadísticas Agrícolas*. Evaluaciones Agropecuarias Municipales. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Ahmad, T., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gull, A. (2019). Supercritical Fluid Extraction: A Review. *Fluid Phase Equilibria*, 5(1), 114–122. [https://doi.org/10.1016/0378-3812\(86\)85017-8](https://doi.org/10.1016/0378-3812(86)85017-8)
- Alarcón, G. A. R., Sanchez, C. G., Gómez, E. O., & Barbosa, L. A. (2006). Caracterización del bagazo de la caña de azúcar: Parte I: características físicas. *Anales Del 6. Encuentro de Energia*  
*No* *Meio* *Rural*, *6*, 1–10.

[http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=MSC0000000022006000100036&lng=es&nrm=iso](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022006000100036&lng=es&nrm=iso)

Alemaný-Costa, L., Cilla, A., García-Llatas, G., Rodríguez-Estrada, M. T., Cardenia, V., & Alegría, A. (2013). Effect of simulated gastrointestinal digestion on plant sterols and their oxides in enriched beverages. *Food Research International*, 52(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.024>

Alemaný-Costa, L., González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegría, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L. M., & Lagarda, M. J. (2012). Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Research International*, 48(1), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.005>

Álvarez-Henao, M. V., Saavedra, N., Medina, S., Jiménez Cartagena, C., Alzate, L. M., & Londoño-Londoño, J. (2018). Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. *Food Chemistry*, 256(118), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.059>

Álvarez-Sala, A., García-Llatas, G., Cilla, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L. M., & Lagarda, M. J. (2016). Impact of Lipid Components and Emulsifiers on Plant Sterols Bioaccessibility from Milk-Based Fruit Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(28), 5686–5691. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02028>

Alvim, I., Souza, F., Koury, I., Jurt, T., & Dantas, B. (2013). Use of the spray chilling method to deliver hydrophobic components : physical characterization of microparticles. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33, 34–39. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000500006>

Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., Nieto, A. B., & Vidales, S. L. (2004). Criterios para seleccionar los factores de conservación a combinar en el desarrollo de los productos frutícolas. In FAO (Ed.), *Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de capacitación*. <http://www.fao.org/3/y5771s/y5771s02.htm>

Amir Shaghghi, M., Harding, S. V., & Jones, P. J. H. (2014). Water dispersible plant sterol formulation shows improved effect on lipid profile compared to plant sterol esters. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.017>

Arboris LLC. (2008). *GRAS Notification for Pine Tree Phytosterols*.

Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R., & Gámbaro, A. (2009). Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food Research International*, 42(7), 871–878. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.006>

Aschoff, J. K., Kaufmann, S., Kalkan, O., Neidhart, S., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2015). In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [ *Citrus sinensis* (L.) osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 578–587. <https://doi.org/10.1021/jf505297t>

Asikin, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Hou, D.-X., Takara, K., & Wada, K. (2012). Wax , policosanol , and long-chain aldehydes of different sugarcane ( *Saccharum officinarum* L .) cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 583–591. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100300>

Asocaña. (2020). *Sector agroindustrial de la caña*. <http://www.asocana.org/publico/info.aspx?Cid=215>

- Athyros, V. G., Kakafika, A. I., Papageorgiou, A. A., Tziomalos, K., Peletidou, A., Vosikis, C., Karagiannis, A., & Mikhailidis, D. P. (2011). Effect of a plant stanol ester-containing spread, placebo spread, or Mediterranean diet on estimated cardiovascular risk and lipid, inflammatory and haemostatic factors. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(3), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.08.014>
- Attard, T. M., McElroy, C. R., Rezende, C. A., Polikarpov, I., Clark, J. H., & Hunt, A. J. (2015). Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Industrial Crops and Products*, 76, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.077>
- Bano, R. (2013). Phytosterols in human nutrition. *International Journal of Scientific Research and Reviews*, 2(2), 1–10. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220>
- Barbosa-Cánovas, Gustavo V. Ortega-Rivas, E., & Hong Yan, P. J. (2005). Food powders Physical properties, processing and functionality. In *Food engineering series*. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124155>
- Barriuso, B., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2016). Unsaturated lipid matrices protect plant sterols from degradation during heating treatment. *Food Chemistry*, 196, 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.074>
- Baumgartner, S., Mensink, R. P., Husche, C., Lütjohann, D., & Plat, J. (2013). Effects of plant sterol- or stanol-enriched margarine on fasting plasma oxyphytosterol concentrations in healthy subjects. *Atherosclerosis*, 227(2), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.012>
- Beakawi Al-Hashemi, H. M., & Baghabra Al-Amoudi, O. S. (2018). A review on the angle of

- repose of granular materials. *Powder Technology*, 330, 397–417.  
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.02.003>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Lipid- unsaponifiable constituents. In *Food Chemistry* (4th ed.). Springer.
- Berk, Z. (2013). *Food Process Engineering and Technology* (S. Taylor (ed.); second edi). Food science and technology, international series.
- Bernal, A. J. D., Crowfoot, D., Fankuchen, I., & Fankuchen, I. (1940). X-Ray crystallography and the chemistry of the steroids. Part I. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 239(802), 135–182.  
<https://doi.org/10.1098/rsta.1940.0010>
- Beveridge, T. H. J., Girard, B., Kopp, T., & Drover, J. C. G. (2005). Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether : Varietal Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1799–1804.
- Blom, W. A. M., Koppenol, W. P., Hiemstra, H., Stojakovic, T., Scharnagl, H., & Trautwein, E. A. (2019). A low-fat spread with added plant sterols and fish omega-3 fatty acids lowers serum triglyceride and LDL-cholesterol concentrations in individuals with modest hypercholesterolaemia and hypertriglyceridaemia. *European Journal of Nutrition*, 58(4), 1615–1624. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1706-1>
- Boue, S. M., Shih, B. Y., Burow, M. E., Eggleston, G., Lingle, S., Pan, Y., Daigle, K., & Bhatnagar, D. (2013). Postharvest Accumulation of Resveratrol and Piceatannol in Sugarcane with Enhanced Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8412–

8419. <https://doi.org/10.1021/jf4020087>

Bureau of Nutritional Sciences Food Directorate. (2010). *Notice of assessment of certain categories of foods containing added phytosterols*. Health Products and Food Branch Health Canada.

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.061>

Buyuktuncer, Z., Fisunoğlu, M., Guven, G. S., Unal, S., & Besler, H. T. (2013). The cholesterol lowering efficacy of plant stanol ester yoghurt in a Turkish population: A double-blind, placebo-controlled trial. *Lipids in Health and Disease*, *12*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-91>

Caliskan, G., & Dirim, S. N. (2016). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Powder Technology*, *287*, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.10.019>

Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2006). Phytosterol-mediated inhibition of intestinal cholesterol absorption is independent of ATP-binding cassette transporter A1. *British Journal of Nutrition*, *95*, 618–622. <https://doi.org/10.1079/BJN20051659>

Calpe-Berdiel, L., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2009). New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, *203*(1), 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.026>

- Cândida Rabelo, S., Carvalho da Costa, A., & Vaz Rossel, C. E. (2015). Industrial waste recovery. In *Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol* (pp. 365–381). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802239-9.00017-7>
- Cantrill, R., & Kawamura, Y. (2008). Phytosterols, phytostanols and their esters. Chemical and Technical Assessment. In *JECFA-Chemical and Technical Assessment* (Vol. 69). <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Phytosterols.pdf>
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- Cardona Salazar, B. L. (2011). *Guía de laboratorio. Propiedades de los sólidos. Manejo de sólidos y Líquidos* (MSL-01). Centro de laboratorios. Corporación Universitaria Lasallista.
- Carmona, M. A., Jiménez, C., Jiménez-Sanchidrián, C., Peña, F., & Ruiz, J. R. (2010). Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate. *Journal of Food Engineering*, 101(2), 210–213. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.004>
- Carretero Colomer, M. (2008). Hipercolesterolemia. Diagnóstico y tratamiento. *Offarm*, 27(9), 109–111. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-hipercolesterolemia-diagnostico-tratamiento-13127390> ER
- Carrillo Inungaray, M. L., & Reyes Munguía, A. (2013). Vida útil de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3).
- Castañeda, J., Arteaga, H., Siche, R., & Rodríguez, G. (2010). Estudio comparativo de la pérdida

- de vitamina C en chalarina ( *Casimiroa edulis* ) por cuatro métodos de deshidratación. *Scientia Agropecuaria*, 1(1), 75–80. [https://sites.google.com/a/unitru.edu.pe/sci-agropecu/publicacion/scagropv1n1/scagrop01\\_75-80](https://sites.google.com/a/unitru.edu.pe/sci-agropecu/publicacion/scagropv1n1/scagrop01_75-80)
- Castro, N., Durrieu, V., Raynaud, C., & Rouilly, A. (2016). Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. *Carbohydrate Polymers*, 144, 464–473. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.004>
- Celli, G. B., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2015). Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods -a Review of Methods and Current Limitations. *Food and Bioprocess Technology*, 8(9), 1825–1837. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1559-z>
- Cercaci, L., Rodriguez-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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.010>
- Chaudhari, P. R., Jain, A. K., & Aparnathi, K. D. (2014). Phytosterol : A Functional Ingredient in Food. In *Technical Articles* (pp. 165–169).
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 17(5), 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.011>
- 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. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.755541>

- Chen, X. W., Guo, J., Wang, J. M., Yin, S. W., & Yang, X. Q. (2016). Controlled volatile release of structured emulsions based on phytosterols crystallization. *Food Hydrocolloids*, *56*, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.035>
- Choi, J.-Y., Lee, H.-J., Cho, J.-S., Lee, Y.-M., Woo, J.-H., & Moon, K.-D. (2017). Prediction of shelf-life and changes in the quality characteristics of semidried persimmons stored at different temperatures. *Food Science and Biotechnology*, *26*(5), 1255–1262. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0173-4>
- Christie, W. W. (2012). Sterols 3. Sterols and their conjugates from plants and lower organisms: structure, occurrence, biochemistry and analysis. In *The lipid library*.
- Cilla, A., Garcia-Llatas, G., Lagarda, M. J., Barberá, R., & Alegría, A. (2019). Development of functional beverages: the case of plant sterol-enriched milk-based fruit beverages. In *Functional and Medicinal Beverages* (pp. 285–312).
- Čížková, H., Soukupová, V., Voldřich, M., & Ševčík, R. (2007). Differentiation of coffee varieties according to their sterolic profile. *Journal of Food and Nutrition Research*, *46*(1), 28–34.
- CK-12 Foundation. (2021). *Órganos del Sistema Digestivo*. Conceptos de Ciencias de La Vida. <https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-conceptos-de-ciencias-de-la-vida-grados-6-8-en-espanol/section/11.18/primary/lesson/Órganos-del-sistema-digestivo-%3A%3Aof%3A%3A-Órganos-del-sistema-digestivo-%3A%3Aof%3A%3A-conceptos-life-science-ck-12-para-la-escue>
- Clavijo-Romero, V., Ortiz C., D., & Serna-Jiménez, J. A. (2016). Identificación de factores microbiológicos asociados al deterioro de jugo (naranja-mandarina) mínimamente procesado

- para su bioconservación. *Alimentos Hoy*, 24(39), 159.  
[https://acta.org.co/acta\\_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/viewFile/413/343](https://acta.org.co/acta_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/viewFile/413/343)
- Cofan Pujol, M. (2014). Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 26(1), 41–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.10.008>
- Color-paints. (2021). *Paleta de colores PANTONE*. Catalogo de Colores Pantone. <https://color-paints.ru/?p=pantone>
- Comunian, T. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. In *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>
- Coutinho, I. D., Baker, J. M., Ward, J. L., Beale, M. H., Creste, S., & Cavalheiro, A. J. (2016). Metabolite Profiling of Sugarcane Genotypes and Identification of Flavonoid Glycosides and Phenolic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 4198–4206.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01210>
- Da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>
- Dąbrowski, G., Czaplicki, S., & Konopka, I. (2019). Fractionation of sterols, tocopherols and squalene in flaxseed oils under the impact of variable conditions of supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83(July).  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103261>

DANE. (2015). Cuenta satélite piloto de la agroindustria del cultivo de caña de azúcar 2005-2012.

In *Dirección de Síntesis y Cuentas Nacionales (DSCN)*. <https://doi.org/1>. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) [Internet]. [cited 2015 Mar 5]. Available from: <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/censos>

DANE. (2017). *Boletín Técnico - Encuesta Nacional Agropecuaria*.

[https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2017/boletin\\_ena\\_2017.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2017/boletin_ena_2017.pdf)

De Graaf, J., De Sauvage Nolting, P. R. W., Van Dam, M., Belsey, E. M., Kastelein, J. J. P., Pritchard, P. H., & Stalenhoef, A. F. H. (2002). Consumption of tall oil-derived phytosterols in a chocolate matrix significantly decreases plasma total and low-density lipoprotein-cholesterol levels. *British Journal of Nutrition*, 88, 479–488. <https://doi.org/10.1079/BJN2002690>

De Icaza Tena, G. (2018). *La Vida Útil de los Alimentos y sus Principales Reacciones: ¿Qué pasa en los alimentos con el tiempo?* Innovación Editorial Lagares de México, S.A.

De Jong, A., Plat, J., & Mensink, R. P. (2003). Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(7), 362–369. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(03)00002-0)

de Luna Jiménez, A. (2006). Valor Nutritivo de la Proteína de Soya. *Investigación y Ciencia*, 14(36), 29–34. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67403606>

de Melo, M. M. R., Silvestre, a. J. D., & Silva, C. M. (2014). Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green

- technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.04.007>
- de Palma, K. R., García-Hernando, N., Silva, M. A., Tomaz, E., & Soria-verdugo, A. (2019). Pyrolysis and Combustion Kinetic Study and Complementary Study of Ash Fusibility Behavior of Sugarcane Bagasse , Sugarcane Straw , and Their Pellets □ Case Study of Agro-Industrial Residues. *Energy & Fuels*, 33, 3227–3238.  
<https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b04288>
- del Río, J. C., Marques, G., Lino, A. G., Lima, C. F., Colodette, J. L., & Gutiérrez, A. (2015). Lipophilic phytochemicals from sugarcane bagasse and straw. *Industrial Crops and Products*, 77, 992–1000. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.064>
- del Valle, J. M., & Uquiche, E. L. (2002). Particle size effects on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil-containing seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), 1261–1266.  
<https://doi.org/10.1007/s11746-002-0637-9>
- Deng, R. (2012). Food and Food Supplements with Hypocholesterolemic Effects. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1(1), 15–24.  
<https://doi.org/10.2174/2212798410901010015>
- Devaraj, S., Autret, B. C., & Jialal, I. (2006). Reduced-calorie orange juice beverage with plant sterols lowers C-reactive protein concentrations and improves the lipid profile in human volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 756–761. <https://doi.org/84/4/756>  
[pii]
- Devaraj, S., Jialal, I., & Vega-Lopez, S. (2004). Plant Sterol-Fortified Orange Juice Effectively

- Lowers Cholesterol Levels in Mildly Hypercholesterolemic Healthy Individuals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(3), e25–e28. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120784.08823.99>
- Di-Batista, C. A., Constenla, D., Ramírez Rigo, M. V., & Piña, J. (2017). Process analysis and global optimization for the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 321, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.08.008>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>
- Di-Battista, C. A., Trapé, D., Constenla, D. T., Ramírez Rigo, V., & Piña, J. (2013). microencapsulación de fitoesteroles mediante secado por atomización: influencia de la temperatura de secado. *AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos*.
- Di Battista, C. A., Ramírez-Rigo, M. V., & Piña, J. (2018). *Microencapsulation of Phytosterols by Spray Drying* (Vol. 56). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64058-1.00011-X>
- Diftis, N., & Kiosseoglou, V. (2006). Physicochemical properties of dry-heated soy protein isolate – dextran mixtures. *Food Chemistry*, 96, 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.036>
- Dikshit, S., Bubna, S., Gupta, A., & Kumar, P. (2020). Advances in various techniques for isolation and purification of sterols. *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), 2393–2403. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04209-3>
- Dima, S., Dima, C., & Iordachescu, G. (2015). Encapsulation of Functional Lipophilic Food and

Drug Biocomponents. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 417–438.  
<https://doi.org/10.1007/s12393-015-9115-1>

Domingues, R. M. A., de Melo, M. M. R. De, Oliveira, E. L. G., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D., & Silva, C. M. (2013). Optimization of the supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark using experimental design. *The Journal of Supercritical Fluids*, 74, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.12.005>

Doornbos, A. M. E., Meynen, E. M., Duchateau, G. S. M. J. E., van der Knaap, H. C. M., & Trautwein, E. A. (2006). Intake occasion affects the serum cholesterol lowering of a plant sterol-enriched single-dose yoghurt drink in mildly hypercholesterolaemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(3), 325–333. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602318>

Dopico-Ramírez, D., García-García, L., Abril-González, A., & Cordero-Fernández, Yelenys Hernández-Corvo, D. (2012). Lignina de bagazo como fibra dietética. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 46(1), 46–50.

Dordevic, V., Balanc, B., Belscak-Cvitanovic, A., Levic, S., Trifkovic, K., Kalusevic, A., Kostic, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedovic, V. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 7, Issue 4, pp. 452–490). <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>

Durán C, R., & Valenzuela B, A. (2010). La Experiencia Japonesa Con Los Alimentos Foshu: ¿Los Verdaderos Alimentos Funcionales? *Revista Chilena de Nutrición*, 37(2), 224–233. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182010000200012>

- EFSA -European Food Safety Authority-. (2006). *Plant stanol esters and blood cholesterol - Scientific substantiation of a health claim related to plant stanol esters and lower/reduced blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006*. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/825>
- Elez-Martínez, P., Soliva-Fortuny, R. C., & Martín-Belloso, O. (2005). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment. *European Food Research and Technology*, 222(3), 321. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0073-3>
- Eller, F. J., Moser, J. K., Kenar, J. A., & Taylor, S. L. (2010). Extraction and Analysis of Tomato Seed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(7), 755–762. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1563-4>
- Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 25(2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
- Escolà-Gil, J. C., Quesada, H., Julve, J., Martín-Campos, J. M., Cedó, L., & Blanco-Vaca, F. (2014). Sitosterolemia: Diagnosis, investigation, and management. *Current Atherosclerosis Reports*, 16(424). <https://doi.org/10.1007/s11883-014-0424-2>
- Espinoza Atencia, E. (2019). Evaluación De La Vida Útil De Los Alimentos (Shelf Life): Efecto De La Temperatura. *Ciencia & Desarrollo*, 4, 90–94. <https://doi.org/10.33326/26176033.1996.4.83>

- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B 6, B 12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3 AUG(August), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>
- Euromonitor. (2018). Soft Drinks Global Industry Overview. In *Euromonitor* (Issue March).
- Euromonitor Internacional. (2017a). Consumer Lifestyles in Colombia. In *Passport: Vol. march*.
- Euromonitor Internacional. (2017b). *Soft Drinks in Colombia* (Issue FebreRo).
- European Commission. (2012). (EU) No 432/2012 “list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children’s development and health.” <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:136:0001:0040:en:PDF>
- Solubility-Characters, 5 (2014). <https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/godkendelse/kontrol-og-inspektion/~media/D0991097DDB34313879B9A79CD12FA20.ashx>
- Evrendilek, G. A., Jin, Z. T., Ruhlman, K. T., Qiu, X., Zhang, Q. H., & Richter, E. R. (2000). Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 77–86. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(99\)00004-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1466-8564(99)00004-1)
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Falet, H. (2013). Sitosterolemia: Platelets on high-sterol diet. *Blood*, 122(15), 2534–2535.

<https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-521153>

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

FAO. (2018). *FAOSTAT*. Faostat Crops- Production of Sugar Cane: Top 10 Producers. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. (2017). *Comportamiento de la Industria Cafetera de Colombia*. [https://federaciondefcafeteros.org/static/files/Informe\\_Industria\\_2017.pdf](https://federaciondefcafeteros.org/static/files/Informe_Industria_2017.pdf)

Félix, J., López, M., Fuster, V. P., & Alberich, R. S. (2016). La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. *Clin Investig Arterioscler*, 28(6), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2016.04.001>

Feng, S., Luo, Z., Tao, B., & Chen, C. (2015). Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. *LWT - Food Science and Technology*, 60, 970–976.

Feng, S., Luo, Z., Zhang, Y., Zhong, Z., & Lu, B. (2014). Phytochemical contents and antioxidant capacities of different parts of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 151, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.057>

Feng, S., Luo, Z., Zhong, Z., Jiang, L., & Tang, K. (2014). Extraction optimization by response surface methodology: Purification and characterization of phytosterol from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind. *Journal of Separation Science*, 37, 1308–1314. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301316>

Ferguson, J. J. A., Stojanovski, E., MacDonald-Wicks, L., & Garg, M. L. (2016). Fat type in

- phytosterol products influence their cholesterol-lowering potential: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Progress in Lipid Research*, 64, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.08.002>
- Fernandes, P., & Cabral, J. M. S. (2007). Phytosterols : Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98, 2335–2350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438–450. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.007>
- Ferrer, A., Altabella, T., Arró, M., & Boronat, A. (2017). Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Progress in Lipid Research*, 67, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.002>
- Food and Drug Administration. (2016). *21CFR101.83. Health claims: plant sterol/stanol esters and risk of coronary heart disease (CHD)*. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=101.83>
- FSANZ. (2010). *Application A1024 - Equivalence of plant stanols, sterols & their fatty acid esters. Assessment report*. <http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/applicationa1024equi4316.aspx>
- FSANZ -Food Standards Australia New Zealand. (2005). *Application A604 – Initial Assessment Phytosterols in fruit juice and fruit juice drinks*.
- Fuentes, A., Fresno, M. J., Santander, H., Valenzuela, S., Gutiérrez, M. F., & Miralles, R. (2010). Sensopercepción Gustativa: una Revisión. *International Journal of Odontostomatology*, 4,

161–168.

- Fujiwara, G. M., Campos, R., Costa, C. K., Gaspari, J. D. F., Miguel, O. G., Miguel, M. D., Marques, F. D. A., Maria, S., & Zanin, W. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *49*(3), 537–547.
- Gabas, A. L., Telis, V. R. N., Sobral, P. J. A., & Telis-Romero, J. (2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*, *82*(2), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.029>
- Gadelha-Moreira, G. E., Maia-Costa, M. G., Rodrigues de Souza, A. C., Sousa de Brito, E., Dantas de Medeiros, M. de F., & de Azeredo, H. M. C. (2009). Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *LWT - Food Science and Technology*, *42*, 641–645. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.008>
- Garcia-Llatas, G., Cilla, A., Alegría, A., & Lagarda, M. J. (2015). Bioavailability of plant sterol-enriched milk-based fruit beverages: In vivo and in vitro studies. *Journal of Functional Foods*, *14*, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.023>
- García Baldizón, C., Molina Córdoba, M. E., & Chacón Valle, G. (2011). Evaluación De La Vida Útil De Una Pasta De Tomate Mediante Pruebas Aceleradas Por Temperatura. *Revista Ingeniería*, *21*(2), 31–38. <https://doi.org/10.15517/ring.v21i2.2683>
- Georges, P., Sylvestre, M., Ruegger, H., & Bourgeois, P. (2006). Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids*, *71*(8), 647–652.

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.01.016>

Gil-Chávez, J., Villa, J. A., Ayala-Zavala, F., Heredia, B., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 12, Issue 1, pp. 5–23).

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>

Gilbert, L. (1997). The consumer market for functional foods. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods*, 1(3), 5–21. <https://doi.org/10.1300/J133v01n03>

Giuffrè, A., & Capocasale, M. (2016). Sterol composition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed oil: The effect of cultivar. *International Food Research Journal*, 23.

Gomes, G. B., Zazula, A. D., Shigueoka, L. S., Fedato, R. A., Da Costa, A. B. B. A., Guarita-Souza, L. C., Baena, C. P., Olandoski, M., & Faria-Neto, J. R. (2017). A Randomized Open-Label Trial to Assess the Effect of Plant Sterols Associated with Ezetimibe in Low-Density Lipoprotein Levels in Patients with Coronary Artery Disease on Statin Therapy. *Journal of Medicinal Food*, 20(1), 30–36. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.0042>

Gómez, J. E. (2012). Morbimortalidad cardiovascular en el mundo. *Revista Colombiana de Cardiología*, 19(6), 298–299.

Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 146(3), 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037>

González-Larena, M., Cilla, A., García-Llatas, G., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2012). Plant

- sterols and antioxidant parameters in enriched beverages: Storage stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4725–4734. <https://doi.org/10.1021/jf3002679>
- González-Larena, M., Garcia-Llatas, G., Clemente, G., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2015). Plant sterol oxides in functional beverages: Influence of matrix and storage. *Food Chemistry*, 173, 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.121>
- Guardamagna, O., Abello, F., Baracco, V., Federici, G., Bertucci, P., Mozzi, A., Mannucci, L., Gnasso, A., & Cortese, C. (2010). Primary hyperlipidemias in children: Effect of plant sterol supplementation on plasma lipids and markers of cholesterol synthesis and absorption. *Acta Diabetologica*, 48(2), 127–133. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0233-1>
- Guarner, F., & Azpiroz, F. (2005). Alimentos funcionales. In Fundación española para la ciencia y la Tecnología (Ed.), *Alimentos funcionales*. <http://www.eufic.org/article/es/expid/basics-alimentos-funcionales/>
- Gylling, H., Hallikainen, M., Nissinen, M. J., & Miettinen, T. A. (2010). The effect of a very high daily plant stanol ester intake on serum lipids, carotenoids, and fat-soluble vitamins. *Clinical Nutrition*, 29(1), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.08.005>
- Gylling, H., Halonen, J., Lindholm, H., Konttinen, J., Simonen, P., Nissinen, M. J., Savolainen, A., Talvi, A., & Hallikainen, M. (2013). The effects of plant stanol ester consumption on arterial stiffness and endothelial function in adults: A randomised controlled clinical trial. *BMC Cardiovascular Disorders*, 13(50). <https://doi.org/10.1186/1471-2261-13-50>
- Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H. N., Ellegard, L., Jessup, W., Jones, P. J., Lütjohann, D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B., Borén, J., Catapano, A. L., De Backer,

- G., Deanfield, J., Descamps, O. S., Kovanen, P. T., Riccardi, G., ... Chapman, M. J. (2014). Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232, 346–360. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.043>
- Gylling, H., & Simonen, P. (2015). Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients*, 7, 7965–7977. <https://doi.org/10.3390/nu7095374>
- Hamunen, A. (2013). “Process for isolation of fatty acids, resin acids and sterols from tall oil pitch” U.S. Patent 8 450 453 (Patent No. US 8,450,453 B2).
- 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*, 21(6), 449–453. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(09\)60001-5](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(09)60001-5)
- Han, S., Jiao, J., Xu, J., Zimmermann, D., Actis-Goretta, L., Guan, L., Zhao, Y., & Qin, L. (2016). Effects of plant stanol or sterol-enriched diets on lipid profiles in patients treated with statins: Systematic review and meta-Analysis. *Scientific Reports*, 6(March), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep31337>
- Hanna-instruments. (2020). *Conductividad y sólidos disueltos*. Blog. <https://www.hannainst.es/blog/79/conductividad-y-solidos-disueltos>
- Hasegawa, M., Stevanovic, T., & Achim, A. (2016). Relationship between ethanolic extracts of yellow birch and tree characteristics. *Industrial Crops and Products*, 94, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.038>
- He, Z., Yuan, B., Zeng, M., Tao, G., & Chen, J. (2015). Effect of simulated processing on the

antioxidant capacity and in vitro protein digestion of fruit juice-milk beverage model systems.

*Food Chemistry*, 175, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.007>

Hernández-Mijares, A., Bañuls, C., Rocha, M., Morillas, C., Martínez-Triguero, M. L., Víctor, V. M., Lacomba, R., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., & Lagarda, M. J. (2010). Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake. *British Journal of Nutrition*, 104(7), 1018–1025. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001686>

Hernandez Urzúa, M. A. (2016). Grupos microbianos indicadores de calidad. In *Microbiología de los Alimentos Fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud* (pp. 139–152). Panamericana.

Herrera, T., Navarro Del Hierro, J., Fornari, T., Reglero, G., & Martín, D. (2019). Acid hydrolysis of saponin-rich extracts of quinoa, lentil, fenugreek and soybean to yield saponin-rich extracts and other bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(6), 3157–3167. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9531>

Houweling, A. H., Vanstone, C. A., Trautwein, E. A., Duchateau, G. S. M. J. E., & Jones, P. J. H. (2009). Baseline plasma plant sterol concentrations do not predict changes in serum lipids, C-reactive protein (CRP) and plasma plant sterols following intake of a plant sterol-enriched food. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(4), 543–551. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602969>

Howe, V., Sharpe, L. J., Alexopoulos, S. J., Kunze, S. V., Chua, N. K., Li, D., & Brown, A. J. (2016). Cholesterol homeostasis: How do cells sense sterol excess? *Chemistry and Physics of*

*Lipids*, 199, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.02.011>

Hrabovski, N., Sinadinović-Fišer, S., Nikolovski, B., Sovilj, M., & Borota, O. (2012). Phytosterols in pumpkin seed oil extracted by organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(10), 1204–1211. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200009>

Huang, L., Zhong, T., Chen, T., Ye, Z., & Chen, G. (2007). Identification of b-sitosterol, stigmasterol and ergosterin in *A. roxburghii* using supercritical fluid extraction followed by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 21, 3024–3032. <https://doi.org/10.1002/rcm.3181>

Hung Llamas, B. R., Falero Morejón, A., Perez Bolaños, C., Tirado Morales, S., Balcinde Quiñones, Y., & Pineda Rodríguez, M. (2008). Fitosteroles. Parte 2: Fuentes de obtención, formas de uso y posición actual en el mercado. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 39(2), 97–104.

Ikeda, I. (2015). Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. *Journal of Oleo Science*, 64(1), 9–18. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14221>

Instituto Nacional de Salud. (2013). Enfermedad cardiovascular principal causa de muerte en Colombia. *Boletín ONS*. [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/ons/boletin1/boletin\\_web\\_ONS/boletin1.html](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/ons/boletin1/boletin_web_ONS/boletin1.html)

IOC -Institut Œnologique de Champagne. (2020). *Gomas arábicas*. <https://ioc.eu.com/wp-content/uploads/2018/04/Plaq-GOMMES-ARABIQUES-ES.pdf>

- Izadi, Z., Nasirpour, A., & Garousi, G. (2012). Optimization of Phytosterols Dispersion in an Oil/Water Emulsion Using Mixture Design Approach. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(12), 1715–1722. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.646599>
- Jafarian Asl, P., Niazmand, R., & Yahyavi, F. (2020). Extraction of phytosterols and tocopherols from rapeseed oil waste by supercritical CO<sub>2</sub> plus co-solvent: A comparison with conventional solvent extraction. *Heliyon*, 6(3), e03592. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03592>
- Jain, T., & Bathla, S. (2015). Plant sterols for human health- A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(2), 1081–1087. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i2.734>
- Janzantti, N. S., Santos, G. C., & Monteiro, M. (2014). Shelf life of fresh and pasteurized organic passion fruit (*Passiflora Edulis* F. Flavicarpadeg.) pulp. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(1), 262–270. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00772.x>
- Jimenez Herrera, A. (2018). *Determinación del factor Q para establecer la vida útil de un concentrado de fruto*. universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Jones, P. J. H., Shamloo, M., MacKay, D. S., Rideout, T. C., Myrie, S. B., Plat, J., Rouillet, J. B., Baer, D. J., Calkins, K. L., Davis, H. R., Duell, P. B., Ginsberg, H., Gylling, H., Jenkins, D., Lütjohann, D., Moghadasian, M., Moreau, R. A., Mymin, D., Ostlund, R. E., ... Weingärtner, O. (2018). Progress and perspectives in plant sterol and plant stanol research. *Nutrition Reviews*, 76(10), 725–746. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy032>
- Jones, P. J. H., Vanstone, C. A., Raeini-Sarjaz, M., & St-Onge, M. P. (2003). Phytosterols in low- and nonfat beverages as part of a controlled diet fail to lower plasma lipid levels. *Journal of*

- Lipid Research*, 44(9), 1713–1719. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300089-JLR200>
- Julien-David, D., Zhao, M., Geoffroy, P., Miesch, M., Raul, F., Aoude-Werner, D., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2014). Analysis of sitosteryl oleate esters in phytosterols esters enriched foods by HPLC-ESI-MS2. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.03.013>
- 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. <https://doi.org/10.2174/2212798410901010001>
- Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., & Paoletti, R. (2003). Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(8), 965–978. <https://doi.org/10.4065/78.8.965>
- Khathir, R., Agustina, R., Nurba, D., Syafriandi, & Putra, D. (2019). Shelf-life estimation of cauliflower based on total soluble solids by using the Arrhenius and Q10 approach. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 365, 12006. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/365/1/012006>
- Kilulya, K. F., Msagati, T. A. M., Mamba, B. B., Ngila, J. C., & Bush, T. (2014). Effect of site , species and tree size on the quantitative variation of lipophilic extractives in Eucalyptus woods used for pulping in South Africa. *Industrial Crops & Products*, 56, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.017>
- Köhler, J., Teupser, D., Elsässer, A., & Weingärtner, O. (2017). Plant sterol enriched functional food and atherosclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1281–1289. <https://doi.org/10.1111/bph.13764>

- Kong, X., Jia, C., Zhang, C., Hua, Y., & Chen, Y. (2017). Characteristics of soy protein isolate/gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions: influence of different preparation routes and pH. *RSC Advances*, 7(51), 31875–31885. <https://doi.org/10.1039/C7RA01472D>
- Koolman, J., & Röhm, K.-H. (2004). Metabolismo de los lípidos: Biosíntesis del colesterol. In Editorial medica Panamericana (Ed.), *Bioquímica: Texto y atlas* (Tercera Ed, pp. 172–173).
- Lagarda, M. J., Garc, G., & Farr, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1486–1496. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.052>
- Lau, V. W. Y., Journoud, M., & Jones, P. J. H. (2005). Plant sterols are efficacious in lowering plasma LDL and non-HDL cholesterol in hypercholesterolemic type 2 diabetic and nondiabetic persons. *Am J Clin Nutr*, 81, 1351–1358.
- Lee, M., Lee, S., & Song, K. Bin. (2005). Effect of g -irradiation on the physicochemical properties of soy protein isolate films. *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.01.006>
- Li, X., & Jasti, B. R. (2006). *Design of controlled release drug delivery systems* (McGraw-Hill (ed.)). <https://doi.org/10.1036/0071417591>
- Lia, C., Wang, J., Shi, J., Huang, X., Peng, Q., & Xueb, F. (2015). Encapsulation of tomato oleoresin using soy protein isolate-gum aracia conjugates as emulsifier and coating materials. *Food Hydrocolloids*, 45, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.022>
- Lim, W. T., & Nyam, K. L. (2016). Characteristics and controlled release behaviour of microencapsulated kenaf seed oil during in-vitro digestion. *Journal of Food Engineering*,

182, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.022>

Lin, Y., Knol, D., & Trautwein, E. A. (2016). Phytosterol oxidation products (POP) in foods with added phytosterols and estimation of their daily intake: A literature review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 1423–1438. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500368>

Lin, Y., Knol, D., Valk, I., van Andel, V., Friedrichs, S., Lütjohann, D., Hrnčirik, K., & Trautwein, E. A. (2017). Thermal stability of plant sterols and formation of their oxidation products in vegetable oils and margarines upon controlled heating. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.01.007>

Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018). Lignins : Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(335), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms19020335>

Loh, Y. R., Sujan, D., Rahman, M. E., & Das, C. A. (2013). Review Sugarcane bagasse - The future composite material: A literature review. *Resources, Conservation and Recycling*, 75, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.03.002>

López-Ortiz, N. C. (2015). La cuestión de las sensaciones gustativas básicas. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 17(2), 185–194. <https://doi.org/DOI:10.17533/udea.penh.v17n2a07>

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. *Analytical Chimica Acta*, 588, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.067>

- Maki, K. C., Lawless, A. L., Reeves, M. S., Dicklin, M. R., Jenks, B. H., Shneyvas, E., & Brooks, J. R. (2012). Lipid-altering effects of a dietary supplement tablet containing free plant sterols and stanols in men and women with primary hypercholesterolaemia: a randomized, placebo-controlled crossover trial. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(4), 476–482. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.636345>
- Maki, K. C., Lawless, A. L., Reeves, M. S., Kelley, K. M., Dicklin, M. R., Jenks, B. H., Shneyvas, E., & Brooks, J. R. (2013). Lipid effects of a dietary supplement softgel capsule containing plant sterols/stanols in primary hypercholesterolemia. *Nutrition*, *29*(1), 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.05.002>
- Malina, D. M. T., Fonseca, F. A., Barbosa, S. A., Kasma, S. H., MacHado, V. A., França, C. N., Borges, N. C., Moreno, R. A., & Izar, M. C. (2015). Additive effects of plant sterols supplementation in addition to different lipid-lowering regimens. *Journal of Clinical Lipidology*, *9*(4), 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.04.003>
- Mansour Hefnawy, H. T., & Ramadan, M. F. (2011). Physicochemical characteristics of soy protein isolate and fenugreek gum dispersed systems. *Journal of Food Science and Technology*, *48*(3), 371–377. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0203-1>
- Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Chiaramoni, N. S., & Alonso, S. D. V. (2015). Bioactive compounds as functional food ingredients: characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. *Journal of Food Engineering*, *166*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.007>
- Martin, D., Navarro Del Hierro, J., Villanueva Bermejo, D., Fernández-Ruiz, R., Fornari, T., & Reglero, G. (2016). Bioaccessibility and Antioxidant Activity of *Calendula officinalis*

- Supercritical Extract as Affected by in Vitro Codigestion with Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(46), 8828–8837. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04313>
- Martins, P. F., De Melo, M. M. R., Sarmiento, P., & Silva, C. M. (2016). Supercritical fluid extraction of sterols from *Eichhornia crassipes* biomass using pure and modified carbon dioxide. Enhancement of stigmasterol yield and extract concentration. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.027>
- Martins, P. F., De Melo, M. M. R., & Silva, C. M. (2016). Techno-economic optimization of the subcritical fluid extraction of oil from *Moringa oleifera* seeds and subsequent production of a purified sterols fraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 107, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.07.031>
- McClements, D. J. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 174, 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.03.002>
- McKenney, J. M., Jenks, B. H., Shneyvas, E., Brooks, J. R., Shenoy, S. F., Cook, C. M., & Maki, K. C. (2014). A softgel dietary supplement containing esterified plant sterols and stanols improves the blood lipid profile of adults with primary hypercholesterolemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled replication study. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114(2), 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.09.023>
- 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(21), 9997–10002. <https://doi.org/10.1021/jf802000m>

- Meng, X., Pan, Q., & Liu, Y. (2012). Preparation and properties of phytosterols with hydroxypropyl  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *European Food Research and Technology*, 235(6), 1039–1047. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1833-5>
- Mezquita Cerezal, P., Gatica Urtuvia, V., Quintanilla Ramírez, V., & Zavala Arcos, R. (2011). Desarrollo de producto sobre la base de harinas de cereales y leguminosa para niños celíacos entre 6 y 24 meses; II: Propiedades de las mezclas. *Nutricion Hospitalaria*, 26(1), 161–169. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.1.4939>
- Mingyai, S., Srikaeo, K., Kettawan, A., Singanusong, R., Nakagawa, K., Kimura, F., & Ito, J. (2018). Effects of extraction methods on phytochemicals of rice bran oils produced from colored rice. *Journal of Oleo Science*, 67(2), 135–142. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17122>
- Ministerio De Agricultura y desarrollo Rural. (2019). *Cadena de Citricos. Indicadores e instrumentos* Diciembre 2019. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Citricos/Documentos/2019-12-30> Cifras Sectoriales.pdf?ID=352
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2005). *Guía de atención de la obesidad* (p. 15). [https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/15Atencion de la Obesidad.pdf](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/15Atencion%20de%20la%20Obesidad.pdf) [http://www.acin.org/acin/new/Portals/0/Templates/Guia Leishmania.pdf](http://www.acin.org/acin/new/Portals/0/Templates/Guia%20Leishmania.pdf)
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2020). Prevenir enfermedades cardiovasculares es una decisión de vida. *Boletín de Prensa No 772 de 2020*. <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Prevenir-enfermedades-cardiovasculares-es-una-decision-de-vida-.aspx>

- Mizraji, M., Kokenc, F., Ingver, C., & San Millán, J. (2011). El sentido del gusto. *Actas Odontológicas*, 8(2).
- 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, 919–923. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.004>
- Morán-Valero, Maria I., Martin, D., Torrelo, G., Reglero, G., & Torres, C. F. (2012). Phytosterols esterified with conjugated linoleic acid. in vitro intestinal digestion and interaction on cholesterol bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11323–11330. <https://doi.org/10.1021/jf303148d>
- Morán-Valero, María Inés. (2014). *Desarrollo y aplicación de modelos de digestión intestinal in vitro en la evaluación de lípidos bioactivos*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70(January), 35–61. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.001>
- Moreau, R. a, & Hicks, K. B. (2004). The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes. *Lipids*, 39(8), 769–776. <https://doi.org/10.1007/S11745-004-1294-3>
- Moschakis, T., Dergiade, I., Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Katsanidis, E. (2017). Modulating the physical state and functionality of phytosterols by emulsification and organogel

- formation: Application in a model yogurt system. *Journal of Functional Foods*, 33, 386–395.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.007>
- Muñoz Jáuregui, A. M., Alvarado-Ortíz, U. C., & Encina Zelada, C. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables Phytosterols and phytostanols: Health claims. *Revista Horizonte Médico Volumen*, 11(2).
- Murugesan, R., & Orsat, V. (2012). Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients- A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0638-z>
- Nagasampagi, B. A., Rowe, J. W., Simpson, R., & Goad, L. J. (1971). Sterols of coffee. *Phytochemistry*, 10, 1101–1107. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89946-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89946-X)
- Navarro del Hierro, J., Herrera, T., García-Risco, M. R., Fornari, T., Reglero, G., & Martín, D. (2018). Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. *Food Research International*, 109(April), 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.058>
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Petrovic, T., & Bugarski, B. (2013). Chapter 13 Encapsulation Systems in the Food Industry. In *Advances in Food Process Engineering Research and Applications* (p. 687). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7906-2>
- Negrao-Murakami, A. N., Nunes, G. L., Pinto, S. S., Murakami, F. S., Amante, E. R., Cunha-Petrus, J. C., Prudêncio, E. S., & Amboni, R. D. M. C. (2017). Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT - Food Science and*

*Technology*, 79, 561–567.

Nieminen, V., Laakso, P., Kuusisto, P., Niemelä, J., & Laitinen, K. (2016). Plant stanol content remains stable during storage of cholesterol-lowering functional foods. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.059>

Niittynen, L. H., Jauhiainen, T. A., Poussa, T. A., & Korpela, R. (2008). Effects of yoghurt enriched with free plant sterols on the levels of serum lipids and plant sterols in moderately hypercholesterolaemic subjects on a high-fat diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(5), 357–367. <https://doi.org/10.1080/09637480701554137>

Normén, L., Johnsson, M., Andersson, H., Van Gameren, Y., & Dutta, P. (1999). Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden. *European Journal of Nutrition*, 38(2), 84–89. <https://doi.org/10.1007/s003940050048>

Normén, Lena, Bryngelsson, S., Johnsson, M., Evheden, P., Ellegård, L., Brants, H., Andersson, H., & Dutta, P. (2002). The Phytosterol Content of Some Cereal Foods Commonly Consumed in Sweden and in the Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 693–704. <https://doi.org/10.1006/jfca.2002.1098>

Normén, Lena, Ellegård, L., Brants, H., Dutta, P., & Andersson, H. (2007). A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.06.002>

Nosari, A. B. F. L., Lima, J. F., Serra, O. A., Alexandre, L., & Freitas, P. (2015). Improved green coffee oil antioxidant activity for cosmetical purpose by spray drying microencapsulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(3), 307–311.

<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.04.006>

NTC 4458. (2018). *Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. método horizontal para el recuento de coliformes o escherichia coli o ambos. técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos*. ICONTEC.

NTC 4519. (2009). *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C*. ICONTEC.

NTC 5698-1. (2009). *Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (aw) superior a 0,95*. ICONTEC.

Nurhadi, B., Roos, Y. H., & Maidannyk, V. (2016). Physical properties of maltodextrin de 10: Water sorption, water plasticization and enthalpy relaxation. *Journal of Food Engineering*, 174, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.11.018>

Nutrients-db. (2014). *Nutrients in different food products*. Food Group. <https://www.nutrients-db.com/>

Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K., & Che Man, Y. B. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of phytosterol from roselle seeds with a central composite design model. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2–3), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.11.002>

Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K., & Man, Y. B. C. (2011). Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phytosterol-enriched oil from Kalahari melon seeds. *Food*

- Bioprocess Technology*, 4, 1432–1441. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0253-4>
- Nyam, Kar Lin, Tan, C. P., Karim, R., Lai, O. M., Long, K., & Man, Y. B. C. (2010). Extraction of tocopherol-enriched oils from Kalahari melon and roselle seeds by supercritical fluid extraction (SFE-CO<sub>2</sub>). *Food Chemistry*, 119(3), 1278–1283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.007>
- Nyam, Kar Lin, Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K., & Man, Y. B. C. (2011). Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phytosterol-enriched oil from Kalahari melon seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1432–1441. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0253-4>
- Nyström, L. (2012). Analysis Methods of Phytosterols. In *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals* (pp. 313–351). <https://doi.org/10.1002/9781118229378.ch10>
- OCDE/FAO. (2017). Azúcar. In *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2016*. OECD Publishing. <http://www.fao.org/3/a-BT088s.pdf>
- Odriozola Serrano, I. (2009). *obtención de zumos y frutos cortados con alto potencial antioxidante mediante tratamientos no térmicos*. Universidad de Lleida.
- OMS. (2018, May 24). Las 10 principales causas de defunción. *Centro de Prensa de OMS*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Oracz, J., Nebesny, E., & Zy, D. (2014). Effect of roasting conditions on the fat , tocopherol , and phytosterol content and antioxidant capacity of the lipid fraction from cocoa beans of different *Theobroma cacao* L . cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1002–1014. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300474>
- Orduz- Rodriguez, J. (2020). Situación Actual y Perspectivas de la Citricultura Colombiana en los

Nuevos Escenarios Fitosanitarios. *I Simposio Intensificación Sostenible de La Fruticultura Andina*.

Ostlund, R. E. J. (2004). Phytosterols and cholesterol metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 15(1), 37–41. <https://doi.org/10.1097/00041433-200402000-00008>

Ottestad, I., Ose, L., Wennersberg, M. H., Granlund, L., Kirkhus, B., & Retterstøl, K. (2013). Phytosterol capsules and serum cholesterol in hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Atherosclerosis*, 228(2), 421–425. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.001>

Pacheco-Palencia, L. A., & Susanne Mertens-Talcott, S. T. T. (2015). Chemical characterization and oxidative stability of seeds and oil of sesame grown in Morocco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 10505–10511. <https://doi.org/10.1021/jf1007677>

Palau Oliver, A., Picó Segura, C., Bonet Piña, M. L., Oliver Vara, P., Serra Vich, Francisca, Rodríguez Guerrero, A. M., & Ribot Riutort, J. (2005). *El Libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación*.

Palmeiro-Silva, Y. K., Aravena, R. I., Ossio, L., & Fluxa, J. P. (2020). Effects of daily consumption of an aqueous dispersion of free-phytosterols nanoparticles on individuals with metabolic syndrome: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*, 12(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu12082392>

Parameswaran, B. (2009). Sugar cane bagasse. In P. Singh Nee Nigam & A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues* (pp. 240–248). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7>

- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63(2), 5669–5684.
- Patel, R. P., Patel, M. P., & Suthar, A. M. (2009). Spray Drying Technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(10), 44–47.  
<http://sdmimdjournal.in/index.php/indjst/article/view/30719>
- Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340–372. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>
- Perlman, D. (2009). *US20090092727*.
- 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. <https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1044>
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., Pascual-Teresa, S. De, de Ancos, B., & Cano, M. P. (2009). Fatty Acids , Sterols , and Antioxidant Activity in Minimally Processed Avocados during Refrigerated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3204–3209.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2003). Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, 60(1), 21–29. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00006-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00006-2)
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2005). Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and

- shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 1–9.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.10.004>
- Racette, S. B., Lin, X., Ma, L., & Ostlund, R. E. (2015). Natural dietary phytosterols. *Journal of AOAC International*, 98(3), 679–684. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGERacette>
- Rahman, M. S. (2007). Handbook of Food Preservation. In *Food Research International* (second edi, Vol. 35, Issue 4). CRC Press. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00143-5)
- Raju, M. P., Babu, D. G. A., Kumar, B. R., & Rajashekar, C. H. (2013). The Role of Phytosterols Enriched Foods-A Review. *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)*, 7(6), 40–47.
- Ramírez Torrealba, C. J. (2012). *Factores físicos y químicos que intervienen en la interacción tanino-proteína y su relación con la sensación de astringencia*. Universidad de Chile.
- Ras, R. T., Fuchs, D., Koppenol, W. P., Garczarek, U., Greyling, A., Keicher, C., Verhoeven, C., Bouzamondo, H., Wagner, F., & Trautwein, E. A. (2015). The effect of a low-fat spread with added plant sterols on vascular function markers: Results of the Investigating Vascular Function Effects of Plant Sterols (INVEST) study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 101(4), 733–741. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.102053>
- Ras, R. T., Hiemstra, H., Lin, Y., Vermeer, M. A., Duchateau, G., & Trautwein, E. A. (2013). Consumption of plant sterol-enriched foods and effects on plasma plant sterol concentrations - A meta-analysis of randomized controlled studies. *Atherosclerosis*, 230(2), 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.08.012>
- Reaver, A., Hewlings, S., Westerman, K., Blander, G., Schmeller, T., Heer, M., & Rein, D. (2019).

- A randomized, placebo-controlled, double-blind crossover study to assess a unique phytosterol ester formulation in lowering LDL cholesterol utilizing a novel virtual tracking tool. *Nutrients*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/nu11092108>
- Reineccius, G. (2019). Use of proteins for the delivery of flavours and other bioactive compounds. *Food Hydrocolloids*, *86*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.039>
- Resolución 3929. (2013). *Reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y las bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta, o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de estos que se procesen, empaquen, transporten, importen*. Ministerio de salud y protección social.
- Resolución Número 333. (2011). Requisitos de rotulado o etiquetado nutricional para alimentos envasados para consumo humano. *Ministerio de La Protección Social*, 2011, 56.
- Ribas, S. A., Sichieri, R., Moreira, A. S. B., Souza, D. O., Cabral, C. T. F., Gianinni, D. T., & Cunha, D. B. (2017). Phytosterol-enriched milk lowers LDL-cholesterol levels in Brazilian children and adolescents: Double-blind, cross-over trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *27*(11), 971–977. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.09.010>
- Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J. P., Berger, A., Métairon, S., Quaile, S., Piguet-Welsch, C., Sagalowicz, L., Green, H., & Fay, L. B. (2004). Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol in normocholesterolemic humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(1), 171–177. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.171>
- Rocha, V. Z., Ras, R. T., Gagliardi, A. C., Mangili, L. C., Trautwein, E. A., & Santos, R. D. (2016).

- Effects of phytosterols on markers of inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 248, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.035>
- Rodríguez-Roque, M. J. (2014). *In vitro bioaccessibility of health-related compounds from beverages based on fruit juice, milk or soymilk: Influence of food matrix and processing*. Universidad de Lleida.
- Rogowska, A., & Szakiel, A. (2020). The role of sterols in plant response to abiotic stress. *Phytochemistry Reviews*, 19(6), 1525–1538. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09708-2>
- Rozner, S., & Garti, N. (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 282–283(December 2005), 435–456. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.12.032>
- Ruiz Rico, maría alejandra. (2020). *piña, gulupa, uchuva, mango y granadilla fueron las frutas más exportadas durante 2019*. Agronegocios. <https://www.agronegocios.co/agricultura/pina-gulupa-y-uchuva-fueron-las-frutas-mas-exportadas-durante-2019-2961479>
- Ruiz, Y., Sánchez, J., Hernández, E., Auleda, J. M., & Raventós, M. (2010). Viscosidad de zumos comerciales de melocotón, manzana y pera a temperaturas cercanas a la congelación. *Afinidad LXVI*, 546(marz), 114–118.
- Salazar, A. (2017). Crece el negocio de los jugos naturales en Colombia. *Revistaalimentos*, Junio. <https://www.revistaalimentos.com/crece-negocio-los-jugos-naturales-en-colombia/>
- Salo, P., & Kuusisto, P. (2016). Cholesterol Lowering Effect of Plant Stanol Ester Yoghurt Drinks with Added Camelina Oil. *Cholesterol*, 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/5349389>
- Sánchez-Pozo, A., & Ortega de la Torre, M. de los Á. (2010). 1.11. Metabolismo de las

- lipoproteínas. In *Tratado de Nutrición. Tomo 1*.
- Sanchez Pozo, A., & Gil Hernandez, A. (2017). Metabolismo del colesterol. In *Tratado de Nutrición. Bases Fisiologicas y bioquimicas de la nutricion*.
- Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2010). Carotenoid Pigments Encapsulation : Fundamentals , Techniques and Recent Trends. *The Open Chemical Engineering Journal*, 4, 42–50.
- Santos, S. A. O., Vilela, C., Domingues, R. M. A., Oliveira, C. S. D., Villaverde, J. J., Freire, C. S. R., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2017). Secondary metabolites from *Eucalyptus grandis* wood cultivated in Portugal, Brazil and South Africa. *Industrial Crops & Products*, 95, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.044>
- Sapkale, G. N., Patil, S. M., Surwase, U. S., & Bhatbhage, P. K. (2010). Supercritical Fluid Extraction: A Review. *Journal of Biological and Chemical Chronicles*, 8(2), 729–743. <https://doi.org/10.33980/jbcc.2019.v05i01.019>
- Sarmiento Rubiano, L. . (2006). Alimentos funcionales , una nueva alternativa de alimentación. *Revista Orinoquia*, 10(1), 16–23.
- Saska, M., & Chou, C. C. (2006). Antioxidants: An excellent phytochemical functional food from sugarcane. *2006 Meeting of Sugar Industry Technologists, Inc., LaBaule, France*, 898.
- Scholz, B., Guth, S., Engel, K. H., & Steinberg, P. (2015). Phytosterol oxidation products in enriched foods: Occurrence, exposure, and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(7), 1339–1352. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400922>
- Schvab, M. del C. ., Ferreyra, M. M. ., Gerard, L. M., & Davies, C. V. (2013). Parámetros de calidad de jugos de naranja entrerrianas. *Revista Iberoamericana de TecnologíaPostcosecha*,

14(1), 85–92. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81327871015.pdf>

- Shanmukharadhya, K. S., & Sudhakar, K. G. (2007). Effect of fuel moisture on combustion in a bagasse fired furnace. *Journal of Energy Resources Technology, Transactions of the ASME*, 129(3), 248–253. <https://doi.org/10.1115/1.2748816>
- Sharif, K. M., Rahman, M. M., Azmir, J., Mohamed, A., Jahurul, M. H. A., Sahena, F., & Zaidul, I. S. M. (2014). Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. *Journal of Food Engineering*, 124, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003>
- Sherazi, S. T. H., Mahesar, S. A., & Sirajuddin. (2016). Vegetable oil deodorizer distillate: A rich source of the natural bioactive components. *Journal of Oleo Science*, 65(12), 957–966. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16125>
- Shy-Kai, N., Li-Ying, L. J., Chin-Ping, T., Kamariah, L., & Kar-Lin, N. (2013). Effect of accelerated storage on microencapsulated kenaf seed oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(7), 1023–1029. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2249-5>
- Silvia, R. da, Rocha-santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Trends in Analytical Chemistry Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>
- Simándi, B., Kristo, S. T., Kéry, Á., Selmeczi, L. K., Kmech, I., & Kemény, S. (2002). Supercritical fluid extraction of dandelion leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 23, 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(02\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(02)00012-8)
- Singh, A., Lal, U., Mukhtar, H., Singh, P., Shah, G., & Dhawan, R. (2015). Phytochemical profile of sugarcane and its potential health aspects. *Pharmacognosy Reviews*, 9(17), 45.

<https://doi.org/10.4103/0973-7847.156340>

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>

Smet, E. De, Mensink, R. P., & Plat, J. (2012). Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: Suggested mechanisms from past to present. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(7), 1058–1072. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100722>

Solà, R., Valls, R. M., Godàs, G., Perez-Busquets, G., Ribalta, J., Girona, J., Heras, M., Cabré, A., Castro, A., Domenech, G., Torres, F., Masana, L., Anglés, N., Reguant, J., Ramírez, B., & Barriach, J. M. (2012). Cocoa, hazelnuts, sterols and soluble fiber cream reduces lipids and inflammation biomarkers in hypertensive patients: A randomized controlled trial. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031103>

Soupas, L. (2006). *Oxidative stability of phytosterols in food models and foods*. University of Helsinki.

Sovová, H., Galushko, A. A., Stateva, R. P., Rochová, K., Sajfrtová, M., & Bártlová, M. (2010). Supercritical fluid extraction of minor components of vegetable oils : b -Sitosterol. *Journal of Food Engineering*, 101, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.002>

Sovová, H., & Stateva, R. P. (2011). Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering*, 27(3), 79–156.

Spilburg, C. A. (2006). *Methods and formulations for enhancing the absorption and gastrointestinal bioavailability of hydrophobic drugs*.

- Taşan, M., Bilgin, B., Geçgel, U., & Demirci, A. S. (2006). Phytosterols as Functional Food Ingredients. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(2), 153–159.
- Tazuma, S., & Takikawa, H. (2017). Bile acids in gastroenterology. In S. Tazuma & H. Takikawa (Eds.), *Gut* (Vol. 25, Issue 11). Springer. <https://doi.org/10.1136/gut.25.11.1305>
- Thomsen, A. B., Hansen, H. B., Christiansen, C., Green, H., & Berger, A. (2004). Effect of free plant sterols in low-fat milk on serum lipid profile in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(6), 860–870. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601887>
- Tian, H., Guo, G., Fu, X., Yao, Y., Yuan, L., & Xiang, A. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Fabrication , properties and applications of soy-protein-based materials : A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 475–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.110>
- Tolve, R., Cela, N., Condelli, N., Di Cairano, M., Caruso, M. C., & Galgano, F. (2020). Microencapsulation as a tool for the formulation of functional foods: The phytosterols' case study. *Foods*, 9(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods9040470>
- Tolve, R., Condelli, N., Caruso, M. C., Genovese, F., Di Renzo, G. C., Mauriello, G., & Galgano, F. (2019). Preparation and characterization of microencapsulated phytosterols for the formulation of functional foods: Scale up from laboratory to semi-technical production. *Food Research International*, 116, 1274–1281. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.016>
- 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.02.029>

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>

Tyagi, S., Lee, K.-J., Mulla, S. I., Garg, N., & Chae, J.-C. (2019). Chapter 2 - Production of Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Current Approaches and Perspectives. In *Applied Microbiology and Bioengineering* (Issue 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815407-6.00002-2>

Uddin, M. S., Ferdosh, S., Haque Akanda, M. J., Ghafoor, K., Rukshana, A. H., Ali, M. E., Kamaruzzaman, B. Y., Fauzi, M. B., Hadijah, S., Shaarani, S., & Islam Sarker, M. Z. (2018). Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 53(14), 2206–2223. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1454472>

Uddin, Md Salim, Sarker, M. Z. I., Ferdosh, S., Akanda, M. J. H., Easmin, M. S., Bt Shamsudin, S. H., & Yunus, K. Bin. (2015). Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1385–1394). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6833>

Vaghini, S., Cilla, A., Garcia-Llatas, G., & Lagarda, M. J. (2016). Bioaccessibility study of plant sterol-enriched fermented milks. *Food & Function*, 7(1), 110–117. <https://doi.org/10.1039/C5FO00458F>

- Vaikousi, H., Larazidou, A., Biliaderis, C. G., & Zawistowski, J. (2007). Phase Transitions , Solubility , and Crystallization Kinetics of Phytosterols and Phytosterol – Oil Blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1790–1798.
- Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., & Morales, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutrición*, *41*(2), 198–204. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000200011>
- Valitova, J. N., Sulkarnayeva, A. G., & Minibayeva, F. V. (2016). Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)*, *81*(8), 819–834. <https://doi.org/10.1134/S0006297916080046>
- Vásquez-Trespalcacios, E. M., & Romero-Palacio, J. (2014). Efficacy of yogurt drink with added plant stanol esters (Benecol®, Colanta) in reducing total and LDL cholesterol in subjects with moderate hypercholesterolemia: A randomized placebo-controlled crossover trial NCT01461798. *Lipids in Health and Disease*, *13*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-125>
- Verleyen, T., Forcades, M., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, a., & Greyt, W. (2002). Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *79*(2), 117–122. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0444-3>
- Vilcanqui-Pérez, Fulgencio Vílchez-Perales, C. (2017). Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud. Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *67*(2). <https://www.alanrevista.org/ediciones/2017/2/art-10/>
- Vilela, C., Santos, S. A. O., Oliveira, L., Camacho, J. F., Cordeiro, N., Freire, C. S. R., & Silvestre,

- A. J. D. (2013). The ripe pulp of *Mangifera indica* L.: A rich source of phytosterols and other lipophilic phytochemicals. *Food Research International*, 54(2), 1535–1540. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.017>
- Villacís Chiriboga, J. A. (2015). *determinación de la cinética de degradación de ácido ascórbico en zumo de naranja (citrus sinensis var. valencia) sometida a calentamiento y radiación ultravioleta para su aplicación en procesos tecnológicos*. Universidad técnica de Ambato.
- Villegas-Ruiz, X., Ruiz-Espinosa, H., & Bárcenas-Pozos, M. . (2010). Tecnología de enmascaramiento de sabor amargo en alimentos. *Temas Selecto de Ingeniería de Alimentos*, 1, 27–36.
- Vingerhoeds, M. H., & Harmsen, P. F. H. (2004). Proteins: Versatile Materials for Encapsulation. In *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology* (pp. 73–102). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3_5)
- Vlahakis, C., & Hazebroek, J. (2000). Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(1), 49–53. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0008-6>
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2009). Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields. *Food and Bioproducts Processing*, 87(2), 102–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.08.001>
- Wang, F. C., Acevedo, N., & Marangoni, A. G. (2017). Encapsulation of phytosterols and phytosterol esters in liposomes made with soy phospholipids by high pressure

- homogenization. *Food and Function*, 8(11), 3964–3969. <https://doi.org/10.1039/c7fo00905d>
- Wang, L., Wu, M., & Liu, H. M. (2017). Emulsifying and physicochemical properties of soy hull hemicelluloses-soy protein isolate conjugates. *Carbohydrate Polymers*, 163, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.069>
- Weingärtner, O., Baber, R., & Teupser, D. (2014). Plant sterols in food: No consensus in guidelines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 811–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.147>
- Wern Chonga, R. W., Christopher, M. B., McRaea, C., & Packer, N. H. (2019). Comparing the chemical composition of dietary fibres prepared from sugarcane , psyllium husk and wheat dextrin. *Food Chemistry*, 298, 125032.
- Willett, W. C. (2002). Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*, 296(5568), 695–698. <https://doi.org/10.1126/science.1071055>
- Wong, A. (2014). Chemical and microbiological considerations of phytosterols and their relative efficacies in functional foods for the lowering of serum cholesterol levels in humans: A review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 6, Issue 1, pp. 60–72). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.023>
- Woodgate, D., Chan, C. H. M., & Conquer, J. A. (2006). Cholesterol-lowering ability of a phytostanol softgel supplement in adults with mild to moderate hypercholesterolemia. *Lipids*, 41(2), 127–132. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5080-z>
- Xu, X., Dong, J., Mu, X., & Sun, L. (2011). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil , carotenoids , squalene and sterols from lotus ( *Nelumbo nucifera* Gaertn ) bee pollen. *Food and*

*Bioproducts Processing*, 89(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.003>

Xue, F., Li, C., & Adhikari, B. (2020). Ultrasonics - Sonochemistry Physicochemical properties of soy protein isolates-cyanidin-3-galactoside conjugates produced using free radicals induced by ultrasound. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 64(104990).

Yan-Zong, C., Shih-Yao, K., Hao-Cheng, J., Yu, Y.-M., Ju-Ying, L., Wei-Hsien, W., & Chung-Wei, T. (2015). Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 636–644. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.010>

Yanniotis, S., Taoukis, P., Stoforos, N. G., & Karathanos, V. T. (2013). *Advances in Food Process Engineering Research and Applications*. 687. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7906-2>

Yi, C., Fu, M., Cao, X., Tong, S., Zheng, Q., Firempong, C. K., Jiang, X., Xu, X., & Yu, J. (2013). Enhanced oral bioavailability and tissue distribution of a new potential anticancer agent, Flammulina velutipes sterols, through liposomal encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(25), 5961–5971. <https://doi.org/10.1021/jf3055278>

Yoo, E.-G. (2016). Sitosterolemia: a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 21(1), 7. <https://doi.org/10.6065/apem.2016.21.1.7>

Yu, F., Yang, J., Tang, X., & Hu, Y. (2014). The feasibility of novel liposome consisted of sphingomyelin and  $\beta$ -sitosterol for gypenosides delivery. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 509–516. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.509>

Zahid, S., Zahoor, T., Nadeem, M., Jahangir Chughtai, M. F., Khaliq, A., Ahsan, S., & Sagheer,

- A. (2020). Effect of soy protein on hypercholesterolemia and hypertension to reduce the risk of cardiovascular diseases: Effect of soy protein on hypercholesterolemia and hypertension. *Progress in Nutrition*, 22(1 SE-Original articles), 288–296. <https://doi.org/10.23751/pn.v22i1.7220>
- Zawistowski, J., & Jones, P. (2015). Regulatory aspects related to plant sterol and stanol supplemented foods. *Journal of AOAC International*, 98(3), 750–756. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEZawistowski>
- Zhang, L., Zeng, X., Fu, N., Tang, X., Sun, Y., & Lin, L. (2018). Maltodextrin: A consummate carrier for spray-drying of xylooligosaccharides. *Food Research International*, 106, 383–393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.004>
- Zhang, R., Wang, W., Zhang, H., Dai, Y., Dong, H., & Hou, H. (2019). Effects of hydrophobic agents on the physicochemical properties of edible agar/maltodextrin films. *Food Hydrocolloids*, 88, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.008>
- Zhao, Z., Yan, H., Zheng, R., Khan, M. S., Fu, X., Tao, Z., & Zhang, Z. (2018). Anthocyanins characterization and antioxidant activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind extracts. *Industrial Crops and Products*, 113(January), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.015>
- Zheng, R., Su, S., Zhou, H., Yan, H., Ye, J., Zhao, Z., You, L., & Fu, X. (2017). Antioxidant / antihyperglycemic activity of phenolics from sugarcane ( *Saccharum officinarum* L. ) bagasse and identification by UHPLC-HR-TOFMS. *Industrial Crops and Products*, 101, 104–114.
- Zou, Y., Jiang, Y., Yang, T., Hu, P., & Xu, X. (2012). 16 - *Minor Constituents of Palm Oil:*

*Characterization, Processing, and Application* (O.-M. Lai, C.-P. Tan, & C. C. B. T.-P. O. Akoh (eds.); pp. 471–526). AOCS Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-9818936-9-3.50019-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-9818936-9-3.50019-8)

## ANEXOS

**Anexo A. Principales materias primas cultivadas en Colombia, como posibles fuentes de fitoesteroles**

Alimento	Parte	Grasa (%)	Esteroles (mg/100g) *	Producción Nacional (Ton/año)	Precio (COP/kg)	Usos	Referencia
Caña de Azúcar	Corteza	0,1	87	> 24 millones	2.600	Consumo interno, Humano, Azúcar, panela y bebidas. Animal, Melaza y forrajes.	(Feng, Luo, Zhong, et al., 2014; Asocaña, 2020; Agronet-Minagricultura, 2017)
Café	Grano	13	240	> 7 millones	6.800	Exportación, consumo interno	(Agronet-Minagricultura, 2017; Čížková et al., 2007; Nagasampagi et al., 1971; Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, 2017)
Palma	Fruto	53	81	> 1 millón	1.750	Aceite	(Agronet-Minagricultura, 2017; Belitz et al., 2009; Normén et al., 2007).
Aguacate	Pulpa	17	83	320.629	3.000	Exportación, aceite, obtención de compuestos	(Plaza et al., 2009; Agronet-Minagricultura, 2017; Nutrients-db, 2014).
Soya	Grano	18	405	126.300	3.000	Alimentación animal	(Vlahakis & Hazebroek, 2000; Agronet-Minagricultura, 2017)
Coco	Fruta	65	97	118.600	3.400	Bebidas, aceites	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Cacao	Grano	57	150	84.288	7.000	Chocolates	(Agronet-Minagricultura, 2017; Oracz et al., 2014)

<b>Alimento</b>	<b>Parte</b>	<b>Grasa (%)</b>	<b>Esteroles (mg/100g)*</b>	<b>Producción Nacional (Ton/año)</b>	<b>Precio (COP/kg)</b>	<b>Usos</b>	<b>Referencia</b>
Algodón	Semilla	33	95	18.667	900	Textiles, uso general	(Agronet-Minagricultura, 2017; Verleyen et al., 2002)
Cebada	Semilla	1,4	60	4.800	2.560	Bebidas	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Trigo	Germen	2	344	4.579	3.000	Aceite, harinas	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Girasol	Semilla	26	322	3.697	27.000	Aceite	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Ajonjolí	Semilla	49	404	2.300	6.000	Aceite, consumo directo	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Maní	Semilla	46	220	2.116	7.500	Aceite, consumo directo	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Avena	salvado	7	40	457	3.200	Alimentación humana y animal	(Agronet-Minagricultura, 2017; Normén et al., 2007)
Higuerilla	Semilla	47	165	297	61.700	Biodiesel, Industria química (pintura, esmaltes, cosméticos)	(Agronet-Minagricultura, 2017; Pacheco-Palencia & Susanne Mertens-Talcott, 2015)

**Anexo B. Matrices alimentarias adicionadas con fitosteroles y sus efectos sobre el perfil lipídico**

Matriz	País	Dosis (g/día)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo (veces)	Duración (semanas)	Muestra de intervención			resultados obtenidos	Referencias
						n	Edad (años)	Condición de inclusión		
Margarina	Alemania	4,56 <sup>1</sup>	Est	2	12	126	40-65	Hipercolesterolemia leve, aparentemente saludables	↓CT 10% ↓LDL 12% ↓HDL 4% ↓TG 4%	(Ras et al., 2015)
Crema unttable (34,4% grasa)	Alemania	3,3 <sup>1</sup>	Est	2	4	130	18-75	Hipercolesterolemia leve	↓CT 4 % ↓LDL 5 % ↔HDL ↓TG 10%	(Blom et al., 2019)
Leche	Brasil	1,2 <sup>1</sup>	Est	2	8	30	6-19	Hipercolesterolemia media-moderada	↓CT 5 % ↓LDL 10% ↔HDL ↓TG 19%	(Ribas et al., 2017)
Margarina	Brasil	2,0 <sup>1</sup>	Est	1	6	11	58-74	Tratamiento con estatinas, con antecedentes agudos de enfermedades coronarias	↓CT 13% ↓HDL nr ↓LDL 16 % ↓TG 18%	(Gomes et al., 2017)
Bebida no grasa (0,1%)	Canadá	1,8 <sup>1</sup>	L	3	3	15	22-68	Hipercolesterolemia moderada	↓CT 11% ↓LDL 10% ↓TG 20%	(Jones et al., 2003)
Bebida con bajo contenido graso (1%)	Canadá	1,8 <sup>1</sup>	L	3	3	15	22-68	Hipercolesterolemia moderada	↓CT 10% ↓LDL 8% ↓TG 6%	(Jones et al., 2003)
Margarina	Canadá	1,8 <sup>1</sup>	L	1	3	15	40-80	Hipercolesterolemia leve	↓CT 10% ↓LDL 15% ↓HDL 9% ↑TG 9%	(Lau et al., 2005)

Matriz	País	Dosis (g/día)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo (veces)	Duración (semanas)	Muestra de intervención			Resultados obtenidos	Referencias
						n	Edad (años)	Condición de inclusión		
Margarina	Canadá	1,8 <sup>1</sup>	L	1	3	14	40-80	Hipercolesterolemia leve, diabetes tipo 2	↓CT 14,6% ↓LDL 26% ↑HDL 7% ↑TG 8%	(Lau et al., 2005)
Margarina	Canadá	2,0 <sup>1</sup>	Est	3	4	41	35-70	Hombres con normo-hipercolesterolemia leve, con sobrepeso moderado	↓CT 5 % ↓LDL 7 % ↓HDL 4% ↓TG 7%	(Houweling et al., 2009)
Yogurt	Canadá	2,0 <sup>1</sup>	L	1	4	47	19-75	Hipercolesterolemia leve	↓CT 7% ↓LDL 11% ↑HDL 2% ↓TG 13%	(Amir Shaghghi et al., 2014)
Yogurt	Canadá	3,37 <sup>1</sup>	Est	1	4	47	19-75	Hipercolesterolemia leve	↓CT 6% ↓LDL 11% ↔HDL ↔TG	(Amir Shaghghi et al., 2014)
Yogur liquido	Colombia	4,0 <sup>2</sup>	Est	2	4	40	20 -50	Hipercolesterolemia leve-moderada	↓CT 7% ↓LDL 10% ↔HDL ↔TG	(Vásquez-Trespalcios & Romero-Palacio, 2014)
Leche baja en grasa (1,2%)	Dinamarca	1,2 <sup>1</sup>	L	2	4	71	45 - 65	Hipercolesterolemia moderada	↓CT 4% ↓LDL 7% ↔HDL ↔TG	(Thomsen et al., 2004)
Leche baja en grasa (1,2%)	Dinamarca	1,6 <sup>1</sup>	L	2	4	71	45 - 65	Hipercolesterolemia moderada	↓CT 7% ↓LDL 9% ↔HDL ↔TG	(Thomsen et al., 2004)
leche baja en grasa (1,8%)	España	2,0 <sup>2</sup>	Est	2	12	31	18-76	Hipercolesterolemia moderada sin tratamiento	↓CT 6% ↓LDL 9 % ↔HDL ↔TG	(Hernández-Mijares et al., 2010)

Matriz	País	Dosis (g/día)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo (veces)	Duración (semanas)	Muestra de intervención			Resultados obtenidos	Referencias
						n	Edad (años)	Condición de inclusión		
Crema de cacao y avellanas (44% grasa)	España	2,0 <sup>1</sup>	Est	1	4	30	43-65	Con hipertensión presión sanguínea (sistólica de 120-159 mm Hg y diastólica de 80-99 mm Hg), hipercolesterolemia leve-moderada. Fumadores	CT nr ↓LDL 11 % HDL nr ↓ApoB 8%	(Solà et al., 2012)
Crema de cacao, avellanas y fibra soluble (47% grasa)	España	2,0 <sup>1</sup>	Est	1	4	27	43-65	Hipercolesterolemia leve-moderada; con hipertensión presión sanguínea (sistólica 120-159 mm Hg y diastólica 80-99 mm Hg), fumadores	CT nr ↓LDL 9 % HDL nr ↓ApoB 8%	(Solà et al., 2012)
Jugo de naranja	Estados Unidos	2,0 <sup>1</sup>	L	2	8	72	20-73	Hipercolesterolemia moderada	↓CT 7% ↓LDL 13% ↔HDL ↔TG	(Devaraj et al., 2004)
Jugo de naranja	Estados Unidos	2,0 <sup>1</sup>	L	2	8	72	20-73	Hipercolesterolemia moderada	↓CT 5% ↓LDL 9% ↔HDL ↔TG ↓ApoB 12% ↔a-T; a-C; B-C, licopeno y luteína	(Devaraj et al., 2006)
Yogur	Finlandia	1,0 <sup>1</sup>	L	1	4	15	25-59	Hipercolesterolemia leve-moderada	↓CT 2% ↓LDL 4 % ↔HDL ↔TG	(Niittynen et al., 2008)

Matriz	País	Dosis (g/día)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo (veces)	Duración (semanas)	Muestra de intervención			Resultados obtenidos	Referencias
						n	Edad (años)	Condición de inclusión		
Yogur	Finlandia	2,0 <sup>1</sup>	L	2	8	12	25-59	Hipercolesterolemia leve-moderada	↓CT 6% ↓LDL 6% ↔HDL ↔TG	(Niittynen et al., 2008)
Untable a base de aceite vegetal y bebida a base de avena	Finlandia	8,8 <sup>2</sup>	Est	1	10	25	18-75	Hipercolesterolemia leve a moderada	↓CT 13% ↓LDL 17% ↔HDL ↔TG ↓α y β- C 45% ↓α y γ - T 15%	(Gylling et al., 2010)
Margarina	Finlandia	3,0 <sup>2</sup>	Est	3	24	46	25-66	Sin criterios de inclusión para perfil lipídico, no consumidores de medicamentos o suplementos que afecten el nivel de colesterol sérico	↓CT 5% ↓LDL 3% ↔HDL ↔TG	(Gylling et al., 2013)
Yogur	Finlandia	1,6 <sup>2</sup>	Est	1	4	28	25-65	Hipercolesterolemia leve	↓CT 5% ↓LDL 9% ↔HDL ↔TG	(Salo & Kuusisto, 2016)
Yogur	Finlandia	2,0 <sup>2</sup>	Est	1	4	29	25-65	Hipercolesterolemia leve	↓CT 4% ↓LDL 8% ↔HDL ↔TG	(Salo & Kuusisto, 2016)
Untable (10,5% grasa)	Grecia	2,0 <sup>2</sup>	Est	No específica	16	50	50-58	Hipercolesterolemia leve.	↓CT 14% ↓LDL 16% ↔HDL ↔TG ↓SPCR 17%	(Athiros et al., 2011)

Matriz	País	Dosis (g/día)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo (veces)	Duración (semanas)	Muestra de intervención			Resultados obtenidos	Referencias
						n	Edad (años)	Condición de inclusión		
Yogur	Italia	2,0 <sup>1</sup>	Est	1	12	29	8-16	Con historia de hipercolesterolemia familiar	↓CT 8 % ↓LDL 10% ↔HDL ↔TG	(Guardamagna et al., 2010)
Chocolate (15% grasa)	Países bajos	1,8 <sup>1</sup>	L	3	4	31	21-75	Hipercolesterolemia leve	↓CT 6% ↓LDL 10% ↔HDL ↔TG	(De Graaf et al., 2002)
Yogur (2,7% grasa)	Países bajos	3,2 <sup>1</sup>	Est	1	4	184	55-59	Hipercolesterolemia leve	↓CT 7 % ↓LDL 9 % ↔HDL ↔TG	(Doornbos et al., 2006)
Yogur (3,5% grasa)	Países bajos	2,8 <sup>1</sup>	Est	1	4	184	55-59	Hipercolesterolemia leve	↓CT 6 % ↓LDL 9% ↔HDL ↔TG	(Doornbos et al., 2006)
Margarina	Países bajos	3,0 <sup>1</sup>	Est	2	12	43	18-70	Normo e hipercolesterolemia leve	↓CT 5,3% ↓LDL 8,1% ↔HDL	(Baumgartner et al., 2013)
Margarina	Países bajos	3,0 <sup>2</sup>	Est	2	12	43	18-70	Normo e hipercolesterolemia leve	↓CT 5,3% ↓LDL 7,8% ↔HDL	(Baumgartner et al., 2013)
Bebida láctea baja en grasa	Suiza	3,6 <sup>1</sup>	Est	1	1	26	28-30	Sin desordenes metabólicos, normolipidemicos	↓CT 20% ↓TG 13% ↓β-C 60% ↓α-T 32%	(Richelle et al., 2004)
Bebida láctea baja en grasa	Suiza	2,2 <sup>1</sup>	L	1	1	26	28-30	Sin desordenes metabólicos, normolipidemicos	↓CT 23% ↓TG 13% ↓β-C 48% ↓α-T 11%	(Richelle et al., 2004)

Matriz	País	Dosis (g/día)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo (veces)	Duración (semanas)	Muestra de intervención			Resultados obtenidos	Referencias
						n	Edad (años)	Condición de inclusión		
Yogur bajo en grasa cuchareable	Turquía	3,3 <sup>2</sup>	Est	2	4	35	23-65	Hipercolesterolemia leve- moderada, no consumo de medicamentos que pudiera influir en el perfil lipídico	↓CT 4% ↓LDL 6% ↔HDL ↔TG	(Buyuktuncer et al., 2013)

Dosis: 1: fitoesteroles, 2: fitoestanoles, 3 mezcla de fitoesteroles y fitoestanoles

Forma del esteroles Est: Esterificado; L: Libre

Resultados obtenidos CT: Colesterol total; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; TG : Triglicéridos; β-caroteno: β – C; α-tocoferol α-T; SPCR Alta sensibilidad a proteína C- reactiva

**Anexo C. Formas farmacéuticas de suplementación con fitoesteroles y sus efectos sobre el perfil lipídico**

Forma farmacéutica	País	Dosis (g/d)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo	Duración (semanas)	Muestra De Intervención			Resultados Obtenidos	Referencias
						n	Edad (Años)	Condición de Inclusión		
Cápsula	Brasil	2,0 <sup>1</sup>	L	4 capsulas, 2 en cada comida	4	86	55-68	Prevención primaria o secundaria de enfermedad coronaria, con indicación de terapia para reducción de lípidos en suero	↓TC 5- 7% ↓LDL 4- 6% ↔HDL ↔TG	(Malina et al., 2015)
Cápsulas blandas	Canadá	2,7 <sup>2</sup>	Est	6 capsulas, 3 en cada comida	4	12	33- 70	Hipercolesterolemia moderada- alta	↓CT 8% ↓LDL 9% ↔HDL ↔TG	(Woodgate et al., 2006)
Dispersión acuosa	Chile	2,0 <sup>1</sup>	L	1 sachet 8mL	24	102	18-65	Diagnosticados con síndrome metabólico y glucemia en ayunas >100mg/dL	↓TC 2% ↓TG 15% ↓VLDL 10% ↔HDL	(Palmeiro-Silva et al., 2020)
Tableta	Estados Unidos	1,8 <sup>1</sup>	L	4 tabletas, 2 en cada comida	6	32	21-79	Hipercolesterolemia leve-moderada y buena salud en general	↓CT 3% ↓LDL 5% ↔HDL ↔TG	(Maki et al., 2012)
Cápsulas blandas	Estados Unidos	2,9 <sup>3</sup>	Est	4 capsulas, 2 en cada comida	6	28	21-79	Hipercolesterolemia leve-moderada	↓CT 7% ↓LDL 9% ↔HDL ↓TG 9%	(Maki et al., 2013)
Cápsulas blandas	Estados Unidos	1,8 <sup>3</sup>	Est	4 capsulas, 2 en cada comida	6	30	21-79	Hipercolesterolemia leve-moderada y buen estado de salud en general.	↓CT 3% ↓LDL 4% ↔HDL ↔TG	(McKenney et al., 2014)

Forma farmacéutica	País	Dosis (g/d)	Forma Est ó L	Frecuencia consumo	Duración (semanas)	Muestra De Intervención			Resultados Obtenidos	Referencias
						n	Edad (Años)	Condición de Inclusión		
Cápsula	Estados Unidos	1,5 <sup>1</sup>	L	3 capsulas de 0,5 g	4	32	30-65	Adultos saludables, normocolesterolemia	↓LDL 10%	(Reaver et al., 2019)
Cápsulas blandas	Noruega	2,0 <sup>1</sup>	Est	2 capsulas por día	4	41	18-80	Hipercolesterolemia media-moderada	↔CT ↔LDL ↔HDL ↔TG	(Ottestad et al., 2013)

Dosis: 1: fitoesteroles, 2: fitoestanoles, 3 mezcla de fitoesteroles y fitoestanoles

Forma del esteroil Est: Esterificado; L:Libre

Resultados obtenidos CT: Colesterol total; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad; TG : Triglicéridos; β-caroteno: β – C; α-tocoferol α-T; SPCR Alta sensibilidad a proteína C- reactiva

### Anexo D. Metodología para la estimación de vida útil de bebida de naranja con y sin fitoesteroles encapsulados

Los parámetros evaluados para la estimación de vida útil, por modelo matemático  $Q_{10}$ , fueron pH, sólidos disueltos (ppm), conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) y aceptación general de las bebidas (jugo de naranja control y jugo de naranja con encapsulados de fitoesteroles); a dos temperaturas (10 y 20°C). En Tabla 20, se muestra el promedio de los valores obtenidos en las mediciones realizadas.

**Tabla 20.** Promedio de valores experimentales de las variables pH, sólidos disueltos, conductividad y aceptación sensorial

Variable analizada	pH				Sólidos disueltos (ppm)				Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )				Aceptación general (sensorial)			
	Control		Encapsulados		Control		Encapsulados		Control		Encapsulados		Control		Encapsulados	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
0	3,17	3,17	3,35	3,35	1964	2671	2160	2966	3928	5342	4320	5932	8,3	8,3	8,2	8,2
1	3,17	3,29	3,44	3,49	1711	2104	2025	2671	3421	4207	4050	5342	8,4	8,4	7,8	8
2	3,31	3,40	3,58	3,67	1593	2104	1789	2164	3185	4207	3578	4328	8	8,3	7,7	7,5
6	3,22	3,31	3,69	3,77	1357	1732	1475	2004	2713	3464	2949	4007	7,7	7,8	7,7	6,9
8	3,40	3,66	3,71	3,85	1357	1632	1750	1867	2714	3264	3499	3734	7,8	7,4	7,8	3,4
14	3,32	3,55	3,85	4,07	1259	1650	1593	1959	2517	3299	3185	3919	7,5	5,1	7,5	-
16	3,32	3,40	3,67	4,10	1121	1461	1391	1514	2242	2923	2781	3028	7,4	3,2	6,9	-
21	3,23	3,62	3,80	4,13	1095	1134	1382	1217	2189	2269	2764	2433	6,3	-	4,3	-
29	3,38	3,55	3,66	4,08	805	733	1010	797	1611	1467	2021	1595	5,8	-	-	-
43	3,29	3,51	3,66	4,01	494	780	1022	981	987	1560	2043	1963	4,1	-	-	-

1. Determinación del orden de la reacción: Con los datos de la tabla anterior, se grafica cada variable contra tiempo; hallando el coeficiente de determinación ( $r^2$  más cercano a 1), se elige el orden de la reacción (Tabla 21).

**Tabla 21.** Coeficientes de determinación ( $r^2$ ) de las variables analizadas y orden de la reacción

Variable analizada	pH				Sólidos disueltos (ppm)				Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )				Aceptación general (sensorial)			
	Control		Encapsulados		Control		Encapsulados		Control		Encapsulados		Control		Encapsulados	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
0	0,162	0,309	0,214	0,530	0,923	0,830	0,811	0,786	0,922	0,829	0,811	0,786	0,963	0,892	0,658	0,789
1	0,165	0,315	0,219	0,525	0,969	0,891	0,855	0,830	0,970	0,891	0,855	0,829	0,937	0,824	0,613	0,729
2	0,330	0,557	0,673	0,937	0,945	0,917	0,876	0,907	0,945	0,917	0,875	0,907	0,978	0,99	0,908	0,915

2. Encontrar las constantes de velocidad ( $k$ ) para cada parámetro

Según el orden de la reacción encontrado, se trabajan con las siguientes ecuaciones (Ecuación 7 y Ecuación 8)

$$\ln \frac{A_0}{A_t} = kt \quad \text{Ecuación 7 Cinética de primer orden}$$

$$\frac{1}{A_t} - \frac{1}{A_0} = kt \quad \text{Ecuación 8. Cinética de segundo orden}$$

Donde,  $A_0$  es la concentración (valor) inicial del parámetro evaluado

$A_t$  es la concentración del parámetro en el tiempo

$t$  tiempo estimado

$k$  es la constante de velocidad

Viendo las ecuaciones 7 y 8 de la forma  $y = mx + b$ , se obtienen las siguientes expresiones respectivamente

$$\frac{1}{At} = kt + \frac{1}{A_0} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$\ln At = \ln A_0 - kt \quad \text{Ecuación 10}$$

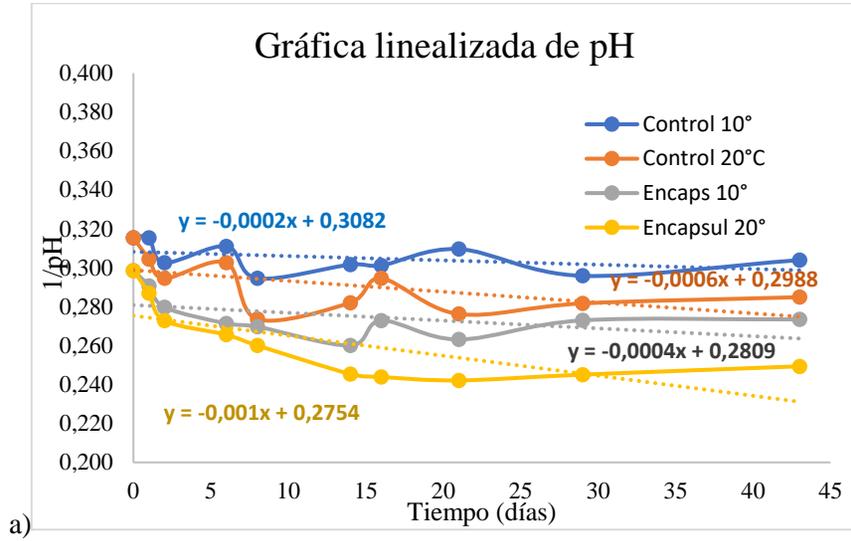
Con las expresiones de las ecuaciones 9 y 10, se obtiene la Tabla 22 y se procede a graficar nuevamente cada uno de los valores contra el tiempo

**Tabla 22.** Linealización de datos obtenidos en cada uno de los parámetros, según el orden de la reacción (primer orden  $\ln A_t$ , segundo orden  $1/A_t$ )

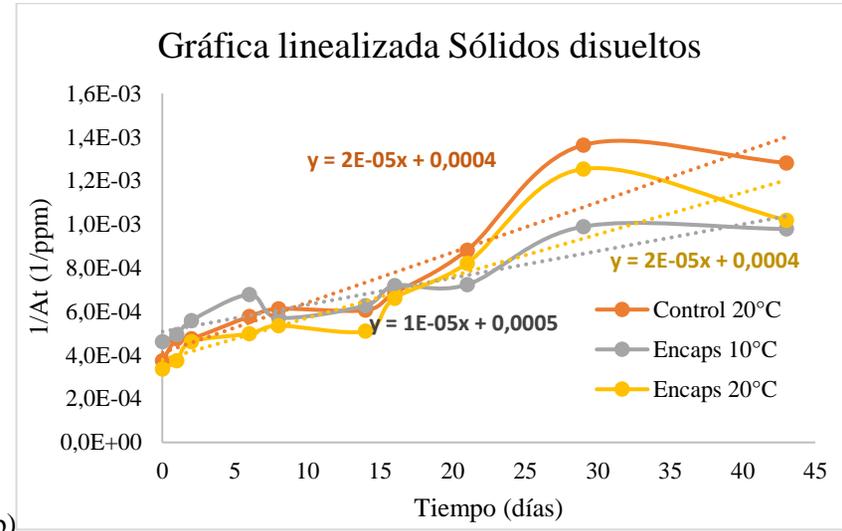
Variable analizada	pH				Sólidos disueltos (ppm)				Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ )				Aceptación general (sensorial)			
	Control		Encapsulados		Control		Encapsulados		Control		Encapsulados		Control		Encapsulados	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
0	0,315	0,315	0,299	0,299	7,583	3,7E-04	4,6E-04	3,4E-04	8,276	1,9E-04	2,3E-04	1,7E-04	0,120	0,120	0,122	0,122
1	0,315	0,304	0,291	0,287	7,445	4,8E-04	4,9E-04	3,7E-04	8,138	2,4E-04	2,5E-04	1,9E-04	0,119	0,119	0,128	0,125
2	0,303	0,295	0,280	0,273	7,373	4,8E-04	5,6E-04	4,6E-04	8,066	2,4E-04	2,8E-04	2,3E-04	0,125	0,120	0,130	0,133
6	0,311	0,303	0,271	0,266	7,213	5,8E-04	6,8E-04	5,0E-04	7,906	2,9E-04	3,4E-04	2,5E-04	0,130	0,128	0,130	0,145
8	0,295	0,274	0,270	0,260	7,213	6,1E-04	5,7E-04	5,4E-04	7,906	3,1E-04	2,9E-04	2,7E-04	0,128	0,135	0,128	0,294
14	0,302	0,282	0,260	0,245	7,138	6,1E-04	6,3E-04	5,1E-04	7,831	3,0E-04	3,1E-04	2,6E-04	0,133	0,196	0,133	-
16	0,301	0,295	0,273	0,244	7,022	6,8E-04	7,2E-04	6,6E-04	7,715	3,4E-04	3,6E-04	3,3E-04	0,135	0,313	0,145	-
21	0,310	0,276	0,263	0,242	6,998	8,8E-04	7,2E-04	8,2E-04	7,691	4,4E-04	3,6E-04	4,1E-04	0,159	-	0,233	-
29	0,296	0,282	0,273	0,245	6,691	1,4E-03	9,9E-04	1,3E-03	7,384	6,8E-04	4,9E-04	6,3E-04	0,172	-	-	-
43	0,304	0,285	0,273	0,249	6,202	1,3E-03	9,8E-04	1,0E-03	6,895	6,4E-04	4,9E-04	5,1E-04	0,244	-	-	-

Una vez linealizado cada uno de los valores experimentales de los parámetros analizados, se grafica la función linealizada correspondiente ( $\ln$

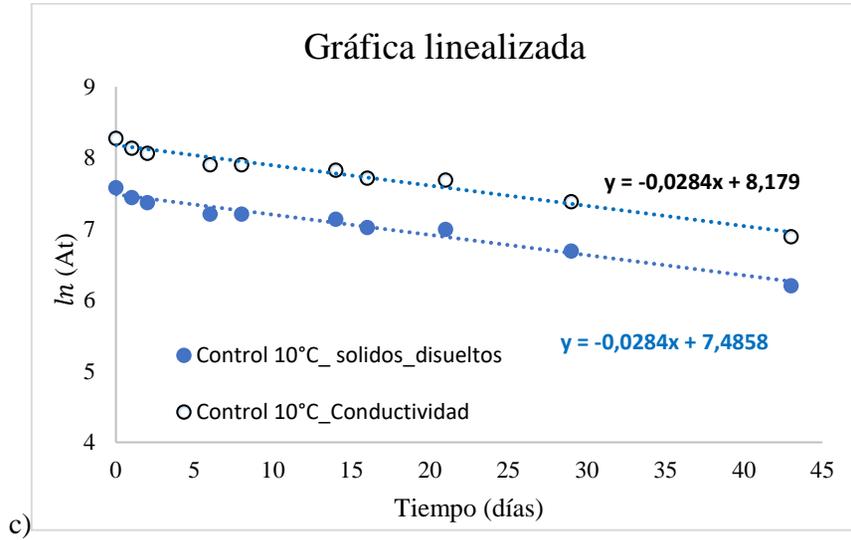
$A_t$  o  $1/A_t$ ) con respecto al tiempo (Figura 36). Con la ecuación de la recta obtenida, se obtiene la constante de velocidad (k), la cual corresponde a la pendiente (tabla 24).



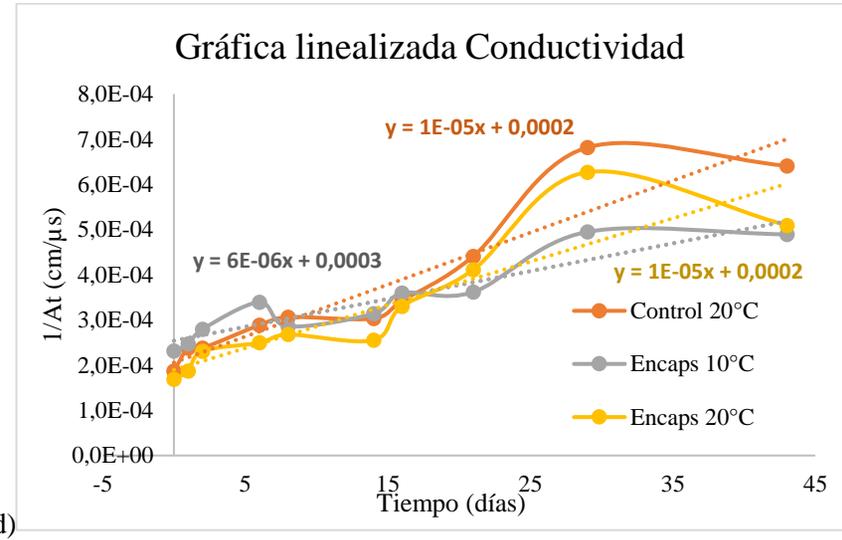
a)



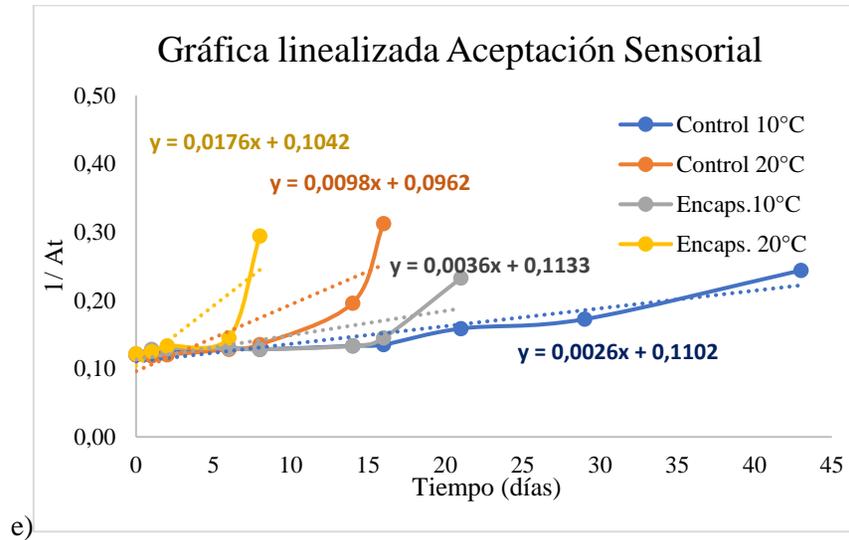
b)



c)



d)



**Figura 36.** Linealización de parámetros, según su orden de reacción, contra el tiempo, para bebida control y bebida con encapsulados de fitoesterol a 10 y 20°C. a) pH, b) sólidos disueltos, c) control a 10°C de solidos disueltos y conductividad. d) conductividad, e) aceptación sensorial de las bebidas.

De acuerdo a las ecuaciones 10 y 11, se procede a la elaboración de la Tabla 23, para hallar cada una de las constantes de velocidad

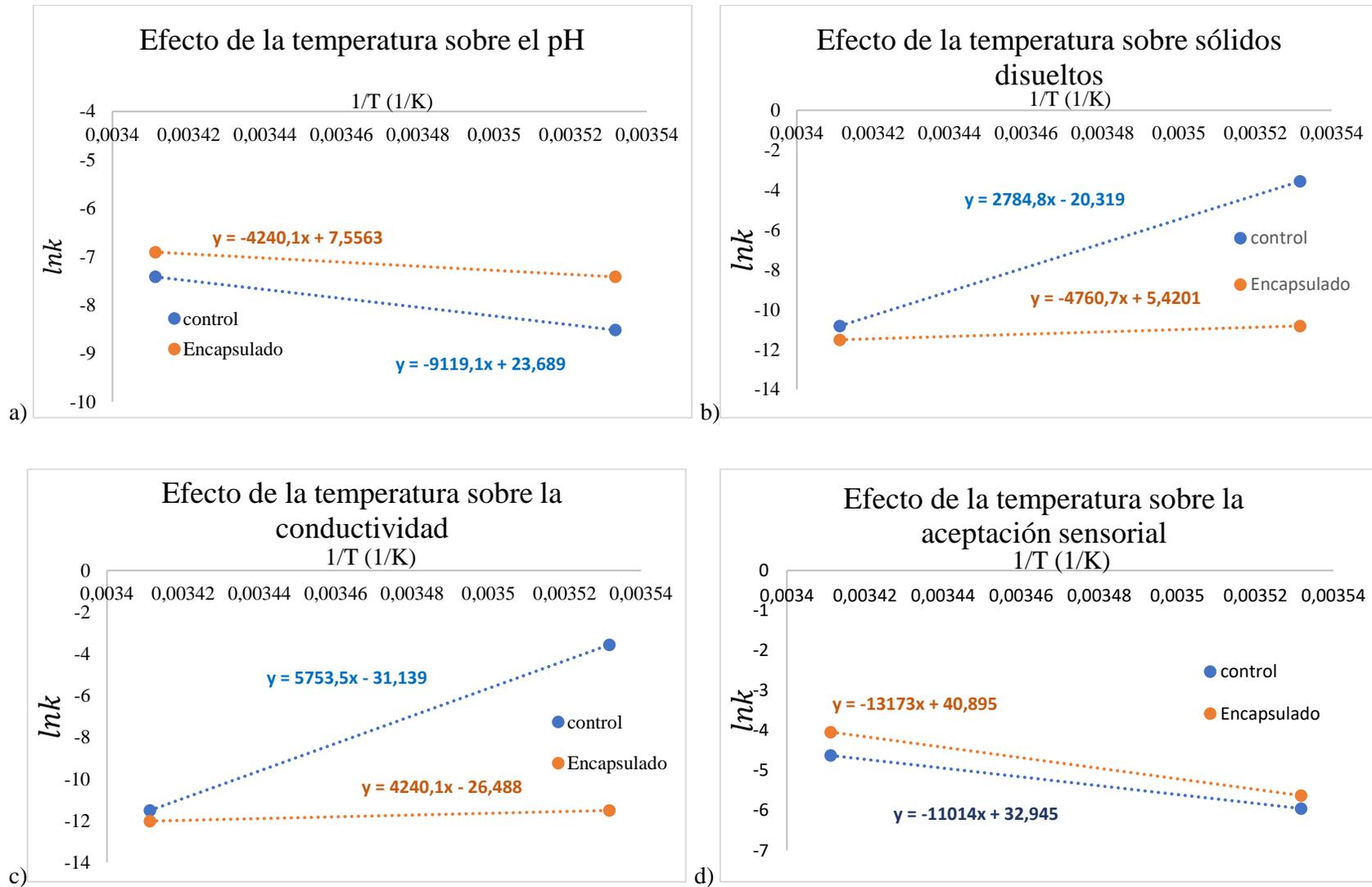
**Tabla 23.** Constantes de Velocidad (de deterioro) para cada uno de los parámetros analizados ( $k = m$ )

Parámetros analizados	Control		Encapsulados	
	10°C	20°C	10°C	20°C
pH	-2,0E-04	-6,0E-04	-6,0E-04	-1,0E-03
Solidos disueltos	2,84E-02	2,00E-05	1,00E-05	2,00E-05
Conductividad	2,84E-02	1,00E-05	6,00E-06	1,00E-05
Aceptación sensorial	2,60E-03	9,80E-03	3,60E-03	1,76E-02

3. Determinación de la Energía de activación: Para esto, se grafica la función  $\ln(k)$  contra el inverso de la temperatura en °K (1/T). Se halla la  $E_a$  según la siguiente relación  $E_a = m * R$

**Tabla 24.**  $\ln k$  de cada uno de los parámetros

Parámetros analizados	Control		Encapsulados	
	10°C	20°C	10°C	20°C
Temperatura (K)	283,15	293,15	283,15	293,15
pH	-8,517	-7,419	-7,419	-6,908
Solidos disueltos	-3,561	-10,820	-10,820	-11,513
Conductividad	-3,561	-11,513	-11,513	-12,024
Aceptación sensorial	-5,952	-4,625	-5,627	-4,040



**Figura 37.** Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción en cada uno de los parámetros evaluados, a) pH, b) sólidos disueltos, c) conductividad y d) aceptación sensorial de las bebidas.

De acuerdo a la Figura 37, se pueden encontrar la Ea. Datos mostrados en la Tabla 25.

**Tabla 25.** Energías de activación ( $E_a$ ) de cada uno de los parámetros evaluados para jugo control y encapsulado

Parámetros analizados	Energías de activación (J/mol)	
	Control	Encapsulados
pH	-7,58E+04	-3,53E+04
Sólidos disueltos	2,32E+04	-3,96E+04
Conductividad	4,78E+04	3,53E+04
Aceptación sensorial	-9,16E+04	-1,10E+05

#### 4. Determinación de valor de $Q_{10}$

Reemplazando la ecuación con los datos obtenidos anteriormente se encuentra la relación

$$\ln Q_{10} = \frac{Ea}{R} \left[ \frac{10}{T(T + 10)} \right]$$

Ea= Energía de activación de la reacción

R= Constante de los gases ideales (8,314 J/mol\*K)

T= Temperatura en K ( $^{\circ}\text{C} + 273,15$ )

$$Q_{10} = e^{\text{valor de } \ln Q_{10}}$$

**Tabla 26.** Factor  $Q_{10}$  de las bebidas sin y con fitoesteroles encapsulados

Parámetro	Muestra	Temperatura (K)	In $Q_{10}$	$Q_{10}$
pH	Control	283,15	-1,098	0,333
	Encapsulado	283,15	-0,512	0,600
	control	293,15	-1,026	0,358
	Encapsulado	293,15	-0,478	0,620
Sólidos disueltos	control	283,15	0,336	1,400
	Encapsulado	283,15	-0,574	0,563
	control	293,15	0,314	1,369
	Encapsulado	293,15	-0,536	0,585
conductividad	control	283,15	0,693	1,999
	Encapsulado	283,15	0,512	1,668
	control	293,15	0,647	1,910

	Encapsulado	293,15	0,478	1,612
Aceptación sensorial	control	283,15	-1,327	0,265
	Encapsulado	283,15	-1,594	0,203
	control	293,15	-1,240	0,289
	Encapsulado	293,15	-1,489	0,226

## Anexo E. Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH durante la digestión *in vitro*

### Metodología

La actividad antioxidante del medio de digestión también fue determinada para las muestras de extracto obtenido por FSC; extracto con aceite de soya y micropartículas de FE, con el fin de lograr caracterizar las muestras en todas las etapas de la digestión. Para esto, se usó el ensayo con el reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) antes y después de las fases de digestión gástrica e intestinal, de acuerdo al procedimiento descrito por Martin et al., (2016). Brevemente, el medio de digestión fue diluido en etanol:clorformo (4:1), de allí una alícuota (500 $\mu$ L) fue adicionada a 1500  $\mu$ L de DPPH en metanol (0,06 mM), se agitó por 1 min en vortex y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Las muestras fueron guardadas en oscuridad durante 1 hora y finalmente se realizó la medida a 517nm en un espectrofotómetro. Este procedimiento también se aplicó para los controles y fue realizado por triplicado.

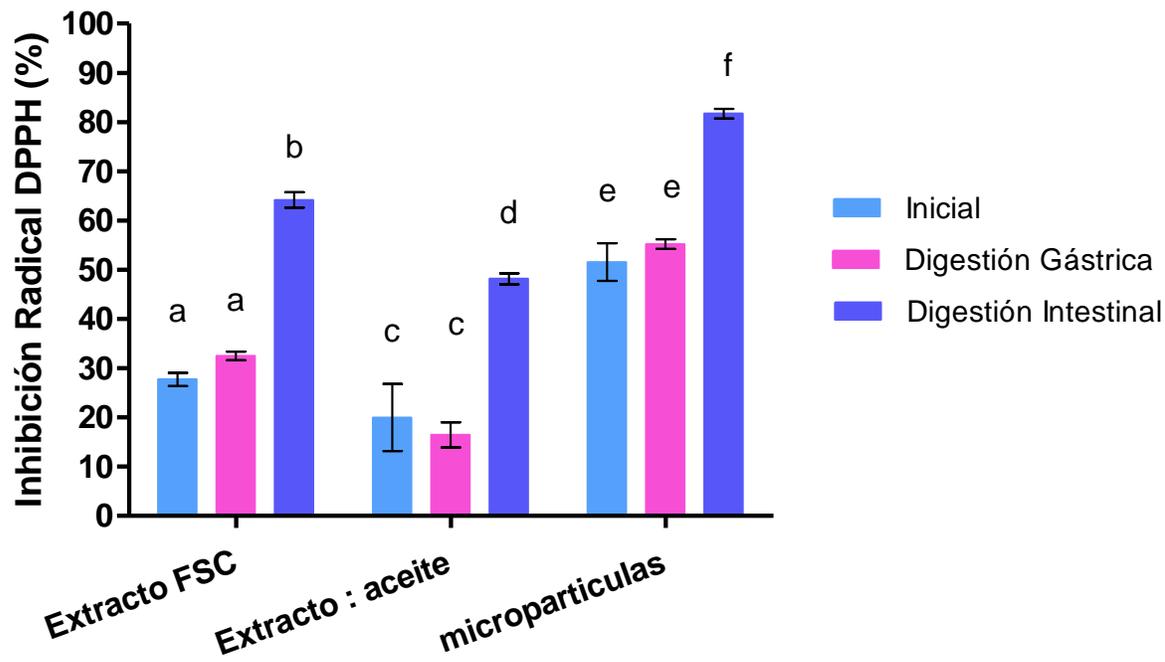
La concentración del DPPH en el medio, fue estimado por curvas de calibración (DPPH), y la actividad antioxidante fue expresada como se muestra en la *%Inhibición DPPH = 100 -  $\mu$ g de DPPH/mL muestra  $\div$   $\mu$ g de DPPH/mL Control  $\times$  100* Ecuación 11

$$\%Inhibición DPPH = 100 - \frac{\mu g \text{ de DPPH/mL muestra}}{\mu g \text{ de DPPH/mL Control}} \times 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

## Resultados y discusión

En algunos estudios, los FE han sido identificados como antioxidantes debido a que pueden ofrecer protección contra ciertos tipos de cánceres (Abuajah et al., 2015), particularmente el  $\beta$ -sitosterol el cual es capaz de neutralizar los radicales libres de DPPH (un donante de aniones superóxido)(Jain & Bathla, 2015). Sin embargo, la capacidad antioxidante de las muestras analizadas no se puede atribuir únicamente a los FE, ya que, al ser un extracto, otra gran cantidad de compuestos podrían ayudar en esta propiedad (En la Tabla 6. Caracterización del extracto de bagazo de caña de azúcar obtenido por FSC, se detallan algunos compuestos identificados del extracto trabajado). Las características antioxidantes de un extracto se ven afectada por factores como el tiempo y el pH, por lo que se hizo necesario determinar si las muestras analizadas presentan cambios en dicho aspecto, cuando son sometidos a una digestión simulada *in vitro*.

En la Figura 38, se observa la inhibición del radical DPPH de las muestras evaluadas en 3 etapas del proceso de digestión (antes y después de la fase gástrica y al finalizar la fase intestinal); identificando que antes y después de la fase gástrica, la inhibición de DPPH no cambia estadísticamente para cada muestra; pero si lo hace en más de un 30% aproximadamente al finalizar todo el proceso digestivo (al comparar con la fase gástrica). Los valores de inhibición de DPPH en la etapa intestinal del extracto por FSC, extracto: aceite y micropartículas correspondió a  $64,17 \pm 1,57$ ;  $48,14 \pm 1,11$  y  $81,69 \pm 0,98$ , respectivamente.



**Figura 38.** Actividad antioxidante por el método DPPH, para cada muestra con FE en las diferentes etapas de la digestión *in vitro*. Letras diferentes indican diferencia estadística

La capacidad antioxidante que se detecta en las muestras podría atribuirse a la presencia de pequeñas cantidades de compuestos fenólicos como los ácidos cinámico, cafeico, ferúlico y p-cumárico, que son productos intermedios en la formación de la lignina (polímero de complejo fenólico) (Liu et al., 2018), y el bagazo de caña de azúcar es rico en este compuesto (lignina) como uno de los principales componentes de la pared celular vegetal, encontrándose entre un 18 a 20% en esta matriz (Wern Chonga et al., 2019; Zheng et al., 2017). Asimismo, un extracto obtenido por FSC, puede tener compuestos fenólicos en pequeñas proporciones ya que estos metabolitos también pueden ser extraídos por FSC (Silvia et al., 2016).

En el extracto obtenido por FSC, las primeras fases de digestión tiene un valor similar al estudio de Feng et al., (2014), en el cultivo de caña de azúcar Badila (Red-ring) de Zhejiang-China en la

corteza ( $28,13 \pm 1,03\%$ ), el nudo ( $35,84 \pm 1,15$ ) y la punta ( $28,35 \pm 0,40\%$ ); lo que demuestra que los compuestos responsables de la capacidad antioxidante presente en el extracto, no se alteran a pH ácidos (condiciones de digestión gástrica *in vitro*). Otros estudios muestran que no solo la caña de azúcar o sus productos (principalmente el jugo) presentan alta actividad antioxidante, los anillos de caña de azúcar también tienen buena actividad antioxidante (500-1750 mg GAE / 100g o entre 65-220 mg GAE / 100 mg fenólicos), demostrando una correlación entre los compuestos fenólicos y DPPH, en el estudio realizado por Zhao et al., (2018).

En el caso de las enzimas adicionadas en el modelo de digestión, se observa que las enzimas gástricas (lipasa gástrica y pepsina) no mostraron un efecto significativo en las muestras (antes o después de la digestión gástrica), debido a que las muestras son principalmente de naturaleza lipídica (Extracto FSC y Extracto: de aceite). Sin embargo, el valor de inhibición de DPPH para las microcápsulas ( $51,57 \pm 3,82\%$ ) fue mayor que las muestras de lípidos, esto se debe a la dispersión de las partículas en un medio acuoso con pH ácido, favorecido por un proceso de emulsificación. Por otro lado, el aumento de la actividad antioxidante en la digestión intestinal, luego de la agitación en presencia de pancreatina y ácidos biliares, favoreció la hidrólisis de los compuestos dentro de las muestras, conclusión similar a la obtenida por He et al., (2015), con compuestos fenólicos, que durante 2 h de digestión intestinal a pH 7,5, presentaron una hidrólisis por pancreatina mucho mayor que la digestión gástrica por pepsina.

En el caso de las micropartículas, estas expresan mayor actividad antioxidante, incluso desde la primera fase, debido a su estado físico que permite la dispersión en las soluciones acuosas, además de que los agentes encapsulantes empleados, son fácilmente solubilizados, permitiendo mostrar fácilmente su actividad antioxidante.