



**Secretaría de Educación Pública**

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**

**Instituto Tecnológico de Veracruz**

**Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de  $\alpha$ -Tocoferol elaboradas con fosfolípidos y fosfolípidos modificados y evaluadas en un sistema de digestión *in vitro***

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.BQ. Victor Manuel Loyo Cruz

Asesores:

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dra. María de Jesús Perea Flores

H. Veracruz Ver.

Diciembre 2017

## DEDICATORIA

Madre, **Rosa Cruz**, muchas gracias por tu apoyo y tu respaldo en los momentos más difíciles en que he estado, gracias por levantarme cuando me he caído y darme la fuerza para seguir adelante cuando me sentía derrotado, pero sobre todo gracias por ser esa madre que siempre me lleva hacia delante y me impulsa a soñar en grande, te quiero mamá.

Papa, **Venancio Loyo**, hoy en día entiendo y comprendo más el gran esfuerzo que hiciste por mí, que esas manos ásperas y desgastadas fueron por darme una vida mejor, siempre estaré orgulloso de saber que puede heredar esa tenacidad y lucha por seguir adelante, gracias por ayudarme a estar hoy aquí, te quiero papá.

**Alaina**, sin querer te convertiste en esa madre que cualquier persona fuera de su hogar quisiera encontrar, gracias por tu apoyo, consejos y ayuda, cuídate sabes que te aprecio mucho.

**Reyna, Sofí y Luis**, muchas gracias por su amistad, paciencia, cariño, han hecho este camino más fácil y placentero, se los agradezco con todo el corazón, espero que esta amistad perdure por muchos años.

**Laura**, sin querer llegaste en el momento menos pensado, pero sin lugar a dudas en el más indicado, has sido esa parte que me faltaba para darle impulso, orden y estabilidad a mi vida; como lo hace un surfactante a una nanoemulsión. Te amo y espero que el futuro sea el mejor para ambos.

**Ingrid**, te agradezco mucho toda la ayuda que me diste en este proyecto, sin duda tu apoyo fue fundamental para terminarlo, ya que demostraste haberte sentido parte de él, y me los demostraste cada día que fuiste a trabajar, por eso siempre te estaré agradecido.

## AGRADECIMIENTOS

**Dra. Cynthia Cano**, sin duda fue un camino difícil, pero lo logramos, me ha dejado un gran aprendizaje, además de agradecerle de corazón haberme dejado ser parte de este proyecto el cual disfrute. Espero que este sea un inicio de mejores cosas para ambos, muchas gracias Dra.

**Dr Hugo Sergio**, gracias por darme la oportunidad de pertenecer y hacerme sentirme parte de esta gran familia que tiene en el laboratorio. No hay palabras para agradecerle el apoyo y aprendizaje que usted me ha brindado.

**Dra. Mari Perea**, le agradezco mucho toda la atención que me brindo, gracias por su apoyo para el término de este proyecto.

**Karla y Jorge**, me alegra haberlos conocido, muchas gracias por haberme brindado su amistad, siempre estaré agradecido con ustedes por esos momentos de ayuda que en algún momento me brindaron.

**Abi**, te agradezco mucho por el apoyo que me diste en varias partes del proyecto.

Una gran agradecimiento a todos los doctores que me apoyaron de alguna manera para culminar con este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos que conocí en la UNIDA solo tengo una palabra ¡gracias!

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por haber proporcionado el financiamiento para la realización de mis estudios de Maestría.

## RESUMEN

**Loyo Cruz, Victor Manuel. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre del 2017. Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de  $\alpha$ -Tocoferol elaboradas con fosfolípidos y fosfolípidos modificados y evaluadas en un sistema de digestión *in vitro*. Asesores Dra. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. María de Jesús Perea Flores.**

El  $\alpha$ -Tocoferol (AT) es un compuesto liposoluble con actividad antioxidante, es propenso a oxidarse en presencia de oxígeno y luz. Además, tiene baja bioaccesibilidad, por lo que se requiere de un sistema de encapsulamiento para su protección y mejorar su absorción en el intestino delgado. Para esto se propone el uso de nanoemulsiones (NE) aceite-agua (O/W), estabilizadas con fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilcolina (LPC) obtenida por hidrólisis enzimática.

En el presente trabajo se evaluaron las características fisicoquímicas de las NE O/W de AT elaboradas con PC y LPC, así como su comportamiento en un digestor *in vitro*. Para la formulación de las NE se utilizaron triacilglicéridos de cadena media (MCT) como fase dispersa a dos concentraciones (0 y 0.4 g) y el AT a 0.1 y 0.5 g; en la fase continua se utilizaron 0.5 y 1 g de PC, además de 2.5 y 5 g de glicerol, repitiendo las mismas condiciones para LPC.

Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos con LPC presentaron tamaños de partícula superiores a 500 nm y sedimentación inversa después de una hora de ser elaboradas, descartando las emulsiones con este surfactante. Con respecto a las NE de PC, los mejores tratamientos obtenidos debido a sus características físicas evaluadas (tamaño y estabilidad de almacenamiento a 4 °C y 25 °C) fueron los tratamientos T4, T11 y T12, los cuales presentaron tamaños promedio de partícula <150 nm. A estos se les agregó una concentración inicial de

AT de 0.1 g a diferencia de los demás tratamientos que contenían 0.5 g de AT. El tratamiento T4 contenía 0.4 g de MCT, obteniendo un tamaño de partícula promedio de 142.5 nm; el tamaño de partícula fuera mayor que el de los tratamientos T11 (71.84 nm) y T12 (74.71 nm) que no contenían MCT. Con respecto la concentración de AT encapsulado, los tratamientos T4 y T12 presentaron mayor concentración de AT encapsulado 7.4 mg/mL NE y 5.2 mg/mL NE respectivamente, a diferencia del tratamiento T11 1.5 mg/mL NE, esto posiblemente, debido a que los tratamientos T4 y T12 tenían una mayor concentración de PC (1 g), mejorando su protección con respecto al tratamiento T11 (0.5 g de PC). La temperatura de almacenamiento (4 °C y 25 °C) y el periodo evaluado (8 semanas) no tuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la concentración de AT encapsulado para ninguno de los tratamientos. A estos tratamientos también se les determinó el porcentaje de encapsulamiento, obteniendo un 99% para los tratamientos T11 y T12, mientras que no fue posible determinarlo para el tratamiento T4.

Finalmente, en el sistema de digestión *in vitro* se observó que el tratamiento T4 fue el que tuvo mayor porcentaje de digestión lipídica, 90.6%, posiblemente por la presencia de MCT, contrario al tratamiento T12, que tuvo el 41.8%. Sin embargo, fue el que obtuvo mayor bioaccesibilidad de 75%, mientras que para tratamiento T4 fue del 17.5 %. Esto se debió posiblemente a que el tratamiento T12 tenía una mayor concentración de PC (1g) y ausencia de MCT.

## ABSTRACT

**Loyo Cruz, Victor Manuel. M. Sc. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Diciembre del 2017. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -Tocopherol nanoemulsions made with modified phospholipids and lysophospholipids, evaluated in an *in vitro* digestion system. Advisors: Dr. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. María de Jesús Perea Flores.**

$\alpha$ -Tocopherol (AT) is an oil soluble compound which has antioxidant activity, is prone to oxidation in the presence of oxygen and light, and has a low bioaccessibility, therefore an encapsulation system is required for its protection and improvement. Absorption in the small intestine. For this, the use of nanoemulsions (NE) stabilized with phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine (LPC) obtained by enzymatic hydrolysis is proposed.

In this work, the physicochemical characteristics of the NE O/W of AT elaborated with PC and LPC, as well as their behavior in an *in vitro* digester were evaluated. As the dispersed phase, medium chain triacylglycerides (MCT) were used at two concentrations (0 g and 0.4 g) and the AT at 0.1 and 0.5 g; in the continuous phase 0.5 g and 1 g of PC plus 2.5 g and 5 g of glycerol were used, repeating the same conditions for LPC.

Results showed that treatments with LPC presented particle sizes higher than 500 nm and creaming after an hour of being elaborated, discarding the emulsions with this surfactant. In relation to PC NE, the best treatments obtained due to their physical characteristics evaluated (size and storage stability at 4 ° C and 25 ° C) were the treatments T4, T11 and T12, which presented average sizes of particle <150 nm. To these was added an initial concentration of AT of 0.1 g, unlike the other treatments that contained 0.5 g of AT. The T4 treatment contained 0.4 g of MCT, obtaining a mean particle size of 142.5 nm; the particle size was greater than that of

the T11 (71.84 nm) and T12 (74.71 nm) treatments that did not contain MCT. With respect to the concentration of encapsulated AT, the treatments T4 and T12 showed a higher concentration of encapsulated AT 7.4 mg/mL-NE and 5.2 mg/mL-NE respectively, unlike the T11 1.5 mg/mL-NE treatment, possibly due to the fact that treatments T4 and T12 had a higher concentration of PC (1 g), improving their protection with respect to the T11 treatment (0.5 g of PC). The storage temperature (4 ° C and 25 ° C) and the evaluated period (8 weeks) did not have a significant effect ( $p \leq 0.05$ ) on the concentration of encapsulated AT for any of the treatments. The percentage of encapsulation was also determined for these treatments, obtaining 99% for the T11 and T12 treatments, while it was not possible to determine it for the T4 treatment.

Finally, in the *in vitro* digestion system it was observed that T4 treatment was the one that had the highest percentage of lipid digestion, 90.6%, due to the presence of MCT, contrary to T12 treatment, which had 41.8%. However, it was the one that obtained the highest bioaccessibility of 75%, whereas for T4 treatment it was 17.5%. This was possibly because the T12 treatment had a higher concentration of PC (1g) and absence of MCT.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	V
LISTA DE TABLAS .....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1 REVISIÓN DE LA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
1.1 COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	3
1.1.1 Vitamina E (Tocoferol).....	3
1.1.1.1 Biodisponibilidad y farmacocinética de vitamina E.....	5
1.1.1.2 Actividad biológica de $\alpha$ -Tocoferol.....	7
1.2 NANOENCAPSULACIÓN .....	8
1.2.1 Técnicas de nanoencapsulación .....	8
1.3 NANOEMULSIONES .....	10
1.3.1 Emulsificación .....	10
1.3.1.1 Surfactantes .....	12
1.3.1.1.A Fosfolípidos y fosfolípidos modificados .....	15
1.3.1.2 Estabilizantes .....	18
1.3.2 Formación de la nanoemulsión.....	19
1.3.2.1 Métodos de alta energía.....	19
1.3.2.1.A Homogeneizador de válvula de alta presión .....	20
1.3.2.1.B Microfluidizador .....	21
1.3.2.1.C Homogenizador ultrasónico.....	22
1.3.2.2 Métodos de baja energía .....	22
1.3.3 Caracterización de las nanoemulsiones .....	23
1.3.3.1 Estabilidad.....	23
1.3.3.2 Tamaño de partícula.....	26

1.3.3.3 Carga eléctrica de la partícula .....	27
1.3.3.3.A Potencial $\zeta$ .....	27
1.3.3.4 Estructura .....	28
1.3.3.4.A Microscopía confocal.....	28
1.3.4 Propiedades interfaciales .....	30
1.3.5 Liberación controlada .....	31
1.4 SÍNTESIS DE ANTECEDENTES.....	33
<b>2 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>3 HIPÓTESIS.....</b>	<b>36</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>5 METODOLOGÍA.....</b>	<b>38</b>
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1.1 Reactivos .....	39
5.1.2 Obtención de Lisofosfatidilcolina .....	39
5.1.2.1 Síntesis de Lisofosfatilcolina por vía enzimática .....	39
5.1.2.2 Determinación del rendimiento de Lisofosfatidilcolina por HPLC .....	40
5.1.2.3 Recuperación de Lisofosfatidilcolina.....	40
5.1.3 Determinación de ácidos grasos de los surfactantes y MCT .....	40
5.1.4 Formación de nanoemulsiones de $\alpha$ -Tocoferol.....	41
5.1.4.1 Preparación de las emulsiones gruesas .....	41
5.1.4.2 Homogenización por ultrasonificación .....	42
5.1.4.3 Diseño experimental.....	42
5.1.5 Caracterización de nanoemulsiones de $\alpha$ -Tocoferol.....	43
5.1.5.1 Análisis del tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .....	43
5.1.5.2 Evaluación de la estabilidad de almacenamiento .....	44
5.1.5.3 Cuantificación de $\alpha$ -Tocoferol .....	45
5.1.5.3.A Porcentaje de encapsulamiento .....	45
5.1.5.3.B Determinación de concentración .....	46
5.1.5.4 Sistema de liberación <i>in vitro</i> .....	46
5.1.5.4.A Simulación del sistema de digestión <i>in vitro</i> .....	46

5.1.5.4.B Descripción de las etapas del sistema de digestión <i>in vitro</i> .....	47
5.1.5.4.C Microscopía confocal de barrido láser (MCBL) .....	48
5.1.5.4.D Determinación de la bioaccesibilidad de $\alpha$ -Tocoferol.....	49
5.1.6 Análisis estadístico.....	49
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
6.1 SÍNTESIS DE LISOFOSFATILCOLINA POR VÍA ENZIMÁTICA .....	51
6.1.1 Determinación del rendimiento de Lisofosfatidilcolina por HPLC .....	51
6.1.2 Determinación de ácidos grasos de los surfactantes y MCT .....	54
6.2 FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOEMULSIONES DE $\alpha$ -TOCOFEROL.....	55
6.2.1 Formación de nanoemulsiones de Lisofosfatidilcolina .....	55
6.2.2 Formación de nanoemulsiones con Fosfatidilcolina.....	58
6.2.3 Efecto de los componentes .....	61
6.2.4 Determinación de la estabilidad en el tamaño de partícula durante el almacenamiento por medio de dispersión de luz dinámica .....	63
6.2.5 Evaluación de la estabilidad de almacenamiento de las nanoemulsiones por medio de dispersión múltiple de luz estática .....	66
6.2.6 Evaluación de los tratamientos óptimos .....	71
6.2.6.1 Efecto de la concentración de MCT .....	71
6.2.6.2 Efecto de la temperatura de almacenamiento.....	73
6.2.6.3 Potencial $\zeta$ .....	74
6.2.6.4 Cuantificación de $\alpha$ -Tocoferol de los tratamientos .....	75
6.2.6.4.A Porcentaje de encapsulamiento de $\alpha$ -Tocoferol.....	75
6.2.6.4.B Determinación de concentración de $\alpha$ -Tocoferol encapsulado .....	76
6.2.6.5 Sistema de digestión <i>in vitro</i> .....	78
6.2.6.5.A Influencia en el tamaño de partícula de los tratamientos .....	78
6.2.6.5.B Influencia en el potencial $\zeta$ de los tratamientos.....	81
6.2.6.5.C Digestión lipídica de los tratamientos .....	83
6.2.6.5.D Determinación de la bioaccesibilidad de $\alpha$ -Tocoferol de los tratamientos .....	85
<b>7 CONCLUSIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>8 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>88</b>
<b>9 APENDICES.....</b>	<b>94</b>

9.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFOLIPASA A <sub>1</sub> .....	94
9.2 GRÁFICOS DE TURBISCAN .....	95

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1</b> Isómeros de Tocoferol .....	4
<b>TABLA 2</b> Consumo de Vitamina E recomendada.....	7
<b>TABLA 3</b> Clasificación y comparación de las emulsiones.....	11
<b>TABLA 4</b> Tipos de agentes surfactantes .....	13
<b>TABLA 5</b> Surfactantes comúnmente usados en la industria alimentaria.....	14
<b>TABLA 6</b> Comparación de los diferentes tipos de homogeneizadores .....	20
<b>TABLA 7</b> Variables para la obtención de nanoemulsiones de $\alpha$ -Tocoferol .....	42
<b>TABLA 8</b> Diseño factorial para la preparación de nanoemulsiones para cada uno de los surfactantes (Fosfatidilcolina y Lisofosfatidilcolina) .....	43
<b>TABLA 9</b> Condiciones del sistema de digestión <i>in vitro</i> .....	47
<b>TABLA 10</b> Composición de ácido grasos en % molar de Fosfatidilcolina Avanti (PC Ava), Lisofosfatidilcolina (LPC), Fosfatidilcolina (PC) y triacilglicéridos de cadena media (MCT) .....	55
<b>TABLA 11</b> Tamaños de partícula promedio de las nanoemulsiones.....	59
<b>TABLA 12</b> Porcentaje de encapsulamiento después de ser filtrado por centrifugación a 5000 rpm .....	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> Estructura química del Tocoferol .....	4
<b>FIGURA 2</b> Estructura química del $\alpha$ -Tocoferol .....	5
<b>FIGURA 3</b> Metabolismo de la Vitamina E en el cuerpo humano .....	6
<b>FIGURA 4</b> Técnicas de encapsulación .....	9
<b>FIGURA 5</b> Micrografía y diagrama de una emulsión .....	10
<b>FIGURA 6</b> Tipos de emulsiones aceite-agua (O/W), agua-aceite (W/O) y emulsiones agua-aceite-agua (W/O/W) y aceite-agua-aceite (O/W/O) .....	11
<b>FIGURA 7</b> Cabezas de los diferentes glicerofosfolípidos .....	16
<b>FIGURA 8</b> Sitios de acción de las diferentes fosfolipasas: A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , C y D. R <sup>1</sup> y R <sup>2</sup> son ácidos grasos y X es el sustituyente (colina, serina, etanolamina, inositol) ....	18
<b>FIGURA 9</b> Formación de una nanoemulsión por homogenizador de válvula de alta presión.....	20
<b>FIGURA 10</b> Modo de acción del microfluidizador.....	21
<b>FIGURA 11</b> Representación de la formación de nanoemulsiones a partir de un ultrasonicador .....	22
<b>FIGURA 12</b> Fenómenos de inestabilidad que se presentan en las nanoemulsiones .....	24
<b>FIGURA 13</b> Esquema de funcionamiento del Turbiscan .....	26
<b>FIGURA 14</b> Representación gráfica de modelos: monomodal (a) y bimodal (b) en la determinación del tamaño de partícula .....	27
<b>FIGURA 15</b> Representación del funcionamiento del microscopio confocal .....	29
<b>FIGURA 16</b> Diagrama de las etapas, factores físicos y bioquímicos para evaluar el comportamiento de las nanoemulsiones en un sistema de digestión <i>in vitro</i> .....	32
<b>FIGURA 17</b> Diagrama de flujo experimental .....	38
<b>FIGURA 18</b> Incidencia de luz en la muestra y representación esquemática de las partes del Turbiscan .....	45

<b>FIGURA 19</b> Cinética de hidrólisis enzimática de Fosfatidilcolina Avanti (PC Ava). Conversión de PC Ava a Lisofosfatidilcolina (LPC) a 50 °C durante 90 minutos.....	51
<b>FIGURA 20</b> Cromatogramas de conversión de Fosfatidilcolina Avanti (PC Ava) a Lisofosfatidilcolina (LPC) y fase móvil de Cloroformo (CHCl <sub>3</sub> ); a) Tiempo 0; 99.83% de PC y 0.17% de LPC y b) Tiempo 20 minutos; 2.64% y 97.36% de LPC.....	53
<b>FIGURA 21</b> Cromatograma de Fosfatidiletanolamina (PE) y Fosfatidilcolina (PC) y fase móvil de Cloroformo (CHCl <sub>3</sub> ).....	54
<b>FIGURA 22</b> a) Distribución de tamaños promedio de partícula, obtenidos para cada uno de los 16 tratamientos sometidos por sonicación; b) Distribución de tamaño (PercentilD90) de cada uno de los 16 tratamientos.....	57
<b>FIGURA 23</b> Tratamientos de emulsiones elaboradas con Lisofosfatidilcolina (LPC) con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	58
<b>FIGURA 24</b> Tamaños de partícula promedio obtenidos para cada uno de los 16 tratamientos; b) Distribución de tamaño (PercentilD90) de cada uno de los 16 tratamientos.....	60
<b>FIGURA 25</b> Interacción múltiple de las variables ( $\alpha$ -Tocoferol, Glicerol, Fosfatidilcolina (PC) y triacilglicéridos de cadena media (MCT)) con respecto al tamaño de partícula promedio.....	62
<b>FIGURA 26</b> Tratamientos de nanoemulsiones elaboradas con Fosfatidilcolina con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	63
<b>FIGURA 27</b> Distribución de tamaños de partícula (Percentil D90) de las nanoemulsiones en almacenamiento por 8 semanas. a) Tratamientos con MCT y 0.1 g de AT, b) Tratamientos sin MCT y 0.5 g de AT, c) Tratamientos sin MCT y 0.1 g de AT, d) Tratamientos con MCT y 0.5 g de AT.....	65
<b>FIGURA 28</b> Nanoemulsiones después de 8 semanas de almacenamiento (4°C) elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	66
<b>FIGURA 29</b> Gráficos de estabilidad por 60 días (2 meses) de las nanoemulsiones (T15, T16, T9 y T10) a 4 °C elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	67

<b>FIGURA 30</b> Gráficos de estabilidad por 60 días (2 meses) de las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) a 4 °C elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	69
<b>FIGURA 31</b> Nanoemulsiones almacenadas durante 8 semanas a 25 °C con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	70
<b>FIGURA 32</b> Gráficos de estabilidad por 60 días (2 meses) de las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) a 25 °C elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8.....	71
<b>FIGURA 33</b> a) Tamaños de partícula promedio de los tratamientos T4, T11 y T12; b) Distribución de tamaño (PercentilD90) de los tratamientos T4, T11 y T12, durante un período de 8 semanas .....	72
<b>FIGURA 34</b> Tamaño de partícula de los tratamientos T4, T11 Y T12 a dos temperaturas diferentes (4 °C Y 25 °C) por un periodo de 8 semanas.....	74
<b>FIGURA 35</b> Efecto de la temperatura (4°C y 25 °C) sobre el potencial $\zeta$ en los tratamientos T4, T11 y T12, en un período de 8 semanas .....	75
<b>FIGURA 36</b> Fotografías del permeado de las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) sometidas a filtración por centrifugación .....	76
<b>FIGURA 37</b> Concentración de $\alpha$ -Tocoferol (AT) encapsulado y evaluado a dos temperaturas de almacenamiento (4° y 25° C) durante 60 días.....	77
<b>FIGURA 38</b> Influencia de las etapas de digestión <i>in vitro</i> (boca, estómago e intestino delgado) en el tamaño de partícula promedio de las nanoemulsiones T4, T11 y T12 .....	79
<b>FIGURA 39</b> Imágenes de microscopía confocal de las nanoemulsiones teñidas con rojo nilo (lípidos) en las diferentes etapas del sistema de digestión <i>in vitro</i> (boca, estómago e intestino) .....	80
<b>FIGURA 40</b> Influencia de las condiciones del sistema de digestión <i>in vitro</i> en el potencial $\zeta$ de los tratamientos T4, T11 y T12.....	83
<b>FIGURA 41</b> Porcentaje de liberación de los ácidos grasos libres (AGL) debido a la hidrólisis enzimática de los tratamientos T4, T11 y T12 durante 120 min.....	84
<b>FIGURA 42</b> a) Tamaño de partícula promedio de las micelas formadas después de la digestión <i>in vitro</i> de los tratamientos T4, T11 y T12; b) Apariencia de las micelas después de la digestión <i>in vitro</i> de los tratamientos T4, T11 y T12 .....	86

<b>FIGURA 43</b> Bioaccesibilidad de los diferentes tratamientos (T4, T11 y T12) después de la digestión <i>in vitro</i> .....	86
<b>FIGURA 44</b> Curva de calibración de Proteína.....	94
<b>FIGURA 45</b> Gráficos de estabilidad de almacenamiento a 4 °C durante 60 días de los diferentes tratamientos: T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16 .....	100
<b>FIGURA 46</b> Nanoemulsiones elaboradas y evaluadas para su almacenamiento a 4 °C: a) obtenidas después de ultrasonicarlas (tiempo 0); b) nanoemulsiones después de 60 días de almacenamiento a una temperatura de 4 °C .....	101
<b>FIGURA 47</b> Gráficos de estabilidad de almacenamiento a 25 °C durante 60 días de los diferentes tratamientos: T4, T11, T12.....	103
<b>FIGURA 48</b> Nanoemulsiones elaboradas y evaluadas para su almacenamiento a 25 °C: a) obtenidas después de ultrasonicarlas (tiempo 0); b) nanoemulsiones después de 60 días de almacenamiento a una temperatura de 25°C .....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGL: Ácidos grasos libres	O/W/O: Aceite-Agua en aceite
AT: $\alpha$ -Tocoferol	PA: Ácido fosfatídico
CEHC: Carboxil etil hidróxido cromas	PC: Fostatidilcolina
CG: Cromatografía de gases	PE: Fosfatidiletanolamina:
CYP: Citocromo P450	PG: Fosfatidilglicerol
HDL: Lipoproteínaspro de alta densidad	PI: Fosfatidilinositol
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia	PS: Fosfatidilserina
LPC: Lisofosfatidilcolina	SDI: Sistema de digestión <i>in vitro</i>
LPL: Lipoproteínas	SGF: Fluido gástrico
MCT: Triacilglicéridos de cadena media	SSF: Fluido de la saliva
NE: Nanoemulsión	T: Tratamiento
NCI: Instituto Nacional de Cáncer	VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad
O/W: Aceite en agua	W/O: Agua en aceite
	W/O/W: Agua-Aceite en agua

## INTRODUCCIÓN

El  $\alpha$ -Tocoferol (AT) es un isómero de la vitamina E cuya estructura química está conformada por dos anillos aromáticos y una cadena de 16 carbonos. Su estructura le confiere propiedades antioxidantes y características particulares: liposoluble, sensibilidad a la luz y al oxígeno; provocando su oxidación. Es considerado como un compuesto bioactivo por sus propiedades benéficas para la salud, debido a que se han encontrado estudios donde asocian el AT en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, antiinflamatorias, coronarias y la diabetes (Serrano *et al.*, 2006; Peh *et al.*, 2015; Amparo *et al.*, 2009).

Por lo tanto, actualmente se recomienda el consumo de AT, sin embargo, el AT se ve limitado por la baja absorción en el organismo, ya que solo se absorbe alrededor del 33% (Peh *et al.*, 2015). En años recientes, se han estudiado alternativas para mejorar la biodisponibilidad de AT en el organismo que permitan también mejorar la adición de AT en alimentos y bebidas. Una de las maneras más prometedoras para lograrlo es a través de nanoemulsiones, que tienen la capacidad de proteger al compuesto bioactivo, controlar la liberación en el lugar deseado, mejorar la vida de anaquel y la biodisponibilidad del AT.

Un factor determinante en el desarrollo y en las características de las nanoemulsiones es la selección de sus componentes interfaciales. Entre ellos se encuentran los surfactantes que mejoran la estabilidad cinética, debido a que bajan la tensión superficial entre la fase dispersa y continua de la nanoemulsión. Por lo tanto, tienen relación directa con la capacidad de protección y liberación del compuesto bioactivo.

En el grupo de investigación se han desarrollado diferentes surfactantes a partir de la modificación de fosfolípidos que han demostrado ser mejores que los surfactantes convencionales (Dodecil sulfato de sodio, Tween, entre otros), al disminuir el

tamaño de partícula, incrementar la estabilidad y mejorar la biodisponibilidad del compuesto bioactivo. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las características fisicoquímicas de nanoemulsiones de AT elaboradas con fosfolípidos y fosfolípidos modificados, estudiando parámetros como tamaño de partícula, potencial zeta ( $\zeta$ ), estabilidad, capacidad de atrapamiento y el proceso de liberación del compuesto activo en un sistema de digestión *in vitro*, utilizando microscopía confocal.

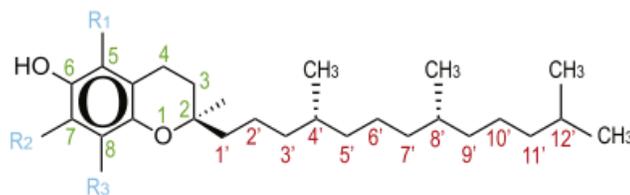
## 1 REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 1.1 Compuestos Bioactivos

Los compuestos bioactivos, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) (2016), son sustancias químicas de origen vegetal y animal que se encuentran en cantidades pequeñas. Estos compuestos cumplen funciones específicas en el cuerpo, que logran tener un impacto positivo para la salud humana. Entre los compuestos bioactivos se incluyen vitaminas, taninos, índoles, resveratrol, carotenoides y otros. Se ha comprobado que el consumo de estos compuestos puede reducir el riesgo de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como enfermedades coronarias, neurodegenerativas, infarto cerebral, diabetes y cáncer (Serrano *et al.*, 2006; Peh *et al.*, 2015).

#### 1.1.1 Vitamina E (Tocoferol)

La vitamina E se descubrió en 1922, fue aislada de vegetales y frutas. Está definida como un compuesto liposoluble y clasificado en 8 tipos de isómeros:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -Tocoferol y  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, n  $\delta$ -Tocotrienol (Figura 1). (Westergren y Kalikstad 2010; Peh *et al.*, 2015; Hatanaka *et al.*, 2010; Saberi *et al.*, 2013).



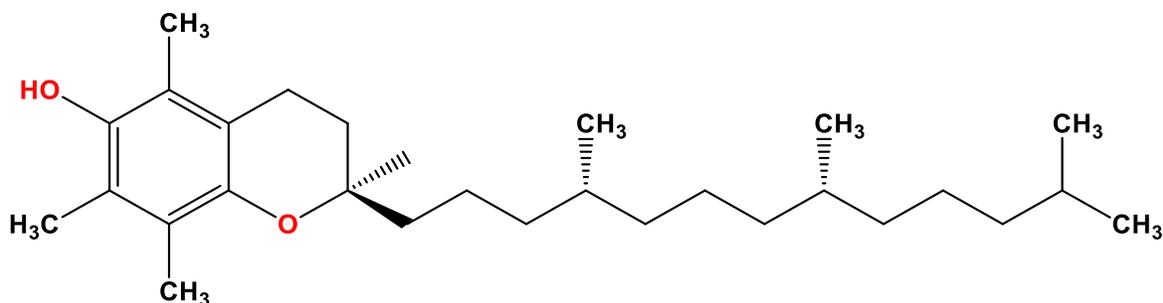
(2'R, 4'R, 8'R)- Tocoferol

**FIGURA 1. Estructura química del Tocoferol (Peh *et al.*, 2015)**

La estructura de Tocoferol cuenta con dos anillos aromáticos y una cadena hidrocarbonada de 16 carbonos, además cuenta con 3 estereocentros quirales en las posiciones: C-2 (dentro del anillo aromático), C-4' y C-8' (en la cadena hidrocarbonada). Las letras griegas permiten distinguir la posición de los grupos metilo en el anillo aromático. La diferencia entre cada uno de los isómeros ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ ) se encuentra en los sustituyentes del anillo en la posición de los carbonos C-5, C-7, C-8 como se especifica en la Tabla 1 (Peh *et al.*, 2015). El isómero de  $\alpha$ -Tocoferol (Figura 2) se encuentra en mayor proporción en la naturaleza, además este se absorbe de mejor manera en el intestino delgado a comparación de los demás isómeros (Peh *et al.*, 2015).

**TABLA 1. Isómeros de Tocoferol (Peh *et al.*, 2015)**

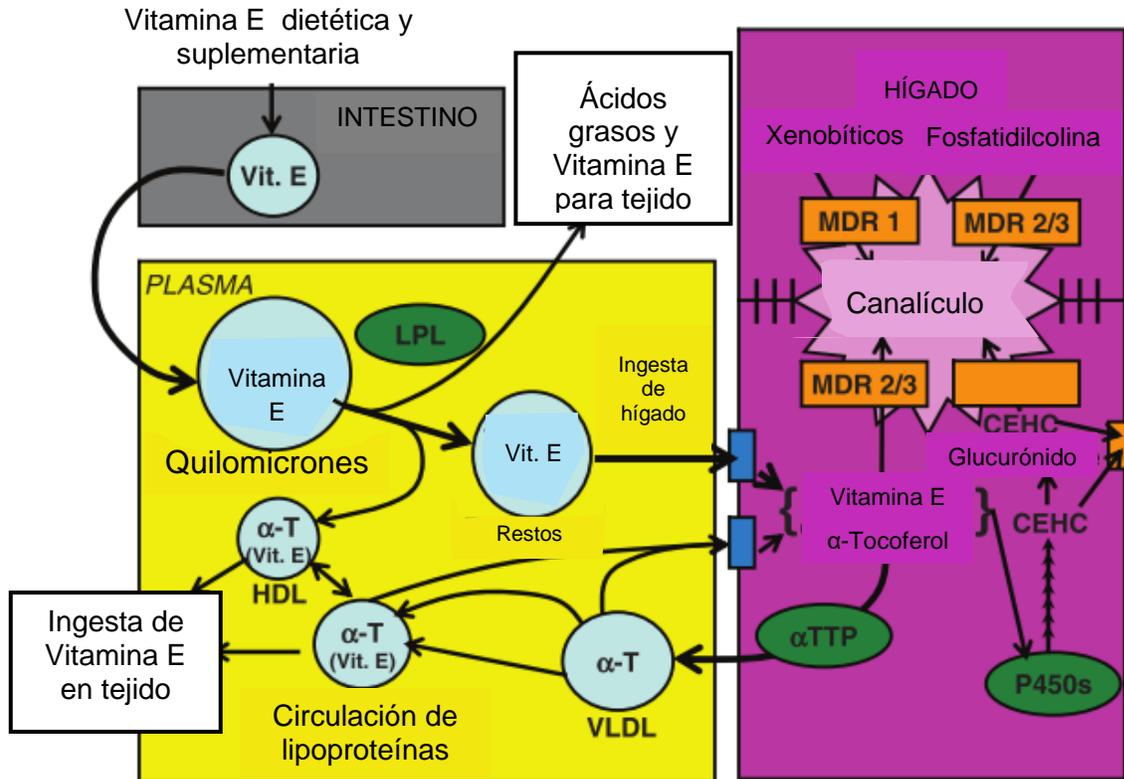
Vitamina E	R1	R2	R3	Peso molecular
$\alpha$ -Tocoferol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	430.71
$\beta$ -Tocoferol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	416.68
$\gamma$ -Tocoferol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	416.68
$\delta$ -Tocoferol	H	H	CH <sub>3</sub>	402.65



**FIGURA 2. Estructura química del  $\alpha$ -Tocoferol (Peh et al., 2015)**

### 1.1.1.1 Biodisponibilidad y farmacocinética de vitamina E

La vitamina E es esencial para el cuerpo humano; sin embargo, este no logra sintetizarla y por lo tanto se debe ingerir. La absorción de  $\alpha$ -Tocoferol (AT) dependerá de la cantidad y manera de administrar. En el intestino delgado se producen sales biliares y enzimas pancreáticas que forman micelas para la encapsulación de AT y por consiguiente su absorción (Traber, 2007). La Figura 3 muestra que el AT una vez absorbido en el intestino delgado es transportado por quilomicrones al torrente sanguíneo y posteriormente las lipoproteínas hidrolizan los quilomicrones. Estos quilomicrones transportan ácidos grasos y AT a los tejidos. Dentro del torrente sanguíneo continúa la formación de quilomicrones, donde la fracción de AT se une a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y otras lipoproteínas. El resto de quilomicrones son transportados al hígado. En esta parte, por la acción de la proteína AT transferasa ( $\alpha$ -TTP) impide la degradación lisosomal de AT, en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs). Además, durante el catabolismo de las lipoproteínas se distribuyen de manera que sean absorbidas por el hígado o por los tejidos. El exceso de AT se puede secretar por la bilis por medio de genes (MDR 2/3) y también es metabolizado por el citocromo P450 (CYP), por medio del proceso carboxil etil hidróxido cromas (CEHCs) y que pueden glucoronizar para excretarse por las vías urinaria o la bilis (Traber, 2007).



**FIGURA 3. Metabolismo de la Vitamina E en el cuerpo humano (Traber, 2007)**

Respecto a la ingesta diaria recomendada, la Academia de Alimentos y Nutrición del Instituto de Medicina de los Estados Unidos (FDB-NIH, 2000) cita que un pequeño entre 4 y 8 años debe consumir 6 mg de vitamina E diarios, un hombre de entre 19 y 30 años debe consumir 12 mg por día y una mujer del mismo rango de edad debe consumir en promedio 12 mg por día. En la siguiente Tabla (2) se muestra de manera completa las ingestas recomendadas para mujeres y hombres de diferentes edades.

En estudios realizados se determinó que la dosis de vitamina E ingerida de manera libre fue absorbida en un 33% en el cuerpo humano y el 67% fue eliminado en las heces fecales (Traber, 2007).

**TABLA 2. Consumo de Vitamina E recomendada (FDB-NIH, 2011)**

Edad	Consumo de Vitamina E (mg/día)				
	Niños	Hombres	Mujeres	Embarazo	Lactancia
1-3	5	-	-	-	-
4-8	6	-	-	-	-
9-13	-	9	9	-	-
14-18	-	12	12	12	16
19-50	-	12	12	12	16
51-70	-	12	12	-	-
> 70	-	12	12	-	-

### 1.1.1.2 Actividad biológica de $\alpha$ -Tocoferol

Su mecanismo de acción consiste en la interrupción del proceso de auto-oxidación de las células y reacción con especies reactivas de oxígeno. En la auto-oxidación, el AT interacciona en las reacciones en cadena por medio de la donación de un hidrógeno al radical peroxilo, originando así un radical ariloxilo y un hidroperóxido (Sayago *et al.*, 2007). Los radicales formados de esta reacción se estabilizan por deslocalización electrónica en el fenol; además, pueden reaccionar con otros radicales peroxilo y formar productos estables. Existen estudios que relacionan la ingesta de vitamina E con reducción de los niveles de colesterol y un mejoramiento en los enfermos de Alzheimer. El AT unido al succinato logran inducir la apoptosis de células cancerígenas y puede retrasar o prevenir la diabetes mellitus tipo 2 (Sayago *et al.*, 2007; Peh *et al.*, 2015; Traber, 2007).

El  $\alpha$ -Tocoferol en su estado natural presenta una tonalidad amarilla, con textura viscosa, se oxida rápidamente al ser expuesto a iones metálicos de transición, oxígeno y la luz (Peh *et al.*, 2015; Yang y McClements, 2013), lo que complica su uso como aditivo en alimentos, medicamentos y cosméticos.

Por lo tanto, la posibilidad de desarrollar sistemas acarreadores que permitan incrementar sus aplicaciones manteniendo la estabilidad del compuesto y su bioactividad es de gran importancia. Además de la protección y la liberación controlada del compuesto bioactivo en el lugar deseado. Así esto se puede lograr mediante la técnica de encapsulación.

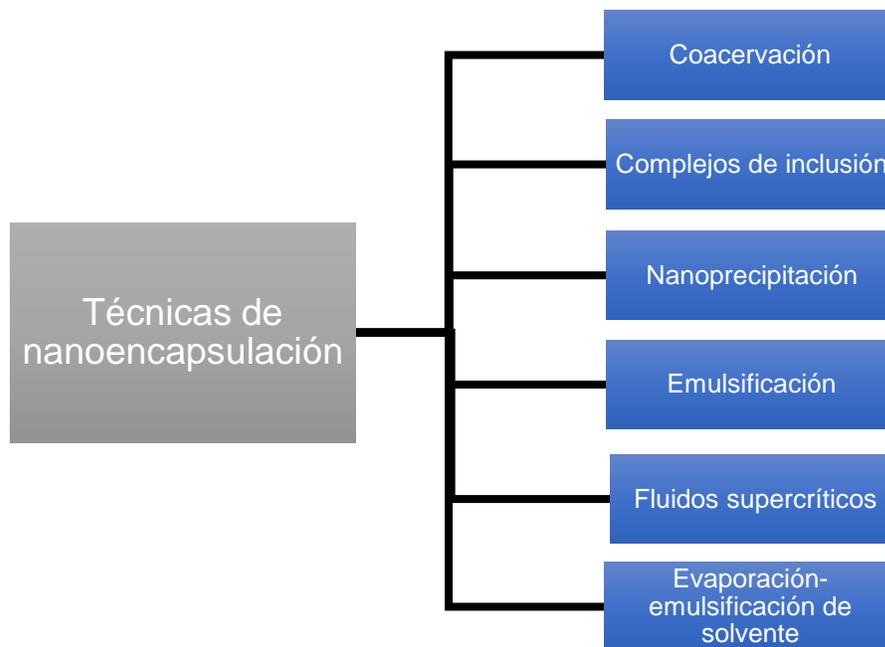
## **1.2 Nanoencapsulación**

La nanoencapsulación constituye un medio para crear sistemas que protejan a los compuestos bioactivos, al generar una barrera fisicoquímica contra elementos prooxidantes; como radicales libres, oxígeno, rayos UV entre otros. También proveen un incremento en la eficiencia biológica, liberación controlada de los componentes en el lugar deseado y la prevención de efectos secundarios (Gonnet *et al.*, 2010). La eficiencia de encapsulación, así como otros aspectos (tasa de encapsulación y vida media) dependen de las concentraciones y componentes en su fabricación (material pared, compuesto bioactivo, solvente acuoso) y la manera de suministro (tópica, oral, parenteral o intravenosa), también llamados sistemas acarreadores (Gonnet *et al.*, 2010).

### **1.2.1 Técnicas de nanoencapsulación**

Para la obtención de sistemas acarreadores se emplean diferentes técnicas de nanoencapsulación (Figura 4), que tienen influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de los sistemas encapsulados, tales como: tamaño de partícula, superficie, forma, solubilidad y mecanismos de liberación. Por lo tanto, es esencial seleccionar la técnica apropiada de nanoencapsulación basada en el tamaño

requerido, en las propiedades fisicoquímicas, naturaleza del núcleo y el material de pared (Ezhilarasi *et al.*, 2013).



**FIGURA 4. Técnicas de encapsulación (Ezhilarasi *et al.*, 2013)**

Estas técnicas de nanoencapsulación se pueden utilizar para proteger diversos compuestos bioactivos hidrófilos y lipófilos. La emulsificación, coacervación, y la técnica de fluidos supercríticos se utilizan para la encapsulación de compuestos hidrófilos y lipófilos (McClements, 2009; Leong *et al.*, 2009). Mientras que, los complejos de inclusión, evaporación-emulsificación de solvente y de nanoprecipitación se utilizan especialmente en compuestos lipofílicos (Reis *et al.*, 2006).

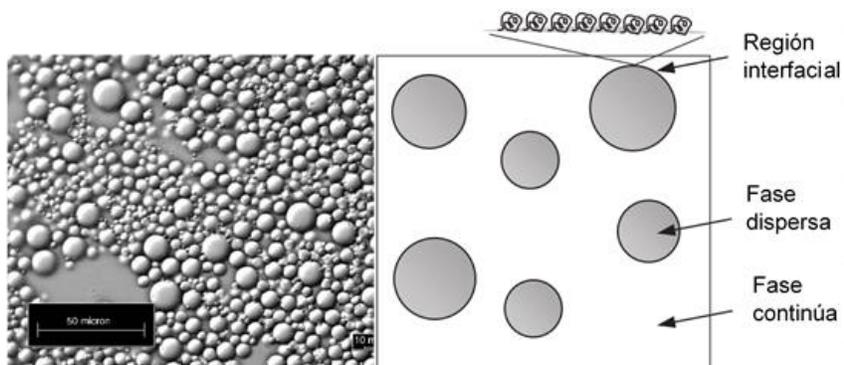
Dentro de las técnicas de nanoencapsulación, la emulsificación destaca por sus múltiples ventajas como: incrementa la solubilidad, la bioaccesibilidad, biodisponibilidad y la absorción de las vitaminas liposolubles; además de permitir una liberación controlada de las mismas, así como su facilidad para escalamiento (Ezhilarasi *et al.*, 2013; McClements, 2009). Además, con la técnica de

emulsificación se pueden producir partículas de tamaño nanométrico de 10 a 500 nm (nano-encapsulación), micrométricos (microencapsulación) o escala macro (Ray *et al.*, 2015).

### 1.3 Nanoemulsiones

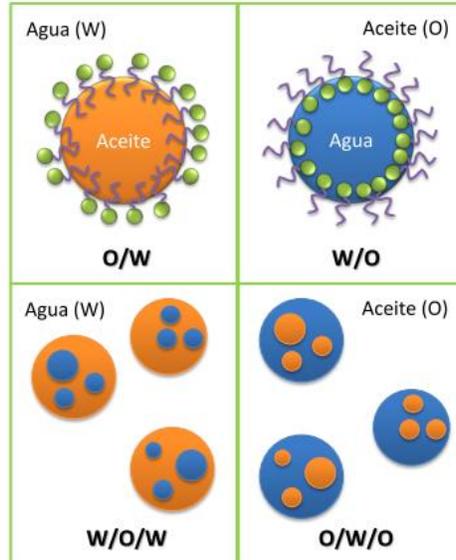
#### 1.3.1 Emulsificación

La emulsificación es el proceso mediante el cual dos líquidos inmiscibles, se mezclan, formando un sistema coloidal llamado emulsión, conformado por una fase continúa y una fase dispersa como se muestra en la Figura 5 (McClements, 2005, 2009).



**FIGURA 5. Micrografía y diagrama de una emulsión (McClements, 2005, 2009)**

Las emulsiones se pueden presentar de dos maneras aceite-agua (O/W) y agua-aceite (W/O). También existen otro tipo de emulsiones complejas llamadas múltiples, que se definen como gotas pequeñas dentro de las gotas en la fase dispersa (aceite-agua-aceite (O/W/O) y agua-aceite-agua (W/O/W)). Los tipos de emulsiones se pueden observar en la Figura 6 (McClements 2005; Cano, 2013; Dickinson, 2009).



**FIGURA 6. Tipos de emulsiones aceite-agua (O/W), agua-aceite (W/O) y emulsiones agua-aceite-agua (W/O/W) y aceite-agua-aceite (O/W/O) (Cano, 2013)**

Las emulsiones se pueden clasificar también por su tamaño de partícula, en la Tabla 3; se presenta la clasificación y sus características.

**TABLA 3. Clasificación y comparación de las emulsiones (McClements, 2011; Jafari *et al.*, 2008)**

Características	Emulsión	Microemulsión	Nanoemulsión
Tamaño de partícula	100 nm a 100 µm	2 a 50 nm	10 a 500 nm
Apariencia	Turbio/opaco	Claro	Claro/turbio
Cantidad de surfactante	Muy bajo	Muy alto del 10 al 20%	Media < 10%

La emulsificación es generalmente aplicada en la nanoencapsulación de compuestos bioactivos en una solución acuosa para la formación de emulsiones con tamaños nanométricos, con promedios de partículas de 100-500 nm. Esto

ofrece gran potencial de nanoencapsulación para la concentración de compuestos liposolubles ya que se incrementan sus propiedades fisicoquímicas (estabilidad, antioxidante, etc.) (McClements, 2009; Robins, 2007; Lee *et al.*, 2013; Jafari *et al.*, 2008).

Si bien las emulsiones son consideradas termodinámicamente inestables; debido a que la energía libre de la dispersión coloidal (partículas en agua) es mayor que la energía libre de las fases separadas (aceite y agua) (McClements, 2012), esto se puede contrarrestar con la aplicación de surfactantes, los cuales generan una disminución en la tensión superficial y como resultado aumentar su estabilidad (McClements y Rao, 2011). Las diversas inestabilidades que se pueden desarrollar en las emulsiones son: floculación, sedimentación, sedimentación inversa, coalescencia y maduración de Ostwald. Así la utilización de surfactantes permite solucionar los fenómenos de inestabilidad ya mencionados.

#### **1.3.1.1 Surfactantes**

Como se ha descrito anteriormente, si se mezclan una fase oleosa y una fase acuosa, estas fases se separarán y buscarán la manera de mantenerse en equilibrio. Cuando este equilibrio no sucede, debido a la agregación de las partículas de la fase dispersa, se añaden diferentes tipos de surfactantes para mejorar su estabilidad a largo plazo (Cano, 2013; Dickinson, 2009). En la Tabla 4 se muestran ejemplos sobre esta clasificación (Cano 2013; McClements y Rao, 2011).

**TABLA 4. Tipos de agentes surfactantes (McClements y Rao, 2011; Cano 2013; Dickinson, 2009)**

Tipo de Agente	Función	Ejemplos
Surfactantes	Sustancias que inducen la formación de emulsiones estables por un lapso; debido a la formación de una cubierta en la región interfacial, la cual rodea la gota, produciendo así fuerzas de repulsión de Van der Waals y electrostáticas; provocando así repulsión entre las partículas y a su vez previniendo la agregación de las mismas.	Polisacáridos anfífilicos (goma arábica, almidón modificado, etc.) proteínas (caseinato) y surfactantes (Lecitina, Tweens, Spans)

Los surfactantes son compuestos químicos que tienen la capacidad de estabilizar emulsiones y pueden interactuar rápidamente con la interfase, de la fase dispersa y la fase continua. De forma ideal los surfactantes deben tener la capacidad de interactuar rápidamente con la interfase aceite-agua durante la homogenización y reducir la tensión interfacial. Por lo general los surfactantes son estructuras complejas, ejemplo de ello son las proteínas o almidones modificados, que forman una red estructural tridimensional que se ajustan a la región interfacial. De manera general los surfactantes se pueden clasificar de la siguiente manera (McClements y Rao, 2011; McClements, 2004):

**Surfactantes iónicos.-** Son aquellos que en sus grupos funcionales se encuentran cargados negativamente (éster de ácido cítrico y lauril sulfato de sodio) y algunos cargados positivamente (arginato láurico). Sin embargo, estos se ven limitados cuando se utilizan en grandes cantidades, ya que llegan a causar irritación.

**Surfactantes no-iónicos.-** Estos tienen la característica de no contener grupos disociables con el agua. Se componen de una parte no polar y una parte polar, tienen amplio manejo debido a su baja toxicidad, irritabilidad, fácil formación tanto

en métodos de alta energía como de baja energía. Entre los ejemplos se encuentran el sorbitan monooleato, la sacarosa monopalmitato y el éter polioxietileno (POE).

Surfactantes Zwitterionicos.- Cuentan con un mínimo de 2 grupos ionizables de cargas opuestas, que pueden estar constituidos en una carga negativa, neutra y positiva, la cual dependerá del pH. Uno de los más utilizados son los fosfolípidos (lecitina) (McClements y Rao, 2011). Hoy en día existe una gran variedad de surfactantes que son utilizados en la industria de alimentos; algunos de estos se describen en la Tabla 5.

**TABLA 5. Surfactantes comúnmente usados en la industria alimentaria (McClements, 2004)**

Nombre químico	Ingesta diaria aceptable (mg/kg)	Solubilidad	Tipo
Lecitina	ND	Aceite-agua	Zwitterionicos
Sales de ácidos grasos	ND	Aceite-agua	Zwitterionicos
Esteres de sacarosa	0-10	Aceite-agua	Zwitterionicos
Estearoil lactilato	0-20	Aceite	Iónico
Esteres de ácido cítrico	ND	Agua	Iónico
Ácido diacetil tartárico	0-50	Agua	Iónico
Ésteres de ácido láctico	ND	Aceite	No iónico
Ésteres de propilenglicol	0-25	Aceite	No iónico
Polioxietileno	0-25	Agua	No iónico
Tween	ND	Agua	No iónico

ND= No determinado

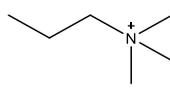
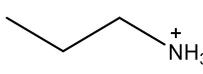
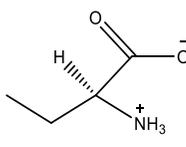
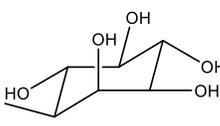
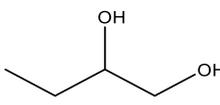
Actualmente algunos de estos surfactantes, como es el caso de la fosfatidilcolina son utilizados como surfactante para la formación de nanoemulsiones de compuestos bioactivo. Sin embargo, aún se realizan estudios para poder obtener otros tipos de fosfolípidos que actúen como surfactantes y algunos son modificados enzimáticamente con la finalidad de incrementar las propiedades surfactantes y nutraceuticas de los mismos (Cavazos, 2013). En el siguiente apartado se describen de manera específica y la manera de obtenerlos.

#### **1.3.1.1.A Fosfolípidos y fosfolípidos modificados**

Los fosfolípidos son versátiles debido a la constitución de su estructura, ya que cuenta con una parte no polar, glicerol y una parte polar (fosfato y como sustituyente colina). Esto los hace únicos e ideales para el área farmacéutica como excipientes debido a su capacidad de proteger diversos compuestos bioactivos. Estas moléculas se encuentran presentes en todas las membranas celulares y orgánulos, donde cumplen funciones estructurales, como cofactores y activadores de diversas enzimas. Existen diferentes maneras de obtener los fosfolípidos, un ejemplo de ello es la fosfatidilcolina; que puede ser obtenida a partir de soya, huevo o vía sintética. Además, se han podido desarrollar liposomas, emulsiones intravenosas, micelas mezcladas con PC/sales biliares y micelas de fosfolípidos (Li *et al.*, 2015).

Dependiendo de la cantidad de alcoholes contenidos en los fosfolípidos, estos se pueden dividir en glicerofosfolípidos y esfingomelinas. Los glicerofosfolípidos a su vez cuentan con diferentes clasificaciones que dependerán del grupo que se encuentra unido a la cabeza (Figura 7), entre los que se encuentran (Li *et al.*, 2015):

- Fosfatidiletanolamina (PE)
- Fosfatidilcolina (PC)
- Fosfatidilserina (PS)
- Ácido fosfatídico (PA)
- Fosfatidilinositol (PI)
- Fosfatidilglicerol (PG)

Fosfolípido	
Fostatidilcolina	
Fosfatidiletanolamina	
Fosfatidilserina	
Ácido fosfatídico	
Fosfatidilinositol	
Fosfatidilglicerol	

**FIGURA 7. Cabezas de los diferentes glicerofosfolípidos**

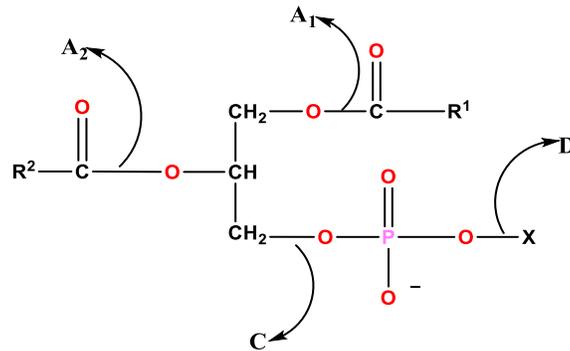
Tienen la capacidad de ser agentes antioxidantes, conferida por unirse a metales pro-oxidantes gracias al grupo aniónico con el que cuenta el grupo fosfato, propiciando así la inhibición de la oxidación lipídica, además de que se ha reportado que las emulsiones tienden a reducir la oxidación lipídica por iones metálicos (Qian y Decker, 2015). Por lo tanto, al modificar los fosfolípidos enzimáticamente se podrían mejorar sus propiedades surfactantes, de dispersión, viscosidad y capacidad antioxidante. Además, en la literatura se ha encontrado que tienen efectos positivos para la salud, como la reducción de los niveles de colesterol y triacilglicéridos en sangre, además pueden propiciar una mejor absorción de los mismos dependiendo del tipo de modificación (Acosta, 2009; Chávez, 2015).

Ejemplo de ello es la lisofosfatidilcolina, producto obtenido de la hidrólisis enzimática parcial de la fosfatidilcolina. Este compuesto tiene la característica de presentar mejores propiedades surfactantes, debido a que incrementa la estabilidad y solubilidad de los compuestos lipofílicos en la formulación de la fase dispersa, además de incrementar la absorción de compuestos bioactivos en las células del intestino delgado. Otro ejemplo de ello es la fosfatidilcolina, que es modificada en la posición sn-1 con ácidos grasos de cadena media lo que provoca una mejora en el empaquetamiento molecular de la interfase y propicia la formación de emulsiones mucho más estables (Ochoa, 2013).

La aplicación de enzimas para la modificación enzimática tiende a ser específica, se obtienen en condiciones suaves (temperaturas y pH bajos), facilita la purificación y disminuye los residuos de los productos. Las enzimas utilizadas para esto; son lipasas y fosfolipasas (Cavazos, 2013). Estas provocan una hidrólisis y reacción inversa de esterificación en los enlaces éster de los fosfolípidos. Existen 4 grupos principales de fosfolipasas que actúan específicamente en los enlaces éster (Ochoa, 2013):

- Fosfolipasa A<sub>1</sub> (fosfatidilcolina 1-acilhidrolasa)
- Fosfolipasa A<sub>2</sub> (fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa)
- Fosfolipasa C (fosfatidilcolina colinfosfohidrolasa)
- Fosfolipasa D (fosfatidilcolina fosfatidohidrolasa)

Esto permitirá obtener un fosfolípido completamente modificado dependiendo del enlace éster que hidrolice la enzima (Figura 8).



**FIGURA 8. Sitios de acción de las diferentes fosfolipasas: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C y D. R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ácidos grasos y X es el sustituyente (colina, serina, etanolamina, inositol) (Ochoa, 2013)**

Ejemplo de ellos es la obtención lisofosfatidilcolina (LPC) a partir de PC mediante la enzima Fosfolipasa A<sub>1</sub>, la cual tiene la capacidad de hidrolizar la posición sn-1, en un medio acuoso. Como resultado de esta reacción se tiene la obtención de un ácido graso libre de la posición sn-1 y la obtención de LPC unida a un solo ácido graso en la posición sn-2 (Casado *et al.*, 2013). Con esto se espera que tenga una capacidad de empaquetamiento de 0.74 con la LPC a diferencia de la PC de 0.4. Esto se debe a la característica geométrica de cada una, donde la LPC cuenta con una forma de cono invertido, lo cual propiciaría una forma directa para la encapsulación del compuesto bioactivo en forma de micelas, a diferencia de la PC que tiende a formar una fase laminar (Chávez, 2015).

### 1.3.1.2 Estabilizantes

Los estabilizantes, a menudo descritos como cosolventes, son moléculas que no permiten una buena estabilización en las emulsiones por sí mismas, debido al tamaño pequeño de la cabeza polar. Por este motivo se utilizan como cosolventes y generan los siguientes mecanismos fisicoquímicos (McClements y Rao, 2011):

- Optimización de la relación de viscosidad entre las fases dispersa y continua

- Reducción de la repulsión eléctrica entre los grupos de la cabeza de surfactantes iónicos en una interfaz al actuar como espaciadores
- Inducción de una adecuada curvatura interfacial

Uno de los estabilizantes más utilizados es el glicerol, que es soluble en agua y modifica las propiedades fisicoquímicas de una solución acuosa (densidad, viscosidad, índice de refracción y tensión superficial). Se ha podido observar que la adición de glicerol a la fase acuosa altera la tensión superficial y su solubilidad en surfactantes iónicos y no iónicos. Además, permite disminuir la concentración de surfactante, así como disminuir el tamaño de partícula de la emulsión (McClements y Rao, 2011; Saberi *et al.*, 2013). Ejemplo de ello es que Saberi *et al.*, (2013) mencionan que una concentración de glicerol del 40% del total de la emulsión de AT le dio estabilidad al sistema. En otro estudio se menciona que la solubilización de limoneno para la formación de microemulsiones utilizando surfactantes no iónicos; se vio favorecida por la adición de glicerol (Garti *et al.*, 2001).

### **1.3.2 Formación de la nanoemulsión**

A nivel laboratorio y en la industria, la fabricación de nanoemulsiones se realiza por métodos de alta energía y baja energía (McClements y Rao, 2011).

#### **1.3.2.1 Métodos de alta energía**

El propósito de utilizar dispositivos de alta energía (homogenizador de alta presión, ultrasonificador, microfluidizador) se debe a que tienen la capacidad de generar una fuerza de cizalla que permite entremezclar el aceite y la fase acuosa formando gotas pequeñas (Kentish *et al.*, 2008).

Los dispositivos de alta energía son utilizados ampliamente en la industria debido a que mejoran las propiedades físicas, entre ellas una mayor estabilidad de las nanoemulsiones, a diferencia de la mayoría de los métodos de baja energía, además de ser más fácilmente escalables (McClements y Rao, 2011).

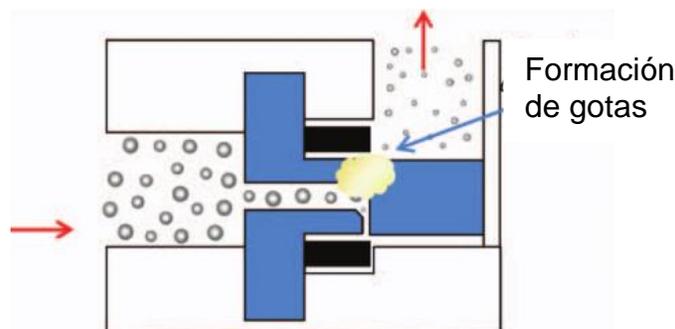
En la Tabla 6 se presentan los diferentes tipos de homogeneizadores que se utilizan en la industria alimentaria.

**TABLA 6. Comparación de los diferentes tipos de homogeneizadores (Robins, 2007)**

Homogeneizador	Producción	Eficiencia energética relativa	Tamaño de gota mínimo	Viscosidad de la muestra
Homogeneizador de alta presión	Continuo	Alto	< 100 nm	Baja a media
Homogeneizador ultrasónico	Estacionario	Alto	< 100 nm	Bajo a media
Microfluidizador	Continuo	Alto	< 100 nm	Bajo a media

#### 1.3.2.1.A Homogeneizador de válvula de alta presión

El homogeneizador de válvula de alta presión es eficiente para la reducción del tamaño de partícula. Este consiste en someter una emulsión gruesa (pre-emulsificada) a altos valores de esfuerzo cortante. Esto sucede debido a que el equipo tiene una bomba que dirige la emulsión hacia una cámara por medio de una válvula estrecha. Conforme pase la emulsión por la válvula se genera un esfuerzo cortante, ocasionando la reducción del tamaño de las gotas (ejemplo de 100  $\mu\text{m}$  a 100 nm) (McClements y Rao, 2011) (Figura 9).



**FIGURA 9. Formación de una nanoemulsión por homogeneizador de válvula de alta presión**

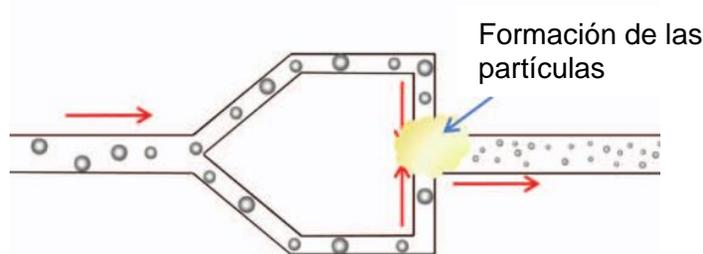
Una manera de tener el tamaño de partícula deseado es mediante el incremento del número de ciclos o al incrementar la presión del sistema (Walstra, 1993; Tadros *et al.*, 2004).

### 1.3.2.1.B Microfluidizador

Un microfluidizador, en diseño, es similar al homogenizador de alta presión, ya que aplican altas presiones para forzar una emulsión previamente mezclada; atravesar microcanales para obtener una reducción en el tamaño de las partículas (McClements y Rao, 2011).

Para esta reducción de partículas, el líquido pasa por una cámara en donde éste se divide en dos microcanales, que una vez atravesados colisionan entre sí y como resultado se obtienen fuerzas de cortes elevadas propiciando la reducción de tamaño de partícula (Jafari *et al.*, 2006; McClements y Rao, 2011). El diseño de un microfluidizador se observa en la Figura 10.

Al igual que el homogenizador de alta presión, al incrementar la presión, la concentración del surfactante y el número de ciclos, tiende a producir un tamaño de partícula menor. Sin embargo, en algunos casos se puede formar recoalescencia y esto es debido al número de ciclos que es sometida la nanoemulsión (Kentish *et al.*, 2008).

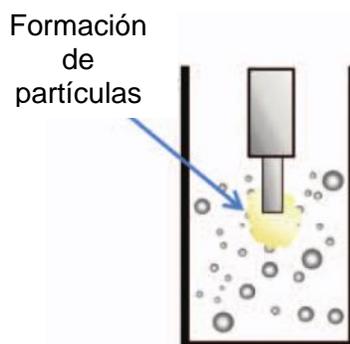


**FIGURA 10. Modo de acción del microfluidizador (McClements y Rao, 2011)**

### 1.3.2.1.C Homogenizador ultrasónico

El homogenizador ultrasónico, utiliza ondas ultrasónicas de alta intensidad que provocan fuerzas de corte para la ruptura de las fases aceite-agua en pequeñas partículas (Kentish *et al.*, 2008; Lin y Chen, 2008; Leong *et al.*, 2009).

El funcionamiento del equipo consiste en una entrada de energía que genera ondas, que se expanden y contraen en respuesta a una tensión eléctrica y es suministrada por un piezoeléctrico de cuarzo. La punta del equipo es introducida dentro de la mezcla del líquido y se inicia la homogenización. Esto es generado por intensas vibraciones mecánicas que conducen efectos de cavitación; obteniendo formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas de líquidos (Figura 11). Este colapso de las microburbujas formadas por cavitación genera fuerzas destructivas en la proximidad inmediata de la sonda del ultrasonido que llevan a las partículas a una ruptura. El tamaño de partícula tiende a disminuir al incrementar la intensidad de las ondas ultrasónicas, además del tiempo de residencia que se aplica (Leong *et al.*, 2009).



**FIGURA 11. Representación de la formación de nanoemulsiones a partir de un ultrasonificador (McClements y Rao, 2011)**

### 1.3.2.2 Métodos de baja energía

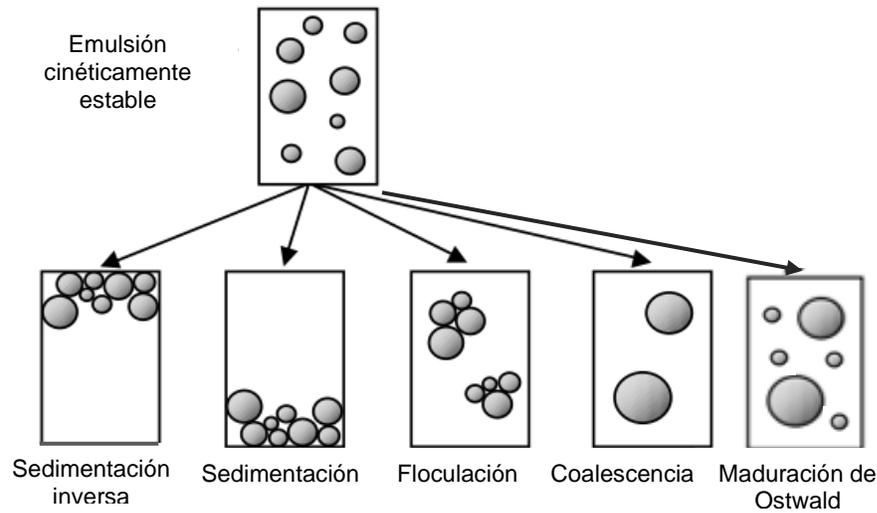
La formación de emulsiones a partir de métodos de baja energía sucede de manera espontánea con más precisión, bajo determinadas condiciones ambientales con una mezcla de surfactantes (Tadros *et al.*, 2004; Bouchemal *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009).

Existen 2 métodos: emulsificación espontánea y fase inversa. Las características de estos métodos es que tienen tamaños de partícula menores que los obtenidos por métodos de alta energía. Sin embargo, existe la limitante de los tipos de aceites y surfactantes que se pueden usar; por ejemplo, no es posible el empleo de proteínas o polisacáridos. En su lugar se utilizan concentraciones relativamente altas de surfactantes sintéticos para la formación de nanoemulsiones (McClements y Rao, 2011).

### **1.3.3 Caracterización de las nanoemulsiones**

#### **1.3.3.1 Estabilidad**

La estabilidad de una emulsión es de suma importancia para su aplicación, debido a que esto determinará el tiempo de su funcionalidad. El término estabilidad de una emulsión se define como su capacidad de resistir diferentes cambios en sus propiedades fisicoquímicas respecto al tiempo, ya que entre más estable sean sus propiedades, cambiarán más lentamente (McClements, 2005). La nanoemulsión puede volverse inestable debido a diferentes tipos de procesos físico-químicos. Los fenómenos de inestabilidad física se expresan como una alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas: separación gravitacional, floculación, sedimentación, sedimentación inversa, coalescencia, inversión de fase, maduración de Ostwald y degradación química (McClements y Rao, 2011; McClements, 2005; Sæther *et al.*, 2004) (Figura 12). Mientras que la inestabilidad química que puede presentar la nanoemulsión, se debe por la oxidación o hidrólisis estructural de las moléculas que comprenden el sistema (McClements, 2004). Por lo tanto, es de suma importancia definir cuáles son los mecanismos que producen la inestabilidad en el sistema, su relación y qué es lo que los provoca, para así mitigar o controlar las propiedades fisicoquímicas con el propósito de obtener una nanoemulsión estable.



**FIGURA 12. Fenómenos de inestabilidad que se presentan en las nanoemulsiones (McClements, 2005)**

Separación gravitacional.- Es una de las formas más comunes de inestabilidad, se genera por la diferencia de densidades entre la fase continua y la fase dispersa, ocasionan los fenómenos conocidos como sedimentación o sedimentación inversa. La sedimentación inversa es el ascenso de partículas cuando tienen baja densidad comparándola con la fase continua (por ej. triacilglicéridos). La sedimentación es el descenso de las partículas cuando cuentan con una mayor densidad que la fase continua. La velocidad con que sucede esta separación se determina a partir de la ley Stokes y el movimiento browniano de las nanopartículas:

$$v = - \frac{2gr^2(\rho_{particula} - \rho_0)}{9\eta_0} \quad \text{Ec. (1)}$$

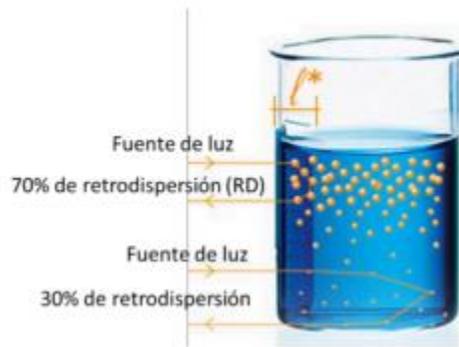
Donde  $g$ : aceleración de la gravedad,  $r$ : radio de las partículas,  $\rho$ : densidad de la gota (partícula) y de la fase continua ( $\rho_0$ ),  $\eta$ : viscosidad de corte en la fase continua (McClements y Rao, 2011).

Coalescencia.- Es el fenómeno mediante el cual dos o más partículas del líquido se fusionan para obtener una sola partícula de mayor tamaño (McClements y Rao, 2011; Cano, 2013).

Floculación.- Es la agregación de partículas, sin perder su identidad. En este proceso, se forman aglomerados, no existe rompimiento de la región interfacial de las gotas y por consiguiente no se modifican. Por ende, con una agitación se pueden separar las gotas (proceso reversible) (McClements y Rao, 2011).

Maduración de Ostwald.- Fenómeno donde se incrementa el tamaño medio de las partículas de una nanoemulsión con respecto al tiempo, debido a la transferencia de masa de las gotas de aceite con menor diámetro a las gotas de aceite de mayor diámetro (McClements y Rao, 2011). Esta maduración se puede retardar mediante la adición de un inhibidor de maduración, que puede ser una molécula no polar soluble en la fase oleosa pero insoluble en la fase acuosa (ej. triacilglicerol de cadena larga o media) (McClements y Rao, 2011).

Por lo tanto, la velocidad de rompimiento de una nanoemulsión y el mecanismo con el que sucede depende básicamente, de su formulación y microestructura. Además de agentes externos a los que está sometido el sistema (temperatura, agitación mecánica, exposición a la luz) que se incluyen en las condiciones de almacenamiento (Acevedo, 2017). Así, la manera de detectar estos fenómenos de inestabilidad puede ser de manera visual, por centrifugación o mediante equipos como el Turbiscan. Este equipo basa su funcionamiento en la incidencia de un haz de luz sobre la muestra, la cual recibe dos señales de luz: una de transmisión y otra de retrodispersión (Figura 13). Esto en función de los cambios que detecta en los tamaños de partícula y la concentración de partículas en un área específica. Así esto facilita su análisis ya que no necesita ser procesada la muestra, no altera al sistema y la detección del mismo es 50 veces más rápido que el ojo humano. El equipo tiene un rango de detección de 1 nm a 5  $\mu\text{m}$  (Lecmarchan *et al.*, 2003; Formulacion, 2013). El tamaño de partícula es otro parámetro de caracterización de las nanoemulsiones, el cual se describe a detalle en la siguiente sección.

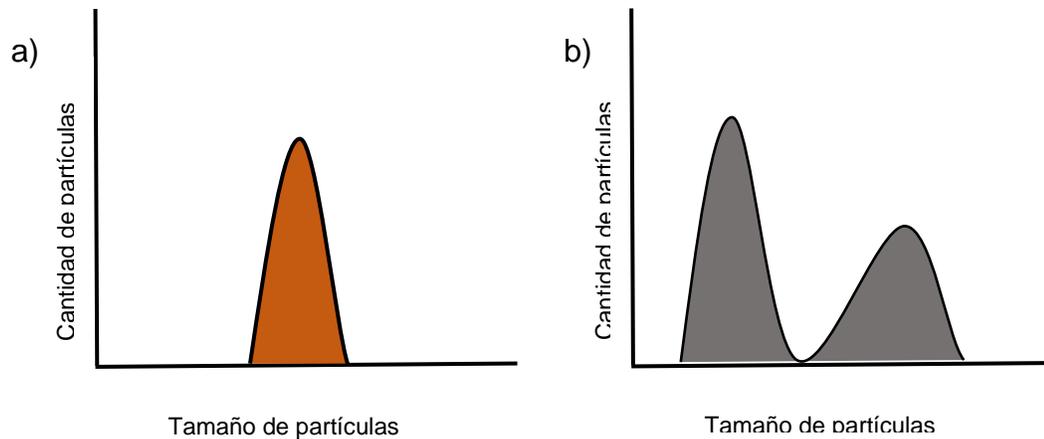


**FIGURA 13. Esquema de funcionamiento del Turbiscan (Formulation, 2013)**

### 1.3.3.2 Tamaño de partícula

Es una de las características más importantes, ya que tiene influencia en las propiedades ópticas, reológicas y en la estabilidad de la nanoemulsión, así como en la liberación controlada del compuesto bioactivo y su destino biológico. Los tamaños de partícula son caracterizados por la distribución de tamaño de partícula, el cual representa la fracción de partículas dentro de un rango discreto. Es preferente representar completamente el tamaño de partícula usando una medición con tendencia de control en la distribución, que generalmente es determinado por la dispersión de luz dinámica (DLS) (Porras *et al.*, 2004).

Otra manera de caracterizar las nanoemulsiones es a partir de la polidispersidad del sistema (diferentes tamaños de partícula en la nanoemulsión); estos pueden ser representados gráficamente en función al número de picos que estarán relacionados en la distribución del tamaño de partícula. Estos gráficos se definen como monomodal y multimodal (McClements, 2011; Cano, 2013); donde el sistema monomodal es el deseado debido a que muestra una homogeneidad de tamaño de partícula, y esto se observa con una alta tasa de estabilidad (Figura 14).



**FIGURA 14. Representación gráfica de modelos: monomodal (a) y bimodal (b) en la determinación del tamaño de partícula (McClements, 2011; Cano, 2013)**

### 1.3.3.3 Carga eléctrica de la partícula

Las nanoemulsiones cuentan con una carga eléctrica debido a surfactantes de adsorción de ionización e iones minerales. La señal y magnitud de la carga eléctrica es fundamental para determinar la estabilidad de las nanoemulsiones, su estado de agregación, interacción con otros componentes. Se describe en términos de densidad de carga-superficie ( $\sigma$ ), potencial superficial ( $\Psi_0$ ) y potencial ( $\zeta$ ). El potencial de la superficie eléctrica es la energía libre requerida para incrementar el cambio de la densidad de superficie de cero a  $\sigma$ , trayendo cargas a la superficie a lo largo del medio circundante (McClements y Rao, 2011).

#### 1.3.3.3.A Potencial $\zeta$

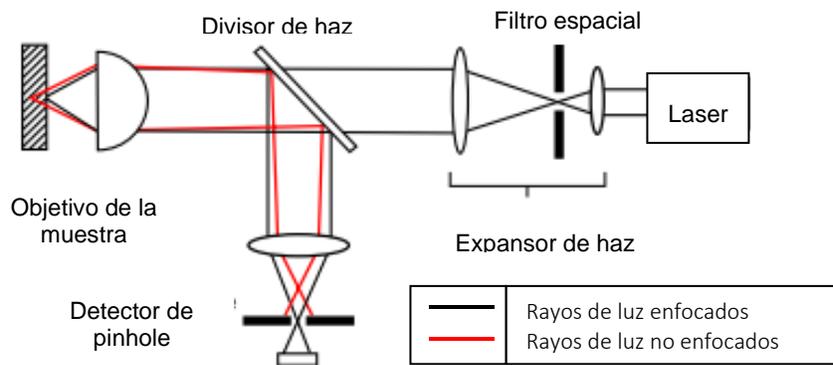
El potencial  $\zeta$  es la medida de carga superficial neta de la partícula y su distribución en la interfase. Para determinar el potencial  $\zeta$  se aplica el modelo de Smoluchowski. Éste establece que una partícula cargada, que se encuentra suspendida en una solución, desarrolla una doble capa eléctrica que variará dependiendo de las características de las partículas y la composición de la solución. Esta, al estar sujeta a un campo eléctrico en suspensión, permite observar el tipo de carga de la partícula debido a que migra hacia los electrodos (Cano, 2013).

### **1.3.3.4 Estructura**

La aplicación de la microscopía se fundamenta en la capacidad de observar estructuras pequeñas (micrométricos y nanométricos). Con la finalidad de poder obtener información acerca de su estructura, forma y conformación del medio. En este caso es el sistema coloidal con la fase continua. Una de las técnicas de microscopía empleada para la observación de nanoemulsiones es la microscopía confocal, que se basa en la emisión de fluorescencia de moléculas específicas, que forman la misma, y así obtener imágenes en 2D y 3D (Jones *et al.*, 2005). Por lo tanto, utilizar la técnica de microscopía confocal es ideal para el uso de estos sistemas.

#### **1.3.3.4.A Microscopía confocal**

El principio del microscopio confocal es utilizar un láser de luz, a una o varias longitudes de onda para excitar muestras que emitan fluorescencia; después este haz de luz se filtra para dejar pasar solo la longitud de onda deseada (Figura 15). La resolución de las muestras está dada por la apertura numérica que cuenta el objetivo del lente, además de dos diafragmas (pinholes); uno de ellos se encuentra entre la fuente de luz y el objetivo, y el otro entre el objetivo y el detector. Estos deben estar alineados debido a que el segundo de los pinholes debe dejar pasar la luz del plano focal; es decir, solo la luz que está en el plano enfocado. Esto ayuda a evitar el traslapamiento de imagen y así poder tener una mejor calidad de esta. Las imágenes son obtenidas a partir de muestras excitadas a determinada longitud de onda lo que propicia que la muestra emita fluorescencia a partir de su luz de emisión (Jones *et al.*, 2005).



**FIGURA 15. Representación del funcionamiento del microscopio confocal**

El sistema también cuenta con un divisor de haz de luz o espejo dichroico; refleja la luz por abajo o encima de la longitud de onda asignada, esta se dirige al fotodetector (fotomultiplicador); sin embargo, antes de que la luz llegue al detector pasa por filtros ya sea de paso bajo o de paso alto, los cuales solo permiten un ancho de banda de luz pase a partir de la longitud de onda emitida (Lamprecht *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2005).

Con el microscopio confocal se puede ver de manera precisa el comportamiento estructural de las nanoemulsiones cuando son sometidas a condiciones simuladas de digestión *in vitro*. Esto se debe principalmente a la fluorescencia que puede ser generada propiamente por los componentes de la emulsión, o por medio de marcadores (cromóforos) que se adhieren a un grupo específico de las moléculas que conforman la emulsión y así emitir una emisión luz específica de la nanoemulsión (Trujillo *et al.*, 2013). Ejemplo de ello es Salvia-Trujillo *et al.*, (2013) los cuales tiñeron la fase oleosa con rojo nilo, el cual se adhiere fácilmente a ácidos grasos. Para observar el cambio estructural de las partículas cuando estas son sometidas a condición de digestión *in vitro*. Tikekar y Nitin (2012) evaluaron las diferentes partes del sistema encapsulado mediante microscopía confocal utilizando rojo nilo como marcador de la fase lipídica; esto con la finalidad de medir el grado de oxidación y degradación de la misma.

### 1.3.4 Propiedades interfaciales

El manejo y conocimiento de las características interfaciales de las partículas es una herramienta para el diseño de sistemas de nanoemulsión en determinadas condiciones específicas que ayudan a determinar el tipo de propiedades de permeabilidad interfacial, la capacidad de atrapamiento y la liberación controlada (McClements, 2005).

Por lo tanto, para tener un desempeño óptimo de las nanoemulsiones en la liberación controlada de sus compuestos bioactivos se deben tener ciertos atributos funcionales y características con la finalidad de una liberación adecuada en el individuo. A continuación, se mencionaran una serie de aspectos que se deben considerar (McClements y Li, 2010):

Capacidad de carga de AT.- La capacidad de carga (LC) es una medida de masa del material encapsulado (ME) por unidad de masa del material de soporte (MC):

$$LC = \frac{ME}{MC} \quad \text{Ec. (2)}$$

Idealmente, un sistema de suministro debe tener una alta capacidad de carga.

Eficiencia de encapsulamiento de AT: La eficiencia de encapsulamiento (LE) es una medida de la capacidad del sistema de liberación para retener el material encapsulado en el tiempo:

$$LE = 100x \frac{ME(t)}{ME(0)} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde ME (t) y ME (0) son la masa de material encapsulado en el momento t y 0, respectivamente. Idealmente, se esperaría que la eficiencia de encapsulación sea alta (100%) a lo largo de la preparación, el almacenamiento y el transporte.

Protección contra la degradación química.- El sistema de liberación se debe diseñar para proteger un compuesto bioactivo encapsulado contra algún mecanismo de degradación química durante el almacenamiento, por ejemplo, la oxidación y/o hidrólisis. La velocidad de estas reacciones de degradación química puede ser

promovido por ciertos factores que necesitan ser controlados (calor, luz, oxígeno o productos químicos específicos).

Mecanismo de liberación.- El sistema de liberación se debe diseñar para que el compuesto bioactivo se libere en el sitio deseado. Esta liberación puede tener una velocidad controlada en respuesta a un detonante ambiental en el sistema (pH, fuerza iónica, actividad enzimática o la temperatura).

Biodisponibilidad.- Un sistema de administración debe mejorar o al menos no afectar negativamente la disponibilidad de cualquier componente bioactivo encapsulado.

Bioaccesibilidad.- Se define como la fracción que se solubiliza dentro de la fase micelar después de la digestión de lípidos. Además, esta depende de la naturaleza de las micelas formadas, es decir, la composición y la naturaleza de las estructuras coloidales formadas (Yang *et al.*, 2015).

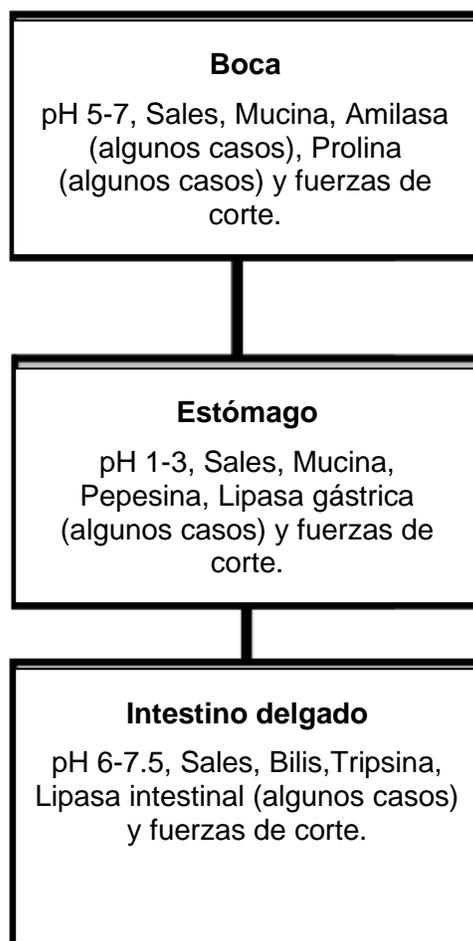
### **1.3.5 Liberación controlada**

Como se ha descrito anteriormente, los compuestos bioactivos (AT) se solubilizan y son transportados a través de la capa mucosa intestinal antes de ser absorbidas por células del epitelio del intestino delgado (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Yang y McClements, 2013). Por esta razón, se han diseñado sistemas gastrointestinales *in vitro*, para observar el comportamiento de las nanoemulsiones.

El sistema *in vitro*, es un modelo de digestión gastrointestinal que simula de una manera simplificada el comportamiento fisiológico, que se basa en las condiciones del sistema digestivo para su simulación. Ejemplo de ellos son la composición de fluidos digestivos, pH y tiempos de residencia de cada compartimiento. La mayoría de los modelos digestivos describen dos compartimentos (también llamados etapas): estómago e intestino delgado; o de tres etapas: boca, estómago e intestino delgado o estómago, intestino delgado y grueso. (Versantvoort *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se realizó el sistema de digestión *in vitro* de acuerdo a las necesidades requeridas para simular la digestión de nanoemulsiones, ejemplo de ellos es que no se utilizarán amilasas en la boca puesto que no se tienen almidones

en las nanoemulsiones, por lo cual, no tendrían efecto en los sistemas nanoemulsionados en lípidos (Sarkar, 2010). Además, ya se encuentran definidos rangos físicos y bioquímicos, descritos en la Figura 16.



**FIGURA 16. Diagrama de las etapas, factores físicos y bioquímicos para evaluar el comportamiento de las nanoemulsiones en un sistema de digestión *in vitro* (Sarkar, 2010)**

## 1.4 Síntesis de Antecedentes

El AT es un isómero de la vitamina E, su estructura le confiere importantes propiedades antioxidantes y características particulares como ser liposoluble, sensible a la luz y al oxígeno (provocan oxidación). Es considerado un “compuesto bioactivo” por las propiedades benéficas para la salud, debido a que se han encontrado estudios donde asocian el AT en tratamientos de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, antiinflamatorias, coronarias y la diabetes (Serrano *et al.*, 2006; Peh *et al.*, 2015; Amparo *et al.*, 2009).

Por lo tanto, se recomienda el consumo de AT, sin embargo, éste se ve limitado por la baja absorción en el organismo, ya que sólo se absorbe alrededor del 33% del total ingerido (Peh *et al.*, 2015). De igual forma, la implementación de la técnica de emulsificación, para la encapsulación de compuestos bioactivos en una solución acuosa, es una alternativa. Así, la encapsulación se obtiene en forma de nanoemulsiones con tamaños promedio de partículas de 100 a 500 nm. Esto ofrece un gran potencial de encapsulación de compuestos liposolubles (McClements, 2009; Robins, 2007; Lee *et al.*, 2013; Jafari *et al.*, 2008). Al encapsular AT se protege de la exposición de luz, oxígeno, mejorar su vida de anaquel y la bioaccesibilidad del mismo (Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, las emulsiones son consideradas inestables termodinámicamente, esto se puede contrarrestar con la aplicación de surfactantes, los cuales generan una disminución en la tensión superficial, permitiendo así aumentar su estabilidad (McClements y Rao, 2011). Un tipo de surfactante versátil que tiende a ser Zwitterionico, debido a que cuenta con una carga negativa y una positiva en cada uno de los extremos de la molécula, es la PC (McClements y Rao, 2011). Además, tiene la característica de ser antioxidante, por lo tanto garantiza la protección del AT (Cavazos, 2013), ya que tiene la capacidad de unirse a metales pro-oxidantes gracias al grupo aniónico con el que cuenta el grupo fosfato. Esto propicia la inhibición de la oxidación lipídica, además de que se ha reportado que también en las nanoemulsiones tiende a reducir la oxidación lipídica por iones metálicos (Qian y Decker, 2015). También en la literatura se ha encontrado que la PC tienen efectos positivos para la salud, como en la reducción

de los niveles de colesterol, triacilglíceridos en sangre y pueden propiciar una mejor absorción de los mismos, dependiendo del tipo de modificación (Acosta, 2009; Chávez, 2015). Además, la PC se puede modificar enzimáticamente para obtener LPC, donde la fosfolipasa A<sub>1</sub> hidroliza en la posición sn-1 la cadena del ácido graso, obteniendo LPC sn-2, demostrando que mejora la encapsulación del compuesto bioactivo (Casado *et al.*, 2013; Chávez, 2015; Cavazos-Garduño, 2013).

Adicionalmente, se emplea la incorporación de agentes estabilizantes como el glicerol, el cual modifica las propiedades fisicoquímicas de una solución acuosa (densidad, viscosidad, índice de refracción y tensión superficial), lo que permite disminuir la concentración del surfactante, así como el tamaño de partícula de la nanoemulsión (McClements y Rao, 2011; Saberi *et al.*, 2013). Ejemplo de ello es que Saberi *et al.*, (2013), mencionan que una concentración del 40% de glicerol del total de la nanoemulsión de  $\alpha$ -Tocoferol le dio una mayor estabilidad al sistema, a diferencia de las que no utilizaron glicerol.

Para producir estos sistemas emulsionados nanométricos, se realizan en dispositivos de alta energía (Kentish *et al.*, 2008) produciendo tamaños de partícula de 50 a 150 nm (Robison, 2007).

Una vez obtenida la nanoemulsión, esta tiene que presentar ciertos parámetros de estabilidad fisicoquímica con la finalidad de evitar fenómenos físicos indeseables como: separación gravitacional, floculación, sedimentación, sedimentación inversa, coalescencia, inversión de fase, maduración de Ostwald (McClements y Rao, 2011; McClements, 2005; Sæther *et al.*, 2004). Además de inestabilidades químicas provocados por la oxidación de la interfase formada por lípidos (Tikekar y Nitin, 2012). Por lo tanto, al encontrar la formulación adecuada, microestructural y agentes externos (temperatura, agitación mecánica, exposición a la luz), se podría disminuir la velocidad de rompimiento de las nanoemulsiones (Acevedo, 2017). Para determinar estos procesos de inestabilidad se puede utilizar el Turbiscan, (Lecmarchan *et al.*, 2003; Formulacion, 2013) que funciona con dispersión de luz dinámica para determinar el tipo de distribución y tamaño de partícula (Porrás *et al.*, 2004). Otro aspecto importante en la formación de los sistemas nanoemulsionados

es el potencial  $\zeta$ , que describe la medida de la carga superficial neta de la partícula y su distribución en la interfase (Cano, 2013). Sus propiedades interfaciales (permeabilidad interfacial, liberación controlada y encapsulación de compuesto bioactivo) pueden determinar la eficiencia, la capacidad de transportar y soportar las condiciones a las que sería sometida en un sistema de digestión (McClements y Rao, 2011; McClements, 2005, 2011).

La eficiencia del sistema encapsulado de AT se evaluó en un sistema de digestión *in vitro*, con microscopía confocal. Esto permitió estudiar los cambios estructurales en cada una de las etapas del sistema de digestión *in vitro* (boca, estómago e intestino delgado) (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Abla y Banga, 2014; Yang *et al.*, 2015; Yang y McClements, 2013).

## 2 JUSTIFICACIÓN

En el mercado existen diferentes formas de consumo de AT, con la finalidad de aprovechar sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, su uso en diversos alimentos, bebidas y productos farmacéuticos está limitado debido a su baja solubilidad en agua y su sensibilidad al oxígeno y luz, que condicionan su bioaccesibilidad. La incorporación del AT en nanoemulsiones es una alternativa a esta problemática y presenta las siguientes ventajas:

- Incrementa su estabilidad
- Incrementa su bioaccesibilidad

Estas ventajas podrían ser favorecidas mediante la modificación enzimática de fosfolípidos que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas en las nanoemulsiones.

## 3 HIPÓTESIS

Es posible desarrollar nanoemulsiones O/W de  $\alpha$ -Tocoferol, estables, con fosfolípidos y fosfolípidos modificados durante su almacenamiento, los cuales permitan incrementar y mejorar la estabilidad y la bioaccesibilidad del compuesto bioactivo.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones O/W de  $\alpha$ -Tocoferol elaboradas con diferentes fosfolípidos (Fosfatidilcolina y Lisofosfatidilcolina), así como su comportamiento en un digestor *in vitro*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Formular y desarrollar nanoemulsiones O/W de  $\alpha$ -Tocoferol con dos tipos de surfactantes (Fosfatidilcolina y Lisofosfatidilcolina).
- Caracterizar fisicoquímicamente las nanoemulsiones formuladas y preparadas con los dos surfactantes.
- Evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones formuladas con respecto al tiempo y el efecto de la temperatura.
- Evaluar el comportamiento de las nanoemulsiones en un sistema de digestión *in vitro*.

## 5 METODOLOGÍA

En este trabajo se evaluaron dos tipos de surfactantes; uno obtenido por un distribuidor y el otro surfactante fue obtenido por modificación enzimática en el laboratorio de Postcosecha. Esto permitió la formación de nanoemulsiones de AT, además de evaluar el sistema *in vitro* y el estudio de imágenes por microscopía confocal (Figura 17).

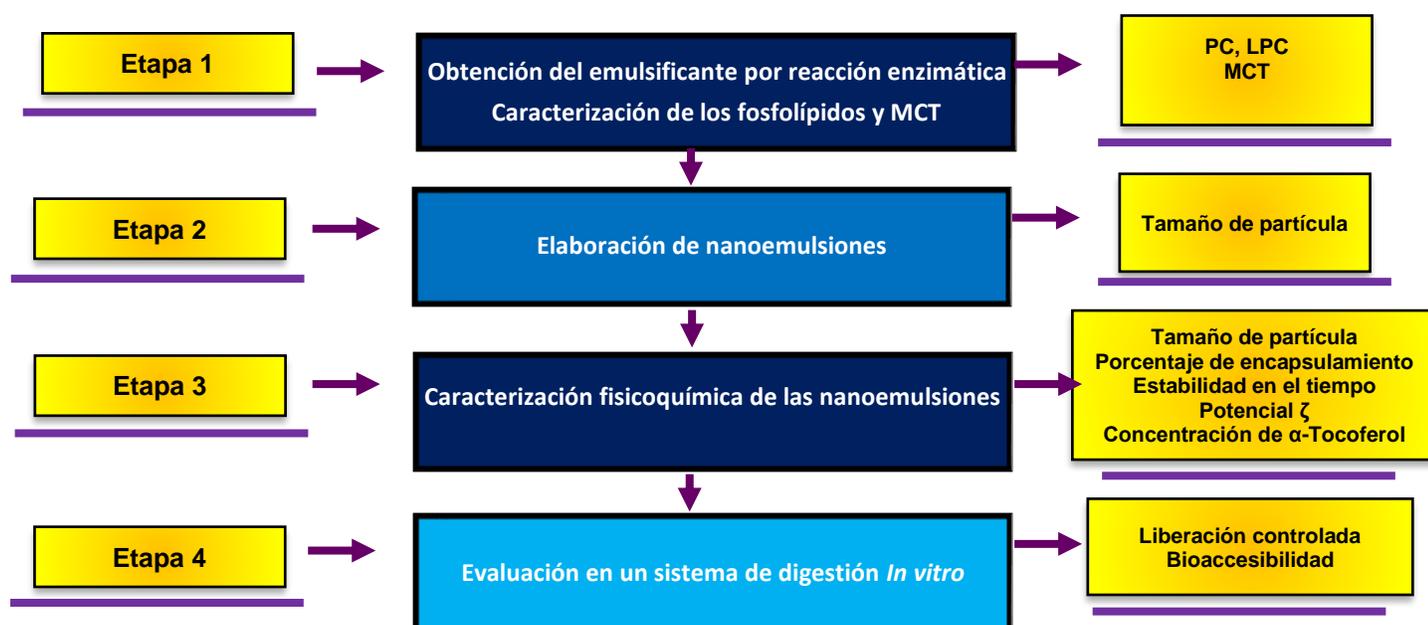


FIGURA 17. Diagrama de flujo experimental

## 5.1 Materiales y métodos

### 5.1.1 Reactivos

Como compuesto bioactivo para la formación de nanoemulsiones se empleó AT, (St. Louis, MO). La Fosfolipasa A<sub>1</sub> (Lecitase Ultra<sup>®</sup>) fue un obsequio de Novozymes (Dinamarca). La fosfatidilcolina de soya (70% de pureza), se compró a Shenyang Tianfeng Bioengineering Technology (Shenyang, China). La Fosfatidilcolina de soya (98% de pureza) para las modificaciones enzimáticas fue adquirida de Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). Como agente estabilizante se uso glicerol grado reactivo (J. T. Baker). Para la formación de nanoemulsiones se utilizó agua Milli-Q<sup>®</sup>. Se adquirió rojo nilo de Thermo Fisher Scientific (USA) para marcar la fosfatidilcolina. Los solventes y reactivos grado HPLC se compraron en Teqsiqum (ciudad de México). Para las pruebas del sistema de digestión *in vitro* los reactivos: mucina, albumina bovina, pepsina y lipasa fueron adquiridos a Sigma. Se emplearon membranas de centrifugación (Microcon, Ultracel YM-50, 50kDa MWCO) compradas en Millipore (Billerica, MA).

### 5.1.2 Obtención de Lisofosfatidilcolina

#### 5.1.2.1 Síntesis de Lisofosfatidilcolina por vía enzimática

La reacción de hidrolisis enzimática se realizó utilizando fosfolipasa A<sub>1</sub> (Lecitase Ultra) de acuerdo con lo reportado por Casado (2012) con ligeras modificaciones. Las condiciones a las que se llevó la reacción son; 36% (v/v) buffer Tris-HCl 1 M, pH=8, 10% (v/v) sales biliares al 0.1% (w/w), 4% (v/v) CaCl<sub>2</sub> (22% w/w) y glicerol 50% (v/v). Se agregó el 20 % (w/w) de PC (Avanti) del peso total de la reacción y una vez que las condiciones de temperatura (50 °C) y con agitación de 600 rpm (impulsor de 3 cm de Ø) fueron logradas, se agregó el 10 % de solución enzimática (995 U/mL de PLA<sub>1</sub>). El tiempo de hidrolisis se estableció en 50 minutos y se extrajeron alícuotas de 50 µL en diferentes tiempos.

### **5.1.2.2 Determinación del rendimiento de Lisofosfatidilcolina por HPLC**

Para determinar el rendimiento de la LPC se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  en diferentes tiempos de la reacción; una vez obtenidos, a cada alícuota se le agregaron 4 mL de acetona a 0  $^{\circ}\text{C}$ , se agitaron en un vortex por 20 s y posteriormente se centrifugaron a 4500 rpm por un minuto. Este proceso se realizó dos veces, con la finalidad de retirar los ácidos grasos y la solución acuosa del medio. Una vez realizado el lavado se procedió a secar con  $\text{N}_2$ , y se les agregó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo por cada mg de muestra. Para su análisis, se aplicó la metodología planteada por Ochoa (2013), con una fase móvil isocrática, compuesta por acetonitrilo, metanol y ácido fosfórico (95.24:3.66:1.1), un flujo de 1 mL/min y tiempo de corrida de 15 min. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ . El equipo tiene una bomba binaria HPLC Waters 1525, auto-muestreador Waters 717plus, detector UV-Visible Waters 2487 y una columna Waters Partisil Sílica 5 mm (4.6  $\times$  250 mm).

### **5.1.2.3 Recuperación de Lisofosfatidilcolina**

Una vez obtenido el producto de interés se realizó la separación de la fase acuosa, la cual contenía sales ( $\text{CaCl}_2$  y sales biliares) además de trazas de enzima. Se adicionó acetona a 0  $^{\circ}\text{C}$ , con un volumen 100 veces el volumen total de la reacción se dejó reposar por 2 horas y 30 minutos, con la finalidad de que sedimentara la LPC del medio. Una vez pasado el tiempo, se decantó y con esto se retiró la fase acuosa y los ácidos libres sintetizados de la reacción enzimática. Posteriormente se secó con  $\text{N}_2$ .

### **5.1.3 Determinación de ácidos grasos de los surfactantes y MCT**

La composición inicial de los ácidos grasos de los dos surfactantes PC y LPC, así como de MCT se determinó por cromatografía de gases. El tratamiento de las muestras para la formación de los ésteres de metilo de los ácidos grasos se efectuó de acuerdo con la metodología descrita por Cavazos (2013). La metilación de los

ácidos grasos esterificados de la molécula del glicerol se llevó a cabo con una solución de metóxido de sodio 0.5 M. La metilación de los ácidos grasos esterificados se llevó a cabo colocando alícuotas (100  $\mu$ L) de la muestra original (PC, LPC y MCT) en tubos de ensayo y se le adicionó 1 mL de metóxido de sodio (Supelco, Belefonte, PA), durante 5 min a temperatura ambiente. Las reacciones de derivatización se detuvieron con la adición de 100  $\mu$ L de agua y los ésteres metílicos formados se extrajeron con hexano (2 mL). A la fase orgánica tras una centrifugación, se adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar la presencia de agua, y posteriormente se inyectó 1  $\mu$ L de la muestra al cromatógrafo de gases. El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar HP Innowax de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y un espesor de película de 0.25  $\mu$ 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 se incrementó la temperatura a 2 °C/min hasta llegar a 230 °C, condición que se mantuvo durante 16 minutos. Las temperaturas 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.

#### **5.1.4 Formación de nanoemulsiones de $\alpha$ -Tocoferol**

##### **5.1.4.1 Preparación de las emulsiones gruesas**

La proporción de fase continua y fase dispersa fue de 95:5 (Cavazos, 2013; Ochoa, 2013; Chávez, 2015, Morais y Burgess, 2014). Se utilizaron dos proporciones para la fase dispersa:  $\alpha$ -Tocoferol 5% y 1% (w/w) además de la adicionando de MCT 0% y 4% (w/w). La fase continua contenía 5%, 10% (w/w) de surfactante, 50% y 25% (w/w) de glicerol y el resto w/w correspondió al agua (Tabla 7), los cuales fueron mezclados por agitación mecánica.

**TABLA 7. Variables para la obtención de nanoemulsiones de  $\alpha$ -Tocoferol**

Variables	Modificación	Tipo
$\alpha$ -Tocoferol	1% y 5%	Concentración w/w
Ácidos grasos de cadena media	0% y 4%	Concentración w/w
Glicerol	25% y 50%	Concentración w/w
Fosfolípidos	5 % y 10%	Concentración w/w
Surfactante	PC y LPC	Surfactante

Una vez que ambas fases se prepararon, la fase dispersa se añadió a la continua. Ya mezcladas se pre-emulsificaron con un homogenizador Ultraturrax T25 (IKA Works, Inc. Staufen, Alemania) por de 3 min a 20,000 rpm, para así obtener una emulsión gruesa.

#### 5.1.4.2 Homogenización por ultrasonificación

La emulsión gruesa se sometió a ultrasonificación para lograr una nanoemulsión con un Sonicador Branson Digital S-450D (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT). Las condiciones de operación fueron 90 watts (20% amplitud) y 50 % del ciclo de trabajo por 12 minutos (Cavazos Garduño 2013; Ochoa 2013; Chávez 2015). Por último, la nanoemulsión se enfrió a temperatura ambiente.

#### 5.1.4.3 Diseño experimental

Para el análisis experimental se realizaron dos diseños, uno por cada tipo de surfactante para evaluar las características de la nanoemulsiones (tamaño de partícula y potencial  $\zeta$ ), además de la estabilidad durante el tiempo de

almacenamiento (Tabla 8) con un diseño factorial de  $2^4$ . Los factores que se estudiaron fueron: concentración de AT, concentración de surfactante y concentración de triacilglicéridos de cadena media y glicerol con un total de 16 tratamientos. Las formulaciones se pueden observar en la Tabla 8.

**TABLA 8. Diseño factorial para la preparación de nanoemulsiones para cada uno de los surfactantes (Fosfatidilcolina y Lisofosfatidilcolina)**

Tratamientos	$\alpha$ -Tocoferol (g)	Glicerol (g)	Surfactante (g)	Triacilglicéridos de cadena media (g)
1	0.1	2.5	0.5	0.4
2	0.1	2.5	1	0.4
3	0.1	5	0.5	0.4
4	0.1	5	1	0.4
5	0.5	2.5	0.5	0
6	0.5	2.5	1	0
7	0.5	5	0.5	0
8	0.5	5	1	0
9	0.1	2.5	0.5	0
10	0.1	2.5	1	0
11	0.1	5	0.5	0
12	0.1	5	1	0
13	0.5	2.5	0.5	0.4
14	0.5	2.5	1	0.4
15	0.5	5	0.5	0.4
16	0.5	5	1	0.4

### 5.1.5 Caracterización de nanoemulsiones de $\alpha$ -Tocoferol

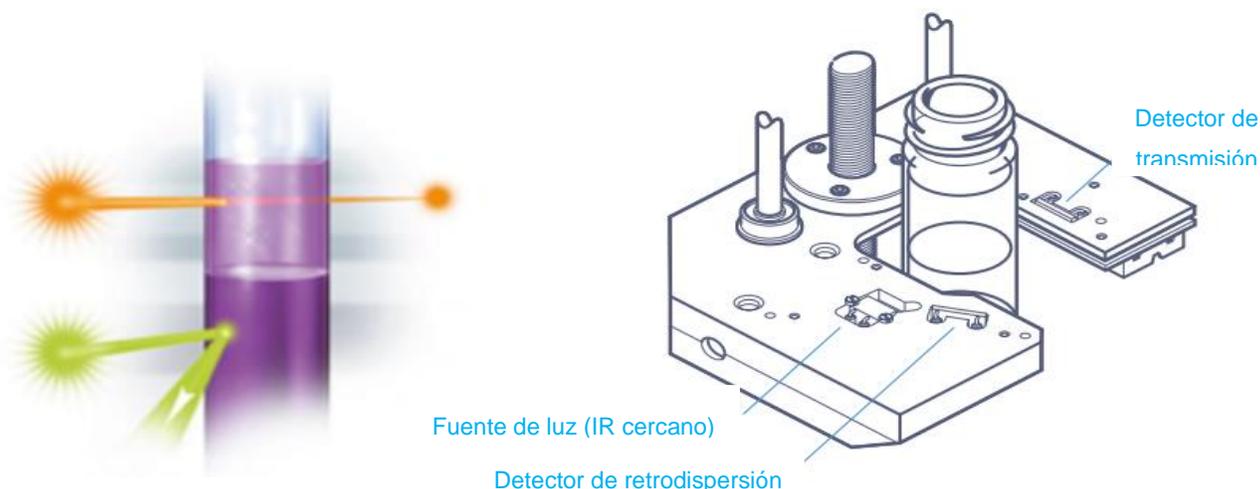
#### 5.1.5.1 Análisis del tamaño de partícula y potencial $\zeta$

Para determinar el potencial  $\zeta$  y el tamaño de partícula se utilizó el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.), el principio de trabajo del equipo se basa en

Dispersión de Luz Dinámica (DLS), que permite detectar el tamaño de partícula. El rango de detección de partícula es de 0.3 nm a 5  $\mu\text{m}$ . Y para determinar el potencial  $\zeta$  se utilizó la técnica Microelectroforesis laser-doppler (Acevedo, 2017). La preparación de la muestra de acuerdo con Ochoa y Acevedo (2013 y 2017) consistió en diluir con agua destilada desionizada, utilizando un factor de dilución 1:100 (nanoemulsión: agua), el analito se colocó en la celda Versa Flour Cuvette 170-2415 para la determinación de tamaño de partícula. Para la determinación del potencial  $\zeta$ . Las muestras se diluyeron usando un factor de 1:100 (nanoemulsión: agua), y se colocó en la celda electroforética del Zetasizer (Nano-ZS90). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente con un ángulo de dispersión de 90° inmediatamente después de su preparación (T0) y sucesivamente después de cada semana hasta la semana ocho.

#### **5.1.5.2 Evaluación de la estabilidad de almacenamiento**

La estabilidad de las nanoemulsiones, fueron evaluadas a una temperatura de almacenamiento de 4 °C para todos los tratamientos, los mejores tratamientos fueron evaluados a 25 °C por 8 semanas; utilizando el equipo Turbiscan Lab® Expert (Formulation, 2016). El principio de medición se basa en la dispersión múltiple de la luz estática con muestras (Acevedo, 2017). Las muestras fueron depositadas en una celda cilíndrica de vidrio y se analizaron por la incidencia de un haz de luz a una longitud de onda de 880 nm que escanea la muestra de arriba abajo. Para el análisis de las muestras el equipo cuenta con un detector de transmitancia que mide la cantidad de luz que pasa a través de la muestra y el detector de retrodispersión que mide la luz reflejada por la muestra (Figura 18). El análisis de estabilidad se lleva a cabo como una variación de los perfiles de retrodispersión y transmitancia que permiten detectar cambios en el tamaño de partícula y la presencia de fenómenos de inestabilidad como agregación de partículas y sedimentación entre otros (Formulation, 2016).



**FIGURA 18. Incidencia de luz en la muestra y representación esquemática de las partes del Turbiscan (Formulation, 2016)**

### 5.1.5.3 Cuantificación de $\alpha$ -Tocoferol

#### 5.1.5.3.A Porcentaje de encapsulamiento

El porcentaje de encapsulamiento se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Mehood (2010) en la cual se utilizaron filtros centrífugos de 50 kDa (celulosa regenerada) y se adicionó un volumen de 3 mL de nanoemulsión, posteriormente se centrifugaron a 5000g por 40 min y se tomaron 50  $\mu$ L del permeado y disolvieron en 950  $\mu$ L de isopropanol. Las muestras se filtraron usando un filtro de tipo PVDF (0.45  $\mu$ m), se pasaron por una fase móvil de: isopropanol:metanol:THF (47.6:47.6:4.8) con 1% de ácido fosfóricos (10% v/v), y un flujo de 1 mL/min. La concentración de AT se determinó por HPLC (Waters 2487; USA), con una columna C18 fase reversa (150-4.6 mm) y el detector de UV-visible a 295 nm.

### **5.1.5.3.B Determinación de concentración**

Para determinar la concentración total de AT encapsulado en las nanoemulsiones en función del tiempo, del estrés térmico y de una posible degradación química, se realizó a partir de Morais y Burgess (2014). Las muestras de nanoemulsiones se mantuvieron a 4 y 25 °C y se analizaron en los siguientes tiempos: 1, 7, 14, 21, 35, 42, 49, 53 y 60 días. Se disolvieron 50 µL de nanoemulsión en 1 mL de isopropanol para determinar el contenido total de AT en cada uno de los sistemas nanoemulsionados. Las muestras se filtraron usando un filtro de tipo PVDF (0.45 µm), se pasaron por una fase móvil de: isopropanol:metanol:THF (47.6:47.6:4.8) con 1% de ácido fosfórico (10% v/v), y un flujo de 1 mL/min. Se determinó la concentración de AT por HPLC (Waters 2487; USA), con una columna C18 fase reversa (150-4.6 mm) y un detector de luz UV a 295 nm.

### **5.1.5.4 Sistema de liberación *in vitro***

Se evaluó el comportamiento y eficiencia de las nanoemulsiones (Bioaccesibilidad) elaboradas (T4, T11 y T12), sometidas a un sistema de digestión *in vitro* el cual asemeja mas no sustituye un sistema vivo.

#### **5.1.5.4.A Simulación del sistema de digestión *in vitro***

Se evaluó la efectividad de la liberación del AT acarreado por los sistemas nanoemulsionados en un sistema *in vitro* con la finalidad de observar la capacidad de protección del AT, así como la concentración máxima que puede llegar al sitio diana. Este proceso inicia en la boca, pasa por el estómago y finalmente llega al intestino delgado donde se lleva a cabo la absorción del compuesto (Failla, 2008; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Versantvoort *et al.*, 2004; Yang, 2015).

### 5.1.5.4.B Descripción de las etapas del sistema de digestión *in vitro*

De acuerdo con diferentes autores (Failla, 2008; Versantvoort *et al.*, 2004; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Yang, 2015) las condiciones para evaluar los sistemas nanoemulsionados en el sistema de digestión *in vitro* se describen en la Tabla 9.

**TABLA 9. Condiciones del sistema de digestión *in vitro***

Boca	Estómago	Intestino
5 mL de fluido salivar (composición): 1.594 g/L NaCl 0.328 g/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0.636 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.202 g/L KCl 0.308 g/L K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O 0.021 g/L C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Na 0.198 g/L H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> (Urea) 0.146 g/L C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Na 3 % wt Mucina 5 mL Nanoemulsión  Incubar a 37 °C, pH 6.8 por 10 min a 100 rpm	Preparación de jugos gástricos: 2 g NaCl 3.2 g/L Pepsina 7 mL de HCl (37%) en un litro y se ajusta a pH 1.2 con HCl  Combinación del fluido salivar y fluido gástrico 50:50 pH 2.5 (Ajuste NaOH 1 M) Incubando a 37°C por 2 h a 100 rpm	Se incubo muestra (30 mL) a 37 °C a pH 7 (ajuste NaOH)  Se adicionaron: 4 mL Extracto biliar (46.87 mg/mL) 1 mL Cloruro de Calcio (110 mg/mL).Se disolvieron en buffer fosfato. 2.5 mL Lipasa (24 mg/mL) disuelta en buffer fostato. El cambio de pH se controló con 0.25 M de NaOH (pH 7)  Incubar por 2 h a 37 °C y 100 rpm

Fase de la boca. - Se simuló el fluido de la saliva (SSF), adicionando mucina y varias sales. Se tomó una alícuota de 5 mL de nanoemulsión de AT, mezclándola con SSF

para obtener una mezcla de 2% (w/w) aceite. El pH se ajustó a 6.8 y se incubó a 37 °C por 10 min con agitación continua (100 rpm).

Fase gástrica. - Se adiciono una solución que simuló las condiciones de un fluido gástrico (SGF), se disolvieron 2 g de NaCl y 7 mL de HCl (37%) en 1 L de agua y se ajustó el pH a 1.2 usando HCl 1 M. El bolo obtenido en la simulación de la boca se mezcló con SGF en una proporción 50:50 volumen y la mezcla final contenía 1% (w/w) aceite. El pH se ajustó a 2.5 usando NaOH 1 M e incubado a 37 °C por dos horas con agitación continua (100 rpm).

Fase del intestino delgado. - Se tomó una alícuota de 30 mL de la muestra a temperatura constante (37 °C), el pH se ajustó a 7 usando NaOH, después se le adicionaron 4 mL de bilis (46.87 mg/mL) y 1 mL de cloruro de calcio (110 mg/mL), disueltos en una solución tampón de fosfatos que se añadieron a la muestra ajustando el pH a 7 de ser necesario. Posteriormente se adicionó 2.5 mL de lipasa (24 mg/mL) disuelto en un tampón de fosfato para incorporarlo a la mezcla. El pH de la mezcla se controló con la adición de NAOH 0.25 M (mL) necesario para neutralizar los ácidos grasos libres (AGL) liberados de la digestión de lípidos (mantener pH 7) por 2 h. El porcentaje de AGL que se forman después de la digestión lipídica se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%AGL = 100 * \left( \frac{V_{NaOH} * M_{NaOH} * P_{MLípidos}}{2 * W_{Lípidos}} \right) \quad \text{Ec. (4)}$$

#### 5.1.5.4.C Microscopía confocal de barrido láser (MCBL)

Para evaluar el tamaño y los cambios microestructurales que ocurren en las distintas fases del modelo gastrointestinal, las nanoemulsiones fueron observadas mediante Microscopía confocal de acuerdo con Trujillo (2013). Para poder observar la fluorescencia de las emulsiones, primero se tiñó la PC con rojo Nilo (50 µg/g de PC), posteriormente 1 µL fue colocado en portaobjetos y observadas bajo el Microscopio Confocal-Multifotónico LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Alemania) con un objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil y excitadas a una longitud de onda de 553 nm, las imágenes fueron capturadas mediante el software de adquisición de imágenes ZEN

2010 (Carl Zeiss, Alemania). Se adquirieron un total de 6 campos en formato \*.RGB y guardados como imagen \*. Tiff a 512x512 píxeles.

#### 5.1.5.4.D Determinación de la bioaccesibilidad de $\alpha$ -Tocoferol

Con base a la metodología de Yang (2015) se determinó la bioaccesibilidad. Se obtuvo una muestra de 10 mL del sistema de digestión *in vitro* y se centrifugó a 4000 rpm por 40 min a 25°C. Se extrajeron 5 mL de muestra de la fase media del centrifugado.

Después de la centrifugación las muestras se separaron en diferentes fases, una de ellas es sedimento ópticamente opaco en la parte inferior, la fase intermedia es acuosa y relativamente clara. En algunas ocasiones contó con una fase aceitosa en la fase superior. En la fase media se encontró el AT que se extrajo usando una solución orgánica de isopropanol y se centrifugó a 1750 rpm por 10 minutos. De la capa superior se separó 1 mL y se secó usando nitrógeno y se almacenó a -40° C para posteriores análisis.

Para la detección del contenido de AT se empleó un HPLC Waters, con una columna C18 fase reversa (150-4.6 mm) y un detector de luz UV a 295 nm. La bioaccesibilidad de AT se estimó con la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{C_{micela}}{C_{total}} \times 100\% \quad \text{Ec. (5)}$$

En donde  $C_{micela}$  y  $C_{Total}$  representan el total de concentración de AT en la fase micelar y en el sistema general después de la digestión.

#### 5.1.6 Análisis estadístico

Los experimentos desarrollados se realizaron por duplicado. Los datos se presentan como promedios  $\pm$  desviación estándar. Todos los datos fueron tratados con análisis

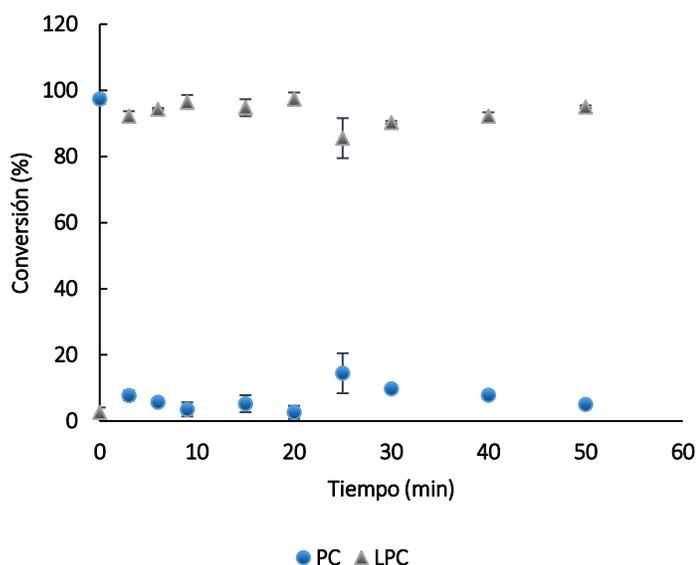
de varianza de una vía (one-way ANOVA) con el software MiniTab 17.1 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania). Las diferencias entre los valores promedio fueron evaluadas utilizando la prueba Tukey de rangos múltiples, el nivel de significancia se definió como  $p \leq 0.05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Síntesis de Lisofosfatilcolina por vía enzimática

#### 6.1.1 Determinación del rendimiento de Lisofosfatidilcolina por HPLC

La cinética de hidrólisis enzimática para la conversión de Fosfatidilcolina Avanti (PC Ava) a Lisofosfatidilcolina (LPC) se muestra en la Figura 19.



**FIGURA 19. Cinética de hidrólisis enzimática de Fosfatidilcolina Avanti (PC Ava). Conversión de PC Ava a Lisofosfatidilcolina (LPC) a 50 °C durante 90 minutos**

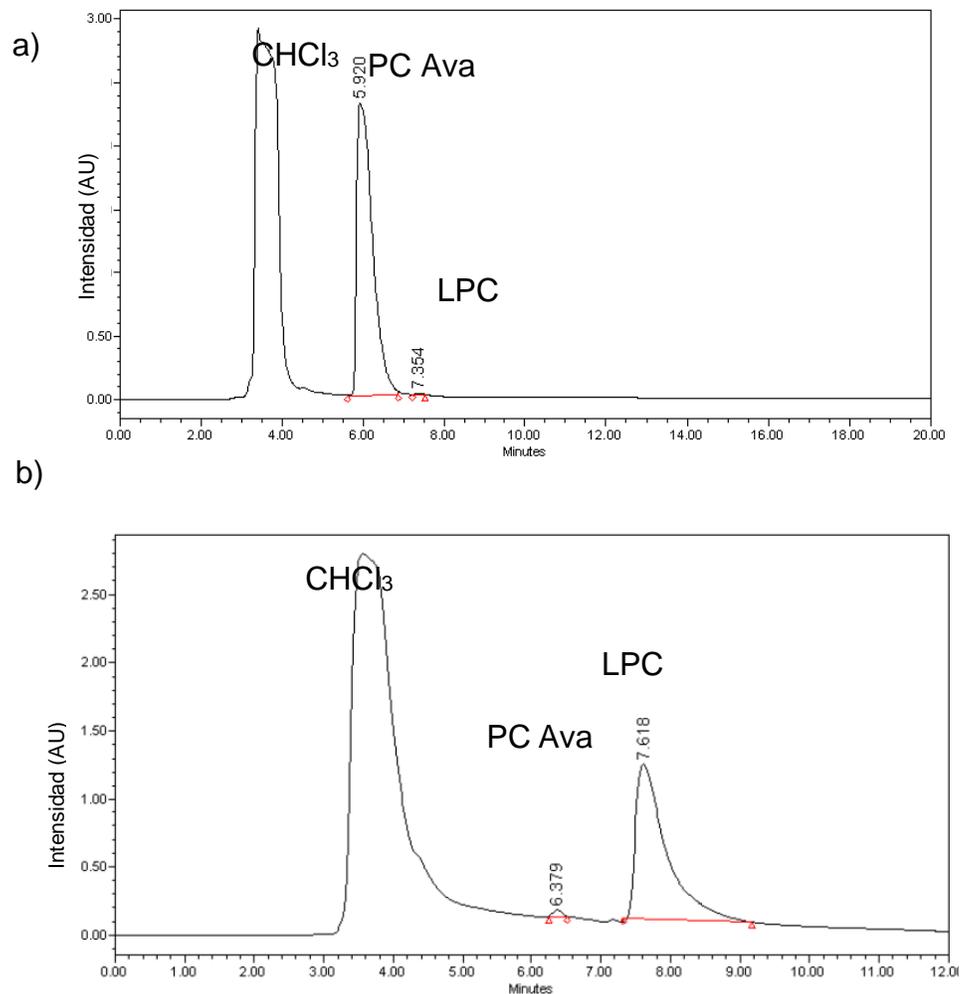
En el minuto 3 existe ya una conversión de PC Ava a LPC del 92%, obteniéndose la máxima conversión en el minuto 20 (97.36%). Al término de la reacción enzimática (50 min) no hubo ningún cambio estadísticamente significativo (LPC 95%). Este resultado, al compararlo con el reportado por Casado *et al.*, (2013),

donde se usó el mismo sistema, modificando únicamente la pureza del sustrato y el uso de diferente enzima (fosfolipasa PLA<sub>2</sub>), fue el mismo porcentaje de conversión (95%), pero en un tiempo de reacción mayor (90 min). Es posible que la disminución del tiempo de reacción en este trabajo se deba a una mayor pureza de PC (98%) con respecto al 90% de pureza en el trabajo de Casado *et al.* (2013), y la utilización de PLA<sub>1</sub> y no PLA<sub>2</sub>. Se puede asumir que la PLA<sub>1</sub> tuvo mayor estabilidad térmica en la reacción, contrario a lo reportado por Zinjarde (2010).

Comparándolo con otros trabajos, se describe que el sistema de reacción evaluado por Acevedo (2017), en el cual utilizó PC para la obtención de LPC usando un medio orgánico (hexano) de reacción con la aplicación de la enzima PLA<sub>1</sub>, logró una conversión máxima de 94% de LPC en 120 min. Esto se puede asumir debido a que en un inicio la cantidad de agua para realizar la reacción fue limitada, por lo tanto, propició un mayor tiempo para iniciar la reacción hidrolítica (Vikbjerg, 2006).

Baeza-Jimenez *et al.*, (2013) lograron una conversión máxima de PC a LPC del 70% en un periodo de 48 h en un medio orgánico de etanol; esto se puede atribuir a que la enzima se encontraba inmovilizada, lo cual dificultaba la interacción del sustrato con la enzima, además de que el etanol podría comportarse como un agente limitante del sistema (Baeza-Jimenez *et al.*, 2013).

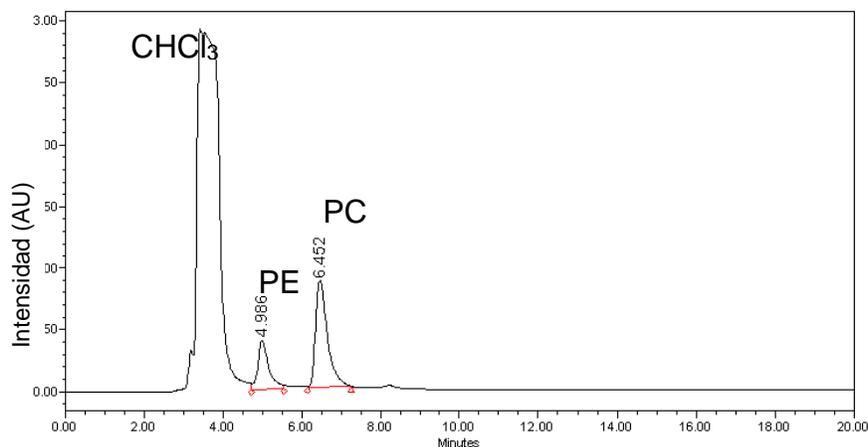
Por otra parte, en los cromatogramas obtenidos de la reacción enzimática (Figura 20) se observa que en el tiempo 0 se tiene un 99.83% de PC Avanti y solo un 0.17% de LPC; al cabo de 20 minutos de reacción hidrolítica se observa que la LPC representó el 97.36%.



**FIGURA 20. Cromatogramas de conversión de Fosfatidilcolina Avanti (PC Avanti) a Lisofosfatidilcolina (LPC) y fase móvil de Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>); a) Tiempo 0; 99.83% de PC y 0.17% de LPC y b) Tiempo 20 minutos; 2.64% y 97.36% de LPC**

Por lo tanto, se obtuvo 2-acyl-LPC ya que la reacción hidrolítica de la PLA<sub>1</sub> se llevó a cabo en la posición sn-1 de la PC Avanti (Baeza-Jiménez *et al.*, 2013; Casado *et al.*, 2013).

Para la elaboración de emulsiones se utilizó la PC que se observa en la Figura 21, la cual es una mezcla PC:PE (Fosfatidiletalonamina) (70:30).



**FIGURA 21. Cromatograma de Fosfatidiletanolamina (PE) y Fosfatidilcolina (PC) y fase móvil de Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>)**

### 6.1.2 Determinación de ácidos grasos de los surfactantes y MCT

En la Tabla 10 se describe la composición de cada uno de los surfactantes (PC Avanti, LPC, PC) y de MCT. De acuerdo a Ochoa (2013) y Cavazos (2013); la PC Avanti tiene en mayor proporción ácidos grasos insaturados, C18:2 (ácido linoleico), cabe destacar que al obtener LPC el porcentaje de C18:2 incrementó 70.33% a 77.69% y a su vez el de C16:0 (ácido palmítico) disminuyó 7.94% a 1.69%, se debe a que la enzima PLA<sub>1</sub> hidroliza en la posición sn-1, lo cual indica que la mayor concentración de ácido palmítico se encuentra en la misma posición, el cual es hidrolizado de la molécula de PC. La PC tiene en mayor proporción dos ácidos grasos: oleico (C18:1) y linoleico (C18:2), contrastando la PC Avanti, atribuido mayormente a la fuente de origen. Los MCT contienen en mayor concentración C12:0 (ácido láurico) concordando con lo ya reportado en la literatura (Bezard *et al.*, 1971; Bhatnagar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Por lo tanto, ya descrita la composición de cada uno de ellos se procedió a evaluarlos en sistemas nanoemulsionados.

**TABLA 10. Composición de ácidos grasos en % molar de Fosfatidilcolina Avanti (PC Ava), Lisofosfatidilcolina (LPC), Fosfatidilcolina (PC) y triacilglicéridos de cadena media (MCT)**

Compuesto		PC Ava	LPC	PC	MCT
Ac. Graso	Nombre	Porcentaje %	Porcentaje %	Porcentaje %	Porcentaje %
C6:0	Ácido Caproico	0	0	0	2.98
C8:0	Ácido Caprílico	0	0	0	8.55
C10:0	Ácido Caprílico	0	0	0	6.21
C12:0	Ácido Láurico	0	0	0	51.47
C14:0	Ácido Mirístico	0	0	0	18.93
C16:0	Ácido Palmítico	7.94	1.69	19.50	5.20
C18:0	Ácido Estearico	2.35	0.11	10.62	1.83
C18:1	Ácido Oleico	14.04	15.18	38.31	4.84
C18:2	Ácido Linoleico	70.33	77.69	28.94	0
C18:3	Ácido $\alpha$ -Linolénico	5.33	5.33	2.63	0
Total		100.00	100.00	100.00	100.00

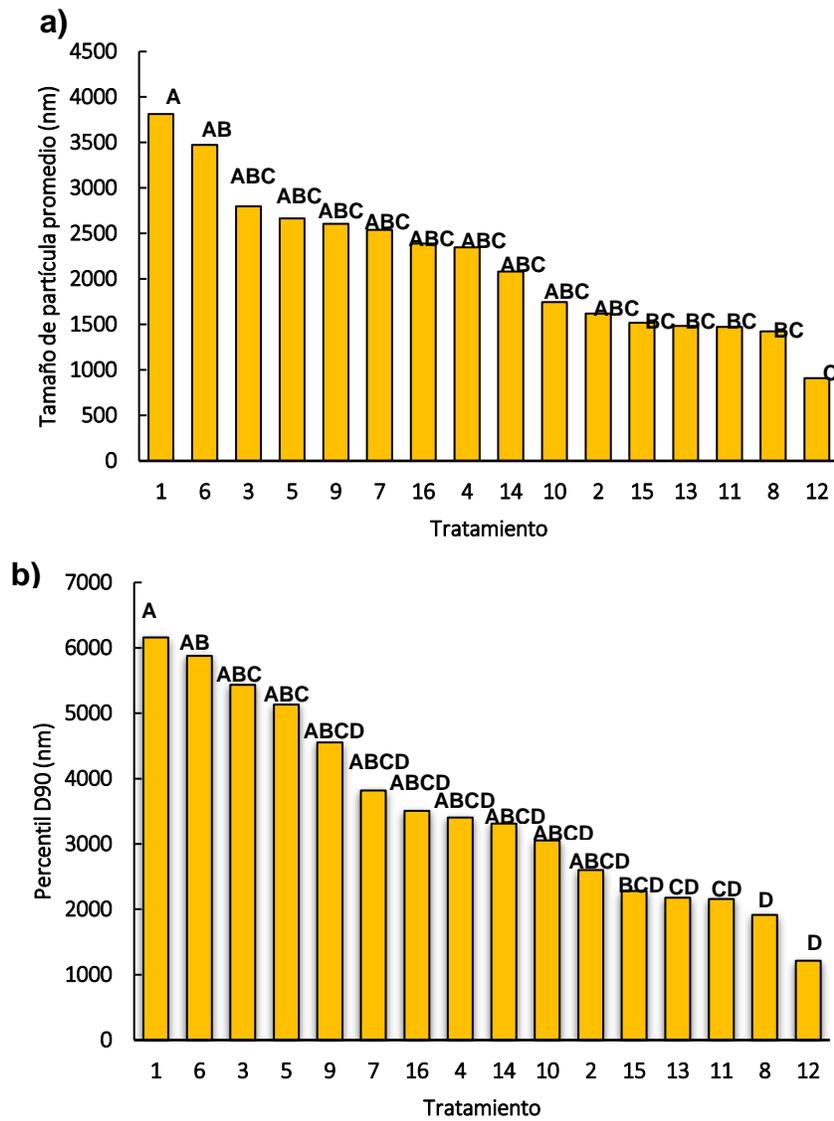
## 6.2 Formación y caracterización de nanoemulsiones de $\alpha$ -Tocoferol

En el presente trabajo, se evaluaron dos tipos de surfactantes para la elaboración de nanoemulsiones, LPC y PC. Se obtuvieron 16 tratamientos con diferentes concentraciones, que previamente se elaboraron a partir de una pre-emulsificación (20,000 rpm por 3 minutos) y posteriormente se sometieron a 12 ciclos: un 1 minuto de sonicación y un minuto de reposo, la amplitud empleada del sonicador fue de 20% (90 Watts).

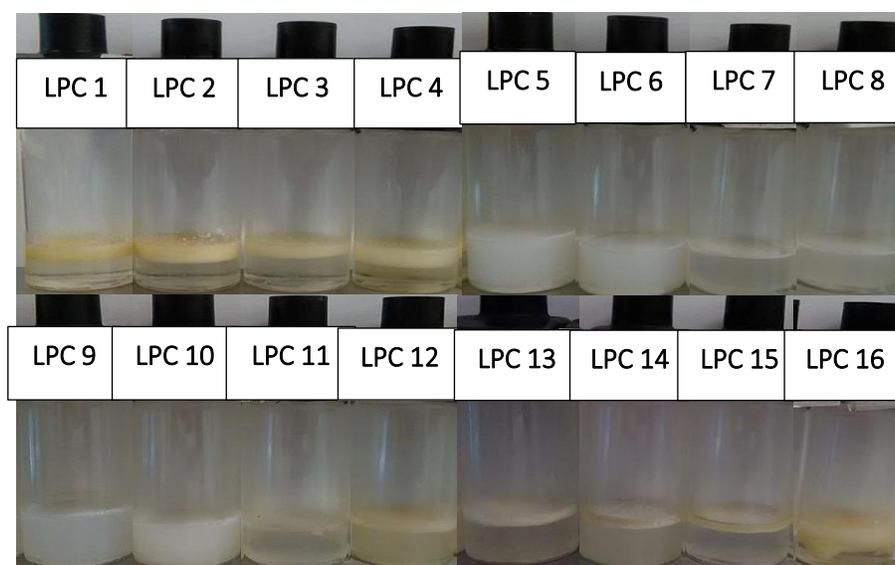
### 6.2.1 Formación de nanoemulsiones de Lisofosfatidilcolina

Las nanoemulsiones elaboradas con LPC no coincidieron con lo reportado por Chávez (2015); donde obtuvo tamaños de partícula de 86.44 nm en la

encapsulación de ácido betulínico, además de ser estables por 12 semanas. Pero si se obtuvo similitud con lo reportado por Acevedo (2017) donde tampoco obtuvo resultados adecuados con este surfactante, ya que al pasar 12 días el tamaño de partícula fue 28.29 veces mayor al tamaño inicial (67.9 nm). Se observa en la Figura 22 que los tamaños promedio de partícula superan los 500 nm, acelerando así los procesos de agregación (McClements, 2011). Esto se corrobora con la distribución de tamaño (Percentil D90) el cual indica el valor que está por debajo del 90% (Percentil D90) de la distribución, por lo tanto, el sistema que tiene una distribución más corta, supera los 1000 nm de tamaño promedio de partícula en su distribución (Percentil D90). Con esto se puede descartar que estos sistemas sean adecuados y cumplan con la descripción de una nanoemulsión (rango de 50 a 500 nm) (McClements, 2011). Esto se podría deber a las características de las moléculas que interaccionan entre sí, ya que si la fase oleosa cuenta en su estructura con una gran cantidad de insaturaciones, así como el surfactante, debería dar como resultado una nanoemulsión estable (Acevedo, 2017). Sin embargo, esto no sucede en este sistema, debido a que el  $\alpha$ -Tocoferol (AT), en su cadena hidrocarbonada no cuenta con insaturaciones a diferencia de la LPC que sí las tiene, propiciando así sistemas inestables (Figura 23).



**FIGURA 22. a) Distribución de tamaños promedio de partícula, obtenidos para cada uno de los 16 tratamientos sometidos por sonicación; b) Distribución de tamaño (PercentilD90) de cada uno de los 16 tratamientos**



**FIGURA 23. Tratamientos de emulsiones elaboradas con Lisofosfatidilcolina (LPC) con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8**

Como se observa en la Figura 23, los sistemas fueron inestables a las pocas horas de haberse elaborado (1 a 2 h), mostraron sedimentación inversa y una separación de fases, concluyendo declinar su uso para estudios posteriores.

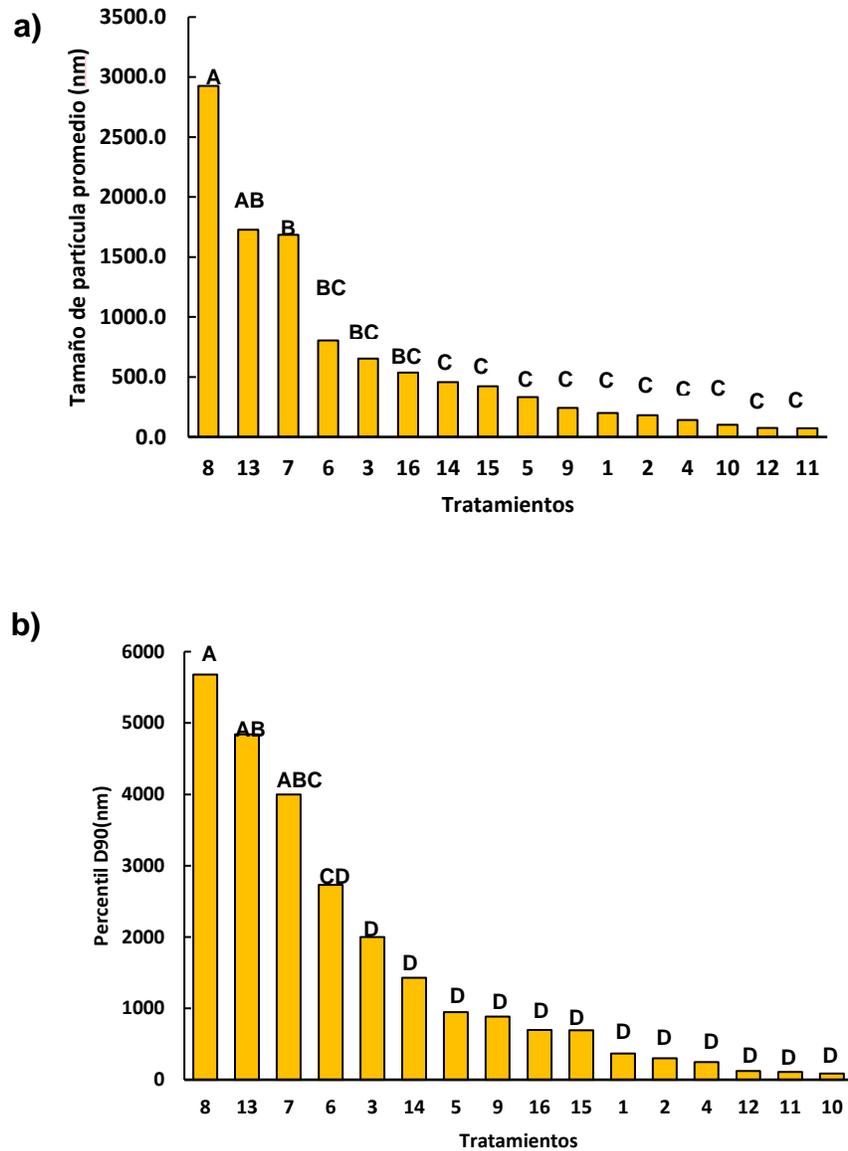
### 6.2.2 Formación de nanoemulsiones con Fosfatidilcolina

La formación de las nanoemulsiones con PC se obtuvieron al someterlas a un proceso de ondas acústicas por 12 min, el tamaño de partícula y la dispersión (Percentil D90) se vieron afectados por las diferentes composiciones con las que fueron elaboradas. A las muestras se les realizó un análisis de one-way ANOVA para determinar la diferencia significativa (Tukey), en el cual se encontró que el tratamiento T8 fue significativamente diferente a los demás tratamientos. Pero estadísticamente iguales desde el tratamiento T6 hasta el T11 (Tabla 11). Se puede observar mediante las Figuras 24a y 24b la distribución de tamaño de partícula y el percentil del mismo. Los que representaron mayor tamaño de partícula y distribución tenían en común una mayor concentración de AT (5%), lo cual dificultó la homogenización del mismo debido a su alta viscosidad (305 mPa·s) (Hategekimana *et al.*, 2015), limitando la obtención de partículas con un diámetro pequeño en el

proceso de homogenización (Ozturk *et al.*, 2014; Hategekimana *et al.*, 2015; Saberi *et al.*, 2013; Hatanaka *et al.*, 2010); a pesar de que los tratamientos T13, T14, T15 y T16 (Figura 24a) cuentan con MCT, que tiende a disminuir la viscosidad de la fase oleosa al mezclarse con el AT (Hategekimana *et al.*, 2015; Ozturk *et al.*, 2014). Además, se obtiene una mejor homogenización del sistema y como consecuencia tamaños de partículas menores. Esto no se logró debido a la alta concentración de AT y a la diferencia de densidades con respecto a la fase continua (Mehmood, 2015) que propicia fenómenos de inestabilidad tales como: sedimentación inversa, maduración de Ostwald y coalescencia.

**TABLA 11. Tamaños de partícula promedio de las nanoemulsiones**

Tratamiento	Tamaño de Partícula
8	2927.3 <sup>A</sup>
13	1728.3 <sup>B</sup>
7	1685.5 <sup>B</sup>
6	804.3 <sup>BC</sup>
3	654.5 <sup>BC</sup>
16	537.5 <sup>BC</sup>
14	456.5 <sup>C</sup>
15	423.4 <sup>C</sup>
5	332.1 <sup>C</sup>
9	242.7 <sup>C</sup>
1	199.3 <sup>C</sup>
2	180.1 <sup>C</sup>
4	142.5 <sup>C</sup>
10	101.3 <sup>C</sup>
12	74.7 <sup>C</sup>
11	71.8 <sup>C</sup>



**FIGURA 24. Tamaños de partícula promedio obtenidos para cada uno de los 16 tratamientos; b) Distribución de tamaño (PercentilD90) de cada uno de los 16 tratamientos**

Por lo tanto descrito lo anterior y representado en la Figura 24 a y b; los mejores tratamientos obtenidos después de ser sometidos a ondas ultrasónicas, debido a su tamaño de partícula y dispersión de tamaño fueron: los tratamientos T4 (142.5 nm), T10 (101.3 nm), T11 (71.8 nm) y T 12 (74.7 nm).

### 6.2.3 Efecto de los componentes

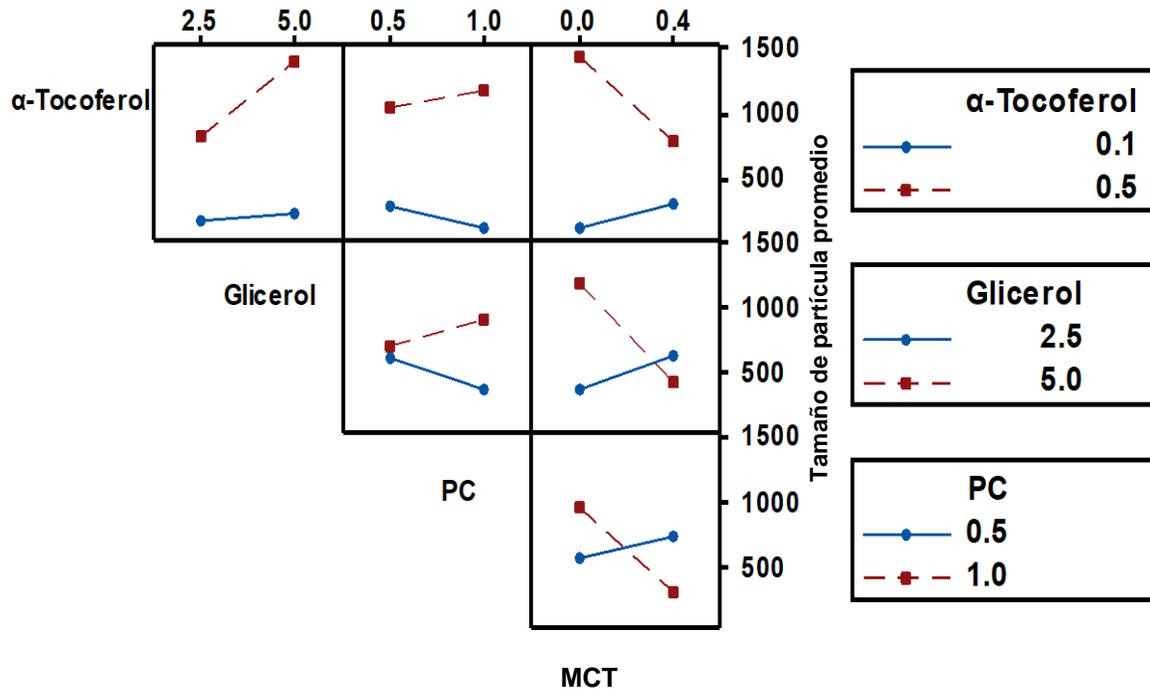
De manera general se pudo observar que los tratamientos con una concentración mayor de PC (10%) T12, T10 y T4, dio como resultado la obtención de los menores tamaños de partícula (74.7 nm, 101 nm, 142.5 nm), excepto en el tratamiento T11 (71.8 nm), que solo tenía el 5% de PC (Figura 24 a,b). Este tratamiento pudo verse favorecido por la concentración de glicerol para la obtención de un menor tamaño de partícula (McClements, 2011), lo cual se discutirá más adelante.

El tener una mayor concentración de PC contribuye a una absorción rápida del mismo en la superficie de las partículas oleosas durante la homogenización (Ozturk *et al.*, 2014; Saberi *et al.*, 2013; Mehmood, 2015; Cavazos, 2013) ya que esto induce a una disminución en la tensión superficial; confiriéndole así una mayor capacidad de encapsulación (Ozturk *et al.*, 2014). El incrementar la concentración de PC tendrá un efecto en las fuerzas gravitacionales, las cuales son comparables con el efecto del movimiento browniano debido a los tamaños de partícula pequeños y con esto inhibir los fenómenos de inestabilidad (Ozturk *et al.*, 2014).

Por otra parte, las nanoemulsiones que contenían concentraciones del 1% de AT y 10% de PC, tendieron a obtener los menores tamaños de partícula (Tratamiento 12, 10 y 4), contrario a lo que sucedió con el tratamiento T11, el cual contenía una menor cantidad de PC (5%). Esto debido a que en teoría, concentraciones altas de glicerol propician una menor cantidad de surfactante, ya que modifica la tensión interfacial (disminuye) entre la fase dispersa y acuosa, además de mejorar la curvatura interfacial (Yang *et al.*, 2012; Saberi *et al.*, 2013). Por lo tanto, el factor más importante para desestabilizar estas nanoemulsiones y obtener tamaños de partículas grandes (>500 nm) es la concentración alta de AT.

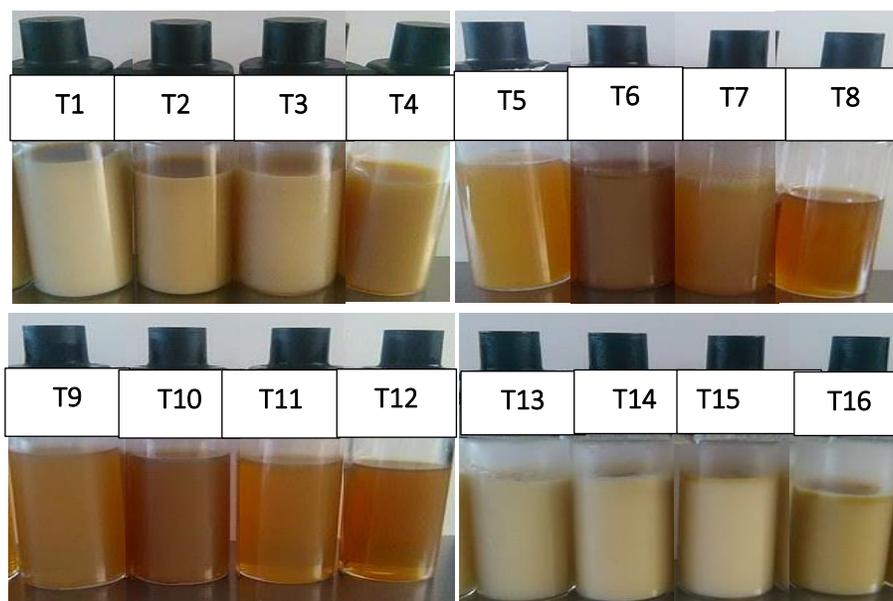
Otra manera de ver el efecto de cada uno de los compuestos y cómo son las interacciones entre ellos se muestra en la Figura 25, donde se observa que altas concentraciones de AT tienden a incrementar el tamaño de partícula, excepto cuando éste interacciona con los MCT. Esto se debe a que ayuda a bajar la viscosidad del compuesto bioactivo, lo cual se refleja en una mejor homogenización y disminución en el tamaño de partícula. También se observa que las altas

concentraciones de glicerol son factor importante para la disminución del tamaño de partícula, como anteriormente se ha mencionado (Yang *et al.*, 2012).



**FIGURA 25. Interacción múltiple de las variables (α-Tocoferol, Glicerol, Fosfatidilcolina (PC) y triacilglicéridos de cadena media (MCT)) con respecto al tamaño de partícula promedio**

En la Figura 26 se muestra el estado macroscópico de las emulsiones. Aquí se puede observar de manera visual los diferentes comportamientos físicos propiciados por las composiciones evaluadas, las cuales tienen relación directa a lo ya descrito en las secciones anteriores.



**FIGURA 26. Tratamientos de nanoemulsiones elaboradas con Fosfatidilcolina con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8**

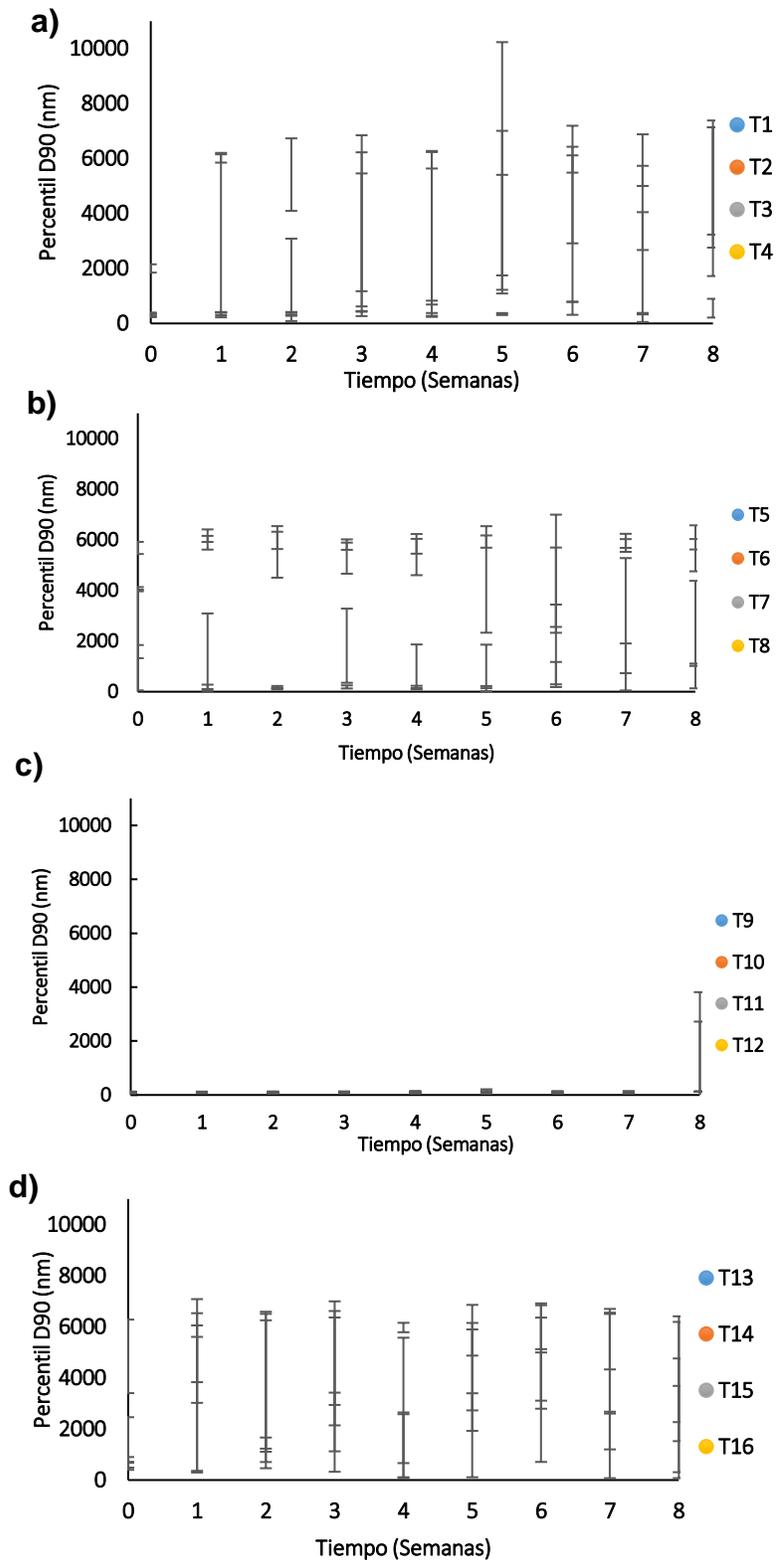
#### **6.2.4 Determinación de la estabilidad en el tamaño de partícula durante el almacenamiento por medio de dispersión de luz dinámica**

La evaluación de la estabilidad de las emulsiones almacenadas se realizó durante dos meses (60 días), utilizando una temperatura de almacenamiento de 4 °C. Para medir el tamaño de partícula durante cada semana se utilizó el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.). Las emulsiones elaboradas con AT tuvieron diferentes comportamientos en cada uno de los sistemas debido a las composiciones con las que fueron elaboradas. En la Figura 27a, la composición T4 destaca debido a su distribución de tamaño de partícula (250-550 nm), ya que tiende a ser estable con respecto al tiempo. Esto se debe, principalmente, al equilibrio entre las densidades de la fase dispersa y fase continua, así como de sus viscosidades (Yang *et al.*, 2012; Saberi *et al.*, 2013), evitando fenómenos de inestabilidad como floculación, coalescencia y sedimentación inversa (McClements y Rao, 2011).

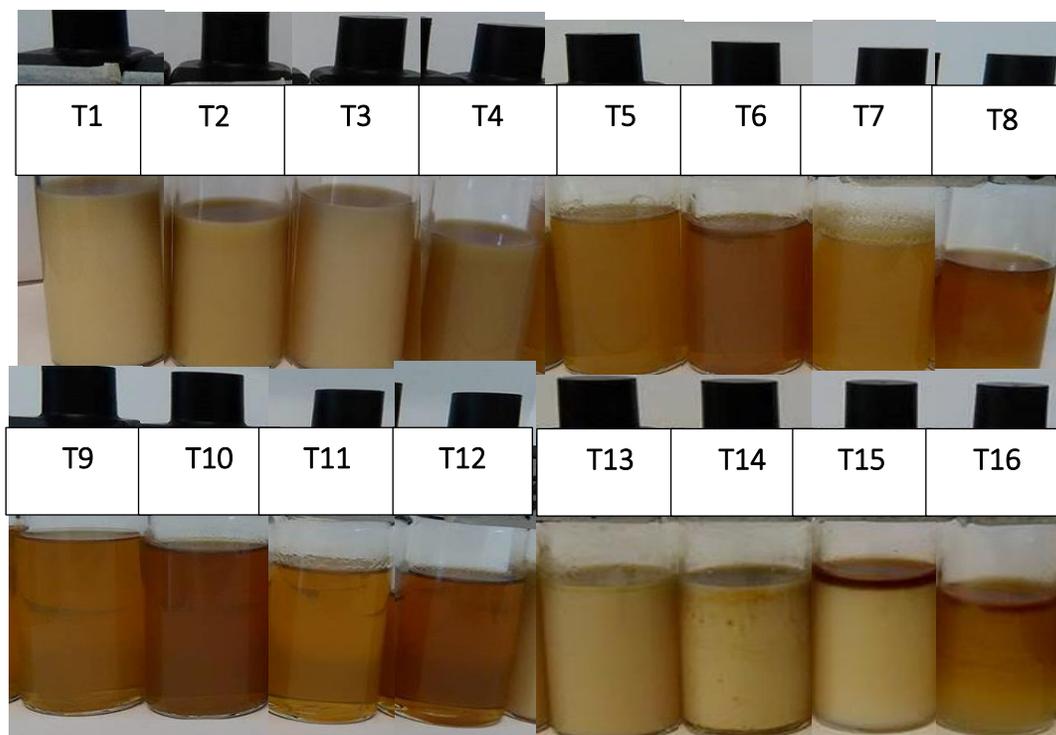
En la Figura 27b, se puede observar que ninguno de los sistemas tuvo distribuciones inferiores a los 500 nm, por lo tanto, los niveles altos de AT repercutieron en una mala homogenización y la formación de sistemas inestables (Ozturk *et al.*, 2014; Hategekimana *et al.*, 2015; Saberi *et al.*, 2013; Hatanaka *et al.*, 2010).

En la Figura 27c, se muestra que los sistemas tuvieron un comportamiento prácticamente lineal, a excepción de los tratamientos T9 y T10. Esto se puede relacionar con una menor cantidad de glicerol la cual contribuye a una mayor movilidad de las partículas dando como resultados fenómenos de agregación (McClements, 2011; Saberi *et al.*, 2013), a partir de la semana 8. Es importante mencionar que los sistemas tienen la menor concentración (0.1 g) de AT, por lo tanto, esta variable no fue un factor para su inestabilidad.

En la última Figura 27d, se observa que ningún sistema fue estable, y esto se relaciona directamente con las altas concentraciones de AT, a pesar de la adición de MCT, los cuales tienen la capacidad de disminuir la viscosidad del mismo. Aun así, no fue suficiente para la obtención de sistemas estables y, por lo tanto, las distribuciones de tamaño fueron superiores a 500 nm (Hategekimana *et al.*, 2015; Ozturk *et al.*, 2014). Esto se observa macroscópicamente en la Figura 28, ya que, en los casos con concentraciones altas de AT, quedaron evidenciados los tratamientos deficientes. Concluyendo que los mejores tratamientos para evaluar en las siguientes etapas fueron T4, T11 y T12.



**FIGURA 27. Distribución de tamaños de partícula (Percentil D90) de las nanoemulsiones en almacenamiento por 8 semanas. a) Tratamientos con MCT y 0.1 g de AT, b) Tratamientos sin MCT y 0.5 g de AT, c) Tratamientos sin MCT y 0.1 g de AT, d) Tratamientos con MCT y 0.5 g de AT**



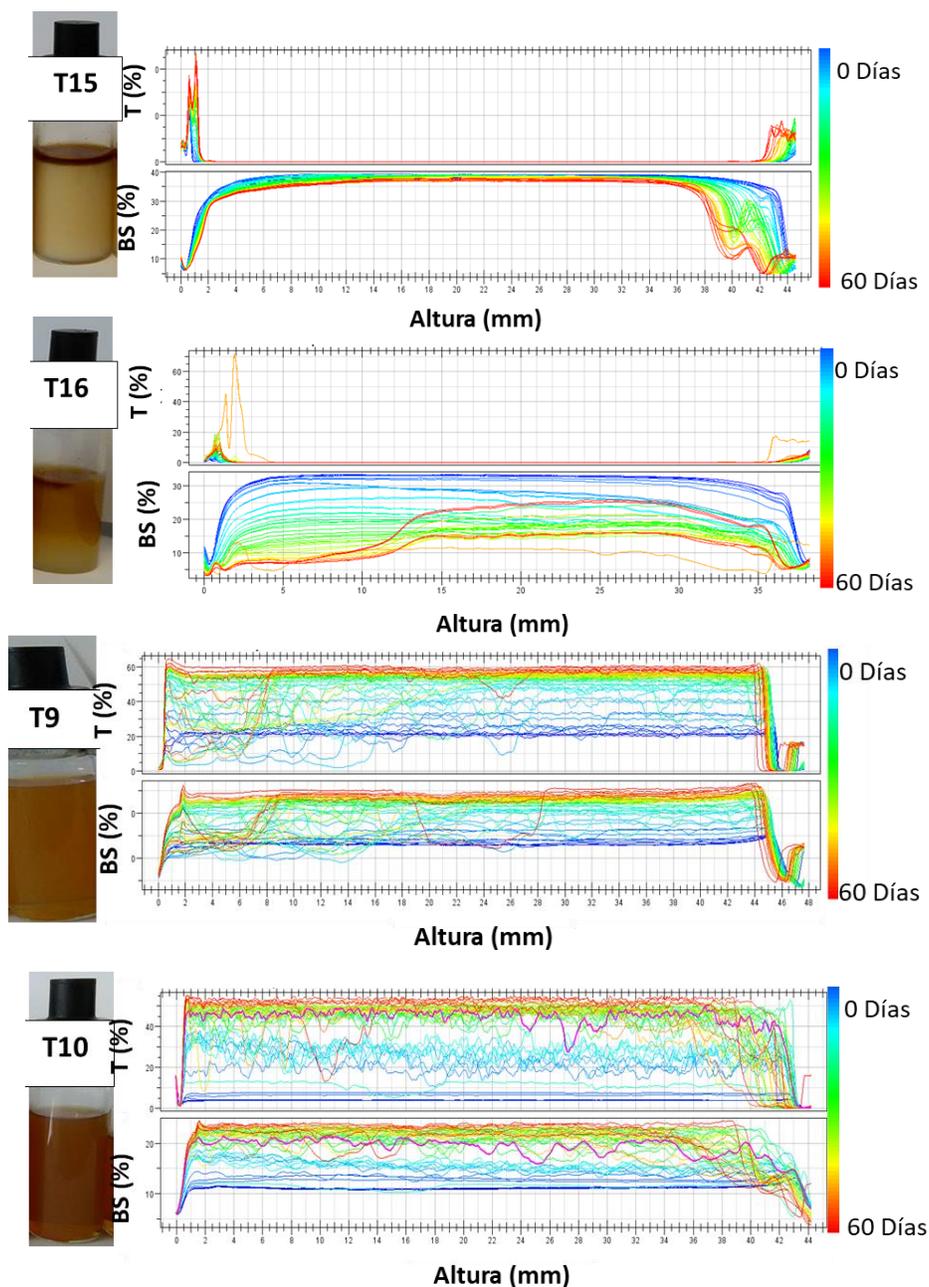
**FIGURA 28. Nanoemulsiones después de 8 semanas de almacenamiento (4°C) elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8**

### **6.2.5 Evaluación de la estabilidad de almacenamiento de las nanoemulsiones por medio de dispersión múltiple de luz estática**

También se evaluó la estabilidad mediante el equipo Turbiscan Lab® Expert, con la finalidad de comparar y comprobar los resultados obtenidos por el Zetasizer (dispersión de luz dinámica) de la sección 6.2.4.

En la Figura 29 se muestra que el tratamiento T15 tiene una clara tendencia de sedimentación inversa en la parte superior de la celda, también muestra el menisco con una capa color café, que, presumiblemente se deba que la concentración de surfactante no fue suficiente para encapsular toda la fase oleosa (McClements y Rao, 2011). Lo mismo sucedió para el tratamiento T16, en el cual se observa un espaciado entre cada uno de los escaneos. Esto se puede asociar a un incremento en el tamaño de partícula (Formulation, 2016). Además de un ligero aclaramiento en la parte inferior del sistema y sedimentación inversa en la parte

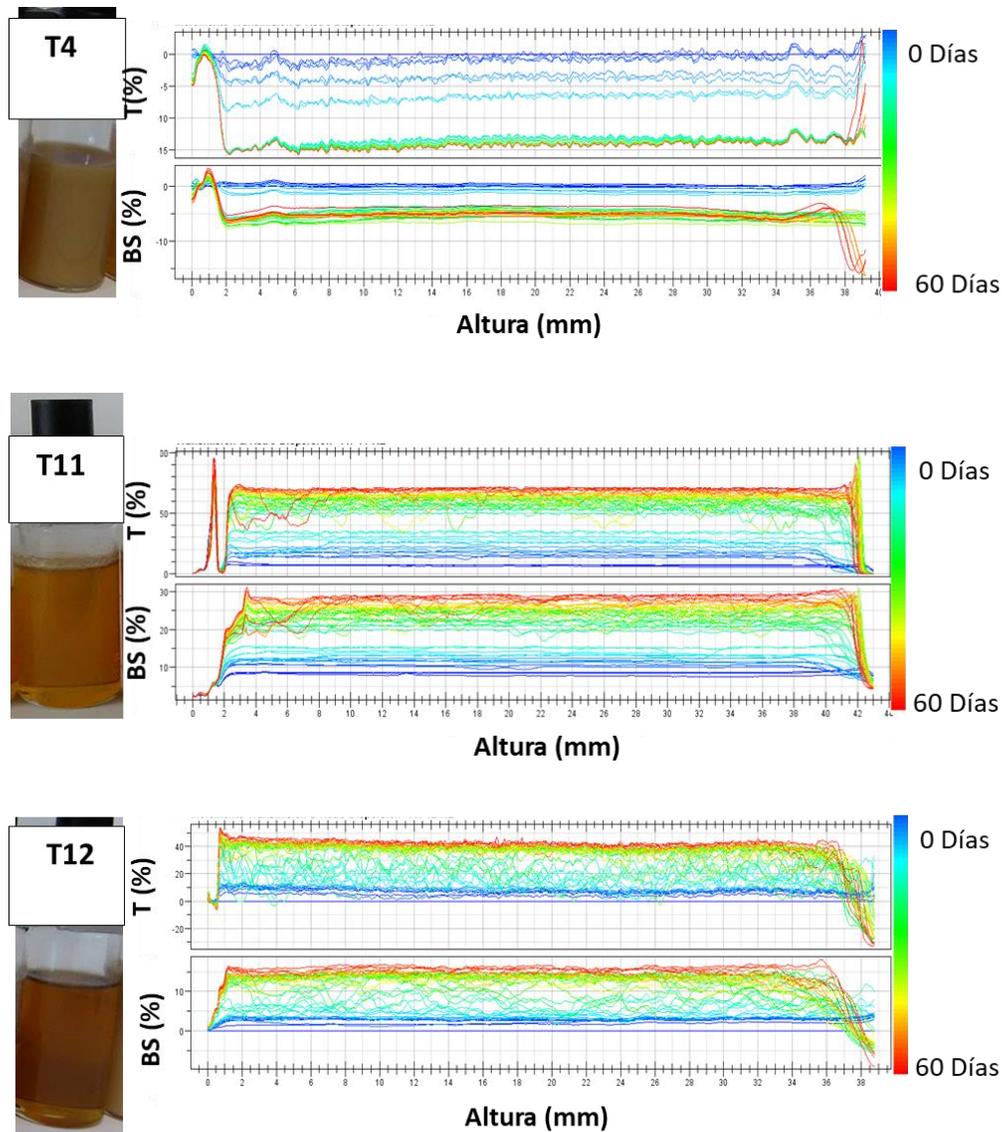
superior. Esto se atribuye principalmente, a la elevada concentración de AT (5%) que propicio interacciones entre los componentes de la emulsión que generaron fenómenos de inestabilidad (Hategekimana *et al.*, 2015; Saberi *et al.*, 2013; Hatanaka *et al.*, 2010).



**FIGURA 29.** Gráficos de estabilidad por 60 días (2 meses) de las nanoemulsiones (T15, T16, T9 y T10) a 4 °C elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8

En el caso de los tratamientos T9 y T10, durante los dos meses de almacenamiento no se observó de manera visual la formación de aglomerados (Figura 29). Sin embargo, al analizarlos con el equipo Turbiscan Lab® Expert, se observaron niveles de Transmitancia (T%) altos. Esto se debe a que el haz de luz puede atravesar la muestra con facilidad debido a la baja turbidez del sistema, sin embargo, se observó que desde la parte baja hasta la parte alta hay irregularidades marcadas en el gráfico. Esto se relaciona con la formación de aglomerados y el tamaño de estos, que podemos observar con una irregularidad mayor en el gráfico (Formulation, 2016). La baja concentración de glicerol pudo ser el factor determinante para que los sistemas no fueran estables durante más tiempo. Esto se debe a que el glicerol funciona como agente estabilizante del sistema y propicia una disminución en la movilidad de la fase dispersa (Saber *et al.*, 2013). Así, se determinó que estos sistemas concuerdan con lo representado en la Figura 27 y descartando la mayoría de los experimentos, excepto 3 tratamientos: T4, T11 y T12.

Los tratamientos T4, T11 y T12, como se observa en la Figura 30 fueron los que mejor estabilidad demostraron, sin embargo, entre ellos existen diferencias en su comportamiento. El experimento T4 muestra que durante el transcurso de almacenamiento la parte central de la celda de la nanoemulsión se mantuvo estable durante los 60 días (línea recta). Esto se podría relacionar con la concentración de MCT que tienen en la fase oleosa y un incremento en la viscosidad del sistema. Y como resultado se obtuvo una menor movilidad entre las partículas del mismo. Además de un incremento en el tamaño de partícula por la mayor concentración de fase oleosa que se encapsuló (McClements, 1999, 2011). Por otra parte, también se observa en la misma zona, hay un salto en las lecturas, el cual se asocia a un incremento en el tamaño de partícula. Este sucede en la primera semana de haberse realizado y se mantiene por los 60 días (Formulation, 2016).

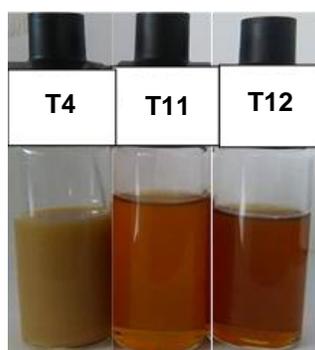


**FIGURA 30. Gráficos de estabilidad por 60 días (2 meses) de las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) a 4 °C elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8**

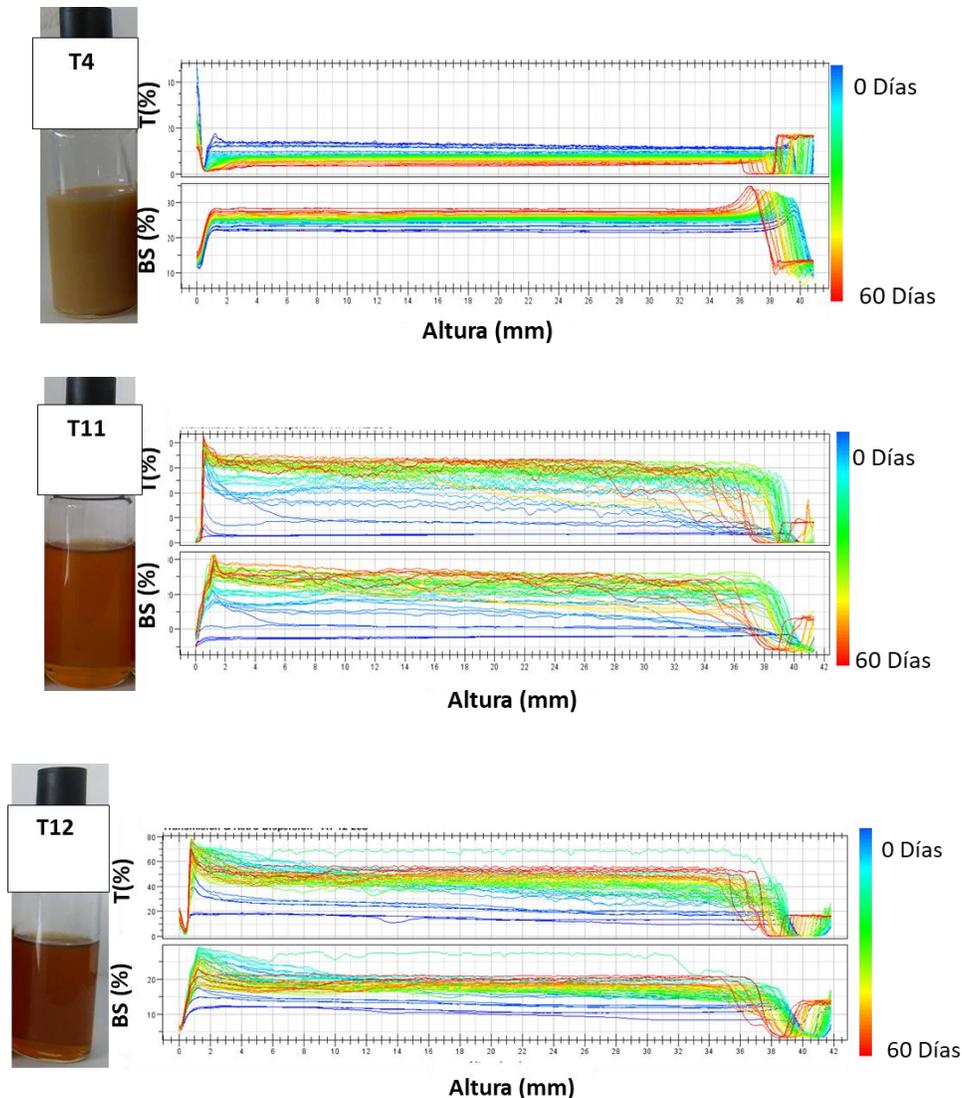
Con respecto a las composiciones T11 y T12 sucede un caso particular, ya que en toda la región central de los sistemas parece haber fenómenos de agregación. Sin embargo, las interacciones entre los aglomerados parecen ser débiles es decir, que las fuerzas de atracción no son suficientes para mantenerlos unidos y al diluirlos con agua, como así requiere el equipo Zetasizer, se separan, obteniendo sistemas estables (McClements, 2004, 2011). Por lo tanto, se determinó que las mejores

composiciones debido a tamaño y estabilidad con respecto al tiempo fueron los tratamientos T4, T11 y T12, los cuales se evaluaron también a una temperatura de almacenamiento de 25 °C.

Estos tratamientos fueron almacenados por un lapso de 8 semanas a 25 °C. En la Figura 31 se muestran las nanoemulsiones al final del periodo de almacenamiento las cuales tuvieron el mismo comportamiento que las nanoemulsiones evaluadas a 4 °C excepto por la turbidez, ya que se muestran ligeramente opacas. Esto lo han relacionado algunos autores, en el caso de surfactantes no iónicos, con la deshidratación de la cabeza polar debido a la presencia de glicerol combinado con el incremento de la temperatura (25 °C) en el sistema; con lo cual se acelera su coalescencia (Saber *et al.*, 2013). Se observa en la Figura 32, un incremento en la movilidad de las partículas de los tratamientos T11 y T12, propiciando fenómenos de agregación, ya que estos son expresados mediante variaciones en las gráficas de estos tratamientos obteniéndose así un incremento mayor en el tamaño de partícula, comparándolos con los sistemas a 4 °C. Con respecto al tratamiento T4, si bien no se observaron fenómenos de agregación, si se nota la tendencia a incrementar el tamaño de partícula en la parte central del gráfico, lo mismo que sucedió a 4 °C.



**FIGURA 31. Nanoemulsiones almacenadas durante 8 semanas a 25 °C con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8**



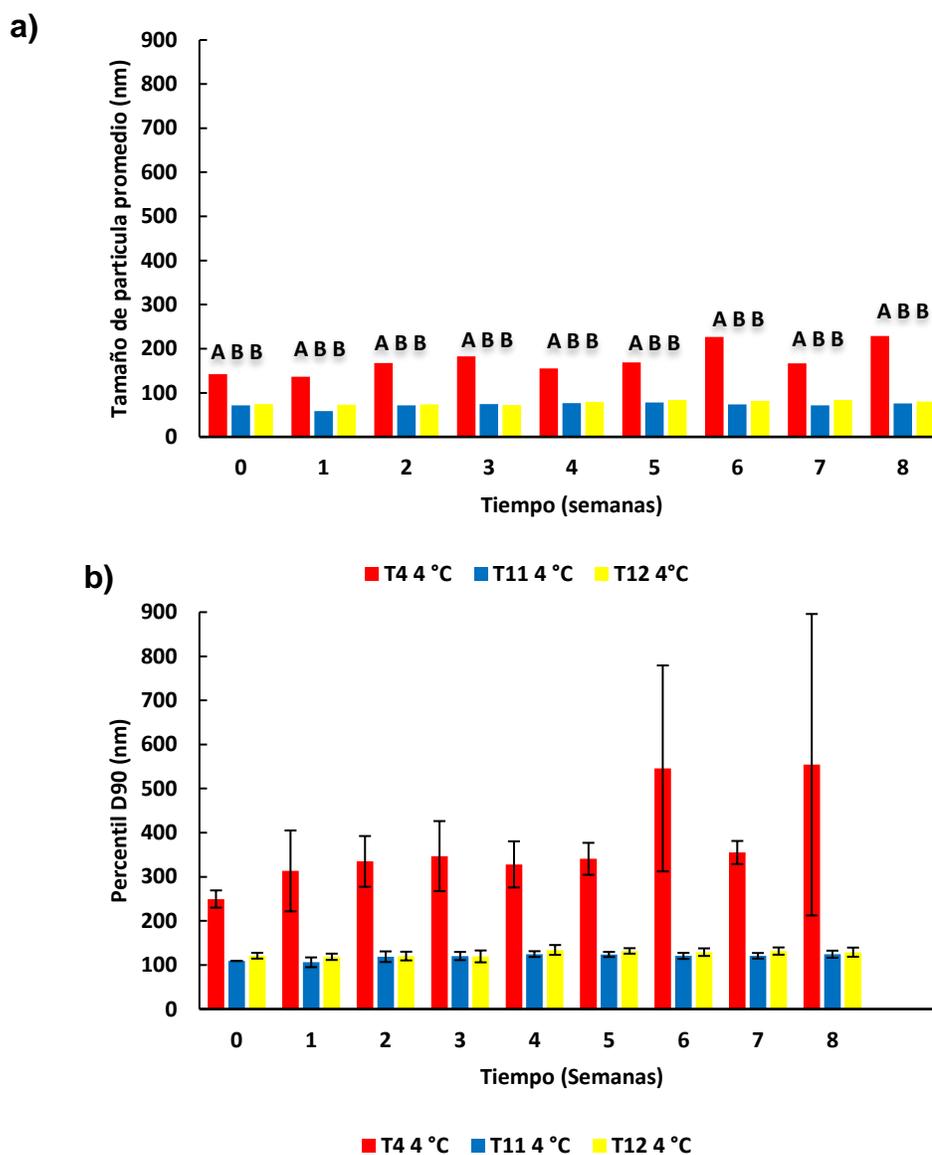
**FIGURA 32. Gráficos de estabilidad por 60 días (2 meses) de las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) a 25 °C elaboradas con diferentes composiciones descritas en la Tabla 8**

## 6.2.6 Evaluación de los tratamientos óptimos

### 6.2.6.1 Efecto de la concentración de MCT

En la Figura 33 se muestra la diferencia de tamaño de partícula entre los tratamientos T11 y T12 con respecto a T4. Los dos primeros tratamientos cuentan con un tamaño de partícula inferior a los 100 nm, a diferencia del tratamiento T4 que supera los 100 nm. Se debe a que en la fase oleosa cuenta con MCT, lo cual incrementa la cantidad de volumen encapsulado en la fase dispersa, ya que este se

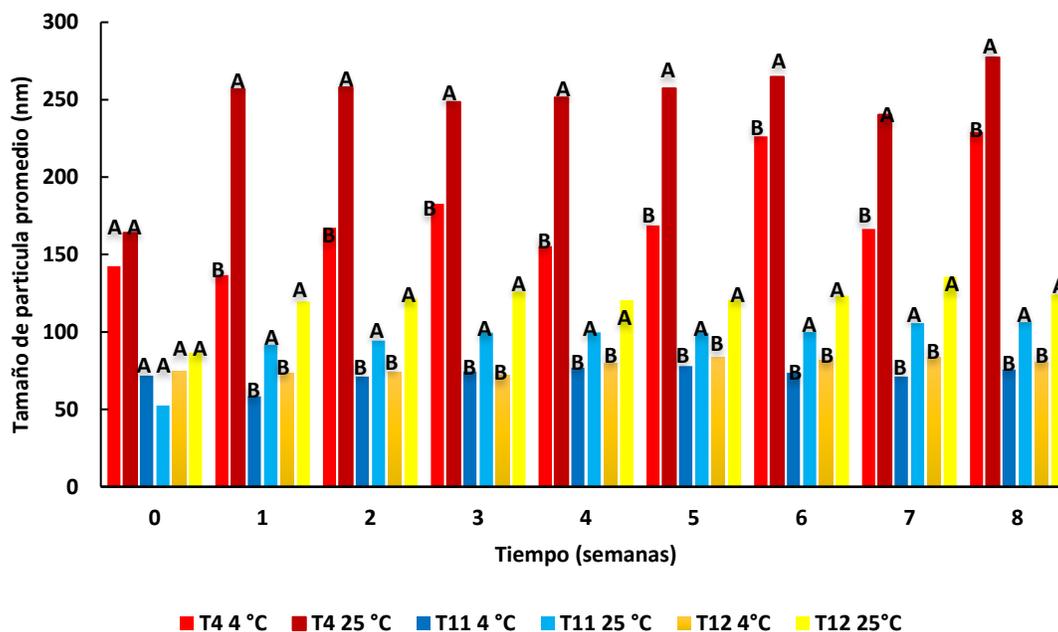
incrementa cuando es encapsulado por el surfactante (McClements y Rao, 2011). Por lo tanto, el análisis estadístico mostro que desde el tiempo 0 son significativamente diferentes T11 y T12 con respecto a T4 y se concluye que la concentración de MCT tiene efecto en el incremento del tamaño de partícula.



**FIGURA 33. a) Tamaños de partícula promedio de los tratamientos T4, T11 y T12; b) Distribución de tamaño (PercentilD90) de los tratamientos T4, T11 y T12, durante un período de 8 semana**

### 6.2.6.2 Efecto de la temperatura de almacenamiento

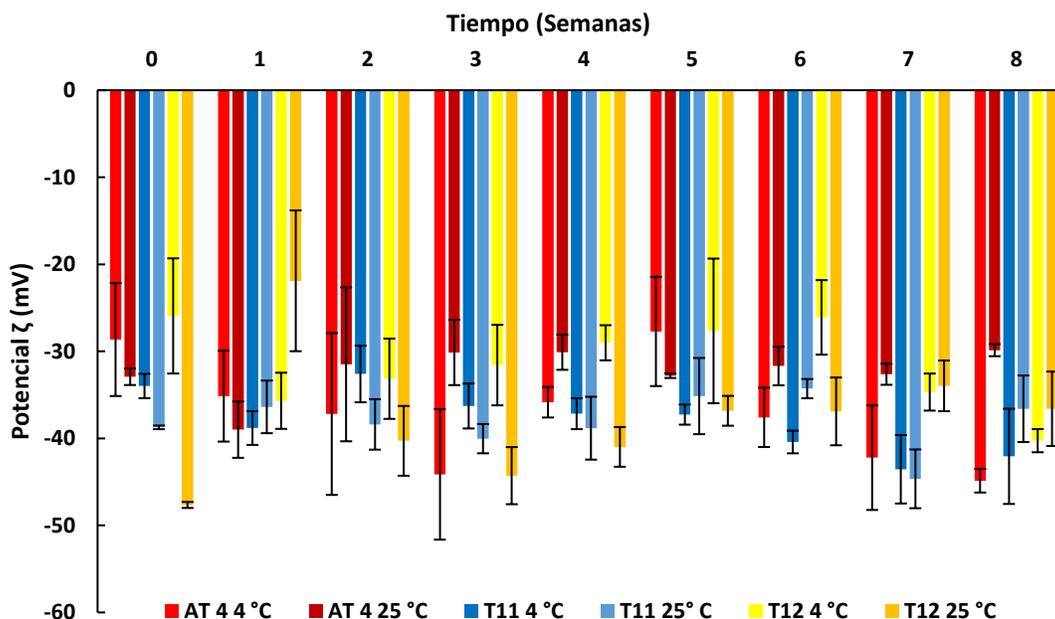
La Figura 34 muestra que en el tiempo 0, los tratamientos (T4, T11 y T12) comparándolos entre temperaturas (4 y 25 °C) eran estadísticamente iguales. Sin embargo, al pasar una semana se observa que en cada uno de los tratamientos existe diferencia significativa entre la temperatura de 4 y 25 °C, que se ve reflejado en un incremento de tamaño de partícula. Por ejemplo, T4 tuvo un incremento solo 0.21 veces a 4 °C, difiriendo de lo ocurrido a 25 °C, puesto a que el tamaño de partícula se incrementó en 0.64. En el tratamiento T11 a 4 °C incrementó 0.07 veces su tamaño mucho menos que a 25 °C el cual se incrementó hasta 0.9, casi duplicando su tamaño. El tratamiento T12 a 4 °C fue de 0.067 veces contra un incremento superior a 25 °C de 0.46 veces. Esto era de esperarse ya que al incrementar la temperatura se incrementaba el movimiento cinético de las partículas, lo cual propiciaba una disminución de las fuerzas de repulsión y probablemente en fenómenos de coalescencia (McClements, 2011; Saberi *et al.*, 2013; Mehmood, 2015). Obteniendo así un incremento en el tamaño de partícula de cada sistema. Sin embargo, los tamaños de partícula promedio no variaron el resto de las semanas. Esto quiere decir que el sistema llegó a un equilibrio entre las partículas (McClements, 2011; Saberi *et al.*, 2013; Mehmood, 2015). Por lo tanto, almacenar las muestras a 4 °C favorece la estabilidad de cada uno de los tratamientos.



**FIGURA 34. Tamaño de partícula de los tratamientos T4, T11 Y T12 a dos temperaturas diferentes (4 °C Y 25 °C) por un periodo de 8 semanas**

### 6.2.6.3 Potencial $\zeta$

En la Figura 35 se observa el potencial  $\zeta$  de las nanoemulsiones con un rango negativo  $< -30$  mV. La diferencia de la temperatura no fue determinante, así como el tiempo de almacenamiento para alterar su valor, ya que los valores promedio obtenidos de cada uno de los tratamientos fueron los siguientes: T4 -34 mV, T11 -37 mV y T12 -34 mV. Demostraron que la naturaleza de la carga negativa se debe al ion fosfato de la PC (Saber *et al.*, 2013; Mehmood, 2015). Debido a que valores inferiores a -30 mV da como resultado sistemas estables, coincidiendo así con McClements (2009).



**FIGURA 35. Efecto de la temperatura (4°C y 25 °C) sobre el potencial  $\zeta$  en los tratamientos T4, T11 y T12, en un período de 8 semanas**

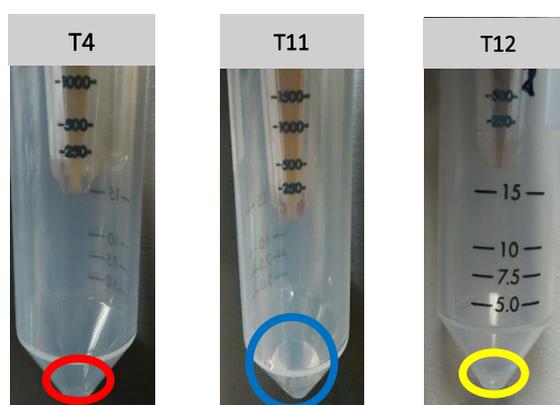
#### 6.2.6.4 Cuantificación de $\alpha$ -Tocoferol de los tratamientos

##### 6.2.6.4.A Porcentaje de encapsulamiento de $\alpha$ -Tocoferol

La determinación del porcentaje de encapsulación (Tabla 12) se realizó a partir de las condiciones descritas en la sección 5.1.5.3.A. De los tres tratamientos T4, T11 y T12, no se pudo determinar el porcentaje de encapsulación de AT del tratamiento T4, debido a la viscosidad elevada de la misma, lo cual provocó una rápida colmatación. Esto se puede deber al tamaño del poro (50 kDa) combinado con la alta viscosidad y la fuerza tangencial aplicada, dando como resultado el taponamiento de la membrana (Tejeda, 1995). Por lo tanto, se podría recomendar utilizar un tamaño de poro mayor 100 kDa (Sari *et al.*, 2014) o diluir la muestra para disminuir la viscosidad del sistema. Con respecto a los otros dos tratamientos (T11 y T12), no existe una liberación significativa en el permeado; esto significa que los sistemas son eficientes para el encapsulamiento de AT (Figura 36).

**TABLA 12. Porcentaje de encapsulamiento después de ser filtrado por centrifugación a 5000 rpm**

Tratamiento	Concentración antes de filtrar	Concentración de permeado mg/mL	Porcentaje de encapsulación
T4	6.571	No determinado	No determinado
T11	2.161	0.002	99%
T12	5.903	0.019	99%



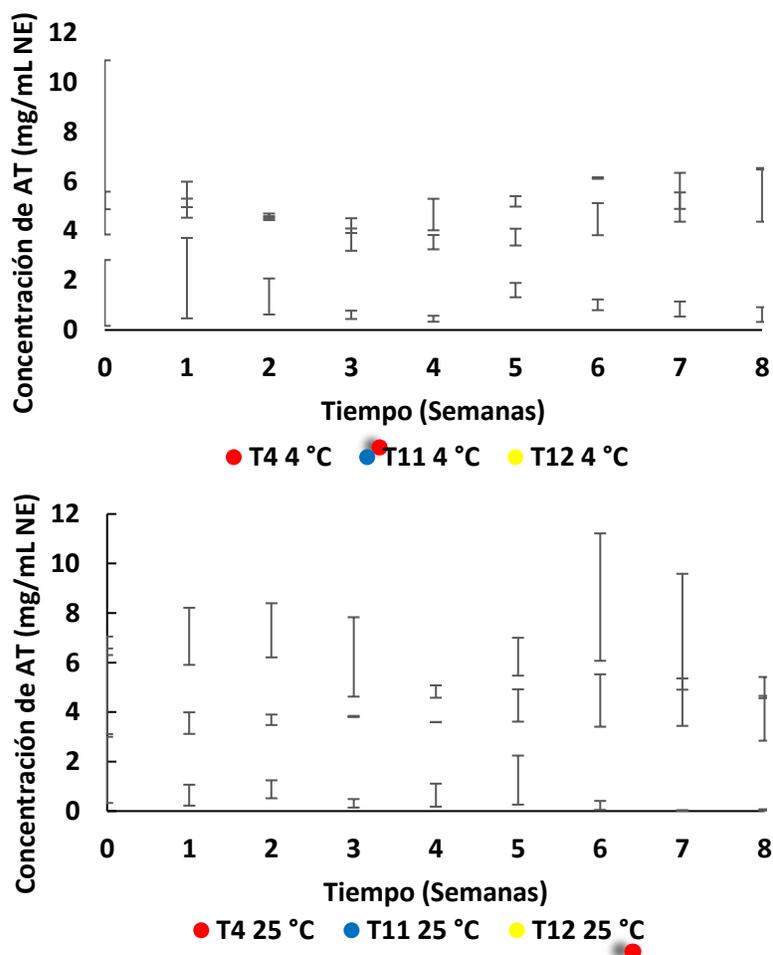
**FIGURA 36 Fotografías del permeado de las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) sometidas a filtración por centrifugación**

#### 6.2.6.4.B Determinación de concentración de $\alpha$ -Tocoferol encapsulado

Las nanoemulsiones T4, T11 y T12 fueron evaluadas en función del tiempo y la temperatura (4°C y 25°). Las nanoemulsiones evaluadas a 4 °C contenían una concentración inicial de encapsulamiento de 7.4 mg/mL NE, 5.2 mg/mL NE y 1.5 mg/mL NE para los tratamientos T4, T12 y T11, respectivamente. Las nanoemulsiones evaluadas a 25 °C contenían 6.43 mg/mL NE, 5.1 mg /mL NE y 1.66 mg/mL NE para los tratamientos T4, T12 y T11, respectivamente (Figura 37). Se sabe que la concentración teórica inicial de AT es de 14 mg/mL NE, sin embargo, este pareció degradarse. Esto se debió probablemente a la termodegradación por el procesamiento en el ultrasonicador, así como una oxidación del compuesto

bioactivo por el oxígeno en el medio (Acevedo, 2016). También la concentración de surfactante puede tener efecto en la protección del compuesto bioactivo. Esto sucede cuando las concentraciones de surfactante son adecuadas, permite formar una interfase lo suficientemente estable para proteger el compuesto bioactivo (McClements y Rao 2011; McClements 2011). La razón principal por la cual se entiende que la PC tiene la capacidad de evitar la oxidación del AT es debido a que reducen la permeación de radicales libres (Qian y Decker, 2015).

La tendencia se observó también en las nanoemulsiones sometidas a 25 °C por lo cual se puede decir que la temperatura de almacenamiento no tuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre la degradación del compuesto bioactivo.



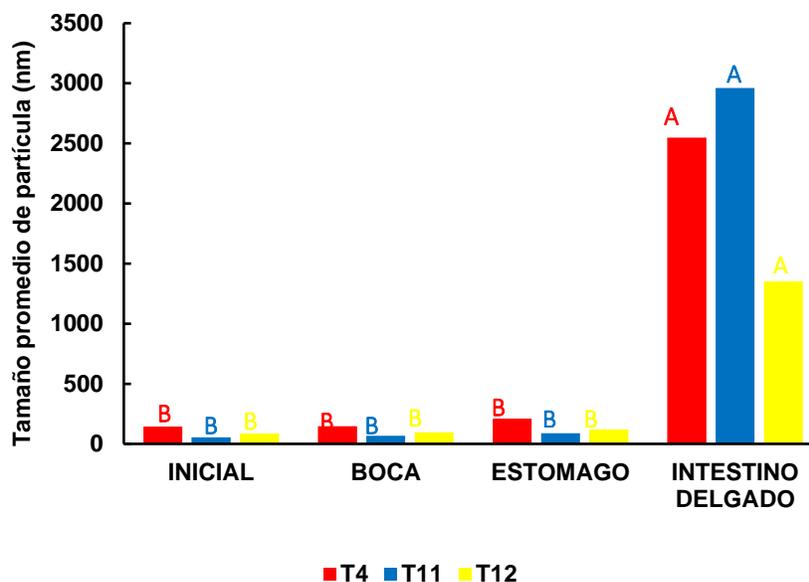
**FIGURA 37. Concentración de  $\alpha$ -Tocoferol (AT) encapsulado y evaluado a dos temperaturas de almacenamiento (4° y 25° C) durante 60 días**

### **6.2.6.5 Sistema de digestión *in vitro***

#### **6.2.6.5.A Influencia en el tamaño de partícula de los tratamientos**

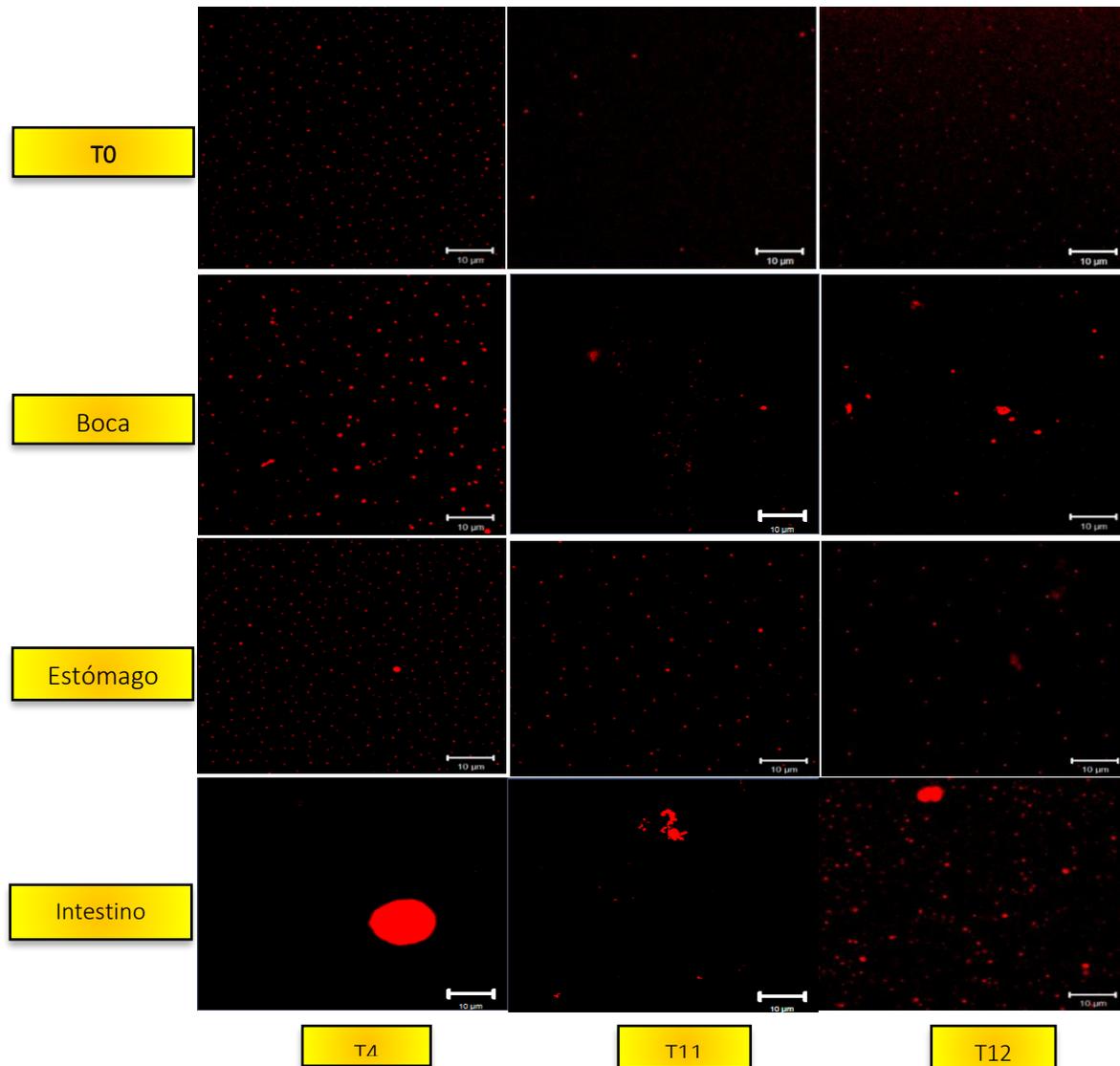
Inicialmente se estudió el impacto de encapsulamiento de AT en cada uno de los tratamientos (T4, T11 y T12). En la etapa inicial la fase oleosa que se utilizó para el tratamiento T4, contenía 0.4 g de MCT, mientras que para los tratamientos T11 y T12, no se empleó MCT, solo se usó una concentración de 0.1 g AT al igual que en T4. En la fase continua se añadieron 5 g de glicerol, 0.5 g de PC para el tratamiento T11 y 1 g para los tratamientos T4 y T12.

Antes de someter las muestras al sistema de digestión *in vitro*, estas presentaron un tamaño inicial promedio de partícula de 53 nm, 85 nm y 140 nm en los tratamientos T4, T11 y T12, respectivamente. La influencia en el tamaño de partícula en cada una de las etapas del sistema se puede ver en la Figura 38. El tratamiento T4 fue significativamente diferente a los otros dos tratamientos. Esto se relaciona con la concentración de MCT, ya que al existir una mayor concentración de fase oleosa encapsulada incrementó el tamaño de partícula. Posteriormente, al ser sometidas a las condiciones del sistema de digestión *in vitro*, en la etapa de la boca, las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) se mantuvieron relativamente estables a cambios de pH y sales del medio. Mediante microscopía confocal (Figura 39) se observó la agrupación o formación de aglomerados, debido a interacciones poliméricas de la mucina con las interfaces de las nanoemulsiones provocando floculación (Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010; Yi *et al.*, 2014).



**FIGURA 38. Influencia de las etapas de digestión *in vitro* (boca, estómago e intestino delgado) en el tamaño de partícula promedio de las nanoemulsiones T4, T11 y T12**

Una vez sometidas las nanoemulsiones a las condiciones de boca, la etapa siguiente fue simular las condiciones gástricas del estómago de acuerdo a la literatura (Singh *et al.*, 2009; Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010; Yi *et al.*, 2014). El pH no ejerció cambios abruptos con respecto al incremento en el tamaño de partícula. Esto es debido a la naturaleza del surfactante (PC), lo cual se muestra en las Figuras 38 y 39, ya que fueron relativamente estables a fenómenos de agregación bajo las condiciones del sistema de digestión *in vitro*. De hecho, se observa en la Figura 39 una disociación de flóculos. Esto podría atribuirse a diferentes razones: disolución de la muestra (agregación de jugos gástricos), agitación mecánica y pH ácido (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013). También se cree que la pepsina no tuvo efecto sobre la interfase de los fosfolípidos debido a que la enzima únicamente interactúa en la hidrólisis de cadenas proteicas (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Yang y McClements, 2013).



**FIGURA 39. Imágenes de microscopía confocal de las nanoemulsiones teñidas con rojo nilo (lípidos) en las diferentes etapas del sistema de digestión *in vitro* (boca, estómago e intestino)**

Posteriormente las nanoemulsiones se simularon en condiciones intestinales, donde se logró apreciar un incremento en el tamaño de partícula, mostrando así que son significativamente diferentes (Figura 38). Esto sugiere una marcada reducción en la estabilidad de las nanoemulsiones después de verse sometidas a condiciones intestinales (lipasa pancreática,  $\text{Ca}^{+2}$ ), lo cual se ve reflejado en un incremento de tamaño de partícula (Figuras 38 y 39). En esta parte del sistema

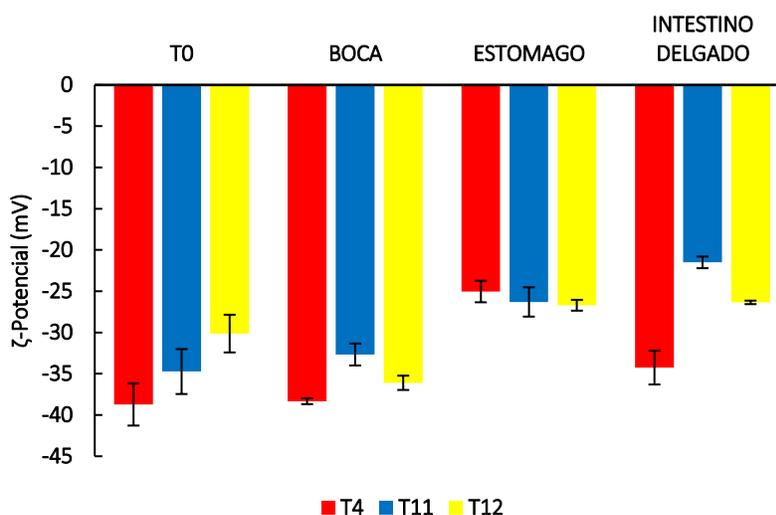
sucedieron diferentes fenómenos físicos; uno de ellos se debió a que los jugos intestinales que contenían las sales biliares son altamente activas a la adherencia en la superficie interfacial de las nanoemulsiones. Otro factor, el más importante, es la interacción de la lipasa pancreática, que tiene la capacidad de absorberse en la superficie de las partículas de las nanoemulsiones, convirtiendo tanto los MCT y fosfolípidos en ácidos grasos libres y monoglicéridos con respecto a los triacilglicéridos. Esta digestión lipídica puede llegar a acumularse en la interfase de las partículas, o estar alrededor de la misma. Esto depende del peso molecular de las partículas hidrolizadas, así como de las sales biliares, fosfolípidos y calcio (Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010; Yi *et al.*, 2014). Por lo tanto, se esperaba que hubiese cambios internos e interfaciales en la composición de las micelas formadas. Además, se esperaba que al remover los ácidos grasos libres y los monoacilgliceridos obtenidos de la digestión se obtuviese una reducción en el tamaño de partícula. Sin embargo, al haberse realizado la digestión lipídica en las nanoemulsiones (T4, T11 y T12) tuvieron una tendencia a incrementar el tamaño de partícula por medio de la coalescencia (Yang y McClements, 2013). Por lo tanto, el análisis sobre el tamaño de partícula promedio real después de la digestión lipídica fue complejo, debido a que el software utilizado para definir los tamaños de partícula funciona a partir de la dispersión de luz dinámica. Esto se debe a que el software asume que las partículas son: esféricas, diluidas y con índices de refracción definidos. Sin embargo, para el caso de estudio no sucedió, ya que se encuentran partículas parcialmente digeridas, partículas de nanoemulsiones digeridas y formación de micelas. Por lo tanto, no se podrían tomar como esféricas y sus índices de refracción son diferentes (Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010). Por lo tanto, se debe ser pertinente y precavido en la interpretación de los tamaños de partícula obtenidos después de la digestión lipídica.

#### **6.2.6.5.B Influencia en el potencial $\zeta$ de los tratamientos**

Los cambios en la carga eléctrica de las partículas fueron medidos en cada una de las etapas del sistema de digestión *in vitro* (Figura 40). En la etapa inicial se observó

que los tres tratamientos (T4, T11 y T12) tuvieron una carga inferior a -30 mV y esta carga puede ser atribuida a los grupos fosfatos de la PC (Hatanaka *et al.*, 2010). Esta carga negativa, en la simulación de la boca se mantuvo en los tratamientos T4 y T11 y ascendió ligeramente en el tratamiento T12. Esto se puede deber a las condiciones de pH neutro (pH 7) que se encuentran en la boca y el ligero descenso se relaciona a la ionización de algunos minerales y la mucina absorbida en la interfase de las nanoemulsiones (Sarkar, 2010; Yang y McClements, 2013). Esta magnitud de la carga aumenta positivamente cuando es sometida a los líquidos gástricos (pH 2.5) provocando la ionización de los grupos fosfatos de la PC. Este aumento de carga positiva podría verse reflejado en un incremento de tamaño de partícula (Figura 40). Sin embargo, este fue ligeramente incrementado debido a que aún existía una interfase lo suficientemente activa para prevenir esta agregación (Yang y McClements, 2013; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

Posteriormente, en la etapa del intestino delgado la carga negativa tiende a disminuir en los tratamientos T4 y T12, y esto se relaciona con la neutralización del pH, lo cual podría ionizar la carga del grupo fosfato al interactuar con el medio. Otra razón es la adsorción de las sales biliares en la interface de las nanoemulsiones, las cuales generan una superficie negativa al ser aniónicas (Yang y McClements, 2013). Con respecto al tratamiento T11 se puede creer que este aumento se deba al desplazamiento de las moléculas de sales biliares por ácidos grasos libres y afectan en un incremento de fuerza catiónica, además de la interacción de iones  $\text{Ca}^{+2}$  (Yang *et al.*, 2015).



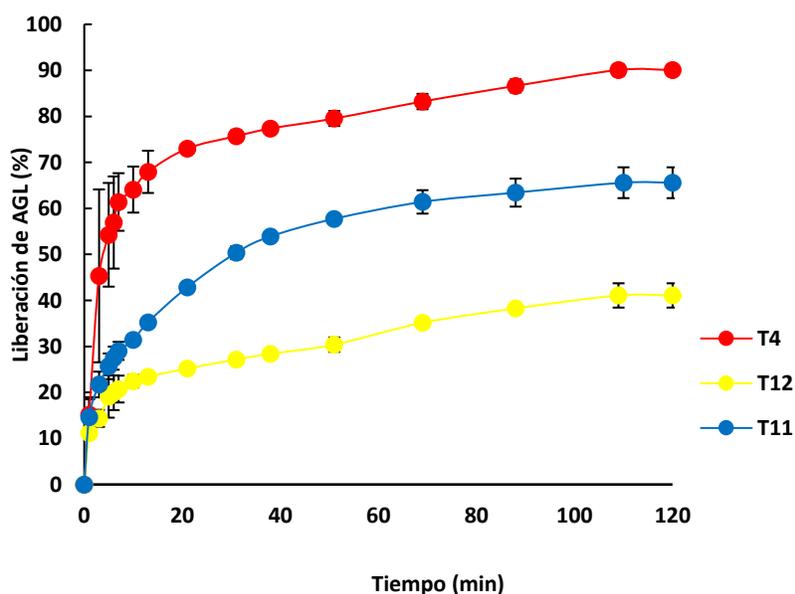
**FIGURA 40. Influencia de las condiciones del sistema de digestión *in vitro* en el potencial  $\zeta$  de los tratamientos T4, T11 y T12**

#### 6.2.6.5.C Digestión lipídica de los tratamientos

La evolución del AT encapsulado en la etapa del intestino delgado relacionado con la digestión lipídica fue medida mediante una titulación manual (bureta) para la neutralización de los ácidos grasos libres. La titulación se realizó mediante la adición de NaOH a 0.25 M para mantener un pH neutro (pH 7) (Singh *et al.*, 2009; Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010; Yi *et al.*, 2014).

En cada uno de los tratamientos (T4, T11 y T12), la hidrólisis enzimática propició una liberación rápida de ácidos grasos libres (Figura 41), ya que la lipasa pancreática interaccionó rápidamente con los MCT y la PC. Sin embargo, el mayor porcentaje de hidrólisis se obtuvo en el tratamiento T4 (90%) y esto se debió a los ácidos grasos de cadena media. En la literatura relacionan que sistemas coloidales con ácidos grasos de cadena media tienden a hidrolizarse más rápidamente debido al tamaño de su cadena (Singh *et al.*, 2009; McClements, 2010; Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010; Yi *et al.*, 2014). Esto se relaciona con los triacilglicéridos de cadena media que fácilmente se dispersan sus cadenas de

ácidos grasos libres en el agua, en comparación con las cadenas largas de los fosfolípidos. Estos ácidos grasos tienden a migrar rápidamente a la fase continua que rodea a la fase dispersa, por lo tanto, no obstruye la interacción de la lipasa pancreática con el sustrato (Singh *et al.*, 2009; McClements, 2010; Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010; Yi *et al.*, 2014). Con los ácidos grasos libres de cadena larga de la PC sucede todo lo contrario, ya que tienden a acumularse en la interfase de las partículas y por lo tanto obstruyen el sustrato que interactúa con la lipasa pancreática (Yang y McClements, 2013; McClements y Li, 2010). Para poder incrementar la digestión lipídica en los ácidos grasos de cadena larga se necesita la cantidad suficiente de sales biliares y calcio libre, los cuales funcionan como detergentes para remover los ácidos grasos de la superficie de las partículas, que podrían precipitar o solubilizarse (Yang y McClements, 2013).



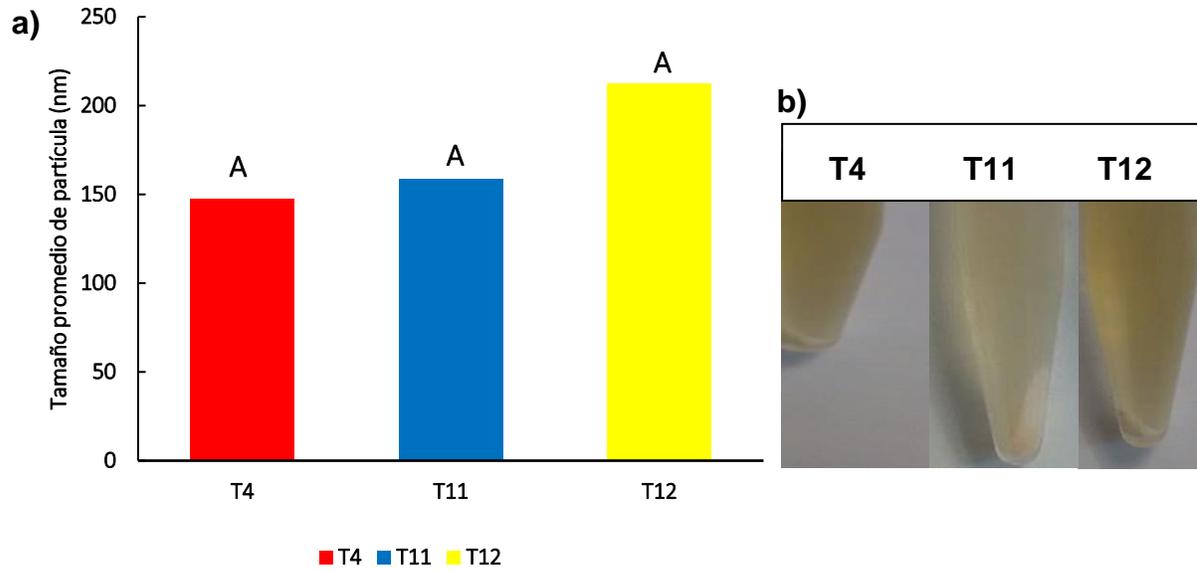
**FIGURA 41. Porcentaje de liberación de los ácidos grasos libres (AGL) debido a la hidrólisis enzimática de los tratamientos T4, T11 y T12 durante 120 min.**

#### **6.2.6.5.D Determinación de la bioaccesibilidad de $\alpha$ -Tocoferol de los tratamientos**

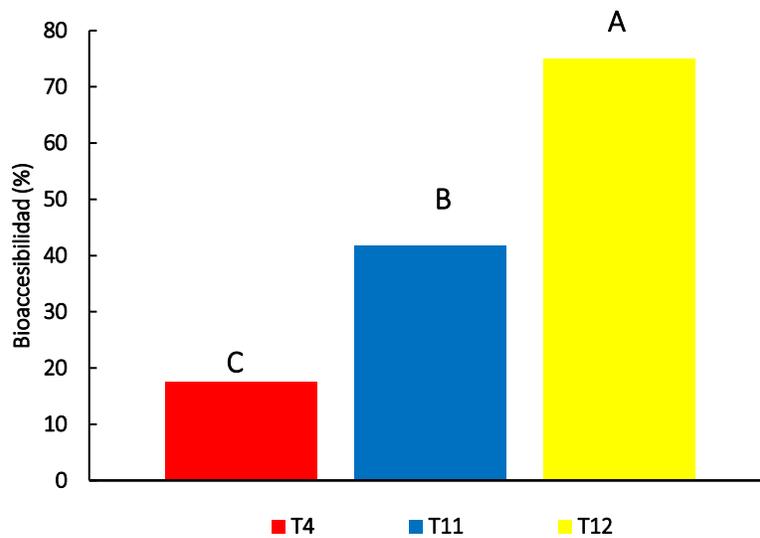
El análisis de la bioaccesibilidad del AT fue medido después de la digestión lipídica, utilizando la metodología de la sección 5.1.5.4.D, se observó la formación de dos capas en los tratamientos T4, T11 y T12, un sedimento color blanco y la fase micelar translúcida. La fase micelar fue medida para determinar la distribución del tamaño de partícula después de ser filtrada por una membrana tipo PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ . Esto se hizo con la finalidad de asemejar de manera *in vitro* el paso de las vesículas y micelas mixtas formadas a través de la mucosa intestinal. Ya que si estas eran capaces de superar la membrana (400 nm), se aseguraba que las micelas formadas podrían ser llevadas a las microvellosidades del intestino delgado para así ser transportadas al torrente sanguíneo. Esto sucedió en cada uno de los tratamientos, debido a que obtuvieron tamaños de partícula promedio de 147 nm, 158 nm y 212 nm para los tratamientos T4, T11 y T12, respectivamente (Figura 42a) (Yang y McClements, 2013; Yi *et al.*, 2014).

En las composiciones T11 y T12 se observó que la parte inferior del tubo fueron sales biliares,  $\text{Ca}^{+2}$  y proteínas y la fase micelar se observó con una textura translúcida. La composición T4 mostró en mayor proporción una capa blanca, posiblemente mayor proporción de micelas, las cuales eran de un tamaño elevado y partículas parcialmente digeridas (Figura 42b) (Yi *et al.*, 2014).

Con respecto a la bioaccesibilidad, el tratamiento T4 obtuvo un 17%, el tratamiento T11 fue de 41.71% y T12, 75 % de bioaccesibilidad. Con ello se muestra que fue mucho más eficiente la protección con los tratamientos T11 y T12 (Figura 43). Esto se puede relacionar con la formación de micelas mixtas a partir de los ácidos grasos de cadena larga, los cuales al emulsionar tienden a encapsular el compuesto bioactivo, debido a la cadena larga de ácidos grasos de la PC a diferencia de los ácidos grasos de cadena media, donde eso no fue posible. Presumiblemente fue por el tamaño de la cadena (media), además de la formación de quelados con el calcio (Yi *et al.*, 2014).



**FIGURA 42. a) Tamaño de partícula promedio de las micelas formadas después de la digestión *in vitro* de los tratamientos T4, T11 y T12; b) Apariencia de las micelas después de la digestión *in vitro* de los tratamientos T4, T11 y T12**



**FIGURA 43. Bioaccesibilidad de los diferentes tratamientos (T4, T11 y T12) después de la digestión *in vitro***

## 7 CONCLUSIONES

1. Las nanoemulsiones elaboradas con LPC tuvieron tamaños de partícula promedio superior a los 500 nm, a diferencia de las emulsiones con PC, las cuales se obtuvieron con tamaños de partícula inferior a los 500 nm.
2. Los mejores tratamientos obtenidos con respecto a su estabilidad y tamaño de partícula fueron los tratamientos T4 (142.5 nm), T11 (71.8 nm) y T12 (74.7 nm). El factor determinante fue la baja concentración de  $\alpha$ -Tocoferol (0.1 g) que contenían.
3. La concentración de surfactante (1g) en los tratamientos T4 y T12 propició una mayor protección al  $\alpha$ -Tocoferol encapsulado, ya que en estos tratamientos se logró conservar concentraciones mayores (7.4 mg/mL NE y 5.2 mg/mL NE respectivamente) de AT, con respecto al tratamiento T11 que únicamente logró conservar una concentración de 1.5 mg/mL NE, puesto que tenía una menor concentración de PC (0.5g)
4. El porcentaje de encapsulamiento de los sistemas acarreadores desarrollados fue eficiente (99%).
5. El mayor porcentaje de bioaccesibilidad (75%) se logró en el tratamiento T12, debido, principalmente, a la concentración del surfactante (1 g) y ausencia de MCT.
6. La presencia de MCT incrementó la digestión lipídica, pero disminuyó la bioaccesibilidad del compuesto bioactivo.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Abla, M. J., y Banga, A. K. (2014). Formulation of tocopherol nanocarriers and *in vitro* delivery into human skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 36(3), 239–246.
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(1), 3–15.
- Acevedo, M. (2017). Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de fitoesteroles formuladas con emulsificantes modificados. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Amparo, L., Marchena, U., Alejandra, G., Parra, M., Adelaida, M., Quiroz, C., Gómez, B. (2009). Bioactive compounds on food and health-promoting properties. *Prespectivas en Nutrición Humana*, 11(1), 27–38.
- Baeza-Jiménez, R., López-Martínez, L. X., Otero, C., Kim, I. H., y García, H. S. (2013). Enzyme-catalysed hydrolysis of phosphatidylcholine for the production of lysophosphatidylcholine. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(10), 1859–1863.
- Bhatnagar, A. S., Prasanth Kumar, P. K., Hemavathy, J., y Gopala Krishna, A. G. (2009). Fatty Acid Composition, Oxidative Stability, and Radical Scavenging Activity of Vegetable Oil Blends with Coconut Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(10), 991–999.
- Bezard, J., Bugaut, M., y Clement, G. (1971). Triglyceride composition of coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(3), 134–139.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., y Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1-2), 241–251.
- Cano, C. (2013). Caracterización fisicoquímica y morfométrica de emulsiones de AT elaboradas con surfactantes y obtenidas por microfluidización. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, México.
- 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 Doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Chávez, R. (2015). Biodisponibilidad de Ácido Betulínico y Curcumina en nanoemulsiones estabilizadas con LPC en un modelo murino. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

- Casado, V., Señorans, F. J., Reglero, G., y Torres, C. F. (2013). Supercritical and enzymatic technologies for the production of lysophosphatidylcholine. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(1), 153–162.
- Cui, L., y Decker, E. A. (2015). Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 18–31.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482.
- Du, C. (2004). Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science Technology*, 15, 230–249.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., y Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628–647.
- Failla, M. L., Huo, T., y Thakkar, S. K. (2008). *In vitro* screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17, 200–203.
- Food and Nutrition Board-Institute of Medicine, National Academies (2000) FDB-NIH (Consultado el 15 de Enero del 2016).
- Garti, N., Yaghmur, A., Leser, M. E., Clement, V., y Watzke, H. J. (2001). Improved oil solubilization in oil/water food grade microemulsions in the presence of polyols and ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2552–2562.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., y Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276–290.
- Hatanaka, J., Chikamori, H., Sato, H., Uchida, S., Debari, K., Onoue, S., y Yamada, S. (2010). Physicochemical and pharmacological characterization of alpha-tocopherol-loaded nano-emulsion system. *International Journal of Pharmaceutics*, 396(1-2),
- Hategekimana, J., Masamba, K. G., Ma, J., y Zhong, F. (2015). Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydrate Polymers*, 124, 172–179.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., y Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191–1202.
- Jones, C. W., Smolinski, D., Keogh, A., Kirk, T. B., y Zheng, M. H. (2005). Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 40(1), 1–71.
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., y Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 170–175.

Formulation, 2016. Turbiscan Lab High Performance Stability Analyser. Disponible online en <http://www.formulation.com/stability-turbiscan-lab.html>. (Consultado el 07 de enero de 2016)

Lamprecht, A, Schäfer, U. F., y Lehr, C. (2000). Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 49(1), 1–9.

Lee, L. L., Niknafs, N., Hancocks, R. D., y Norton, I. T. (2013). Emulsification: Mechanistic understanding. *Trends in Food Science and Technology*, 31(1), 72–78.

Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., y Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(6), 721–727.

Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., y Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98.

Lin, C.-C., Lin, H.-Y., Chen, H.-C., Yu, M.-W., y Lee, M.-H. (2009). Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry*, 116(4), 923–928.

Lin, C. Y., y Chen, L. W. (2008). Comparison of fuel properties and emission characteristics of two- and three-phase emulsions prepared by ultrasonically vibrating and mechanically homogenizing emulsification methods. *Fuel*, 87(10-11), 2154–2161.

McClements, D. J. (2004). Emulsion Ingredients. In *Food Emulsions* (pp. 99–184).

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles Practices and Techniques* (pp. 1–26).

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques*. 2nd. Ed. F. M. Clydesdale (Ed.). Washington, US: CRC Press. Taylor and Francis group. 609p.

McClements, D. J. (2009). *Biopolymers in Food Emulsions*. Modern Biopolymer Science (First Edit). Elsevier Inc.

McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* (pp. 1719-1729)

McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297.

McClements, D. J., y Li, Y. (2010). Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, 1(1), 32–59.

McClements, D. J., y Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213–228.

- McClements, D. J., y Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285–330.
- Mehmood, T. (2015). Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. *Food Chemistry*, 183, 1–7.
- Morais Diane, J. M., y Burgess, J. (2014). Vitamin e nanoemulsions characterization and analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 465(1-2), 455–463.
- National Cancer Institute (2016) NCI Dictionary of Cancer Terms. Disponible online en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?CdrID=703278>. (Consultado el 15 de Enero del 2016).
- Ochoa. (2013). Desarrollo de nanoemulsiones con fosfolípidos estructurados como sistemas acarreadores de curcumina, Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., y McClements, D. J. (2014). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin e delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *Journal of Food Engineering*, 142, 57–63.
- Pan, Y., Tikekar, R. V., y Nitin, N. (2013). Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 450(1–2), 129–137.
- Peh, H. Y., Tan, W. S. D., Liao, W., y Wong, W. S. F. (2015). Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & Therapeutics*.
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., y Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21.
- Porrás, M., Solans, C., Gonzalez, C., Martínez, A., Guinart, A., y Gutierrez, J. M. (2004). Studies of formation of W/O nano-emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 249(1-3), 115–118.
- Cui, L., & Decker, E. A. (2015). Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 18–31
- Robins, M. M. (2007). Lipid emulsions. *Grasas y Aceites*, 51, 26–34.
- Saberi, A. H., Fang, Y., y McClements, D. J. (2013). Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interfase Science*, 411, 105–113.
- Sæther, Ø, Sjöblom, J., y Dukhin, S. S. (2004). Droplet Flocculation and Coalescence in Dilute Oil-in-Water Emulsions. *Food Emulsion*.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., y McClements, D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2), 1475–1480.

- Sari, T. P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R. R. B., Sharma, R., Bhardwaj, M., y Athira, S. (2014). Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, 540–546.
- Sarkar, A. (2010). Behaviour of milk protein – stabilized oil - in - water emulsions in simulated physiological fluids Anwesha Sarkar, 284.
- Sayago, A., Marín, M. I., Aparicio, R., y Morales, M. T. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58(1), 74–86.
- Schubert, H., Ax, K., y Behrend, O. (2003). Product engineering of dispersed systems. *Trends in Food Science and Technology*, 14(1-2), 9–16.
- Schubert, H., y Engel, R. (2004). Product and formulation engineering of emulsions. *Chemical Engineering Research y Design*, 82(A9), 1137–1143.
- Serrano, D., López, M. L., y Espuñes, R. S. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal., *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58–68.
- Singh, H., Ye, A., y Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48(2), 92–100.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., y Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 303–318.
- Tejeda A. 1995. *Bioseparaciones*. Ed. Unision, Hermosillo, 554-555.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 1–23.
- Traber, M. G. (2007). Vitamin E Regulatory Mechanisms. *Annual Reviews of Nutrition*, 27(1), 347–362.
- USDA - NAL. (2011). Dietary Reference Intakes. Estimated Average Requirements. Food and Nutrition Board Information Center, (1997).
- Versantvoort, C., van de Kamp, E., Rempelberg, C. (2004). Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants, 1–85.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48(2), 333–349.
- Wang, J., Wang, X., Li, J., Chen, Y., Yang, W., y Zhang, L. (2015). Effects of Dietary Coconut Oil as a Medium-chain Fatty Acid Source on Performance, Carcass Composition and Serum Lipids in Male Broilers. *Ajas (Asian-Australasian Journal of Animal Sciences)*, 28(2), 223–230.
- Westergren, T., y Kalikstad, B. (2010). Dosage and formulation issues: oral vitamin E therapy in children. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66(2), 109–18.
- Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.-N., Zhao, X., Yang, J.-W., Wang, Z.-G., Lu, F.-G. (2011). Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in

rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 53.

Xing, F., Cheng, G., Yi, K., y Ma, L. (2005). Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins. *Journal of Applied Polymer Science*, 96(6), 2225–2229.

Yang, Y., Decker, E. A., Xiao, H., y McClements, D. J. (2015). Enhancing vitamin E bioaccessibility: factors impacting solubilization and hydrolysis of  $\alpha$ -tocopherol acetate encapsulated

Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M. E., Sher, A. A., y McClements, D. J. (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 398–406.

Yang, Y., y McClements, D. J. (2013). Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified  $\alpha$ -tocopherol acetate. *Food Chemistry*, 141(1), 473–481.

Yi, J., Li, Y., Zhong, F., y Yokoyama, W. (2014). The physicochemical stability and invitro bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions. *Food Hydrocolloids*, 35, 19–27.

## 9 APENDICES

### 9.1 Determinación de la concentración de Fosfolipasa A<sub>1</sub>

Para determinar la concentración de la Fosfolipasa A<sub>1</sub> se usó el método de cuantificación de proteínas de Kruger (2009), utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8453 (absorbancia a 595 nm) y albúmina de suero bovina como estándar (Figura 44). La concentración final de proteína fue de 1.58 mg/mL ± 0.7.

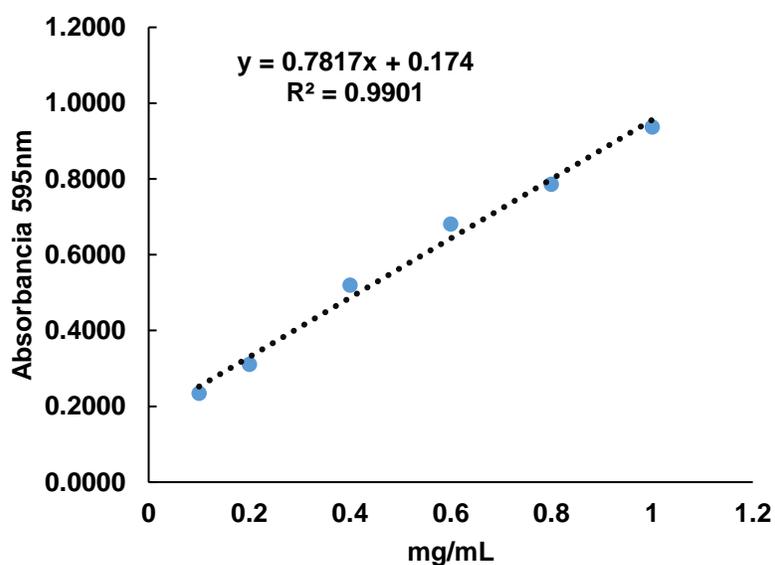
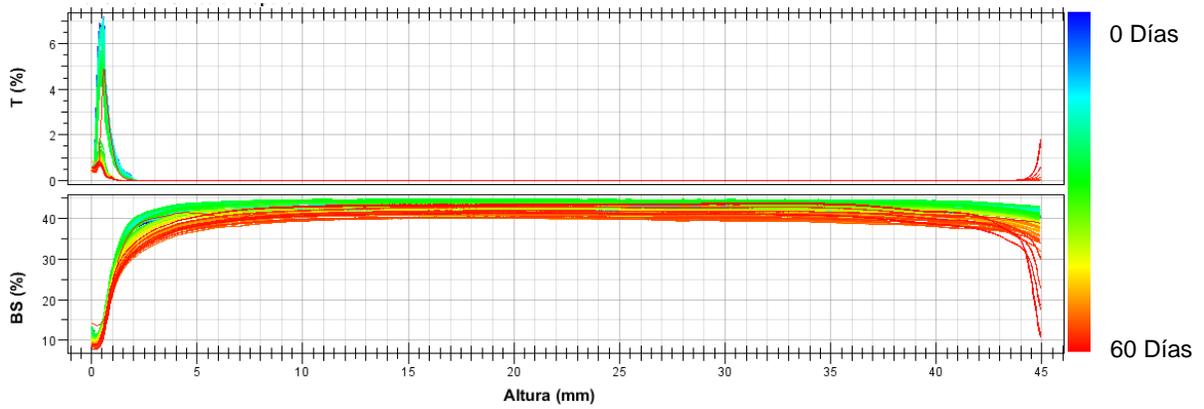


FIGURA 44. Curva de calibración de Proteína

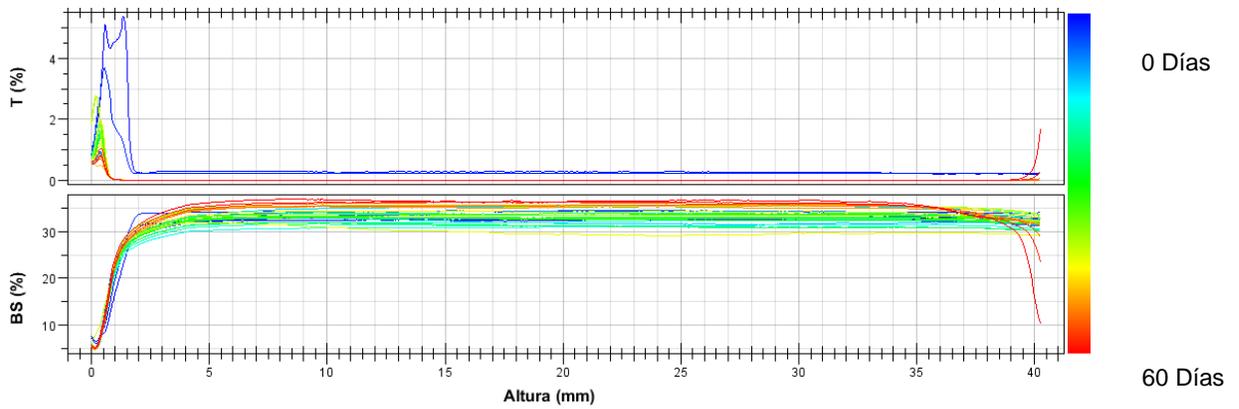
## 9.2 Gráficos de Turbiscan

Gráficos de nanoemulsiones sometidas a almacenamiento (4 °C) durante 60 días

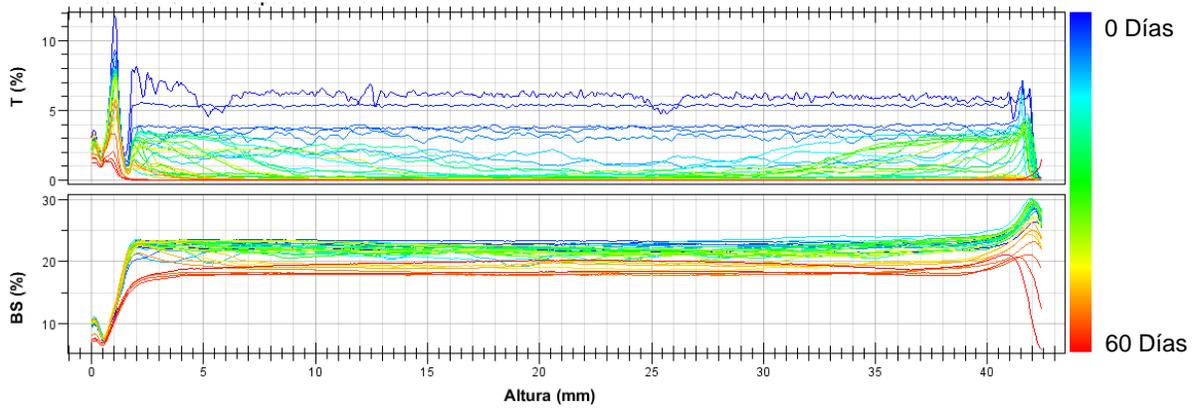
### Tratamiento T1



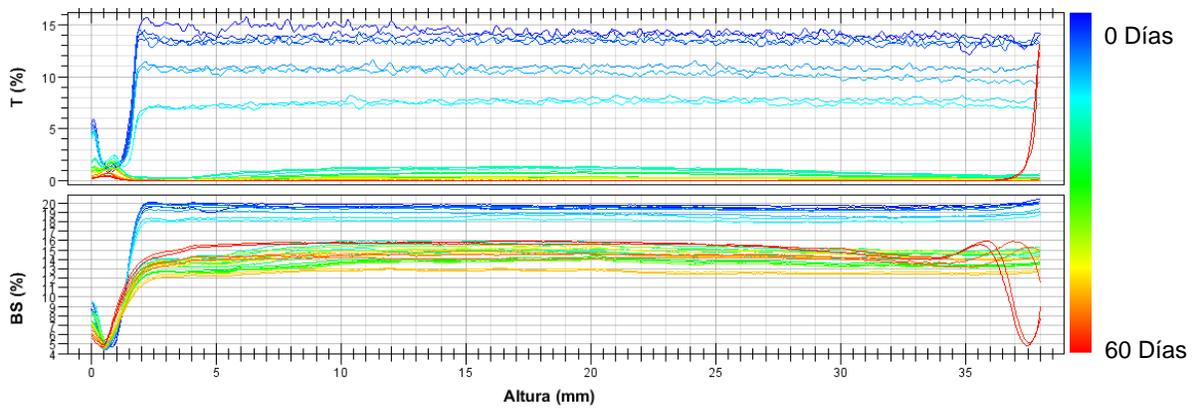
### Tratamiento T2



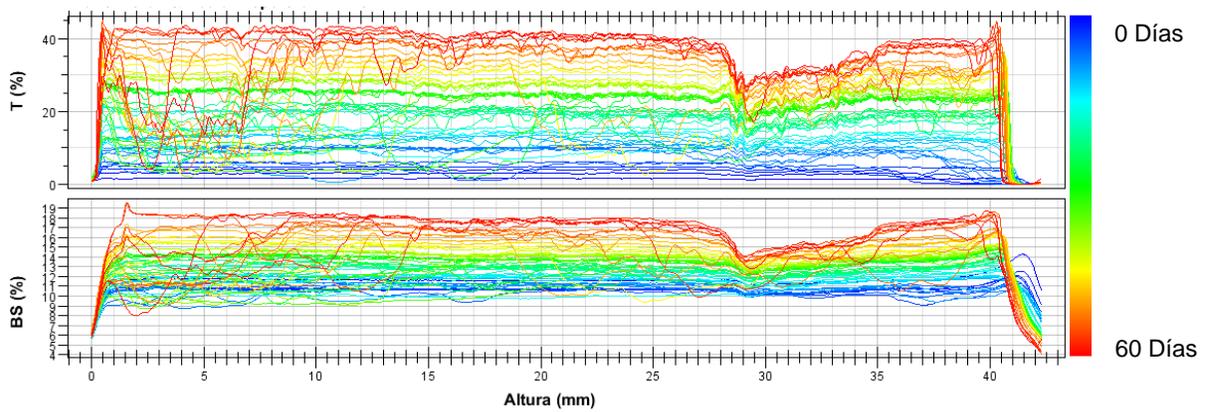
### Tratamiento T3



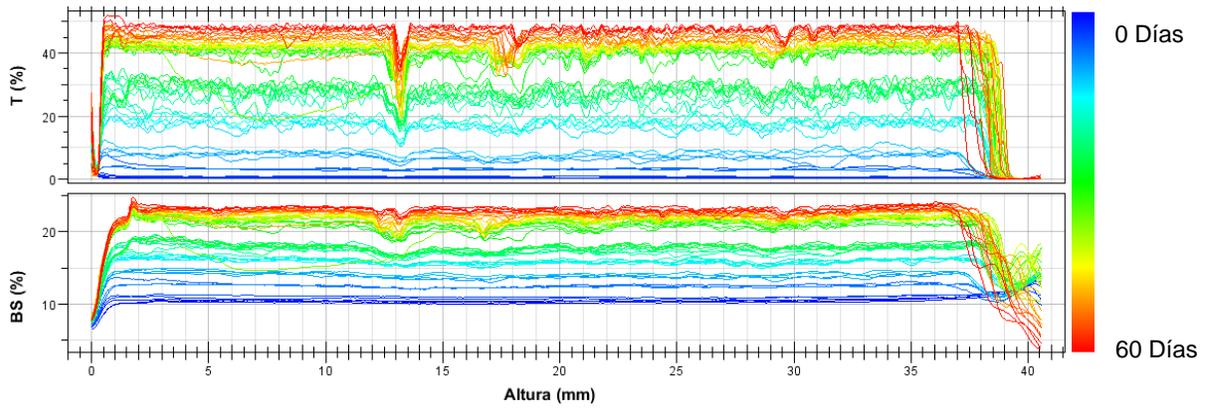
### Tratamiento T4



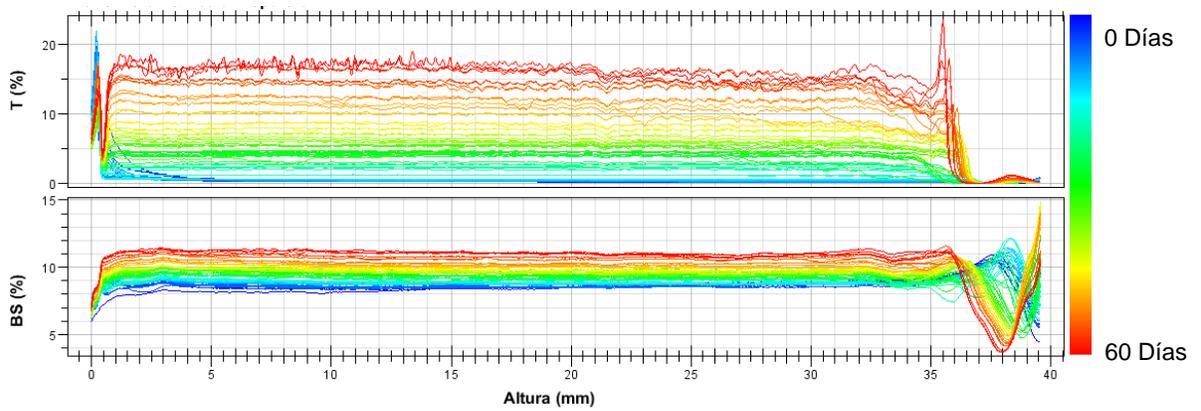
### Tratamiento T5



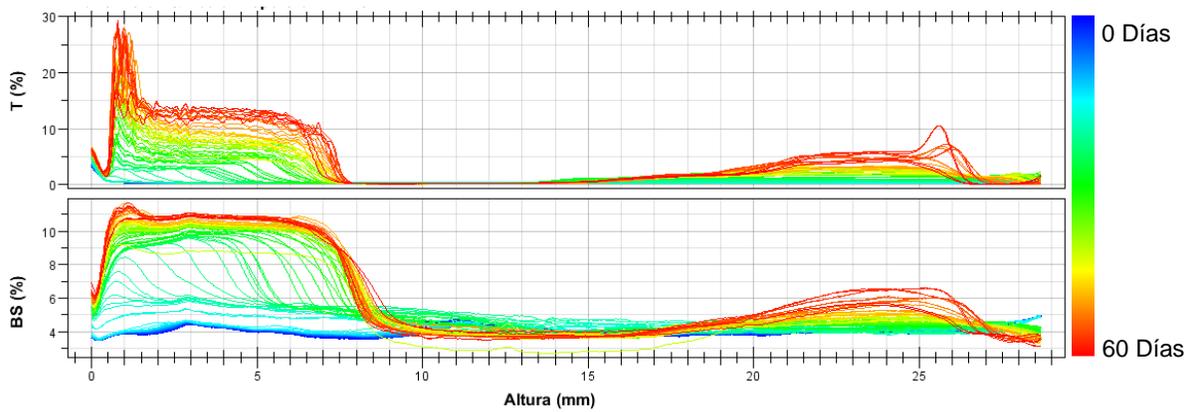
Tratamiento T6



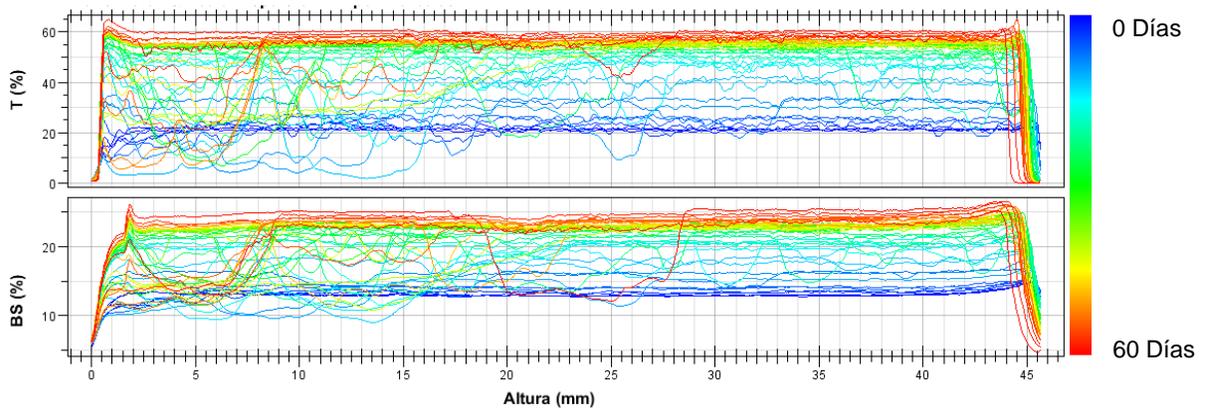
Tratamiento T7



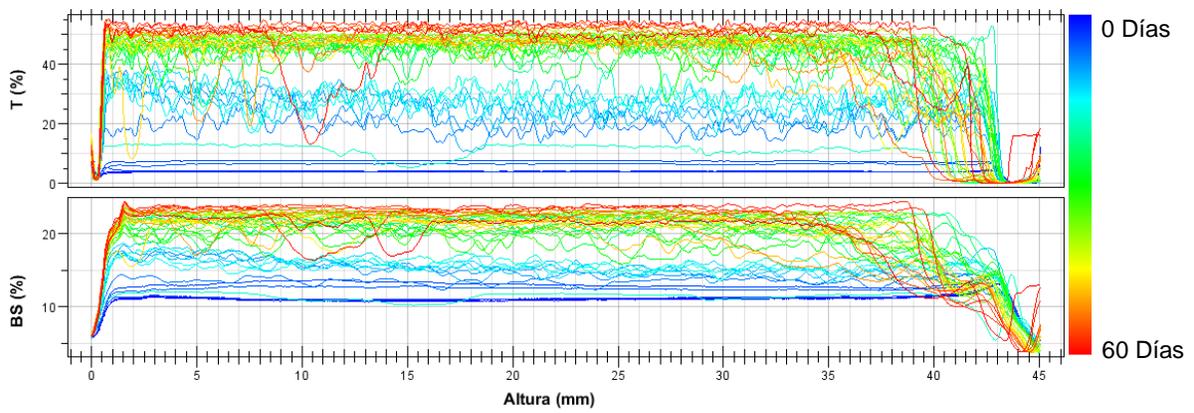
Tratamiento T8



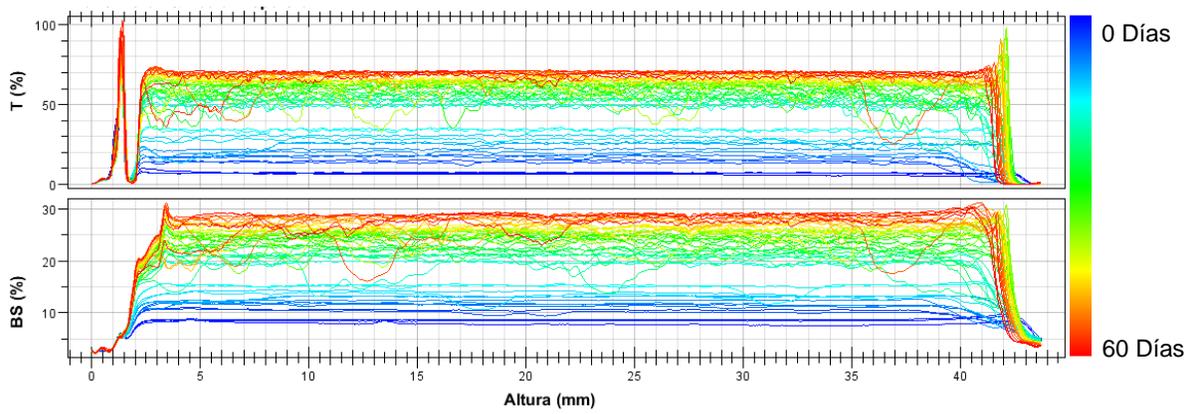
### Tratamiento T9



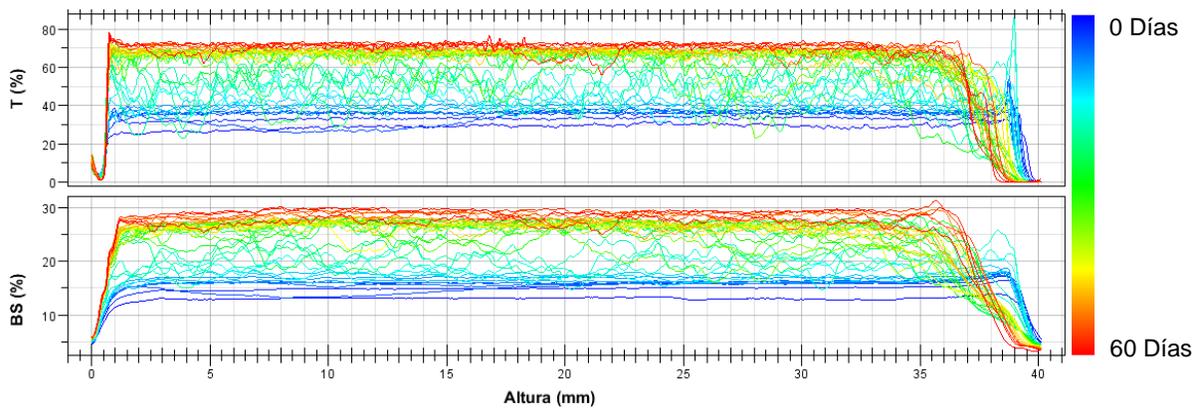
### Tratamiento T10



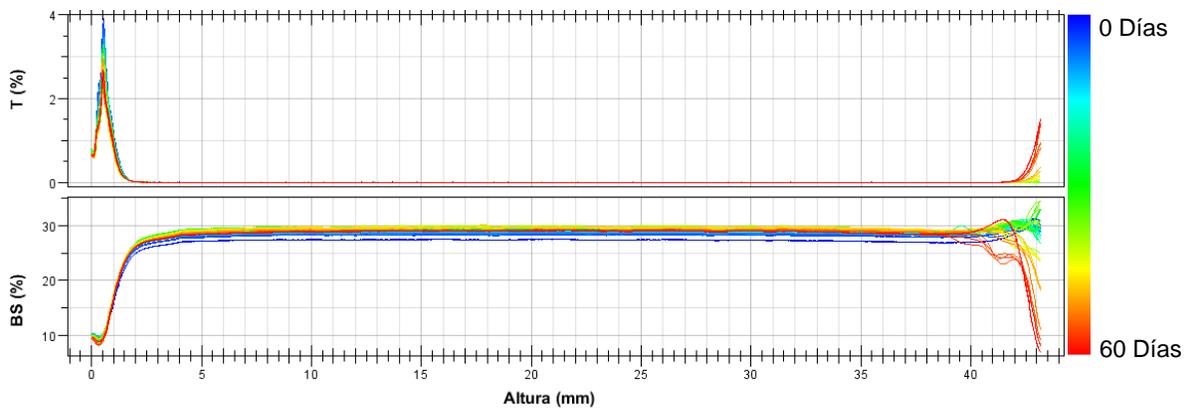
### Tratamiento T11



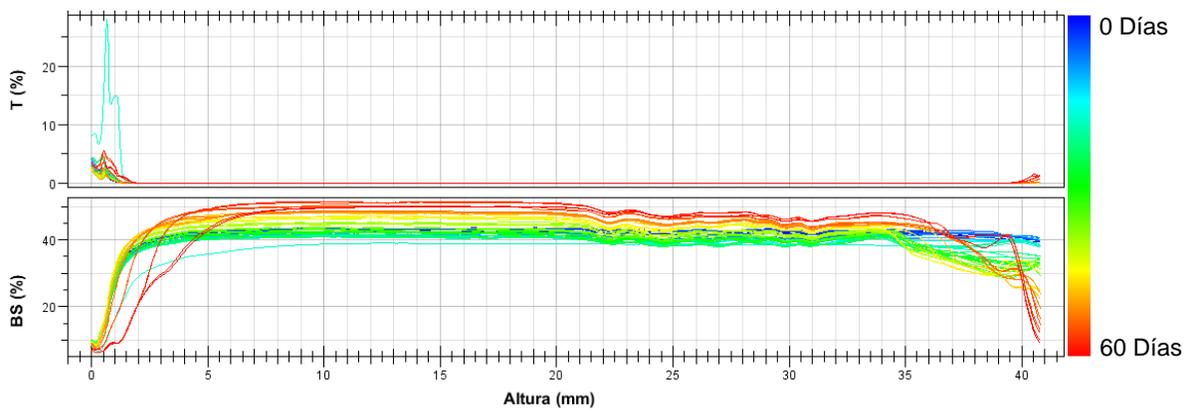
Tratamiento T12



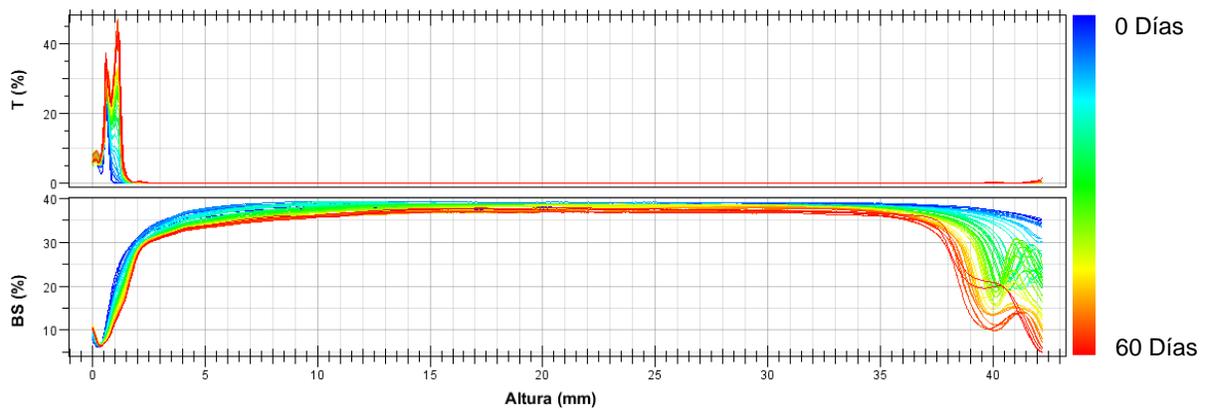
Tratamiento T13



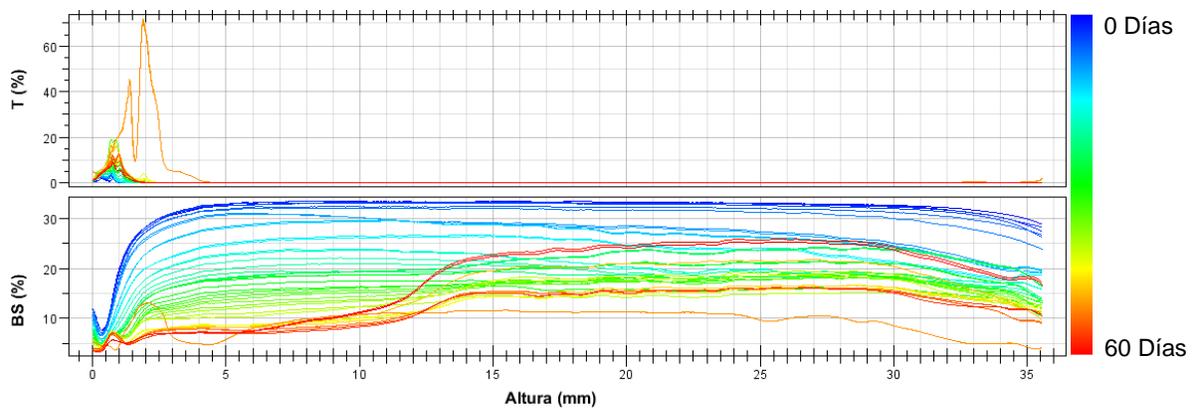
Tratamiento T14



Tratamiento T15

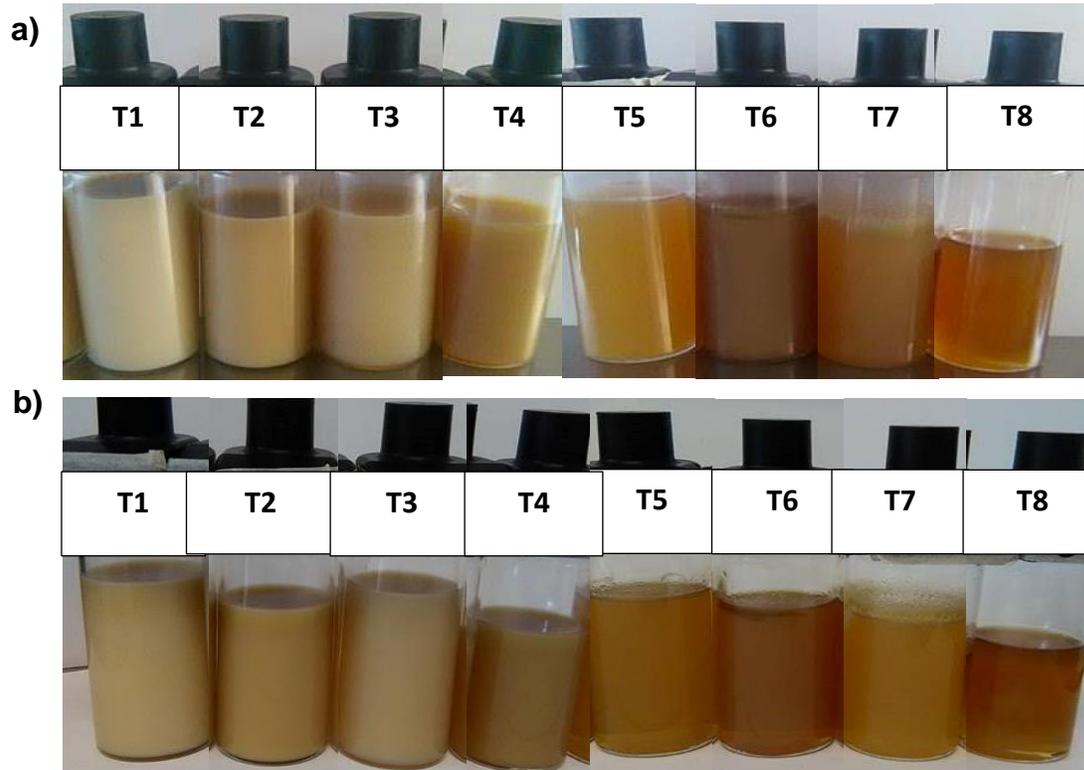


Tratamiento T16



**FIGURA 45. Gráficos de estabilidad de almacenamiento a 4 °C durante 60 días de los diferentes tratamientos: T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16**

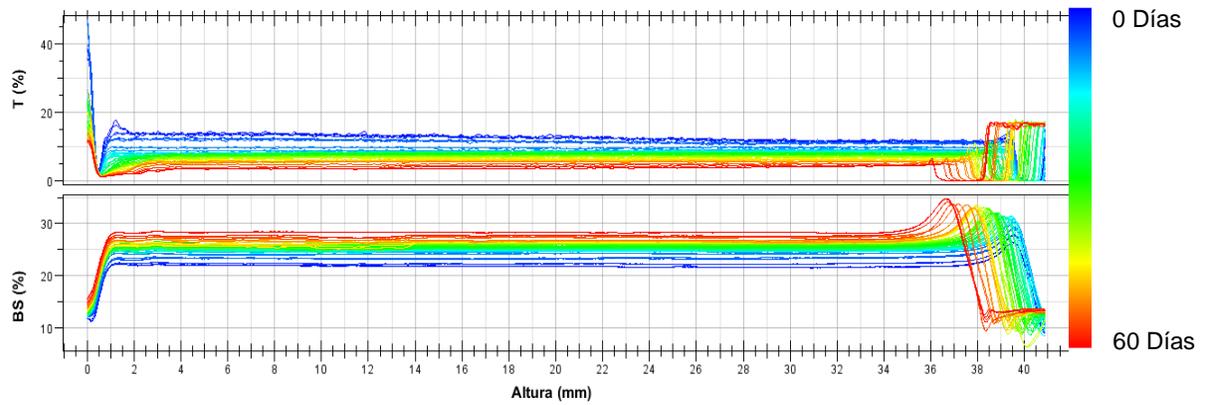
Formación de nanoemulsiones por ultrasonificación



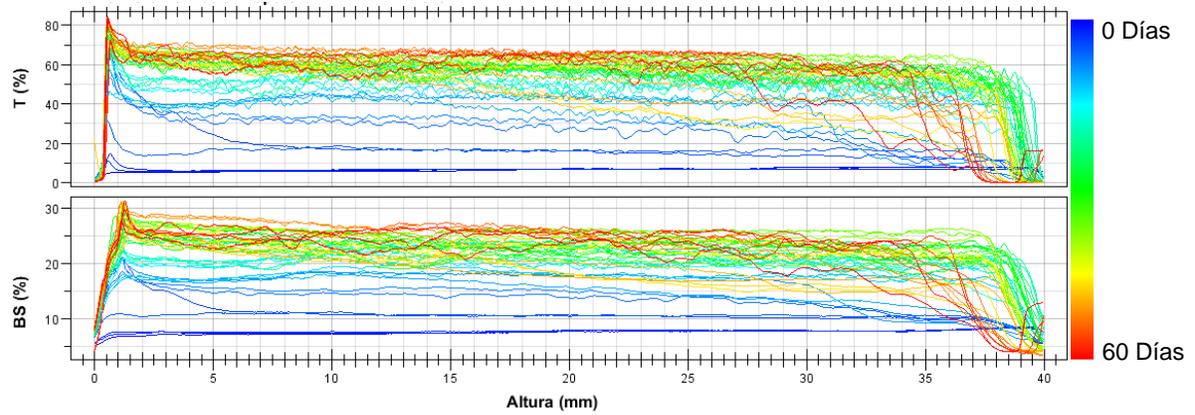
**FIGURA 46.** Nanoemulsiones elaboradas y evaluadas para su almacenamiento a 4 °C: a) obtenidas después de ultrasonicarlas (tiempo 0); b) nanoemulsiones después de 60 días de almacenamiento a una temperatura de 4 °C

Gráficos de nanoemulsiones sometidas a almacenamiento (25 °C) durante 60 días

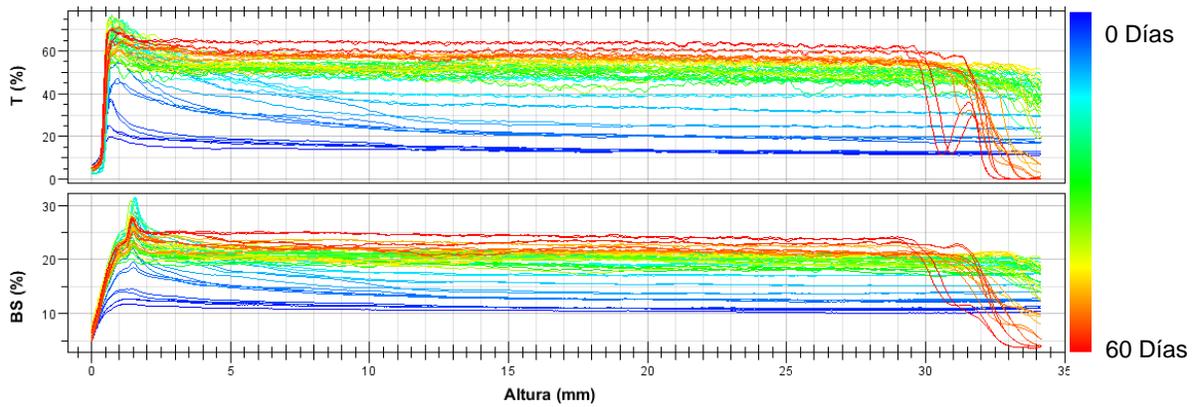
Tratamiento T4



Tratamiento T11

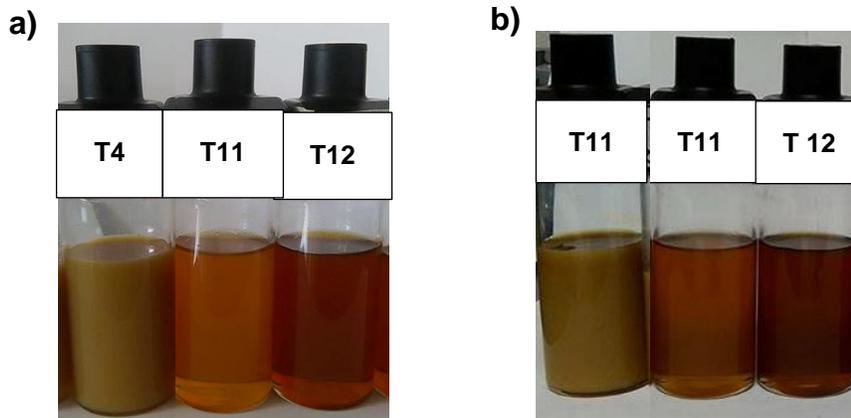


Tratamiento T12



**FIGURA 47. Gráficos de estabilidad de almacenamiento a 25 °C durante 60 días de los diferentes tratamientos: T4, T11, T12**

Formación de nanoemulsiones por ultrasonificación



**FIGURA 48. Nanoemulsiones elaboradas y evaluadas para su almacenamiento a 25 °C: a) obtenidas después de ultrasonificarlas (tiempo 0); b) nanoemulsiones después de 60 días de almacenamiento a una temperatura de 25°C**