

SEP

SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



Subsecretaría de Educación Superior Dirección  
General de Educación Superior Tecnológica  
Instituto Tecnológico de Veracruz

**Preparación de nanoemulsiones acarreadoras de curcumina  
elaboradas con mono- y/o diacilglicéridos producidos  
enzimáticamente**

TESIS

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Alimentos**

Presenta:

**M.C. ALAINA ALESSA ESPERÓN ROJAS**

Asesores:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dr. Ramiro Baeza Jiménez

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

H. Veracruz, Ver.

Junio 2018

## RESUMEN

**Esperón Rojas Alaina Alessa. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio 2018. “Preparación de nanoemulsiones acarreadoras de curcumina elaboradas con mono- y/o diacilglicéridos producidos enzimáticamente”. Asesor: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Ramiro Baeza Jiménez y Dra. Cynthia Cano Sarmiento**

Las nanoemulsiones han demostrado representar un vehículo adecuado para compuestos bioactivos que no son solubles en agua o que requieren ser protegidos de factores como los cambios de pH, la oxidación, la luz o la presencia de iones metálicos. Uno de los componentes más importantes en su formulación son los emulsificantes, que han demostrado una fuerte influencia en la estabilidad de la misma. Dentro de la gama de emulsificantes, los de naturaleza lipídica además de ofrecer sus características funcionales, permiten realizar modificaciones en su estructura con el fin de incrementar el valor nutricional o funcional de algunos de ellos; tal es el caso de los monoacilglicéridos y diacilglicéridos, compuestos que han sido utilizados ampliamente en la industria alimenticia y han demostrado características funcionales y nutricionales altamente atractivas.

En el presente trabajo evaluará el efecto emulsificante de monoacilglicéridos y diacilglicéridos estructurados con ácidos grasos considerados nutraceuticos: ácidos grasos  $\omega$ -3, ácido linoléico conjugado (CLA) y ácidos grasos de cadena media (AGCM) (C 6:0, C 8:0 y C 10:0), por vía enzimática con lipasas inmovilizadas de *Candida antarctica* o *Rhizomucor miehei*; a través de la elaboración de nanoemulsiones acarreadoras de curcumina, que es un compuesto bioactivo con múltiples propiedades benéficas a la salud, pero con baja disponibilidad en su consumo vía oral. Dichas nanoemulsiones serán evaluadas en un modelo *in vivo* (murino) para determinar la biodisponibilidad del compuesto activo en dicho sistema acarreador.

Al finalizar esta investigación se demostró que las nanoemulsiones acarreadoras de curcumina, preparadas con los monoacilglicéridos y diacilglicéridos estructurados enzimáticamente con lípidos bioactivos (AGCM, CLA y  $\omega$ -3) de forma individual, así como la mezcla de ambos, no son significativamente diferentes en cuanto su estabilidad y características. Las nanoemulsiones elaboradas con emulsificantes que contenían CLA y  $\omega$ -3, mostraron una mayor biodisponibilidad de la curcumina al ser evaluadas en un modelo murino, en comparación de emulsiones con los mismos compuestos.

## ABSTRACT

**Esperón Rojas Alaina Alessa. Doctorate in Food Sciences. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2018. "Preparation of curcumin-carrying nanoemulsions made with mono- and / or diacylglycerides produced enzymatically". Advisers: PhD. Hugo Sergio García Galindo, PhD. Ramiro Baeza Jiménez y PhD. Cynthia Cano Sarmiento**

Nanoemulsions have been shown to represent a suitable vehicle for bioactive compounds that are not soluble in water or that need to be protected from factors such as pH changes, oxidation, light or the presence of metal ions. One of the most important components in its formulation are the emulsifiers, which although they are not essential for the formation of an emulsion, if they have demonstrated a strong influence on the stability of the same, as well as a great versatility depending on the type of emulsifier used. . Within the range of emulsifiers, those of a lipid nature, in addition to offering their functional characteristics, allow modifications to be made in their structure in order to increase the nutritional or functional value of some of them; such is the case of monoacylglycerides and diacylglycerides, compounds that have been widely used in the food industry and have demonstrated highly attractive functional and nutritional characteristics.

In the present work, we will evaluate the emulsifying effect of monoacylglycerides and structured diacylglycerides with fatty acids considered nutraceuticals: fatty acids  $\omega$ -3, conjugated linoleic acid (CLA) and medium chain fatty acids (AGCM) (C 6:0, C 8:0 and C 10:0), enzymatically with immobilized lipases from *Candida antarctica* or *Rhizomucor miehei*; through the elaboration of nanoemulsions carrying curcumin, which is a bioactive compound with multiple properties beneficial to health, but with low availability in oral consumption. Nanoemulsions will be evaluated in an *in vivo* (murine model) to determine the bioavailability of the active compound in said carrying system.

At the end of this research it was demonstrated that curcumin-carrying nanoemulsions, prepared with monoacylglycerides and diacylglycerides enzymatically structured with bioactive lipids (AGCM, CLA and  $\omega$ -3) individually, as well as the mixture of both, are not significantly different in that its stability and characteristics. The nanoemulsions made with emulsifiers containing CLA and  $\omega$ -3, showed a greater bioavailability of curcumin when evaluated in a murine model, and compared to emulsions with the same compounds.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>1. ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Compuestos bioactivos.</i>	13
1.1.1 Características.	14
1.1.2 Clasificación.	16
1.2 <i>Curcumina.</i>	17
1.2.1 <i>Características.</i>	18
1.2.1.1 Composición.	18
1.2.1.2 Propiedades físicas y químicas.	19
1.2.1.3 Biodisponibilidad.	20
1.2.2 <i>Actividad biológica.</i>	21
1.2.2.1 Actividad antimicrobiana.	22
1.2.2.2 Actividad sobre tejidos específicos.	22
1.2.2.2 Actividad antiinflamatoria.	23
1.2.2.3 Actividad inmunomoduladora.	24
1.2.2.4 Actividad hipolipidémica.	24
1.2.2.6 Actividad antioxidante.	24
1.2.2.7 Actividad anticarcinogénica.	25
1.3 <i>Nanoemulsiones.</i>	26
1.3.1 Definición.	27
1.3.2 Ventajas.	27
1.3.3. Clasificación.	29
1.3.4 Composición.	30
1.3.4 Preparación.	31
1.3.5 Estabilidad.	32
1.3.6.1 Separación gravitacional	34
1.3.6.2 Floculación.	35
1.3.6.3 Coalescencia	35
1.3.6.4 Maduración de Ostwald.	36

1.4	<i>Emulsificantes.</i>	38
1.4.1	Definición.	38
1.4.2	Clasificación.	39
1.4.3	Monoacilglicéridos.	40
1.4.4.1	Características.	42
1.4.4.2	Actividad biológica.	42
1.4.5	Diacilglicéridos.	42
1.4.5.1	Características.	43
1.4.5.2	Actividad biológica.	44
1.5	<i>Lípidos estructurados.</i>	45
1.5.1	Estrategias para la modificación de lípidos.	46
1.5.1.1	Modificación enzimática de lípidos.	47
1.5.1.2	Factores que afectan la modificación enzimática de los lípidos.	48
1.5.1.2	Factores que afectan la modificación enzimática de los lípidos.	50
1.5.2	Lipasas.	52
1.6	<i>Lípidos bioactivos.</i>	53
1.6.1	Ácidos grasos omega-3 ( $\omega-3$ ).	54
1.6.1.1	Características.	54
1.6.1.2	Actividad biológica	55
1.6.2	Ácido linoléico conjugado.	57
1.6.2.1	Características.	59
1.6.2.2	Actividad biológica.	59
1.6.3	Ácidos grasos de cadena media.	61
1.6.3.1	Características.	62
1.6.3.2	Actividad biológica.	63
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>65</b>
<b>3.</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>66</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>67</b>
4.1	<i>OBJETIVO GENERAL</i>	67
4.2	<i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	67
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>68</b>
5.1	<i>Reactivos</i>	68
5.2	<i>Equipos</i>	69
5.3	<i>Métodos</i>	71
5.3.1	Obtención de Mono y Diacilglicéridos modificados.	71
5.3.1.1	Saponificación del aceite de pescado y del aceite de triacilglicéridos de cadena media (TCM) para la obtención de ácidos grasos libres.	71
5.3.1.2	Reacciones de glicerólisis enzimática	72
5.3.2	Análisis por cromatografía de gases.	74
5.3.3	Separación de los mono y diacilglicéridos por cromatografía en columna.	76

5.3.3 Desarrollo de nanoemulsiones con Mono y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.	76
5.3.3.1 Formulación de las nanoemulsiones O/W acarreadoras de curcumina.	76
5.3.3.2 Preparación de las nanoemulsiones O/W acarreadoras de curcumina.	78
5.3.4 Caracterización de las nanoemulsiones con Mono y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.	78
5.3.5 Evaluación de la estabilidad de las nanoemulsiones.	79
5.2.4 Estudio de la biodisponibilidad de la curcumina en las nanoemulsiones preparadas con monoacilgliceroles y diacilgliceroles	80
5.2.4.1 Modelo murino	80
5.2.4.2 Determinación de la concentración de curcumina en el plasma.	82
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>84</b>
6.1 <i>Obtención de Mono y Diacilglicéridos modificados.</i>	84
6.1.1 Saponificación del aceite de pescado y del aceite de triacilglicéridos de cadena media (TCM) para la obtención de ácidos grasos libres.	84
6.1.2 Reacciones de modificación enzimática.	87
6.1.2.1 Reacciones de síntesis de MAG y DAG con ácidos grasos $\omega$ -3.	87
6.1.2.2 Reacciones de síntesis de MAG y DAG con ácido linoléico conjugado (CLA)	88
6.1.2.3 Reacciones de síntesis de MAG y DAG con ácidos grasos de cadena media.	91
6.1.3 Separación de los monoacilglicéridos y diacilglicéridos por cromatografía en columna	98
6.2 <i>Desarrollo de nanoemulsiones con Monoacilglicéridos y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.</i>	102
6.2.1 Caracterización de las nanoemulsiones con Monoacilglicéridos y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.	103
6.2.2 Medición de la estabilidad de las nanoemulsiones.	106
6.2.2.1 Medición de tamaño promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta.	106
6.2.2.2 Medición de Índice de estabilidad del Turbiscan, valor equivalente y espesor de capa con el Turbiscan Lab <sup>®</sup> Expert.	111
6.2.3 Reformulación de las nanoemulsiones con Mono y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.	116
6.3 <i>Estudio de la biodisponibilidad de la curcumina en las nanoemulsiones preparadas con monoacilgliceroles y diacilgliceroles.</i>	120
6.3.1 Determinación de los parámetros farmacocinéticos de las NE acarreadoras de curcumina	121
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>128</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>130</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Reacciones enzimáticas para la síntesis de la curcumina. ....	19
FIGURA 1.2. Principales mecanismos de desestabilización de las emulsiones.....	34
FIGURA 1.3. Reacciones de síntesis enzimática para la obtención de lípidos estructurados.....	49
FIGURA 1.4. Estructuras de los Isómeros del ácido linoléico conjugado (CLA).....	58
FIGURA 6.1. Esterificación de ácidos grasos de aceite de pescado.....	88
FIGURA 6.2. Producción de mono y diacilglicerol de CLA.....	89
FIGURA 6.2. Cinéticas de formación de acilglicerol de ácidos grasos de cadena media.....	93
FIGURA 6.3. Producción acilglicerol de AGCM. ....	94
FIGURA 6.4 .Síntesis enzimática de acilglicerol de ácidos grasos de cadena media (AGCM).....	97
FIGURA 6.5. Cromatograma típico de la formación de monoacilglicerol y diacilglicerol de ácidos grasos de cadena media.....	98
FIGURA 6.6. Cromatografía en capa fina con fase móvil de Hexano: acetona 70:30 (v/v) y dos reactivos de visualización. ....	101
FIGURA 6.7. Aspecto visual de las NE transportadoras de curcumina.. ....	106
Figura 6.8. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mono, diacilglicéridos y su mezcla de reacción con $\omega$ -3.....	107
Figura 6.9. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mono, diacilglicéridos y su mezcla de reacción con CLA. ....	109
Figura 6.10. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mezcla de reacción con $\omega$ -3, CLA y AGCM. ....	110
Figura 6.11. Evaluación de Índice de estabilidad del Turbiscan (TSI). ....	113

Figura 6.12. Cinéticas de las NE elaboradas con MAG, DAG y la mezcla de reacción con $\omega$ -3, CLA y AGCM.....	114
Figura 6.13. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mezcla de reacción de $\omega$ -3, CLA. ....	118
Figura 6.15. Perfiles de concentración plasmática-tiempo de curcumina.....	122
Figura 6.16. Comparación de los valores del área bajo la curva).....	126

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1. Clasificación química de los compuestos bioactivos de los alimentos. . .	16
TABLA 1.2. Comparación de las características de los diferentes tipos de emulsiones .....	29
TABLA 1.3. Lista de componentes que pueden utilizarse en la elaboración de nanoemulsiones.....	30
TABLA 1.4. Características de los equipos usados en los métodos de elaboración de nanoemulsiones de alta energía.....	31
TABLA 1.5. Comparación entre métodos enzimáticos y químicos para la síntesis de lípidos estructurados.....	46
Tabla 5.1. Condiciones de reacción de glicerólisis para la preparación de los emulsificantes de $\omega$ -3 y ácido linoléico conjugado (CLA).....	73
Tabla 5.2. Formulación de nanoemulsiones acarreadoras de principios activos (Curcumina y ácido betulínico) . . . . .	77
TABLA 6.1. Perfil de ácidos grasos libres presentes en el saponificado de aceite de pescado. ....	84
TABLA 6.2. Perfil de ácidos grasos libres presentes en el saponificado de triacilglicéridos de cadena media.....	85
TABLA 6.3. Perfil de ácidos grasos de presentes en la mezcla de CLA.....	86
TABLA 6.3. Rendimiento (% molar) de la producción de acilglicerolos con del uso de tres enzimas (Novozym 435, Lipozyme RMIM y Lipozyme TLIM) en la incorporación de ácidos grasos de cadena media al glicerol, a 300 rpm de agitación, 15 % de enzima, a 50 °C a las 15 min de reacción.....	92
Tabla 6.4. Síntesis de monoacilglicéridos (MAG) y diacilglicéridos (DAG) de ácidos grasos de cadena media (AGCM) .....	95
TABLA 6.5. Sistema de solventes para la cromatografía en capa fina para la separación de acilglicerolos.....	99
TABLA 6.6. Caracterización de las nanoemulsiones elaboradas con los diferentes emulsificantes sintetizados con ácidos grasos $\omega$ -3 y ácido linoléico conjugado. .....	103

TABLA 6.7. Composición de NE elaboradas con la mezcla de reacción de MAG y DAG de $\omega$ -3, CLA y AGCM y condiciones de preparación.....	116
Tabla 6.8. Caracterización de NE elaboradas con mezclas de reacción con MAG y DAG de $\omega$ -3, CLA y AGCM.....	117
TABLA 6.9. Caracterización de nanoemulsiones estabilizadas con 9 % de PC comercial con 1 % de Kolliphor®EL. ....	120
Tabla 6.10. Comparación de los tamaños promedio de partícula de las diferentes formulaciones utilizadas para determinar la absorción de curcumina en el modelo murino de ratas Wistar.....	124
TABLA 6.11. Parámetros farmacocinéticos de curcumina en emulsiones y nanoemulsiones.....	125

## INTRODUCCIÓN

El estilo de vida actual de la mayoría de las poblaciones ha puesto de manifiesto la importancia de la relación dieta-salud, ya que en las enfermedades con mayor índice de mortalidad, como la diabetes tipo 2, la obesidad, la hipertensión, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, se ha determinado que de una tercera parte a la mitad de sus causales son por la alimentación inadecuada, ya sea por la presencia, falta o el exceso de ciertos nutrientes. Así, los consumidores hoy en día centran su atención a los productos que consumen, buscando en ellos el cumplimiento de una gama de características inherentes (nutricionales, sensoriales, económicas, culturales) y que además sean benéficos para su salud. Dichos beneficios pueden alcanzarse por el consumo de compuestos bioactivos, que son aquellas sustancias valiosas en el mantenimiento de la salud que se encuentran en los alimentos y que pueden ser extraídos y de los mismos e incorporarlos a otros, obteniendo así un alimento funcional.

En la naturaleza se pueden encontrar un sinnúmero de componentes bioactivos, denominados así por su efecto benéfico en la salud y en la prevención de algunas enfermedades, más allá de sus aspectos nutricionales. Bajo este rubro se encuentran vitaminas, ácidos grasos, carotenoides, terpenos y fitoesteroles, entre otros; todos ellos materia prima para productos nutraceuticos. Sin embargo, muchos de ellos poseen características fisicoquímicas que dificultan su adición de manera directa a los alimentos. La mayoría son hidrofóbicos, de elevado punto de fusión, algunos son sensibles al oxígeno, a altas temperaturas, luz e iones metálicos, lo que limita su aplicación y aprovechamiento en alimentos. Una opción ya conocida es el uso de emulsiones que permiten una mayor disponibilidad de las sustancias lipofílicas; sin embargo, se pueden encontrar deficiencias en su estabilidad y disponibilidad.

Ante esta necesidad de disponer de sistemas capaces de encapsular, proteger y proporcionar componentes funcionales al organismo, la nanotecnología ofrece una alternativa a través de las nanoemulsiones que mejoran la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad de los compuestos bioactivos. Una nanoemulsión se define como una dispersión fina de aceite en agua (O/W) estabilizada con emulsificantes y con un tamaño de gota final de 20 a 200 nm, la cual puede ser producidas con fines específicos, modificando algunas de las variables de su elaboración: componentes, método de preparación y usos.

Los emulsificantes son moléculas anfipáticas compuestas por una parte hidrofílica, conocida como “cola” y una hidrofóbica denominada “cabeza”, lo que les permite tener una actividad interfacial dentro de una emulsión, evitando la separación de las fases. Un emulsificante ideal debe producir una baja tensión interfacial, tener facilidad de adsorberse rápidamente a las gotas, formando una película rígida que impida la coalescencia, su solubilidad debe ser mayor en la fase continua además de ser seguro para su uso en alimentos.

Existen numerosos tipos de moléculas con efecto emulsionante, entre los que se encuentran los monoacilglicéridos (MAG) y diacilglicéridos (DAG). Estas son moléculas anfipáticas no iónicas, que poseen características fisicoquímicas que los convierten en moléculas de interés en su aplicación como emulsificantes tanto en la industria de alimentos, como en la cosmética, farmacéutica y química. Los DAG son efectivos en la prevención de la acumulación de la grasa corporal relacionada con los desórdenes relacionados a la obesidad, además de ser considerados ingredientes funcionales.

Estos lípidos pueden ser modificados química o enzimáticamente, reemplazando los ácidos grasos nativos para variar sus propiedades físicas, químicas y con ello sus funciones nutricionales y farmacéuticas, logrando así satisfacer alguna necesidad relacionada con la prevención o mejoramiento de enfermedades. Dentro de las opciones de modificación de lípidos, para el caso de alimentos, es preferible la vía enzimática, ya que las reacciones son más rápidas, se llevan a cabo en condiciones más suaves de reacción y son más específicas.

Con base a lo anterior, en el presente proyecto se busca modificar enzimáticamente a los MAG y DAG con ácidos grasos de interés funcional ( $\omega$ -3, CLA y ácidos grasos de cadena media) para mantener su efecto como emulsificantes y que además aporten un beneficio a la salud, al utilizar las nanoemulsiones como sistema acarreador de curcumina se pretende mejorar su biodisponibilidad y que pueda ser aprovechado todas sus características benéficas a la salud del consumidor.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 Compuestos bioactivos.

La principal función de los alimentos es la de aportar nutrientes y energía, sin embargo, debido a su composición, no es la única que ejerce, pues muchos de ellos cuentan con sustancias que más allá de su función nutritiva ofrecen componentes que han demostrado tener un impacto significativamente benéfico para la salud. Dichos compuestos se denominan sustancias o compuestos bioactivos. Una definición más formal indica que los compuestos bioactivos son componentes no esenciales (por ejemplo vitaminas o polifenoles) que ocurren en la naturaleza, como parte de la cadena alimenticia que influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos con efectos benéficos para la salud (Biesalski *et al.*, 2009, Nahler, 2013; Carbajal, 2013)

Los compuestos bioactivos se conocen también como nutraceuticos, un término acuñado en 1979 por Stephan DeFelice, que refleja su existencia en la dieta humana y su actividad biológica indicando que “son sustancias bioactivas presentes como constituyentes naturales en alimentos, proveen beneficios en la salud más allá de valor nutricional básico del producto, sin ser esenciales para el crecimiento o desarrollo”. Así puede decirse que en los alimentos pueden encontrarse una fracción nutritiva formada por aproximadamente 50 componentes (macronutrientes, minerales y vitaminas) y una fracción denominada no nutritiva, que a su vez está constituida de componentes no naturales (aditivos y contaminantes) y componentes naturales bioactivos de origen animal y vegetal.

Una alimentación saludable, se caracteriza en proporcionar, en cantidad y calidad, suficientes nutrientes, antioxidantes y otras sustancias bioactivas para mantener en óptimas condiciones las funciones del cuerpo y contribuir a un óptimo estado de salud. Se estima que una dieta mixta puede contener entre 60.000 y 100.000 componentes bioactivos distintos, potencialmente efectivos para reducir el

riesgo de enfermedades crónicas (Leitzmann, 2002). Estos miles de componentes se caracterizan por su ubicuidad en el reino vegetal y generalmente se encuentran agrupados en los alimentos y sólo en raras ocasiones un determinado bioactivo se localiza específicamente en un pequeño grupo o familia vegetal, como es el caso de los glucosinolatos de las crucíferas.

Los compuestos bioactivos son derivados de azúcares, lípidos y aminoácidos y muchos de ellos han sido aislados y caracterizados químicamente. Cuando su origen es vegetal se les conoce como fitoquímicos y generalmente intervienen en el metabolismo secundario de las plantas, cumpliendo funciones de colorantes, sustancias aromáticas, sustancias reguladoras del crecimiento, protectores contra parásitos, entre otros. Los alimentos de origen animal son otra fuente de compuestos con actividad biológica comprobada, como ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 de pescado, ácido linoléico conjugado (CLA) de la carne de rumiantes, péptidos de lácteos y luteína de la yema de huevo entre otros. Las bacterias y los hongos son también fuentes conocidas de este tipo de compuestos (Carbajal, 2013).

### **1.1.1 Características.**

Se dice que un compuesto o una sustancia tendrán actividad biológica, cuando presente un efecto directo en el organismo. Este efecto puede ser positivo o negativo dependiendo de la sustancia, la dosis y la biodisponibilidad.

La biodisponibilidad es un paso clave para asegurar la bioeficacia de los compuestos bioactivos en alimentos o en fármacos orales. La biodisponibilidad involucra varias etapas diferentes: liberación, absorción distribución, metabolismo y excreción (LADME por sus siglas en inglés). Los alimentos con compuestos bioactivos, derivados de plantas o animales, necesitan ser biodisponibles para ejercer sus efectos benéficos. Existen varios factores que intervienen en la inactividad tales como la bioaccesibilidad, el efecto de la matriz alimentaria, sustancias transportadoras, estructuras moleculares y enzimas metabolizantes. Diversas tecnologías han sido desarrolladas para mejorar la inactividad incluyendo

las modificaciones estructurales, nanotecnología y sistemas coloidales. Debido a la naturaleza compleja de los alimentos con compuestos bioactivos y a los diferentes mecanismos de absorción los compuestos bioactivos hidrofílicos y lipofílicos, es un reto desenmarañar la biodisponibilidad de dichos compuestos (Rein *et al.*, 2012).

La biodisponibilidad de los compuestos bioactivos presenta una gran variación debido a su naturaleza y función principalmente. Por ejemplo los antioxidantes al ser susceptibles a la oxidación, su estabilidad durante el almacenamiento, procesado o digestión del alimento, está en riesgo. Muchos de los fitoquímicos presentes en el alimento se encuentran en forma de precursores y requieren una hidrólisis previa para su absorción; dependiendo su biodisponibilidad de los sistemas enzimáticos. Otro ejemplo son los flavonoides que mientras algunos de ellos presentan una baja biodisponibilidad, otros pueden ser metabolizados por la flora intestinal del colon formando ácidos fenólicos simples activos. Los bioactivos liposolubles debido a su naturaleza presentan una baja disponibilidad, tal es el caso de los carotenoides, donde dependiendo del procesamiento podría, o no, aumentar la cantidad absorbible. Así, la biodisponibilidad de muchos compuestos bioactivos está sujeta a factores como la temperatura, de la manipulación del alimento, la presencia y actividad de enzimas (a su vez dependiente de luz, temperatura, pH, entre otros) y flora bacteriana para su mejor aprovechamiento (Carbajal, 2013).

Otra característica, resultado de los estudios realizados (*in vitro* o *in vivo*), indica que el consumo de los compuestos bioactivos de forma pura, modifica su biodisponibilidad que cuando se consumen dentro de su matriz original, por lo que debe tomarse en cuenta que en un mismo alimento varios compuestos bioactivos pueden interactuar o ejercer un efecto sinérgico (Gil, 2010). Esto pone de manifiesto la importancia del concepto de “Food synergy” que se define como el proceso por el que componentes de los alimentos, nutrientes y no nutrientes, identificados o no, trabajan conjuntamente (Carbajal, 2013).

### 1.1.2 Clasificación.

Debido a la gran diversidad de compuestos bioactivos se conocen diferentes criterios para su clasificación. En la Tabla 1 se muestra la clasificación química de los compuestos bioactivos y sus efectos biológicos.

TABLA 1.1. Clasificación química de los compuestos bioactivos de los alimentos.

<b>Grupos/subgrupos</b>	<b>Efectos biológicos</b>
<p><b>GLICÓSIDOS Y OLIGOSACÁRIDOS</b></p> <p><i>Glicósidos cardíacos</i> (esteroidales)  <i>Glicósidos cianogénicos</i> (aminoácidos)  <i>Glucosinolatos</i> (aminoácidos con azufre)  <i>Saponinas</i> (triterpenoides pentacíclicos o esteroides tetracíclicos)  <i>Glicósidos de antraquinona</i></p> <p><i>Oligosacáridos</i></p>	<p>Inhibición de las bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa  Utilización del yodo  En el citocromo P450  Inmunomoduladores y antineoplásicos</p> <p>Inducción de la peristalsis y de la secreción de agua y electrolitos en el colon.</p> <p>Prebiótico, inmunomodulador</p>
<p><b>TERPENOIDES</b></p> <p><i>Terpenoides de bajo peso molecular</i>  (Mono- y sesqui terpenoides)</p> <p><i>Diterpenoides</i> (4 isoprenos, C20)</p> <p><i>Resinas</i> (mezclas de terpenoides)</p>	<p>Antibacteriales, antivirales, anticancerígenos,</p> <p>Estimulación gástrica</p> <p>Antineoplásicos Antimicrobianos, cicatrización</p>
<p><b>FENILPROPANOIDES</b></p> <p><i>Ácidos hidroxicinámicos y derivados</i></p> <p><i>Aldehídos cinámicos y monolignoles</i></p> <p><i>Cumarinas</i></p> <p><i>Flavonoides y proantocianidinas</i></p>	<p>Antioxidantes, antivirales, fungicidas, anticancerígenos, inmunomoduladores, antiinflamatorios, dermatológicos, sistema cardio- y cerebro-vascular</p> <p>Antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, analgésicos suaves</p> <p>Dermatológicos, antidepresivos, inhibidores del apetito</p>

(oligómeros de flavonoides) <i>Taninos</i> (polímeros de flavonoides) <i>Lignanós</i>	Antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, estrogénicos Astringentes  Estrogénicos, antineoplásicos, catárticos
<b>ESTEROIDES</b>	Hipocolesterolémicos, anticancerígenos, antioxidantes, hipoglicemiantes, estimulación hormonal
<b>ALCALOIDES</b>  <i>Alcaloides tropano</i> <i>Alcaloides isoquinolina</i>  <i>Alcaloides metilxantina</i>  <i>Pseudoalcaloides</i>	Anticolinérgicos, analgésicos Analgésicos, anticancerígenos, antibacteriales, inmunoestimulantes Efectos neurológicos y en los receptores de adenosina Efectos en el sistema nervioso central y en el transporte de iones
<b>PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS</b>	Antihipertensivos, sedantes, antimicrobianos, inmunomoduladores, antitrombóticos, antioxidantes, hipocolesterolémicos
<b>GRASAS Y ÁCIDOS GRASOS</b>	Antiinflamatorios, neuroprotectores

Fuente: Bernhoft, 2010; Hartmann y Meisel, 2007

Muchos de los compuestos bioactivos que tienen potencial para combatir enfermedades crónicas como la inflamación, enfermedades del corazón, diabetes y cáncer, presentan una baja disponibilidad en el organismo debido a su naturaleza lipofílica, por lo que su utilización en la industria alimentaria se encuentra limitada. Dichas sustancias lipofílicas se han clasificado en 4 grupos: ácidos grasos ( $\omega$ -3), carotenoides ( $\beta$ -caroteno), antioxidantes (tocoferol) y fitoesteroles (stigmasterol) (Silva, *et al.*, 2012).

## 1.2 Curcumina.

La curcumina, cúrcuma o turmeric es el nombre con el cual se denomina al componente principal de la raíz de la planta de *Cúrcuma longa*, una planta de la familia *Zingiberaceae* originaria del sudeste asiático, donde se ha utilizado desde hace mucho tiempo como una especie aromática en su gastronomía, ya que aporta un toque de color y sabor picante a los alimentos (Akram *et al.*, 2010).

La curcumina (diferuloilmetano o curcumina I) ocupa el 77 % del contenido de curcuminoides de la planta, y se encuentra junto con otros dos componentes, la demetoxicurcumina (curcumina II) con un 17 % y la bis-demetoxicurcumina (curcumina III) que ocupa el 3 % y la recientemente descubierta la ciclocurcumina. (Taylor y Leonard, 2011).

### **1.2.1 Características.**

La curcumina fue aislada por primera vez de los rizomas de *C. longa* en 1815, aunque se ha aislado también de otras especies del mismo género (*C. mangga*, *C. zedoaria*, *C. xanthorrhiza*, *C. aromática* y *C. phaeocaulis*) y de otros géneros (*Costus speciosus*, *Etingera elatior* y *Zingiber cassumunar*). Su estructura química fue dilucidada en 1910 como un diferuloilmetano y su nombre, según la IUPAC es 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona. La curcumina se encuentra disponible comúnmente en el mercado en una mezcla de curcumina 77%, demetoxicurcumina 18 % y bisdemetoxicurcumina 5 % (Jagetia y Aggarwal, 2007).

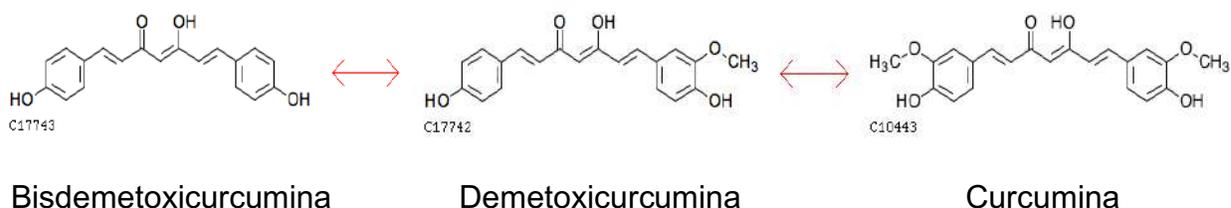
#### **1.2.1.1 Composición.**

Para analizar sus actividades biológicas y composición del rizoma de la *Cúrcuma longa* se han realizado diversos extractos etanólicos, metanólicos y con distintos solventes encontrando que entre los componentes del extracto se cuenta

con un 4.7- 8.2 % de carbohidratos, 2.44 % de aceites esenciales, 1.7 a 3.3 % de ácidos grasos y un 2 % de curcuminoides (Srinivas *et al.*, 1992).

Los curcuminoides forman parte de los compuestos fenólicos, concretamente de los polifenoles, son derivados diarilmetálicos responsables del color amarillo-anaranjado de la cúrcuma. La curcumina, de composición química  $C_{21}H_{20}O_6$  es un estilbenoide, un diarilheptanoide derivado de la ruta Shikimato/Acetato-malonato, donde su precursor es la demetoxicurcumina que a su vez proviene de la acción de una hidrolasa sobre la bisdemetoxicurcumina (Figura 1) (Saiz De Cos y Pérez-Urria Carril, 2014).

FIGURA 1.1. Reacciones enzimáticas para la síntesis de la curcumina. (GenomeNet,



2015)

### 1.2.1.2 Propiedades físicas y químicas.

La curcumina físicamente es un polvo cristalino amarillo naranja de naturaleza hidrofóbica, por lo que es soluble en acetona, etanol, dimetilsulfóxido y aceites. Es prácticamente insoluble en agua a pH neutro o ácido; a pH básico su solubilidad se incrementa pero en estas condiciones se hidroliza rápidamente, cambiando su coloración de amarillo a rojo que presenta una absorción máxima a 425 nm. Se ha determinado una solubilidad máxima para curcumina de 11 ng/mL en solución acuosa a pH de 5 y a pH de 1.2 a 6.8 con agitación su disolución es menor al 2 % (Tonnesen *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2009).

Debido a la capacidad degradativa de la curcumina se ha evaluado la adición de sustancias que la disminuyan, tal es el caso de la adición del 10% de solvente orgánico en solución acuosa donde la vida media para la degradación hidrolítica de la curcumina es de  $4.2 \times 10^3$ , 15 y  $3.5 \times 10^{-2}$  horas a pH de 6, 7 y 8, respectivamente. Una mayor estabilidad (50 y 500 veces) se observó en solución acuosa a pH 7, en presencia de ciclodextrinas; mientras que incrementó cerca de 1800 veces por la adición del surfactante no-iónico tritón X-100 a la solución acuosa (Suresh *et al.*, 2009). Al mezclar la curcumina (30.2 %) con aceites esenciales volátiles (19.7 %) principalmente de tumerón y zingiberino, mostró una vida media de 16.38 semanas cuando se almacenó a temperatura ambiente (Kshirsagar *et al.*, 2009).

La curcumina también es fotosensible debido a la inestabilidad de su enlace dicetónico, el cual puede sufrir hidrólisis y fotólisis. La degradación puede ser debida a tres fenómenos: 1) Ruptura del doble enlace conjugado, 2) Polimerización, y/o 3) Degradación a compuestos de menor peso molecular. Los principales productos de esta degradación son el ácido ferúlico, la vainillina y el ácido vainillínico (Suresh *et al.*, 2009).

### **1.2.1.3 Biodisponibilidad.**

Debido a su baja solubilidad en agua, la curcumina es pobremente absorbida en el tracto gastrointestinal, de manera que su biodisponibilidad, después de su administración por vía oral es muy baja. Yang y colaboradores (2007) reportaron por ejemplo, una biodisponibilidad del 1 % del compuesto bioactivo después de su administración oral en ratas Wistar. Cuando la curcumina se encuentra a pH básico (3-10) se degrada hasta ácido ferúlico y ferulometano (Tønnesen y Karlsen, 1985; Wang, 1997). Las investigaciones indican que se debe a un mecanismo de oxidación, ya que al adicionarle ácido ascórbico, N-acetilesteina o glutatión se previene su degradación a pH de 7.4 (Oetari *et al.*, 1996). La curcumina se considera estable al pH del tracto gastrointestinal, ya que el estómago tiene pH 1-2 y el

intestino delgado un pH de 6.5, y a estos valores de pH (1 y 7) su degradación es extremadamente lenta (Tønnesen y Karlsen, 1985).

Gracias a su elevada lipofilia se absorbe rápidamente por difusión pasiva. Diversos estudios demuestran que aproximadamente el 35 % tanto de las dosis orales como de la administración intraperitoneal de curcumina (2.5 a 1000 mg/Kg) a ratas, se elimina en las heces en 48 h (Holder *et al.*, 1978; Ravindranath y Chandrasekhara, 1982). Aunque para el caso de la orina se excreta el  $6.3 \pm 2.5$  % cuando ha sido administrada por vía oral, mientras que la vía intraperitoneal permite una mayor excreción ( $11.2 \pm 0.7$  %) ambas a las 72 h (Holder *et al.*, 1978).

La curcumina dentro del organismo se biotransforma a dihidrocurcumina y tetrahydrocurcumina que se convierten posteriormente a conjugados monoglucurónicos, siendo los principales metabolitos de la curcumina *in vivo* glucurónidos de curcumina, dihidrocurcumina y tetrahydrocurcumina. (Pan *et al.*, 1999). Se han identificado los metabolitos biliares de la curcumina después de recolectarlos de la bilis de ratas que recibieron 50 mg/Kg de curcumina intravenosa (Holder *et al.*, 1978); entre el 50-60 % de la dosis administrada fue excretada por la bilis en 5 h. Los principales metabolitos biliares fueron glucurónidos de la tetrahydrocurcumina y de la hexahydrocurcumina (52 y 42 % de los metabolitos biliares respectivamente); un componente minoritario fue el ácido dihidroferúlico, lo que significa que la mayor fracción de la curcumina se reduce de forma endógena, y después es glucuronizado por la UDP-glucuronil transferasa.

### **1.2.2 Actividad biológica.**

El rizoma de la cúrcuma fue adoptado como producto medicinal por el Comité de Productos Medicinales Herbales (Committee on Herbal Medicinal Products-HMPC) el 12 de noviembre de 2009. Esta planta ha sido usada en multitud de sistemas de medicina tradicional (China, Hindú y Ayurvédica) para aliviar problemas digestivos, como un antiinflamatorio y en uso tópico por su capacidad de cicatrización (Blumenthal *et al.*, 2000; Taylor y Leonard, 2011).

### **1.2.2.1 Actividad antimicrobiana.**

Se ha demostrado la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-positivas (Lutomski *et al.*, 1974), sobre *Salmonella*, pero no para *E. coli* (Tønnesen *et al.*, 1987); actividad anti fúngica (Banerjee y Nigam, 1978; Apisariyakal *et al.*, 1995) y como antiparasitario (Kiu-Chi *et al.*, 1993). Inhibe la replicación final de la expresión genética del virus HIV-1, sin causar un efecto significativo en las células (Li *et al.*, 1993; Mazumdar *et al.*, 1995).

### **1.2.2.2 Actividad sobre tejidos específicos.**

**Piel:** útil para cada una de las diferentes etapas de la cicatrización de las heridas como la inflamación, granulación y remodelación de tejidos (Chang y But, 1987). Inhibe el metabolismo del ácido araquidónico beneficiando los síntomas de la psoriasis (Bosman, 1994). En ratas diabéticas se ha descrito un efecto reparador tópico (Sidhu *et al.*, 1999). Es efectiva en la prevención y curación del cáncer de piel, inhibiendo el efecto de la oxidación del DNA de la epidermis y modulando la expresión genética de protooncogenes inducidos por diversos agentes carcinogénicos (Huang *et al.*, 1991 y 1997b; Azuine y Bhide, 1992; Kakar y Roy, 1994; Bonte *et al.*, 1997; Limtrakul *et al.*, 1997; Parshad *et al.*, 1998). Se ha demostrado la potencial fototoxicidad de la curcumina, útil para el tratamiento de psoriasis, infecciones bacterianas, cáncer e infecciones virales, aunque también indica un posible poder mutagénico, que todavía no ha sido demostrado (Vijayalaxmi, 1980).

**Tracto gastrointestinal:** Posee beneficios físicos y funcionales: disminuye la secreción gástrica después de 3 h de la administración de extractos acuosos (secreción de ácidos) y metanólicos (liberación de pepsina) (Sakai *et al.*, 1989). Inhibe la producción de IL-8 inducida por *Helicobacter pylori* evitando con esto la gastritis, úlcera y adenocarcinoma gástrico (Munzenmaier *et al.*, 1997). Inhibe la proliferación de las células de cáncer de colon y tumores de estómago (Huang *et al.*,

1997b; Deshpande *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999); a través del aumento de la apoptosis de las células tumorales (Kawamori *et al.*, 1999).

**Hígado:** la curcumina tiene actividad hepatoprotectora, aumenta el flujo de bilis (Hussain y Chandraseskhara, 1994), induce la contracción de la vesícula biliar (Rasyd y Lelo, 1999) y previene la formación de piedras de colesterol en la bilis de ratones (Hussain y Chandrasekhara, 1992). Protege de la toxicidad de la ciclofosfamida, tetraclorometano y otras sustancias tóxicas (Soudamini y Kuttan, 1991; Nishigaki *et al.*, 1992). Mezclada con la dieta, 200 mg/Kg/d protegen del daño que produce la aflatoxina B1 (Son *et al.*, 1992). Disminuye la hepatotoxicidad y metahemoglobinemia por el paracetamol en bajas concentraciones de curcumina (1.87 mg/kg/d), mientras que dosis altas (60 mg/kg/d) potencian la toxicidad (Donatus, 1990).

**Sistema respiratorio:** En 1990 Jain y colaboradores encontraron efectos alentadores sobre el sistema respiratorio en pacientes con bronquitis asmática y sobre la citotoxicidad inducida por la ciclofosfamida (Venkatesan y Chandrakasan, 1995), la bleomicina (Venkatesan *et al.*, 1997) y el paraquat (Venkatesan, 2000) en pulmón de rata. También, se ha observado que la curcumina es un potente agente antiproliferativo en el cáncer de pulmón (Mehta *et al.*, 1997; Verma *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1999).

#### **1.2.2.2 Actividad antiinflamatoria.**

La curcumina y sus derivados han demostrado un efecto positivo en modelos de inflamación aguda, subaguda y crónica en ratones y ratas, aunque no tiene fuertes efectos analgésicos ni antipiréticos, tampoco produce una significativa irritación gástrica, ni tiene efectos en el sistema nervioso central (Srimal y Dharvan, 1973, 1985). Se ha observado una respuesta satisfactoria de la curcumina en pacientes con artritis reumatoide y con osteoartritis (Deodhar *et al.*, 1980).

González-Ortega, 2017 evaluó la actividad inflamatoria de curcumina transportada en dos vehículos (organogel y nanogel) sobre el proceso inflamatorio de un modelo murino con edema auricular, demostrando a través de un análisis histopatológico, que en su presentación de nanogel, presentó un mayor efecto antiinflamatorio (61.8 %) respecto al organogel (45.9%).

### **1.2.2.3 Actividad inmunomoduladora.**

La cúrcuma ha demostrado tener actividad inmunomoduladora por la presencia de polisacáridos y lipopolisacáridos de los extractos del rizoma (Gonda *et al.*, 1992a, 1992b; Inagawa *et al.*, 1992). De acuerdo a South *et al.* (1997) 40 mg/Kg de curcumina en la dieta de las ratas, durante 5 semanas, aumenta las inmunoglobulinas (IgG) aunque no afecta al tipo ni a la actividad de las células natural killer. Antony *et al.*, (1999) observaron un incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos en animales tratados con curcumina.

### **1.2.2.4 Actividad hipolipidémica.**

La ingesta de 0.5 % de curcumina en ratas con diabetes mostró una mejora significativa del estado metabólico y una reducción del colesterol sanguíneo (Lipoproteína de baja densidad, LDL), de los triacilglicéridos y de los fosfolípidos (Babu y Srinivasan, 1995). Ha demostrado actividad hipocolesterolémica, hipolipidémica, e hipotriglicerimiente acompañada de una disminución en la peroxidación lipídica plasmática. (Piyachaturawat *et al.*, 1997, 1999; Hussain y Chandrasekhara, 1992; Deshpande *et al.*, 1997).

### **1.2.2.6 Actividad antioxidante.**

Diversos estudios demuestran la capacidad de la cúrcuma para prevenir la peroxidación lipídica, proceso clave en el inicio y desarrollo de múltiples enfermedades y sus complicaciones, tal es el caso de la aterosclerosis, daño

hepático, daño renal, toxicidad de algunos compuestos, enfermedades oculares y diabetes (Mesa *et al.*, 2000).

El mecanismo antioxidante más conocido de la cúrcuma y de sus componentes activos es la capacidad de éstos para retirar especies reactivas de oxígeno, principales responsables de la peroxidación de los lípidos celulares (Zhao *et al.*, 1989; Priyadarsini, 1997). Estas sustancias son capaces de eliminar principalmente el radical hidroxilo (Reddy y Lockesh, 1994b; Parshad *et al.*, 1998), el radical superóxido (Unnikrishnan y Rao, 1992; Sreejayan y Rao, 1996), el oxígeno singlete (Rao *et al.*, 1995), el dióxido de nitrógeno (Unnikrishnan y Rao, 1995) y el óxido nítrico (Sreejayan y Rao, 1997a). Además, se ha comprobado que la curcumina inhibe la generación del radical superóxido (Srivastava, 1989; Rubi *et al.*, 1995; Bonte *et al.*, 1997). Sreejayan y Rao (1997b) indicaron que la presencia de los grupos fenólicos en la estructura de la curcumina son fundamentales para explicar su capacidad de retirar radicales libres del medio, y que además los grupos metóxilo aumentan esta actividad.

#### **1.2.2.7 Actividad anticarcinogénica.**

Se ha comprobado el efecto preventivo y curativo de la cúrcuma, la curcumina y sus extractos acuosos frente al cáncer y la formación de tumores. Inhibe la carcinogénesis en las tres etapas: promoción del tumor, angiogénesis y crecimiento del tumor (Akram *et al.*, 2010). Los agentes estudiados han sido administrados oralmente, por inyección o probados en sistemas *in vitro*, y su actividad ha sido demostrada usando varios modelos y midiendo algunos marcadores enzimáticos (Mesa *et al.*, 2000).

Gersey *et al.*, en el 2017 estudió el efecto de la curcumina en las células madre del glioblastoma a través de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la regulación negativa de la actividad del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT 3); el cual está involucrado en la desregulación

del crecimiento de células, angiogénesis, metástasis y resistencia a la apoptosis (Shanmugam *et al.*, 2015).

Menon *et al.* (1995) demostraron que la administración oral de curcumina (200 nmol/Kg) inhibe las metástasis intestinales y aumenta la vida de los ratones con tumores inducidos por células de melanoma B15F10. Posteriormente, Thresiamma *et al.* (1998) han comprobado que la curcumina protege contra el daño cromosómico producido por las radiaciones en células de médula espinal. Se ha observado que la curcumina, en presencia de luz, tiene actividad frente a las células basófilas de leucemia (Dalh *et al.*, 1994). Asimismo, Oda (1995) demostró el efecto inhibitorio de la curcumina en la mutagénesis inducida por radiaciones UV.

Agame-Lagunes en 2017 evaluó el efecto de la administración de nanoemulsiones de curcumina (*Curcuma longa*) estabilizadas con fosfatidilcolina modificada con ácidos grasos de cadena media, sobre el proceso de carcinogénesis en ratones transgénicos K14E6, provocando una disminución del gen Cdk4 en el grupo tratado con curcumina en nanoemulsión, además fue comprobado el efecto de disminución del carcinoma epidermoide queratinizado a través de estudios histopatológicos.

### **1.3 Nanoemulsiones.**

Dado que la naturaleza de algunos compuestos bioactivos de gran importancia, como la curcumina, se ha hecho necesario el desarrollo de sistemas acarreadores que sean capaz de encapsularlos, protegerlos y liberarlos dentro del tracto gastrointestinal con tal de que aseguren su aprovechamiento (Mc Clements y Xiao, 2012). Investigación en la industria farmacéutica ha mostrado que la inactividad de drogas pobremente solubles en agua puede ser evitada por la incorporación de varios sistemas de entrega basados en emulsiones (Porter *et al.*, 2007; Patel y Velikov, 2011). En años recientes algunos grupos de investigadores han fabricado exitosamente una variedad de entidades nanométricas (nanopartículas,

nanocápsulas, microemulsiones y nanoemulsiones), empleando diferentes técnicas y materiales (Ezhilarasi *et al.*, 2013).

La aplicación de la nanotecnología en el campo alimentario permite la modificación de muchas características de los alimentos, como textura, sabor, otros atributos sensoriales, intensidad del color, facilidad de procesamiento y estabilidad durante el almacenamiento, permitiendo obtener un gran número de nuevos productos. La nanotecnología también puede mejorar la solubilidad de agua, estabilidad térmica y la biodisponibilidad oral de los componentes funcionales (McClements *et al.*, 2007).

Las nanoemulsiones pueden encapsular un diverso grupo de componentes lipofílicos, incluyendo lípidos bioactivos, sabores, antimicrobianos, antioxidantes y drogas, permitiendo incrementar su biodisponibilidad, conveniencia y palatabilidad (McClements, 2007).

### **1.3.1 Definición.**

La mezcla de dos fases líquidas inmiscibles entre sí, donde una de las fases se encuentra dispersa en forma de gotas sobre la fase dispersante recibe el nombre de emulsión. Las nanoemulsiones consisten de gotas de aceite en un intervalo de tamaño nanométrico, entre 10 y 100 nm dispersadas con una fase continua, donde cada gota de aceite está rodeada por moléculas surfactantes (Acosta, 2009). Debido a la falta de una definición consensuada acerca del tamaño de la gota para ser considerada nanoemulsión, diversos autores estipulan límites que van de 10, 200, 500 o hasta 1000 nm.

### **1.3.2 Ventajas.**

Las nanoemulsiones tienen un número de posibles ventajas sobre emulsiones convencionales para encapsular, proteger y entregar componentes lipofílicos funcionales, entre las que se incluyen alta claridad óptica, alta estabilidad a la

agregación de partículas y separación gravitacional y el incremento en la biodisponibilidad de sustancias lipofílicas (McClements y Xiao, 2012).

La biodisponibilidad de los compuestos bioactivos es incrementada debido a la demostrada capacidad de las nanoemulsiones de aumentar la liberación y tiempo de residencia de los compuestos biológicamente activos en el tracto gastrointestinal, aumentan la absorción a través de las células intestinales y atraviesan los vasos capilares más pequeños, permanecen en el torrente sanguíneo por tiempo prolongado y penetran células y tejidos para llegar a los distintos órganos, reducen los efectos tóxicos y secundarios y mejoran la estabilidad de los compuestos bioactivos (Theaj-Prakash y Thiagarajan, 2011; Chen *et al.*, 2006 a,b; Pinto-Reis *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2006; Nicolaos *et al.*, 2003).

En cuanto a la estabilidad de los compuestos, las nanoemulsiones protegen contra factores ambientales deteriorativos debido a la membrana interfacial que los aísla de éstos (Weiss *et al.*, 2006); y al aumentar el área superficial por unidad de masa, se permite un mayor transporte, exposición y penetración del compuesto activo, facilitando la actividad biológica (Sozer y Kokini, 2009).

El beneficio de la liberación también se puede utilizar en vías de aplicación tópicas, a diferencia de vesículas y liposomas que son menos estables y con precios de producción más elevados, esto aunado a su transparencia, fluidez y baja densidad permite su utilización en la industria farmacéutica y cosmética (Tadros y Kessel, 2004).

A pesar de todas estas ventajas, también se han detectado un par de riesgos por la ingestión oral de nanoemulsiones. El primero es los cambios en el destino biológico de los componentes bioactivos en el tracto gastrointestinal, por esto se sugiere realizar más investigaciones en sistemas *in vivo* para evaluar dicho comportamiento. El segundo se refiere a la toxicidad de sustancias usadas en su fabricación, por lo que los investigadores buscan opciones que no causen estos efectos adversos (McClements, 2011).

### 1.3.3. Clasificación.

Existen diversos criterios para la clasificación de las emulsiones en general y que han sido adoptadas para el caso de nanoemulsiones, uno de ellos toma en cuenta la organización espacial relativa de las fases oleosa y acuosa, así, se tienen emulsiones agua en aceite, conocidas como W/O por sus siglas en inglés, y las de aceite en agua O/W. Estas últimas presentan un mayor potencial a aplicaciones comerciales y son frecuentemente usadas como vehículos de compuestos de la industria farmacéutica, petroquímica, productos relacionados con la salud, cosméticos, agroquímicos y alimentos. Existe otro tipo de emulsiones, denominadas múltiples en las cuales la fase acuosa está dispersa en una oleosa y esta a su vez en otra acuosa (W/O/W) y viceversa O/W/O; sin embargo se utilizan poco debido a que para su preparación se involucran más pasos y que son más susceptibles a desestabilizarse durante su procesamiento y almacenamiento.

Otro criterio de clasificación está relacionado al tamaño de la gota formada. En la TABLA 2, se observan las características de estos tipos de emulsiones.

TABLA 1.2. Comparación de las características de los diferentes tipos de emulsiones

<b>Características</b>	Macroemulsión	Nanoemulsión	Microemulsión
Tamaño de partícula	1 a 100 $\mu\text{m}$ de radio	20-500 nm*	2-100 nm
Estabilidad	Inestable	Inestables a mayor plazo	Estable **
Apariencia	Turbias a opacas	Transparentes o de baja turbidez	Micela "abultada"
Físicas	IR entre valores de ambas fases Susceptible a la fuerza de gravedad	Más estables a separación y agregación gravitacional.	Formación espontánea

\* Algunos autores reportan hasta 1000nm.

\*\* A condiciones ambientales particulares (composición y temperatura)

Fuente: McClements, 2011

### 1.3.4 Composición.

Las nanoemulsiones O/W están formadas por un fase lipídica dispersa en una fase continua acuosa, con cada gota rodeada por una delgada capa interfacial de moléculas de emulsificantes (McClements, 2007). Ejemplos de componentes se pueden observar en la Tabla 3.

TABLA 1.3. Lista de componentes que pueden utilizarse en la elaboración de nanoemulsiones.

Fase oleosa	Fase acuosa	Estabilizadores
<b>Componentes no polares:</b> Triacilglicéridos, Diacilglicéridos, Monoacilglicéridos, Ácidos grasos libres, aceites esenciales, ceras, saborizantes, ácidos minerales, sustitutos de grasa, vitaminas liposolubles, nutraceúticos lipofílicos, antioxidantes.	<b>Componentes polares:</b> Agua con cosolventes como alcoholes y polioles.  Carbohidratos, proteínas minerales, ácidos y bases.  Edulcorantes y sales	Emulsificadores (surfactantes), co-emulsificadores, cosolventes, modificadores de textura, agentes de peso, retardadores de maduración.

Fuente: McClements, 2011; Tan, 2004

La presencia de emulsificantes les permite tener una baja tensión interfacial y poseer estabilidad contra sedimentación inversa, sedimentación, floculación y coalescencia (Myers, 1999). Por su tamaño de glóbulo pequeño, las nanoemulsiones poseen un fuerte movimiento browniano que evita la sedimentación o la sedimentación inversa originado por las fuerzas de gravedad, proporcionando así una alta estabilidad (Mason *et al.*, 2006). Aunque la presión de Laplace es muy grande en las nanoemulsiones, los glóbulos pueden permanecer estables contra la maduración de Ostwald, solo si el compuesto presente tiene poca solubilidad en la

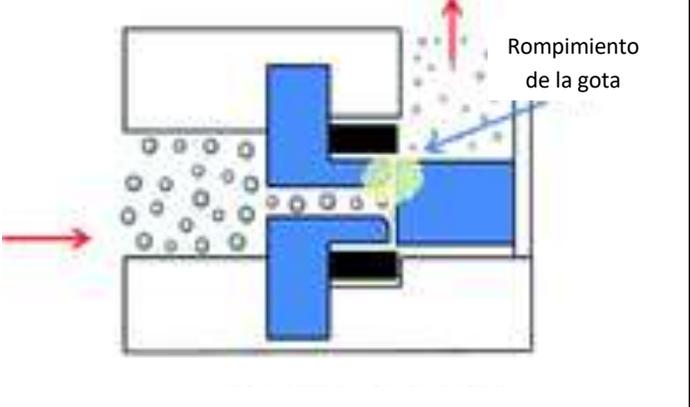
fase continua (Tadros *et al.*, 2004).

### 1.3.4 Preparación.

Las técnicas de preparación y el material de fabricación gobiernan las características finales, calidad y la aplicación de las nanoemulsiones preparadas (Abbas, 2015).

Los métodos para preparar nanoemulsiones se pueden dividir en dos grandes grupos, alta energía y baja energía. Los de alta energía requieren de equipos mecánicos (homogeneizadores) que proporcionan fuerzas que separan y entremezclan las fases, produciendo pequeñas gotas de aceite. Los de baja energía dependen de la formación espontánea de pequeñas gotas de aceite en sistemas O/W con emulsificantes, donde la solución o las condiciones ambientales fueron alteradas. En la TABLA 4 se observan las características de los equipos utilizados en los métodos de alta energía.

TABLA 1.4. Características de los equipos usados en los métodos de elaboración de nanoemulsiones de alta energía.

<p><b>Homogeneizador de válvula de alta presión</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Más común en alimentos</li> <li>* Más efectivo después de preemulsificación</li> <li>* Aplica cizallamiento y alta presión.</li> <li>* Partes: bomba, cámara, válvula.</li> <li>* Requiere de suficiente emulsificante para recubrir cada gota formada</li> <li>* A mayor número de pases y presión el tamaño de la gota es menor.</li> </ul>	 <p>Rompimiento de la gota</p>
--	--

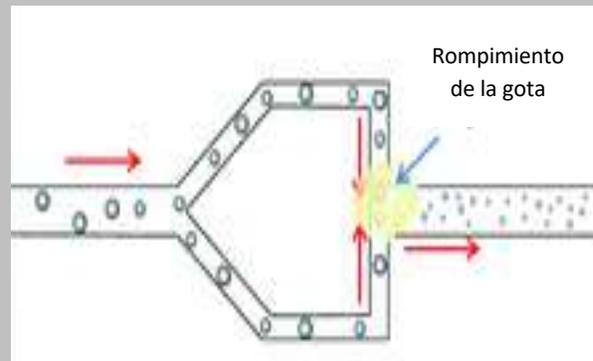
Continúa TABLA 1.4.

### Microfluidizador

\*Usados en farmacia, alimentos, bebidas

\*Usa altas presiones para empujar la muestra por orificio angostos.

\*Menor tamaño de gota a mayor presión de homogeneización, número de pases, concentración de emulsificante y relación de viscosidad de las fases.

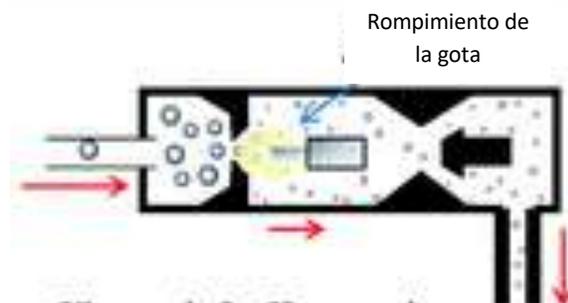


### Homogeneizadores ultrasónicos

\*Generan ondas ultrasónicas de elevada intensidad que rompen las fases.

\*Fundamento: cavitación.

\*Menor tamaño de gota con mayores ondas ultrasónicas, mayor tiempo de residencia, tipo de emulsificante y la viscosidad.



Fuente: McClements (2011)

La homogeneización ultrasónica ha recibido una atención que va aumentando en los últimos años debido a que es considerada “tecnología verde” por su elevada eficiencia, rendimiento económico y bajos requerimientos de instrumental (Bhanvase *et al.*, 2011). El proceso de crecimiento y colapso de las microburbujas (cavitación) en el medio líquido debido al ultrasonido de alta intensidad es responsable de la producción de microjets y turbulencia (Bhanvase *et al.*, 2012a; Bhanvase *et al.*, 2012b; Martins, 2013; Pinjari, 2011; Abbas, 2013). Estas fuerzas intensas de corte inducen a la ruptura de la interfase de las fases inmiscibles, facilitando la producción de emulsiones finas y estables en la presencia de surfactantes (Abbas *et al.*, 2014).

### 1.3.5 Estabilidad.

Una vez formada, la vida útil de las emulsiones puede variar de unas horas hasta años, dependiendo de la formulación y los parámetros del proceso. La estabilidad de una emulsión es la capacidad de resistir los cambios físicos y químicos a través del tiempo. También se considera una medida de la velocidad a la cual una emulsión pasa de ser un sistema disperso uniforme a un sistema con evidencia de separación de fases. Dicha estabilidad depende de factores como: el tamaño de partícula, la diferencia de densidad de ambas fases, la viscosidad de la fase continua y de la emulsión acabada, las cargas de las partículas, la naturaleza, la eficacia y cantidad del emulsificante, y las circunstancias de almacenamiento (temperaturas altas y bajas; agitación y vibración, la dilución o evaporación durante el almacenamiento) o el uso. Puesto que las partículas de una emulsión están suspendidas libremente en un líquido, obedecen a la ley de Stokes si no están cargadas. Para muchos fines industriales la definición de estabilidad incluye forzosamente la no coalescencia de las partículas de la emulsión y la no sedimentación (Fustier *et al.*, 2010).

Las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente desfavorables, porque la energía libre positiva asociada con la creación de una interfase entre el aceite y el agua debido al efecto hidrofóbico, produce sistemas metaestables que se rompen por el tiempo debido a los diferentes mecanismos de inestabilidad (separación gravitacional, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald) (FIGURA 2) .

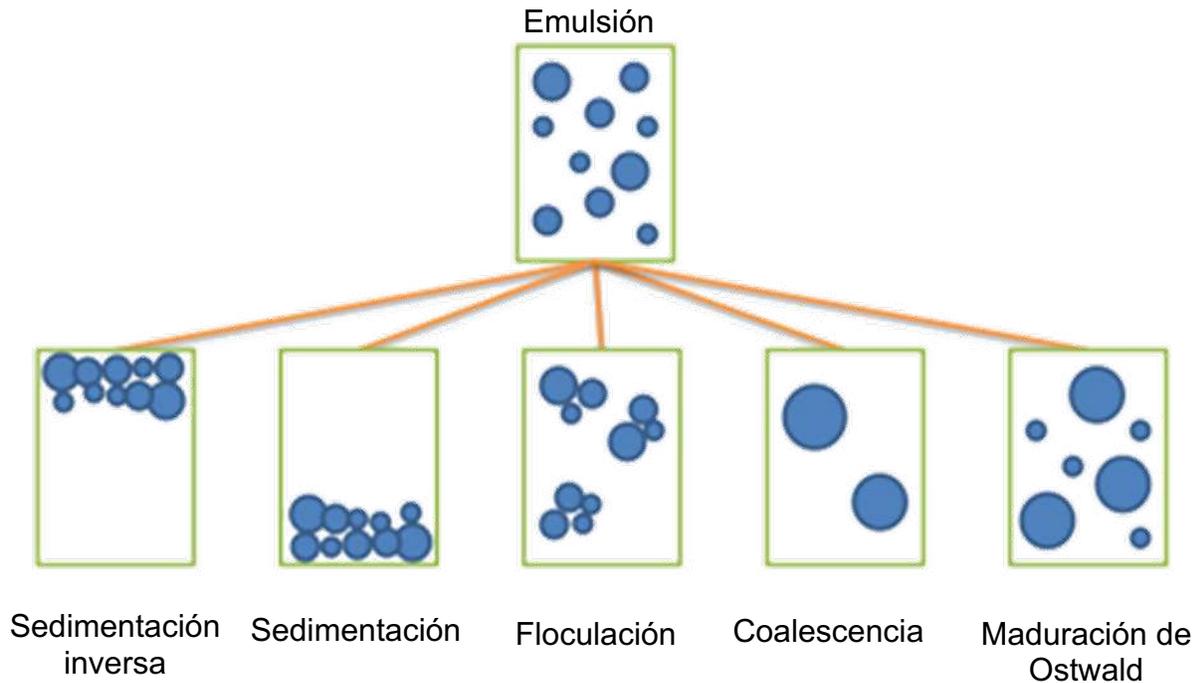


FIGURA 1.2. Principales mecanismos de desestabilización de las emulsiones ( McClements y Xiao, 2012).

### **1.3.6.1 Separación gravitacional**

Bajo este concepto se engloban los términos de sedimentación inversa y el de sedimentación. Es un mecanismo reversible causado por el efecto de la gravedad que producen un gradiente vertical de concentración de las gotas debido a la diferencia de su densidad con la fase que lo rodea (Aranberry *et al.*, 2006). Así, cuando las gotas presentan una mayor densidad que la fase continua tiende a bajar y cuando su densidad es menor suben a la superficie. En una emulsión O/W es más común que se presente la sedimentación inversa y en las W/O sedimentan. Este fenómeno está descrito por la Ley de Stokes que se refiere a la fuerza de fricción experimentada por objetos esféricos moviéndose en el seno de un fluido viscoso. De donde se desprende que la velocidad de sedimentación inversa está en función del tamaño de la gota, así cuando las gotas son pequeñas, la sedimentación inversa

es menor y viceversa (Narbsimhan, 1992). Las emulsiones con tamaño de gota menores a  $0.1 \mu\text{m}$  exhiben estabilidad cinética frente a la sedimentación o sedimentación inversa como consecuencia al fuerte movimiento browniano de los glóbulos (Villareal, 2004). En la etapa inicial del cremado las gotas suben y forman una capa de gotas en la parte superior, cuando las gotas terminan de subir, se empacan para formar la capa de crema; la velocidad de sedimentación inversa puede controlarse además del tamaño de la gota, con la viscosidad del medio dispersante, a mayor viscosidad más lento será el fenómeno (McClements, 2004).

### **1.3.6.2 Floculación.**

La floculación ocurre cuando dos o más gotas se acercan lo suficiente y las fuerzas de Van Der Waals provocan una atracción y forman un agregado en el cual las gotas mantienen su integridad individual y se mueven como una unidad cinética (McClements, 2004; Narsimhan, 1992). Es un proceso reversible ya que el tamaño de las gotas no se modifica y pueden separarse mediante una suave agitación. Debido a que las gotas individuales que están en estado de “floc” están separadas por una delgada película de fase continua, la ruptura de esa película puede dar paso a la coalescencia. La velocidad de la floculación depende de las fuerzas entre las partículas como del movimiento relativo entre las gotas (Narsimhan, 1992).

### **1.3.6.3 Coalescencia**

Cuando dos gotas en una emulsión se acercan una a otra, ellas tienden a flocular debido a las fuerzas de VanDer Waals; debido a que no son partículas sólidas, las gotas tienden a deformarse y formar caras planas paralelas o “lamela aplanada” separadas por una película de líquido delgada. En las gotas grandes, las fases deformadas forman un hoyuelo donde la película tiende a hacerse más

delgado que el de la periferia. El líquido de la fase continua que separa las dos gotas, drena debido a las fuerzas capilares resultantes de la curvatura del radio de las gotas. El drenado continuará hasta que la delgada película se rompa, dando como resultado la unión de ambas gotas o que alcance un equilibrio como un resultado del balance de las fuerzas que actúan a través de la película (Narsimhan, 1992).

Es un proceso irreversible que provoca la formación de gotas más grandes y estas a su vez la separación de fases. La coalescencia depende de factores como la solubilidad del emulsificante, la concentración del mismo y de las propiedades de la película (McClements, 2002).

#### **1.3.6.4 Maduración de Ostwald.**

Es un fenómeno que consiste en el transporte neto del aceite de pequeñas gotas hacia las gotas más grandes a través de la fase continua. Esto se debe al efecto de solubilidad de la fase de la gota en la fase continua de la emulsión. Debido a que la presión dentro de la gota es mayor que la externa, de acuerdo a la ley de Laplace,  $\Delta P = 2\gamma/r$ , la solubilidad  $S$  de la fase de la gota en la fase continua justo en el borde de la gota de radio  $r$ , depende del radio de la misma como lo predice la ecuación de Kelvin

$$S(r) = S_0 \exp(2\gamma V_m / rRT) \quad (1)$$

$$S(r) = S_0 \exp(2\gamma V_m / rRT) \quad (1)$$

donde  $V_m$  es el volumen molar de la fase continua y  $S_0$  es la solubilidad en el seno de la fase continua, la cual es la misma que la solubilidad cercana a una interfase plana. El término  $2\gamma V_m / rRT$  tiene la dimensión de longitud con un valor de 1,5 nm para agua a 25° C que tenga una tensión interfacial de 1 mN/m con la fase oleosa. En consecuencia, un aumento de la solubilidad para gotas de 100 nm tiene un valor insignificante de 1,5 %, mientras que para gotas de 10 nm será de 15 %. Este efecto está limitado a gotas realmente pequeñas y no tiene efecto sobre las

macroemulsiones. La diferencia en solubilidad produce un gradiente de concentración entre los alrededores de la pequeña gota y de las gotas grandes y esto da origen a la transferencia de masa por difusión. Como consecuencia, las pequeñas gotas tienden a 'desinflarse' dentro de las grandes. Teóricamente el proceso no se detendrá hasta que la separación de fases ocurra, pero en la práctica el proceso se ralentiza con el crecimiento de las gotas. Algunas veces puede finalizar el proceso con una distribución bimodal.

Uno de los retos al elaborar una nanoemulsión es el de reducir o inhibir la maduración de Ostwald, por lo que puede tomarse en cuenta la solubilidad y la tensión superficial y el peso molecular del aceite. La velocidad del proceso de maduración podría reducirse utilizando aceites menos solubles en agua (alcanos de mayor peso molecular o sin ramificaciones, aceites menos polares, aceites poliméricos, entre otros). La formulación puede ser usada para reducir la tensión y tomar en cuenta el peso molecular de los aceites (Leal-Calderón, 2012).

Usualmente, las nanoemulsiones son altamente estables a la separación gravitacional por que el tamaño relativamente pequeño de la partícula que permite que los efectos del movimiento browniano, que tiene un nivel de energía de 15 kT, dominen a las fuerzas gravitacionales. De acuerdo a la teoría DLVO (Derjagin, Landau, Verveij, Overbeek) o su equivalente sin repulsión eléctrica, el potencial de interacción gota-gota puede exhibir (1) una barrera repulsiva menor de 15 kT, por lo tanto producir fusión; (2) una barrera de energía superior a 15 kT y la fusión no tendría lugar; (3) una barrera de energía mayor que el efecto browniano pero con un mínimo secundario "a larga distancia" que trae como resultado la floculación de las gotas. También tienen buena estabilidad contra la agregación de las gotas porque el rango de fuerzas atractivas que actúan entre las gotas disminuyen con la disminución del tamaño de partícula, mientras que el rango de repulsión estérica es menos dependiente del tamaño de partícula (McClements, 2005; Hiemenz y Rajagopalan, 1997).

Por todo lo anterior el reto que tienen los científicos es producir nanoemulsiones con partículas lo suficientemente pequeñas que produzcan una larga estabilidad

cinética para poder aplicarlas comercialmente, esto puede lograrse ya sea controlando la microestructura (por la distribución de la partícula) o por medio de la incorporación de sustancias estabilizantes (emulsificantes, modificadores de textura, agentes de peso, entre otros) (McClements, 2011).

#### **1.4 Emulsificantes.**

Varios factores físicos pueden afectar o alterar a estabilidad de las gotas de una emulsión y afectar sus características como acarreador de ingredientes funcionales. Así mismo la estabilización de las emulsiones es muy importante para proveer una mayor vida útil (tanto cinética como termodinámica) sobre emulsiones convencionales, una encapsulación más eficiente de componentes funcionales y una mejor biodisponibilidad. La forma más común de estabilizar emulsiones es por la adsorción del surfactante en la interface entre las gotas y el medio de dispersión, reduciendo la tensión interfacial. Dependiendo del tipo de surfactante aplicado existen diferentes maneras de promover la estabilidad que ha sido alcanzada, surfactantes iónicos pueden proveer una carga eléctrica a las gotas de la emulsión y los surfactantes no iónicos creando una barrera estérica vía grupos moleculares voluminosos dirigidos hacia el medio de dispersión (Grigoriev y Miller, 2009).

##### **1.4.1 Definición.**

Un emulsificante puede definirse como una sustancia que reduce la tensión superficial entre una fase oleosa y una acuosa o el aire y la fase acuosa, favoreciendo la emulsificación e incrementando su estabilidad. Los emulsificantes en alimentos además tienen otras funciones como la modificación de la cristalización de la grasa, interacciones con los componentes tipo carbohidratos o actuar como sustancias formadoras de películas, controlar el transporte de oxígeno y humedad y otras aplicaciones que no están relacionadas a la definición clásica de emulsificante. (Krog y Vang Sparso, 2004). Es una molécula anfifílica, es decir que cuenta con una

zona hidrofílica (generalmente denominada cabeza) y una hidrofóbica (conocida como cola). Esto le permite ubicarse entre la interfaz de sustancias que tienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, es decir una emulsión.

Un emulsificante ideal es aquel que cumple con las siguientes características:

1. Es capaz de reducir la tensión interfacial entre dos líquidos inmiscibles,
2. Debe ser física y químicamente estable, inerte y compatible con los otros componentes de la formulación
3. Debe ser compatible, no irritante u no tóxico en las concentraciones usadas.
4. Debe ser organolépticamente inerte, es decir, no debe impartir ningún color, olor o sabor a la preparación.
5. Debe ser capaz de formar una película coherente alrededor de los glóbulos de la fase dispersa y evitará la coalescencia de los glóbulos de la fase dispersa.
6. Debe producir y mantener la viscosidad requerida de la preparación (Aulton, 2013).

#### 1.4.2 Clasificación.

La mayoría de las emulsificantes en alimentos, más correctamente denominados surfactantes, son moléculas que contienen regiones polares y no polares. En general los grupos no polares son alifáticos, alicíclicos o hidrocarbonados aromáticos, mientras que los grupos funcionales polares contiene heteroátomos como el oxígeno, nitrógeno y sulfuro. Los emulsificantes se clasifican de acuerdo a la carga iónica de la parte activa de la molécula (hidrófila) y el tipo de disociación en la fase acuosa (Márquez *et al.*, 2008). Así se tienen emulsificantes:

**Aniónicos:** son aquellos que poseen grupos funcionales capaces de ionizarse en disolución acuosa originando iones con carga negativa superficial. Contienen generalmente uno de cuatro grupos polares solubles (carboxilo, sulfonato, sulfato o fosfato); combinado con una cadena de hidrocarburos de carácter hidrófobo. Si esta

cadena es corta son muy hidrosolubles y en el caso contrario tienen baja hidrosolubilidad. Se usan principalmente en la industria de jabones y detergentes.

**Catiónicos:** cuando están en contacto de una disolución acuosa se ionizan originando iones con carga positiva y responsables de la actividad superficial. Pueden tener en su molécula uno o varios grupos amino terciarios o cuaternarios. Son utilizados comúnmente en detergentes, tienen propiedades bactericidas y facilidad de adsorción sobre sustratos biológicos o inertes que poseen una carga negativa.

**No iónicos:** Estos emulsificantes no forman iones en disolución acuosa, puesto que ellos poseen grupos hidrofílicos del tipo amida, amina, éter o hidroxilo. Una alta proporción de estos surfactantes pueden tener elevada afinidad por el agua, gracias a la presencia de una cadena poliéster del tipo polióxido de etileno. El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquil benceno, y a veces, una estructura de origen natural como un ácido graso cuando se requiere de una baja toxicidad. Cuando tienen un nivel bajo de toxicidad pueden ser empleados en la fabricación de fármacos, cosméticos y alimentos.

**Anfotéricos (Zwiteriónicos):** Se caracterizan por tener dos grupos funcionales, uno de tipo aniónico y el otro catiónico. En disolución acuosa se ionizan confiriéndole al compuesto el carácter de aniónico o catiónico, según el pH. Algunos son resistentes al pH, otros son de tipo catiónico a pH ácido y de tipo aniónico a pH alcalino; cerca de su punto isoeléctrico son realmente anfóteros. Son compatibles con todos los tipos de emulsificantes; como ejemplos se encuentran los aminoácidos y los fosfolípidos (Hasenhuettl, 2008).

### 1.4.3 Monoacilglicéridos.

El uso de los monoacilglicéridos como emulsificantes data de la década de los 30's cuando fueron utilizados en la producción de margarina. Los monoacilglicéridos y sus ésteres, ácidos grasos y sus ésteres y los fosfolípidos son diferentes tipos de

pequeñas moléculas de surfactantes. Los monoacilglicéridos tienden a adsorberse a las interfases triacilglicéridos-agua fuertemente, lo que aunado a habilidad de formar estructuras cristalinas líquida lamelar, lo hace un buen emulsificante de alimentos. Las estructuras cristalinas líquidas estabilizan las emulsiones a través de diferentes mecanismos, ya sea incrementando la viscosidad aparente, o reduciendo la atracción de las fuerzas de Van Der Waals o mejorando las propiedades mecánicas de la superficie. Estas propiedades de la capa interfacial adsorbida dependen de la eficiencia de empaquetamiento de las moléculas del surfactante en la interfase. (Narsimhan, 1992).

Son producidos industrialmente por interesterificación (Glicerólisis) de grasas disponibles o aceites con glicerol, la reacción de los componentes se lleva al cabo a elevadas temperaturas (200-260 °C) bajo catálisis alcalina seguida de una destilación molecular, produciendo en promedio un 40 % a 60 % de monoacilglicéridos, mientras que el resto está compuesto por diacilglicéridos y triacilglicéridos. La proporción de la formación de isómeros (1-MAG o 2-MAG) depende de la temperatura, aunque el 1-MAG se presenta en mayor proporción que va de 82 al 95 % a temperaturas de 200 y 20 °C respectivamente. La temperatura elevada produce la descomposición y oxidación que genera un color oscuro, sabor a quemado lo que hace necesaria una purificación posterior, elevando costos y tiempo de producción (Diks y Bosley, 2000).

La síntesis enzimática de monoacilglicéridos y otros emulsificantes ha sido reportada como un método para producir emulsificantes estereoespecíficos, sin embargo se han presentado problemas para aislar los productos deseados de la mezcla de reacción para el caso de producción a gran escala y no es una opción comercial (Krog y Larsson, 1986).

A la par del desarrollo de alimentos funcionales, varios investigadores se han enfocado en la producción de emulsificantes grado alimenticio de interés nutricional, especialmente enriquecidos en ácido eicosapentanoico y docosahexanoico. Extensas investigaciones se han aplicado para la producción de nuevos ingredientes funcionales tales como monoacilglicéridos y diacilglicéridos de interés nutricional, principalmente enriquecidos con ácidos grasos  $\omega$ -3 (Camino-Feltes *et al.*, 2012).

#### **1.4.4.1 Características.**

Los monoacilglicéridos y diacilglicéridos son moléculas no iónicas y anfipáticas, esto es que cuentan con porciones hidrofílicas como hidrofóbicas, lo que les confiere excelentes propiedades emulsificantes, siendo ampliamente aplicadas en las industrias químicas, de alimentos, cosméticos y farmacéuticas (Gunstone 1999).

Los procesos químicos y enzimáticos de la producción de monoacilglicéridos están favorecidas bajo la temperatura crítica a la cual el monoacilglicérido empieza a precipitar. Existe una dependencia de la temperatura con el rendimiento del producto en el intervalo de 3-15 °C. En este intervalo la cristalización de productos en la mezcla de reacción es evidente (Arcos y Otero, 1996).

#### **1.4.4.2 Actividad biológica.**

Los monoacilglicéridos son los compuestos más populares de los lípidos simples, desde un punto de vista nutricional su digestión es completa y no tienen restricciones acerca de su consumo diario (Grompone, 2012).

Además de las funciones y beneficios biológicos inherentes a su naturaleza lipídica, los monoacilglicéridos pueden ser utilizados como vehículos de ácidos grasos de interés nutraceútico. Diversos trabajos han modificado o sintetizado monoacilglicéridos con ácidos grasos funcionales como los provenientes del aceite de pescado (Docosahexanoico, DHA y Eicosapentanoico, EPA), ácido linoléico conjugado (CLA) y ácido oleico, para su uso en alimentos (Camino, 2011).

#### **1.4.5 Diacilglicéridos.**

Los diacilglicéridos no han sido tan ampliamente utilizados como emulsificantes como los monoacilglicéridos, sin embargo se le han encontrado

algunas aplicaciones debido a las propiedades de cristalización específica de los 1,2 diacilglicéridos. Existen en dos formas isoméricas: 1,2- y 1,3-diacilglicéridos en una relación relativa de 40:60. Los 1,2- DAG cristalizan en una forma  $\alpha$  metaestable, el cual se transforma a una forma  $\beta'$ , por lo que pueden ser usado para estabilizar los cristales  $\beta'$  en mezclas de grasas, la cual da lugar a problemas de textura en margarina, como agente antibloming en la manteca de cacao o en untables bajos en calorías; además de ser bloques de construcción para la síntesis química de fosfolípidos, glicolípidos y algunas drogas farmacéuticas (Narsimhan, 1992; El Kihel *et al.*, 1996). La producción industrial de diacilglicéridos se puede favorecer usando 6 a 8 partes de glicerol para 100 partes de grasa, obteniéndose rendimientos que contienen 15 % de monoacilglicéridos, 50 % de diacilglicéridos y 35 % de triacilglicéridos.

#### **1.4.5.1 Características.**

El diacilglicerol (DAG) es un componente minoritario de los aceites comestibles, se encuentran en cantidades no mayores a un 10 % (Flickinger, 2006). Sin embargo, tecnológicamente se pueden producir aceites con un contenido en DAG superior al 80%, que son idénticos a los aceites habituales, ricos en triacilglicéridos, en términos de digestibilidad y de valor calórico.

Aproximadamente el 70 % de los DAG disponibles en aceites existen en forma del isómero 1-3 como el resultado de la acilmigración, además presentan una mayor estabilidad que la forma 1-2. Los 1,3-diacilgliceroles son potencialmente atractivos como materiales para numerosas aplicaciones sintéticas, como la preparación de fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas (Wehrli y Pomeranz 1969; Ahmed 1990). Son valiosos como acarreadores de drogas y han sido empleados para la preparación de derivados conjugados de varias de ellas (Kumar and Billimoria 1978; Garzon-Aburbeh *et al.*, 1983; Jacob *et al.*, 1990 en Kim and Lee 2006).

#### **1.4.5.2 Actividad biológica.**

Se ha descrito que la ingesta de DAG reduce los niveles postprandiales de triacilglicéridos en el suero de adultos sanos y la masa grasa en niños, adolescentes y adultos japoneses. Así mismo, en pacientes con diabetes tipo 2, los DAG reducen los triacilglicéridos plasmáticos tanto en el ayuno como en la fase postprandial.

Actúan en el combate contra los altos niveles de colesterol y TAG en la prevención de la obesidad (Eom *et al.*, 2010). En animales de experimentación el consumo de DAG reduce los niveles de leptina e insulina sérica. Recientemente se ha publicado un estudio aleatorizado, a doble ciego controlado por placebo que demuestra que la ingesta de 25 mL/día de DAG en pacientes con diabetes tipo 2 reduce el peso corporal, la glucosa y la leptina plasmática así como la resistencia a la insulina (Gil, 2010).

El beneficio principal lo aporta el 1,3-DAG ya que la ausencia de un ácido graso en la posición sn-2 de los DAG no permiten la resíntesis a triacilglicéridos, evitando así que se depositen en el área abdominal (Smith y Charter, 2010).

Las diferencias fisiológicas observadas entre los DAG y los TAG son debido a las vías metabólicas que siguen después de su absorción por las células epiteliales del intestino. Durante la digestión, los TAG normalmente se hidrolizan a 2-MAG bajo la acción de la lipasa pancreática. Estos son re esterificados a 1,2 (2,3)-DAG y los TAG son almacenados en el organismo. Esta es la principal vía metabólica para la producción de TAG (Matsuo y Tokimitsu, 2001). Los 1,3-DAG consumidos normalmente son hidrolizados a 1(3)-MAG, los cuales presentan baja reactividad como sustratos de las enzimas responsables de la re esterificación a TAG, así, estos MAG son enviados a nuevos procesos de hidrólisis, produciendo ácidos grasos libres y glicerol, los cuales entran a la vía del glicerol-3-fosfato y son reesterificados a 1,3-DAG (Lo *et al.*, 2008). Debido a esta ruta metabólica, la ingestión de DAG produce un incremento en los ácidos grasos libres presentes en la vena porta, acompañada por una reducción en la actividad enzimática involucrada en la síntesis de ácidos grasos en el hígado y un incremento en la beta-oxidación de ácidos grasos (Matsuo y

Tokimitsu, 2001), se cree que dicho incremento es el responsable de la reducción en la grasa corporal y en los niveles séricos de TAG (Lo *et al.*, 2008).

### 1.5 Lípidos estructurados.

Las grasas y aceites son los componentes nutricionales mayoritarios y la principal fuente de energía ya que aportan 9 Kcal/g. Las grasas y aceites naturales son usados para la nutrición animal directamente o después de una modificación apropiada usando tecnologías convencionales a gran escala, como la hidrogenación o endurecimiento. Las grasas y aceites naturales no son siempre productos ideales y la modificación de su composición de ácidos grasos y su estructura regioquímica o estereoquímica puede mejorar sus propiedades y valor nutricional (Bornsheuer, *et al.*, 2003).

Recientemente han aparecido diversos productos que contienen lípidos estructurados cuya composición y posición de los ácidos dentro de la molécula de glicerol, han sido prediseñadas (lípidos estructurados), así como emulsiones lipídicas que combinan ácidos grasos de longitudes y grados de insaturación con triacilglicéridos de cadena media, glicerol y/o fosfolípidos. Estos últimos productos, generalmente usados en nutrición parenteral se denominan “SMOF”, nombre que proviene de su composición (**S**oya, de ácidos grasos de cadena **M**edia, **O**liva y pescado **F**ish). Los estudios realizados indican que los triacilglicéridos de cadena media son degradados, eliminados de la circulación y oxidados más rápidamente que los de cadena larga, por lo que suponen una fuente de energía fácil y rápida. Por otra parte, el glicerol puede servir para la obtención de energía mediante la glucólisis o para la síntesis de nuevos triacilglicéridos. Por su parte los ácidos grasos de los fosfolípidos pueden ser fácilmente insertados en membranas. Las fuentes de ácidos grasos de los SMOF, además de triacilglicéridos de cadena corta y media, son generalmente el aceite de soya, el de oliva, y el de pescado. Es importante destacar el papel que pueden desempeñar la presencia de compuesto minoritarios con carácter antioxidante en la fracción saponificable de los aceites vegetales de estas mezclas, ya que proporcionan un valor añadido a estos productos (Gil, 2010).

El estudio de las propiedades funcionales de distintos tipos de lípidos ha llevado a su utilización como alimentos funcionales y nutraceúticos. Al respecto existen varios lípidos y productos que han adquirido especial relevancia en los últimos años, como los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie  $\omega$ -3, especialmente el ácido eicosapentanoico (20:3  $\omega$ -6, EPA) y el docosahexanoico (22:6  $\omega$ -3, DHA), el ácido gamma linolenico (18:3  $\omega$ -6), el ácido linoléico conjugado (CLA), la oleilestrona el diacilglicerol y los triacilglicéridos de cadena media (Gil, 2010).

### 1.5.1 Estrategias para la modificación de lípidos.

La modificación o diseño estructural de una molécula lipídica, principalmente acilglicéridos, puede ser llevada a cabo por vía enzimática o química. Ambas presentan ventajas y desventajas que se resumen en la Tabla 1.5.

TABLA 1.5. Comparación entre métodos enzimáticos y químicos para la síntesis de lípidos estructurados.

	<b>Proceso enzimático</b>	<b>Proceso químico</b>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requieren sustratos puros</li> <li>• Pequeñas cantidades de catalizador</li> <li>• Puede ocurrir hidrólisis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No selectivo</li> <li>• Drásticas condiciones de temperatura, pH y presión.</li> <li>• Problemas de contaminación al medio ambiente por los solventes que utiliza</li> <li>• Pocas posibilidades de cambiar condiciones de reacción.</li> <li>• Los productos pueden ser no aptos organolépticamente</li> <li>• AGPI pueden ser destruidos</li> </ul>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selectividad</li> <li>• Condiciones suaves de reacción</li> <li>• Biocompatible</li> <li>• Contaminación ambiental</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Métodos más simples</li> <li>• Más económicos</li> <li>• Más fácil de escalar</li> </ul>

- 
- reducida
- Disponibilidad de lipasas con diferentes propiedades (posibilidad de optimizar)
  - Muchas posibilidades para ingeniería de reacción
  - Capacidad de mejorar las propiedades de las lipasas
  - Lipasas inmovilizadas pueden reusarse
  - Compatible con Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)
- 

Fuente: Bornscheuer *et al.*, 2003; Hasan *et al.* 2006

#### **1.5.1.1 Modificación enzimática de lípidos.**

Las reacciones principales involucradas en la obtención de lípidos estructurados, catalizadas por enzimas, pueden resumirse en las siguientes cuatro: acidólisis, alcoholólisis, hidrólisis y esterificación, el mecanismo general se puede observar en la Figura 1.3, donde los ácidos grasos se representan con las letras R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>.

**Hidrólisis:** Se utiliza para producir formas parcialmente hidrolizadas de fosfolípidos, y lisofosfolípidos. Involucra tres pasos desde el TAG hasta el glicerol y los ácidos grasos libres, puede realizarse en reactores de tanque agitado en lotes (STR) o en reactores de lecho compacto (PBR) (Baeza *et al.*, 2014)

**Esterificación:** Es la reacción contraria a la hidrólisis y se produce un éster y agua, a partir de un ácido y un alcohol. El agua es un producto directo de la reacción que afecta negativamente al equilibrio de la reacción, por lo que se debe contar común método para removerla, ya sea por el uso de sistemas que generen vacío, la aplicación de nitrógeno gaseoso, el uso de mallas moleculares o soluciones salinas saturadas (Baeza *et al.*, 2014). La reacción de interesterificación se refiere a una movilización de radicales acilo de los acilglicéridos y un subsiguiente reacomodo. A

diferencia de la hidrogenación, estas reacciones no afectan la saturación y no producen isomerizaciones; sólo propician un reacomodo de los ácidos grasos en las moléculas de los triacilglicéridos (Badui, 2006).

**Alcohólisis:** Es la reacción entre un éster y un alcohol para producir un éster con un grupo acilo diferente, produciendo metil esteres de la esterificación. Puede producirse la conversión de TAG en MAG +DAG hasta en un 11 %, pero la presencia de pequeñas cantidades de alcohol puede inhibir la hidrólisis.

**Acidólisis:** Es la reacción entre un éster y un ácido produciendo un intercambio de grupos acilo, es usada para la incorporación de ácidos libres o etil esteres de EPA y DHA y otros con funciones biológicas como CLA (Baeza *et al.*, 2014).

#### **1.5.1.2 Factores que afectan la modificación enzimática de los lípidos.**

El reemplazo de los grupos acilo en la posición sn-1 y sn-2 se ha llevado a cabo entre ácidos grasos como el CLA, EPA, ácido docosapentanoico (DPA), DHA y ácido caprílico (CA) como donantes de acilo y fosfolípidos (PL), Lisofosfolípidos (LPL) y glicerol como receptores. Dentro de las cuestiones a tomar en cuenta al realizar la modificación enzimática son:

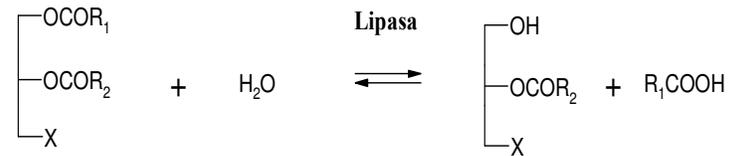
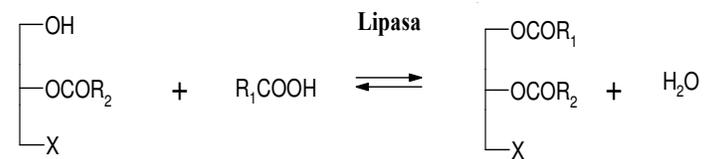
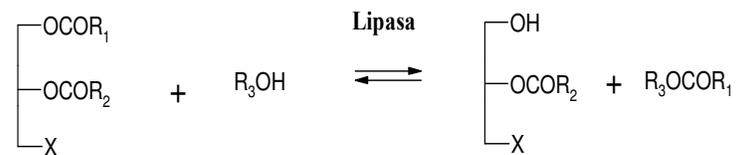
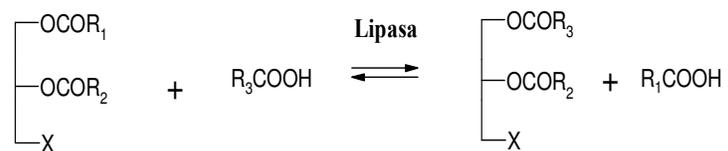
**Hidrólisis:****Esterificación:****Alcoholisis:****Acidolisis:**

FIGURA 1.3. Reacciones de síntesis enzimática para la obtención de lípidos estructurados (Baeza *et al.*, 2014).

### **1.5.1.2 Factores que afectan la modificación enzimática de los lípidos.**

El reemplazo de los grupos acilo en la posición sn-1 y sn-2 se ha llevado a cabo entre ácidos grasos como el CLA, EPA, DPA, DHA y ácido caprílico (CA) como donantes de acilo y fosfolípidos (PL), Lisofosfolípidos (LPL) y glicerol como receptores. Dentro de las cuestiones a tomar en cuenta al realizar la modificación enzimática son:

**Reactividad de los sustratos:** esta se encuentra influenciada por la especificidad y selectividad de las enzimas y de algunos efectos de inhibición. La velocidad de reacción es similar entre ácidos grasos saturados de 6 a 12 C pero menor en C14 y C16. En C18:1 se observa una mayor velocidad de reacción, sin embargo esta se ve afectada por el número de insaturación, ya que cuando están aumentando la velocidad disminuye. Trabajos realizados por Kim en 2007 y 2010 y García 2008 reportan la incorporación de  $\omega$ -3 AGPI (EPA, DPA y DHA) donde EPA fue el más reactivo, seguido por DPA y DHA. Vikberj (2007) encontró al CLA como el más reactivo comparado con CA y DHA.

**Relación molar de sustratos:** Se ha reportado un incremento en la esterificación y la transesterificación al aumentar la concentración de ácidos grasos libres (Adlercreutz, 2002). Sin embargo al aumentar la concentración de AGL se presentan cambios en la polaridad y viscosidad del medio de reacción (Egger, 1997). Para el caso del CLA, Baeza (2012) logró incrementar la incorporación a PC al aumentar la RMS de 1:2 a 1:4 obteniendo 90 %. Para CA en PC Vikberj (2005) alcanzó el 49 % de incorporación con 1:6 (PC: CA). Kim en 2010 y García en 2008 alcanzaron 43 y 35 % de incorporación de  $\omega$ -3 AGPI en PC cuando la RMS fue de 1:8 (PC  $\omega$ -3AGPI).

**Temperatura:** A mayor temperatura se producen los mejores rendimientos durante las reacciones pero muy altas temperaturas las velocidades de reacción pueden disminuir por la desnaturalización de la enzima. En un sistema libre de solvente la temperatura debe ser suficientemente alta para mantener el sustrato en estado líquido, a diferencia de los sistemas de solventes orgánicos que disuelven fácilmente la muestra, sin embargo no pueden utilizarse para aplicaciones en alimentos. Algunas veces debe subirse la temperatura a 60 °C para derretir el sustrato, lo que podría afectar la estabilidad de la lipasa que podría evitarse si la enzima está inmovilizada. La temperatura óptima para la mayoría de las lipasas inmovilizadas es de valores que van de 30 a 62 °C y es menor para el caso de lipasas libres.

**Carga de enzima:** Es la principal variable en la modificación de lípidos catalizados por enzimas. Cuando el efecto de la carga de enzima es evaluado, usualmente altas incorporaciones son alcanzadas y es un efecto favorecido por la temperatura. El exceso puede causar problemas con la agitación y obstaculizar la transferencia de masa.

**pH:** Las lipasas solo son activas a ciertos valores de pH dependiendo de su origen y el estado de ionización de los residuos básicos, neutros y ácidos, los residuos en el sitio catalítico está activo en un estado de ionización particular. El pH oscila entre valores de 7-9 aunque puede llegar a tener actividad entre 4- 10.

La inmovilización de la enzima afecta el pH óptimo dependiendo del reparto de protones entre la fase masiva y el microambiente alrededor del soporte y la restricción de la difusión del protón por el soporte. Si la lipasa es inmovilizada en una matriz polianiónica, la concentración de protones en la vecindad inmediata del soporte puede ser mayor que en la fase mayoritaria. Las reacciones enzimáticas dependen fuertemente del pH en soluciones acuosas, mientras que en solventes orgánicos las enzimas “recuerdan” el pH de la última solución acuosa a la cual fueron expuestas (*pH memory*). Un intervalo favorable de pH depende de la naturaleza de la enzima, la concentración del sustrato, la estabilidad de la enzima, la temperatura y el tiempo de reacción (Akoh, 2002).

**Actividad de agua (aW):** el agua juega un rol importante en todas las interacciones no covalentes, ya que es la responsable de mantener la conformación activa de las proteínas, facilitando la difusión del reactivo y manteniendo la dinámica de la enzima. La actividad de las lipasas a diferentes valores de aW depende del origen de la enzima, por ejemplo las lipasas de mohos son más tolerantes a bajas aW que la de las bacterias.

La aW óptima para la interesterificación va de 0.04 % a 11 % aunque la mayoría de las reacciones requieren menos del 1 %. El contenido de agua en un sistema de reacción es un factor determinante para dirigir la reacción a hidrólisis o síntesis de ésteres. Abraham (1998) encontró que en un sistema libre de solvente la interesterificación domina a la hidrólisis a una relación de agua a lipasa de 0.9 después de la cual se convierte en la reacción predominante. Durante la interesterificación el equilibrio de la reacción puede ser forzado a alejarse de la síntesis de éster, debido a la acumulación de agua, un mol de la cual es producida durante la reacción. El equilibrio puede dirigirse de nuevo hacia la síntesis de ésteres si se elimina constantemente el agua producida durante la reacción. (Baeza *et al.*, 2013)

### 1.5.2 Lipasas.

Las lipasas son un versátil grupo de biocatalizadores denominados triacilglicerol hidrolasas E.C. 3.1.1.3, pertenecen a las serina hidrolasas, actúan en los enlaces éster de grupos carboxílicos; catalizan la hidrólisis y síntesis de acilglicéridos. Se encuentran en animales, plantas, hongos y bacterias, dependiendo de su origen son las propiedades con respecto a su especificidad posicional, en ácidos grasos, termoestabilidad y pH óptimo. Las lipasas controlan la distribución de sus productos debido a su regioselectividad, estereoselectividad y selectividad de sustrato.

Su sitio activo consiste de una triada catalítica de Ser-His-Asp/Glu similar a la de las proteasas de serina, presentando similitud en su actividad catalítica. Se han encontrado tres tipos de lipasas de acuerdo a su sitio de coordinación con el sustrato: Lipasas de la familia de *Rhizomucor*, lipasas de *Pseudomonas* y *Candida antártica*, lipasas correspondientes a la familia de la *Candida rugosa* (Jaeger *et al.*, 1999, Zarevúcka and Zdeněk, 2008)

La catálisis por lipasas ocurre en la interface lípido-agua y la mayoría de las lipasas tienen la propiedad de “activación interfacial” es decir que solo se observa una actividad catalítica alta en presencia de una fase hidrofóbica con triacilglicéridos dispersos en agua o en solvente orgánico. Este fenómeno está relacionado a la presencia de una región hidrofóbica de oligopéptido, una tapa que cubre la entrada al sitio activo de la enzima. En un ambiente acuoso, la tapa se mueve y el sustrato puede entrar y hacer la unión (Anthonsen *et al.*, 1995). Existen excepciones para la activación interfacial como las de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida antártica B*, pero todas esas lipasas aún tienen una pequeña tapa (Verger, 1997; Schimd and Verger, 1998).

Las lipasas son activas sobre un amplio intervalo de pH y temperatura y la mayoría de las enzimas muestran actividad a pH de 7 a 9 y de 30 a 40 °C; *Rhizomucor miehei* y lipasa B de *Candida antártica* son altamente activa y estable a temperaturas de 60 - 80 °C.

A pesar de que los triacilglicéridos son los sustratos naturales de las lipasas, la aplicación de estas enzimas en la modificación de lípidos es atractiva porque muestran tres tipos de selectividad: regioselectividad (sn-1,3); selectividad por los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), saturados, cis- $\omega$ -9 ácidos grasos insaturados o ácidos grasos de cadena corta y selectividad por MAG, MAG y DAG o TAG. (Bornscheuer *et al.*, 2003).

## 1.6 Lípidos bioactivos.

Los lípidos bioactivos son compuestos con características funcionales y nutraceuticas, que provienen de plantas, animales y microorganismos. También pueden producirse por medio de procesos modificados para concentrar ácidos grasos específicos, eliminar ciertos componentes o mejorar ciertas características fisicoquímicas (Shahidi, 2006).

Los lípidos funcionales, particularmente el ácido docosahexanoico, el ácido eicosapentanoico y el ácido linoléico conjugado han atraído la atención debido a sus beneficios en la salud (Ohr, 2005). Tecnologías basadas en emulsiones y secado por aspersión han sido los más comunes intentos empleados para microencapsular y entregar los ácidos grasos en los alimentos (Sanguansri y Agustin, 2001; McClements *et al.*, 2007).

### **1.6.1 Ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3).**

Dentro de la lista de sustancias esenciales para los seres humanos, es decir sustancias que no pueden ser sintetizadas y deben ser adquiridas a través de la dieta, se encuentran los ácidos grasos de la familia  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6; y a pesar que se requiere un balance (5:1 o 10:1  $\omega$ -3:  $\omega$ 6) en el consumo de los mismos, recientes estudios han determinado que el consumo de  $\omega$ -6 está cubierto por la dieta normal, por lo que aún existe un déficit de  $\omega$ -3 que debe ser cubierto. El ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\omega$ -3) se encuentra presente en pescados de agua profunda, como principal fuente, plantas de hoja verde oscuro, aceite de linaza, colza, nueces, grosella, de soya y canola son significativas (Amparo *et al.*, 2009).

#### **1.6.1.1 Características.**

A partir del ácido alfa linolénico (ALA) se sintetizan los ácidos grasos EPA (eicosapentanoico 20:5  $\omega$ -3) y DHA (docosahexanoico C22:6  $\omega$ -3) a través de una serie de pasos de elongación y desaturación, con una conversión en el cuerpo de

entre 2 y 5 % de ALA, por lo que debe ser consumido en los alimentos. Las principales fuentes son los animales del fondo del mar, algas, plancton y pescado, especialmente los grasos como el salmón, caballa, atún, arenque, trucha de agua dulce y las anchoas (Mesa *et al.*, 2006). La distribución de los ácidos grasos en el TAG de los aceites de pescado y mamíferos marinos difiere en que los aceites de pescado los AGPI se encuentran en la posición *sn-2*, mientras que los de mamíferos se encuentran en la posición *sn-1* y *sn-3*. Aunque el EPA y el DHA se encuentran principalmente presentes en los aceites de origen marino, las proporciones pueden variar dependiendo en función de la especie, su localización, estación del año y la disponibilidad de fitoplancton. Algunas fuentes pueden proveer fácilmente la cantidad diaria requerida de AGPI  $\omega-3$  (800 mg) en una cápsula de 2 g de aceite; mientras otras fuentes requieren de altos niveles de consumo para alcanzar esta cantidad (Shahidi, 2006).

Los ácidos grasos  $\omega-3$  son altamente susceptibles a la oxidación y tiene un inherente sabor y olor a pescado, por lo que la mayoría de las aplicaciones en alimentos de estos ácidos grasos requieren micro-encapsulación para la protección de la oxidación y el enmascaramiento el sabor y olor característico (Sanguansri y Agustín, 2010).

#### **1.6.1.2 Actividad biológica**

Los ácidos grasos omega 3 reducen los niveles de colesterol y triacilglicéridos, pero a su vez aumentan los niveles de HDL. Del mismo modo, se han comprobado los efectos protectores que tiene el omega-3 sobre el nivel cognoscitivo de los adultos mayores, en especial de los que padecen de Alzheimer, ya que estos ácidos grasos desempeñan diferentes papeles en la función cerebral (Horrocks y Farooqui, 2004). Se ha evidenciado que el contenido de docosahexanoico (DHA) en el tejido cerebral, está disminuido en los pacientes que sufren alguna alteración neuronal, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, depresión, esquizofrenia, hiperreactividad, esclerosis múltiple, isquemia y desordenes peroxisómicos,

alteraciones que mejoran tras la administración de DHA (Kalmijn, *et al.*, 2004). Estudios epidemiológicos han mostrado una relación entre la ingesta alimentaria de grasas y el desarrollo de Alzheimer, corroborada por estudios experimentales, que han demostrado que una ingesta elevada de colesterol y grasa saturada incrementa el riesgo de sufrir esta enfermedad, mientras que el consumo de aceite de pescado lo reduce. Además, Morris y colaboradores (2003) observaron que la ingesta semanal de pescado reducía el riesgo de desarrollar Alzheimer en una población mayor de 65 años.

Por otra parte el papel de los ácidos grasos como inmunonutrientes, principalmente los  $\omega$ -3 y el oleico es una respuesta de carácter protector, de un gran número de enfermedades como la aterosclerosis, algunas infecciones persistentes, enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso y la fibrosis pulmonar; así como la cirrosis hepática y las enfermedades inflamatorias intestinales. Las células del sistema inmune activadas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos), son susceptibles de modificar el perfil de ácidos grasos de sus membranas según el aporte de lípidos de la dieta (De Caterina *et al.*, 1994). Durante la inflamación, los procesos de marginación, rodamiento, adhesión, y la posterior transmigración de los leucocitos a través del endotelio (diapédesis), están conducidos por distintos mecanismos de estimulación quimiotáctica y determinados por la fijación de moléculas de adhesión complementarias, entre la superficie de los leucocitos y de las células endoteliales. El perfil lipídico de las membranas de las células inmunitarias va a condicionar la producción de mediadores químicos, determinando así la intensidad de la respuesta (Aguilera y Ramírez 2001).

Cuatro estudios clínicos han evaluado el efecto de la administración de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, y sólo dos han mostrado su eficacia como estabilizadores de la función renal. El estudio más amplio, fue llevado a cabo en 106 pacientes, que demostró que la administración durante dos años de 12 g/d de aceite de pescado (1,8 g/d de EPA y 1,2 g/d de DHA) reduce la progresión de la enfermedad (Martínez-González *et al.*, 2006).

Los alimentos fuente en ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, constituyen una buena opción como alimentos cardioprotectores, por lo que se deben de incluir en la dieta regularmente, a la vez que se disminuye la ingesta de ácidos grasos saturados. La influencia de los ácidos grasos monoinsaturados de la dieta a través del aceite de oliva, sobre los lípidos plasmáticos tiene un efecto favorable, principalmente debido a un incremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDLc) y a una caída en los niveles de colesterol total y LDLc en el riesgo de enfermedad cardiovascular, considerando que el consumo excesivo de grasa, es tan solo un factor de riesgo dentro de la etiología de las enfermedades cardiovasculares y que se trata de un problema complejo (Amparo *et al.*, 2009).

Se ha observado que la presencia de AGPI-CL de la serie  $\omega$ -3 principalmente el EPA y el DHA, tanto en la dieta de la madre, como en la leche materna o su suplementación a fórmulas infantiles, puede ejercer efectos positivos en el desarrollo de funciones cognitivas, de la función visual y de la función inmunitaria. Como consecuencia actualmente se suplementan la mayoría de las leches infantiles en Europa con este tipo de ácidos grasos.

El efecto antiinflamatorio de los ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3 ha propiciado la aparición de distintos alimentos funcionales y suplementos alimenticios que lo contienen, con el fin de servir de coadyuvantes en el tratamiento o prevención de la enfermedad cardiovascular. De las aplicaciones de este tipo de ácidos grasos, ésta ha sido la mejor estudiada y en general la bibliografía científica es bastante solida en cuanto a sus beneficios. Por otra parte los ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3 podrían ser también útiles en el manejo de la enfermedad inflamatoria intestinal y de la artritis reumatoide.

### **1.6.2 Ácido linoléico conjugado.**

El CLA o ácido linoléico conjugado es el más común ácido graso  $\omega$ -6 y es el nombre dado a un grupo de por lo menos 28 ácidos grasos encontrados en productos lácteos y carne de rumiante. Durante la biohidrogenación de

microorganismos anaerobios en el rumen se convierten los dobles enlaces cis-cis de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a isómeros cis-trans. Así, son una mezcla de isómeros geométricos y posicionales de ácido octadecadienoico, presentando dobles enlaces en las posiciones 9 y 11, 10 y 12 y 11 y 13, como se observa en la Figura 4. La proporción de los diferentes isómeros es diferente, los lácteos tienen 90 % de 9-cis, 11-trans por ejemplo. Los quesos son una fuente rica de CLA. (Sahidi, 2006). El balance de las diferentes formas varía ampliamente en los suplementos, los alimentos tienen principalmente c9, t11, mientras que los suplementos son altamente ricos en t10, c12, lo cual no se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza, por lo que los suplementos no tienen los mismos efectos en la salud que el CLA obtenido de alimentos (Chin, *et al.*, 1992).

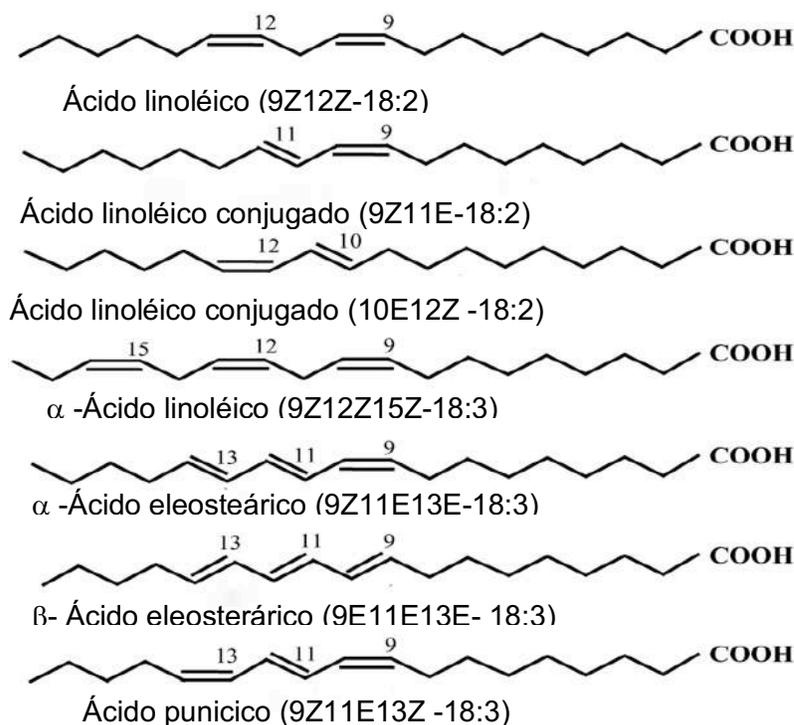


FIGURA 1.4. Estructuras de los Isómeros del ácido linoléico conjugado (CLA). (Tsusuki, *et al.* 2006).

### **1.6.2.1 Características.**

El CLA a diferencia del ácido linoléico tiene los dobles enlaces conjugados, en lugar de tenerlos separados por grupos metilenos. Se sabe que la principal fuente son la carne y productos lácteos de los rumiantes, como vacas, cabras y ovejas, sin embargo el contenido de CLA varía de acuerdo a la alimentación de los animales, así se ha encontrado que el contenido de CLA en animales alimentados con pasto es de 300 a 500 % veces mayor que el contenido en animales que han sido alimentados con granos (Dhiman *et al.*, 1999). Muchas personas ya están consumiendo CLA en sus dietas, el promedio de ingesta en Estados Unidos es de 151 mg por día para mujeres y 212 mg para hombres (Ritzenthaler *et al.*, 2001).

### **1.6.2.2 Actividad biológica.**

La isomería geométrica de los ácidos grasos es importante en términos nutricionales. La mayoría de los ácidos grasos que se encuentran naturalmente poseen isomería *cis*, sin embargo, en la dieta habitual se suele consumir una pequeña pero no despreciable porción (1-7 g/día) de ácidos grasos con isomería *trans*. Estos ácidos grasos provienen esencialmente de la manipulación tecnológica a la que son sometidos los aceites y las grasas para adaptarlos al consumo humano y ejercen usualmente efectos negativos sobre la salud, pero se ha descubierto que algunos de estos isómeros podrían tener efectos beneficiosos para la salud humana, como es el caso del CLA, una mezcla de isómeros del ácido linoléico con al menos un doble enlace en la posición *trans*. La mejor fuente dietética de CLA es el consumo de carnes y productos lácteos procedentes de rumiantes. En una dieta mixta occidental media se estima que el consumo de CLA puede ser de hasta 1.5 g/día. En cuanto a los efectos nutricionales y para la salud derivados del consumo de CLA, son muchas las comunicaciones científicas que informan sobre las propiedades atribuidas al ácido graso. Varios estudios han proporcionado datos de que el CLA normaliza las dislipidemias y reduce las placas ateromatosas en animales

experimentales. Así, se ha descrito que el CLA al 1% como suplemento en la dieta reduce el colesterol en las fracciones de las lipoproteínas y la formación de ateromas en la aorta en las ratas hipercolesterolémicas. Recientes investigaciones sobre los efectos beneficiosos del CLA se han centrado sobre las actividades de sus diferentes isómeros, Evidencias recientes han demostrado que el CLA 18:2 t10, c12 es el isómero ligado a sus efectos hipocolesterolemiantes. Este isómero reduce las actividades de lipoproteína lipasa, triacilglicerol intracelular y glicerol. Por otro lado numerosos estudios han demostrado los efectos del CLA sobre la reducción de grasa corporal, sobre el aumento de masa muscular y sobre la reducción de tejido adiposo en animales de experimentación. La información obtenida al respecto al efecto del CLA en la reducción de peso corporal sugiere que el ácido graso afectaría la interconversión metabólica de los ácidos grasos y produciría una activación de la lipólisis, probablemente por una activación de la beta-oxidación mitocondrial. Produciría, además una disminución de los niveles de leptina y una estimulación de la actividad de la enzima carnitina-palmitoil transferasa. La inhibición de la actividad de la enzima lipoproteína lipasa dependiente de la heparina también podría estar involucrada en el efecto modulador del peso corporal que produce el CLA, ya que disminuiría la biodisponibilidad de los ácidos grasos hacia los tejidos extrahepáticos.

El cuanto a sus efectos antidiabetogénicos, el uso del CLA en pacientes con diabetes de tipo 2 que cuando el suministro fue de 6 g/día durante 8 semanas causó una disminución significativa en la concentración de la glucosa en el ayuno, la leptina, el índice de masa corporal y el peso. Se ha demostrado que el aporte de CLA en la infancia mejora la intolerancia a la glucosa asociada con la diabetes. El suplemento de CLA normaliza la tolerancia a la glucosa y mejora la hiperinsulinemia.

No obstante, los resultados obtenidos en seres humanos en el control de peso son muy pobres, y con respecto a la influencia sobre la resistencia insulínica, algunos estudios indican que lejos de provocar un efecto beneficioso, conducen a una mayor resistencia insulínica en individuos con diabetes tipo 2 por lo que son necesarios más estudios que aclaren si el CLA es realmente un ingrediente seguro para los seres humanos (Gil, 2010).

Rojas-Iglesias en 2018, tomando en cuenta las propiedades antiaterogénicas, antihipertensivas, antioxidantes y antiinflamatorias del CLA evaluó su efecto en la función vascular en ausencia de hormonas sexuales, utilizando un modelo murino orquidectomizado, donde reporta que la dieta suplementada con 1.8 %(p/p) de CLA tuvo un efecto cardioprotector al disminuir hasta 3 veces en la arteria aorta y en la mesentérica la presencia de oxisteroles totales, los cuales, cuando se encuentran en concentraciones elevadas, participan en el desarrollo de ateroma y enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte a nivel mundial.

### **1.6.3 Ácidos grasos de cadena media.**

Los ácidos grasos de cadena media (AGCM) son ácidos grasos saturados con 6 a 12 átomos de carbono, es decir ácido hexanoico o caproico (C6:0), ácido octanoico o caprílico (C8:0), decanoico o cáprico (C10:0) y ácido dodecanoico o laúrico (C12:0) (Osborn y Akoh, 2002).

Los AGCM y los triacilglicéridos de cadena media (TCM) son reconocidos por sus beneficios en la salud, son usados en nutrición enteral y parenteral para una serie de condiciones médicas de pacientes que sufren mala absorción de grasas, una mala digestión, dificultades metabólicas relacionadas a la fibrosis quística, la enfermedad de Crohn, colitis y enteritis (Kabara 2000; Pfeuffer y Schrezenmeir 2002). Pueden ser incorporados en fórmulas infantiles para ayudar a la digestión de la grasa de sistemas digestivos inmaduros. Los suplementos de TCM se venden para el propósito de incrementar el metabolismo para la reducción de peso y proveer energía adicional para actividades deportivas (Tsuji *et al.*, 2001; Che Man y Abdul Manaf 2006; St-Onge y Bosarge 2008).

Se obtienen de aceites de frutos tropicales como el coco y la palma donde el ácido laúrico es presente en grandes cantidades. Los TCM tienen valores calóricos de 8.3 Kcal/g, mientras que los AGCM son más hidrofílicos que su contraparte de cadena larga y estos no necesitan ser solubilizados como micelas como un

prerrequisito para su absorción. Los TCM pueden pasar a la vena porta y fácilmente ser oxidados en el hígado para servir como fuente de energía en lugar de ser absorbidos a través del sistema linfático intestinal (Asakura *et al.*, 2000). Debido a que los TCM aumentan el gasto energético en humanos, puede servir como ingrediente en alimentos para la pérdida de peso. El total del gasto energético al consumir TCM fue de 48 y 65 % veces mayor en individuos delgados y obesos respectivamente; en comparación con TAG de cadena larga (Scalfi *et al.* 1991). Sin embargo, St-Onge y Jones (2003) reportaron que la oxidación de la grasa fue mayor en individuos delgados que en obesos.

### **1.6.3.1 Características.**

Las grasas dietarias contienen principalmente ácidos grasos de 14 o más carbonos; sin embargo existen algunas fuentes naturales con altas cantidades de ácidos grasos de cadena media (mayores al 50 % en peso del total de ácidos grasos) como los aceites de coco y de palma (Willis *et al.*, 1998). La leche de vaca contiene de un 4 a 12 % de ácidos grasos C 6:0 a C 10:0 y de un 2 a 5 % de C 12:0 (Jensen, 2002). Los aceites de ácidos grasos de cadena media son producidos por hidrólisis del aceite de coco o de palma, separación de los ácidos grasos libres de cadena media y subsecuente reesterificación. Estos aceites contienen casi exclusivamente ácidos octanoico y decanoico, en proporciones desde 50:50 hasta 80:20 (Bach y Babayan, 1982; Babayan, 1981).

Los triacilglicéridos de cadena media, en comparación con los triacilglicéridos constituidos principalmente por ácidos grasos saturados de cadena larga, poseen un bajo peso molecular, un tamaño de partícula pequeño y un bajo punto de fusión, son líquidos a temperatura ambiente y contienen una menor densidad energética (8.4 contra 9.2 Kcal/g). Estas propiedades físicas y químicas distintas marcan la diferencia en cómo se absorben y metabolizan estos ácidos grasos (Marten *et al.*, 2006).

La hidrólisis intraluminal de los triacilglicéridos de cadena media es más rápida

y más eficiente que la hidrólisis de los triacilglicéridos de cadena larga y, la absorción de los ácidos grasos de cadena media libres es también más rápida y más eficiente que la absorción de los ácidos grasos de cadena larga. A diferencia de éstos últimos, los ácidos grasos de cadena media estimulan en menor grado la secreción de la colecistoquinina, los fosfolípidos biliares y el colesterol; y pueden ser absorbidos en presencia de la lipasa pancreática o en ausencia de sales biliares (Willis *et al.*, 1998; Bach y Babayan, 1982).

La mayor parte de los ácidos grasos de cadena media son absorbidos y transportados hasta el hígado, mientras que los ácidos grasos de cadena larga son incorporados a los quilomicrones y llevados a la circulación sistémica vía el sistema linfático; en los hepatocitos, así como en otras células, los ácidos grasos de cadena media son tan rápidamente oxidados como la glucosa; no requieren de la enzima carnitin-palmitoil-transferasa para su transporte intramitocondrial, cruzan fácilmente su membrana y dentro de éstas son activados por la enzima cadena media acil CoA sintetasa (Willis *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1985).

### **1.6.3.2 Actividad biológica.**

Estudios recientes confirman el potencial de los ácidos grasos de cadena media para reducir el peso corporal y particularmente la grasa corporal; reducir la secreción de lipoproteínas y atenuar la respuesta postprandial a los triacilglicéridos. Además, su administración en cantidades moderadas, en dietas con bajas cantidades de grasas, reduce más rápida y eficientemente los niveles lipídicos séricos que los ácidos grasos mono o poliinsaturados (Marten *et al.*, 2006; Kasai *et al.*, 2003b; Nosaka *et al.*, 2003; St Onge *et al.*, 2003; St Onge y Jones, 2002).

En animales alimentados con triacilglicéridos de cadena media, se obtuvo una menor ganancia de peso corporal que con la administración de dietas isoenergéticas conteniendo ácidos grasos de cadena larga; la pérdida de peso fue asociada con una disminución en la acumulación grasa. Por otra parte, la alimentación isoenergética con triacilglicéridos de cadena media provocó un mayor incremento de la

termogénesis que los triacilglicéridos de cadena larga en roedores (Baba *et al.*, 1982; Bach y Babayan, 1982) y también en humanos (St Onge *et al.*, 2003; St Onge y Jones, 2002; Scalfi *et al.*, 1991).

En estudios realizados en sujetos obesos, la administración de triacilglicéridos de cadena media, en comparación con el aceite de oliva, redujo significativamente la grasa corporal (St Onge *et al.*, 2003). En Japón, estudios también con sujetos obesos, demostraron una pérdida de peso y grasa corporal significativas, después de la administración de triacilglicéridos de cadena media en dosis de 10 (Tsuji *et al.*, 2001), 5 (Osaka *et al.*, 2003) y 1.7 g por día (Kasai *et al.*, 2003b) durante 12 semanas, mientras que no se detectaron efectos significantes en sujetos no obesos sometidos a la misma dieta (Tuja *et al.*, 2001).

La administración de ácidos grasos de cadena media reduce la respuesta postprandial a los triacilglicéridos, en comparación con la administración de ácidos grasos de cadena larga, tanto en animales (Malogréis *et al.*, 1996) como en humanos (Asadura *et al.*, 2000); también se redujo la respuesta postprandial al colesterol (Kasai *et al.*, 2003a). Por otra parte, una administración moderada de ácidos grasos de cadena media (10 g por día) con una dieta baja en calorías, por cuatro semanas, disminuyó los niveles séricos de glucosa e insulina en sujetos obesos, en comparación con una dieta con ácidos grasos de cadena larga (Krotkiewski, 2001).

*In vivo*, los triacilglicéridos de cadena media pueden reducir el daño intestinal al regular la respuesta inmune, aumentando la secreción de lipopolisacáridos por la sobre-expresión de la inmunoglobulina A (Kono *et al.*, 2004). Además, pueden reducir la hepatotoxicidad inducida por alcohol (Ronis *et al.*, 2004).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Un gran número de compuestos bioactivos que han demostrado ser benéficos para la salud, no han podido ser aprovechados debido a sus características que no permiten su fácil adición en alimentos, ya sea por su carácter lipofílico y/ o por ser susceptibles a condiciones ambientales durante su preparación o almacenamiento. Tal es el caso de la curcumina que ha demostrado contar con múltiples propiedades funcionales pero que presenta una baja biodisponibilidad, por lo que se hace necesario diseñar un medio capaz de solventar dicho problema.

Existen diferentes sistemas para encapsular, proteger y entregar dichos compuestos y por lo tanto incrementar su biodisponibilidad y utilización por el organismo. Entre ellos está el uso de nanoemulsiones, que se diferencian de una emulsión principalmente en el tamaño de las partículas dispersas, permitiendo que dichas diferencias les otorgue múltiples ventajas como sistemas acarreadores. El éxito en el uso de estos sistemas depende en gran medida de la estabilidad de los mismos, la cual se logra a través de la adición de un emulsificante que permita mantener el mayor tiempo posible un tamaño de gota adecuado para su absorción en el tracto gastrointestinal. A pesar de existir un gran número de emulsificantes naturales para su uso en alimentos, como los monoacilglicéridos y diacilglicéridos, que también presentan beneficios nutricionales y que es posible modificarlos por vía enzimática para mejorar sus propiedades funcionales o nutricionales. Así, se plantea en el presente proyecto estructurar monoacilglicéridos y diacilglicéridos que contengan lípidos bioactivos ( $\omega$ -3, CLA y AGCM) para aplicarlos como emulsificantes en nanoemulsiones acarreadoras de curcumina en la búsqueda de incrementar su biodisponibilidad y aprovechar los beneficios a la salud de cada componente (principio activo, emulsificante y lípidos bioactivos).

### **3. HIPOTESIS**

Las nanoemulsiones acarreadoras de curcumina, preparadas con monoacilglicéridos y diacilglicéridos modificados enzimáticamente con lípidos bioactivos, como emulsificantes incrementarán la biodisponibilidad de la curcumina.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad emulsificante de monoacilglicéridos y diacilglicéridos modificados enzimáticamente con ácidos grasos  $\omega$ -3, ácidos grasos de cadena media y ácido linoléico conjugado en nanoemulsiones acarreadoras de curcumina a través de su caracterización y evaluación de la biodisponibilidad.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener Monoacilglicéridos y Diacilglicéridos a través de la esterificación enzimática del glicerol con ácidos grasos  $\omega$ -3, ácidos grasos de cadena media o ácido linoléico conjugado para su utilización como emulsificantes.
2. Desarrollar nanoemulsiones acarreadoras de curcumina por ultrasonificación para determinar la efectividad emulsificante de los monoacilglicéridos y diacilglicéridos modificados
3. Evaluar las características y estabilidad de las nanoemulsiones acarreadoras de curcumina preparadas con los emulsificantes modificados.
4. Determinar la biodisponibilidad de la curcumina encapsulada en las nanoemulsiones preparadas con los emulsificantes modificados, a través de un modelo animal.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y equipos que se utilizarán dentro de esta investigación se describen a continuación.

### 5.1 Reactivos

Para las reacciones de glicerólisis, se utilizó glicerol ( $\geq 98\%$ ) de Golden Bell (Ciudad de México). Las mallas moleculares de 3 Å, el Kolliphor<sup>®</sup>EL, el ácido hexanoico ( $\geq 99.5\%$ ), el ácido octanoico ( $\geq 98\%$ ), el ácido decanoico ( $\geq 98\%$ ), el metóxido de sodio metanólico 0.5M, la piridina (99.8%), el TMCS (clorotrimetilsilano  $\geq 99\%$ ) y el HMDS (Hexametildisilazano,  $\geq 99\%$ ) se compraron a Sigma-Aldrich (Ciudad de México). Los triacilglicéridos de cadena media (MCT) contenidos en un aceite comercial de la marca Swanson<sup>®</sup> (Fargo, ND). El ácido linoléico conjugado (CLA) fue de la marca comercial Clarinol<sup>®</sup> A-95 Kosher de la compañía Lipid Nutrition (Maywood, NJ). El aceite de pescado utilizado fue el 20/50 TG Aceite de pescado de Ocean Nutrition Canada (Nova Scotia, Canadá).

El sulfato de sodio anhidro, la dimetilformamida, el hidróxido de sodio, el ácido fosfomolibdico, el cloruro de manganeso, el carbonato de sodio, la fenoftaleína, el ácido clorhídrico, el cloruro de sodio y de potasio, el fosfato de sodio y de potasio, el dodecilsulfato de sodio, el ácido acético, el acetato de etilo y el ácido sulfúrico fueron de la marca Golden Bell (Ciudad de México). La curcumina fue adquirida en LKT Laboratories (St.Paul, MN).

Los biocatalizadores inmovilizados empleados fueron Novozym 435 (Lipasa de *Candida Antártica*, fracción B; EC 3.1.1.3); Lipozyme RMLM (Lipasa de *Rhizomucor miehei*; EC 3.1.1.3) y Lipozyme TLIM (Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*; EC 3.1.1.3) obsequiadas por NOVO (Salem, VA). Los estándares usados fueron el ácido

tridecanoico (C 13:0), el 1-Monolauril-rac-glicerol (C 12:0), el Dilaurin (C 12:0), el Trilaurin (C 12:0) y el FAME Mix C8-C24, todos adquiridos de SUPELCO (Bellefonte, PA). Todos los solventes y reactivos eran de grado analítico y se compraron en Tecsiquim (Toluca, México).

Se utilizaron placas de aluminio para cromatografía en capa fina (TLC) con gel de sílice 60 F254 (20 x 20 cm), la sílica y el ácido silícico que sirvieron como fase estacionaria en las columnas de separación fueron adquiridas en Merck (Darmstadt, Alemania). La fosfatidilcolina utilizada como emulsificante de referencia fue de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama). La heparina sódica de 1000 UI/ mL fue adquirida de PiSA farmacéutica (Guadalajara, Jalisco). Agua Milli-Q (agua purificada por tratamiento con un equipo Milli-Q. Milli-Q corp. Bedford, MA, USA) fue utilizada para preparar todas las soluciones y nanoemulsiones.

## 5.2 Equipos

Para la elaboración y caracterización de las nanoemulsiones se utilizaran los siguientes equipos.

**a) Homogeneizador.** T25 digital ULTRA-TURRAX homogenizer (IKA Works, Inc., SE Wilmington NC). Este equipo homogeneiza entre 1 a 2,000 mL, con velocidades de 3,500 a 24,000 rpm, con un vástago de dispersión de acero inoxidable, esterilizable (S18N-19G) y un indicador de velocidad digital.

**b) Ultrasonificador.** Branson Digital Sonifier S-450D (Emerson Electric Co., St. Louis MO). Este equipo es un disruptor de ultrasonido que aplica un campo acústico que produce ondas interfaciales que se vuelven inestables, y que con el tiempo resultan en la erupción de la fase oleosa que se encuentra disuelta en el medio acuoso. Aplica el principio de cavitación acústica (formación y posterior colapso de microburbujas por las fluctuaciones de la presión de una onda de sonido simple). Cada colapso de las burbujas provoca niveles de turbulencia extremos localizados que rompen las partículas primarias de aceite en partículas de tamaño nanométrico.

**c) Zetasizer.** Medidor de tamaño de partícula Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.,

Worcestershire UK). Este equipo utiliza la tecnología de difracción de luz Láser y compensación por teoría MIE según Norma ISO13320-1 de noviembre 1999 para obtener tamaños de partícula en un intervalo de medida entre 20 nanómetros y 2 milímetros. Está equipado con un Láser de He-Ne combinado con una fuente de luz azul de estado sólido de baja longitud de onda, para la medida a alta resolución de las partículas submicrónicas. Está diseñado para medir el tamaño de partícula, para determinar la distribución de los diferentes tamaños de partícula dentro de la muestra, de emulsiones de nanopartículas y proteínas, tanto para muestras diluidas como concentradas, así como el potencial Z.

**d) Analizador óptico:** para estudio de estabilidad de dispersiones líquidas serie Turbiscan Lab. La tecnología del Turbiscan consiste en medir a través de la tecnología MLS-Multiple Light Scattering o Dispersión de Luz Múltiple que se basa en el envío de fotones sobre la muestra desde una fuente de luz infrarroja de 880 nm de longitud de onda. Estos fotones, después de haber sido dispersados muchas veces por las partículas o gotas que conforman la emulsión o suspensión, emergen de la muestra y son recogidos por dos detectores situados en el cabezal óptico del equipo a 0° (detector de transmisión) y a 135° (detector de backscattering). El detector de transmisión se emplea principalmente para muestras no opacas o transparentes y el detector de backscattering se emplea para muestras opacas. Las intensidades de luz en Transmisión (T) y Reflexión (BS), en función de la altura de la muestra detectan el cambio de tamaño de partícula en procesos de coalescencia y floculación, y la separación de fases en procesos de sedimentación o flotación. Con los datos recogidos de intensidad de luz, se obtienen unos perfiles que permiten caracterizar la dispersión y detectar procesos como sedimentación, floculación, coalescencia, separación de fases y flotación entre otros.

Para las reacciones enzimáticas se utilizó:

**e) Agitador Orbital:** Thermo Scientific MaxQ 4450 el cual es agitador incubadora y refrigerador. Combina temperaturas de incubación/refrigeración con un movimiento de agitación orbital en una unidad de tamaño reducido.

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 Obtención de Mono y Diacilglicéridos modificados.

La fuente para la obtención de ácidos grasos libres de pescado y de cadena media fueron aceites comerciales ricos en triacilglicéridos, por lo que requieren de un proceso saponificación para dejar disponibles los ácidos grasos y así reaccionen con el glicerol y formar los compuestos deseados.

#### ***5.3.1.1 Saponificación del aceite de pescado y del aceite de triacilglicéridos de cadena media (TCM) para la obtención de ácidos grasos libres.***

Los ácidos grasos libres se prepararon mediante la saponificación del aceite comercial tomando como base la metodología de Kim y colaboradores (2006), de la siguiente manera: en un matraz Erlenmeyer de 1L se depositaron 100 g del aceite, se añadieron 40 g de hidróxido de sodio en lentejas, 300 mL de etanol y 100 mL de metanol -para el caso del aceite de pescado y 100 mL de agua para el caso de TCM- se colocó además, un agitador magnético; se taparon los matraces con un tapón de hule que tenía una horadación por donde se introdujo un tubo de vidrio que permitía el reflujo y la salida de vapores formados. La mezcla se colocó en una parrilla para su calentamiento y agitación, después de la completa disolución de los componentes, se incrementó la temperatura lentamente, para evitar que, por efecto del reflujo, el contenido del matraz se proyectara a través del tubo. Una vez que el reflujo fue constante, se mantuvo durante al menos 30 minutos o hasta que se observó la formación del jabón (un sólido opaco, blanco para el caso de AGCM o ligeramente amarillo para el aceite de pescado). Se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que solidificó por completo. Se adicionaron 200 mL de agua para permitir su solubilización y una vez en estado líquido se transfirió a un embudo de separación de 2L, donde se le adicionaron 400 mL de hexano. La mezcla se agitó y se dejó separar en dos fases, de la cual la fase inferior (acuosa) se transfirió a un vaso de precipitado

donde se midió y ajustó el valor de pH entre 1 y 2 con HCl concentrado, provocando una separación de fases. La mezcla acidificada fue puesta en un embudo de separación, descartándose la fase inferior formada. Los ácidos grasos libres fueron extraídos mediante un lavado con 400 mL de hexano y 200 mL de agua seguido por agitación en el embudo. Se realizó un segundo lavado con 200 mL de agua destilada y se eliminó la fase inferior, mientras que la superior (fase hexánica) con los ácidos grasos se pasó por un embudo que contenía una cama de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para eliminar humedad. Finalmente se hizo pasar a través de una columna de vidrio empacada con algodón, sulfato de sodio anhidro y silica gel activada (malla de 230 – 400) para su limpieza usando todo el hexano necesario, el hexano se evaporó en un rota evaporador a  $40^\circ\text{C}$  en condiciones de vacío. Los ácidos grasos obtenidos fueron almacenados en congelación con atmosfera de nitrógeno para su posterior análisis por cromatografía de gases.

### **5.3.1.2 Reacciones de glicerólisis enzimática**

Para la formación del mono y el diacilglicéridos con lípidos bioactivos ( $\omega$ -3, CLA y AGCM) se llevaron a cabo cinéticas para determinar las mejores condiciones y así obtener el mayor rendimiento de los mismos, ya que durante la reacción de glicerólisis también pueden producirse triacilglicéridos, los cuales no son de interés para este trabajo.

En el caso de los MAG y DAG de  $\omega$ -3 y los de CLA se tomaron como base las condiciones obtenidas por Baeza (2013) y Kim *et al.* (2006) respectivamente. Se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer con tapón de rosca y con capacidad para 25 mL, los cuales se colocaron en un agitador orbital MaxQ 4450, donde se controló la temperatura, la velocidad de agitación y el tiempo de reacción. La mezcla de reacción consistió en la cantidad de glicerol y ácidos grasos de acuerdo a la relación de sustratos y el tipo de enzima (Tabla 6.1). Se utilizaron 10% de mallas moleculares de  $3\text{Å}$  como mecanismo para eliminar el agua formada durante las reacciones de esterificación que dan lugar a los acilgliceroles, a

diferencia de los trabajos de referencia que utilizaron un reactor al vacío para el mismo fin.

Tabla 5.1. Condiciones de reacción de glicerólisis para la preparación de los emulsificantes de  $\omega$ -3 y ácido linoléico conjugado (CLA).

Emulsificante	RS (Gli:AG)	Enzima	Tiempo (h)	Velocidad (rpm)	Temperatura (°C)	Referencia
MAG- $\omega$ 3	3:1	Novozym 435 (15%)	2.5	500	65	Baeza, 2013
DAG- $\omega$ 3	3:1	Novozym 435 (15%)	2.5	500	75	Baeza, 2013
MAG-CLA	1:1	Lipozyme RMIM (5%)	4	450	30	Kim <i>et. al</i> , 2006
DAG-CLA	1:4	Lipozyme RMIM (5%)	8	450	40	Kim <i>et. al</i> , 2006

MAG: monoacilglicerol, DAG: diacilglicerol, Gli: glicerol y AG: ácido graso.

Debido a que no se encontraron referencias para la preparación de acilgliceroles con AGCM, se siguió el protocolo de búsqueda de las mejores condiciones de acuerdo al trabajo reportado por Ochoa en 2013, donde evalúa diferentes enzimas, relaciones de sustratos, concentración de enzima y temperatura de reacción. Así, se realizó un estudio evaluando tres lipasas inmovilizadas: Lipozyme TLIM, Lipozyme RMIM y Novozym 535, en condiciones controladas de temperatura de 50 °C y 60 °C, a 300 rpm de velocidad de agitación, además de tres fuentes de AGCM (Una mezcla ácidos grasos libres C 6:0, C 8:0 y C10:0; un aceite de TCM y los ácidos grasos libres obtenidos por saponificación de dicho aceite), en una relación de sustrato de 1:1 y 1:4 (p/p) de Glicerol: AGCM y 5,10 y 15 % de enzima y 10 % de mallas moleculares; los porcentajes fueron en proporción al peso total de la mezcla. Esta mezcla se dejó reaccionar durante 12 h. Se tomaron muestras de 0.5 mL en tiempos de 0, 1, 2, 4, 8, 12 horas, con la finalidad de determinar en las mejores condiciones para la obtención del mayor rendimiento de cada emulsificante. Al término de cada muestreo se saturó el espacio libre de los matraces con nitrógeno gaseoso con para eliminar la posible humedad, desplazar al oxígeno y así evitar la oxidación de los ácidos grasos.

Una vez concluidos los tiempos de cada reacción, se le adicionó cloroformo en cantidad suficiente para diluir la mezcla y se filtró para recuperar tanto la enzima inmovilizada como las mallas moleculares utilizadas.

Una vez determinadas las mejores condiciones de la reacción, se produjeron en mayor cantidad cada uno de los MAG y DAG con los lípidos bioactivos para ser utilizados como emulsificantes en la formulación de las nanoemulsiones.

En el caso de la mezcla de reacción para la formación de acilgliceroles de  $\omega$ -3, se le eliminaron los ácidos grasos libres que no reaccionaron de la siguiente manera; al volumen total de la mezcla de reacción se le adicionó 3.3 volúmenes de etanol y 3 gotas de fenoftaleína, se les adicionó una solución de NaOH 1N hasta el vire a rosa. Los ácidos grasos fueron extraídos en un embudo de separación con al menos 3 volúmenes de hexano, se elimina el hexano que contiene los ácidos grasos libres en un rotaevaporador a 50 °C y la mezcla resultante, libre de ácidos grasos, se utilizó para su separación en columna.

### **5.3.2 Análisis por cromatografía de gases.**

La composición de los ácidos grasos libres resultantes de la saponificación, así como la del ácido linoléico conjugado se analizó por cromatografía de gases para determinar su peso molecular, necesario para los cálculos de las relaciones molares. El tratamiento de las muestras para la formación de los ésteres de metilo de los ácidos grasos se efectuó de acuerdo a la siguiente metodología: la metilación de los ácidos grasos esterificados a la molécula del glicerol se llevó a cabo con una solución de Metóxido de sodio 0.5 M metanólico y para los ácidos grasos totales con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> metanólico 1M.

En la metilación de los ácidos grasos esterificados se colocaron alícuotas (100  $\mu$ L) de la muestra original en tubos de ensaye, se utilizaron 100  $\mu$ L del estándar interno C13:0 en hexano (1.28 mg/ mL); se evaporó el hexano y adicionó 2.5 mL de Metóxido de sodio 0.5 M en metanol, en un calentador de bloque seco (thermoblock) se calentó a 80 °C durante 10 minutos, pasado ese tiempo se dejó enfriar en un baño

de hielo. Para el caso de ácidos grasos de pescado y ácido linoléico conjugado se adicionó 1.83 mL de dimetilformamida (DMF); se adicionaron 2 mL de hexano y se agitó con ayuda de un vórtex, se añadieron 5 mL de una solución de 90 g/L de  $\text{NaCO}_3$ ; finalmente se centrifugó a 3500 rpm por 10 min, se transfirió la capa superior hexánica en un vial para cromatografía de gases y se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al equipo.

Para los ácidos grasos totales se siguió la metodología previamente descrita, cambiando la adición del metóxido de sodio, por 3 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M en metanol y el calentamiento durante 30 min a 60 °C.

El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar HP Innowax de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y un espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ . Para efectuar la separación de los ésteres de metilo la temperatura inicial del horno fue de 190 °C, la cual se incrementó en 4 °C/min hasta alcanzar 210°C y finalmente esta aumentó a 2 °C/min hasta llegar a 230 °C, condición que se mantuvo durante 16 minutos. La temperatura del puerto de inyección y el detector fueron 240 y 250 °C, respectivamente. Se usó nitrógeno alta pureza como gas acarreador a un flujo constante de 1 mL/min.

Los acilglicéridos formados durante las reacciones se determinaron de la siguiente manera: se mezclaron 100 mg de la mezcla de reacción con 1 mL de piridina, 0.2 mL de HMDS y 0.1 mL de TMCS, la mezcla resultante se mantuvo a 40 °C durante 15 minutos. Después de eso, se añadió 1 mL de hexano y la mezcla se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos; Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la capa superior en un cromatógrafo de gases HP modelo 5890 con un detector de ionización de flama y una columna capilar PE-5 (30 m X 0,32 mm X 1  $\mu\text{m}$ ). Las temperaturas del inyector y del detector se establecieron en 300 y 315 °C, respectivamente. El programa de temperatura comenzó a 100 °C durante un minuto, luego alcanzó 300 °C a una velocidad de 10 °C / min y se mantuvo durante 20 minutos.

### **5.3.3 Separación de los mono y diacilglicéridos por cromatografía en columna.**

Después de las reacciones de glicerólisis los diferentes productos formados en la reacción enzimática fueron separados, los monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos, así como el glicerol y los ácidos grasos libres que no reaccionaron. Se empleó una columna cromatográfica de vidrio de 30 cm para la separación en fase sólida empacada con ácido silícico previamente activado en el horno por al menos 1 h y llevado a un 5 % de humedad. Se realizó la separación de acuerdo a Christie y Xianlin (2010) usando 5 fases móvil compuestas de diferentes relaciones de hexano: éter dietílico (0:100; 2:98; 5:95; 15:85 y 100:0 v/v), a un flujo de 1 mL/min; con este sistema de elución el orden salida teórico es el siguiente: TAG >colesterol >DAG y MAG. La separación se monitoreó mediante cromatografía de capa fina (TLC) con hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:2 v/v/v) como fase móvil y una solución metanólica de ácido sulfúrico al 10% como revelador; con este sistema los MAG quedan cerca del origen, seguidos por los ácidos grasos, DAG y TAG. Las fracciones pertenecientes a los emulsificantes modificados fueron agrupadas y almacenadas en atmósfera de nitrógeno y en refrigeración para su posterior uso.

### **5.3.3 Desarrollo de nanoemulsiones con Mono y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.**

Una vez separados y purificados los distintos emulsificantes se procedió a formular las nanoemulsiones O/W que servirán de sistema acarreador de curcumina, con la finalidad de mejorar su biodisponibilidad por vía oral.

#### **5.3.3.1 Formulación de las nanoemulsiones O/W acarreadoras de curcumina.**

Las mejores condiciones presentadas en los estudios realizados dentro del grupo de trabajo del laboratorio de Manejo Postcosecha (Chávez, 2017; Ochoa, 2013

y Cavazos, 2013) se tomaron como punto de partida para el desarrollo de la composición de las nanoemulsiones acarreadoras de curcumina. Las nanoemulsiones están conformadas con los componentes mostrados en la Tabla 6.2, excepto los emulsificantes, los cuales serán los MAG y DAG con  $\omega$ -3, AGCM y CLA.

Tabla 5.2. Formulación de nanoemulsiones acarreadoras de principios activos (Curcumina y ácido betulínico) realizadas en el laboratorio de manejo de Postcosecha de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos (UNIDA).

Referencia	Fase oleosa 5 %			Fase acuosa 95 %	
	TCM	Principio activo	Glicerol	Agua	Emulsificante
<b>Ochoa, 2013</b>	5 %	AB 5 mg/gNE	25 %	60 %	PC: $\omega$ 3 10 %
<b>Cavazos, 2013</b>	5 %	Cur 5 mg/gNE	25 %	60 %	PC:AGCM 10 %
<b>Chávez, 2017</b>	5 %	AB 5 mg/gNE Cur 5 mg/gNE	25 %	60 %	LPC 10 %

AB: Ácido betulínico, Cur: curcumina, PC: fosfatidilcolina, LPC: lisofosfatidilcolina, ACGM: ácidos grasos de cadena media.

Después de una serie de pruebas preliminares las formulaciones de las nanoemulsiones acarreadoras de curcumina usando MAG y DAG de lípidos bioactivos resultó lo siguiente: El contenido de la fase acuosa representó el 97 % del peso total de la NE y el 3 % fue ocupado por la fase oleosa. La fase acuosa contenía 49 % de agua Milli-Q y 50 % de glicerol, además fueron probados los emulsificantes a dos niveles, 1 y 3.5 %. La fase oleosa contenía 3% de aceite de triglicéridos de cadena media, 5 mg de curcumina por g de NE y dos niveles de Kolliphor®EL (1 y 0.5 % respectivamente). Todos los porcentajes indicados son en relación al peso total de la nanoemulsión.

Las condiciones del proceso de emulsificación para la formación de nanoemulsiones se seleccionaron de acuerdo a la distribución del tamaño promedio de partícula dentro del intervalo establecido para ser consideradas nanoemulsiones ( $\leq$  200 nm), una vez aprobado este criterio, se caracterizaron con parámetros como

Índice de polidispersidad (PDI) , potencial zeta y se midió la estabilidad con ayuda del Turbiscan® Lab Expert.

### ***5.3.3.2 Preparación de las nanoemulsiones O/W acarreadoras de curcumina.***

El proceso de elaboración de las nanoemulsiones O/W fue el siguiente: Se pesaron por separado las fases de acuerdo a la formulación descrita previamente, para la fase oleosa la curcumina en un vaso de precipitado de 50 mL, se le adicionó Kolliphor®EL y se mezclaron con ayuda de una espátula, finalmente se le agregó el aceite de cadena media. Para la fase acuosa en un tubo de ensayo se pesó agua purificada tipo Milli Q® a la cual se le adicionó el emulsificante y el glicerol, ambos en porcentajes de acuerdo a la formulación a probar. Además de evaluar los emulsificantes por separado, es decir MAG o DAG, también se utilizó la mezcla de reacción de cada lípido bioactivo, mezcla que contenía una alta proporción de MAG y DAG.

Una vez pesados por separado, ambas fases se sumergieron en un baño de ultrasonido durante 20 minutos a 60 °C para favorecer su homogeneización posterior, inmediatamente después de terminado este tiempo se adicionó la fase oleosa a la acuosa y se mezclaron vigorosamente con una espátula, posteriormente por medio de un homogeneizador Ultraturrax 20,000 rpm durante 3 min a intervalos de 1 min se formó una emulsión. Después de esto, la emulsión se vertió en los viales del ultrasonificador Branson y se programó a la amplitud deseada (20 o 30%); el sonotrodo se introdujo a intervalos de 1 min durante 2 o 3 min (dependiendo de los resultados de la cinética de sonicación); a cada muestra y tiempo se le midió el tamaño de partícula con un equipo Zetasizer Nano-ZS90. Las nanoemulsiones obtenidas se almacenaron a 5 °C para su estudio de estabilidad.

### **5.3.4 Caracterización de las nanoemulsiones con Mono y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.**

Para la caracterización de las nanoemulsiones se evaluó el tamaño del glóbulo, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial Z con ayuda del equipo Zetasizer Nano-ZS90

Para el análisis del tamaño de glóbulo y el PDI se depositaron 20  $\mu\text{L}$  de la NE a evaluar en una celda de plástico y se diluyó 1 mL de agua purificada Milli Q<sup>®</sup>, cada muestra fue leída por triplicado.

Se analizó la carga superficial de los glóbulos midiendo la carga media de su superficie como potencial zeta. El contenido de la celda anterior, se transfirió a la celda capilar plegada con electrodos y se leyó por triplicado cada muestra.

### **5.3.5 Evaluación de la estabilidad de las nanoemulsiones.**

Como parte de la evaluación de las nanoemulsiones se utilizó el equipo Turbiscan Lab<sup>®</sup>Expert donde se determinaron los siguientes parámetros: el Turbiscan Stability Index (TSI), Mean Value (Valor promedio) y Peak Thickness (anchura de capa). El TSI ofrece un número simple y automático para entender de una forma global la estabilidad de un sistema disperso y permite hacer comparaciones entre ellos para determinar cuál es más estable de manera general. Para conocer la intensidad y velocidad de la coalescencia o floculación de una emulsión y el cambio de la media del tamaño de partícula a través del tiempo se calculará el Mean Value. Finalmente el Peak Thickness será útil para caracterizar el espesor de las fases que se separaron y la velocidad con que lo hicieron. Este equipo no requiere preparación alguna de la muestra, por lo que se depositarán 25 mL de la nanoemulsión a evaluar en la celda de lectura y se obtendrán los datos para su análisis con el Software incluido en el equipo.

En la determinación de la estabilidad las NE almacenadas durante 5 semanas a una temperatura de 4 °C, fueron evaluados los parámetros ya mencionados cada semana. Los niveles de significancia estadística ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos serán evaluados usando la prueba de comparación de medias de Tukey.

Dentro de las mediciones de estabilidad se volverán a tomar los parámetros obtenidos en el Zetasizer; tamaño promedio de partícula, PDI y potencial zeta, para monitorear los posibles cambios que pudieran sufrir las NE.

#### **5.2.4 Estudio de la biodisponibilidad de la curcumina en las nanoemulsiones preparadas con monoacilgliceroles y diacilgliceroles**

Para evaluar la biodisponibilidad de la curcumina de las diferentes nanoemulsiones preparadas con los emulsificantes modificados enzimáticamente, se realizaron ensayos *In vivo* utilizando un modelo murino.

##### **5.2.4.1 Modelo murino**

Se usaron 20 ratas machos de la cepa Wistar de 6 meses de edad y con peso alrededor de 400 a 500 g que se manejaron de acuerdo a los protocolos establecidos en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2008). Las ratas tuvieron un periodo de adaptación al bioterio de dos semanas previo al experimento, durante el cual fueron alimentados con dieta estándar (Tekland Global diet 2018s, Harlan) y mantenidos a temperatura controlada de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , una humedad relativa del 50% y ciclos de luz/obscuridad de 12 h.

Previo al experimento, los animales fueron pesados y de acuerdo a este parámetro, aleatorizados en grupos de 4 animales para cada tratamiento, a cada grupo se le aplicó un análisis estadístico ANOVA para asegurar que no existiera diferencia entre los grupos que pudiera afectar los resultados. El alimento fue suspendido antes de la administración oral de los tratamientos.

Los tratamientos evaluados fueron 5: la nanoemulsión empleando PC, la nanoemulsión con la mezcla de reacción acilgliceroles de  $\omega$ -3 y CLA y dos emulsiones de  $\omega$ -3 y CLA. Las nanoemulsiones fueron preparadas con las mejores condiciones encontradas en el trabajo tanto en su caracterización, como en su estabilidad. En la NE estabilizada con PC se tomó como base el trabajo de Chávez,

preparando una NE O/W 5/95 % con 5 mg de curcumina por g de NE; 1 % de Kolliphor®EL y 9 % de emulsificante, 25 % de glicerol y 60 % de agua; la preparación fue la misma que para las demás NE. La emulsión de la reacción de  $\omega$ -3 y CLA fue mezclada únicamente con un homogeneizador Ultraturrax a 10,000 rpm durante 30 s. La dosis administrada fue de 20 mg de curcumina por Kg de peso del animal, por lo que los volúmenes de NE fueron ajustados entre 3.14 y 4.50 mL de la NE correspondiente al peso de la rata, dichos volúmenes se encontraron en el intervalo permitido para este tipo de animales por vía oral (volumen máximo tolerable) que es de 10 mL por Kg de peso.

La sangre fue colectada por el método de corte de cola en rata como se detalla a continuación: en cada animal sin anestesiar y utilizando un método o dispositivo de inmovilización adecuado, se calentó la cola mediante agua caliente durante 5-10 minutos. Pasado ese tiempo se lavó la cola para eliminar cualquier resto de heces u orina y se le aplicó etanol al 70 % dejándolo evaporar. Se situó la cola sobre una superficie plana y limpia y se cortó perpendicularmente con una hoja estéril de bisturí, aproximadamente 1-2 mm desde el extremo de la cola. Se cambió la hoja entre animales. Se aplicó una suave presión proximalmente al corte y recogió la sangre mediante tubos Eppendorf®. Finalmente se aplicó hemostasia mediante presión suave con torunda durante 30-45 segundos. Para la siguiente toma se eliminó la costra formada con una torunda con etanol.

Antes de la administración se tomó la primera muestra de sangre, aproximadamente 0.5 mL, la cual fue reportada como tiempo 0. Inmediatamente después se les administró por vía oral con una cánula intragástrica la NE correspondiente a su grupo y peso. Las muestras de sangre de la cola fueron tomadas a 1, 2, 4, 8 y 12 h después de haber administrado la dosis oral. Las muestras de sangre se pusieron en tubos Eppendorf® de 2 mL con 20  $\mu$ L de heparina por mL de sangre, los cuales fueron centrifugados para obtener el plasma a 4000 rfc por 10 min a 4 °C. Se colectó el plasma (sobrenadante) en otro tubo Eppendorf® y fue almacenado en congelación a -15 °C hasta su análisis.

#### **5.2.4.2 Determinación de la concentración de curcumina en el plasma.**

La metodología fue de acuerdo a lo reportado por Mishra *et al.*, 2011 con algunas modificaciones. Los tubos con plasma fueron descongelados en un baño de agua a 37 °C; una vez descongeladas las muestras se tomaron 250 µL de plasma y fueron puestas en un tubo Eppendorf® al cual se le añadió 25 µL de una solución de ácido acético al 2.8 % (v/v) para estabilizar la curcumina, los tubos fueron agitados con ayuda de un vórtex durante 20 s. Para extraer la curcumina se adicionaron 1.2 mL de acetato de etilo y se colocaron en un baño de ultrasonidos por 10 min. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rfc por 10 min a 4 °C y se separó y transfirió la fase orgánica sobrenadante para posteriormente ser evaporada. Después de esto, la muestra se resuspendió en 500 µL de metanol y se pasó a través de un filtro de membrana (0.45 µm) para ser cuantificados por HPLC. La cuantificación de curcumina en el plasma fue calculado a partir de una curva estándar. El sistema cromatográfico usado para analizar el plasma consistió de una bomba cuaternaria de HPLC (600 Waters), un inyector automático (Waters 717) y un detector UV Visible (Waters 2489). La columna utilizada para la separación fue una Econosphere C18 (Alltech, 250 x 4.6mm, 5 µm) a temperatura ambiente, la fase móvil fue metanol a un flujo isocrático de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. La detección se realizó a una longitud de onda de 430 nm (Akowuah y Zhari, 2008).

Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron obtenidos a partir del análisis de la curva de la concentración de curcumina sobre el tiempo. Los valores para la concentración máxima alcanzada ( $C_{m\acute{a}x}$ ) y tiempo para alcanzarla ( $t_{m\acute{a}x}$ ) serán obtenidos directamente de la curva. El área bajo la curva ( $AUC_{0-t}$ ) de la concentración respecto al tiempo se calculó mediante el método de los trapecios con ayuda del software Geogebra classic 6. Los parámetros farmacocinéticos tales como el tiempo de vida media plasmática ( $t_{1/2}$ ), la constante de eliminación ( $K_{el}$ ) y la biodisponibilidad relativa ( $F_{rel}$ ) serán calculados mediante un análisis no compartamental descrito por Dipiro *et al.*, (2005). Los niveles de significancia

estadística ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos serán evaluados usando la prueba de comparación de medias de Tukey.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de Mono y Diacilglicéridos modificados.

A continuación se presentan los resultados del proceso de obtención de cada monoacilglicéridos y diacilglicéridos estructurados con cada lípido bioactivo.

#### 6.1.1 Saponificación del aceite de pescado y del aceite de triacilglicéridos de cadena media (TCM) para la obtención de ácidos grasos libres.

El aceite comercial de pescado, marca Ocean Nutrición Canadá (Nova Scotia, Canada) así como el aceite comercial de triacilglicéridos de Cadena Media Swanson® se sometieron a una reacción de saponificación de acuerdo a la metodología de Kim *et al.* (2006). A través de varias reacciones de saponificación se logró obtener un volumen final de 450 mL aproximadamente de cada uno de ellos. Se tomó una muestra, por duplicado, y fueron inyectados en el cromatógrafo de gases para conocer su composición, de la cual se muestra el promedio en las siguientes Tablas (6.1 y 6.2).

TABLA 6.1. Perfil de ácidos grasos libres presentes en el saponificado de aceite de pescado.

Ácido graso	Contenido (% molar)	Ácido graso	Contenido (% molar)
C 14:0	0.395± 0.003	C 20:4 ω-6	0.556± 0.000
C 16:0	1.293± 0.006	C 20:3 ω-3	0.754± 0.008
C 16:1	0.874± 0.010	C 20:5 ω-3 (EPA)	<b>13.044± 0.007</b>
C 16:3	0.217± 0.001	C 22:1 ω-11	9.588± 0.020
C 18:0	0.370± 0.055	C 22:1 ω-9	0.913± 0.002
C18:1	1.207± 0.018	C21:5 ω-3	1.633± 0.009

C18:4	0.249± 0.001	C22:5 DPA	1.291±0.005
C20:0	0.305± 0.001	C22:6 ω-3 (DHA)	<b>57.264±0.075</b>
C20:1	2.065± 0.010		

Como puede observarse, la mayor cantidad de ácidos grasos están representados por DHA , seguido de EPA, ambos ácidos de interés para este trabajo, por lo que la cantidad de ácidos grasos ω-3 será definida como la suma de DHA y EPA.

Los ácidos grasos de cadena media obtenidos por saponificación fueron utilizados en la evaluación de las mejores condiciones para la formación de acilgliceroles de AGCM.

TABLA 6.2. Perfil de ácidos grasos libres presentes en el saponificado de triacilglicéridos de cadena media

Ácido graso	Contenido (% molar)
C 6:0	0.563 ±0.003
C 8:0	<b>71.620 ± 0.004</b>
C 10:0	<b>27.632 ±0.022</b>
C 12:0	0.185 ±0.011

La composición reportada en la etiqueta del producto comercial indica que tiene de 50 a 65 % de ácido caprílico (C 8:0) y 30 a 45 % de ácido caprílico (C 10:0), similar a los resultados aquí mostrados, las diferencias pueden deberse a que durante el proceso de saponificación puede no lograrse el 100 % de la liberación de los ácidos grasos o la variación característica del producto comercial.

Para el caso del ácido linoléico conjugado, no se realizó saponificación ya que se encuentran libres en una mezcla de los diferentes isómeros de gran pureza (95

%). Se le determinó su perfil de ácidos grasos de la misma manera y el resultado se observa en la siguiente Tabla (6.3).

TABLA 6.3. Perfil de ácidos grasos de presentes en la mezcla de CLA.

Ácido graso	Contenido (% molar)
C 16:0	0.451 ± 0.060
C 18:1	5.957 ± 0.003
C 18:2	1.360 ± 0.014
CLA c9, t11	<b>42.291 ± 0.070</b>
CLA t10, c12	<b>44.040 ± 0.023</b>
otros isómeros CLA	5.900 ± 0.002

Con esta información se determinaron los pesos moleculares de cada aceite, considerando la ecuación de Filleires (1995) y Halverson (1993).

$$Mw_{tri} = 3.Mw_{FFA} + Mw_{gly} - 3.Mw_{water} \quad (2)$$

De donde:

$Mw_{tri}$  = Peso molecular del aceite

$MW_{gly}$  = Peso molecular del glicerol

$MW_{FFA}$  = promedio del peso molecular de los ácidos grasos libres

$Mw_{water}$  = Peso molecular del agua

De donde se obtuvieron los siguientes valores:

Ácidos grasos  $\omega_3$  = 989.164g/mol

Ácidos grasos de cadena media = 493.728 g/mol

Ácido linoléico conjugado= 879.249 g/mol

Lo cual se tomó en cuenta para la para la preparación de las relaciones molares entre los aceites y el glicerol de las diferentes reacciones enzimáticas.

### **6.1.2 Reacciones de modificación enzimática.**

La cinética de las reacciones enzimáticas se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta y se verificó mediante cromatografía de gases después de la silanización.

#### **6.1.2.1 Reacciones de síntesis de MAG y DAG con ácidos grasos $\omega$ -3.**

En los acilglicerol de  $\omega$ -3 y debido a la complejidad y la amplia variedad de ácidos grasos presentes, el método de silanización y detección propuesto no fue lo suficientemente sensible como para diferenciar todos los productos formados durante la glicerólisis, por lo que se evaluaron los principales ácidos grasos (DHA y EPA), asumiendo que por las condiciones (reportadas como ideales por Baeza, 2013) se favorece la formación de MAG y DAG. Así, se analizaron los ácidos grasos esterificados de la cinética de reacción de la formación de acilglicerol de  $\omega$ -3, en dos condiciones de reacción, a una temperatura de 65 y de 75 °C, los resultados se observan en la Figura 6.1.

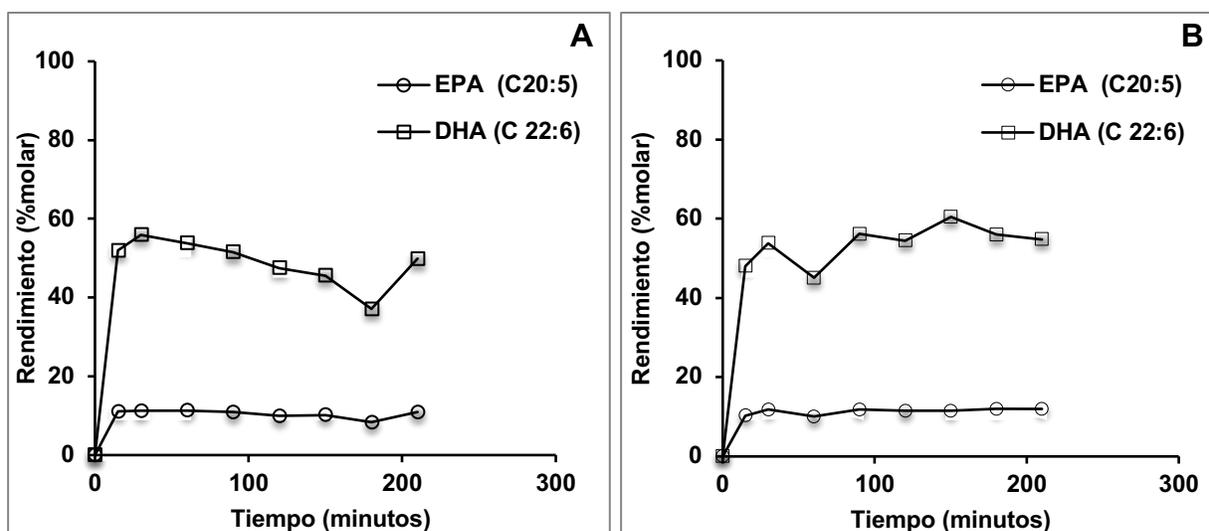


FIGURA 6.1. Esterificación de ácidos grasos de aceite de pescado en una relación molar de sustratos de 3:1 aceite: glicerol; con 15 % de enzima Novozym 435, con agitación de 400 rpm por 210 min. A) 65 °C y B) 75 °C.

Debido a que en la reacción enzimática se obtienen ambos productos de interés (MAG y DAG) se tomarán los valores más altos de la esterificación de estos ácidos grasos como las mejores condiciones, así para 65 °C se obtiene la mayor esterificación a los 30 min, con un 55.91 % de DHA y 11.20 % de EPA, dando un total de 67.11 %; mientras que a 75 °C a los 150 min se obtiene un 71.96 % de rendimiento, de los cuales 60.47 % es de DHA y 11.49 % de EPA, por lo que se seleccionaron estas últimas condiciones para la producción de acilglicérols de  $\omega$ -3.

#### 6.1.2.2 Reacciones de síntesis de MAG y DAG con ácido linoléico conjugado (CLA)

La reacción de formación de acilglicérols de CLA se evaluó a dos relaciones de sustratos 1:1 y 1:4 (p/p) en las condiciones mencionadas en la metodología. Los resultados se muestran en las siguientes gráficas (Figura 6.2).

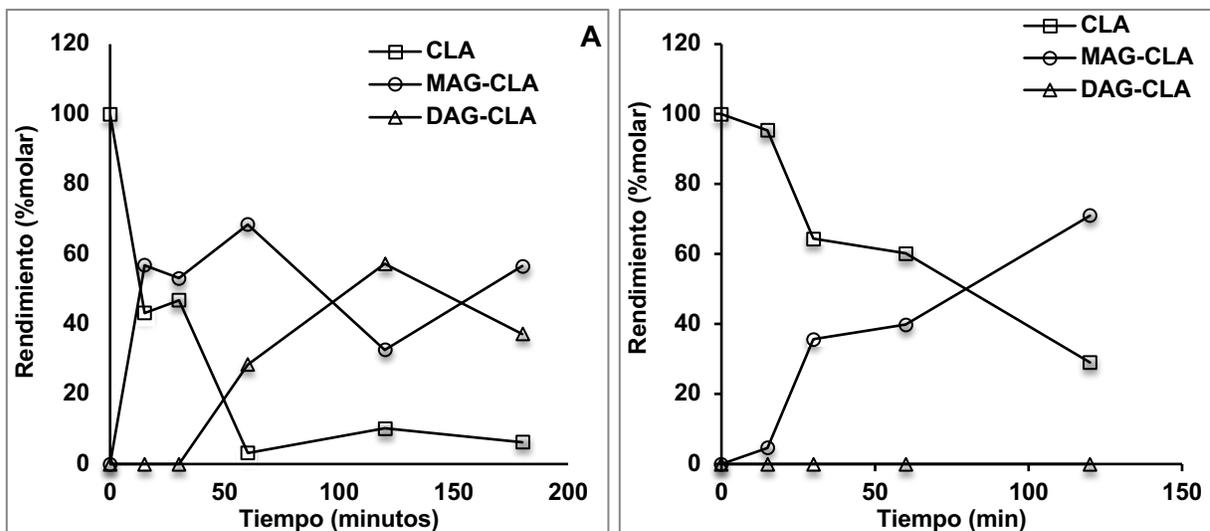


FIGURA 6.2. Producción de mono y diacilgliceroles de CLA con 10 % de Lipozyme RM IM con de agitación de 400 RPM y a 40 °C a diferentes relaciones de sustrato CLA: Glicerol. A) 1:1 (p/p) y B) 4:1 (p/p).

Como se puede observar, las mejores condiciones de producción de MAG y DAG de CLA se presentan con una relación 1:1 (p/p), la enzima utilizada en primer lugar forma monoacilglicéridos al esterificar un ácido graso al glicerol y cuando la cantidad de moléculas de glicerol disminuye, las vuelve a esterificar formando los DAG; esto puede observarse en la primera gráfica, donde la formación de MAG inicia a los 15 min y alcanza su concentración máxima a los 60 min, mientras que para los DAG sucede a los 120 min, tiempo en el cual también la concentración de MAG disminuye, ya que se están formando DAG a partir de los MAG.

Baeza en el 2013, demostró que un incremento en la concentración de ácido graso libre (mayor relación molar) favorece el rendimiento global de la reacción de entre la fosfatidilcolina y CLA. Para la menor relación molar (1:2, PC: CLA) el máximo porcentaje de CLA incorporado fue de 40 % y a medida que el exceso molar de CLA aumentó, se superó el 60 %. Este fenómeno estuvo claramente favorecido por una mayor carga de enzima en el sistema de reacción. Debido a esto, en el presente trabajo se evaluó una relación de sustratos donde había un exceso de CLA (4:1 p/p), sin embargo no se observó el efecto propuesto por Baeza, si no que hubo un retardo

en la formación de los compuestos de interés, donde el tiempo de inicio de la formación de MAG y el requerido para alcanzar su punto máximo se duplica, pasando de 15 para el inicio y 60 min para alcanzar su punto máximo, a 30 min y 120 min respectivamente, por lo que si se replica este comportamiento para los DAG, en el último tiempo de esta cinética (120 min) apenas iniciaría su formación, por esto no se observa en la gráfica.

Kim y Lee en el 2006, sintetizaron DAG con CLA encontrando su mayor producción a 40 °C en una relación de sustratos de 6:1 p/p, con 5 % de Lipozyme RMIM, agitación de 450 rpm al vacío y a las 5.5 h; indicando que de los parámetros evaluados (temperatura, carga de enzima, velocidad de agitación y vacío) sobre la concentración y la pureza del DAG, la velocidad de reacción se ve afectada por la temperatura (producción máxima 2 h antes a 50 y 60 °C), mientras que en la concentración de DAG-CLA, la temperatura, la carga de enzima, la velocidad de agitación y el vacío son los parámetros que ejercen influencia. A pesar de que estos autores no evaluaron la relación de sustratos, confirman que se requiere de un largo tiempo (5.5 h) para alcanzar la máxima concentración de DAG-CLA; en este estudio, a diferencia del presente, la producción de DAG inicia a la primera hora, esto puede deberse al efecto del vacío, ya que la enzima ha demostrado una mayor eficiencia de esterificación bajo una continua remoción del vacío (Dicks y Bosley, año?); lo cual podría explicar que debido al sistema usado en este trabajo (mallas moleculares) no se alcanzó los niveles de eficiencia requeridos. Kim en el 1991 al evaluar la síntesis de glicéridos de C 10:0 con Lipozyme TM-20 con 4 métodos de remoción de agua formada durante las reacciones de esterificación, 1) Vacío (5 cmHg absoluto); 2) Burbujeo de aire al reactor; 3) Recirculación de aire y 4) Columna con mallas moleculares y trampa de frío (-5 °C); concluyendo que la conversión final fue altamente influenciada por los métodos de remoción de agua, siendo la columna con mallas moleculares y trampa de frío la de mejor rendimiento.

Por otra parte Martínez *et al.*, (2004) sugiere RMS 1:1 y 1:2 de glicerol:CLA para favorecer la formación de MAG-CLA, y Arcos *et al.*, (1998) reportan que a bajas relaciones de CLA:glicerol se favorece la formación de MAG y DAG de CLA, mientras

que una alta concentración de CLA en relación al glicerol, favorece la producción de TAG-CLA; pero debido a que no se cuantificaron los TAG en el sistema de producción presentado en este trabajo, no se puede corroborar esta teoría para explicar la nula formación de DAG-CLA en las condiciones evaluadas.

Con todo lo anterior y debido a que los productos de interés son ambos MAG y DAG -CLA, se usarán las condiciones antes mencionadas para la relación 1:1 (p/p) y un tiempo de 120 min donde se obtuvo un 57 % de DAG y 32 % de MAG. Los valores máximos individuales de MAG y DAG se presentan a tiempos diferentes, así a los 60 min se obtiene 70 % de MAG y a los 120 min un 60 % de DAG.

### ***6.1.2.3 Reacciones de síntesis de MAG y DAG con ácidos grasos de cadena media.***

En la síntesis de MAG-AGCM y DAG-AGCM se evaluó la capacidad de 3 lipasas comerciales inmovilizadas, Lipozyme TLIM, Lipozyme RMIM y Novozym 535 para la incorporación de AGCM a la molécula de glicerol, en las siguientes condiciones: 50 °C de temperatura, 300 rpm de velocidad de agitación, en una relación de sustratos de 1:1 (p/p) glicerol : AGCM libres y 15 % de enzima por 4 h (esta última condición, como resultado de estudios preliminares, donde después de ese tiempo no se observaron cambios en el comportamiento en la cinética de formación de MAG y DAG). Se tomaron muestras de 0.5 mL en tiempos de 0, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 min. Al término de cada muestreo se saturó el espacio libre de los matraces con nitrógeno gaseoso con la finalidad de eliminar la posible humedad, desplazar al oxígeno y así evitar la oxidación de los ácidos grasos. Se almacenaron en congelación hasta su análisis por cromatografía de gases. Los resultados a los 15 minutos, por presentar el mayor porcentaje de producción, se observan en la siguiente tabla.

TABLA 6.3. Rendimiento (% molar) de la producción de acilgliceroles con del uso de tres enzimas (Novozym 435, Lipozyme RMIM y Lipozyme TLIM) en la incorporación de ácidos grasos de cadena media al glicerol, a 300 rpm de agitación, 15 % de enzima, a 50 °C a las 15 min de reacción

Enzima	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)
<i>Candida antártica</i> (Novozym 435)	53.32 ± 0.5	28.75±0.9	6.61±0.5
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM IM)	50.60 ± 0.8	25.76±0.5	6.10±0.4
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM)	0.0	0.0	0.0

Como se puede observar en las siguientes gráficas (Figura 6.2), el comportamiento de las enzimas RMIM y Novozym 435 son muy similares, de rápida acción, ya que a los 15 minutos de reacción alcanzaron la mayor concentración de los compuestos de interés MAG y DAG, con un 50 y 25 % respectivamente y éstas se mantienen durante el tiempo evaluado; por otra parte, a pesar de que si se logra la formación de TAG, ésta es mínima (6 % a los 15 min). En trabajos realizados por Low *et al.*, en el 2007 donde evaluaron la incorporación de AGCM al glicerol para formar TAG usando las tres enzimas mencionadas, encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ellas, mostrando que la enzima de mayor actividad sintética fue Novozym 435 ( $52.87 \pm 0.03$  U/g), además de ser con la que se obtuvo el mayor rendimiento (56.7 %), esto se debe a que es una lipasa altamente afín a los AGCM y por no ser específica de posición. La Lipozyme RMIM mostró un valor intermedio entre las tres enzimas evaluadas al presentar un 34.04 % de rendimiento en la formación de TAG-AGCM. Finalmente la Lipozyme TLIM, de manera similar al presente estudio, exhibió el menor rendimiento (1.72 %). Se sabe que la Lipozyme TLIM es una de las lipasas con una fuerte tendencia para formar agregados biomoleculares que antagonizan sus centros activos abiertos; este hecho necesita ser considerado porque el monómero y el dímero pueden presentar diferentes características de actividad, estabilidad y selectividad. Además, en otro estudio realizado por Sim y colaboradores (año) demostraron el efecto de la temperatura en

la transesterificación con Lipozyme TLIM, indicando que la temperatura ideal para esta reacción debe ser igual o menor 40 °C por 63 h. Esto podría explicar la baja actividad de esta enzima en el sistema utilizado en el presente estudio (50 °C) y en el trabajo de Sim. Tomando en cuenta estos resultados se eligió a Novozym 435 como catalizador de las reacciones de glicerólisis de AGCM.

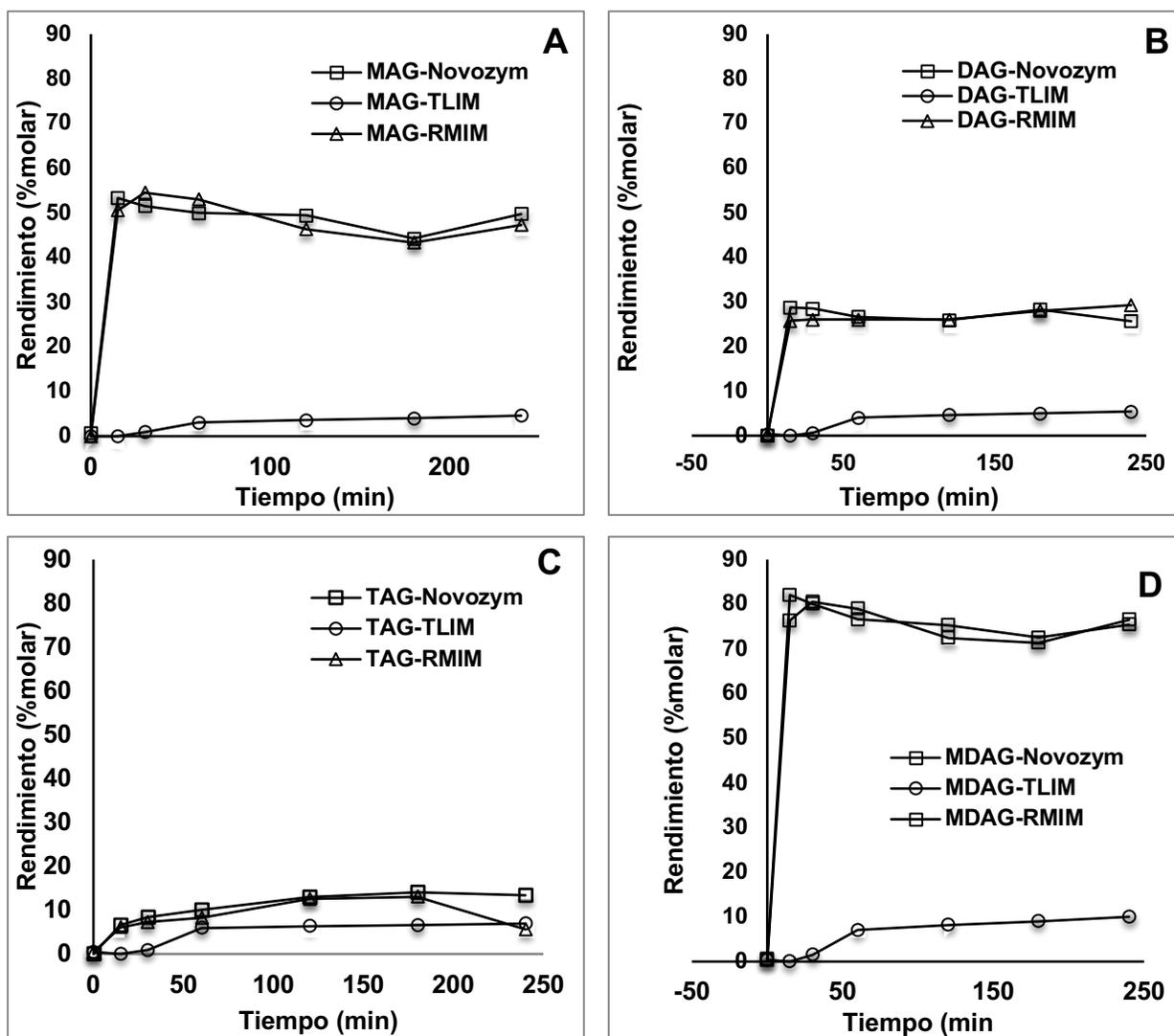


FIGURA 6.2. Cinéticas de formación de acilglicerol de ácidos grasos de cadena media, con tres enzimas inmovilizadas (Novozym 435, Lipozyme RMIM y Lipozyme TLIM) a 300 rpm de agitación, 15 % de enzima, a 50 °C. A) Monoacilglicéridos B) Diacilglicéridos C) Triacilglicéridos y D) Suma de MAG y DAG.

El siguiente parámetro a evaluar fue la relación de sustratos, comparándose la relación 4:1 contra 1:1 (p/p), encontrando mejores rendimientos cuando la proporción en peso de sustratos era la misma, tal como se observa en las gráficas siguientes (Figura 6.3).

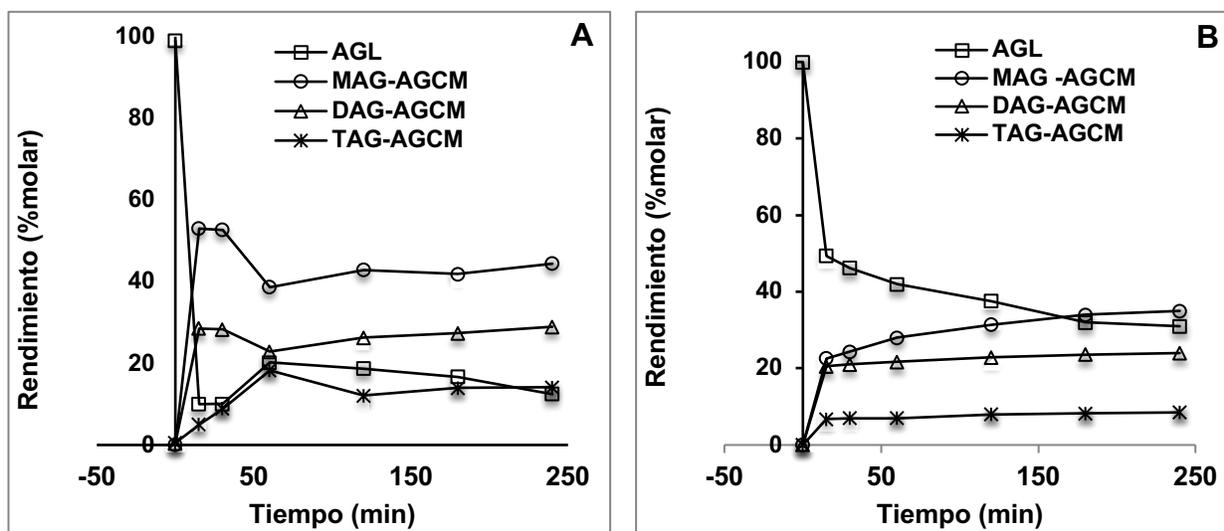


FIGURA 6.3. Producción acilglicerol de AGCM con 15 % de Novozym 435 con agitación de 300 rpm y a 50 °C. A) Relación de sustratos AGCM: Glicerol 1:1 (p/p). B) Relación de sustratos AGCM: Glicerol 4:1 (p/p).

En el estudio realizado por Low *et al.* (2017) demostraron que la relación entre sustratos tiene influencia en el rendimiento de la formación de TAG-AGCM, así a mayor concentración de AGCM hay una mayor producción 73.3 % de TCM usando 2 % de enzima, 1 % de mallas moleculares, 90 °C y durante 10 h de reacción, con una relación molar de sustratos 4:1 (AGCM: glicerol).

En las gráficas anteriores se observa que una relación de sustratos 1:1 (p/p) AGCM: glicerol mostró mejores rendimientos (MAG 52 % y DAG 28 %) que la relación 4:1 (p/p) (MAG 22 % y DAG 20 %) al mismo tiempo de reacción (15 min). En este trabajo las relaciones entre sustratos se reportan en peso, al convertirlas a relaciones molares de sustrato, y debido a que el peso molecular del glicerol es mucho menor que el de los AGCM, al hablar de una relación 1:1 (p/p) de

AGCM:glicerol se trata de un exceso de glicerol (RMS 1:5.51 AGCM:glicerol) y en la relación 4:1 (p/p) de AGCM:glicerol se tiene una menor cantidad del mismo (RMS 1:1.5 AGCM:glicerol). Low *et al.* evalúa en conjunto el efecto de la temperatura y la RMS, indicando que a 100 °C en una RMS 4:1 se obtiene una mayor producción de TCM que a 60 °C en una RMS de 1:1 AGCM-glicerol; las condiciones de este trabajo coinciden con la RMS de 4:1 (p/p), justificando así la baja esterificación de AGCM al glicerol.

La siguiente variable a evaluar fue la fuente de AGCM, existen varias formas de obtener MAG y DAG por vía enzimática, una de ellas es por hidrólisis de los TAG y otra por esterificación del glicerol con los ácidos grasos libres (AGL), por lo que se evaluaron estas dos fuentes, los ácidos grasos libres se obtuvieron por dos formas, por saponificación (AGS) de TCM y con una mezcla de ácidos grasos libres comerciales C 6:0, C 8:0, C10:0 en una relación 1:1:1 en peso. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6.4. Síntesis de monoacilglicéridos (MAG) y diacilglicéridos (DAG) de ácidos grasos de cadena media (AGCM) a diferentes relaciones de sustrato, a 50 °C, 300 rpm de agitación, 15 % de enzima Novozym 435 y 10 % de mallas moleculares.

Fuente de sustrato	Relación de sustrato AGCM:glicerol (p/p)	MAG (%molar)	DAG (%molar)	Tiempo (min)
Ácidos grasos comerciales	1:1	55 ±1.0	27 ±0.8	30
	4:1	33 ±1.2	30.5 ±1.8	120
Triacilglicéridos de cadena media	1:1	12 ±0.9	22 ±1.1	30
	4:1	43.6 ±1.3	29.3 ±1.0	120
Ácidos grasos por saponificación	1:1	52 ±0.2	28.30 ±1.0	15
	4:1	71 ±1.8	23 ±0.9	120

De acuerdo a lo observado en la tabla anterior las fuentes de sustrato con mayor rendimiento y rapidez en la síntesis son ambos ácidos grasos libres, en una relación de sustratos 1:1 (p/p) para los AGL y 4:1 (p/p) para los AGS, la diferencia se

encuentra en el tiempo en que alcanzan su máxima concentración, siendo de 30 y 120 min respectivamente, por lo que se considera que el uso de AGL comerciales en una relación 1:1 (p/p) por 30 minutos como las mejores condiciones evaluadas para la síntesis de MAG y DAG de AGCM. La reacción con TCM presentó un rendimiento alto (72 % de MAG y DAG) en una relación 4:1 (p/p) pero a un mayor tiempo (120 min). Respecto a esto, existen reportes que únicamente las enzimas provenientes de *Candida rugosa*, diferente a la utilizada en este estudio (Novozym 435 proviene de *Candida antártica*) son capaces de hidrolizar completamente los triacilglicéridos en ácidos grasos y glicerol, ya que no son específicas y son capaces de hidrolizar todas las posiciones, además no se inhiben con una elevada concentración de ácidos grasos libres. Además por razones de estequiometría, Aha *et al.* (2005), indica que sólo la alcoholólisis de TAG con glicerol o la esterificación directa de glicerol puede producir las moléculas deseadas a altos rendimientos.

Tomando en cuenta todos los resultados anteriores, se exploró la opción de determinar la cantidad de enzima adecuada, así se evaluaron 3 concentraciones 5, 10 y 15 % (del peso total de la mezcla de reacción). Los resultados se muestran en las siguientes gráficas (Figura 6.4).

Los resultados indican que la mayor formación de MAG (78 %) sucede con un 5 % de enzima a los 60 min de reacción; mientras que los DAG alcanzan su máximo rendimiento en las condiciones probadas (24 %) a los 120 min con 15 % de enzima.

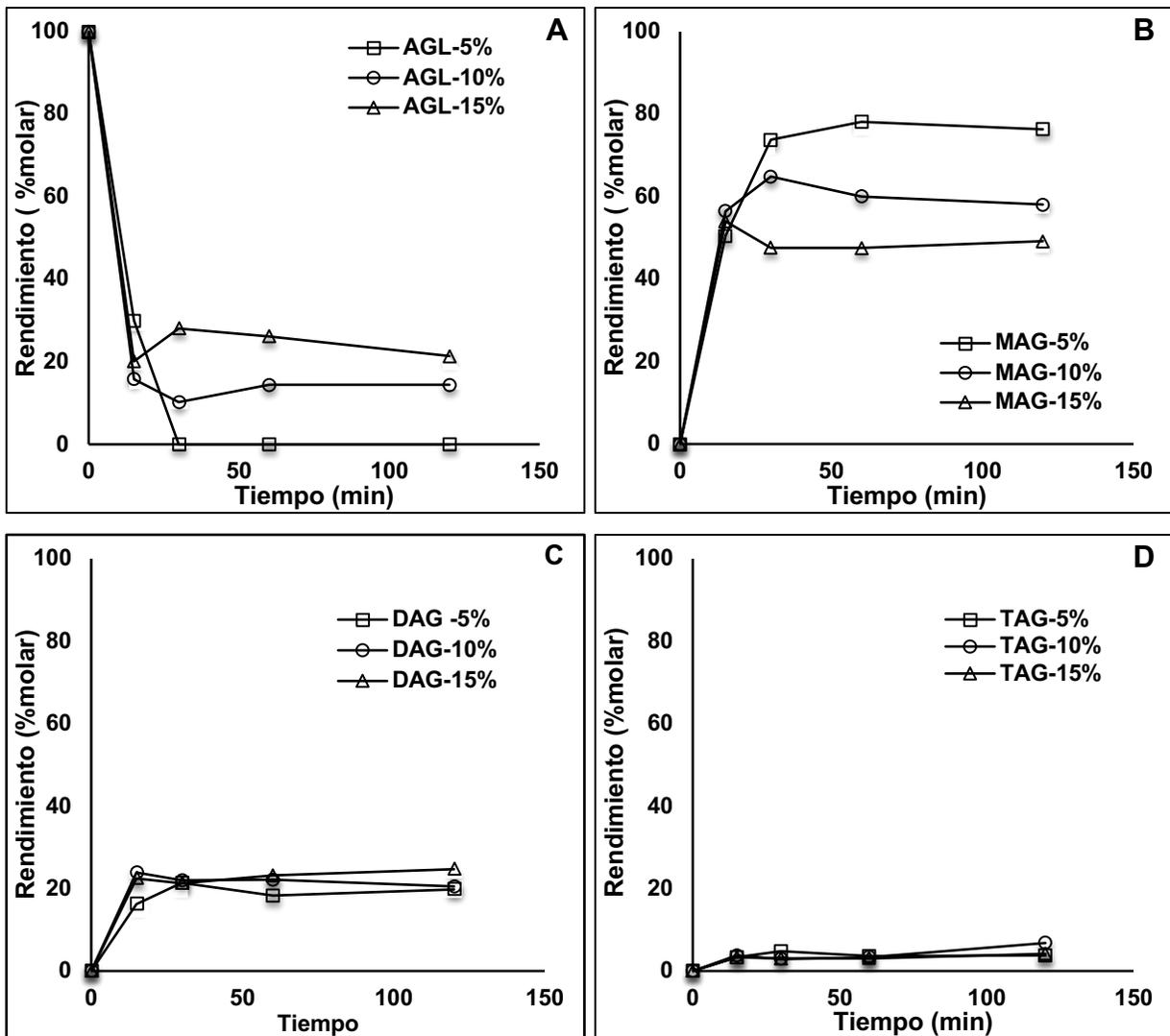


FIGURA 6.4 .Síntesis enzimática de acilglicérols de ácidos grasos de cadena media (AGCM) con relación de sustratos de AGCM: glicerol 1:1 (p/p) 50 °C Novozym 435, 300 rpm con 10 % mallas moleculares y 5, 10 y 15 % de enzima. A) Consumo de los ácidos grasos libres; B) Formación de monoacilglicéridos; C) Formación de diacilglicéridos y D) Síntesis de triacilglicéridos.

Es conocido que la carga de enzima es la principal variable en la modificación de lípidos por vía enzimática; cuando el efecto de la carga de elevado, usualmente altas incorporaciones son alcanzadas, este efecto a su vez se encuentra favorecido por la temperatura, por otro lado el exceso puede causar problemas en la agitación y

obstaculizar la transferencia de masa (Baeza *et al.*, 2013), esto podría ser la razón de la diferencia en la producción de MAG a 5 y 15% de 78.13 y 47.52 % respectivamente, este fenómeno no se observa en la formación de DAG ni de TAG; debido a esto la concentración ideal de enzima, de acuerdo a los parámetros evaluados es de 5 % (en peso total de la reacción).

Todas las cinéticas fueron monitoreadas a través de cromatografía de gases después de una derivatización por silanización. En la figura 6.5, se observa un cromatograma típico de la formación de MAG y DAG de AGCM.

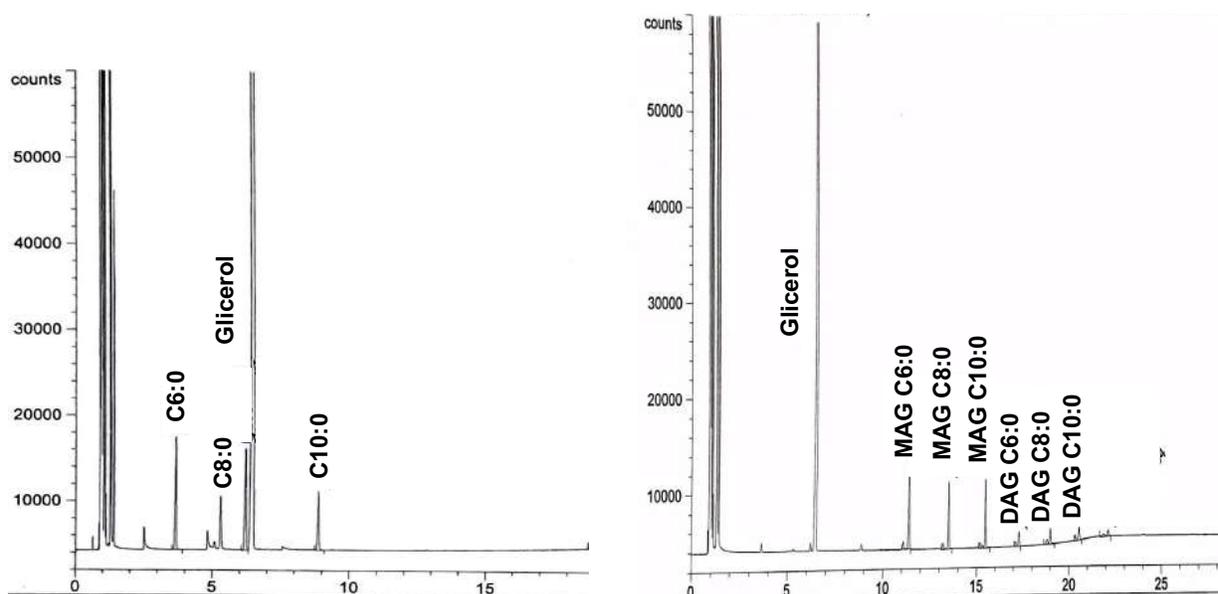


FIGURA 6.5. Cromatograma típico de la formación de monoacilglicérols y diacilglicérols de ácidos grasos de cadena media (C 6:0, C8:0 y C 10:0).

### 6.1.3 Separación de los monoacilglicéridos y diacilglicéridos por cromatografía en columna

En el matraz donde se llevó a cabo la reacción se encuentran, además de las mallas moleculares y la enzima inmovilizada que fue removida físicamente por

decantación y lavados con hexano; los productos de la reacción: monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol que no haya reaccionado. Como el principal interés es evaluar los MAG y DAG de manera individual, fueron separados por columna cromatográfica.

Los productos de la esterificación de ácidos grasos  $\omega$ -3, así como los de ácido linoléico conjugado no presentaron dificultades ni en su separación, ni en el monitoreo por cromatografía de capa fina, sin embargo para el caso de los productos de ácidos grasos de cadena media, no fue posible separarlos ni observarlos con el mismo sistema de solventes empleado para los casos anteriores, lo cual asumimos que se debe a la diferencia en la naturaleza de los ácidos grasos, ya que los ácidos grasos de cadena media, poseen un bajo peso molecular, un tamaño de partícula pequeño y un bajo punto de fusión, son líquidos a temperatura ambiente y contienen una menor densidad energética (8.4 contra 9.2 Kcal/g de los ácidos grasos de cadena larga, por lo que como lo indica Marten *et al.*, (2006), estas propiedades físicas y químicas distintas marcan la diferencia en cómo se absorben y metabolizan estos ácidos grasos y podría tener repercusión en su comportamiento químico.

Debido a esto fue necesario realizar una revisión de los métodos actuales Baeza-Jiménez (2013), Hernández-Martín y Otero (2008), Hossen (2005), aplicados para la separación de los diferentes componentes lipídicos de una muestra con características similares a los obtenidos. Las condiciones fueron las que se muestran en la siguiente Tabla.

TABLA 6.5. Sistema de solventes para la cromatografía en capa fina para la separación de acilglicerolos.

<b>Fase móvil</b>	<b>Reactivo de visualización</b>	<b>Referencia</b>
Hexano: dietil éter: ácido fórmico (80:20:2 v/v)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 10 % en metanol	Christie y Xianlin, 2010
Hexano: éter: ácido acético (50:50:1 v/v/v)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 2 % en etanol	Baeza, 2013
Cloroformo: metanol: agua	Ácido fosfomolibdico al 10 % en	Hernández-

(65:25:4 v/v)	etanol	Martín y Otero, 2008
Cloroformo : metanol (70:30, 40:60, 30:70 y 35:65 v/v)	Ácido fosfomolibdico al 5 % en etanol	Hossen, 2005
Éter de petróleo: acetona (92:8 v/v)	Ácido sulfúrico al 70 % en agua	AOCS, 1997
Éter de petróleo: dietil éter: ácido acético (10:10:0.4, v/v/v) y éter: dietil éter (49:1, v/v)	Solución de Metanol, agua, Cloruro de manganeso y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (120:120:0.8:8 mL v/v/p/v)	Froissard <i>et al.</i> , 2015

Ninguno de los métodos evaluados resultó lo suficientemente sensible para detectar los productos de reacción de AGCM, ni los estándares evaluados, por lo que se desarrolló un nuevo sistema cromatográfico que consistió en usar como fase móvil una mezcla de hexano: acetona (70:30 v/v) y un proceso de doble revelado, ya que se detectó que hacía falta mayor oxidación de los compuestos para su visualización, se utilizó en primer lugar una solución de ácido sulfúrico al 10% en metanol y se secó en la parrilla de calentamiento, después de eso se sumergió en una solución de ácido fosfomolibdico en metanol al 10 %. Este método permitió, no sólo una visualización adecuada tanto de los estándares, como para los productos de reacción; sino que fue lo suficientemente sensible para separar e identificar los 3 monoacilglicéridos presentes (MAG de C 6:0, de C 8:0 y de C 10:0) y las dos configuraciones de de diacilglicéridos (1,3- y 1,2-), como se observa en la siguiente imagen (Figura 6.6).

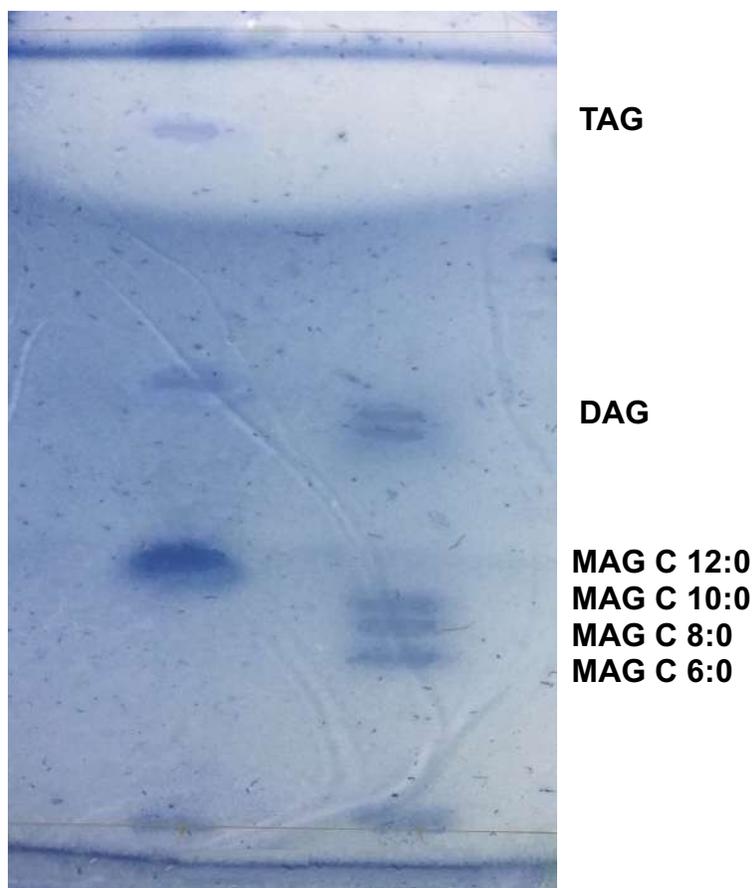


FIGURA 6.6. Cromatografía en capa fina con fase móvil de Hexano: acetona 70:30 (v/v) y dos reactivos de visualización. Primero ácido sulfúrico al 10 % en metanol seguido de ácido fosfomolibdico 10 % en metanol. En el carril izquierdo estándares de Monolauril-rac-glicerol (C12:0), Dilaurin (C12:0) y Trilaurin (C12:0) y en el carril derecho la mezcla de reacción entre glicerol y ácidos grasos de cadena media.

Con este sistema cromatográfico fue posible observar y separar los acilglicérols de AGCM, advirtiendo que la concentración de TAG en la mezcla de reacción es nula, por lo que, aunado a la imposibilidad de su separación en columna y placa de vidrio, con los métodos evaluados; se decidió utilizar dicha mezcla sin separar sus componentes, como emulsificante para estabilizar las nanoemulsiones.

Además se evaluó este sistema a 3 concentraciones diferentes: 3, 6 y 9  $\mu\text{g/mL}$  para determinar su sensibilidad relacionada a la cantidad de analito presente, demostrando que a las 3 concentraciones puede visualizarse correctamente los diferentes componentes de la mezcla. Finalmente al método de Christie y Xianlin

(2013) se modificó la parte de visualización con los dos reactivos y se logró observar los componentes como MAG y DAG, aunque a diferentes Rfs, como consecuencia de la polaridad de la fase móvil, aunque no se observaron los diferentes MAG o DAG de forma individual, como en el método propuesto.

## **6.2 Desarrollo de nanoemulsiones con Monoacilglicéridos y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.**

Después de una serie de pruebas preliminares se llegó a la formulación propuesta en la metodología, en primer término se realizaron las nanoemulsiones (NE) que contenían 1 % del emulsificante a evaluar y 1 % del Kolliphor®EL, este último se adicionó con la finalidad de favorecer la rápida y eficiente disolución de la curcumina ya que es un solubilizador no iónico y emulsificante para formulaciones de activos no solubles en agua y otros componentes hidrofóbicos (BASF, 2018). En trabajos previos realizados en nuestro grupo de trabajo, se utilizaron dos metodologías para lograr la adecuada disolución de la curcumina para la formación de la NE, el método de evaporación-emulsificación y el método de hidratación de capa delgada, siendo éste último el más eficiente, sin embargo el tiempo invertido en su realización es de 3-4 h para cada nanoemulsión, por lo que en el presente proyecto se buscó una alternativa. De acuerdo a Porter *et al.*, muchos compuestos bioactivos hidrofóbicos como la curcumina, que son cristalinos a temperatura ambiente dificultan su capacidad de incorporarse a los productos fluidos por su tendencia a agregarse y sedimentar. De ahí la necesidad de ser dispersados en un acarreador lipídico, fase oleosa de una emulsión, con la condición de que debe permanecer fluida durante todo el proceso; lo que puede alcanzarse por calentamiento o disolución (Ochoa, 2013). Sin embargo, algunos son termolábiles o inestables por lo que se recomienda disolverlos en aceites o solventes orgánicos como el alcohol tomando en cuenta su solubilidad y las condiciones del proceso. Li *et al.* (2012) indica que es posible producir emulsiones de compuestos bioactivos a través de la combinación de ambos procesos; el compuesto cristalino se dispersa en

el acarreador, que después es calentado para disolver los cristales. Aunque se corre el riesgo de que al regresar a la temperatura ambiente, se vuelvan a formar los cristales agregándose y sedimentando. Así la adición de Kolliphor®EL además de ayudar en la disolución de la curcumina al ser un aceite acarreador, también actuó como cosurfactante en la NE.

### 6.2.1 Caracterización de las nanoemulsiones con Monoacilglicéridos y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.

Al elaborar las NE con la metodología previamente descrita, se obtuvieron los siguientes resultados de su caracterización, para las NE que tenían en su formulación 1 % de emulsificante (MAG, DAG y Reacción de  $\omega$ -3, MAG, DAG y Reacción de CLA y Reacción de AGCM) y 1 % de Kolliphor®EL. Tabla 6.6.

TABLA 6.6. Caracterización de las nanoemulsiones elaboradas con los diferentes emulsificantes sintetizados con ácidos grasos  $\omega$ -3 y ácido linoléico conjugado.

Emulsificante	Tamaño promedio de partícula (nm)	Índice de polidispersidad	Potencial Zeta (mV)
MAG $\omega$ -3	165.35 <sup>a</sup> $\pm$ 3.02	0.191 <sup>b</sup> $\pm$ 0.011	-20.5 <sup>b</sup> $\pm$ 2.12
DAG $\omega$ -3	275.7 <sup>c</sup> $\pm$ 1.12	0.235 <sup>c</sup> $\pm$ 0.022	-30.1 <sup>b</sup> $\pm$ 1.21
Rx $\omega$ -3	155.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.03	0.173 <sup>b</sup> $\pm$ 0.019	-36.5 <sup>c</sup> $\pm$ 1.34
MAG CLA	147.65 <sup>a</sup> $\pm$ 1.21	0.159 <sup>b</sup> $\pm$ 0.043	-21.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.03
DAG CLA	150 <sup>a</sup> $\pm$ 1.99	0.159 <sup>b</sup> $\pm$ 0.021	-24.35 <sup>b</sup> $\pm$ 2.05
Rx CLA	142.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.12	0.228 <sup>c</sup> $\pm$ 0.042	-31.1 <sup>bc</sup> $\pm$ 3.02
Rx AGCM	184.4 <sup>b</sup> $\pm$ 1.02	0.091 <sup>a</sup> $\pm$ 0.032	-8.82 <sup>a</sup> $\pm$ 4.23

Los valores reportados son la media  $\pm$  DS. n = 2. Valores con letras diferentes presentan diferencias significativas entre formulaciones (P < 0.05). MAG: monoacilglicéridos, DAG: diacilglicéridos, Rx: reacción, CLA: ácido linoléico conjugado y AGCM: ácidos grasos de cadena media.

En la elaboración de las nanoemulsiones, solamente en un caso ideal, todos las gotas de la fase dispersa son del mismo tamaño, en la realidad pueden existir diferentes tamaños, que se agrupan por secciones en forma de campana de Gauss, así, lo aceptable en una NE es contar en la gráfica de tamaño promedio de partícula, con sólo una campana, indicando que se trata de un sistema monomodal. Varios autores reportan haber elaborado nanoemulsiones, sin embargo aún existe disparidad en el criterio, ya que en el caso de Quintanilla *et al.*, 2010 y Chiesa *et al.*, 2008 definen a una NE con un tamaño de partícula de 1-100 nm; mientras que Constantinides *et al.*, en 2008 indica que el tamaño puede ser de 100 a 500 nm y Bouchemal *et al.*, 2004, así como Araujo *et al.*, 2007, presentan nanoemulsiones de entre 100-600 nm. Debido a esto, en el presente trabajo se consideró un tamaño promedio de partícula entre 20 a 200 nm. Bajo este criterio, al observar los resultados de la tabla todos los emulsificantes formulados, excepto los DAG  $\omega$ -3, se encuentran dentro del intervalo de tamaño propuesto.

Prajapati *et al.*, 2012 llevó a cabo una evaluación comparativa de mono, di y triglicéridos de ácidos grasos de cadena media (C 8:0 y C 10:0) a través de un diagrama de fase de lípidos / surfactantes / agua, determinación de solubilidad y pruebas de dispersión para su aplicación en el desarrollo de formas de dosificación farmacéuticas; donde ponen de manifiesto que, además de la formación de microemulsiones O/W y W/O, las mezclas de lípido/surfactante forman geles o fases líquidas cristalinas después de la dilución con agua, predominando la formación de gel, cuando la concentración del surfactante es relativamente alta (>50 %). Entre mayor formación de gel, el tamaño de partícula aumenta; los autores reportaron que la diferencia en la proporción de MAG y DAG en el surfactante influye en la formación de gel, siendo menor a mayor cantidad de MAG ya que éste demostró producir menos fase de gel que los DAG por separado. También indican que al combinar MAG, tanto con DAG como con TAG disminuye la formación de gel y promueve la formación de sistemas emulsionados de <200 nm. Esto podría explicar el tamaño

promedio de partícula de los DAG  $\omega$ -3 que es mayor de 200 nm; y por qué en la mayoría de los compuestos evaluados, la mezcla de reacción que contiene altas cantidades de MAG y DAG presentan iguales o menores tamaños promedio de partícula que cuando se utilizan por separado dichos emulsificantes.

Cabe mencionar, que respecto al PDI, se espera contar con NE con un comportamiento monomodal y que sus valores sean menores a 0.2 para determinar que son de buena calidad y altamente estables (Klang y Valenta, 2011). Todas las formulaciones evaluadas cumplen con ambos criterios.

El potencial Z es la medida de la carga superficial y a pesar de que no es un criterio absoluto para definir la estabilidad de un sistema nanoemulsionado, ya que varios estudios han demostrado presentar NE estables con valores de potencial Z diferentes a los sugeridos, se toma en cuenta para un análisis integral de la estabilidad (Ochoa, 2013 y Cavazos, 2013). Así, Márquez, 2005 sugiere valores  $\leq 30$  mV o  $\geq 30$  mV. El signo dependerá de la carga de la capa del coloide, que atraerá cargas contrarias, así un coloide con carga negativa atraerá contraiones positivos exhibiendo un valor positivo de potencial Z y viceversa. Por los valores obtenidos podemos indicar que la carga superficial de los coloides formados en las NE presentadas, es positiva; y que se encuentran dentro de los valores esperados, excepto para los casos de la reacción de AGCM y de  $\omega$ -3, lo cual no influye en sus demás características.

Respecto a su apariencia visual, las nanoemulsiones presentan diferentes tonalidades de amarillo, debido a la curcumina, que presenta ese color característico, mientras que al interactuar con los demás componentes, puede tomar tonalidades ligeramente más oscuras. McClements, 2011 indica que una de las características de las NE a diferencia de otros sistemas como las emulsiones, son transparentes o de baja turbidez, fenómeno que se encuentra relacionado con el tamaño de partícula y la dispersión de la luz, cuando las gotas son mucho menores que la longitud de onda de la luz ( $d \gg \lambda$ ) y la dispersión es débil (Herrera, 2012). Las NE obtenidas no son transparentes como se observa en la Figura 6.7.



FIGURA 6.7. Aspecto visual de las NE transportadoras de curcumina. Preparadas con A) Monoacilglicéridos B) Diacilglicéridos y C) Mezcla de reacción de  $\omega$  -3 D) MAG E) DAG y F) Mezcla de reacción con CLA G) Mezcla de reacción con ácidos grasos de cadena media.

### 6.2.2 Medición de la estabilidad de las nanoemulsiones.

La estabilidad fue determinada por un análisis completo de los datos obtenidos en el equipo Zetasizer, es decir, tamaño promedio de partícula (TPP), índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta (PZ); así como la información que se obtuvo en el Turbiscan Lab® Expert, que incluye el Índice de estabilidad del Turbiscan (TSI), así como el Mean value o valor equivalente (VE) y el Peak Thickness o espesor de capa (EC).

#### 6.2.2.1 Medición de tamaño promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta.

Una vez elaboradas y caracterizadas, las NE fueron almacenadas a 5 °C durante 5 semanas, tomando una muestra (20  $\mu$ L) cada semana, para monitorear

sus características y su estabilidad. Los resultados obtenidos con el Zetasizer se observan en las siguientes gráficas (Figura 6.8).

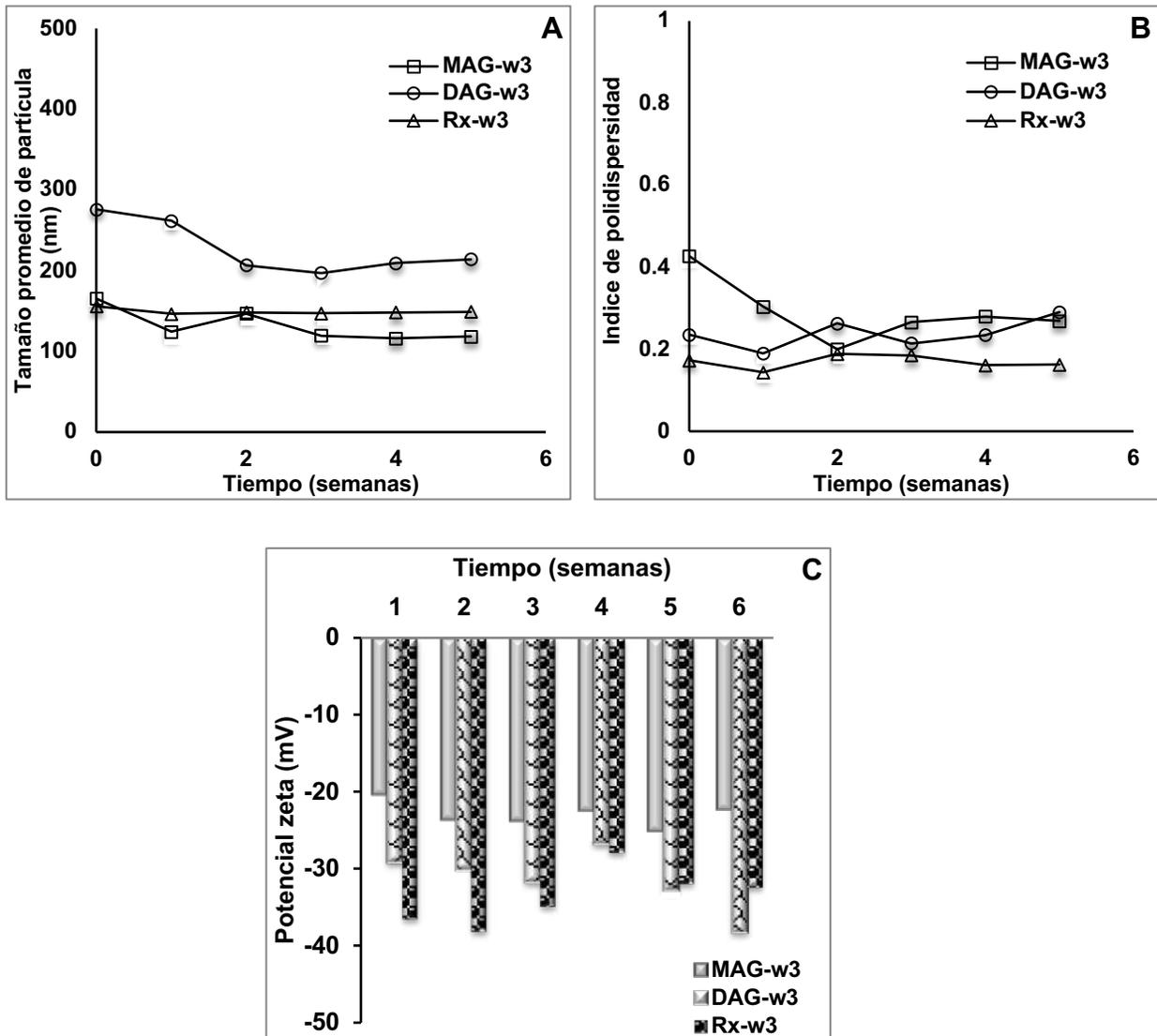


Figura 6.8. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mono, diacilglicéridos y su mezcla de reacción con  $\omega$ -3. En una relación 1:1 (%/%) de emulsificante: Kolliphor<sup>®</sup>EL, almacenadas 5 semanas a 5 °C. A) Tamaño promedio de partícula, B) Índice de polidispersidad y C) Potencial Zeta.

De acuerdo a los resultados observados en las gráficas anteriores (Figura 6.7), en cuanto al tamaño promedio de partícula, no se observan diferencias estadísticas al realizar un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias usando la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  usando el software estadístico MINITAB 17, entre los valores de la cinética de la reacción de  $\omega$ -3, ni para los MAG  $\omega$ -3, pero si para los DAG  $\omega$ -3. Esto es consistente con lo demostrado por Prajapati *et al.*, 2012 respecto a que es mejor utilizar una mezcla de MAG y DAG que usarlos por separado, para obtener tamaños de partícula más pequeños, y que los DAG tienden a formar una fase de gel, lo que provoca mayores tamaños de partícula. Es importante hacer notar, que a pesar de que los tamaños iniciales de estas NE no son tan pequeños como en otras NE de curcumina que utilizan diferentes emulsificantes, como Lee *et al.*, 2008 que alcanza tamaños de 35 nm usando Lecitina y Tween 80, o Ganga, 2008 y Ganta & Amiji, 2009 que presentan 115 y 132 nm respectivamente con lecitina de huevo como emulsificante, la mayoría de estos trabajos presentan al paso del tiempo un incremento del tamaño de partícula. Como lo pone de evidencia Ochoa, 2013 reportando que el diámetro medio de glóbulo en NE elaboradas con PC modificada con AGCM, alcanzó los 43 nm en 120 días de almacenamiento, un incremento del 45 % en relación con su tamaño de glóbulo inicial; mientras que las NE preparadas con PC no modificada presentaron un mayor incremento en su tamaño globular (71 %), pasando de 84 hasta 144 nm durante su almacenamiento. Este fenómeno no se presenta en las NE elaboradas en este trabajo, durante el tiempo de evaluación, favoreciendo su estabilidad.

La estabilidad de las NE elaboradas con MAG, DAG y la mezcla de reacción de CLA se pone en evidencia en las siguientes gráficas (Figura 6.9).

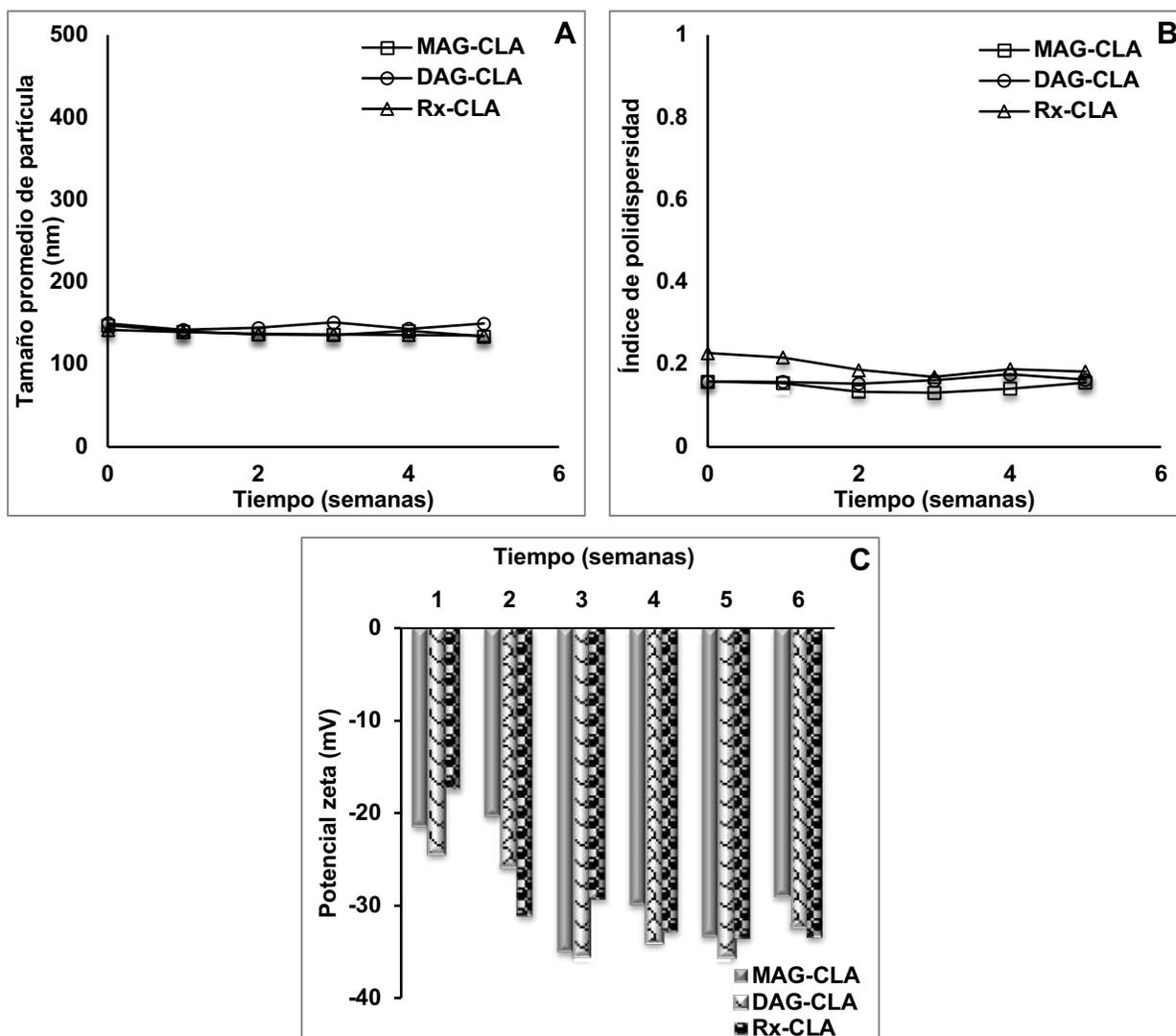


Figura 6.9. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mono, diacilglicéridos y su mezcla de reacción con CLA. En una relación 1:1 (%/%) de emulsificante: Kolliphor®EL, almacenadas 5 semanas a 5°C. A) Tamaño promedio de partícula, B) Índice de polidispersidad y C) Potencial Zeta.

Estas NE muestran un comportamiento, respecto al tamaño promedio de partícula, más homogéneo a lo largo de las semanas de evaluación, así como entre los diferentes emulsificantes, ya que no se encontraron diferencias estadísticas al realizar un análisis de varianza. Asimismo para el caso del PDI, mostrando valores

dentro de los límites y par el potencial Z, alcanzando los valores ideales a partir de la segunda semana.

Finalmente, las NE estabilizadas con la mezcla de reacción de AGCM mostraron el siguiente comportamiento en lo parámetros evaluados en las 5 semanas (Figura 6.10).

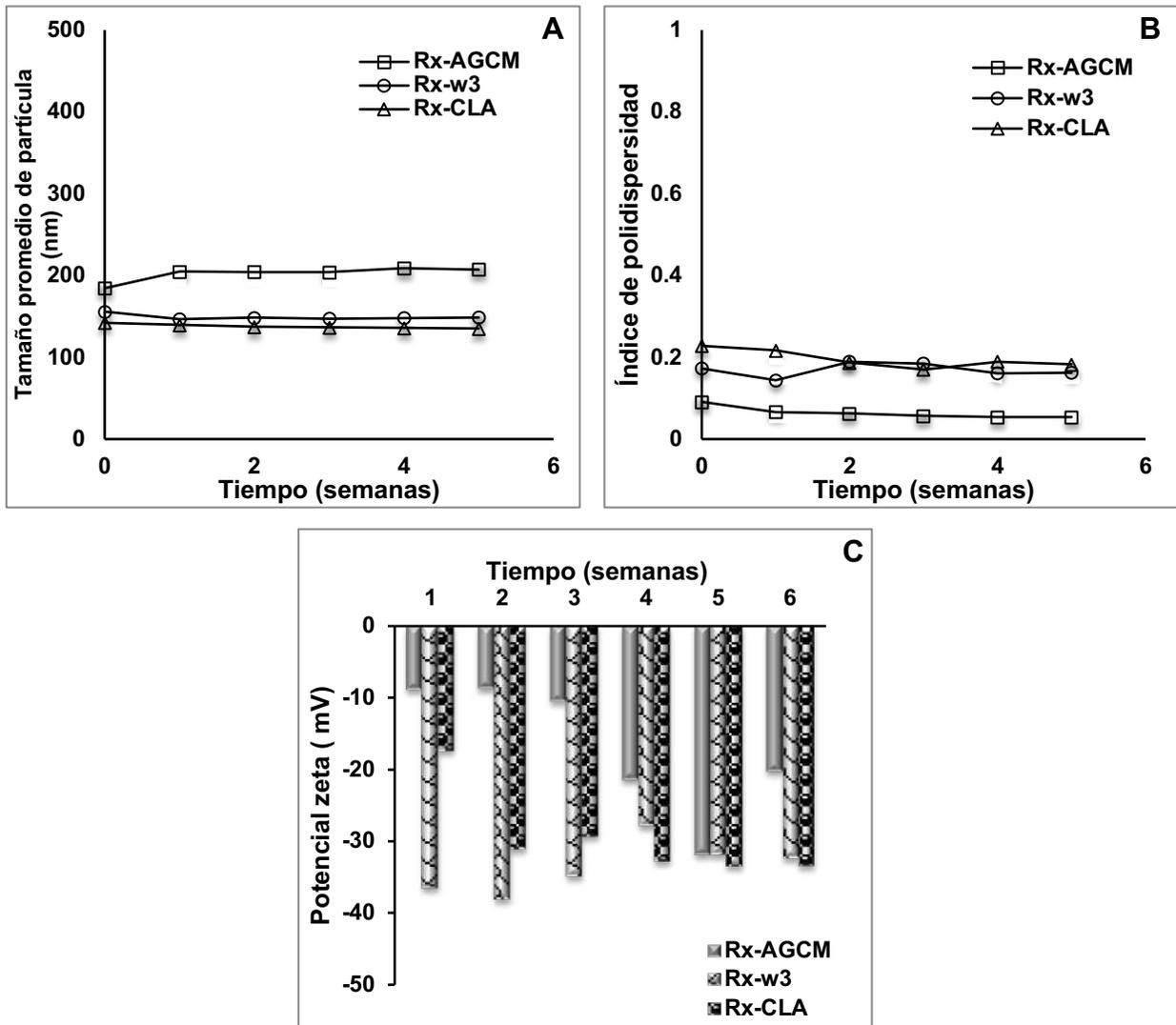


Figura 6.10. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mezcla de reacción con  $\omega$ -3, CLA y AGCM. En una relación 1:1 (%/%) de emulsificante: Kolliphor<sup>®</sup>EL, almacenadas 5 semanas a 5 °C. A) Tamaño promedio de partícula, B) Índice de polidispersidad y C) Potencial Zeta.

Debido a que no se contaba con los MAG y DAG de AGCM de manera individual, se comparó el comportamiento de la NE estabilizada con la mezcla de reacción de AGCM contra las otras dos mezclas de reacción (de  $\omega$ -3 y CLA). Aunque no existe diferencia estadística entre los diferentes puntos de la cinética, lo que nos demuestra que no hubo cambio durante el tiempo evaluado, si se demostró diferencias entre cinéticas de las diferentes reacciones, así CLA y  $\omega$ -3 son estadísticamente iguales, pero diferentes a la reacción de AGCM, en los tres parámetros evaluados, y aunque el tamaño promedio de partícula la NE con AGCM resulta desfavorecida, para el caso de PDI, presenta los mejores valores. Finalmente en cuanto el Potencial zeta, las NE de AGCM alcanzan valores deseables hasta la 5ª semana, a diferencia de las otras dos reacciones que presentan mejores valores durante todo el experimento.

#### ***6.2.2.2 Medición de Índice de estabilidad del Turbiscan, valor equivalente y espesor de capa con el Turbiscan Lab® Expert.***

Además de los criterios antes mencionados, las muestras se evaluaron con ayuda del equipo Turbiscan Lab®Expert, del cual el manual sugiere que el primer parámetro a tomar en cuenta sea el TSI, ya que ofrece información al comparar entre las diferentes formulaciones, acerca de qué sistema es más estable, al representar la suma de todas las variaciones detectadas en la muestra (respecto al tamaño o a la concentración). Además se recomienda tomar en cuenta los valores de transmitancia para el caso de muestras transparentes o translúcidas y para el caso de muestras opacas, el valor de la retrodispersión (backscattering). Debido a que las NE elaboradas no son transparentes, se tomaron en cuenta los datos tanto de retrodispersión (BS) y su diferencia ( $\Delta$ BS). Los diferentes tipos de desestabilización se pueden observar a simple vista al revisar la gráfica generada por el equipo. Dependiendo de la zona donde se observen los cambios a través del tiempo, puede identificarse el tipo de desestabilización, en caso de existir, dentro del sistema. Así cuando se observan cambios en el extremo izquierdo de la gráfica, que

corresponden a la base de la celda de medición, se tratará de un fenómeno de sedimentación. Cuando las anomalías se presentan en el extremo derecho de la gráfica (parte superior de la celda) se trata de un fenómeno de sedimentación inversa; ambos pueden medirse su intensidad, tomando en cuenta el Peak Thickness o espesor de capa que es calculado por el equipo a un tiempo dado. La separación en la parte central de la gráfica, de todas las mediciones realizadas indica problemas de floculación o coalescencia, sin embargo no es posible diferenciar entre ellos, ya que sólo pone en evidencia un incremento en el tamaño de la partícula, pero no define su causa.

A continuación se muestran los resultados de los parámetros evaluados en el Turbiscan para las diferentes NE (Figura 6.10).

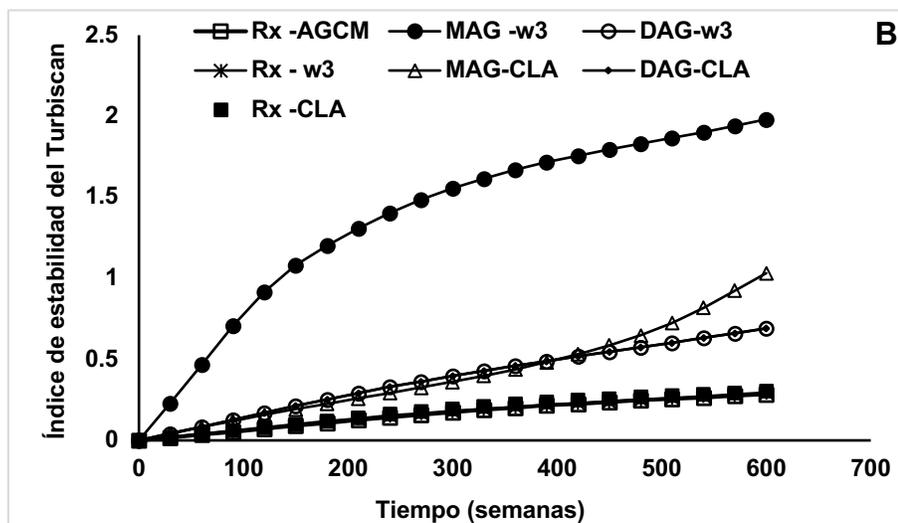
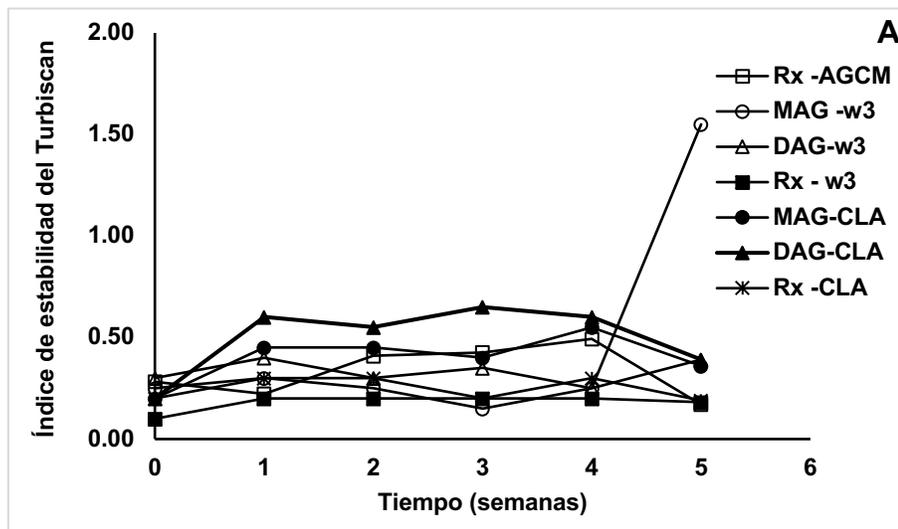


Figura 6.11. Evaluación de Índice de estabilidad del Turbiscan (TSI) de las nanoemulsiones elaboradas con MAG, DAG y la mezcla de reacción con  $\omega$ -3, CLA y AGCM , A) durante 5 semanas y B) en la 5ª semana.

Los datos extraídos del Turbiscan Lab<sup>®</sup> Expert de los valores de TSI a cada semana, fueron graficados para determinar el cambio experimentado a lo largo del tiempo de evaluación y con un análisis de varianza se demostró que las diferencias entre cada semana no es significativo, excepto para el caso de la 5ª semana en la NE con MAG  $\omega$ -3, donde se observa un aumento brusco en el valor de TSI. Así en la Figura 6.9, se observa una gráfica estándar de la comparación de los valores de TSI, donde las NE más cercanas al eje de las X, son las más estables; mientras que la de MAG  $\omega$ -3 muestra una inestabilidad global, lo que concuerda con el resultado observado en la Figura 6.8, por lo que podemos indicar que dicha NE inicia un proceso de inestabilidad.

A pesar de que después de una revisión en las diferentes cinéticas obtenidas del Turbiscan % BS (Retrodispersión) vs altura de la celda; no se observa algún cambio en la misma, que indique la presencia de algún fenómeno de desestabilización, se calcularon los datos de Valor equivalente y espesor de capa inferior y superior, que se encuentran relacionados con efectos de Floculación /coalescencia, sedimentación y sedimentación inversa, respectivamente, para cada NE y cada tiempo evaluado, dichos resultados se muestran en las siguientes gráficas (Figura 6.12).

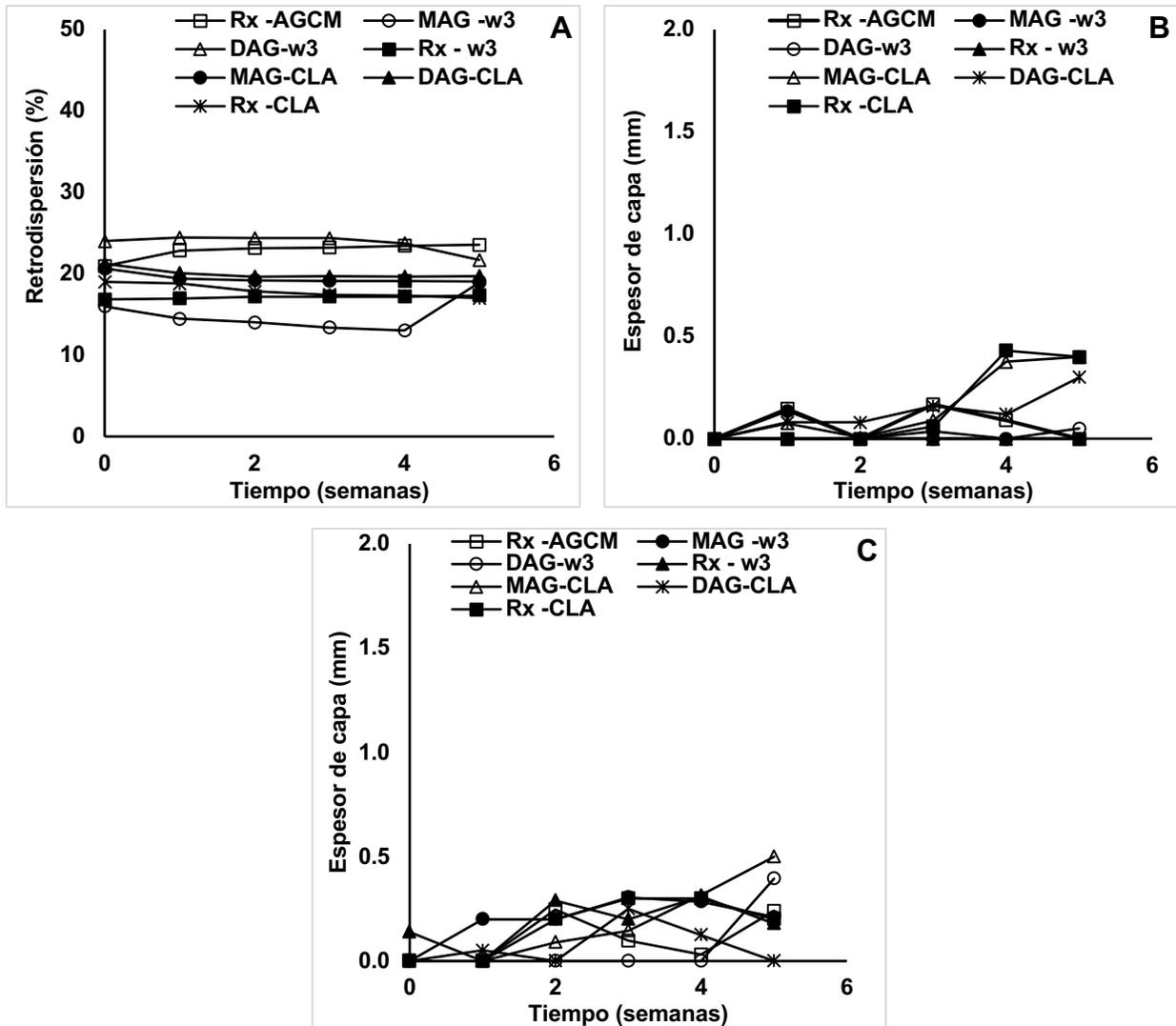


Figura 6.12. Cinéticas de las NE elaboradas con MAG, DAG y la mezcla de reacción con  $\omega$ -3, CLA y AGCM. A) Valor equivalente, B) Espesor de capa inferior y C) Espesor de capa superior durante 5 semanas.

En las gráficas anteriores se pone de evidencia, después de realizar un análisis estadístico (ANOVA) y la comparación de medias usando la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), que no hay diferencias significativas ni durante el desarrollo de la cinética, como entre ellas, en el valor de % de retrodispersión que representa un incremento de tamaño y este a su vez, un fenómeno de desestabilización debido a floculación o coalescencia. Sólo para el caso de la 5ª semana, para las NE con el emulsificante

MAG- $\omega$ -3 se observa un aumento de tamaño y por lo tanto la presencia de floculación o coalescencia. Cuando este dato se compara con la gráfica de tamaño promedio de partícula obtenida en las mismas condiciones, pero en el equipo Zetasizer Nano, no se observa dicho fenómeno, ya que se mantiene constantes los tamaños reportados por el equipo, sin embargo esto puede deberse que para la prueba en el Zetasizer Nano, se toma una muy pequeña cantidad de muestra (20  $\mu$ L) y además se disuelve en 1 mL de agua; esto puede provocar que o no se tome la muestra de la zona donde hubo un aumento de tamaño, o que por efecto del movimiento y dilución el fenómeno pudiera revertirse, lo que nos indicaría que se trata de floculación y no de coalescencia. Para todas las demás NE no hay evidencia de presentarse ni floculación ni coalescencia, en el tiempo y condiciones evaluadas.

Respecto a el espesor de capa tanto inferior (sedimentación) como superior (sedimentación inversa) en las NE evaluadas no presentaron variaciones, solo para el caso de las NE con CLA, se presenta un aumento en la sedimentación a partir de la 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> semana, sin embargo no sobrepasa los 0.5 mm y al no existir límites establecidos en la literatura, y no observarse a simple vista la formación de un sedimento, se sigue considerando estables a la sedimentación. Finalmente para la sedimentación inversa aunque se determinaron diferencias significativas a lo largo de la cinética de cada NE, incrementándose sobre todo en la 5<sup>a</sup> semana y para los casos de CLA, también se consideran estables al no sobrepasar los 0.5 mm de espesor.

Al analizar todos los datos anteriores respecto a la caracterización y la estabilidad por 5 semanas de las diferentes NE preparadas con los emulsificantes propuestos, y al observar que en los casos donde se comparan el uso de los MAG y DAG de forma individual contra la mezcla de reacción que contiene a ambos, no se observan diferencias significativas al realizar el análisis estadístico; o en algunos casos se observa un mejor comportamiento con la mezcla, por lo que se decidió utilizar únicamente las mezclas de reacción de los 3 lípidos bioactivos ( $\omega$ -3, CLA y AGCM) como emulsificantes para la estabilización de las NE acarreadoras de curcumina.

### 6.2.3 Reformulación de las nanoemulsiones con Mono y Diacilglicéridos modificados como emulsificantes.

Una vez seleccionados los emulsificantes a utilizar, la mezcla de reacción de  $\omega$ -3, CLA y AGCM, se modificó la formulación para aumentar el contenido de los emulsificantes preparados, después de varias pruebas preliminares se obtuvieron los mejores resultados con una relación de 3.5% del emulsificante estructurado y 0.5% de Kolliphor®EL, por lo que se prepararon, caracterizaron y evaluaron respecto a su estabilidad las NE reformuladas (Tabla 6.7.).

TABLA 6.7. Composición de NE elaboradas con la mezcla de reacción de MAG y DAG de  $\omega$ -3, CLA y AGCM y condiciones de preparación (\*CLA).

Componente	Cantidad
Agua (%)	43
Emulsificante (%)	<b>3.5</b>
Glicerol (%)	50
Curcumina (mg/g NE)	2.5
Triglicéridos de cadena media (%)	3
Kolliphor® (%)	<b>0.5</b>
Tiempo de sonicación (min)	2/3*
Amplitud (%)	20/30*

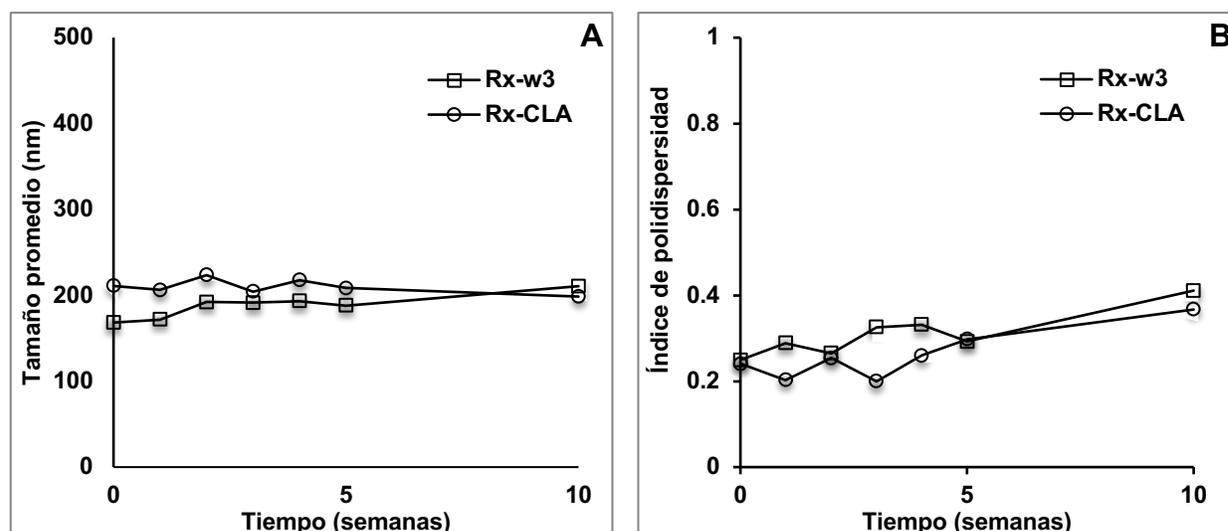
Los resultados de su caracterización se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 6.8. Caracterización de NE elaboradas con mezclas de reacción con MAG y DAG de  $\omega$ -3, CLA y AGCM conteniendo 3.5% de estos y 0.5% de Kolliphor®EL.

Parámetros	NE $\omega$ -3	NE-CLA	NE-AGCM
Tamaño promedio de partícula (nm)	151.1 $\pm$ 2.16	190.6 $\pm$ 1.25	518.7 $\pm$ 3.84
Índice de polidispersidad	0.1 $\pm$ 0.01	0.189 $\pm$ 0.04	0.4 $\pm$ 0.02
Potencial zeta (mV)	-30.5 $\pm$ 1.14	-32.3 $\pm$ 1.87	-17.9 $\pm$ 2.5

Con los resultados observados, se identificó que las características presentadas por la NE-AGCM mostraban tamaños promedio de partícula fuera de los límites establecidos para este trabajo, de igual manera el índice de polidispersidad señala que a pesar de tener un comportamiento monomodal, existe una gran dispersión entre los tamaños de partícula y finalmente el potencial zeta tampoco coincide con los valores deseables; por todo lo anterior se decidió no usar esta formulación para evaluar su estabilidad. Esto no significa que los MAG y DAG de AGCM no puedan ser útiles como emulsificantes, si no que requieren de un trabajo más profundo en la búsqueda de las mejores condiciones y en su formulación para ser utilizados.

Las otras dos NE fueron evaluadas su estabilidad por 10 semanas, observando su evolución en las siguientes gráficas (Figura 6.13).



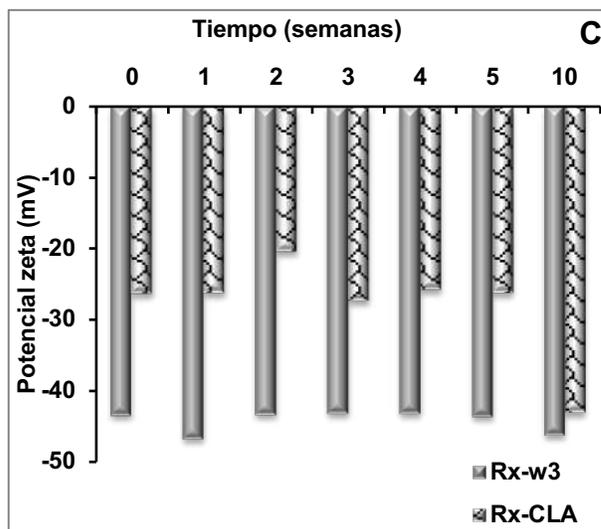


Figura 6.13. Evolución de la estabilidad de NE elaboradas con mezcla de reacción de  $\omega$ -3, CLA. En una relación 3.5:0.5 (%/%) de emulsificante: Kolliphor®EL, almacenadas 10 semanas a 5 °C. A) Tamaño promedio de partícula, B) Índice de polidispersidad y C) Potencial Zeta.

Como resultado del análisis estadístico, no se observan diferencias significativas entre los diferentes puntos de la cinética ni entre ellas para el tamaño promedio de partícula. En el PDI se observa un incremento a través del tiempo alcanzando valores cercanos o de 0.4 para la semana diez, aunque desde el inicio presentaron datos en el límite superior de 0.2. Para el potencial zeta la NE con la reacción de CLA mantuvo sus valores en un promedio de -25 mV, excepto en la semana diez donde se incrementa dicho valor; mientras que las de NE con mezcla de reacción con  $\omega$ -3 se mantiene constante todas las semanas, pero a valores altos (-40 mV). Sin embargo esto último no tiene gran influencia en la estabilidad de las NE ya que no se observan separación de fases o formación de sedimentos. Para asegurar que son estables se evaluó con ayuda del Turbiscan Lab® Expert, obteniéndose la siguiente información (Figura 6.14).

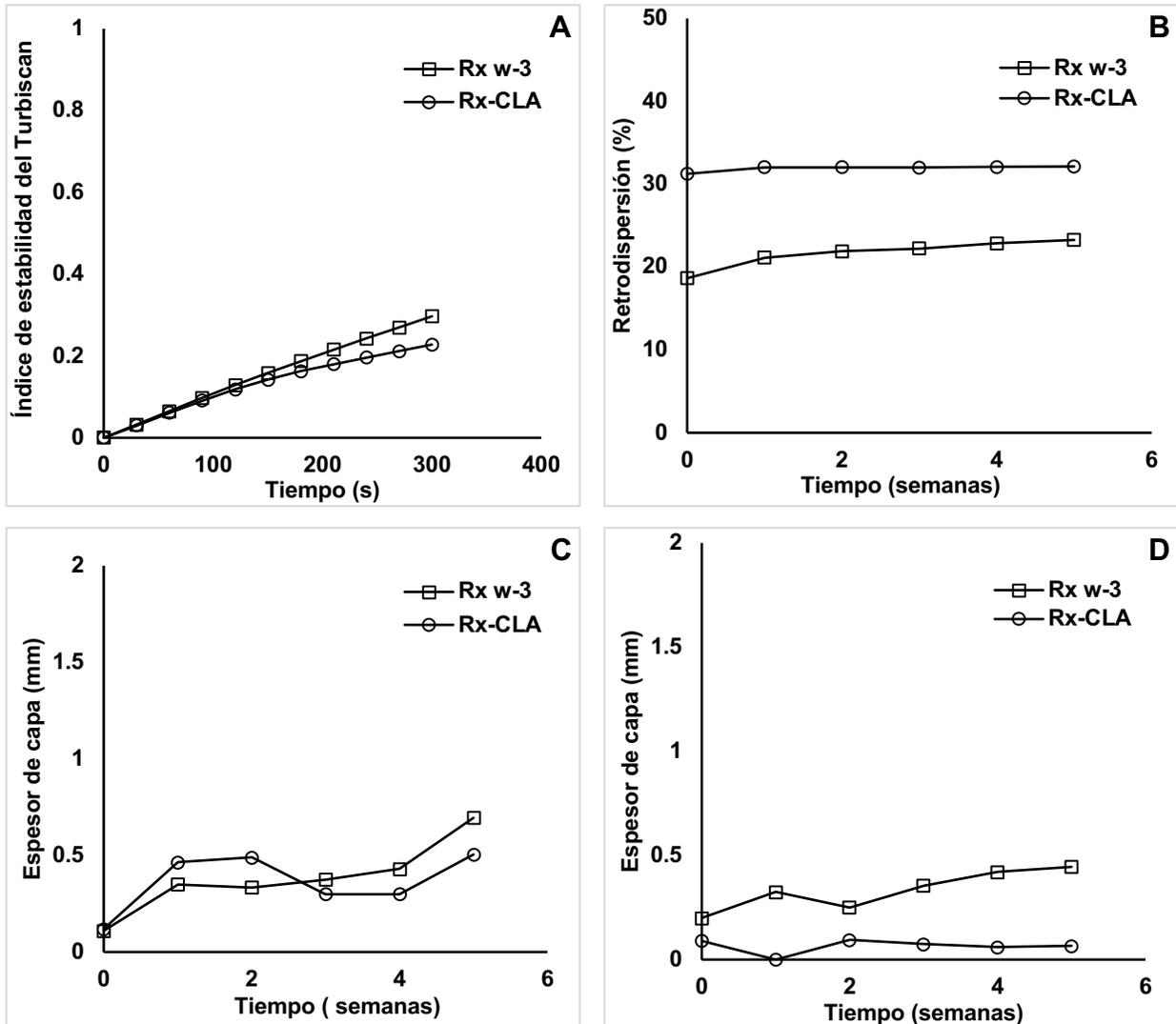


Figura 6.14. Cinéticas de las NE elaboradas con la mezcla de reacción de □-3 y CLA evaluadas durante 5 semanas. A) Índice de estabilidad del Turbiscan a la 5ª semana, B) Valor equivalente, C) Espesor de capa inferior y D) Espesor de capa superior de

Los resultados mostrados indican que en cuanto al TSI muestran comportamientos similares en su estabilidad total; además se mantienen sin cambios en el % de retrodispersión, indicando que no hay aumento de tamaño en el tiempo evaluado (5 semanas); que si hay formación de una capa en la zona inferior no

mayor de 1 mm para ambos casos y que en la zona superior sólo se observa una capa de menos de 0.5 nm.

Analizando los resultados obtenidos, se acepta que ambas formulaciones son estables y que serán las utilizadas para evaluar su biodisponibilidad en un modelo murino.

### 6.3 Estudio de la biodisponibilidad de la curcumina en las nanoemulsiones preparadas con monoacilgliceroles y diacilgliceroles.

Para el estudio de la biodisponibilidad de la curcumina transportada en NE estabilizadas con mezclas de MAG y DAG de  $\omega$ -3 y CLA, se utilizó el modelo murino descrito previamente en la metodología.

Además se preparó una NE estabilizada con PC comercial, tomando como referencia el trabajo de Ochoa, 2013; para tener un punto de comparación con las elaboradas con los emulsificantes preparados en este trabajo, la cual fue también caracterizada y evaluada su estabilidad por 5 semanas, obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA 6.9. Caracterización de nanoemulsiones estabilizadas con 9 % de PC comercial con 1 % de Kolliphor®EL, durante 5 semanas de almacenamiento.

<b>Parámetros/tiempo (semanas)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Tamaño promedio de partícula (nm)</b>	159.9	161.1	165.21	164.9	166.21	168.12
<b>Índice de polidispersidad</b>	0.216	0.187	0.178	0.181	0.183	0.192
<b>Potencial Z (mV)</b>	-10.3	-12.0	-12.4	-18.4	-19.23	-25.7

Las nanoemulsiones elaboradas con 9 % de PC comercial y 1 % de Kolliphor®EL muestran tamaños promedio de partícula y de PDI dentro de los

criterios establecidos, aunque no para el caso del potencial Z, sin embargo, esto concuerda con lo reportado tanto por Ochoa, 2013 y Cavazos, 2013 que a pesar de que las NE elaboradas con PC no cumplen con el criterio de presentar valores de potencial Z de -30 mV, sí cuentan con la estabilidad necesaria durante el tiempo evaluado.

Como paso previo, se pesaron cada uno de los animales y se aleatorizaron los valores obtenidos para formar los 5 grupos a evaluar, se realizó un análisis estadístico (ANOVA) y la comparación de medias usando la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  para asegurar que no existieran diferencias en los grupos que pudieran afectar los resultados. Los pesos de las ratas se encontraron entre 337 y 565 g. Con estos valores se calculó el volumen de administración de las NE, asegurando que todas recibieran la misma dosis de 20 mg de curcumina/Kg de peso del animal; sin dejar de lado que la dosis permitida por vía oral para estos animales es de 10 mL por Kg; así el volumen ingerido por las ratas fluctuó entre 2.69 hasta 4.51 mL de NE.

Antes de su administración, a cada una se le cortó la punta de la cola y se obtuvo la primera muestra de sangre, que representa el tiempo cero, inmediatamente después se les administró la NE y se contó el tiempo hasta la segunda toma de muestra. Así sucesivamente para todos los tiempos a evaluar (1, 2, 4,8 y 12 h).

De las muestras de sangre obtenidas se les separó el plasma y se extrajo la curcumina como se encuentra descrito en la sección metodología. Se realizó una curva estándar de curcumina con concentraciones desde 10 ng/mL hasta 1 µg/mL de curcumina para determinar la concentración en las muestras evaluadas.

### ***6.3.1 Determinación de los parámetros farmacocinéticos de las NE acarreadoras de curcumina***

Con la información obtenida por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de las muestras de plasma del modelo murino evaluado, se construyó la siguiente

gráfica (Figura 6.15), de donde se obtuvieron los diferentes parámetros farmacocinéticos de interés.

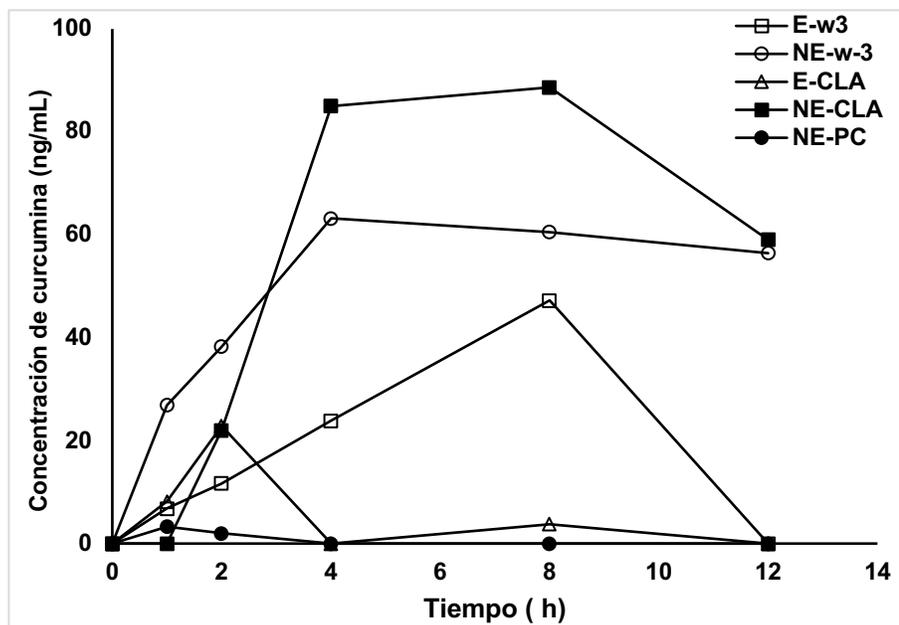


Figura 6.15. Perfiles de concentración plasmática-tiempo de curcumina. En ratas Wistar después de su administración oral en emulsiones (E) y nanoemulsiones (NE) estabilizadas con MAG y DAG de  $\omega$ -3 y CLA, y NE estabilizada con fosfatidilcolina (PC). Cada punto representa la media  $\pm$  DS,  $n = 3$ .

Al analizar la gráfica anterior, se pone de manifiesto que la emulsión de  $\omega$ -3 y la NE preparada con el mismo emulsificante exhiben un comportamiento diferente, tanto en la concentración máxima alcanzada (47.26 y 63.21 ng/mL respectivamente), en el tiempo que tardan en alcanzarla (8 y 4 h respectivamente ) y finalmente en el tiempo de retención de la curcumina, ya que mientras la emulsión una vez que alcanza su concentración máxima, al siguiente punto disminuye, en la NE se mantiene la concentración máxima hasta al menos 8 h (donde se detuvo el experimento); esto, desde el punto de vista farmacológico es deseable ya que mantiene más tiempo su efecto y la cantidad de principio activo presente en el organismo será mayor (área bajo la curva).

Al comparar el comportamiento entre la Emulsión y la NE estabilizadas con la

mezcla de MAG y DAG preparados con CLA, también se observan diferencias entre ellas, aunque la Emulsión alcanza su concentración máxima en un corto tiempo (2h vs 4h de la NE), los valores presentados son menores que la NE (21.9 y 85 ng/mL respectivamente), además la NE también mantiene dicha concentración por 4 h), mientras que la emulsión inmediatamente después de alcanzar su valor máximo disminuye abruptamente. Este fenómeno también se ha observado en otras NE de curcumina preparadas con PC, PC modificada con AGCM y Lisofosfatidilcolina en los trabajos reportados por Ochoa, 2013 y Chávez, 2017, que a pesar de presentar altas concentraciones de curcumina (116, 316 y 600 ng/mL) todas exhiben un comportamiento farmacocinético asociado a una rápida absorción. Finalmente la NE estabilizada con PC comercial, a pesar de alcanzar su concentración máxima en el menor tiempo (1 h), esta es muy baja (3.2 ng/mL), y a pesar que el comportamiento es similar al reportado por Ochoa, en cuanto a alcanzar rápidamente su concentración máxima, las concentraciones no son las mismas; esto puede deberse al método de preparación de la NE de PC, ya que mientras Ochoa, la obtuvo con el método de hidratación de capa delgada, en el presente trabajo se le adicionó 1% de Kolliphor®EL para disolver la curcumina, además de otros cambios a su formulación original como el uso del 9 y no el 10 % de PC, y usar menos contenido de glicerol (25 %) que con las demás formulaciones de este trabajo, por lo que consideramos que todos estos cambios pudieron modificar no su comportamiento, pero si su biodisponibilidad.

Esto permite notar que no sólo es el tamaño promedio de partícula lo que provoca una mayor absorción de curcumina en el plasma, ya que la NE de PC es la de menor tamaño como se muestra en la siguiente Tabla 6.10 y sin embargo no exhibe una alta concentración, incluso, es superada por las emulsiones que cuentan con un mayor tamaño. Esto indica que además del tamaño de partícula pueden estar involucrados otras características, como el tipo de emulsificante, en este caso, los MAG y DAG son de los emulsificantes más eficientes en la industria alimentaria y se utilizan en mayor proporción que la PC, puede también afectar la naturaleza de los ácidos grasos que componen a los emulsificantes, ya que cuando Ochoa, 2013

comparó PC contra PC modificada con AGCM , estos últimos presentaron una mayor concentración en plasma, lo que fue adjudicado únicamente a la diferencia de tamaño de partícula, pero con el estudio actual se puede inferir que el tipo de ácido graso presente en la PC modificada tuvo influencia positiva en la biodisponibilidad. Esto también explicaría porque el comportamiento entre las NE de CLA y  $\omega$ -3 presentan el mismo comportamiento (manteniendo la concentración de curcumina estable por varias horas 4-8h) pero diferentes concentraciones de curcumina.

Tabla 6.10. Comparación de los tamaños promedio de partícula de las diferentes formulaciones utilizadas para determinar la absorción de curcumina en el modelo murino de ratas Wistar.

	<b>E-<math>\omega</math>3</b>	<b>NE-<math>\omega</math>3</b>	<b>E-CLA</b>	<b>NE-CLA</b>	<b>NE-PC</b>
Tamaño promedio de partícula (nm)	1000	159	760	200	149

Los parámetros farmacocinéticos de interés fueron, concentración máxima alcanzada ( $C_{m\acute{a}x}$ ) expresada en ng de curcumina por mL de plasma; el  $T_{m\acute{a}x}$  representa el tiempo necesario para alcanzar la  $C_{m\acute{a}x}$ , ambos valores se obtienen directamente de la gráfica de concentración plasmática contra tiempo. El área bajo la curva (ABCt) indica la cantidad del principio activo en el organismo después de la administración y es el principal indicador de la biodisponibilidad de un fármaco. Existen dos maneras de reportar la biodisponibilidad de las formulaciones, una es la biodisponibilidad absoluta, donde se compara la concentración de principio activo por cualquier vía de administración contra la de vía intravenosa (que se toma como el 100%), si se compara entre vías de administración sin tomar en cuenta la vía IV, entonces se refiere a la biodisponibilidad relativa ( $F_{rel}$ ), que se expresa como cuanto por ciento es más biodisponible una formulación que otra. La constante de eliminación ( $K_{el}$ ) representa la proporción del principio activo eliminado por unidad de tiempo ( $h^{-1}$ ), así a mayor valor de  $K_{el}$ , habrá una mayor velocidad de eliminación,

para esto se toman los dos últimos puntos de una gráfica del logaritmo natural de la concentración del fármaco en función del tiempo, y el valor obtenido indica que al multiplicarlo por 100, el valor obtenido es el % de principio activo remanente en el cuerpo que es removida cada hora después de alcanzar su concentración máxima. Finalmente la vida media plasmática ( $t_{1/2}$ ) representa el tiempo necesario para que la concentración de la droga en el plasma, disminuya a la mitad, esto se relaciona con la duración de la acción del fármaco e indica cuando otra dosis sería requerida. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla 6.11.

TABLA 6.11. Parámetros farmacocinéticos de curcumina en emulsiones y nanoemulsiones. Estabilizadas con MAG y DAG de  $\omega$ -3 y CLA y NE estabilizada con fosfatidilcolina (PC), después de la administración oral de 20mg de curcumina/Kg de peso a ratas Wistar.

Parámetro	E- $\omega$ 3	NE- $\omega$ 3	E-CLA	NE-CLA	NE-PC
<b>C<sub>máx</sub></b> (ng/mL)	47.26 ±1.23	63.21 ±2.33	22.85±4.23	88.65±2.31	3.27±0.99
<b>t<sub>máx</sub></b> (h)	8	4	2	8	1
<b>ABC<sub>t</sub></b> (ng.h/mL)	284.87	629.19	57.42	760.49	6.15
<b>F<sub>rel</sub></b> (%)	----	45	----	7.5	---
<b>K<sub>el</sub></b> (h <sup>-1</sup> )	0.96 ±0.08	1.01±0.23	1.56±0.76	0.10±0.02	0.49±0.12
<b>t<sub>1/2</sub></b> (h)	2	2.5	2	2.5	1.5

De acuerdo a lo explicado anteriormente, al relacionarlo con los resultados obtenidos, se observa que la concentración máxima más elevada se presenta en las NE de ambos emulsificantes, a pesar de que los tiempos para alcanzar dicha concentración no fueron tan rápidos como en el trabajo de Ochoa, 2013 o Chávez,

2017, aunque como ya se hizo notar, en el caso de las formulaciones de este trabajo las concentraciones máximas se mantuvieron por más tiempo. El área bajo la curva de las formulaciones confirma que las NE presentaron una mayor cantidad de curcumina en el organismo, al compararlo con el de referencia se observa que aunque Ochoa (2013) obtuvo una  $C_{m\acute{a}x}$  aproximadamente 3 veces mayor que la de la NE con CLA, al final los valores de ABC muestran que el emulsificante utilizado en esta investigación (NE-CLA) presentan valores superiores (760 vs 720 ng/mL) con la ventaja del mayor tiempo de permanencia en el organismo (Figura 6.16)

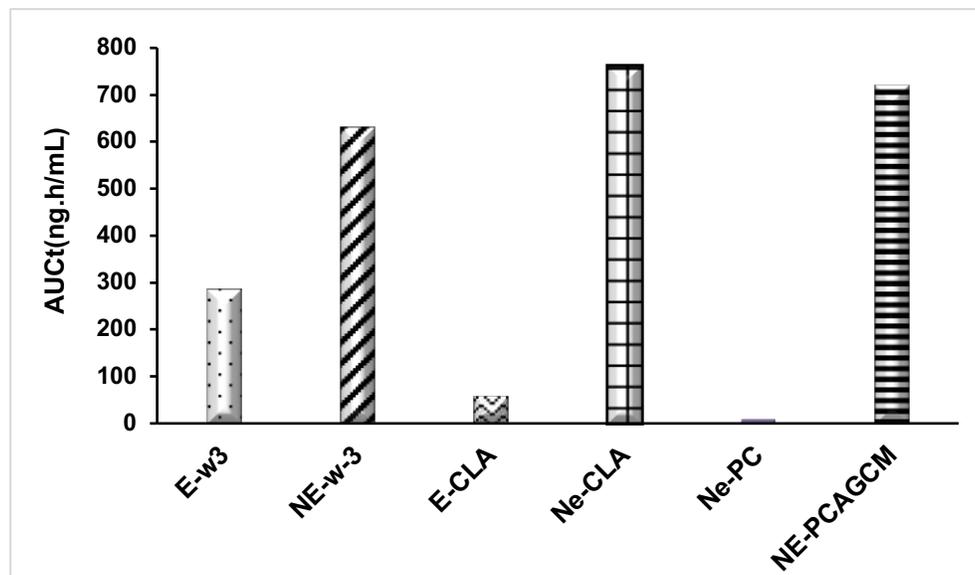


Figura 6.16. Comparación de los valores del área bajo la curva de las emulsiones (E) y nanoemulsiones (NE) elaboradas con MAG y DAG de  $\omega$ -3 y CLA, NE de PC normal y modificada (Ochoa, 2013).

Respecto a la biodisponibilidad relativa, se compararon las NE vs las emulsiones de cada emulsificante probado, encontrando que para el caso de las formulaciones con de  $\omega$ -3, la NE es 45% más biodisponible (biodisponibilidad relativa) que la emulsión correspondiente; y para las formulaciones con CLA, fue de 7.5% más disponible la NE que la emulsión.

Finalmente se observa que la vida media plasmática es más alta en ambas nanoemulsiones a diferencia de las emulsiones, indicando con esto que tardará más tiempo en el eliminarse la curcumina del organismo, después de alcanzar su máxima concentración.

## 7. CONCLUSIONES

Respecto a la síntesis enzimática de monoacilglicéridos y diacilglicéridos de ácidos grasos  $\omega$ -3 y con ácido linoléico conjugado, el mayor rendimiento se obtuvo para  $\omega$ -3 (68.8 %), con la mayor temperatura evaluada (75 °C) y para ácido linoleico conjugado (96.84 %) a una relación de sustratos CLA:glicerol donde se presenta una mayor concentración de glicerol (1:1 p/p).

La mayor producción de monoacilglicéridos y diacilglicéridos de ácidos grasos de cadena media (95.16 %) se obtuvo con las siguientes condiciones: 5 % (en peso) de Novozym 435 (30 min) Gli: AGCM libres (1:1 p/p), 300 rpm y 10 % (en peso) de mallas moleculares a 50 °C.

Las nanoemulsiones O/W acarreadoras de curcumina con 1 % de monoacilglicéridos y/o diacilglicéridos preparados con ácidos grasos  $\omega$ -3, CLA y de CM con 1 % de Kolliphor®EL, cuentan con las características deseables (tamaño promedio de partícula < a 200 nm; Índice de polidispersidad < a 0.2 y potencial Z cercano a -30 mV), además no presentaron cambios significativos en los parámetros de estabilidad evaluados durante las 5 semanas.

Las nanoemulsiones O/W acarreadoras de curcumina con 3.5 % (en peso) de la mezcla de reacción con monoacilglicéridos y/o diacilglicéridos preparados con ácidos grasos  $\omega$ -3 y CLA con 0.5 % de Kolliphor®EL, fueron estables durante 10 semanas. Respecto a las NE con 3.5:0.5 % de la mezcla de MAG y DAG de AGCM con Kolliphor®EL podrían realizarse cambios en su formulación y/o procesamiento para alcanzar las características deseables para ser utilizado como emulsificante.

Las emulsiones de curcumina estabilizadas con la mezcla de MAG y DAG de  $\omega$ -3 presentan un mecanismo de liberación lento ( $t_{m\acute{a}x}$  8h) y junto a las de CLA, al alcanzar la  $C_{m\acute{a}x}$  inicia su descenso. En las nanemulsiones de los mismos emulsificantes, el tiempo de permanencia es prolongado (8 y 4 h respectivamente).

La biodisponibilidad relativa de la curcumina transportada dentro de las NE de  $\omega$ -3 y CLA es 45 y 7.5% mayor en comparación a las emulsiones y la cantidad de curcumina ( $C_{m\acute{a}x}$ ) es 2.2 y 13.3 veces mayor que en las emulsiones de correspondientes.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Abbas, Shabbar, Eric Karangwa; Mohanad Bashari, Khizar Hayat, Xiao Hong, Hafiz Rizwan Sharif, Xiaoming Zhang. (2015). Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. *Ultrasonics Sonochemistry* (23) 81-92

Abbas, Shabbar. K. Hayat, E.Karangwa, M.Bashari, X. Zhang, (2013) Anoverview of ultrasound- assisted food-grade nanoemulsions, *Food Eng. Rev.* 5 139–157.

Abbas, Shabbar. M. Bashari, W. Akhtar, W. Li, X. Zhang, (2014) Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch, *Ultrasonics Sonochemistry*. 21 1265–1274

Abraham, G., Murray, M.A. and John, V.T. (1998). Interesterification selectivity in lipase catalyzed reactions of low molecular weight triglycerides. *Biotechnology Letters* 10, 555-558.

Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 14, 3–15.

Adlercreutz, D., Budde, H., Wehtje, E. (2002). Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnology and Bioengineering*. 78, 403–411.

Agame Lagunes, B., 2017. Efecto de la administración de nanoemulsiones de curcumina (*Curcuma longa*) estabilizadas con fosfatidilcolina modificada con ácidos grasos de cadena media, sobre el proceso de carcinogénesis en ratones transgénicos K14E6. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Aguilera MC. Ramírez T. (2001). Efectos protectores de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados sobre el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. *Nutr. Hosp.*; 16:78-91.

Ahmed FU. (1990). Efficient synthesis of fatty monoglyceride sulfates from fatty acids and fatty acid methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67:8–14

Akram, M., Shahab-Uddin, Ahmed, A., Khan, U., Hannan, A., Mohiuddin, E., & Asif,

- M. (2010). Curcuma Longa and Curcumin: a Review Article. *Rom. J. Biol. – Plant Biol.*, 55(2), 65–70.
- Akoh, C. (2002). Structured Lipids. In: *Food Lipids. Chemistry, nutrition and biotechnology*, Pp. 895-926. 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- Amparo, L., Marchena, U., Alejandra, G., Parra, M., Adelaida, M., Quiroz, C., Gómez, B. (2009). Bioactive compounds on food and health-promoting properties. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 11(1), 27–38.
- Anthonsen, HW, Baptista, A, Drablos, F, Martel, P, Petersen, SB, Sebastiao, M and Vaz, L. (1995). Lipases and estereases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1, 315-371.
- Antony S, Kuttan R, Kuttan G. (1999). Immunomodulatory activity of curcumin. *Immunol Invest*, **28**(56): 291-303.
- Apisariyakul, A., Vanittanakom, N., Buddhasukh, D. (1995). Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **49**, 163–169.
- Aranberri, B. P. Binks, J.H., Clint, P.D. y Fletcher, I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7(3): 211-230.
- Arcos, J. A., & Otero, C. (1996). Enzyme, medium, and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono- and dioleoylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(6), 673–682. <http://doi.org/10.1007/BF02517939>
- Arterburn Linda M., Eileen Bailey Hall and Harry Oken. (2006) distribution, interconversion, and dose response of W-3fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83: 6 1467-1476.
- Asakura, L., Lottenberg, A.M.P., Neves, M.Q.T.S., Nunes, V.S., Rocha, J.C., Passarelli, M. (2000). Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*. **71**, 701–705.
- Aulton, Michael E. (2002). *Pharmaceutics: the design and manufacture of medicines*. 2ed. Churchill Livingstone) 679 pags.

Azuine MA, Bhide SV. (1992). Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr. Cancer*, **17**(1): 77-83.

Baba, N., Bracco, E.F., Hashim, S.A. (1982). Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **35**, 678-682.

Babayan, V.K. (1981). Medium chain length fatty acid esters and their medical and nutritional applications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **58**, 49-51.

Babu PS, Srinivasan K. (1995). Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat. *Mol Cell Biochem*, **152**: 13-21.

Bach, A.C., Babayan, V.K. (1982). Medium-chain triglycerides: an update. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **36**, 950-962.

Badui, D. S. 1999. *Química De Los Alimentos*. 4a. Ed. Prentice Hall México, pp 211-278.

Baeza-Jiménez R., Da Som No, Christina Otero, Hugo S. García, Jeom Sig Lee e In-Haw Kim. (2014). Lipase-Catalysed Enrichment of  $\alpha$ -Linolenic Acid from Evening Primrose Oil in a Solvent-Free System. *J Am Oil Chem Soc*. **91**:1147-1153

Baeza-Jiménez R, González- Rodríguez J, Kim IH, García HS, Otero C. (2012). Use of immobilized phospholipase A1-catalyzed acidolysis for the production of structured phosphatidylcholine with an elevated conjugated linoleic acid content. *Grasas Aceites*, **63**(1): 44-52

Baeza-Jiménez, R., Miranda, K., García, H.S. and Otero, C. (2013). Lipase-catalyzed glycerolysis of fish oil to obtain diacylglycerols. *Grasas y Aceites* **64**, 237-242.

Benerjee A., Nigam SS. (1978). Antimicrobial efficacy of the essential oil of *Curcuma longa*. *Ind J Med Res*, **68**: 864-866.

Bernhoft, A., (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway

Bhanvase, B.A., D.V. Pinjari, P.R. Gogate, S.H. Sonawane, A.B. Pandit, (2011) Process intensification of encapsulation of functionalized CaCO<sub>3</sub> nanoparticles using

ultrasound assisted emulsion polymerization, *Chem. Eng. Process.* 50 1160–1168.

Bhanvase, B.A. D.V. Pinjari, P.R. Gogate, S.H. Sonawane, A.B. Pandit, (2012a) Synthesis of exfoliated poly (styrene-co-methyl methacrylate)/montmorillonite nanocomposite using ultrasound assisted in situ emulsion copolymerization, *Chem. Eng. J.* 181–182 770–778.

Bhanvase, B.A. D.V. Pinjari, S.H. Sonawane, P.R. Gogate, A.B. Pandit, Analysis of semibatch emulsion polymerization: role of ultrasound and initiator, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012b) 97–103.

Biesalski, H.-K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Weber, P. (2009). Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition* 25(11-12), 1202–5.

Blumenthal, M.; Goldberg, A. y Brinckmann, J. 2000. (Eds.). *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs.* Austin, TX: American Botanical Council; Newton, MA: Integrative Medicine Communications.

Bonte F, Noel-Hudson MS, Wepierre J, Meybeck A. (1997). Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med*, 63: 265-266.

Bornscheuer, Uwe t., Marek Adamczak and Mohamed M. Soumanou. (2003). Lipase-catalysed synthesis of modified lipids. Chapter 6 In *Lipids for functional foods and nutraceuticals.* Frank Gunstone. The oily press. United Kingdom, 319pages.

Bosman B. (1994). Testing of lipoxygenase inhibitors, cyclooxygenase inhibitors, drugs with immunomodulating properties and some reference antipsoriatic drugs in the modified mouse tail test, an animal model of psoriasis. *Skin Pharma- col*, 7(6): 324-334.

Camino Feltes M.M., D. de Oliveira, J.M. Block y J.L. Ninow. 2012. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. *Food Bioprocess Technol.* Published on line

Carbajal, A.A., (2013). Manual de nutrición y dietética. Universidad Complutense de Madrid. 366págs. Publicación en línea: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal>.

Cavazos Garduño, A. 2013. Formación y caracterización de nanoemulsiones O/W de ácido betulínico elaboradas a partir de lecitina modificada con ácidos grasos omega-3. Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Chang H, But PP. (1987). «Pharmacology and applications of chinese materia medica», vol 2, World Scientific Publishing Company, Singapore.

Chen, H., Weiss, J., Shahidi, F. (2006a). Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technology*. **60**, 30–36.

Chen, L., Remondetto, G.E., Subirade, M. (2006b). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*. **17**, 272–283.

Chin SF, W.Liu, JM Storksin, and Y.L Ha, HW Pariza. (1992) Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*. 5(3) 185-197

Cui, J., Yu, B., Zhao, Y., Zhu, W., Li, H., Lou, H., Zhai, G. (2009). Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*. **371**, 148–155.

Dahl, Thomas, Piotr Bilski, Krzysztof J. Reszka and Colin F. Chignell. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochemistry and Photobiology*. 59 (3) 290-294.

Davies, J.T. (1957). *Proc. Int. Congr. Surface Activity (2d)*, vol. 1 p 426 Butterworth London.

De Caterina R, Endres S, Kristensen SD, Schmidt EB.  $\omega$ -3 fatty acids and renal diseases. *Am J Kidney Dis*. 1994; 24:397-415.

Deodhar SD, Sethi R, Scrima RC. (1980). Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin. *Indian J Med Res*, 71:632-634.

Deshpande Shailes, Ingle Arvind D, Maru GB. (1997a). Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pirene-induced forestomach papillomas in mice. *Cancer Lett*, 118(1): 79-85.

Dhiman TR, Anand GR, Satter LD y Pariza MW. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal Dairy Science*. 82 (10) 2146-2156.

Dickinson, Eric and Stainsby George. 1982. *Colloids in Food*. Applied science publishers.UK. 533 pág.

DiPiro, J. T. Spruill, W. J., Blouin, R. A., Pruemer, J. M. y Wade, W. E. 2005.

Concepts in Clinical Pharmacokinetics. 4th Edition. American Society of Health-System Pharmacists. pp 17 – 50

Diks, R.M.M. y J.A. Bosley. (2000). The exploitation of lipase selectivities for the production of acylglycerols. Chapter 1 .In *Enzymes in Lipid Modification* edited by Uwe T. Bornscheuer. Edit Wiley-VCH. New York 413 pags.

Donatus, I. A. Sardjoko, and N. P. Vermeulen, (1990) Cytotoxic and cytoprotective activities of curcumin. Effects on paracetamol-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and glutathione depletion in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **39**, 1869–1875.

El Kihel L., Bourass, J, Richomme, P. Petit, J.Y. (1996). Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory effects of niflumic acid lipophylic prodrugs in brain edema. *Drug. Res.* **46**. 1040-1044.

Ezhilarasi P. N. & P. Karthik & N. Chhanwal & C. Anandharamakrishnan. (2012). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol* 6:628–647

Eom, T.-K., Kong, C.-S., Byun, H.-G., Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2010). Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice. *Process Biochemistry*, 45(5), 738–743.

Flickinger, BD. (2006). Diacylglycerols (DAGs) and their mode of action. In, *Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-products*. Shahidi, f. (ed.) Taylor y Francias Group. Boca Ratón, FL., pp 181-186.

Fustier P. A.R. Taherian and H.S. Ramaswamy. Emulsion delivery systems for fuctional foods. In *Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-products*. Shahidi, f. (ed.) Taylor y Francias Group. Boca Ratón, FL. 505 págs.

García, H.S., Kim, I.H., López-Hernández, A., and Hill, C.G. (2008). Enrichment of lecithin with *n*-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A1. *Grasas y Aceites*. **59**, 368– 374.

Garzon-Aburbeh A, Poupaert JH, Claesen M, Dumont P, Atassi G. (1983). 1,3-Dipalmitoylglycerol ester of chlorambucil as a lymphotropic, orally administrable antineoplastic agent. *J Med Chem* 26:1200–3.

GenomeNet. [www.Genome.jp](http://www.Genome.jp) Reacciones de aciltransferasas R08811 y R08812

Gersey, Z., Rodriguez, G., Barbarite, E., Sánchez, A., Walters, W., Ohaeto, K. & Graham, R.M. (2017). Curcumin decreases malignant characteristics of glioblastoma stem cells via induction of reactive oxygen species. *BMC Cancer*, (17) 1-11.

Gil Hernández, Ángel. (2010). Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos tomo II 2ª edición. Editorial médica Panamericana. México, 812 páginas.

Gonda R, Takeda M, Shimizu M, Tomoda M. (1992a). Characterization of a neutral polysaccharide having activity on the reticulo endothelial system from the rhizome of *Curcuma longa*. *Chem Pharm Bull*, 40: 185-185.

Gonda R, Tomoda M, Takada K, Ohara N, Shimizu M. (1992b). The core structure of ukonan A, a phagocytosis-activating polysaccharide from the rhizome of *Curcuma longa*, and immunological activities of degradation products. *Chem Pharm Bull*, 40: 990-993.

González Ortega, L. A., 2017. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de curcumina acarreadora en dos vehículos (organogel y nanogel) sobre el proceso inflamatorio de un modelo murino con edema auricular. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Grompone MA (2012). Mono- y diglicéridos (in press). In: Block & Barrera-Arellano (ed). *Temas Selectos en Aceites y Grasas*. Editora Blücher, São Paulo, Brazil

Gunstone, F. D., Harwood, J. L., & Padley, F. B. (1994). Marine oils: fish and whale oils. In F. D. Gunstone (Ed.), *the Lipid Handbook* (pp. 167–171). London, United Kingdom: Chapman & Hall. Guo,

Hartmann Rainer y Hans Meisel. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. 18(2) April 2007, Pages 163–169

Hasan, F., Shah, A. A. y Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Tech.* 39:235–251

Hasenhuettl, G. L. (2008). Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. In G. L. Hasenhuettl & R. W. Hartel (Eds.), *Food emulsifiers and their applications* (pp. 1–38). New York: Springer Science+Business Media

Herrera M L. Introduction. In: *Analytical Techniques for Studying the Physical Properties of Lipid Emulsions*. New York: Springer; 2012. p1-6.

Hiemenz, Paul C., Rajagopalan Raj. (1997). Principles of colloid and surface chemistry. 3er edition. Marcel Dekker, Inc. New York.

Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. (1978). The metabolism and excretion of curcumin (1, 7-bis (4hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*, 8: 761-768.

Hong RL, Sponhn WH, Hung MC. (1999). Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clin Cancer Res*, 5(7): 1884-189 1.

Horrocks LA, Farooqui AA. (2004). Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids*. 70:361-72.

Huang MT, Newmark HL, Frenkel K. (1997). Inhibitory effects of curcumin on tumogenesis in mice. *J Cell Biochem*, 27: 26-34.

Huang HC, Jan TR, Yeh SF. (1992). Inhibitory effect of curcumin, an anti-inflammatory agent, on vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol*, 221: 381-384.

Hussain M, Chandrasekhara N. (1994). Biliary proteins from hepatic bile of rats fed curcumin or capsaicin inhibit cholesterol crystal nucleation in supersaturated model bile. *Ind J Biochem Biophys*, 31: 407412.

Hussain M, Chandrasekhara N. (1992). Effects of curcumin of cholesterol gall-stone induction in mice. *Indian J Med Res*, 96: 288-291.

Ikeda, Y., Okamura Ikeda, K., Tanaka, K. (1985). Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases from rat-liver mitochondria. Isolation of the holo- and apoenzymes and conversion of the apoenzyme to the holoenzyme. *Journal of Biological Chemistry*. **260**, 1311–1325.

Inagawa H, Nishizawa T, Tsuliola D, Suda T, Chiba Y, Okutomi T, Morikawa A, Soma GI, Mizuno DI. (1992). Homeostasis as regulated by activated macrophage. II. LPS of plant origin other than wheat flour and their concomitant bacteria. *Chem Pharm Bull*, 40: 994-997.

Israelachvili, J. (1992). Thermodynamic Principles of Self-Assembly. in *Intermolecular and Surfaces Forces*. London: Academic Press, 341–94.

Jacob G., Hesse W, Shashoua VE. 1990. Synthesis, brain uptake, and pharmacological properties of a glyceryl lipid containing GABA and the GABA-T inhibitor  $\gamma$ -vinyl- GABA. *J Med Chem* 33:733–6.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews of Microbiology* 53, 315-351.

Jagetia, G.C., Aggarwal, B.B. (2007). "Spicing up" of the immune system by curcumin. *Journal of Clinical Immunology*. **27**, 19–35.

Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. (1990). Elevated lipid peroxidation levels in red blood cells streptozotocin treated diabetic rats. *Metab Clin Exp*, **39**: 971-975.

Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. **85**, 295–350.

Kabara, J. (2000). A health oil for the new millennium. *Inform*, **11**, 123–127.

Kakar SS, Roy D. (1994). Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos, c-jun and c-myc protooncogenes messenger RNAs in mouse skin. *Cancer Lett*, 87(1): 85-89.

Kasai, M., Maki, H., Nosaka, N., Aoyama, T., Ooyama, K., Uto, H. (2003a). Effect of medium-chain triglycerides on the postprandial triglyceride concentration in healthy men. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **67**, 46–53.

Kasai, M., Nosaka, N., Maki, H., Negishi, S., Aoyama, T., Nakamura, M. (2003b). Effect of dietary medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) on accumulation of body fat in healthy humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. **12**, 151–160.

Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao CV, Reddy BS. (1999). Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res*, 59: 597-601.

Kim, I.H., Garcia, H.S., Hill, C.G. (2007). Phospholipase A<sub>1</sub> catalyzed synthesis of phospholipids enriched in *n*-3 polyunsaturated fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**, 1130–1135.

Kim, In-Hwan, Garcia, H.S. and Hill Jr. C.G. (2010). Synthesis of Structured Phosphatidylcholine Containing *n*-3 PUFA Residues via Acidolysis Mediated by Immobilized Phospholipase A<sub>1</sub>. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87,

1293-1299.

Kim In-Hwan and S.-M. Lee. 2006. Synthesis of Diacylglycerols containing CLA by Lipase-catalyzed esterification. *Journal of Food Science. Food Chemistry and Toxicology* 71 (7) 378-382

Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Akao N, Kondo K, Tsuda Y. (1993). Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Phann Bull*, **41**: 1640-1643.

Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Maki, A., Amemiya, H., Hirai, Y. (2004). Medium chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. **286**, 1085–1089.

Krotkiewski, M. (2001). Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides. *International Journal of Obesity*. **25**, 1393–1400.

Kshirsagar, A.C., Yenge, V.B., Sarkar, A., Singhal, R.S. (2009). Efficacy of pullulan in emulsification of turmeric oleoresin and its subsequent microencapsulation. *Food Chemistry*. **113**, 1139–1145.

Kumar R, Billimoria JD. (1978). Gastric ulceration and concentration of salicylate in plasma in rats after administration of <sup>14</sup>C-labeled aspirin and its synthetic triglyceride, 1,3-dipalmitoyl-2(2' -octoxy-[<sup>14</sup> C]carboxyben-zoyl)-glycerol. *J Pharm Pharmacol* 30:754–8.

Leal-Calderon, F., Thivilliers, F. & Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **12**, 206–212.

Li ZJ, Zhang LJ, Dezube Dj, Crumpacker CS, Pardee AB. (1993). Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 1839-1842.

Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyaku1 A, Dunn FW. (1997). Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*, 116(2): 197-203.

Lo, S.-K., Tan, C.-P., Long, K., Yussof, M. S. A., y Lai, O.-M. (2008). Diacylglycerol oil—properties, processes and products: a review. *Food Bioprocess Technology*, 1: 223–233.

- Lutomski J, Kedzia B, Debska W. (1974). Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi. *Planta Med*, 26(1): 9-19.
- Marten, B., Pfeuffer, M., and Schrezenmeir, J. (2006). Review medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*. **16**, 1374–1382.
- Martins, A.B., M.F. Schein, J.L.R. Friedrich, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rodrigues (2013) Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: enhanced activity and operational stability, *Ultrason. Sonochem.* 20 1155–1160
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **18**, 635–666.
- Matsuo, N., & Tokimitsu, I. (2001). Metabolic characteristics of diacylglycerol. *Inform*, 12, 1098–1102.
- Mazumder, A., Raghavan, K., Weinstein, J., Kohn, K.W., Pommier, Y. (1995). Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochemical Pharmacology*. **49**, 1165–1170.
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press. Boca Raton. 609p.
- McClements, D. J. (2005). Theoretical Analysis of Factors Affecting the Formation and Stability of Multilayered Colloidal Dispersions. *Langmuir*, **2005**, 21 (21), pp 9777–9785
- McClements, D.J., (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 2011,7, 2297-2316.
- McClements, D.J., Decker, E.A. & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, **72**(8), R109–R124.
- McClements, D. J. (2002) Lipid based emulsions and emulsifiers, pp 63 – 102. En: *Food lipids. Chemistry, nutrition and biotechnology*. (Ed. Akon, C. C., y Min, P. B.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- McClements, D. J. y H. Xiao. (2012). Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. *Food Funct.* 3: 202-220.

Mehta K, Pantazis P, McQueeb T, Aggarwal B. (1997). Antiproliferative effects of curcumin (diferuloilmethane) against human breast tumor cell lines. *Anti-cancer Drugs*, **8**: 470-481.

Mesa, M., Ramírez-Tortosa, M., Aguilera, C., Ramírez-Boscá & Gil, A (2000). Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides. *Ars Pharmaceutica*, 3(41), 307–321.

Morris MC, Evans DA, Bienias JL. (2003) .Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol.*;60:940-4

Munzenmaier A, Lange C, Glocker E, Covacci A, Moran A, Berswill S, Baeuerle PA, Kist M, Palh HL. (1997). A secreted/ shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol*, **159**(12): 6140- 6147.

Myers, D. (1999). Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications. John Wiley and Sons, Inc. Second edition edition.

Narsimhan, Ganesan. (1992). Capitulo 6. Emulsions. En Physical chemistry of foods editado por Henry G. Schwartzberg y Richard W. Hartel. Marcel Dekker, Inc. New York . 735 págs.

Nicolaos, G., Crauste-Manciet, S., Farinotti, R., Brossard, D. (2003). Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil in water submicron emulsion. *International journal of pharmaceutics*. **263**, 165–171.

Nishigaki I, Kuttan R, Oku H, Ashoori F, Abe H, Yagi K. (1992). Suppressive effect of curcumin on lipid peroxidation induced in rats by carbon tetrachloride or Co-60 irradiation. *Clin Biochem Nutr*, **13**: 23-29.

Nosaka, N., Maki, H., Suzuki, Y., Haruna, H., Ohara, A., Kasai, M. (2003). Effects of margarine containing medium chain triacylglycerols on body fat reduction in humans. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. **10**, 290–298.

Ochoa Flores A.A. 2013. Desarrollo de nanoemulsiones con fosfolípidos Estructurados como sistemas acarreadores de Curcumina. Tesis de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Oetari S, Sudidyo M, Commandeur JNM Samhoedi MR, Vermeulen NPE. (1996). Effects of curcumin on cytochrome P-450 and glutathione S-transferase activities in

rat liver. *Biochem Pharmacol*, 51: 39-45.

Ohr, L.M. (2005). Functional fatty acids. *Food Technology*, **59**(4), 63–65.

Osborn, H.T., Akoh, C.C. (2002). Structured lipids novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **3**, 94–103.

Pan, M.H., Huang, T.M., Lin, J.K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metabolism and Disposition*. **27**, 486 – 494.

Parshad R; Sanford KK; Price FM, Steele VE; Tarone RE; Kelloff GJ; Boone CW. (1998). Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res*, **18**: 3263-3266.

Patel A. R. and K. P. Velikov, *LWT–Food Sci. Technol.*, (2011), 44, 1958–1964. Citado en: McClements, D. J. y H. Xiao 2012. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. *Food Funct.* **3**, 202-220

Pfeuffer, M. & Schrezenmeir, J. (2002). Milk lipids in diet and health – medium chain fatty acids (MCFA). *Bulletin International Dairy Federation*, **377**, 32.

Pinjari, D.V. A.B. Pandit, Room temperature synthesis of crystalline CeO<sub>2</sub> nanopowder: advantage of sonochemical method over conventional method, *Ultrason. Sonochem.* **18** (2011) 1118–1123.

Pinto, R. C., Ronald, J. N., Ribeiro, A. J. y Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol.* **2**:8– 21.

Piyachaturawat P, Charoenpiboonsin J, Toskukao C, Suksamrarn A. (1999). Reduction of plasma cholesterol by Curcuma comosa extract in hypercholesterolemic hamsters. *J Ethnopharmacol*, **66**(2): 199-204.

Piyachaturawat P, Teeratagolpibal N, Tolskulkao C, Suksamram A. (1997). Hypolipidemic effect of Curcuma comosa in mice. *Artery*, **22**(5): 233-241.

Porter, J. H. C., Trevaskis, N. L., y Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**:231-248

Priyadarsini, K. I. (1997) Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radical Biol Med* **23**, 838–843.

Ramanathan, Muruganathan, Lok Kumar Shrestha, Taizo Mori, Qingmin Ji, Jonathan P. Hill and Katsuhiko Ariga. (2013). Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications. *Phys. Chem. Chem Phys.* 15, 10580-10611

Rasyid A, Lelo A. (1999). The effect of curcumin and placebo on human gall-bladder function: an ultrasound study. *Aliment Pharmacol Ther*, 13: 245-249.

Ravindranath V, Chandrasekhara N. (1982). Metabolism of curcumin-studies with (3H)-curcumin. *Toxicology*, 22: 337-344.

Rao, C. V. A. Riven, B. Simi, and B. S. Reddy, (1995). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary Curcumin: A naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res* **55**, 259–266.

Reddy and A.C., B.R.Lokesh, (1994) Studies on antiinflammatory activity of spice principles and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on carrageenan-induced inflammation in rats. *Ann Nutr Metab* **38**, 349–358

Rein, Maarit J. Mathieu Renouf, Cristina Cruz-Hernandez, Lucas Actis-Goretta, Sagar K. Thakkar & Marcia da Silva.(2013) Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol.***75**:3. 588–602

Ritzenthaler Kristin L, McGuire Michelle K., Falen Roger, Shultz Terry D, Dasgupta Nairanjana y McGuire Mark A. (2001) Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *The Journal of nutrition.* 131(5) 1548-1554.

Rojas- Iglesias, M.M. 2010. Efecto del ácido linoléico conjugado (CLA) dietario sobre la producción de oxisteroles arteriales en ratas orquidectomizadas. Tesis de Maestría en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz.

Saiz de Cos, Paula. (2014). Cúrcuma I (Curcuma longa L.) *Reduca (Biología)*. Serie Botánica. 7 (2): 84-99

Sakai K, Miyazaki Y, Yamane T, Saitoh Y, Iwaka C, Nishhata T. (1989). Effect of extracts of Zingiberaceae herbs on gastric secretion in rabbits. *Chem Pharm Bull*, **37**: 215-217.

Sanguansri, L. y Augustin, M.A. (2001). Encapsulation of food ingredients. WO 01/74175A1.

Scalfi, L., Coltorti, A., Contald, F. (1991). Postprandial termogénesis in lean and obese subjects after meals supplemented with medium-chain and long-chain. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **53**, 1130–1133.

Shahidi, F. (2006). *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY. 563 p.

Shaikh, J. D.D., Ankola, V., Beniwal, D., Singh, M., Ravi, K. (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **37**, 223–230

Shanmugam, M., Rane, G., Kanchi, M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M., Sethi, G. (2015). The Multifaceted Role of Curcumin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules* (20).

Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, Singh AK, Seth P, Banaudha KK, Patnaik GK, Maheshwari RK. (1999). Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. *Wound Repair Regen*, 7(5): 362-374.

Silva, H.D., Cerqueira, M.A., Vicente, A. (2012). Nanoemulsions for food applications: Development and characterization. *Food Bioprocess Technol*. **5**, 854–867.

Smith, Jim y Edward Charter. (2010). *Functional Food Product Development*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd. United Kingdom. 505 pags.

Soudamini KK, Kuttan R. (1991). Chemoprotective effects of curcumin against cyc1ophosphamide toxicity. *Indian J Pharmacol*, 54: 213-217.

South EH, Exon JH, Hendrix K. (1997). Dietary curcumin enhances antibody responses in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 19: 105-119.

Sozer, N., Kokini, J.L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*. **27**, 82–89.

Sreejayan, N. and M. N. Rao, (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* **46**, 169–171

Sreejayan and M. N. Rao, (1997) Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* **49**, 105–107.

Srimal RC, Dhawan BN. (1985). In «Development of unani drugs from herbal sources and the role of elements in their mechanism of action», RB Arora (De.), Hamdard National Foundation Monograph., Hamdard National Foundation New Delhi, pp 131-142.

Srimal RC, Dhawan BN. (1973). Pharmacology of curcumin. A non-steroidal and anti-inflammatory agents. *J Pharmacol*, 25: 447.

Srivastava, R. (1989) Inhibition of neutrophil response by curcumin. *Agents Actions* **28**, 298–303.

St-Onge, M.P. & Bosarge, A. (2008). Weight-loss diet that includes consumption of medium-chain triacyl- glycerol oil leads to a greater rate of weight and fat mass loss than does olive oil. *American Journal of Clinical Nutrition*, **87**, 621–626.

St Onge, M.P., Jones, P.J.H. (2002). Physiological effects of medium-chain triglycerides: Potential agents in the prevention of obesity. *American Society for Nutritional Sciences*. **132**, 329–332.

St Onge, M.P., Ross, R., Parsons, W.D., Jones, P.J.H. (2003). Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obesity Research*. **11**, 395–402.

Suresh, D., Gurudutt, K.N., Srinivasan, K. (2009). Degradation of bioactive spice compound: curcumin during domestic cooking. *European Food Research Technology*. **228**, 807–812.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. **108-109**, 303–318.

Tadros, T., Kessell, L. (2004). Stabilizing nanodispersions in personal care and cosmetic applications. *Cosmetics and Toiletries*. **119**, 41–45.

Tadros Th. y Vicent B. 1983. pp 129-286. En: Enciclopedia of Emulsion Technology: Basic. Theory. (Ed. Becher, P.). Marcel Dekker Inc. New York.

Tan, C.P., Nakajima, M. (2005).  $\beta$ -carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*. **92**, 661–671.

Taylor, R. y Leonard M. 2011. Curcumin for Inflammatory Bowel Disease: A Review of Human Studies. *Alternative Medicine Review*, 16(2): 152-156

Theaj-Prakash, U.R., Thiagarajan, P. (2011). Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Research in Biotechnology*. **2**, 01–13.

Thresiamma, K. C. J. George, and R. Kuttan, (1998). Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity, *J Exp Clin Cancer Res* **17**, 431–434

Tonnesen H. H. and J. Karlsen, (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch* **180**, 402–404

Tönnesen, H., Masson, M., Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*. **244**, 127–135.

Tönnesen HH, de Vries H, Karlsen J, van Henegouwen GB. (1987). Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharmaceu Sci*, **76**: 371-373.

Tsuji, H., Kasai, M., Takeuchi, H., Nakamura, M., Okazaki, M., Kondo, K. (2001). Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *Journal of Nutrition*. **131**:2853–2859.

Tsuzuki, Tsuyoshi Yuki Kawakami, Renpei Abe, Kiyotaka Nakagawa, Kazunori Koba, Jun Imamura, Toshio Iwata, Ikuo Ikeda, and Teruo Miyazawa. (2006). Conjugated Linolenic Acid Is Slowly Absorbed in Rat Intestine, but Quickly Converted to Conjugated Linoleic Acid he *Journal of Nutrition Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms J. Nutr.* vol. 136 (8) 2153-2159

Unnikrishnan M. K. and M. N. Rao, (1995) Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Mol Cell Biochem* **146**, 35–37

Venkatesan N. (2000). Pulmonary protective effects of curcumin against paraquat toxicity. *Life Sci*, 66(2): 21-28. Verma SP, Goldin BR, Lin PS. (1998). The inhibition of

the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspect*, 106: 807-812.

Venkatesan N, Punithavathi V, Chandrakasan G. (1997). Curcumin protects bleomycin-induced lung injury in rats [published erratum appears in *Life Sci* 1998; 62(19):P1,295]. *Life Sci*, 61(6): 51-58.

Venkatesan N, Chandrakasan G. (1995). Modulation of cyclophosphamide-induced early lung injury by curcumin, an anti-inflammatory antioxidant. *Mol Cell Biochem*, 142(1): 79-87

Verma SP, Goldin BR, Lin PS. (1998). The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspect*, 106: 807-812.

Vijayalaxmi B. (1980). Genetic effect of turmeric and curcumin in mice and rats. *Mutation Res*, **79**: 125-132.

Vikbjerg, A.F., Mu, H., Xu, X. (2005). Lipase-catalyzed acyl exchange of soybean phosphatidylcholine in n-hexane: A critical evaluation of both acyl incorporation and product recovery. *Biotechnology Progress*. **21**, 397–404.

Vikbjerg, A.F., Jonsson, G., Mu, H., Xu, X. (2006). Application of ultrafiltration membranes for purification of structured phospholipids produced by lipase-catalyzed acidolysis. *Separation and Purification Technology*. **50**, 184–191.

Vikbjerg, A.F., Mu, H., Xu, X. (2007). Synthesis of structured phospholipids by immobilized phospholipase A2 catalyzed acidolysis. *Journal of Biotechnology*. **128**, 545–554.

Villareal, C. A. M. 2004. "Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la piel". Tesis de maestría. Universidad de los andes, facultad de ciencias, laboratorio de espectroscopia molecular. Mérida, Venezuela.

Wang X., Jiang Y., Wang Y., Huang M., Ho C. y Huang Q. (1997) Enhancing anti-inflammatory activity of curcumin through o/w nanoemulsions. *Food Chem*. 108:419-424.

Watanabe Yomi, Yuji Shimada, Yoshie Yamauchi-Sato, Masaaki Kasai, Takaya Yamamoto, Kentaro Tsutsumi, Yoshio Tominaga, and Akio Sugihara (2002). Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* Lipase. *JAOCS* 79, 891–896

(September

Wehrli HP, Pomeranz Y. (1969). Synthesis of galactosyl glycerides and related lipids. *Chem Phys Lipids* 3:357–70.

Weiss, J., Takhistov, P., McClements, J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*. **71**, 107–116.

Willis, W.M., Lencki, R.W., Marangoni, A.G. (1998). Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **38**, 639–674.

Yang, K., Lin, L., Tseng, T., Wang, S., Tsai, T. (2007). Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **853**, 183–189.

Zarevúcka, M. and Zdeněk W. (2008). Plant Products for Pharmacology: Application of Enzymes in Their Transformations. *International Journal of Molecular Science* 9, 2447-2473.

Zhang F, Altorki NK, Mestre JR, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. (1999). Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*, **20**: 445-451.

Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. (1989). Scavenging effects of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys*, **14**: 175-185.