



## **Secretaría de Educación Pública**

### **TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO** Instituto Tecnológico de Veracruz

#### **Caracterización físico-química de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con emulsificantes modificados**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.Q. María Victoria Paola Acevedo Estupiñan

Asesores:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

## DEDICATORIA

## AGRADECIMIENTOS

## RESUMEN

**Acevedo Estupiñan, Maria Victoria Paola. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Febrero de 2017. Caracterización físico-química de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles. Asesores: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López.**

Los fitoesteroles (FEs) son compuestos bioactivos de interés debido a su confirmada acción hipocolesteromiante. Actualmente existen y se desarrollan procesos para añadirlos en alimentos funcionales. Uno de los más prometedores es la formulación de nanoemulsiones que protegen el compuesto y permiten su solubilidad en matrices acuosas. Es muy importante evaluar las características físicas y químicas de la emulsión formulada, con el fin de determinar su estabilidad y la calidad del emulsificante utilizado. La fosfatidilcolina (PC), es un emulsificante que puede ser modificado enzimáticamente para mejorar su funcionalidad y valor nutricional. El objetivo de este estudio fue evaluar las características físico-químicas de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con PC y sus modificaciones (PC- $\omega$ 3, LPC-AGCM y LPC). Las emulsiones se formularon con una relación 10:1 de emulsificante:fitoesteroles libres, 4% de triglicéridos de cadena media y 30% de glicerol y agua. La estabilidad fisicoquímica de estas emulsiones se evaluó a 37°C durante 14 días, determinando el tamaño de partícula (TP), el potencial  $\zeta$ , el valor de peróxido (PV), el contenido de fitosteroles y sus productos de oxidación (POF); la estabilidad térmica se evaluó a 4 y 37°C durante 14 días, determinando TP, PV, y durante 1 mes, la separación de fases. Las emulsiones iniciales formuladas con PC- $\omega$ 3, fueron las más inestables y con mayor TP en la evaluación preliminar. En la evaluación durante 14 días la LPC-AGCM mostró el menor tamaño de partícula inicial y el mayor potencial  $\zeta$  con respecto a la PC nativa. Después de un almacenamiento de 14 días a 37 °C, ambas emulsiones mostraron un aumento en el TP, mientras que el potencial  $\zeta$  permaneció constante. Durante el almacenamiento, el PV fue estable en las emulsiones con LPC-AGCM en comparación con PC, en la cual se observó una ligera susceptibilidad a la oxidación. En cuanto a los POFs, sólo se detectaron óxidos de  $\beta$ -sitosterol en ambos sistemas, excepto los derivados epoxi que no se detectaron en las preparadas con LPC-AGCM. La evaluación a 4 y 37°C de PC y LPC evidenció la aceleración de las inestabilidades físicas y la oxidación con la temperatura y la dependencia de la oxidación con el grado de insaturaciones de los ácidos grasos del emulsificante. Las emulsiones LPC-AGCM mostraron mejor estabilidad química y las de PC alcanzaron una aun mejor estabilidad física, sin distar mucho en cuanto a estabilidad química con respecto a LPC-AGCM. Por lo tanto, se concluye que el sistema con mejores características fue el estabilizado con PC nativa.

## ABSTRACT

**Acevedo Estupiñan, Maria Victoria Paola. M.Sc. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. February 2017. Physico-chemical characterization of phytosterol O/W nanoemulsions. Advisors: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López.**

Phytosterols (PS) are bioactive compounds of interest because of their confirmed hypocholesterolemic action. Currently, processes are used and developed that allow them to be added to functional foods. One of the most promising approaches is the preparation of nanoemulsions, which protect the compound and allow its solubility in aqueous matrices. In its formulation, it is very important to assess the physical and chemical characteristics to determine its stability and the quality of the emulsifier used. Phosphatidylcholine (PC) is an emulsifier which can be modified enzymatically to improve their functionality and nutritional value. The objective of this study was to evaluate the physico-chemical characteristics of free phytosterols formulated with PC and enzymatically modified emulsifiers (PC- $\omega$ 3, LPC-AGCM and LPC). The emulsions were formulated with a 10:1 emulsifier:phytosterols ratio, 4% medium chain triglycerides, 30% glycerol and water. The physicochemical stability of emulsions was evaluated at 37°C for 14 days, determining the particle size (PS),  $\zeta$ -potential, peroxide value (PV), phytosterol content and phytosterol oxidation products (POP), and a thermal stability analysis at 4 and 37°C evaluating PS and PV by 14 days and phase separation by 1 month. The initial emulsions formulated with PC- $\omega$ 3 were the most unstable and with greater PS in the preliminary evaluation. In the evaluation for 14 days LPC-AGCM showed the lowest initial PS and the highest  $\zeta$ -potential with respect to PC. After storage for 14 days at 37 °C, both emulsions showed an increase in PS, while  $\zeta$ -potential remained constant. During storage, PV were stable in emulsions formulated with LPC-AGCM as compared to PC, in which PV showed a slight susceptibility to oxidation. As for the POPs, only oxides of  $\beta$ -sitosterol were detected in both systems, except for the epoxy derivatives which were not detected in the emulsions prepared with LPC. Evaluation of emulsions prepared with PC and LPC at 4 and 37 °C showed the acceleration of the physical instabilities with the temperature and the dependence of the oxidation with the temperature and the degree of fatty acids unsaturations in the emulsifier. In general, the O/W emulsions prepared with LPC-AGCM showed a better chemical stability while those made with PC exhibited better physical stability, without large differences in chemical stability with LPC-AGCM. We concluded that PC was the best emulsifier to prepare PS O/W functional nanoemulsions.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN .....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE TABLAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>1. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
1.1 COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	3
1.2 FITOESTEROLES (FE) .....	4
1.2.1 <i>Solubilidad</i> .....	6
1.2.2 <i>Oxidación</i> .....	7
1.2.3 <i>Beneficios para la salud</i> .....	11
1.2.4 <i>Modo de acción de los fitoesteroles</i> .....	13
1.2.5 <i>Sistemas acarreadores de fitoesteroles</i> .....	17
1.3 EMULSIONES .....	20
1.3.1 <i>Emulsificantes</i> .....	21
1.3.2 <i>Propiedades de las emulsiones</i> .....	28
1.3.3 <i>Caracterización de emulsiones</i> .....	30
1.3.4 <i>Estabilidad de las emulsiones</i> .....	39
1.3.5 <i>Métodos de emulsificación</i> .....	45
1.4 SÍNTESIS DE ANTECEDENTES .....	48
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>55</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
4.1. GENERAL.....	56

4.2.	ESPECÍFICOS .....	56
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
5.1.	REACTIVOS .....	57
5.2.	METODOLOGÍA .....	57
5.2.1.	<i>Preparación del emulsificante LPC .....</i>	<i>59</i>
5.2.2.	<i>Preparación de la nanoemulsiones .....</i>	<i>59</i>
5.2.3.	<i>Análisis de las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones .....</i>	<i>61</i>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
6.1.	FASE PRELIMINAR .....	67
6.1.1.	<i>Evaluación del tiempo de sonicación y la concentración de glicerol en la NE .....</i>	<i>67</i>
6.1.2.	<i>Producción de lisofosfatidilcolina .....</i>	<i>70</i>
6.1.3.	<i>Composición de ácidos grasos de los emulsificantes utilizados .....</i>	<i>72</i>
6.2.	PREPARACIÓN DE LAS NANOEMULSIONES .....	74
6.3.	CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LAS NANOEMULSIONES .....	75
6.3.1.	<i>Caracterización físico-química .....</i>	<i>77</i>
6.3.2.	<i>Características químicas .....</i>	<i>79</i>
6.4.	ESTABILIDAD DE LA NE CON RESPECTO A LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO .....	86
6.4.1.	<i>Tamaño de partícula .....</i>	<i>86</i>
6.4.2.	<i>Valor de peróxidos .....</i>	<i>87</i>
6.4.3.	<i>Evaluación de la estabilidad de las NE .....</i>	<i>88</i>
6.5.	MORFOLOGÍA DE LAS NANOEMULSIONES .....	92
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Contenido de fitoesteroles totales en algunos alimentos y aceites (Rozner y Garti, 2006) .....	4
<b>TABLA 2.</b> Emulsificantes utilizados generalmente en emulsiones alimenticias (Adaptada de McClements, 2016).....	25
<b>TABLA 4.</b> Diseño experimental fase preliminar .....	58
<b>TABLA 5.</b> Formulación de las emulsiones.....	60
<b>TABLA 6.</b> Composición emulsiones fase preliminar [%p/p].....	67
<b>TABLA 7.</b> Composición de ácidos grasos en %mol de los emulsificantes estudiados.....	72
<b>TABLA 8.</b> Fotografías de la preparación de las nanoemulsiones de fitoesteroles en sus 3 etapas. Preparación de las fases oleosas y acuosas; preparación de la pre-emulsión con el homogenizador Ultraturrax y preparación de la nanoemulsión con ultrasonificación para las emulsiones realizadas con los emulsificantes LPC y PC.....	74
<b>TABLA 9.</b> Estabilidad óptica a 4 y 37°C durante un mes de almacenamiento para las emulsiones realizadas con PC.....	89
<b>TABLA 10.</b> Estabilidad óptica a 4 y 37°C durante un mes de almacenamiento para las emulsiones realizadas con LPC .....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estructura química de los principales fitoesteroles y el colesterol. Adaptado de Zawistowski (2010) y Vanmierlo et al. (2013).....	5
<b>FIGURA 2.</b> Formula estructural de óxidos de esteroles con y sin insaturaciones en su anillo. R=H, colesterol. R=CH <sub>3</sub> , campesterol. R=C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , sitosterol (Vanmierlo et al., 2013).....	8
<b>FIGURA 3.</b> Autooxidación de esteroles (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).....	9
<b>FIGURA 4.</b> Oxidación de la cadena lateral de los esteroles (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).....	10
<b>FIGURA 5.</b> Principales factores de riesgo en enfermedades coronarias (Mackay y Mensah, 2004).....	12
<b>FIGURA 6.</b> Metabolismo y absorción del colesterol (Mathews et al., 2002).....	14
<b>FIGURA 7.</b> Reesterificación del colesterol y de los lípidos intestinales (Ros, 2003).....	14
<b>FIGURA 8.</b> Modo de acción de los fitoesteroles. FC: colesterol libre; CE: éster de colesterol (Zawistowski, 2010).....	15
<b>FIGURA 9.</b> Presencia de cristales de FE en las gotas de las emulsiones (Zychowski et al., 2016), Escala 10 µm. ....	19
<b>FIGURA 10.</b> Presencia de cristales de FE en nanoemulsiones (Ribeiro et al., 2016).....	20
<b>FIGURA 11.</b> (A) Micrografía de una emulsión con gotas de aceite dispersas en agua (McClements, 2004); (B) Componentes de una emulsión (McClements, 2009). ....	20

<b>FIGURA 12.</b> Representación esquemática de la formación y rompimiento de una emulsión (Tadros, 2009). .....	21
<b>FIGURA 13.</b> Estructura esquemática de diferentes clases de emulsificantes en la interface aceite-agua. (Rayner y Dejmek 2015) (a) Emulsificantes no iónico de bajo Peso Molecular (PM); (b) iónicos de bajo PM; (c) Macromoléculas anfifílicas con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas como las proteínas y almidones modificados; (d) partículas como gránulos de almidón, cristales de grasas y microgeles de proteína.....	22
<b>FIGURA 14.</b> Estructura química de los fosfolípidos (Cui y Decker, 2015).....	26
<b>FIGURA 15.</b> Organización estructural de fosfolípidos (Vikbjerg, 2006). .....	27
<b>FIGURA 16.</b> Media, moda y mediana en una distribución típica de tamaños de partícula (Malvern, 2015). .....	32
<b>FIGURA 17.</b> Esquema microscopio electrónico de transmisión. (Kuntsche et al., 2011). (A) Esquema de un microscopio electrónico de transmisión y del trayecto de electrones. (B) Esbozo de un porta muestras con funciones suplementarias integradas para cryo-TEM. (C) Sistema automatizado de vitrificación de muestras para cryo-TEM.....	36
<b>FIGURA 18.</b> Esquema funcionamiento de la técnica DLS en el equipo ZetaSizer Nano ZS90. (Malvern Inc. 2013). .....	38
<b>FIGURA 19.</b> Potencial $\zeta$ (Malvern Inc., 2013). .....	39
<b>FIGURA 20.</b> Diagrama esquemático de los mecanismos de inestabilidad más comunes que pueden ocurrir en las emulsiones (Chung y McClements, 2014).....	40
<b>FIGURA 21.</b> Esquema funcionamiento del equipo Turbiscan (Formulation, 2013). .....	43

<b>FIGURA 22.</b> Principio de operación del rotor estator del agitador Ultraturrax (IKA, 2013).....	46
<b>FIGURA 23.</b> Sonicador Branson.....	48
<b>FIGURA 24.</b> Cuadro Metodológico.....	58
<b>FIGURA 25.</b> Efecto de la concentración de glicerol y la amplitud en el tamaño de partícula de la nanoemulsión. Emulsiones realizadas a 40, 80 y 120 W de potencia con un 10% (A), 20%(B) y 30% (C) de glicerol. Producción enzimática de lisofosfatidilcolina.....	68
<b>FIGURA 26.</b> Cinética de conversión de PC a LPC. La reacción enzimática se realizó a 60°C, 300 rpm en hexano y con PLA1 como enzima.....	70
<b>FIGURA 27.</b> Cromatograma de la reacción de hidrólisis obtenido para la conversión de PC a LPC. A. Área de PC y LPC antes de comenzar la reacción enzimática, tiempo 0. B. Área de PC y LPC a los 120 minutos de reacción enzimática.....	71
<b>FIGURA 28.</b> Evaluación preliminar de tamaños de partícula de las emulsiones formuladas con PC, LPC, LPC-AGCM y PC- $\omega$ 3 durante 4 días a 37°C .....	76
<b>FIGURA 29.</b> Tamaño de Partícula de las emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM como emulsificantes. Tiempo de almacenamiento 14 días a 37°C .....	77
<b>FIGURA 30.</b> Comparación NE obtenidas por Riberiro (2016) y el presente trabajo .....	78
<b>FIGURA 31.</b> Potencial $\zeta$ de las emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM como emulsificantes. Tiempo de almacenamiento 14 días a 37°C .....	79
<b>FIGURA 32.</b> Valor de peróxidos emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM como emulsificantes. Almacenados a 37°C por 14 días.....	80

<b>FIGURA 33.</b> Contenido de fitoesteroles en las emulsiones preparadas con los emulsificantes PC y LPC-AGCM. Almacenadas a 37°C por 14 días.....	82
<b>FIGURA 34.</b> Tipo y cantidad de fitoesteroles encontrados en las emulsiones preparadas con los emulsificantes PC y LPC-AGCM. Almacenadas a 37°C por 14 días. ....	83
<b>FIGURA 35.</b> Contenido total de óxidos de fitoesteroles en las emulsiones formuladas con PC y LPC-AGCM. Almacenadas durante 14 días a 37°C. ....	84
<b>FIGURA 36.</b> Productos de oxidación del $\beta$ -sitosterol en las emulsiones preparadas con PC y LPC durante el almacenamiento. Los datos son mostrados como replicas individuales. ....	85
<b>FIGURA 37.</b> Tamaño de Partícula de las emulsiones preparadas con PC y LPC como emulsificantes. Tiempo de almacenamiento 12 días a 37°C y 4°C. ....	87
<b>FIGURA 38.</b> Valor de peróxido de NE de FE evaluadas durante 14 días a 37 y 4 °C .....	88
<b>FIGURA 39.</b> Estabilidad de las NE formuladas con PC (izq) y LPC (der) a 37°C (izq) y a 4°C (der) después de 1 mes de almacenamiento. ....	92
<b>FIGURA 40.</b> Micrografías Cryo-TEM de nanoemulsiones de fitoesterol formuladas con fosfatidilcolina. ....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

PC: Fosfatidilcolina

PC- $\omega$ 3: Fosfatidilcolina modificada con ácidos grasos omega tres

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPC-AGCM: Lisofosfatidilcolina modificada con ácidos grasos de cadena media

NE: Nanoemulsiones

O/W: Aceite en agua

FE: Fitoesteroles

POFs: Productos de oxidación de los fitoesteroles

TCM: Triglicéridos de cadena media

TP: tamaño de partícula

HCL: Hipercolesterolemia

CG: cromatografía de gases

## INTRODUCCIÓN

Los fitoesteroles (FE) son triterpenos con un cuerpo esteroide y cadena lateral alquílica muy parecidos tanto en estructura como en funcionalidad al colesterol. Estos compuestos se encuentran en la membrana celular de las plantas y han sido clasificados como lípidos funcionales debido a su actividad hipocolesterolemizante ampliamente comprobada en varios ensayos *in vivo* (Engel y Schubert, 2005; Ostlund, 2007; Leong *et al.*, 2011a).

Los altos niveles de colesterol en sangre  $\geq 200$  mg/dL son uno de los principales factores de riesgo en las enfermedades coronarias como: arritmia o infarto agudo de miocardio. A pesar que los fitoesteroles se consumen diariamente en las dietas regulares, su ingesta promedio en adultos esta entre 150-450 mg al día, muy por debajo de la dosis efectiva de 2000 mg al día que recomienda la FDA para que los fitoesteroles disminuyan el riesgo de enfermedades coronarias (FDA, 2010). Es por esto que desde hace 15 años se han desarrollado alimentos funcionales que permitan administrar esta dosis en 1, o máximo 4 porciones como lo especifica la FDA (Zawistowski y Jones, 2015).

Dentro de los diferentes métodos para incorporar los FE en alimentos, el más utilizado es la esterificación con ácidos grasos, puesto que mejora su solubilidad en matrices lipídicas como mantequillas, margarinas, queso crema y yogures, entre otros alimentos ricos en grasas. La principal desventaja de incorporarlos de esta manera es que junto con los FE se añaden alrededor de un 20% de lípidos que no son recomendables en una dieta saludable. Es por esto que se han investigado otros métodos para incorporar los FE libres en matrices acuosas, que permitan reducir la ingesta adicional de ácidos grasos. Una de las maneras más promisorias para cumplir este propósito es la incorporación de los FE a sistemas acarreadores como nanoemulsiones, puesto que coadyuvan a proteger el compuesto bioactivo de la oxidación y degradación, a

controlar su liberación y, además, al disminuir el tamaño de partícula en la emulsión se mejora su estabilidad y biodisponibilidad.

En la formulación de nanoemulsiones es muy importante evaluar sus características físicas y químicas con el fin de determinar su estabilidad y la calidad del emulsificante utilizado. Los fosfolípidos son emulsificantes comunes y naturales que, además, pueden ser modificados enzimáticamente para mejorar su funcionalidad y valor nutricional. La fosfatidilcolina (PC), es uno de los fosfolípidos más ampliamente utilizados en las emulsiones alimentarias, el cual además de poseer una alta actividad emulsificante, ejerce actividad antioxidante mediante la inhibición de la formación de hidroperóxidos lipídicos y la quelación de metales pro-oxidantes en emulsiones de aceite en agua (O/W). El objetivo de este estudio fue evaluar las características físico-químicas de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con PC y emulsificantes modificados enzimáticamente (PC- $\omega$ 3, LPC-AGCM y LPC).

# 1. REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.1 Compuestos bioactivos

El papel más importante de la nutrición balanceada es asegurar una adecuada ingesta de nutrientes y contribuir a la salud humana sostenida. Este es un reto para la industria alimentaria ya que los consumidores no sólo demandan alimentos saludables, sino también ricos y convenientes (Schwager *et al.*, 2008). Es por esto que se han invertido grandes esfuerzos en investigación y desarrollo de alimentos más sanos y nutritivos. Actualmente, más del 80% de los compuestos activos extraídos de las plantas se utilizan en alimentos y más del 30% de los medicamentos son producidos a partir de productos naturales bioactivos (Ren *et al.*, 2013; Bonilla *et al.*, 2015).

Los productos naturales bioactivos o fitoquímicos, son generalmente metabolitos (primarios o secundarios) de las plantas que tienen la capacidad para reducir el riesgo de enfermedades a través de una amplia gama de actividades biológicas. Dependiendo de sus características y estructura química se pueden clasificar en tres grupos: compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides (Madrid y Madrid, 2006).

Sin embargo, su baja solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad y especificidad, junto con los efectos secundarios observados a altas concentraciones, han limitado su aplicación (Wang *et al.*, 2014). Además, cuando estos fitoquímicos se añaden a diferentes matrices alimenticias o farmacéuticas, puede ser necesario diseñar un sistema de liberación que garantice la efectividad del compuesto, y así evitar su pérdida y oxidación debido a algunos factores ambientales (luz, oxígeno entre otros) o enmascarar algún sabor u olor, y así mantener la conveniencia sensorial total del producto alimenticio (Bonilla *et al.*, 2015). Esto ha conducido a los científicos a enfocar sus esfuerzos y énfasis en el desarrollo y mejoramiento de sistemas protectores y acarreadores de los compuestos bioactivos.

## 1.2 Fitoesteroles (FE)

Los fitoesteroles son compuestos de origen vegetal que pertenecen a la familia de los lípidos, se encuentran en aceites vegetales, semillas, nueces, hojas y tallos. La mayor cantidad de FE se encuentra en los arboles coníferos 2-5%, seguido de los aceites vegetales (0.1-1%) (Verleyen *et al.*, 2002) nueces, cereales y en menor cantidad en frutas y verduras (Leal-Castañeda *et al.*, 2015). En la Tabla 1 se enlista el contenido de fitoesteroles total de algunos alimentos y aceites vegetales, una lista más completa se puede encontrar en Bacchetti *et al.* (2011).

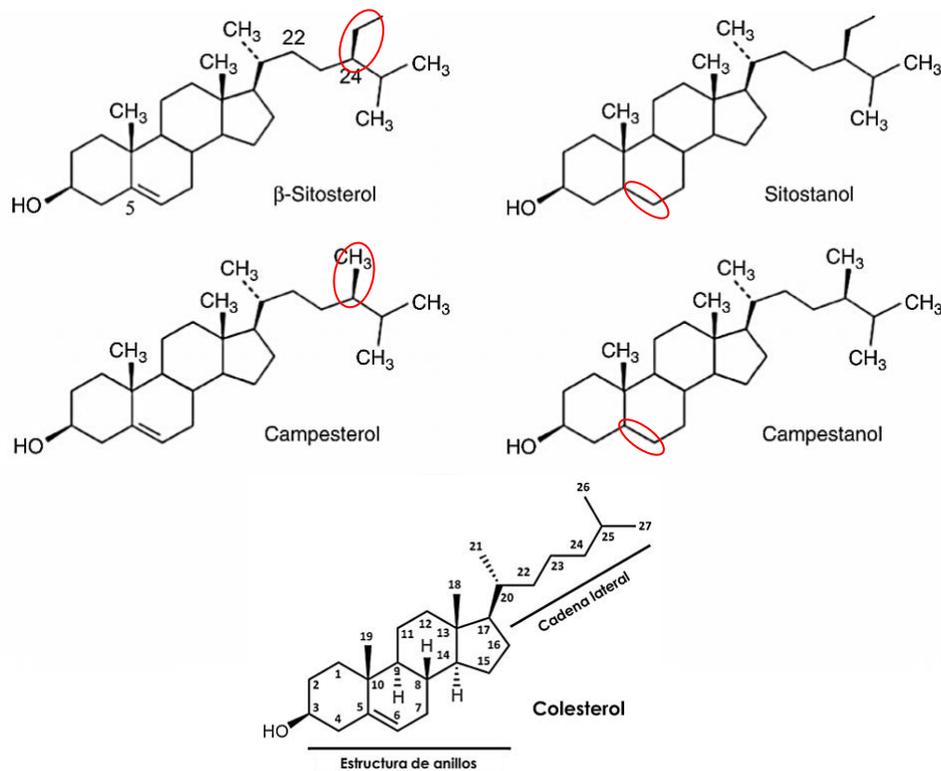
**TABLA 1. Contenido de fitoesteroles totales en algunos alimentos y aceites** (Rozner y Garti, 2006).

<b>Alimento</b>	<b>Fitoesteroles (mg/100g porción)</b>
<b>Aceite de maíz</b>	952
<b>Aceite de girasol</b>	725
<b>Aceite de oliva</b>	176
<b>Almendras</b>	143
<b>Fríjoles</b>	76
<b>Maíz</b>	70
<b>Trigo</b>	69
<b>Lechuga</b>	38
<b>Banano</b>	16
<b>Manzana</b>	12

En las plantas, los fitoesteroles se pueden encontrar de varias formas: como alcoholes libres, como esteres (esterificados con ácidos grasos de cadena larga, o con ácido ferúlico, como en el aceite de salvado de arroz – $\gamma$ -orizanol), como esteril glucósidos y como esteril glucósidos acetilados (Moreau *et al.*, 2002).

Existen aproximadamente 200 tipos de fitoesteroles (Muñoz *et al.*, 2011), los más comunes son el  $\beta$ -sitosterol (65%), campesterol (32%) y estigmasterol (3%) (Vanmierlo

*et al.*, 2013). Químicamente, los fitoesteros son triterpenos, compuestos por un esqueleto de esteroides y una cadena lateral alquílica. Son muy parecidos en estructura al colesterol (Figura 1), se diferencian principalmente por los sustituyentes en el carbono 24 de la cadena lateral, por ejemplo, grupos metilo (campesterol) o etilo (sitosterol). Además, la adición de un doble enlace en la posición 22 es única del estigmasterol (Zawistowski, 2010). Los fitoesteros son esenciales para establecer y regular la fluidez y permeabilidad en las membranas celulares de las plantas. Los fitoesteros se utilizan principalmente en la industria alimentaria, al ser compuestos bioactivos. En otras industrias, como la cosmética se aprovecha su acción humectante, regeneradora y antioxidante para producir pomada de labios (lipstick), acondicionadores y cremas (Fernandes y Cabral, 2007; Muñoz *et al.*, 2011; Xinmei *et al.*, 2015).



**FIGURA 1. Estructura química de los principales fitoesteros y el colesterol.**  
Adaptado de Zawistowski (2010) y Vanmierlo *et al.* (2013)

### 1.2.1 Solubilidad

Los fitoesteroles son compuestos lipofílicos, que por su naturaleza son prácticamente insolubles en soluciones acuosas. Su solubilidad en grasas y aceites es limitada y depende del tipo de aceite, así como de la temperatura. Son parcialmente solubles en solventes orgánicos apolares como hexano, iso-octano, cloroformo y 2-propanol. Es posible incorporar del 10-20% de los fitoesteroles en aceites vegetales a 50-80°C; sin embargo, los fitoesteroles tienden a cristalizarse al enfriarse (Engel y Schubert, 2005). El alto punto de fusión de los fitoesteroles (138-145°C) claramente afecta su solubilidad (Vaikousi *et al.*, 2007).

La adición de agua a los aceites tiende a disminuir la solubilidad de los fitoesteroles a la mitad (Christiansen *et al.*, 2002). Por ejemplo, se puede disolver de 3.5-4% de  $\beta$ -sitosterol en aceite que contiene triglicéridos de cadena media, pero si a ese aceite se le añade un 10% de agua, la solubilidad del mismo esteroles desciende a 1.5-2%. La baja solubilidad de los fitoesteroles en las mezclas aceite en agua, puede ser explicada por la formación de cristales monohidratados. Generalmente los fitoesteroles se solubilizan mejor en aceites más polares como los diacilglicéridos, debido a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura (Vaikousi *et al.*, 2007).

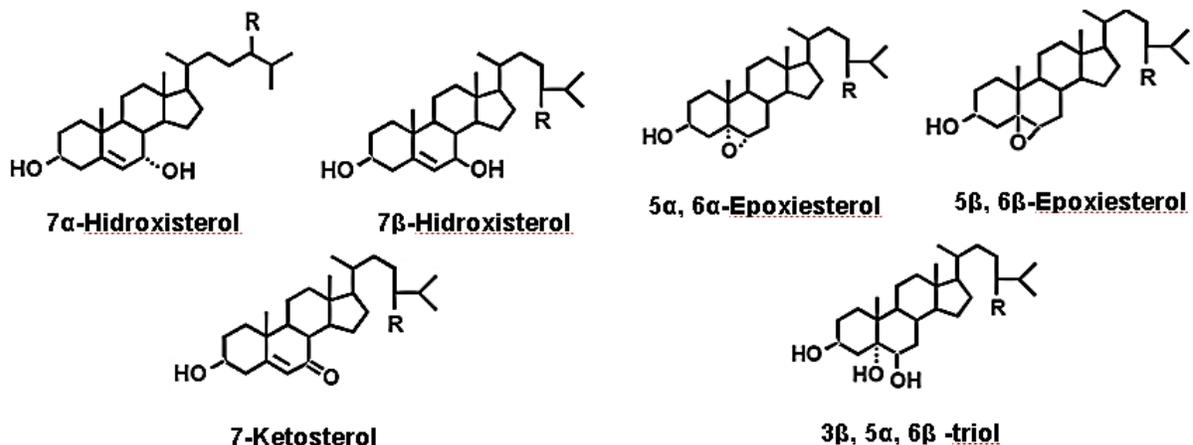
Una de las soluciones que demostró aumentar la solubilidad de los fitoesteroles en lípidos se introdujo al final de la década de los 80's, y aún es muy utilizada. Esta consiste en esterificar los fitoesteroles con ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, lo que permite que los fitoesteroles se incorporaren a alimentos de base grasa como margarinas, aderezos y yogures, aumentando su solubilidad hasta 10 veces (Ostlund, 2002). Esto también se asocia con una disminución en el punto de fusión de los fitoesteroles; es más, al esterificar los fitoesteroles incluso con ácidos grasos de cadena media (C8-C12) se consigue una disminución del punto de fusión de aproximadamente 40°C. Los esteres de fitoesteroles comerciales, esterificados con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tienen puntos de fusión en el rango de 25-45°C (ADM, 2007). El mayor inconveniente de esterificar los fitoesteroles para adicionarlos a matrices alimenticias es el aumento en el aporte calórico obtenido de fuentes lipídicas, lo cual es muy perjudicial en productos de dieta o bajos en grasa,

mercado objetivo de los fitoesteroles. Además, los ácidos grasos con los cuales se esterifican y disuelven los fitoesteroles pueden acelerar su oxidación (Soupas *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Oxidación

Como todos los lípidos insaturados, los fitoesteroles son propensos al ataque de especies reactivas de oxígeno, dando como resultado los productos de oxidación de fitoesteroles: POFs (González-Larena *et al.*, 2011). Estos POFs pueden ser compuestos polares (hidroxi-, ceto-, epoxi- y derivados triol) y no polares (esteradienos y esteratrienos), que reducen el contenido inicial de fitoesteroles y disminuyen o eliminan su eficacia (Dutta, 2004).

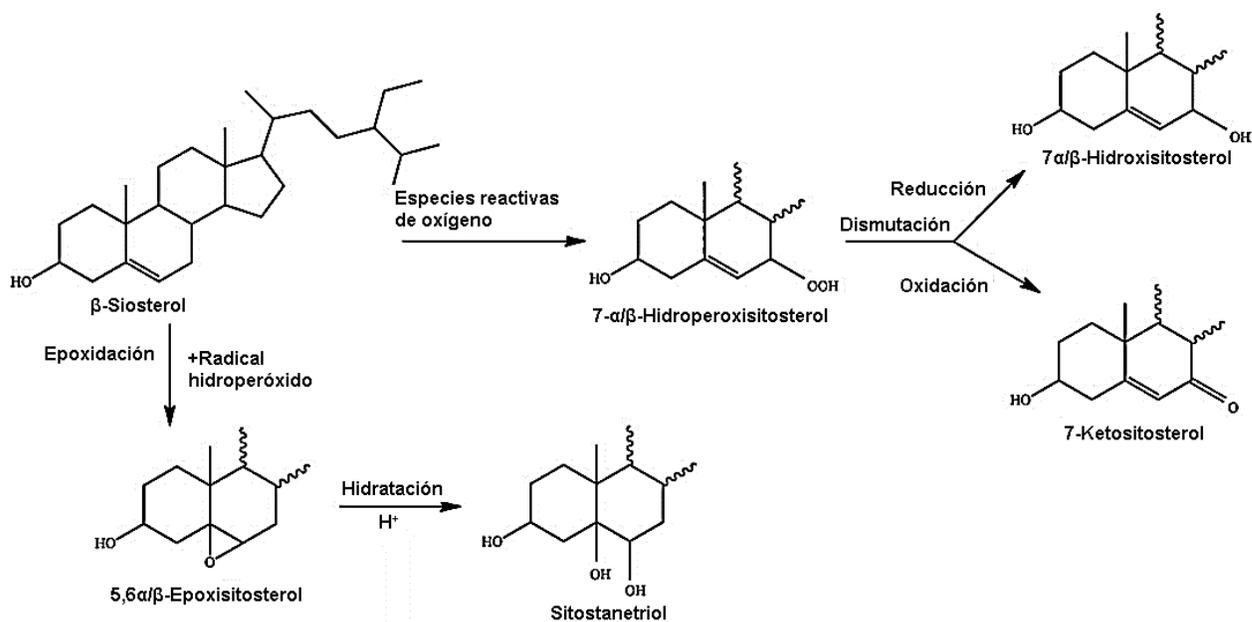
Es importante conocer el comportamiento térmico de los fitoesteroles debido a su incorporación en alimentos funcionales, que pueden ser expuestos de diversas maneras al calor durante diferentes etapas (procesamiento, almacenamiento, transporte, consumo, entre otras), para mantener las propiedades, calidad y seguridad de los productos enriquecidos con fitoesteroles. Los POFs pueden ejercer efectos tóxicos comparables cualitativamente a los productos de oxidación del colesterol (POCs), que han sido extensamente estudiados y están implicados en la iniciación y progresión de enfermedades crónicas como diabetes, aterosclerosis, neurodegeneración, y son generadores de mutaciones (González-Larena *et al.*, 2015; Oehrl y Boyd, 2004). Sin embargo, debido a que su absorción intestinal (5%) es mucho menor que el colesterol (70%), sus efectos son cuantitativamente menos nocivos (Vanmierlo *et al.*, 2013; Zawistowski, 2010). Los POFs predominantes son los resultantes de la oxidación de los fitoesteroles más abundantes:  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol. Una comparación entre los POFs y POCs se puede observar en la Figura 2.



**FIGURA 2. Formula estructural de óxidos de esteroides con y sin insaturaciones en su anillo. R=H, colesterol. R=CH<sub>3</sub>, campesterol. R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, sitosterol (Vanmierlo *et al.*, 2013).**

Los POFs se forman mediante oxidación enzimática o no enzimática. La oxidación no enzimática es un mecanismo de radicales libres que puede ser iniciado por diversos factores como luz, calor, aire, agua y metales de transición. Diversas especies reactivas de oxígeno pueden oxidar a los fitoesteroides como: oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), catión dioxígeno ( $\text{O}_2^+$ ), hidroperóxidos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

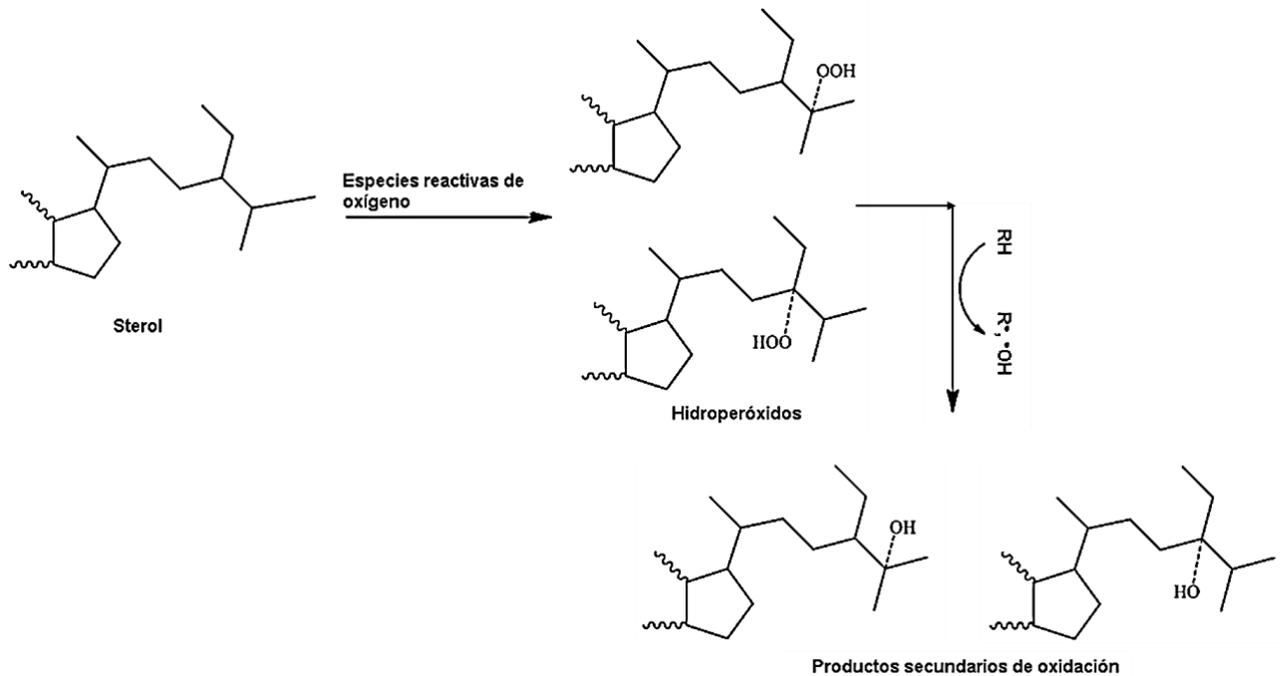
El mecanismo más común de oxidación de los esteroides es la autooxidación (o termo-oxidación) con el oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ). Esta reacción inicia al remover un hidrógeno del carbono 7 en los anillos, formando un radical libre que al estar en contacto con el oxígeno triplete producen el radical  $3\beta$ -hidroxicolest-5-en-7-peroxilo. Estos productos son estabilizados al abstraer más hidrógenos de los anillos que se añaden a estos radicales, dando como resultado productos más estables como el 7-hidroperóxido. La dismutación del 7-hidroperóxido forma los compuestos  $7\alpha$ -hidroxiesterol,  $7\beta$ -hidroxiesterol y 7-cetosterol, que son más estables (Figura 3) (Dutta, 2004; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).



**FIGURA 3. Autooxidación de esteroides** (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

También se pueden formar epóxidos y trioles en la estructura de los anillos; esto ocurre cuando se encuentran una molécula no oxidada de esteroide y un radical hidropéroxido, dando como resultado tanto  $\alpha$  como  $\beta$ -epóxidos (Figura 3). Es común encontrar estos productos en la autooxidación a elevadas temperaturas; sin embargo, los trioles solo se forman al ser hidratados o expuestos a un ambiente ácido (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

Otros óxidos que se pueden encontrar son los productos de oxidación en la cadena lateral, aunque generalmente se producen en menor cantidad que la autooxidación, como los derivados 20-hidroperóxido, 24-hidroperóxido, 25-hidroperóxido y 26-hidroperóxido que conducen a la formación, por ejemplo, del 24 o 25-hidroxisitosterol. Su mecanismo de oxidación es parecido al descrito para la oxidación en los anillos y los productos generados se denominan POFs de cadena lateral (Figura 4) (Dutta, 2004; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).



**FIGURA 4. Oxidación de la cadena lateral de los esteroides** (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011).

Los POFs se reportan en la mayoría de los estudios después de exponer al calor los fitoesteroides (180°C) durante al menos 1h; sin embargo, exposiciones cortas, como la ultrapasteurización (135°C, por 2 segundos) no producen POFs. Los ésteres de fitoesterol son más susceptibles a la oxidación térmica debido a la mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con los esteroides libres (Zawistowski, 2010).

En cuanto a los efectos biológicos de los POFs, la mayoría son controversiales; hay evidencia que demuestra su potencial aterogénico y proinflamatorio, por una parte, así como efectos citotóxicos y pro-apoptóticos que pueden ser utilizados para prevenir la carcinogénesis por otra parte. También se les atribuyen efectos androgénicos, disminución de depósitos de grasa visceral, reducción de la ganancia de peso, triglicéridos séricos y glucosa en sangre (DFG, 2014; Leal-Castañeda *et al.*, 2015).

### 1.2.3 Beneficios para la salud

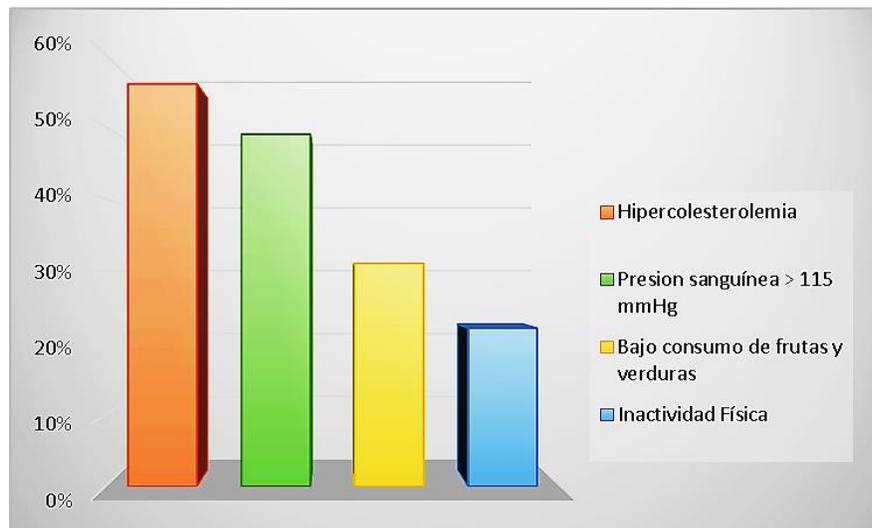
A los fitoesteroles se les han atribuido diversas propiedades benéficas como antioxidantes (impiden la peroxidación lípida) (Mel'nikov *et al.*, 2004), anti-inflamatorios, anti-cancerígenos (en líneas celulares, cáncer de seno y próstata) (Brufau *et al.*, 2008) y la más importante y renombrada es su propiedad hipocolesteromiantes (Valenzuela y Ronco, 2004; Fernandes y Cabral, 2007). Este efecto de reducción de colesterol en sangre, fue descrito hace más de 60 años (Pollak, 1953), pero no fue sino hasta 1990 que se hizo un avance significativo en la comprensión de este campo y se inició la incorporación de fitoesteroles en alimentos funcionales. Se ha concluido y comprobado ampliamente en animales y humanos que la dosis efectiva de fitoesteroles está entre 1.5-3 g/día, para reducir los niveles de colesterol de baja densidad (LDL) del 8 al 15 % (Quílez *et al.*, 2003; Engel y Schubert, 2005).

Los fitoesteroles son efectivos agentes hipocolesteromiantes en personas con niveles de colesterol normal y elevado, con diabetes tipo 2, así como en niños con antecedentes familiares de hipercolesterolemia (Brufau *et al.*, 2008). La eficiencia (dosis-respuesta) del efecto hipocolesterolémico de los fitoesteroles, en humanos, depende de sus estructuras químicas (esterificados o no), y sobre todo los métodos de formulación de los sistemas acarreadores del compuesto (Zawistowski, 2010; Panpipat *et al.*, 2013).

Es necesaria la adición de fitoesteroles a alimentos funcionales, puesto que en una dieta occidental promedio, la ingesta diaria está apenas entre los 100-300 mg/día (Ostlund, 2002; Leong *et al.*, 2011b) y en una dieta vegetariana el consumo diario solo alcanza aproximadamente a 450 mg/día (Ling y Jones, 1995; Morton *et al.*, 1995). Por lo tanto, la cantidad ingerida de fitoesteroles no es suficiente para ejercer algún efecto en la disminución de los niveles de colesterol en sangre.

Por otro lado, mantener controlados los niveles de colesterol en sangre es de suma importancia puesto que altos niveles de colesterol conllevan al inicio eventual de enfermedades cardiovasculares. La más importante de estas es la enfermedad coronaria, que puede conducir a anginas de pecho, insuficiencia cardíaca, arritmias,

infarto al miocardio y en algunos casos, a la muerte súbita (Rozner y Garti, 2006; NHLBI, 2015). Se ha observado que hay una conexión directa entre los altos niveles de colesterol o hipercolesterolemia (HCL), obesidad y enfermedades vasculares (Lara *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que al reducir los niveles de colesterol en 1% se reducen del 2-2.7% el riesgo de enfermedades coronarias (Mel'nikov *et al.*, 2004; Zawistowski, 2007). De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que una reducción del 10% en los niveles de colesterol sérico en hombres de 40 años, resulta en una reducción del 50% en enfermedades cardíacas durante los siguientes 5 años, puesto que el colesterol es el principal factor de riesgo de enfermedades coronarias (Figura 5).



**FIGURA 5. Principales factores de riesgo en enfermedades coronarias** (Mackay y Mensah, 2004).

Es por esto que existe un gran interés en encontrar métodos para reducir los niveles de colesterol, y por lo tanto prevenir el desarrollo de enfermedades. Los métodos más utilizados para lograr este objetivo son medicamentos y aditivos alimentarios. El mayor inconveniente de utilizar medicamentos anti-colesterol está relacionado con sus efectos colaterales. Es así como los aditivos alimentarios naturales, se han revelado como una alternativa atractiva en la reducción de los niveles de colesterol (Rozner y

Garti, 2006). De hecho, el Programa Nacional de Educación en Colesterol de Estados Unidos (NCEP, por sus siglas en inglés) incentiva el consumo de fitoesteroles como una opción terapéutica/dietaria para disminuir los niveles de colesterol LDL (Calpe-Berdiel *et al.*, 2009).

Sin embargo, en algunas ocasiones también se pueden utilizar en conjunto los fitoesteroles como potenciadores de algunos fármacos hipocolesteromiantes como las estatinas. Si el problema de colesterol en el individuo es muy grave, incluso se puede hacer una terapia triple (estatinas, fitoesteroles y colesteraquina) que reduce el colesterol LDL hasta en 67%, no obstante es necesario evaluar su seguridad (Brufau *et al.*, 2008).

#### **1.2.4 Modo de acción de los fitoesteroles**

Para comprender la manera en la que los fitoesteroles ejercen su acción hipocolesteromiante es necesario recordar el mecanismo de absorción del colesterol en el organismo. Según Valenzuela y Ronco (2004) y Zawistowski (2010), entre un 95-98% del colesterol que se ingiere está esterificado con ácidos grasos en el grupo hidroxilo del carbono 3 de la estructura cíclica de la molécula. El páncreas secreta hacia el intestino delgado una colesterolesfera que hidroliza los ésteres de colesterol con la ayuda de las sales biliares, cuyos componentes actúan como activadores de la enzima. El colesterol libre que se encuentra en el lumen intestinal durante el proceso digestivo se origina a partir de dos fuentes principalmente, la dieta (200-500 mg/día) y la bilis (hasta 1 g/día). El colesterol libre es incorporado en las micelas mixtas quedando "solubilizado" en la fracción fosfolipídica que forma la superficie de estas estructuras micelares. Estas micelas, se aproximan al ribete en cepillo de las microvelocidades del epitelio intestinal y al contacto con la membrana, transfieren al interior de la célula su contenido (Figura 6). Se estima que aproximadamente un 50% del colesterol se absorbe y el resto se elimina por las deposiciones. El colesterol absorbido es nuevamente re-esterificado en la célula intestinal y se incorpora a la estructura de los quilomicrones que la célula intestinal exporta al torrente circulatorio.

El colesterol que no es re-esterificado es nuevamente secretado hacia el lumen del intestino (Figura 7). La cantidad de colesterol absorbido en la circulación depende de la variabilidad genética y factores dietéticos (Valenzuela y Ronco, 2004; Zawistowski, 2010).

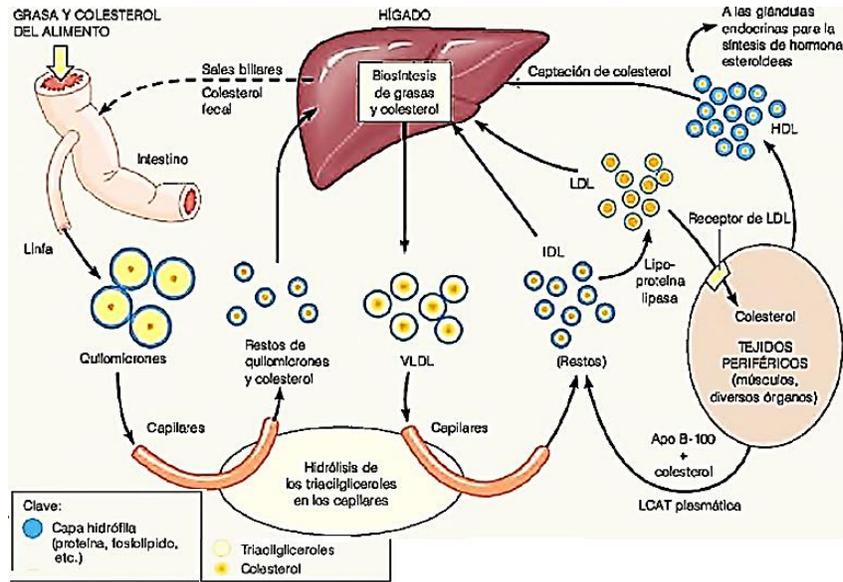


FIGURA 6. Metabolismo y absorción del colesterol (Mathews *et al.*, 2002).

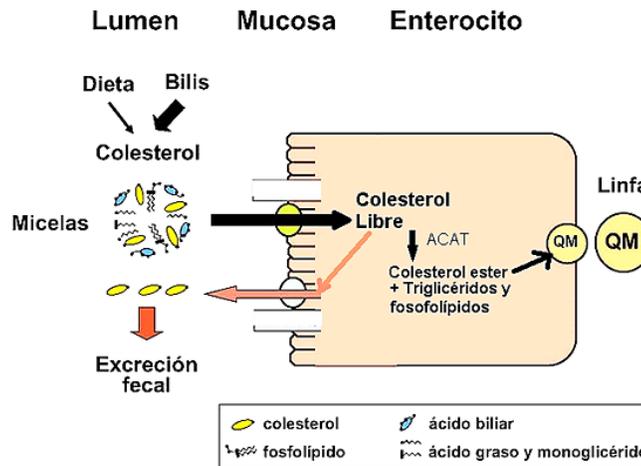
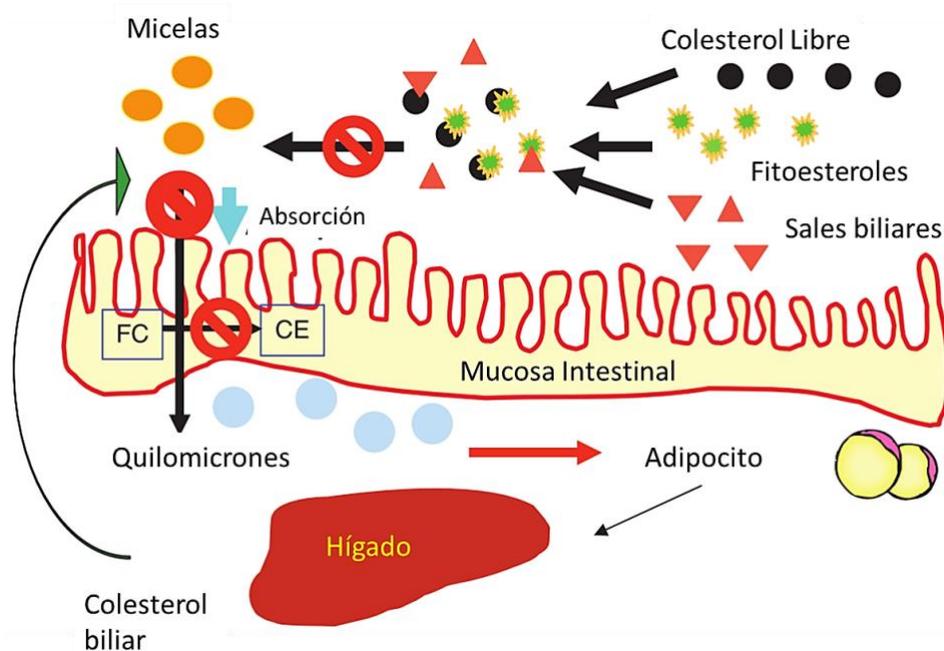


FIGURA 7. Reesterificación del colesterol y de los lípidos intestinales (Ros, 2003).

El consumo de fitoesteroles juega un papel importante en la reducción de la absorción de colesterol. Se han propuesto una serie de mecanismos sobre el efecto

hipocolesterolémico de los fitoesteros. En la Figura 8 se ilustran tres de estos modos de acción:

- Competencia entre los fitoesteros y el colesterol por la solubilización micelar. Esta teoría se basa en la similitud de sus estructuras químicas (Gylling *et al.*, 1999). Se ha sugerido que los fitoesteros tienen mayor afinidad por las micelas que el colesterol al ser más hidrofóbicos (Calpe-Berdiel *et al.*, 2009). Por lo tanto, los fitoesteros disminuyen la solubilidad del colesterol, lo desplazan de la micela mixta e inhiben su absorción (Ostlund, 2002).



**FIGURA 8. Modo de acción de los fitoesteros. FC: colesterol libre; CE: éster de colesterol (Zawistowski, 2010).**

- Co-precipitación de colesterol y los fitoesteros; ambos compuestos tienen escasa solubilidad en los lípidos, por lo que limitan mutuamente su incorporación en las micelas. Una vez que el consumo de fitoesteros alcanza un nivel crítico en el lumen intestinal, se produce la formación de cristales mixtos

de colesterol/fitoesterol. Esto conduce a la precipitación del colesterol en el tracto gastrointestinal, lo que se traduce en la reducción de su absorción intestinal, ya que el colesterol en la forma cristalina no es absorbible y se excreta (Mel'nikov *et al.*, 2004; Noakes *et al.*, 2005).

- Competencia entre los fitoesteroles y el colesterol por la captación en las células de la mucosa intestinal o al interferir con la esterificación en los enterocitos (Gylling *et al.*, 1999). Este mecanismo puede incluir la competencia con el colesterol por el transportador de esterol, Niemann-Pick C1, para obtener la entrada en los enterocitos. También podría haber cierta competencia por las proteínas ATP: ABCG5 y ABCG8, que son responsables de la liberación del colesterol y fitoesteroles entre la mucosa y el lumen intestinal (Zawistowski, 2010). Además se ha reportado que la actividad de la enzima Acil Colesterol Transferasa (ACAT) encargada de la esterificación del colesterol para incorporarlo en los quilomicrones, se ve disminuida en presencia de los fitoesteroles (Taha *et al.*, 2015).

El transporte de los fitoesteroles en la circulación es ineficiente, ya que del 0.04% a máximo el 5% de los fitoesteroles son absorbidos desde el lumen intestinal hacia la circulación en comparación con hasta el 70% para el colesterol. Esta gran diferencia en su absorción se debe a la mayor hidrofobicidad de la molécula de fitoesterol (Valenzuela y Ronco, 2004; Brufau *et al.*, 2008, Calpe-Berdiel *et al.*, 2009). Sin embargo, esta interferencia también puede disminuir la absorción intestinal del colesterol. La competencia con el colesterol por la esterificación puede explicar el efecto hipocolesterolémico adicional de los fitoesteroles. Sin embargo, este efecto no es significativo ya que la tasa de esterificación de los fitoesteroles es mucho menor que la del colesterol. El campesterol,  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol son esterificados al 89, 79 y 34%, respectivamente, de la velocidad con la que es esterificado el colesterol (Zawistowski, 2010).

Se ha demostrado que el balance de colesterol en el individuo es un factor clave en el grado de reducción de la biodisponibilidad del colesterol. Por lo tanto, cuanto mayor es la eficiencia de la absorción de colesterol en la línea de base de un individuo, menor es la absorción de colesterol al ingerir los fitosteroles. Esto explica la correlación positiva entre la absorción de colesterol de alta eficiencia inicial y el aumento de magnitud de las reducciones de colesterol sérico total y LDL (Gylling *et al.*, 1999).

Es importante resaltar que, aunque la reducción de la absorción de colesterol está parcialmente compensada por el aumento de la síntesis de colesterol. Este aumento no es lo suficientemente grande y, por lo tanto, el colesterol total y el de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) que circulan en el plasma se reducen. Los niveles de colesterol HDL y triacilglicéridos normalmente no se ven afectados por la ingesta de fitoesteroles (Gylling *et al.*, 1999; Nguyen, 1999). Además, vale la pena mencionar que no todos los fitoesteroles se limitan sólo a la inhibición de la absorción de colesterol. Se ha propuesto que el  $\beta$ -sitosterol disminuye la síntesis de colesterol y la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa, enzima que controla la tasa de producción de colesterol en la ruta del mevalonato en el citoplasma de las células (Field *et al.*, 1997; Taha *et al.*, 2015). También se ha descrito que los fitoesteroles insaturados  $\Delta^{22}$ , principalmente el estigmasterol, pero también el ergosterol y el brasicasterol, inhiben la síntesis de colesterol. Se ha demostrado que estos tipos de fitoesteroles inhiben la  $\Delta^{24}$ -reductasa, una enzima que cataliza la saturación del doble enlace en C-24 durante la biosíntesis del colesterol (Zawistowski, 2010; Taha *et al.*, 2015). Por último, los fitoesteroles también pueden afectar la expresión de la proteína microsomal triacilglicerol-transferasa (MTP) que participa en el ensamblaje de vLDL y quilomicrones (Liang *et al.*, 2011).

### **1.2.5 Sistemas acarreadores de fitoesteroles**

En los últimos 20 años el mercado mundial de los fitoesteroles como suplementos dietarios ha crecido rápidamente, dando lugar a numerosos productos comerciales (Bacchetti *et al.*, 2011). Esto se ve reflejado en las numerosas patentes que proponen

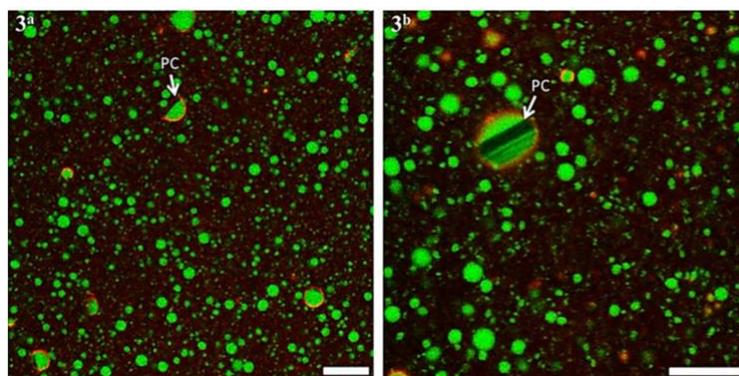
incluir a los fitoesteroles en alimentos, de manera que lleguen a los consumidores productos novedosos, funcionales y con buen sabor que incluyan su acción hipocolesteromizante (Ostlund 1999; Mundelein y Miller, 2001; Gottemoller, 2001; Won-Tae *et al.*, 2001; Auriou y Ferreres, 2002; Biffin, 2002; Goulson *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2005; Zawistowski, 2007; Chatla *et al.*, 2011; Sagalowicz *et al.*, 2013; Perlman, 2014). Para llegar a esto los investigadores han tenido que sobrepasar los obstáculos que imponen los fitoesteroles en la formulación de alimentos como son: su baja o nula solubilidad (tanto en agua como en aceites), cristalización, punto de fusión alto, sabor arenoso, entre otras.

La tecnología de emulsiones ha sido ampliamente utilizada tanto en la fabricación de alimentos clásicos como margarinas, aderezos para ensaladas, leches, yogures y helados, como en la incorporación de compuestos bioactivos como omega-3, amino ácidos y CLA, licopeno, astaxantina, luteína y fitoesteroles en los alimentos. Las ventajas de un sistema basado en emulsiones incluyen: (a) prevención de la oxidación del lípido bioactivo en las gotas de la fase dispersa, (b) incrementar la absorción o biodisponibilidad del compuesto activo y (c) mejorar la estabilidad de los fitoesteroles, los cuales se incluyen dentro de los lípidos bioactivos con tendencia a cristalizarse (Chen *et al.*, 2013). Se han utilizado efectivamente las nanoemulsiones para acarrear compuestos bioactivos en bebidas funcionales claras. Esto es posible gracias a las dimensiones de estas estructuras que son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz, permitiendo que la dispersión de luz sea muy débil, obteniendo así una bebida clara.

Con respecto a la formulación de fitoesteroles en matrices de base acuosa, se recomienda establecer dispersiones líquidas estables, ya que una vez suspendidos en un medio líquido, las partículas de fitoesteroles pueden sedimentarse o flotar, afectando sus atributos sensoriales como sabor y apariencia; incluso las partículas se pueden agregar impidiendo su redispersión al agitar. Por esto se propone que al reducir el tamaño de partícula de los fitoesteroles se puede mejorar la estabilidad de la dispersión, entre más pequeños son, más área superficial contienen por unidad de volumen, y por lo tanto pueden ser mezclados más eficientemente con los otros

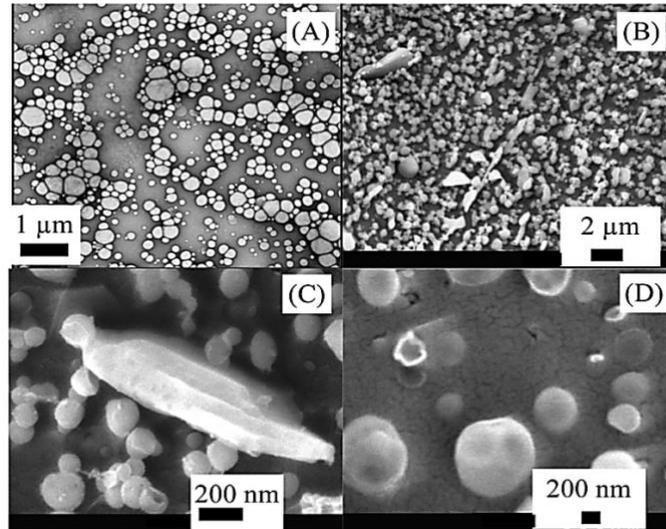
ingredientes en los alimentos (Zawistowski, 2010). Sin embargo, si su formulación no es la adecuada se pueden observar la presencia de cristales insolubles en los sistemas como en Zychowski *et al.* (2016) (Figura 9) y Ribeiro *et al.* (2016) (Figura 10).

En la Figura 9 se presentan emulsiones enriquecidas con 0.6% de FE vistas en microscopía Confocal laser, con una magnificación de 3 y 5 veces (a y b) en donde se observa la presencia de cristales de FE en la interface (Zychowski *et al.*, 2016). Sus emulsiones fueron formuladas con 10% grasa de leche, 89% agua y 1% de aislado de proteína de suero (WPI), los FE se calentaron para añadirlos a la fase oleosa, se pre-emulsificaron en un rotor estator y las NE se obtuvieron en un homogenizador de alta presión.



**FIGURA 9. Presencia de cristales de FE en las gotas de las emulsiones** (Zychowski *et al.*, 2016), Escala 10  $\mu\text{m}$ .

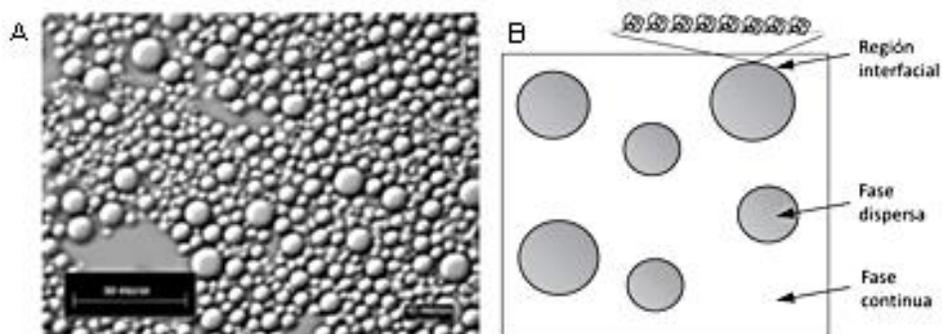
En la Figura 10, se presentan A. Micrografía Cryo-TEM con tinción negativa de la dispersión coloidal que contiene 1% de FE. B-D. Micrografías SEM de las dispersiones coloidales que contienen 2% de FE en donde se observa la presencia de cristales de FE. Las nanoemulsiones fueron formuladas con un 10% de fase oleosa: TCM y FE, 90% fase acuosa: Tween 20 (2%), agua (88%) los FE se calentaron para añadirlos a la fase oleosa, se preemulsificaron en un rotor estator y las NE se obtuvieron en un microfluidizador (Ribeiro *et al.*, 2016).



**FIGURA 10. Presencia de cristales de FE en nanoemulsiones (Ribeiro *et al.*, 2016).**

### 1.3 Emulsiones

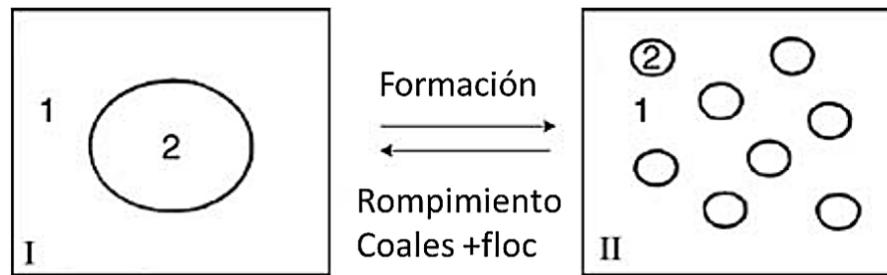
Las emulsiones son una de las tecnologías más ampliamente utilizadas para crear sistemas acarreadores que permitan incluir sustancias lipídicas en alimentos de base acuosa. Una emulsión es un tipo de coloide (es decir, un sistema formado por dos o más fases inmiscibles que pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas) que se compone de dos líquidos inmiscibles, generalmente aceite y agua. Se caracterizan porque uno de los líquidos se dispersa en pequeñas gotas (fase dispersa) en el otro (fase continua) (Figura 11) (McClements, 2004; Tadros, 2009).



**FIGURA 11. (A) Micrografía de una emulsión con gotas de aceite dispersas en agua (McClements, 2004); (B) Componentes de una emulsión (McClements, 2009).**

Dependiendo de la distribución del aceite en la fase acuosa, las emulsiones se pueden clasificar como: aceite en agua (O/W) si las gotas de aceite están dispersas en el agua, por ejemplo, leche, cremas, mayonesa, sopas, salsas y bebidas; o agua en aceite (W/O) si el sistema consiste de gotas de agua dispersas en aceite como la mantequilla y la margarina (McClements, 2004; Tadros, 2009).

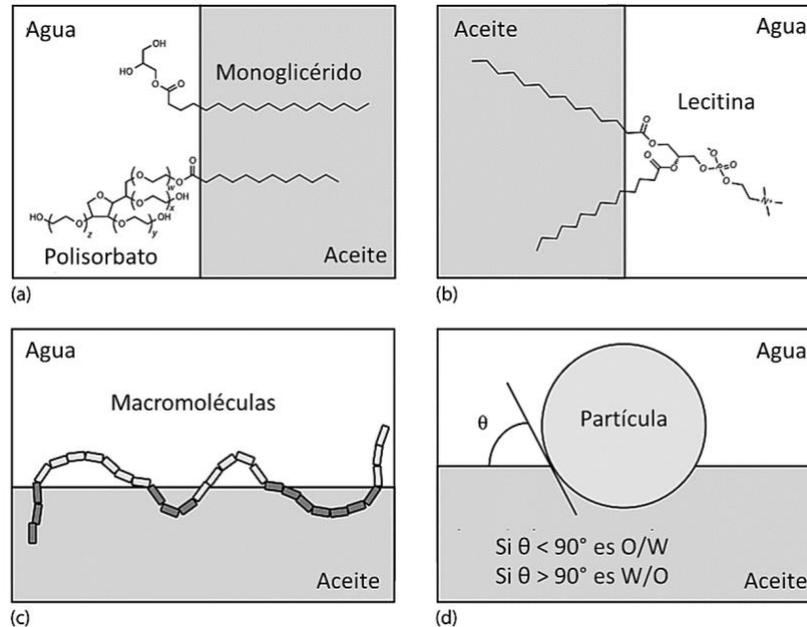
Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, por ejemplo, en un sistema aceite en agua, al agitar el sistema se producen gotas más pequeñas del aceite, pero un tiempo después de su formación se rompe la emulsión volviendo a su estado inicial (Figura 12) (Tadros, 2009). Esto se debe a que la tendencia general de un líquido es reducir su superficie, por lo tanto, cualquier intento de aumentarla requiere energía (Dickinson, 2009).



**FIGURA 12. Representación esquemática de la formación y rompimiento de una emulsión (Tadros, 2009).**

### 1.3.1 Emulsificantes

Los emulsificantes son moléculas anfífilas con actividad superficial, es decir poseen tanto grupos polares como apolares que les permiten ubicarse en la interface de las emulsiones y reducir la tensión interfacial, mejorando la interacción y el tamaño de las partículas en la emulsión (Figura 13). Además, los emulsificantes una vez adsorbidos en la superficie de la gota crean una barrera contra la coalescencia y la floculación durante el almacenamiento (McClements, 2004).



**FIGURA 13. Estructura esquemática de diferentes clases de emulsificantes en la interface aceite-agua.** (Rayner y Dejmek 2015) (a) Emulsificantes no iónico de bajo Peso Molecular (PM); (b) iónicos de bajo PM; (c) Macromoléculas anfifílicas con regiones hidrofóbicas e hidrofílicas como las proteínas y almidones modificados; (d) partículas como gránulos de almidón, cristales de grasas y microgeles de proteína.

Existen varios tipos de emulsificantes con características específicas que determinan su capacidad para formar y estabilizar emulsiones. Las variables que más afectan estas características son: el pH del medio, sus fuerzas iónicas, el tipo de iones presentes en el medio, el tipo de aceite, la interacción con cada uno de los ingredientes en la emulsión, la temperatura y la energía a la que es sometido el sistema. Por lo tanto, uno de los pasos más importantes en la formulación de nanoemulsiones es identificar el emulsificante más apropiado para cada aplicación (McClements, 2009).

Las principales características de un emulsificante son:

- Capacidad de emulsificación (EC): máxima cantidad de aceite que puede ser dispersado en una solución acuosa que contiene una cantidad específica de emulsificante, sin que la emulsión se rompa o invierta.

- Índice de estabilidad de la emulsión (ESI): mide el cambio del tamaño de partícula de una emulsión después de un tiempo específico de almacenamiento, o estrés ambiental (calentar, enfriar, agitar). Entre menos se incrementa el tamaño de partícula, mejor es el emulsificante.
- Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB): Se mide en una escala entre 0 y 20 y expresa numéricamente la fuerza y tamaño entre una porción polar y una no polar en un surfactante. Este número indica la solubilidad de un surfactante en la fase oleosa o acuosa (McClements 2016; Pasquali et al., 2008). Los valores HLB de emulsiones W/O van de 3.5-6, mientras que para emulsiones O/W van de 8-18.

Dentro de los emulsificantes más utilizados en la industria de alimentos se encuentran los biopolímeros anfifílicos (macromoléculas), ciertos materiales particulados (partículas coloidales) y los surfactantes (pequeñas moléculas). En el caso de los biopolímeros anfifílicos, como proteínas y polisacáridos, sus características moleculares están dadas por el tipo, número, secuencia de monómeros que conforman sus cadenas y las rotaciones de sus enlaces covalentes que les permiten configurarse de maneras específicas en la interface. Es así como las regiones hidrofílicas y lipofílicas se distribuyen a lo largo de su esqueleto. Es muy importante tener en cuenta que los biopolímeros son especialmente sensibles a los cambios de pH, temperatura, fuerza iónica y composición del solvente (Dickinson, 2003). Por su parte, los materiales particulados: son aquellos que pueden estabilizar emulsiones de manera “mecánica” con partículas sólidas como gránulos de almidón, cristales de quitina, de grasas y microgeles de proteína de suero (emulsiones pickering). Las propiedades de estas partículas: tamaño, forma y la humectación en ambas fases les confieren a las partículas pickering, la habilidad de crear barreras físicas que previene el contacto entre las gotas y les confiere alta estabilidad contra la coalescencia (Rayner *et al.*, 2014). Es importante recalcar que debido a su gran tamaño (miles de nm) no son muy utilizadas en la fabricación de nanoemulsiones (Rayner y Dejmek 2015).

Por ultimo, los surfactantes: son moléculas relativamente pequeñas que tienen una “cabeza” polar, hidrofílica y una “cola” apolar, hidrofóbica (Friberg *et al.*, 2004). La cabeza polar puede ser aniónica, catiónica, zwitteriónica (compuesto eléctricamente neutro, pero con cargas positivas y negativas en la molécula) o no iónica (McClements, 2016). A continuación, se presentan los más utilizados, dentro de los cuales destaca la lecitina. En la Tabla 2 se muestran algunos de los emulsificantes más utilizados y su ingesta diaria aceptable.

- Mono y diglicéridos: surfactantes producidos al interesterificar grasas y aceites con glicerol (Moonen y Bas, 2004). Generalmente son no iónicos, con HLB: ~2-5 y susceptibles a formar micelas inversas, emulsiones W/O y microemulsiones W/O (McClements, 2016).
- Esteres ácidos orgánicos de mono y diglicéridos: son esterificados con ácidos orgánicos (acético, cítrico, diacetil tartárico, láctico) y con hidrocarburos de diferente longitud e insaturación que les confieren diferentes propiedades funcionales a estos surfactantes (Gaupp y Adams, 2004; McClements, 2016).
- Esteres poliolicos de ácidos grasos: se forman al esterificar polioles (poliglicerol, propilenglicol, sorbitan, polioxietilen sorbitan y sacarosa) con ácidos grasos. Los ester de sorbitán de ácidos grasos “Span™” y los ester de polioxietilen sorbitan “Polysorbate™” o “Tween™” son de los surfactantes liposolubles e hidrosolubles, respectivamente más utilizados (McClements, 2016). A pesar de su alta demanda, su ingesta diaria está limitada a 25 mg/kg de peso corporal, lo cual limita su uso impulsando la búsqueda de emulsificantes más naturales.
- Saponinas: glucósidos de alto peso molecular formados por un azúcar y un triterpeno o aglicona esteroideal. Son emulsificantes naturales recientes extraídos principalmente de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*. Pueden estabilizar emulsiones O/W en un amplio rango de pH y temperaturas (Yang y McClements, 2013; McClements, 2016).

**TABLA 2. Emulsificantes utilizados generalmente en emulsiones alimenticias**  
(Adaptada de McClements, 2016).

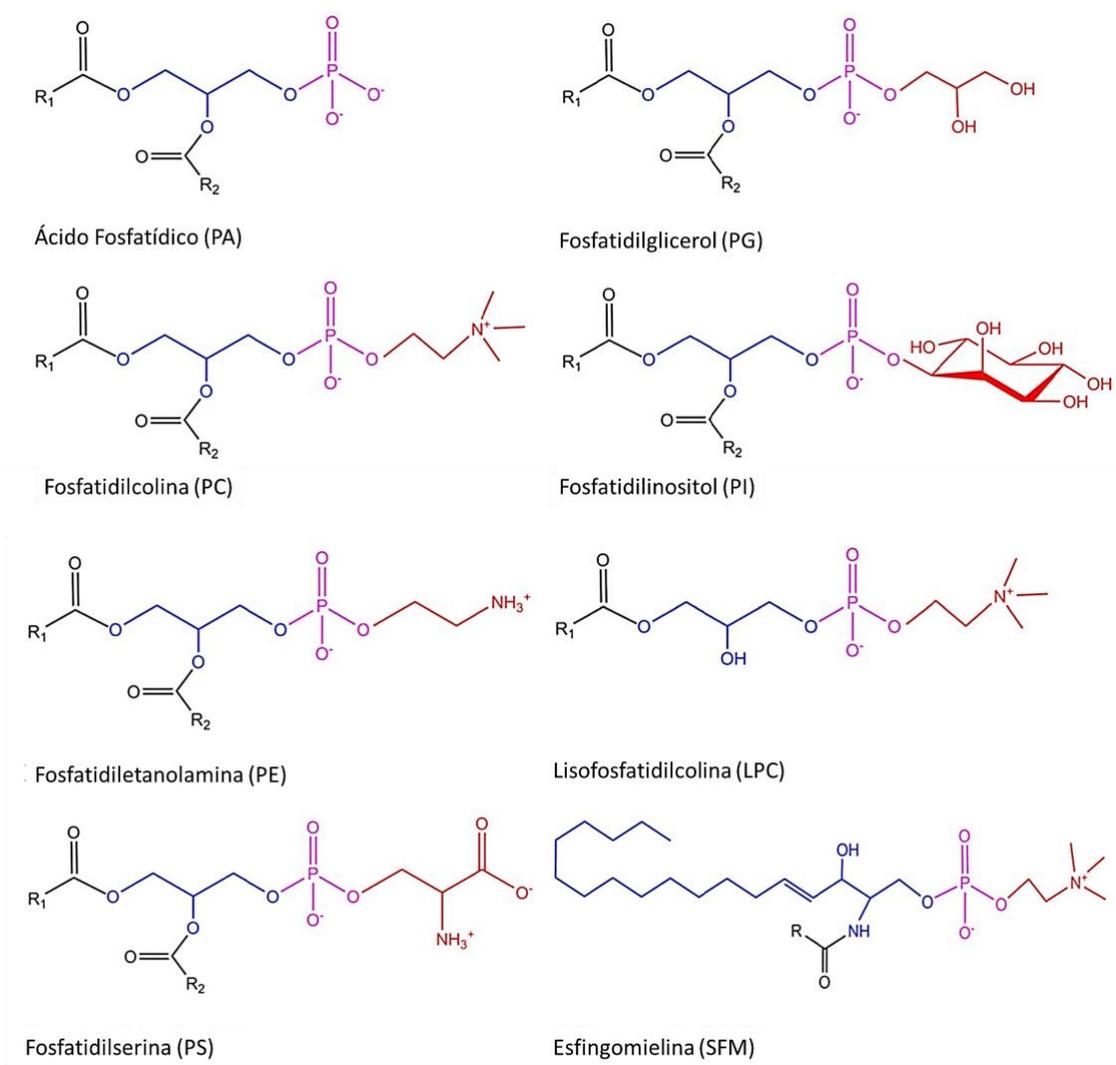
Nombre químico	Abreviación	ADI (mg/kg)	Solubilidad
<b>Iónicos</b>			
Lecitina	-	NL	Aceite/agua
Esteroil lactilato de sodio	SSL	0-20	Agua
Esteroil lactilato de calcio	CSL	0-20	Aceite
Esteres ácidos diacetil tartáricos de MG	DATEM	0-50	Agua
<b>No iónicos</b>			
Monoglicéridos	MG	NL	Aceite
Esteres de ácido láctico de MG	LACTEM	NL	Aceite
Esteres de poliglicerol de AG	PGE	0-25	Agua
Esteres de sucrosa de AG	-	0-10	Aceite/agua
Monoestearato de sorbitan	SMS	0-25	Agua
Monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano	Tween 20	0-25	Agua
Monooleato de polioxietilen (20) sorbitano	Tween 80	0-25	Agua

ADI: ingesta diaria aceptable, NL: No Limitado

### 1.3.1.1 Lecitina

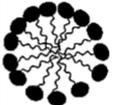
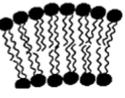
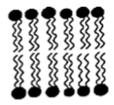
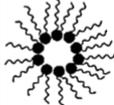
La lecitina es de origen natural y pueden ser extraída de diversas fuentes alimenticias como soya, colza, y huevo. Además, se ha reportado que la lecitina mejora la biodisponibilidad de sustancias bioactivas, e inhibe su cristalización (Amate *et al.*, 2001; Cui y Decker, 2015; Van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008).

La lecitina comprende una mezcla de diferentes tipos de fosfolípidos. Los fosfolípidos se componen de un esqueleto de glicerol, al que van unidos dos colas, cadenas de ácidos grasos (generalmente la sn-1 es saturada y la sn-2 es insaturada) y una cabeza de grupo fosfato. Dependiendo del compuesto que se una al grupo fosfato es el nombre del compuesto y sus propiedades. Así, si al grupo fosfato se le une una colina su nombre será fosfatidilcolina (PC) (Cui y Decker, 2015) (Figura 14).



**FIGURA 14. Estructura química de los fosfolípidos** (Cui y Decker, 2015).

En la Figura 15 se encuentran algunas estructuras básicas que se pueden observar al mezclar un fosfolípido con agua o al mezclarlo con un solvente orgánico (Vikbjerg, 2006).

Forma	Organización	Fase	Anfífilos
 Cono invertido		Micela hexagonal I	Anfífilos de una sola cadena con una gran cabeza polar
 Cono truncado		Lamelar flexible	Anfífilos de doble cadena con una gran cabeza polar o de una sola cadena pero con un grupo polar pequeño
 Cilindro		Cúbico lamelar	Anfífilos de doble cadena con una cabeza polar pequeña
 Cono truncado invertido		Micela reversa hexagonal II	Anfífilos de doble cadena con una cabeza polar pequeña, A anfífilos no iónicos, cadenas poliinsaturadas

**FIGURA 15. Organización estructural de fosfolípidos** (Vikbjerg, 2006).

Además, se ha reportado que los fosfolípidos tienen propiedades antioxidantes. Específicamente, pueden unirse a metales pro-oxidantes gracias a las cargas negativas presentes en el grupo fosfato ayudando así a inhibir la oxidación lipídica. En las emulsiones también se ha reportado que su adición reduce la oxidación lipídica inducida por metales, con un pH por encima de su pKa (0.8-4) (Cui y Decker, 2015).

Por otra parte, la lecitina puede ser hidrolizada química o enzimáticamente para romper una de las colas de hidrocarburos y así producir emulsificantes más hidrófilos con un HLB más adecuado para aplicaciones específicas (McClements, 2004). Al realizar modificaciones a la lecitina con sustancias benéficas para la salud, estas se convierten en lípidos estructurados, es decir, lípidos cuya estructura molecular, o composición de ácidos grasos, ha sido modificada respecto a su estado natural, proporcionándoles propiedades fisicoquímicas especiales y/o beneficios nutricionales, por lo que algunos pueden ser considerados nutraceuticos (Baeza, 2013).

Uno de los compuestos que se pueden obtener con modificación enzimática es la lisofosfatidilcolina (LPC), un fosfolípido con solo una cadena de ácidos grasos, ya sea en la posición sn-1 o sn-2. Por lo tanto, la sección transversal de la región apolar es dos veces más pequeña que la de la fosfatidilcolina. Según las estimaciones, los parámetros de empaquetamiento para la LPC y la PC son 0.4 y 0.74, respectivamente. Por ello, las diferencias en la geometría entre estas dos moléculas se reflejan en las características de agregación de la LPC. Debido a que tiene la forma de “cono invertido”, la molécula tiende a formar directamente micelas en soluciones acuosas; la PC en cambio tiende a formar una fase lamelar. Este efecto se debe a los cambios en la curvatura de sus superficies (Chavez, 2015).

### **1.3.2 Propiedades de las emulsiones**

La manera directa de evitar las inestabilidades de las emulsiones es conocer las propiedades moleculares. Sin embargo, medir estas propiedades generalmente es muy difícil debido a su pequeño tamaño, rápido movimiento y basta cantidad. Por lo tanto, la información que se necesita sobre las características moleculares de las emulsiones se debe obtener de medidas indirectas de sus propiedades físico-químicas para así poder caracterizarlas y determinar sus posibles inestabilidades y propiedades finales (McClements, 2004).

#### **1.3.2.1 Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula en una emulsión es una de las propiedades claves en su caracterización puesto que influye en el tiempo de almacenamiento y estabilidad, las propiedades ópticas, reología del producto, así como la apariencia, biodisponibilidad, sabor y textura (McClements, 2009). Por lo tanto, es muy importante controlar esta característica. El número de partículas en una emulsión es extremadamente grande y aumenta al disminuir el tamaño de partícula (McClements, 2016).

### 1.3.2.2 Carga de las partículas

Las propiedades fisicoquímicas, organolépticas y nutricionales de varias emulsiones alimenticias están gobernadas por la magnitud y signo de la carga eléctrica de las partículas. Su carga se puede originar por la adsorción de emulsificantes que son ionizados o ionizables a cierto pH (McClements, 2016).

La carga eléctrica de una partícula puede ser caracterizada por su densidad de carga superficial ( $\sigma$ ), potencial eléctrico superficial ( $\psi$ ) y potencial zeta ( $\zeta$ ) (Hunter, 1986). La densidad de carga superficial, es la cantidad de carga eléctrica por unidad de superficie; depende de la cantidad neta de carga y el número de moléculas con actividad superficial adsorbidas por unidad de área interfacial. El potencial eléctrico superficial es la cantidad de energía necesaria para aumentar la densidad de carga superficial de cero a  $\sigma$ . El potencial eléctrico superficial, depende de la composición iónica del medio circundante y por lo general, disminuye a medida que la fuerza iónica de la fase acuosa incrementa (McClements y Rao, 2011). El potencial entre la capa líquida de la superficie fuertemente enlazada a la partícula y la fase acuosa se llama potencial zeta ( $\zeta$ ) y proporciona una medida de la carga superficial neta en la partícula y la distribución del potencial en la interface (Li y Tian, 2002, Cano-Sarmiento, 2014).

### 1.3.2.3 Propiedades interfaciales

La interface de las partículas es una región estrecha (generalmente de unos pocos nanómetros de espesor) que rodea cada gota en la emulsión, allí se encuentra una mezcla de aceite, agua y otras moléculas con actividad superficial. La interface desempeña un papel importante en la determinación de muchas de las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de las emulsiones alimentarias. Es por esto que es importante elucidar cómo sus características interfaciales están relacionadas con las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales de las emulsiones. La composición y estructura de la región interfacial se determinan por el tipo y concentración de especies tensoactivas presentes antes de la formación de la emulsión, así como por los eventos que ocurren durante y después de la formación de

la emulsión. El espesor y la reología de la región interfacial pueden influir en la estabilidad de las emulsiones, la reología de las emulsiones, la velocidad de transporte de moléculas dentro o fuera de las partículas. También hay que tener en cuenta que, en la interface se acumulan componentes con actividad superficial que pueden conducir a la aceleración de algunas reacciones químicas como la oxidación de lípidos, al aumentar la concentración local de moléculas o al reunir diferentes especies reactivas (McClements y Decker, 2000; McClements, 2016).

### 1.3.3 Caracterización de emulsiones

#### 1.3.3.1 Tamaño de partícula y microestructura

Dependiendo de la distribución de los tamaños de partícula, las emulsiones pueden ser monodispersas si todas las partículas tienen exactamente las mismas dimensiones o polidispersas si existe un rango de tamaños de partícula. Las distribuciones monodispersas se pueden caracterizar completamente con el radio o diámetro de la partícula, mientras que en las emulsiones polidispersas (mayoría de emulsiones) es necesario tener en cuenta su distribución y caracterizar de acuerdo a la concentración de las gotas vs su perfil de tamaño (Cano-Sarmiento, 2014; McClements, 2016).

Para simplificar la interpretación de los datos de distribución de tamaño de partícula, se pueden calcular una serie de parámetros estadísticos (Malvern, 2015). La elección del parámetro estadístico más apropiado para una muestra dependerá de cómo se utilizarán los datos y contra cuales se compararán. Por ejemplo, si se quiere reportar el valor más “común” en la distribución de tamaño de partícula de una muestra se pueden calcular los siguientes parámetros:

- Media: representa la población promedio, Ecuación (3).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i f_i}{N} \quad (3)$$

- Mediana: representa al valor en la mitad de la distribución de tamaños de frecuencia. Ecuación (4).

$$Me = L_i + \frac{\frac{N}{2} - F_{i-1}}{f_i} \cdot a_i \quad (4)$$

- Moda: representa el tamaño con más frecuencia y depende de la amplitud de los intervalos, Ecuación (5).

$$h_i = \frac{f_i}{a_i}$$

$$Mo = L_i + \frac{h_i - h_{i-1}}{(h_i - h_{i-1}) + (h_i - h_{i+1})} \cdot a_i \quad (5)$$

Con:  $f_i$ : Frecuencia absoluta,  $N$ : Número total de datos,  $F_i$ : Frecuencia acumulada,  $L_i$ : Límite inferior de la clase modal,  $a_i$ : Amplitud de la clase

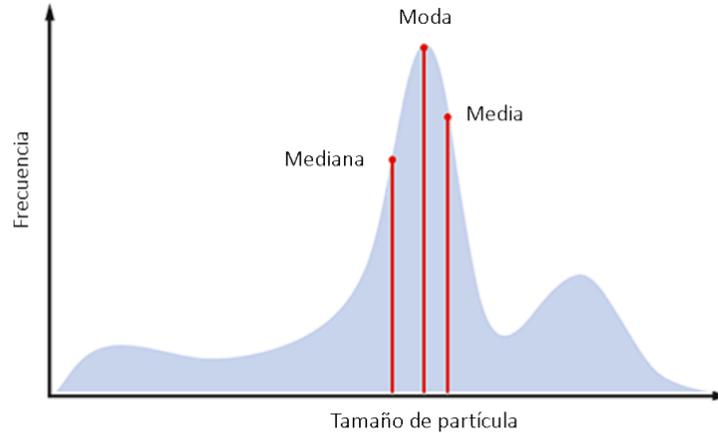
Si la forma de la distribución de tamaños de partícula es asimétrica, estos tres parámetros seguramente no son equivalentes (Figura 16). Por lo tanto, es muy importante determinar cuál parámetro es el que da más información sobre la muestra.

Finalmente, el índice de Polidispersidad en una distribución se puede representar:

- Calculando el decil 90: Representa que el 90% de las partículas están por debajo de este valor. Ecuación (6).

$$D_k = L_i + \frac{\frac{k \cdot N}{10} - F_{i-1}}{f_i} \cdot a_i \quad k = 1, 2, \dots, 9 \quad (6)$$

- Dividiendo el ancho absoluto de la distribución sobre su media



**FIGURA 16. Media, moda y mediana en una distribución típica de tamaños de partícula (Malvern, 2015).**

En cuanto a los métodos más utilizados para determinar el tamaño de partícula se encuentran la microscopía electrónica y los métodos basados en dispersión de luz (LS) (Dalglish, 2004). A continuación, se profundiza en las técnicas antes mencionadas, las cuales fueron utilizadas en el presente trabajo:

#### 1.3.3.2 Microscopía

Las técnicas de microscopía permiten aumentar el rango de nuestra visión para observar objetos pequeños; se utiliza ampliamente en las nanoemulsiones para: Determinar el tamaño de las gotas emulsificadas, obtener las dimensiones y estructuras de los flóculos, encontrar la forma, tamaño y localización de los cristales de grasa, conocer la morfología de la superficie de las gotas y burbujas de aire, y conocer la estructura tridimensional de los emulsificantes. Cualquier tipo de microscopía debe tener (McClements, 2004):

- Resolución: Se puede distinguir entre dos objetos cercanos
- Magnificación: Número de veces que la imagen se aumentó para examinar el objeto
- Contraste: que tan bien se distingue un objeto del medio.
- La preparación de la muestra debe ser poco invasiva

#### 1.3.3.2.1 Microscopía óptica

Es útil para evaluar emulsiones con diámetros de partícula grandes  $>1 \mu\text{m}$  y diferenciar el tipo de inestabilidad de una emulsión (floculación o coalescencia). Su uso es muy restringido debido a su limitada resolución, arriesgada preparación de muestra y subjetividad (McClements, 2004).

#### 1.3.3.2.2 Microscopía Confocal Laser de Barrido (LSCM)

Otorga información muy valiosa sobre la microestructura de la emulsión, da imágenes más claras que la microscopía óptica convencional y permite la generación de imágenes tridimensionales. La visualización de la microestructura se facilita con la fluorescencia, natural de algunos componentes o añadida mediante tintes que se unen selectivamente a ciertos componentes o a alguna de las 2 fases (McClements, 2004).

#### 1.3.3.2.3 Microscopía electrónica

Es ampliamente utilizada para examinar la estructura de las emulsiones, particularmente aquellas que no se pueden analizar con un microscopio óptico; es decir, las emulsiones con diámetro de partícula  $<1 \mu\text{m}$ , como las nanoemulsiones. Esta microscopía da información sobre la concentración, dimensiones y distribución espacial de diversas estructuras. Otra de sus grandes ventajas es que la muestra no es alterada en su preparación (McClements, 2004).

Este tipo de microscopía utiliza rayos de electrones en vez de rayos de luz, con longitudes de onda mucho menores que la luz, por lo tanto, pueden examinar objetos mucho más pequeños, de hasta 1 nm. Las dos microscopías electrónicas que más se han utilizado para caracterizar emulsiones son:

#### 1.3.3.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se utiliza para obtener imágenes de la topografía superficial de la muestra con apariencia tridimensional. Mide la cantidad de electrones secundarios que se generan

en la muestra debido al bombardeo del rayo de electrones. Al bombardear la muestra con electrones se genera energía, un poco de esta energía es absorbida por la muestra y genera los electrones secundarios que abandonan la superficie de la muestra y son recolectados por el detector. Las imágenes obtenidas pueden ser hasta de 3 nm. (McClements, 2004).

#### 1.3.3.2.5 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Puede ser concebido como un microscopio de luz invertida, en el cual, la muestra es iluminada por un haz de electrones por medio de lentes magnéticos (Figura 17A). Estos electrones que atraviesan la muestra son magnificados y proyectados en una pantalla para crear la imagen. Como los electrones son fácilmente desviados debe mantenerse un alto vacío en la columna del microscopio. Además, debido a que los electrones penetran poco en la materia, sólo se pueden estudiar las superficies de muestras delgadas o secciones de muestra. Es importante aclarar que algunos electrones son reflejados o absorbidos lo que crea diferentes densidades de electrones. Los componentes con diferentes densidades de electrones aparecen con diferente intensidad en la imagen, entre más electrones se transmitan, más oscura es la imagen, se pueden observar estructuras hasta de 0.4 nm. La imagen obtenida generalmente representa una fina capa de la muestra en 2 dimensiones (Kuntsche *et al.*, 2011). En cuanto al contraste, este se disminuye al incrementar la aceleración del voltaje, puesto que la dispersión de los electrones es inversamente proporcional a su velocidad. Además, la resolución en TEM es directamente proporcional al voltaje de aceleración de los electrones. Por lo tanto, se obtiene una alta resolución cuando se aumenta el voltaje debido a la corta longitud de onda de los electrones (Klang *et al.*, 2012). En las investigaciones de sistemas coloidales en TEM los voltajes se encuentran entre 80-200 Kv.

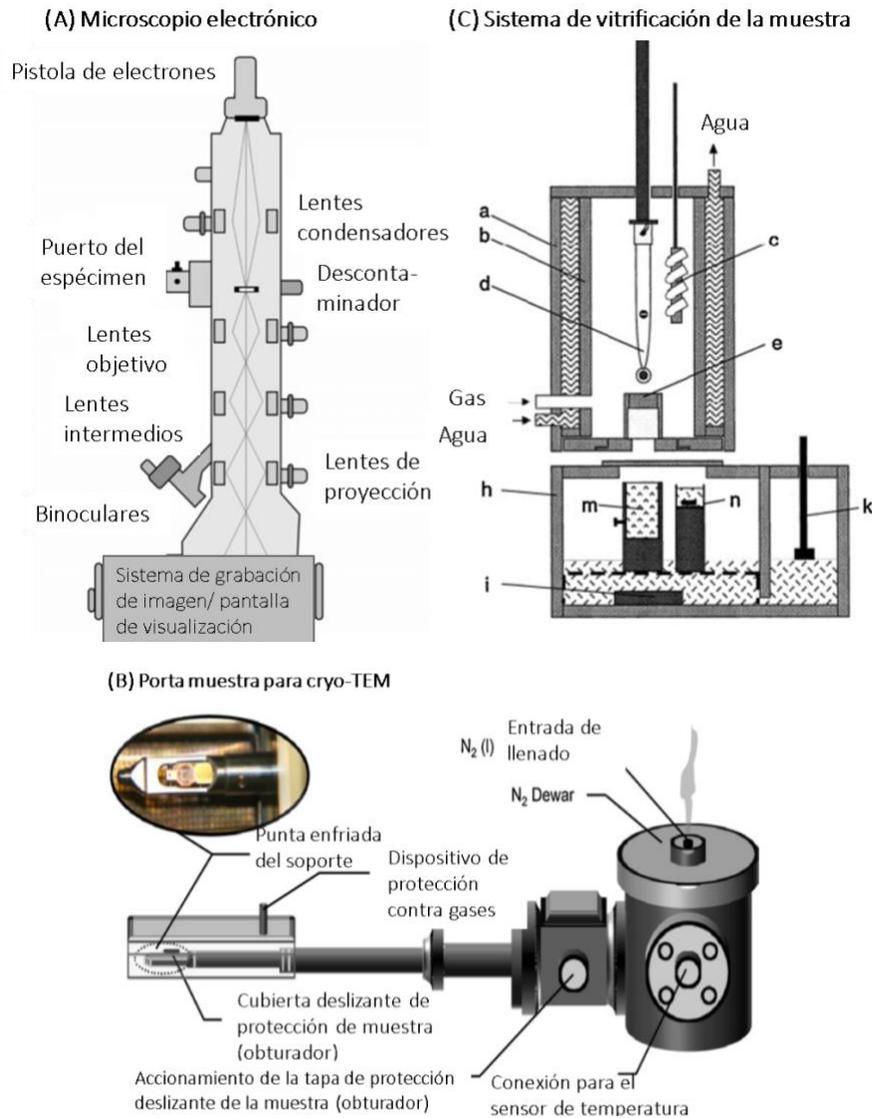
En cuanto a la muestra se necesita que esté deshidratada y sea muy delgada (0.05-0.1  $\mu\text{m}$ ). Existen diferentes métodos para preparar muestras para TEM (ej. tinción negativa, fractura por congelación y vitrificación por inmersión) que pueden proveer diferente información sobre las estructuras coloidales. Debido a su simplicidad, la

tinción negativa es el método de preparación de muestras más utilizado para la evaluación de formulaciones coloidales con TEM (Friedrich *et al.*, 2010). Sin embargo, tanto teñir como secar puede alterar estructuralmente la muestra, lo cual se debe tener muy en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. La técnica de fractura por congelación, conocida como Cryo-TEM, no requiere un proceso de secado previo así que permite una investigación directa de los coloides en el estado vitrificado, congelado-hidratado, por lo tanto, muy cercano a su estado natural (Egelhaaf *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2010; Kuntsche *et al.*, 2011).

#### 1.3.3.2.6 Cryo-TEM

El Cryo-TEM requiere algunas características adicionales para el microscopio electrónico de transmisión convencional (Kuntsche *et al.*, 2011). Como un sistema de control de temperatura (criostato) y un soporte especializado para la rejilla que contiene la muestra en el microscopio electrónico (Figura 18.B) que asegure el adecuado enfriamiento de la muestra y su protección. En la preparación de la muestra es muy importante controlar la humedad y que el sistema de vitrificación sea automatizado. En la Figura 17C se presenta un esquema del sistema automatizado de vitrificación de muestras para cryo-TEM (Egelhaaf *et al.*, 2000). El esquema muestra la cámara con la rejilla de muestra fijada con pinzas (d), los bloques de vidrio acrílico sobre los que se fija el papel filtro para eliminar el exceso de muestra (e) y una caja de poliestireno (cámara de congelación) que contiene nitrógeno líquido (h) con dos recipientes (m, n). La temperatura en la parte superior de la cámara de congelación se mantiene a  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La muestra se sumerge en el recipiente lleno de criógeno (generalmente etano líquido) (m). La velocidad de enfriamiento debe ser alta para que se vitrifique la muestra y se evite la formación de hielo cristalino (cúbico o hexagonal). La caja de poliestireno completa se desplaza y la muestra se coloca en el segundo recipiente (n) lleno de nitrógeno líquido que contiene la caja de transferencia. (Kuntsche *et al.*, 2011).

En total, la vitrificación de la muestra, la inserción de la muestra en el soporte y la transferencia del soporte en el TEM sólo deben tomar unos minutos para evitar la contaminación con hielo cúbico o variaciones de temperatura (Kuntsche *et al.*, 2011).



**FIGURA 17. Esquema microscopio electrónico de transmisión.** (Kuntsche *et al.*, 2011). (A) Esquema de un microscopio electrónico de transmisión y del trayecto de electrones. (B) Esbozo de un porta muestras con funciones suplementarias integradas para cryo-TEM. (C) Sistema automatizado de vitrificación de muestras para cryo-TEM

### 1.3.3.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Mide el coeficiente de difusión translacional de las gotas al analizar la interacción entre el láser y la emulsión. La emulsión debe estar diluida para evitar la interacción entre las partículas, de esta manera el tamaño de la partícula puede ser calculada mediante la ecuación Stokes-Einstein para partículas en movimiento Browniano (Ecuación 7):

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta_1 D} \quad (7)$$

Dónde: r: Radio de la partícula, k: Constante de Boltzmann, T: Temperatura absoluta,  $\eta_1$ : Viscosidad del fluido, D: Constante de difusión de la partícula en el fluido

Algunos instrumentos analíticos, como el Zetasizer Nano ZS90 de Malvern Inc., se basan en este principio para determinar el tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula en una emulsión con tamaños de partícula entre 3 nm-3  $\mu$ m.

En este tipo de mediciones es importante asegurar que la viscosidad de la fase acuosa sea Newtoniana y que las partículas que se miden sean esféricas (Malvern Inc. 2013).

En el equipo Nano-ZS90, las mediciones se realizan al colocar la nanoemulsión directamente en la cubeta del módulo. La técnica de dispersión de luz dinámica mide la fluctuación, dependiente del tiempo, en la luz dispersada que surge de una suspensión de partículas que experimentan un movimiento browniano. Las partículas suspendidas en la nanoemulsión dispersan la luz de acuerdo a su tamaño de partícula como se ilustra en la Figura 18. El tamaño de partícula de los nanoemulsiones se puede caracterizar con diferentes diámetros promedios como se explicó anteriormente.



**FIGURA 18. Esquema funcionamiento de la técnica DLS en el equipo ZetaSizer Nano ZS90.** (Malvern Inc. 2013).

El índice de polidispersidad (PDI) es una estimación adimensional que se utiliza para describir la amplitud de la distribución de tamaño de partícula monodispersas. Para que una emulsión sea estable se esperan valores  $PDI \leq 2.5$ . en muestras polidispersas se deben calcular otros parámetros estadísticos como el decil 90 (Dv90) (Malvern Inc. 2013).

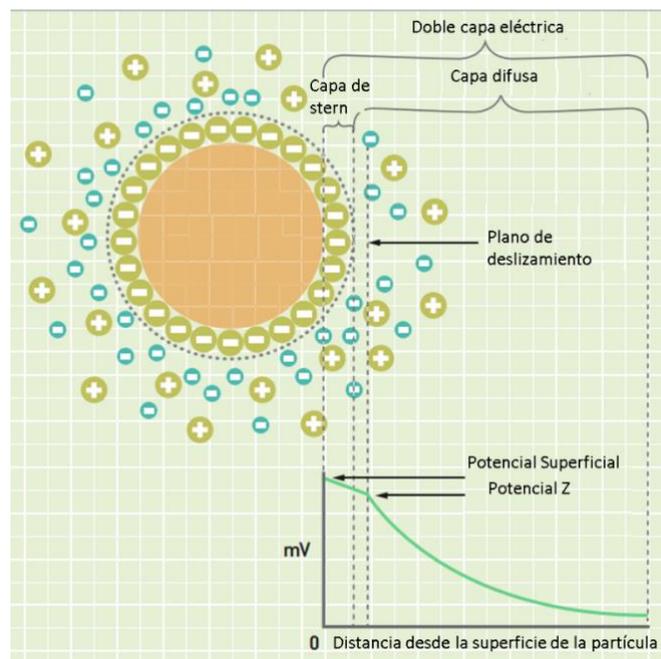
#### 1.3.3.4 Potencial $\zeta$

Debido a que la magnitud y el tipo de carga influyen la interacción entre las gotas y el medio circundante es de suma importancia poder conocer y representar su valor. Las gotas en la mayoría de las emulsiones en alimentos tienen una carga eléctrica apreciable, y por lo tanto las interacciones electrostáticas desempeñan un papel importante en la determinación de su estabilidad en general y sus propiedades fisicoquímicas. Se ha visto que existe una carga eléctrica que depende del pH y fuerza iónica entre las gotas de aceite y el emulsificante libre en emulsiones O/W. Una medida de la influencia del pH, la fuerza iónica o la composición de la solución es el potencial  $\zeta$ . Entre más alejado de 0 sea el potencial  $\zeta$ , mayor es la repulsión entre las partículas, evitando así la floculación y coalescencia (McClements, 2004).

La técnica utilizada para medir el potencial  $\zeta$  en el equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern Inc es microelectroforesis Laser-Doppler, en el cual, un campo eléctrico es

aplicado a una solución de moléculas o a una dispersión de partículas, las cuales se desplazan de acuerdo a su potencial  $\zeta$ .

La velocidad con la que se mueven las moléculas se determina con análisis de fase de luz difusa; este valor permite determinar la movilidad electroforética y por lo tanto el potencial  $\zeta$  (Malvern Inc., 2013), como se ilustra en la Figura 19. El signo, magnitud y rango de las interacciones que operan entre las gotas de una emulsión, determina en gran medida la estabilidad y las propiedades físico-químicas del sistema. Por esto es importante conocer, reconocer y caracterizar las interacciones de partículas en la emulsión que determinan la inestabilidad del sistema (Malvern Inc., 2013).



**FIGURA 19. Potencial  $\zeta$**  (Malvern Inc., 2013).

#### 1.3.4 Estabilidad de las emulsiones

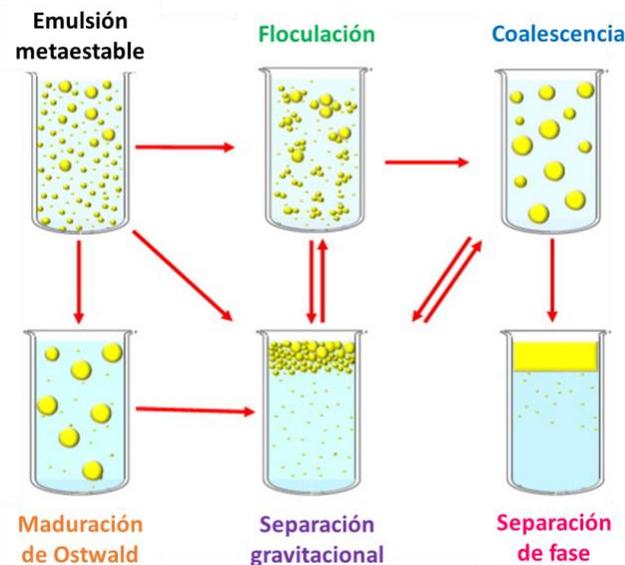
El término "estabilidad de la emulsión" se refiere a la capacidad de una emulsión de resistir los cambios en sus propiedades con el tiempo: cuanto más estable es la emulsión, sus propiedades cambiarán más lentamente. Una emulsión puede volverse inestable debido a diferentes tipos de procesos físicos y químicos. La inestabilidad física resulta de una alteración en la distribución espacial o en la organización

estructural de las moléculas (sedimentación, sedimentación inversa, floculación, coalescencia, inversión de fase, y maduración de Ostwald), mientras que la inestabilidad química (oxidación e hidrólisis) se produce por una alteración en el tipo de moléculas presentes (McClements, 2004).

Es por esto que es de suma importancia conocer cuales mecanismos producen la inestabilidad, como se relacionan y qué factores los influyen, de esta forma se pueden controlar las propiedades físico-químicas y obtener una emulsión más estable.

#### 1.3.4.1 Estabilidad física de las emulsiones

Las nanoemulsiones en general, debido a su menor tamaño de partícula, tienden a tener una mayor estabilidad en la separación gravitacional y la agregación de partículas y menor estabilidad con respecto a la maduración de Ostwald. En la Figura 15 se presenta un esquema general de los mecanismos de inestabilidad en las emulsiones (Chung y McClements, 2014).



**FIGURA 20.** Diagrama esquemático de los mecanismos de inestabilidad más comunes que pueden ocurrir en las emulsiones (Chung y McClements, 2014).

El fenómeno de agregación de partículas está determinado principalmente por las fuerzas de interacción entre las gotas, así la interacción entre un par de gotas se puede describir como la suma de sus fuerzas de Van Der Waals, interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y estéricas, las dos primeras fomentan la agregación y las dos siguientes la repulsión entre partículas impidiendo la agregación. Puesto que la repulsión estérica solo se da a corto rango, la interacción de repulsión más importante es la repulsión electrostática que depende directamente de la carga eléctrica en la gota (es decir, su potencial  $\zeta$ ). La magnitud tanto de las fuerzas de atracción como de repulsión se ve aumentadas con un mayor tamaño de partícula (McClements, 2011). Este fenómeno depende también del espesor y carga del emulsificante y del pH, fuerza iónica y temperatura de la fase continua (McClements y Rao 2011). Las dos formas más comunes de agregación de partículas son la Floculación y la Coalescencia. La floculación se presenta cuando dos o más gotas se juntan para formar un agregado en el cual permanece la integridad de las gotas. En la coalescencia dos o más gotas que han estado durante un tiempo considerable juntas se convierten en una sola más grande debido a la reorganización de las interacciones entre el emulsificante, la gota y el medio. La coalescencia también puede conducir a que se libere la fase lipídica, proceso conocido como *oiling off* en la que se ven gotas de aceite libre en la superficie de la emulsión (Piorkowski y McClements 2014).

La separación gravitacional, sedimentación o flotación. Es la separación de fases debido a la diferencia entre las densidades de las fases continua y dispersa. Así, si la densidad de las gotas es menor que la de la fase continua (como en las emulsiones O/W), las gotas migran hacia arriba produciéndose la flotación, también conocida como sedimentación inversa. Por el contrario, si la densidad de las gotas es mayor que la de la fase continua (como en las emulsiones W/O), las gotas se moverán hacia abajo causando sedimentación. La cristalización de la fase lipídica también puede conllevar a la sedimentación. Se previene al igualar las densidades de las dos fases en la emulsión y/o modificando la viscosidad de la fase continua (McClements y Rao, 2011).

La velocidad con la que se produce la separación está determinada por la ley Stokes y el movimiento browniano de las nanopartículas, que se presenta en la ecuación (2):

$$v_{Stokes} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9n_1} \quad \Delta = \sqrt{2Dt} \quad (2)$$

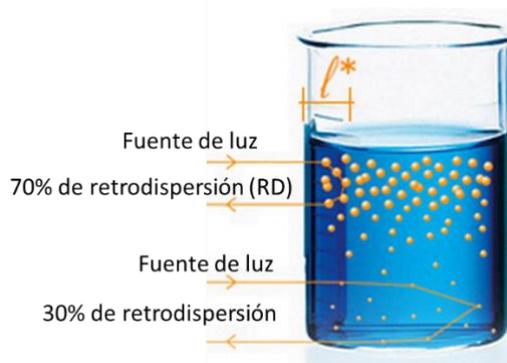
Donde, g: aceleración de la gravedad, r: tamaño de partícula de las gotas,  $\rho$ : densidad de: 1. la fase continua y 2. La gota, n: viscosidad de corte en la fase continua,  $\Delta$ : velocidad movimiento browniano, D: Coeficiente de difusión translacional de la partícula y t: tiempo

Maduración de Ostwald: Es el proceso en el cual las gotas grandes crecen a expensas de otras más pequeñas debido al transporte de masa de la fase dispersa desde una gota a otra a través de la fase continua (Cano-Sarmiento, 2014). Depende del emulsificante, su permeabilidad y la reología de la nanoemulsión. La maduración de Ostwald es muy importante en alimentos que contienen lípidos solubles en la fase continua puesto que la velocidad de transporte de masa se vería aumentada (McClements, 2009).

La velocidad con la que una emulsión se rompe, y el mecanismo por el que ocurre este proceso, depende de su composición y microestructura, así como de las condiciones ambientales que experimenta durante su vida útil, por ejemplo, variaciones de temperatura, agitación mecánica, y las condiciones de almacenamiento. Así, el mecanismo de inestabilidad que predomine, condicionará su vida de anaquel (Rayner y Dejmek, 2015). A parte de las características especificadas anteriormente para evaluar o predecir la estabilidad de las emulsiones: tamaño de partícula y carga de la gota, esta se puede medir en el tiempo de forma visual, al determinar la velocidad con la que se separan las fases al someterlas a algún factor externo como agitación o cambios de temperatura. También hay equipos como el Turbiscan que escanean el tubo de vidrio en el que se encuentra la emulsión de arriba abajo con un rayo de luz monocromático monitoreando la luz transmitida y dispersada. Esto mejora la precisión con la cual se observan las distintas fases evitando las limitaciones y errores humanos (Rayner y Dejmek, 2015). A continuación, se amplía la información sobre este equipo

#### 1.3.4.1.1 Turbiscan

El equipo recibe dos señales de luz, la luz transmitida a través de la muestra y la luz retrodispersada (RD) por la muestra. En función de estas detecta cambios en el tamaño de partículas y/o la concentración local de partículas. La utilización de este equipo es ventajosa puesto que no requiere preparación de la muestra, no es una técnica intrusiva, las condiciones se mantienen estables, no necesita dilución y la detección es 50 veces más rápida que el ojo humano. Detecta partículas en el rango de 5 nm-1 mm (Lemarchand *et al.*, 2003; Formulacion, 2013).



**FIGURA 21. Esquema funcionamiento del equipo Turbiscan** (Formulacion, 2013).

#### 1.3.4.2 Inestabilidad Química de las emulsiones

Una de las formas más comunes de inestabilidad química en los alimentos que contienen grasas es la oxidación lipídica.

La oxidación lipídica es uno de los factores determinantes en la calidad y vida de anaquel de alimentos naturales y procesados. Ésta influencia de manera adversa el sabor, olor, textura y contenido nutricional al formar productos primarios de auto-oxidación lipídica como hidroperóxidos, materiales poliméricos, compuestos volátiles asociados con la rancidez (como el 3-hexanal) y productos del rompimiento de cadenas de ácidos grasos (Waraho *et al.*, 2011) (Cui *et al.*, 2016) (Frankel *et al.*, 2002).

La velocidad con la que ocurre la oxidación lipídica depende de varios factores como: la estructura molecular de los lípidos (esterificados o libres), exposición a la luz, temperatura de almacenamiento, la velocidad a la que el oxígeno se disuelve en el medio, la presencia de prooxidantes /antioxidantes y la estructura organizacional de los lípidos (McClements y Decker 2000) (Charoen *et al.*, 2012). Además, la susceptibilidad a la oxidación incrementa de acuerdo al grado de insaturación de los ácidos grasos, siendo los ácidos grasos omega-3 los más susceptibles a la oxidación al ser altamente poliinsaturados como EPA, DHA y SDA (Espinosa *et al.*, 2015).

El primer paso para entender el potencial de una emulsión como sistema oxidativamente estable de liberación de compuestos bioactivos es entender la susceptibilidad oxidativa de cada lípido en la emulsión (Boon *et al.*, 2008). Uno de los mecanismos más comunes de oxidación lipídica en emulsiones es la interacción entre los hidroperóxidos lipídicos ubicados en la interface de la gota y los metales de transición ubicados en la fase acuosa (McClements y Decker, 2000). Es por esto que la interface aceite-agua de las emulsiones alimenticias tiene un gran impacto en las rutas de oxidación lipídica, al influir en la localización y reactividad de los metales de transición pro-oxidantes, como el ion Ferroso ( $Fe^{2+}$ ), que promueven la oxidación principalmente por la descomposición de hidroperóxidos de lípidos que van a formar más hidroperóxidos, acompañados de radicales peroxilo y alcoxilo que son altamente reactivos. A su vez, estos radicales reaccionan con otros ácidos grasos insaturados, propagando la reacción de oxidación (Cercaci *et al.*, 2007). Eventualmente, estas reacciones resultan en la descomposición de ácidos grasos que conllevan a la producción de productos secundarios de oxidación, como aldehídos y cetonas, asociadas con los olores y sabores de rancidez (Boon *et al.*, 2008). Además, también puede promover la inestabilidad física de algunas emulsiones. Por ejemplo, muchos de los productos de reacción generados durante la oxidación de los lípidos tienen actividad superficial, y por lo tanto pueden interactuar con la membrana interfacial que rodea a las partículas de tal modo que puede conducir a coalescencia.

La velocidad de oxidación lipídica en emulsiones O/W puede ser afectada por varios factores como, la composición de ácidos grasos, la composición iónica, tipo y

concentración de prooxidantes y antioxidantes, el pH de la fase acuosa, características de la fase oleosa como: tamaño de partícula, concentración y estado físico; y las propiedades interfaciales de la emulsión como el grosor, la carga, la reología, la permeabilidad y el área superficial (McClements y Decker, 2000; Waraho *et al.*, 2011).

Es por esto que se deben desarrollar estrategias efectivas para retardar la oxidación lipídica en emulsiones. Algunos de los métodos más utilizados para lograrlo son: incorporar antioxidantes, controlar las condiciones de almacenamiento, el pH y mejorar las propiedades interfaciales de las partículas con el fin de impedir el paso de oxígeno (McClements, 2004; Cercaci *et al.*, 2007).

### **1.3.5 Métodos de emulsificación**

La formación de nanoemulsiones no es un proceso espontáneo, y el sistema formado es metaestable, es por esto que se requieren métodos de alta energía para superar la energía libre superficial y así aumentar el área interfacial entre las dos fases, mejorando la dispersión y el rompimiento de las grandes gotas de aceite convirtiéndolas en gotas más pequeñas. Las técnicas de emulsificación se clasifican en dos grandes grupos: métodos de baja energía y métodos de alta energía.

#### **1.3.5.1 Métodos de Baja Energía**

Los métodos de baja energía dependen de la formación espontánea de pequeñas gotas de aceite dentro de la mezcla aceite-agua-emulsificante cuando la solución o las condiciones ambientales son apropiadas (temperatura o composición). Dentro de estos métodos encontramos: La emulsificación espontánea e inversión de fases (Anton y Vandamme, 2009; McClements, 2016).

#### **1.3.5.2 Métodos de Alta energía**

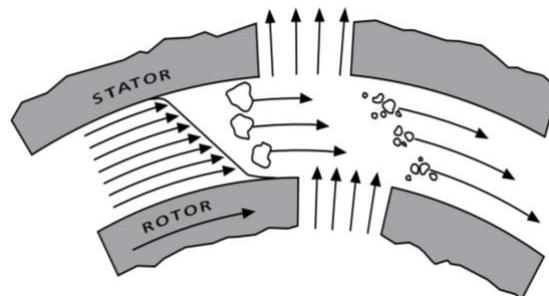
Los métodos de alta energía utilizan dispositivos mecánicos capaces de generar fuerzas de disrupción intensas que mezclan y quebrantan las fases oleosa y acuosa;

esto conduce a la formación de gotas diminutas de aceite. Estos métodos requieren que se les aplique alta energía para que las fuerzas disruptivas aplicadas excedan a las fuerzas regenerativas que mantienen a las gotas en su forma esférica. La fuerza mínima necesaria teórica, está dada por la presión de Laplace:  $\Delta P = \gamma / 2r$

Dentro de los métodos que se clasifican aquí se encuentran:

#### 1.3.5.2.1 Agitación de alta cizalla

Permite obtener emulsiones gruesas, como los agitadores tipo Ultraturrax. Estos agitadores constan de un rotor y un estator (Figura 22). El elevado número de revoluciones del rotor permite que el medio a procesar se aspire axialmente de modo automático en el cabezal de dispersión, para después presionarlo radialmente a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. Debido a las grandes fuerzas de aceleración, el líquido se somete a unos esfuerzos muy intensos de cizalla y empuje. Además, en la rendija de cizallamiento, existente entre el rotor y el estator, aparece una gran turbulencia que conduce a una mezcla óptima de la suspensión. El tamaño de gota disminuye con el tiempo de agitación, hasta que se llega a un límite, después del cual no hay cambios relevantes (IKA, 2013).



**FIGURA 22. Principio de operación del rotor estator del agitador Ultraturrax (IKA, 2013).**

#### 1.3.5.2.2 Homogeneizador de válvula de alta presión (HPVHs)

Es el más utilizado actualmente en la industria de alimentos. Funciona empujando la emulsión gruesa, mediante una bomba, a través de una cámara que cuenta con una válvula al final del camino. En esta válvula, por la reducción del tamaño en el paso, la emulsión experimenta fuerza de intensa disrupción como turbulencia, cizalla y cavitación que ocasionan que las gotas gruesas disminuyan su tamaño. Se pueden conseguir menores tamaños de gota al aumentar: la presión, el número de pasos, la velocidad de adsorción del emulsificante; al disminuir la tensión interfacial y cuando la relación de viscosidad entre la fase dispersa y continua este entre  $0.05 < \eta_d/\eta_c < 5$ .

#### 1.3.5.2.3 Microfluidizador

Se parece al HPVH en que también hace pasar la emulsión gruesa por un espacio muy pequeño a alta presión impulsado por una bomba, se diferencia en la forma en la que están diseñados los canales, puesto que la corriente principal se divide en 2 que se encuentran posteriormente a alta velocidad, permitiendo que estas corrientes colisionen y pasen por la pequeña apertura.

Se consiguen menores tamaños de partícula al aumentar la presión del homogeneizador, el número de pasos y la concentración del emulsificador; al disminuir: la relación de viscosidad de las fases dispersa y continua, es decir que sus viscosidades sean más parecidas con surfactantes iónicos.

#### 1.3.5.2.4 Ultrasonicador

Utiliza ondas de ultrasonido de alta intensidad (>20 kHz) para reducir el tamaño de las gotas ya sea de una mezcla de fases o una emulsión gruesa (Figura 23).

Los sonicadores de laboratorio consisten en una sonda ultrasónica que contienen un cristal piezoeléctrico que convierte las ondas eléctricas en ondas de alta presión. Cuando se introduce la sonda en la muestra se producen fuerzas disruptivas de turbulencia, cavitación y ondas interfaciales. Las fuerzas de cizalla son producidas

principalmente por la cavitación, definido como el proceso de formación de burbujas, su crecimiento e implosión en un medio líquido (Sivakumar *et al.*, 2014). Comparado con los métodos mecánicos tradicionales, el ultrasonido es una herramienta superior para obtener nanoemulsiones más homogéneas y por lo tanto más estables. Además, el consumo de energía es considerablemente menor que los dispositivos convencionales. El ultrasonicador es más versátil en términos de operación y limpieza del dispositivo, además es considerado como un método efectivo en costos para generar nanoemulsiones de grado farmacéutico. Muchos estudios han reportado la formación de nanoemulsiones con esta técnica a escala laboratorio. Sin embargo, también se han realizado estudios a escala industrial con equipos de emulsificación en flujo continuo como el reactor de cavitación hidrodinámica Liquid Whistle (LWHCR) con la preparación de nanoemulsiones estables a escala industrial (Cavazos-Garduño *et al.*, 2015). Otros equipos que se encuentran para producción industrial, se basan en el ultrasonido como el homogenizador ultrasónico Jet. El tamaño de gota disminuye al aumentar: el tiempo de sonicación, el nivel de energía, y la concentración de emulsificante (Kentish *et al.*, 2008).



**FIGURA 23. Sonicador Branson.**

#### **1.4 Síntesis de Antecedentes**

En los últimos años ha habido un creciente esfuerzo de investigación para mejorar la solubilidad y/o biodisponibilidad de los fitoesteroles, utilizando diferentes enfoques

como la modificación quimio-enzimática para hacerlos solubles en agua (He *et al.*, 2016), la formación de complejos de inclusión en ciclodextrinas (Sasako *et al.*, 2016; Comunian y Favaro-Trindade, 2016), la formación de microemulsiones (Fisher *et al.*, 2013; Rozner *et al.*, 2008), solubilización mediante fluidos supercríticos (Ubeyitogullieari y Ciftci, 2016), microcápsulas (Di Battista *et al.*, 2015) y nanoemulsiones (Engel y Schubert, 2005; Leong *et al.*, 2011; Alexander *et al.*, 2012; Panpipat *et al.*, 2013; Izadi *et al.*, 2015; Zychowsky *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2016).

Estas técnicas tienen varias desventajas como el uso de disolventes orgánicos, complicadas modificaciones químicas o enzimáticas que consumen tiempo, inestabilidad de los productos y baja biodisponibilidad (especialmente en las microcapsulas que presentan tamaños y distribuciones de partícula muy grandes) y la dificultad para controlar las propiedades de las partículas como en las microemulsiones que son pequeñas pero muy susceptibles a la desintegración una vez se cambia la configuración del sistema. Esto dificulta su incorporación en matrices alimenticias, que son todavía problemas importantes con las técnicas actuales (Weiss *et al.*, 2008). Otro factor limitante importante para el uso de estos sistemas en la industria alimentaria, es que sólo un número limitado de los materiales utilizados en ellos son de grado alimentario. Para la comercialización exitosa, se deben usar ingredientes grado alimentario, que sean preferiblemente económicos (Ubeyitogullieari y Ciftci, 2016).

Otra técnica utilizada, con menos frecuencia en los últimos años es la esterificación de FE que se evita debido a los altos costos de producción, sus tasas de absorción impredecibles, puesto que varían entre el 40-96% entre cada persona (Zychowsky *et al.*, 2016), su mayor propensión hacia la oxidación (Soupas *et al.*, 2005) y el alto consumo de triglicéridos en la dieta, entre 23-50 g por día (Ostlund *et al.*, 1999).

También se ha reportado que dependiendo del método para incorporar los FE en la matriz alimenticia será la eficiencia en la reducción de colesterol LDL (Rossi *et al.*, 2010). Incluso para el mismo tipo de FE, diferentes procesos de formulación conllevan a diferencias significativas en la dosis respuesta de los FE (Engel y Schubert, 2005). La emulsificación es uno de los medios más atractivos para incorporar FE en las matrices alimenticias y ha demostrado una buena eficiencia en disminuir los niveles

de colesterol LDL (Panpipat *et al.*, 2013; Ostlund *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2012; Zychowski *et al.*, 2016). Aunque los sistemas emulsionados enriquecidos con FE son efectivos en la reducción del colesterol LDL, su éxito final es altamente dependiente del estado físico y la localización de los FE en el sistema emulsionado (Zychowski *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que los FE solubilizados son más efectivos para reducir los niveles de colesterol LDL que los FE dispersos (no solubilizados) puesto que se encuentran en una fase amorfa y no cristalina que mejora su biodisponibilidad, sin embargo, la fase amorfa es más inestable dificultando su elaboración (Ostlund *et al.*, 1999; Paaver *et al.*, 2016). Otro aspecto deseable es el tamaño de partícula; tamaños de partícula pequeños (en el orden de nm) tienen una mayor área superficial que incrementa la tasa de solubilización de FE en las micelas mixtas, mejorando su efecto hipocolesterolemiante (Ribeiro *et al.*, 2016).

Las nanoemulsiones presentan buena tolerancia a inestabilidades debidas a la gravedad debido a su pequeño tamaño de partícula, mayor superficie interfacial que facilita la absorción del compuesto bioactivo, con un bajo impacto en la apariencia de bebidas o productos líquidos (McClements, 2011), además, la habilidad para suprimir la cristalización al formar partículas amorfas (Ribeiro *et al.*, 2016).

En la literatura son pocos los trabajos en los que se emplean nanoemulsiones (NE) o nanodispersiones para acarrear los FE (Engel y Schubert, 2005; Leong *et al.*, 2011a, b; Alexander *et al.*, 2012; Panpipat *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2016). La mayoría utilizan un homogenizador de alta presión (Leong *et al.*, 2011a,b; Alexander *et al.*, 2012) o microfluidización como método de homogenización (Engel y Schubert, 2005; Ribeiro *et al.*, 2016). En la revisión realizada solo Panpipat *et al.* (2013) utilizaron la ultrasonificación como método de homogenización en la producción de FE. Sin embargo, otros trabajos con compuestos bioactivos diferentes han demostrado que la ultrasonificación es un método efectivo para producir nanoemulsiones (Cavazos-Garduño, 2013; Ochoa-Flores, 2013; Chávez-Zamudio, 2015).

Otro factor importante a considerar en la preparación de NE de FE es la manera de dispersarlos en la fase oleosa (sin esterificarlos), antes de la homogenización. Se ha reportado que es posible mezclar a temperatura ambiente, con calor o con calor y en presencia de etanol para mejora su solubilidad (Alexander *et al.*, 2012). Sin embargo, Dykstra *et al.* (2014) reportaron que, en presencia de etanol la biodisponibilidad de los PS se vio limitada. Por lo tanto, es más conveniente disolver los FE al mezclarlos con temperatura en aceites, como lo hicieron Christiansen *et al.* (2002); Izadi *et al.* (2012, 2015), Ribeiro *et al.* (2016) y Zychowski *et al.* (2016).

Ahora bien, el aceite en el que se disuelven los FE juega un papel muy importante, ya que determina y controla las características físicas y químicas en la fase dispersa. Los triglicéridos de cadena media (TCM) se han utilizado como medio oleoso efectivo en la dispersión de FE (Christiansen *et al.*, 2002; Engel y Schubert, 2005; Waraho *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016). Debido a su alta estabilidad oxidativa durante el calentamiento, impiden la degradación térmica (Waraho *et al.*, 2011), su muy baja solubilidad en agua que, al estar junto con los FE, reduce y hace poco probable la maduración de Ostwald (Lindfors *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2016) y su alta capacidad para solubilizar los FE (hasta 35% a 100°C) (Engel y Schubert, 2005). En este punto es importante aclarar que no es conveniente alcanzar una supersaturación o incluso una saturación de FE en los TCM. Al estar saturada la mezcla es más probable que se formen cristales de FE en forma de aguja que pueden partirse y perforar la emulsión, lo que conlleva a inestabilidad y su consecuente sedimentación (Christiansen *et al.*, 2002; Engel y Schubert, 2005; Ribeiro *et al.*, 2016). Aunque, es posible que, a pesar de que se formen cristales si el tamaño de partícula es pequeño, el volumen disponible para formar núcleos de cristalización por gota se vea reducido impidiendo la cristalización (Ribeiro *et al.*, 2016).

Los emulsificantes que se han utilizado para estabilizar las NE o nanodispersiones de FE han sido sintéticos con una ingesta diaria aceptable entre 10 y 25 mg/Kg (McClements, 2016), principalmente Tween 20 (Engel y Schubert, 2005; Leong *et al.*, 2011b; Panpipat *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2016) y esterres de ácidos grasos de sacarosa (Leong *et al.*, 2011a). Su uso se debe a que es necesario un emulsificante

que sea estable en las temperaturas de solubilización de los FE y que, además, pueda encapsularlos rápidamente en la fase continua (Engel y Schubert, 2005). Sin embargo, otros emulsificantes de origen natural como los fosfolípidos han demostrado una mejor estabilidad física, química y biodisponibilidad del compuesto bioactivo.

El efecto sinérgico en la biodisponibilidad de los FE fue demostrado por Ostlund *et al.* (1999) en un estudio en humanos a quienes se les administró sitostanol en micelas de lecitina, encontrando que la reducción del colesterol y LDL fue del 37%, incluso en dosis de 300 mg. Schuler *et al.* (1990) demostraron que la presencia de fitoesteroles en los fosfolípidos modifica las propiedades físicas de la membrana externa y en particular el empaquetamiento molecular en las bicapas de fosfolípidos, que mejora su incorporación en los sistemas acarreadores, obteniendo estructuras unilamelares (Alexander *et al.*, 2012). Al controlar cuidadosamente la relación fosfolípidos: FE y el método para homogenizarlos y dispersarlos en agua, puede ser posible obtener alta eficiencia de encapsulamiento, limitada agregación, así como alta estabilidad (Halling y Slote, 2004; Alexander *et al.*, 2012).

Se ha reportado que al modificar los fosfolípidos química o enzimáticamente, es posible aumentar su biodisponibilidad, y estabilidad física. Cavazos-Garduño (2013) y Ochoa-Flores (2013) reportaron que la modificación enzimática (con fosfolipasa A1 inmovilizada en Duolita) de PC con ácidos grasos omega-3 para estabilizar nanoemulsiones O/W de ácido betulínico y, ácidos grasos de cadena media (AGCM), para estabilizar nanoemulsiones O/W de curcumina, permite obtener menores tamaños de partícula, mayor estabilidad y una mejor biodisponibilidad de los compuestos bioactivos acarreados al utilizar la PC modificada vs la PC sin modificar. Por su parte, Chávez-Zamudio (2015) obtuvo LPC al remover un ácido graso de la PC con la enzima fosfolipasa A1 y comprobó que era un emulsificante efectiva para estabilizar y mejorar la biodisponibilidad de nanoemulsiones O/W tanto de curcumina como de ácido betulínico. Estas emulsiones fueron preparadas utilizando glicerol que se ha reportado que mejora la dispersión y disminuye el tamaño de partícula de la NE al modificar la viscosidad del medio (Qian y McClements, 2011).

Finalmente, es importante considerar que el tipo de emulsificante puede tener un gran impacto en la oxidación lipídica (Uluata *et al.*, 2015), especialmente cuando el compuesto bioactivo tiene actividad interfacial (Cercaci *et al.*, 2007) y es propenso a la oxidación como los FE que forman POFs que se pueden encontrar en los productos de consumo final (García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011; Alemany-Costa *et al.*, 2012; González-Larena *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015).

En las emulsiones el mecanismo de oxidación es diferente que en los aceites crudos, pues ocurre en la interface, ya que existe una gran superficie de contacto que aunado a sustancias pro-oxidantes en la fase acuosa (como metales de transición) pueden influir en la desestabilización de la interface y oxidación del compuesto activo (Cercaci *et al.*, 2007; Waraho *et al.*, 2009; Waraho *et al.*, 2011; Kittipongpittaya *et al.*, 2012; Uluata *et al.*, 2015). Es por esto que estabilizar las nanoemulsiones con compuestos que tengan también actividad antioxidante, como los fosfolípidos (Cardenia *et al.*, 2011; Cui y Decker, 2015), es de gran interés (Uluata *et al.*, 2015).

Existe una necesidad imperante de un nuevo método simple y con compuestos naturales que permitan disminuir el tamaño y la cristalinidad de fitoesteroles con el fin de mejorar su solubilidad y, por consiguiente, su biodisponibilidad en matrices acuosas. Este trabajo ofrece un avance en el entendimiento de cómo pueden ser introducidos los FE para formular productos nutracéuticos en altas proporciones.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen varios productos en el mercado como mantequilla, margarina, queso crema, leche y yogurt que son enriquecidos con fitoesteroles esterificados, con el fin de mejorar su solubilidad en matrices lipídicas, impedir su cristalización y aprovechar su efecto hipocolesteromiante. Sin embargo, al esterificar los fitoesteroles con ácidos grasos se añaden alrededor de un 20% de lípidos, que no son saludables ni recomendables para personas con altos niveles de colesterol. Es por esto que en los últimos años se ha incrementado el interés por encontrar una forma de estabilizar y solubilizar los fitoesteroles en matrices acuosas, lo que facilitaría e incrementaría sus aplicaciones.

Las nanoemulsiones son una excelente alternativa para facilitar la incorporación de fitoesteroles en sistemas O/W, protegiéndolos de la oxidación y conservando así sus propiedades bioactivas. En la actualidad existen muy pocos reportes que estudien la incorporación de fitoesteroles con emulsificantes naturales y en este tipo de matrices. Por lo tanto, es importante evaluar nuevas formas de administrar los fitoesteroles y caracterizar física y químicamente estas emulsiones con el fin de determinar las inestabilidades a las cuales este sistema es susceptible.

Para esto, se plantea estudiar y caracterizar fisicoquímicamente las nanoemulsiones de fitoesteroles, elaboradas con 3 emulsificantes modificados enzimáticamente, PC- $\omega$ 3, LPC-AGCM y LPC, y comparar su acción con la lecitina sin modificar seleccionando el emulsificante que permita obtener un sistema con el mejor tamaño de partícula, estabilidad, potencial  $\zeta$ , protección del compuesto activo hacia la oxidación y eficiencia de encapsulación, estabilidad en el tiempo y la conservación de sus características iniciales.

### **3. HIPÓTESIS**

Es posible preparar nanoemulsiones de fitoesteroles O/W estables con propiedades físicas y químicas deseadas utilizando como emulsificante fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina modificada con ácidos grasos de cadena media y fosfatidilcolina modificada con ácidos grasos omega 3.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. General**

Evaluar las características físico-químicas de nanoemulsiones O/W de fitoesteroles formuladas con PC y emulsificantes modificados enzimáticamente (PC- $\omega$ 3, LPC-AGCM y LPC)

### **4.2. Específicos**

- Formular y desarrollar nanoemulsiones O/W de fitoesteroles con los emulsificantes en estudio.
- Evaluar las características físicas y químicas de las nanoemulsiones preparadas con los diferentes emulsificantes.
- Evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones en función de la temperatura de almacenamiento y con respecto al tiempo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos

Todos los compuestos químicos y solventes utilizados son grado analítico o grado HPLC. Los emulsificantes LPC-AGCM y PC- $\omega$ 3 fueron proporcionados por el laboratorio Postcosecha de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos – UNIDA. La PC utilizada tanto para las modificaciones enzimáticas como para la elaboración de las emulsiones fue Lecitina de Soya al 95% pureza Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL). La enzima utilizada en la modificación fue la Fosfolipasa A1 Lecitase Ultra LYN 05047 (Novozymes A/S Bagsvaerd, Denmark). En las nanoemulsiones se utilizaron fitoesteroles libres (Sigma,  $\beta$ -Sitosterol  $\geq$ 70%) y glicerol ( $\geq$ 99.5% Sigma, 100 mL).

### 5.2. Metodología

En el presente trabajo se evaluó la incorporación de fitoesteroles a nanoemulsiones O/W elaboradas con 3 emulsificantes modificados enzimáticamente. El trabajo se llevó a cabo como se explica en el cuadro metodológico (Figura 24). De manera general se pueden diferenciar tres fases que comprenden la preparación de las emulsiones, seguido por el análisis de las características fisicoquímicas de las emulsiones preparadas, y finalmente el análisis y evaluación del efecto de los emulsificantes en la incorporación y la estabilidad de los fitoesteroles en las nanoemulsiones con los datos obtenidos.

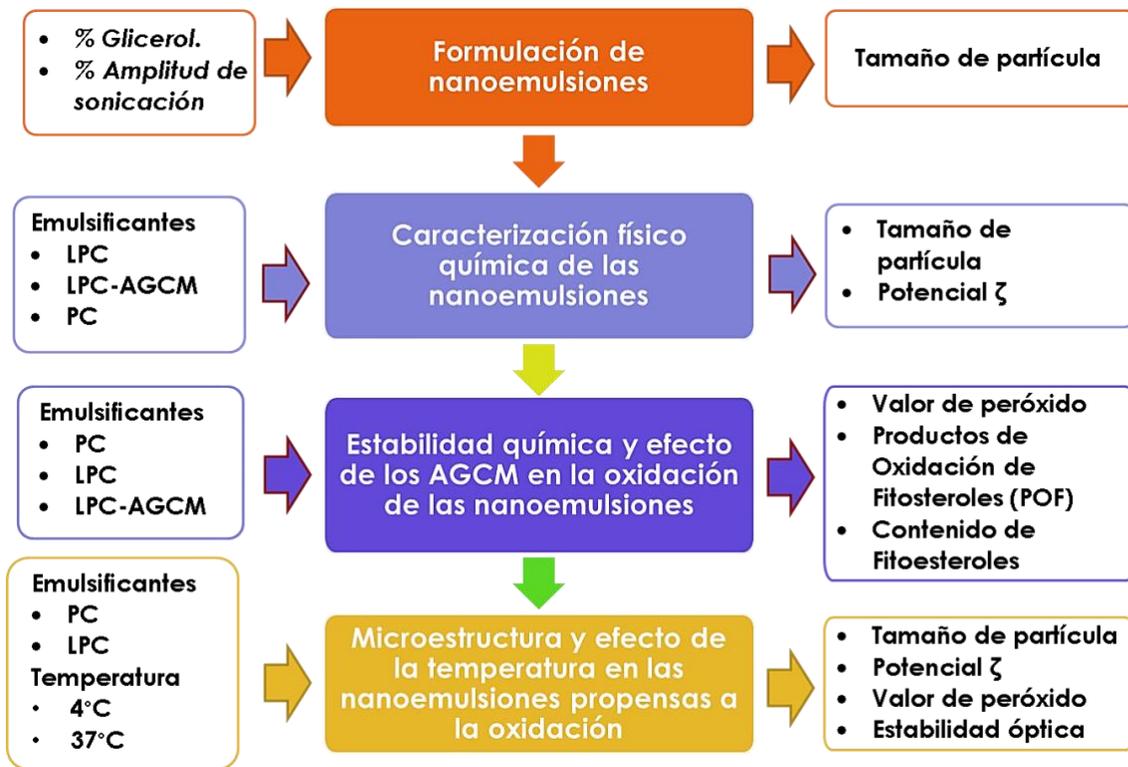


FIGURA 24. Cuadro Metodológico

Adicionalmente, se realizaron dos fases preliminares. En la primera se preparó uno de los emulsificantes modificados enzimáticamente (LPC) y en la segunda se evaluaron los factores que tienen mayor influencia en la preparación de las nanoemulsiones de fitoesteroles con un diseño factorial  $3^2$  como se especifica en la Tabla 3.

TABLA 3. Diseño experimental fase preliminar

Factor	Nivel
Concentración de glicerol en la nanoemulsión	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10%</li> <li>• 20%</li> <li>• 30%</li> </ul>
Porcentaje de amplitud en el equipo de ultrasonificación (potencia equivalente)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% (4 W)</li> <li>• 20% (8 W)</li> <li>• 30% (12 W)</li> </ul>

### 5.2.1. Preparación del emulsificante LPC

La modificación enzimática de fosfatidilcolina (PC) a lisofosfatidilcolina (LPC) se realizó según lo reporta Lim *et al.* (2014), con algunas adecuaciones. La hidrólisis de PC a LPC se hizo en hexano usando la fosfolipasa A1 (Lecitase Ultra LYN05047) como biocatalizador; las proporciones fueron: para 1 g de PC, se añadieron 4 mL de hexano, 200  $\mu$ L de agua y 50  $\mu$ L de enzima. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 60°C y 300 rpm en un matraz Erlenmeyer con tapa dentro de un agitador orbital con control de temperatura (MaxQ, ThermoScientific). La enzima se añadió cuando el agitador orbital alcanzó las condiciones de reacción y desde ese momento se empezaron a contar las 2 horas de reacción.

Una vez completo el tiempo de reacción se procede con la purificación, basada en el método propuesto por Estiasih *et al.* (2013). Esta consiste en añadir a la mezcla de reacción acetona (98% pureza, Baker) fría, a menos de 0°C, agitar vigorosamente, dejar reposar por 20 minutos y decantar. La purificación de fosfolípidos con acetona se realizó 5 veces. La relación acetona [mL]:PC inicial [g] fue de 20:1

### 5.2.2. Preparación de la nanoemulsiones

La proporción de fase continua a fase dispersa fue 95:5 (Cavazos-Garduño, 2013; Ochoa-Flores, 2013; Chavez-Zamudio, 2015). Se usó como compuesto bioactivo fitoesteroles libres ( $\beta$ -Sitosterol  $\geq$ 70% de pureza, Sigma) con una relación 10:1 emulsificante:fitoesteroles. Para conseguir las condiciones en las cuales se obtienen las emulsiones más estables se evaluaron 3 concentraciones de glicerol (10, 25 y 30%) y 3 amplitudes en la sonicación (10, 20 y 30%) como fase preliminar.

La preparación de las nanoemulsiones se realizó según lo propusieron Engel y Schubert (2005), con modificaciones basadas en las metodologías de Cavazos-Garduño (2013), Ochoa-Flores (2013) y Chávez-Zamudio (2015). Brevemente, se preparó primero la fase continua compuesta por glicerol ( $\geq$ 99.5% Sigma, 100 mL) (10, 20 o 30%, p/p); el emulsificante a evaluar con una relación 10:1 con respecto a los

fitoesteroles y el porcentaje restante agua desionizada. El fosfolípido se disolvió en agua a 50°C con glicerol y se agito durante 20 minutos con un agitador magnético. Posteriormente, se pasó la mezcla homogénea por un baño ultrasónico (Aqua Wave 9376 Barnstead Lab Line) durante 1 min y finalmente se calentó a 90°C en una plancha de calentamiento.

La fase dispersa se preparó con 4% de triglicéridos de cadena media (TCM 100% Pure MCT Oil, Swanson, California) y 1% de fitoesteroles (excepto para las NE con LPC-AGCM que fue 4.5% TCM y 0.5% FE, conservando la relación emulsificante: fitoesteroles). Posteriormente, se colocó en un baño ultrasónico durante dos minutos y finalmente se calentó a 105°C en una plancha de calentamiento. Todos los porcentajes son en peso, el 100% corresponde al peso final de la nanoemulsión. En la Tabla 4, se resume la composición de la emulsión.

**TABLA 4. Formulación de las emulsiones**

<b>Compuesto</b>	<b>Porcentaje p/p</b>
<b>Glicerol</b>	10, 20 o 30%
<b>Emulsificante</b>	10%
<b>Fitoesteroles</b>	1%
<b>TCM</b>	4%
<b>Agua</b>	75, 65 o 55%

Una vez preparadas ambas fases y en las temperaturas antes mencionadas se añadió la fase dispersa a la continua y se mezcló con un agitador magnético (Engel y Schubert, 2005). Una vez mezclada se pasó por un homogeneizador tipo rotor estator Ultraturrax T25 (IKA Works, Inc. Staufen, Alemania) por 3 minutos a 20.000 rpm para producir una emulsión gruesa aceite en agua. Esta emulsión gruesa se llevó al equipo de ultrasonicación (Sonicador Branson Digital S-450D, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) para obtener la nanoemulsión. Las condiciones fueron 50 % de ciclo de

trabajo, 12 minutos de operación y temperatura máxima de 35.2 °C. La amplitud a la cual se obtuvieron las emulsiones más homogéneas fue evaluada (10, 20 y 30% que correspondieron a 4, 8 y 12 W). Finalmente, las nanoemulsiones preparadas se enfriaron para su caracterización (Engel y Schubert, 2005).

Se evaluaron los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión (tamaño de partícula, potencial  $\zeta$ , morfología, valor de peróxidos, contenido de fitoesteroles y POFs) durante un tiempo de almacenamiento de 14 días a 37°C y adicionalmente se realizó un estudio de estabilidad, evaluando 2 temperaturas de almacenamiento 4 y 37 °C durante 30 días. La estabilidad de las emulsiones fue medida referente a los cambios que mostraron en el tamaño de partícula, el valor de peróxido y sus características ópticas.

### **5.2.3. Análisis de las características fisicoquímicas de las nanoemulsiones**

#### **5.2.3.1. Análisis del tamaño de partícula y potencial $\zeta$ .**

Se determinaron en el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Inc.); este equipo emplea la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) para detectar el tamaño de partícula e índice de polidispersidad como se explicó en la sección 1.3.3.1. Su intervalo de detección es de 0.3 nm a 5  $\mu$ m. Las muestras se diluyeron con agua destilada desionizada utilizando un factor de dilución 1:30 (nanoemulsión:agua). Se utilizaron celdas Versa Flour Cuvette 170-2415 para determinar el tamaño de partícula.

Para medir el potencial  $\zeta$  el equipo utiliza la técnica de microelectroforesis laser-Doppler que se especifica en la sección 1.3.3.4. Para determinar el potencial  $\zeta$ , las muestras se diluyeron utilizando el mismo factor de dilución, se utilizaron celdas electroforéticas del Zetasizer (Nano-ZS90). Todas las mediciones se realizaron por triplicado, con un ángulo de dispersión de 90° y a 25 °C. Para precisar la medida del potencial  $\zeta$  se midió el valor de pH de la emulsión con un pHmetro Thermo Orion 5 star (Thermo Fisher Scientific, Inc).

### 5.2.3.2. Evaluación del contenido de fitoesteroles

#### 5.2.3.2.1. Extracción de la fracción lipídica en la emulsión

La extracción de la fracción lipídica de la emulsión se realizó añadiendo 30  $\mu\text{L}$  de 19-hidroxicolesterol y 140  $\mu\text{L}$  de dihidrocolesterol, como estándares internos, a un tubo Pyrex con tapa; los solventes de los estándares fueron evaporados con una corriente de  $\text{N}_2$ . El tubo se pesó, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de emulsión y se volvió a pesar. Posteriormente se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo:metanol (1:2), se mezcló en vortex durante 1 min y enseguida se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 180  $\mu\text{L}$  de NaCl 0.3% p/v. Se mezcló por 1 min, se sonicó por 10 minutos y se centrifugó a 3000 rpm por 20 min. La fase acuosa superior fue separada y lavada con 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se centrifugó por 20 minutos a 3000 rpm, se descartó la fase acuosa y se recuperaron las dos fases oleosas en un matraz limpio y previamente pesado. Se secó bajo corriente de  $\text{N}_2$  y se resuspendió en 3 mL de cloroformo, se homogeneizó y finalmente, se separó el contenido en 2 tubos cónicos, cada uno con 1.5 mL de solución. Este extracto lipídico de 1.5 mL se utilizó para determinar la cantidad de fitoesteroles y POFs.

#### 5.2.3.2.2. Purificación de los fitoesteroles de la fracción lipídica en la emulsión

La purificación se realizó según el método descrito por Bortolomeazzi *et al.* (1990), con algunos ajustes. Se tomó uno de los tubos cónicos de 1.5 mL y se le evaporó el solvente bajo corriente de  $\text{N}_2$ . Enseguida, se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de hexano:éter dietílico (80:20) y se purificó este extracto en una columna STRATA SI-1 silica de 500 mg/3mL (STRATA™, Phenomenex, Torrence, CA). La activación de la columna se hizo con 3 mL de hexano, enseguida se agregó la muestra y se eluyó con 5mL de hexano: éter dietílico (80:20). Finalmente, los fitoesteroles se eluyeron con 4mL de hexano: éter (1:1) y 3 mL de metanol. La muestra se secó con nitrógeno y se silaniza con una mezcla silanizante (5:2:1 v/v/v) de piridina, hexametildisiloxano y trimetilclorosiloxano (Sigma) por 20 minutos a 40°C (Sweeley *et al.*, 1963). Después se secó con nitrógeno y se añadieron 0.5 mL de hexano. Finalmente, se centrifugó por

5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un vial para cromatografía de gases (CG) (Leong *et al.*, 2011b; Leal-Castañeda *et al.*, 2015).

### 5.2.3.2.3. Análisis por cromatografía de gases

La cuantificación del contenido de fitoesteroles en la emulsión se determinó en un cromatógrafo de gases acoplado a masas Shimadzu QP 2010 Plus gas chromatograph (Kyoto, Japon) equipado con un inyector split-splitless y acoplado a un detector de impacto de electrones (EI) en el espectrómetro de masas. Se utilizó una columna capilar fused-silica Restek RTX-5 (10 m× 0.1 mm i.d. × 0.1 µm film thickness; Bellafonte, PA) cargada con 95% dimetil- y 5% difenil-polisiloxano. La temperatura fue programada de 220 a 325 °C en una rampa de 5°C/min. La temperatura del inyector y la fuente de iones se fijaron a 325 y 320°C respectivamente. La inyección se realizó en modo split (1:50). El gas acarreador fue helio con una velocidad lineal de 47.7 cm/s. La fuente de energía fue 70 eV (Inchingolo *et al.*, 2014).

### 5.2.3.3. Determinación de productos de oxidación de los fitoesteroles, POFs.

#### 5.2.3.3.1. Purificación de los óxidos de fitoesteroles de la fracción lipídica en la emulsión

Se tomaron los otros 1.5 mL del extracto recuperado con cloroformo, se secaron bajo corriente de N<sub>2</sub>, se resuspendieron en 200 µL de hexano:éter dietílico (95:5) y se purificaron en una columna Supelclean™ LC-Si SPE tubes 500 mg/3 mL (Supelco) de acuerdo al método reportado por Guardiola *et al.* (1995). La activación de la columna se hizo con 5 mL de hexano, enseguida se agregó la muestra y se eluyó con 5 mL de hexano; después se eluyó con 10 mL de hexano:éter dietílico (95:5), 30 mL de hexano:éter dietílico (90:10) y 10 mL de hexano:éter dietílico (80:20). Finalmente, se recolectaron en tubos limpios los óxidos de fitoesteroles con 10 mL de acetona. La muestra se secó con nitrógeno y se silanizó con una mezcla silanizante (5:2:1 v/v/v) de piridina, hexametildisiloxano y trimetilclorosiloxano por 20 minutos a 40°C (Sweeley *et al.*, 1963). Posteriormente se secó con nitrógeno y se añadieron 0.05 mL de hexano.

Finalmente se centrifugo por 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un vial para CG.

### 5.2.3.3.2. Determinación de POFs

La determinación de los productos de oxidación de los fitoesteroles se realizó siguiendo la metodología publicada por Leal-Castañeda *et al.* (2015) y utilizando las mismas condiciones especificadas en la sección 5.2.3.2.3 para la cuantificación de fitoesteroles en un cromatógrafo de gases acoplado a masas Shimadzu QP 2010 Plus gas chromatograph (Kyoto, Japon). Se midió en un intervalo de 40 a 650 m/z a una velocidad de 2500 uma/s. Los modos de adquisición e integración fueron: exploración completa de la corriente total de iones (TIC) y monitoreo de iones individuales (SIM), respectivamente. La identificación de POFs se realizó al comparar sus tiempos de retención y su espectro de masa con los reportados en estudios previos (Alemany *et al.*, 2013; Apprich y Ulberth, 2004; Inchingolo *et al.*, 2014; Leal-Castañeda *et al.*, 2015; Menéndez-Carreño *et al.*, 2016). Los POFs fueron reconocidos y cuantificados por sus iones característicos: 19-hidroxicolesterol (353), 7 $\alpha$ -hidroxistosterol (484), 7 $\beta$ -hidroxistosterol (484),  $\alpha$ -epoxistosterol (412),  $\beta$ -epoxistosterol (412), 7-cetostosterol (500), sitostanetriol (431).

### 5.2.3.4. Determinación del valor de peróxido en la nanoemulsión

Los productos primarios de oxidación, hidroperóxidos se determinaron con el método descrito por Shantha y Decker (1994), con las modificaciones realizadas para emulsiones de Hu *et al.* (2003), con el fin de evaluar la estabilidad térmica de la fase dispersa en la emulsión. En resumen, se tomaron 300 $\mu$ L de la emulsión, se añadió 1.5 mL de isoctano: isopropanol (3:1) para extraer los hidroperóxidos de la emulsión, se mezcló en vortex por 10 s, se esperaron 20s y se mezcló de nuevo 2 veces más. Se centrifugo a 3000 rpm por 2 min, se tomaron 200  $\mu$ L de la fase orgánica superior y se depositaron en un tubo limpio. Se agregaron 2.8 mL de metanol: butanol (2:1) y se añadieron 30  $\mu$ L de Fe(SCN)<sub>2</sub> preparado en el momento del ensayo. Se permitió el

desarrollo del color por 20 min cubriendo las muestras con papel aluminio y se leyó el cambio de coloración en un espectrofotómetro Jasco V-550 a una longitud de onda de 510 nm. Para preparar el  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$  se pesaron 0.2 g de  $\text{FeSO}_4$ , se le agregaron 5 mL de agua desionizada, se mezcló en vortex por 5 s, se tomó inmediatamente 1 mL de esta solución y se mezcló con 1 mL de  $\text{BaCl}_2$  (0.132 M), se mezcló en vortex por 10 s y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante ( $\text{FeCl}_2$ ) y se mezclaron con 200  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{SCN}$  (3.94 M), ocurrió un cambio de color y se formó el  $\text{Fe}(\text{SCN})_2$  que se agregó inmediatamente a las muestras.

### 5.2.3.5. Análisis estructural de la emulsión

Para realizar el análisis estructural de las de las nanoemulsiones se capturaron y analizaron imágenes en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) del Centro de Nanociencias, Micro y Nanotecnología del Instituto Politécnico Nacional en la Ciudad de México. La muestra se diluyó tomando 1 gota y agregándola en 2 mL de agua destilada. Una gota de la muestra se puso en el portamuestra de carbono y este se introdujo en el equipo de congelación de muestras CryoPlunge CP3-Gatan, que regula la temperatura y humedad de la muestra a  $-170^\circ\text{C}$  y 80% HR. El Cryo Plunge funciona con  $\text{N}_2$  líquido para mantener la temperatura y etano líquido para vitrificar la muestra. La muestra congelada se introdujo en el portamuestras de cobre del equipo TEM JEOL modelo JEM.2100 que opera con un voltaje de 80 Kv, tiene un filamento de boruro de lantano y está equipado con un porta-muestras criogénico marca Gatan 914 con controlador de temperatura TSmart 900 Gatan. Las imágenes fueron analizadas con el software Digital Micrograph de Gatan.

### 5.2.3.6. Caracterización óptica de la estabilidad en las nanoemulsiones

La estabilidad de las nanoemulsiones preparadas se evaluó empleando un analizador óptico de dispersión de luz, Turbiscan (Formulacion, Francia). La medición se realizó con la técnica de dispersión múltiple de luz estática; para esto se depositó la muestra en una celda cilíndrica de vidrio y se analizó mediante un haz de luz emitida en la

## MATERIALES Y MÉTODOS

longitud de onda del infrarrojo cercano (880 nm) que escanea la celda de arriba abajo (Mao *et al.*, 2010). Se evaluó la estabilidad de las nanoemulsiones almacenadas a 37 y a 4°C cada día durante 5 minutos por un mes (Yuan *et al.*, 2008; Camino y Pilosof, 2011).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Fase preliminar

#### 6.1.1. Evaluación del tiempo de sonicación y la concentración de glicerol en la NE

Utilizando fosfatidilcolina al 90% se prepararon 10 g de emulsión con la composición que se muestra en la Tabla 5. Cada emulsión se preparó por duplicado.

**TABLA 5. Composición emulsiones fase preliminar [%p/p]**

<b>Componente</b>	<b>Fase continua</b>	<b>Fase dispersa</b>
PC (90%)	5 %	-
Glicerol	10, 20 o 30%	-
Agua	80, 70 o 60%	-
TCM	-	4.5 %
FE	-	0.5 %

En la Figura 25 se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la concentración de glicerol con respecto a la amplitud utilizada en el equipo de ultrasonificación.

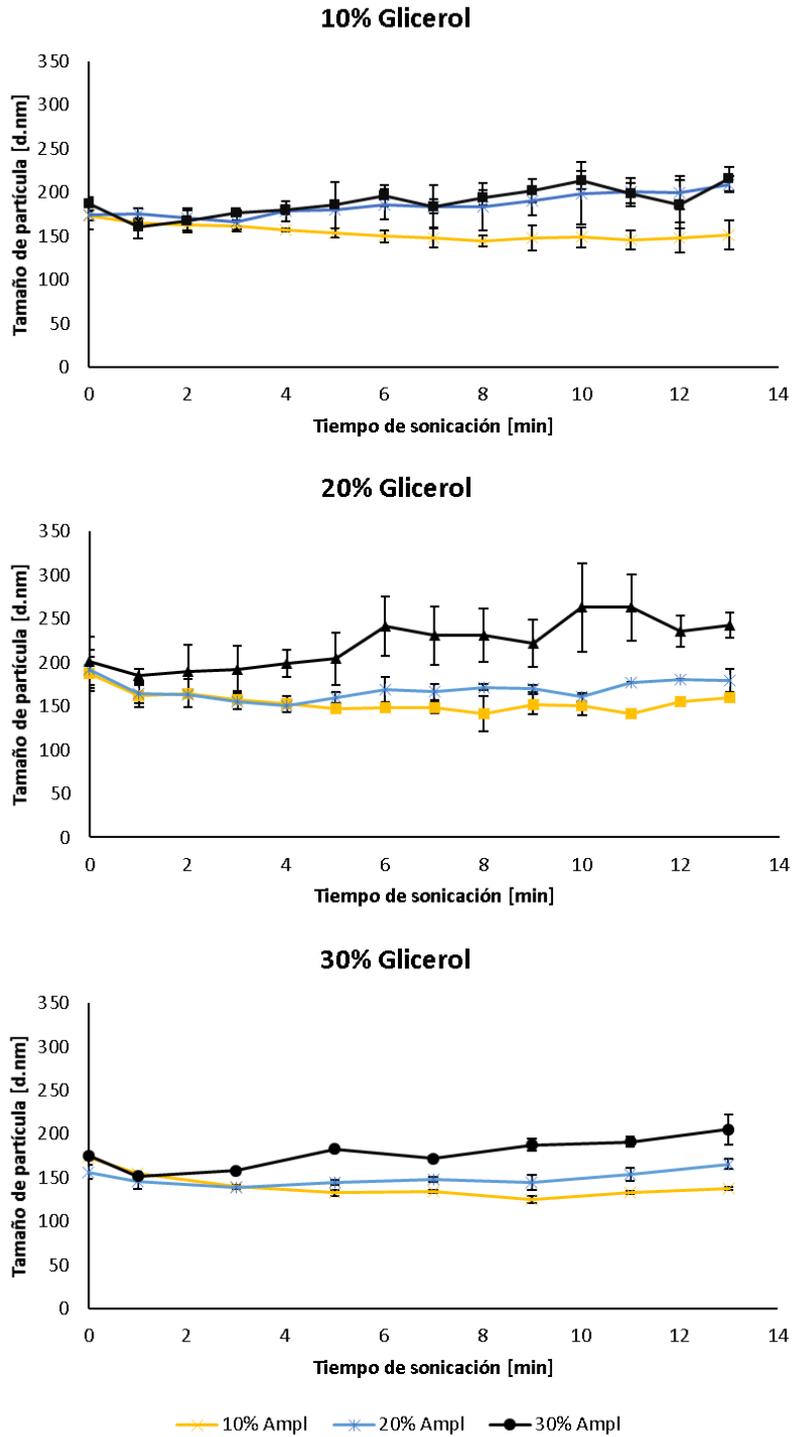


FIGURA 25. Efecto de la concentración de glicerol y la amplitud en el tamaño de partícula de la nanoemulsión. Emulsiones realizadas a 40, 80 y 120 W de potencia con un 10%, 20% y 30% de glicerol.

De la Figura 25 es claro el efecto del glicerol. A mayor concentración de glicerol se pueden obtener menores tamaños de partícula. El glicerol aumenta la viscosidad del medio impidiendo la aglomeración de partículas; es decir, previene la recoalescencia puesto que disminuye la frecuencia de colisión entre estas (McClements, 2005; Chanasattru *et al.*, 2008, 2009; Sakulku *et al.* 2009). Además, cuando la viscosidad entre la fase oleosa y acuosa es más parecida, las fuerzas disruptivas en el equipo de homogenización, actúan de mejor manera, lo que permite obtener tamaños de partícula más pequeños y homogéneos (McClements, 2011; Qian y McClements, 2011; Wooster *et al.*, 2008; Canselier *et al.*, 2002).

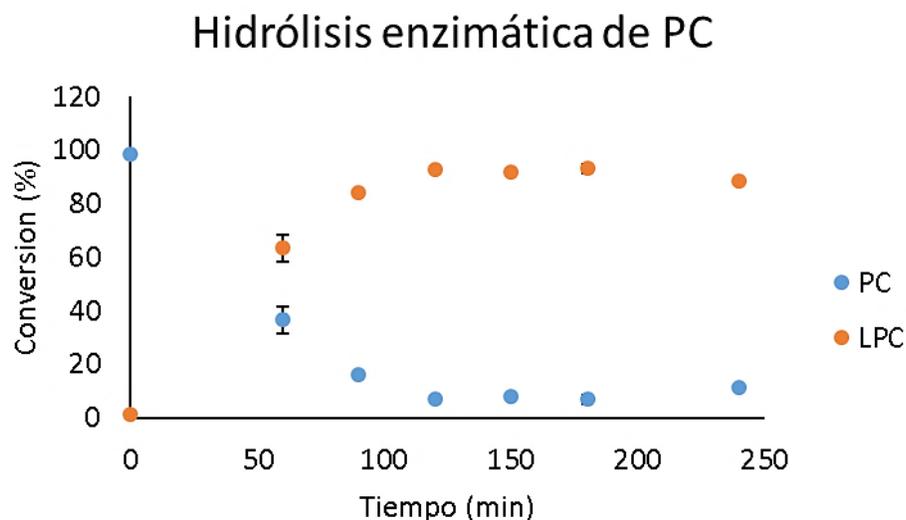
Con respecto a la disminución del tamaño de partícula debido a la adición de glicerol Qian y McClements (2011) variaron la concentración de la fase continua, para evaluar el efecto de la viscosidad, al incluir diferentes cantidades de glicerol (0 - 50 wt%) en la fase acuosa antes de la homogenización. Usaron como emulsificante SDS al 2.5% y encontraron una apreciable reducción en el tamaño medio de partícula al incrementar la concentración de glicerol, que pasó de 127 nm con 0% de glicerol a 87 nm con 50% de glicerol. Su estudio concuerda con el trabajo de Wooster *et al.* (2008), quienes encontraron que la adición de polietilenglicol (PEG) en la fase acuosa antes de la microfluidización conllevaba a una disminución del diámetro medio de partícula, lo cual fue parcialmente atribuido al aumento de viscosidad en la fase continua, y, por lo tanto, una disminución de la diferencia entre las viscosidades de la fase continua y dispersa, dada por el PEG.

También, Ochoa-Flores (2013) explicó la disminución del tamaño de partícula y la estabilidad de las emulsiones al incrementar la proporción de glicerol en la fase acuosa porque el glicerol incrementa la micro-viscosidad de la fase continua, hace más lenta la difusión de las moléculas del soluto a través de la solución, retarda de este modo su agregación en la superficie del sólido-líquido y promueve la estabilidad física. Además, al incluir sustancias co-disolventes como el glicerol, se puede inhibir la nucleación en el sistema, el crecimiento de cristales y la precipitación del compuesto bioactivo.

Por su parte Sakulku *et al.* (2009) agrega que el efecto de glicerol solo es beneficioso hasta una concentración máxima del 50% en la fase acuosa, ya que una concentración mayor disminuye la velocidad con la que el emulsificante cubre las gotas al formar la emulsión, lo que conduce a mayores tamaños de partícula.

### 6.1.2. Producción de lisofosfatidilcolina

La producción de lisofosfatidilcolina se realizó con el procedimiento descrito en la metodología. La cinética de conversión de PC a LPC, Figura 26, muestra que a partir de los 50 minutos comenzó a obtenerse una mayor cantidad de LPC que de PC en las muestras y que la máxima conversión de PC a LPC (94.35%) se alcanzó a los 120 minutos. Este resultado es comparable con lo obtenido por Lim *et al.* (2014), quienes usando un sistema similar obtuvieron una conversión de PC en LPC de 90.8% a las 3 h. Es posible que la mayor conversión y menor tiempo de reacción obtenido en este trabajo se deba al aumento en la cantidad de enzima utilizada: 1% en Lim *et al.* (2014), y 5% en el presente trabajo.

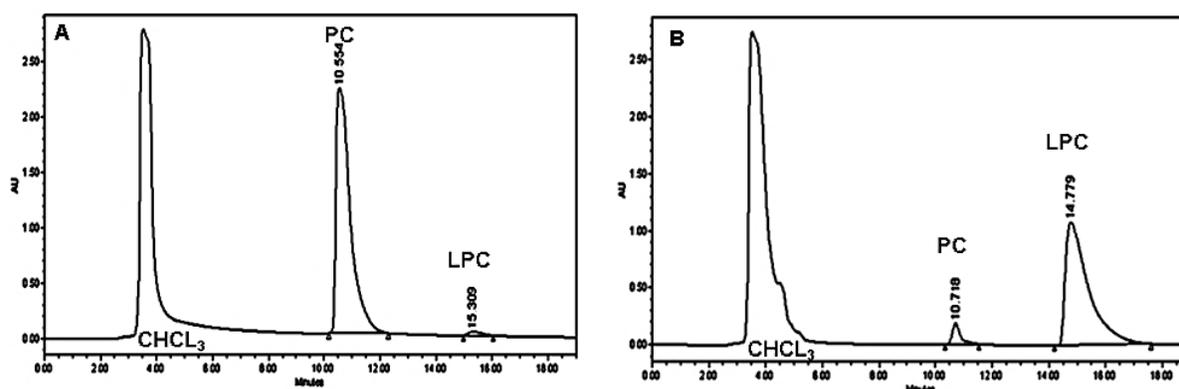


**FIGURA 26. Cinética de conversión de PC a LPC.** La reacción enzimática se realizó a 60°C, 300 rpm en hexano y con PLA1 como enzima.

Con respecto a otros trabajos se menciona el sistema evaluado por Baeza-Jiménez *et al.* (2013), quienes modificaron PC para obtener LPC en un sistema etanólico con PLA1 inmovilizada. Con este sistema obtuvieron una menor conversión a un mayor tiempo de reacción (58.51% y 48 h) que el reportado en el presente trabajo. Esto se debe principalmente al medio de reacción utilizado y a la inmovilización de la enzima que trae como consecuencias un menor contacto entre la enzima y el sustrato.

De la cinética de hidrólisis también se aprecia que la conversión se mantiene por encima de 85% hasta 250 minutos después de iniciada la reacción. Es importante resaltar que no es conveniente prolongar el tiempo de reacción después de 250 minutos, puesto que se observó una reconversión de LPC a PC que es también catalizada por la enzima, ya que esta tiene la capacidad de hidrolizar, esterificar y transesterificar (Estiasih *et al.*, 2013).

Los cromatogramas obtenidos en la reacción de hidrólisis se muestran en la Figura 27. En estos se observa la conversión de PC a LPC, sin embargo, se observa que el área inicial de PC no es igual que el área final de LPC; esto es de esperarse puesto que en la reacción enzimática se hidroliza una de las cadenas de ácidos grasos de la PC para producir LPC y ácidos grasos libres (Baeza-Jiménez *et al.*, 2013).



**FIGURA 27. Cromatograma de la reacción de hidrólisis obtenido para la conversión de PC a LPC. A. Área de PC y LPC antes de comenzar la reacción enzimática, tiempo 0. B. Área de PC y LPC a los 120 minutos de reacción enzimática.**

La PLA1 hidroliza el enlace sn-1 de la molécula de PC, que se caracteriza por tener ácidos grasos saturados. Es por eso que en este trabajo (y como se presenta en la siguiente sección) se obtuvo 2-acyl-LPC, que se caracteriza por que su cadena de ácidos grasos presenta insaturaciones; es de esperarse que estas insaturaciones le confieran a la molécula propiedades más hidrofílicas (Estiasih *et al.*, 2013).

### 6.1.3. Composición de ácidos grasos de los emulsificantes utilizados

En la Tabla 6., se presenta la composición de ácidos grasos de cada uno de los emulsificantes estudiados, así como de la PC desde la cual se realizaron las modificaciones enzimáticas.

**TABLA 6. Composición de ácidos grasos en %mol de los emulsificantes estudiados.**

Ácido graso	PC- $\omega$ 3 (Cavazos <i>et al.</i> , 2015)	LPC-AGCM (Chávez <i>et al.</i> , 2016)	LPC	PC
C8:0	-	15.34 $\pm$ 0.32	-	-
C10:0	-	7.95 $\pm$ 0.05	-	-
C14:0	-	2.92 $\pm$ 0.00	-	-
C16:0	3.09 $\pm$ 0.06	3.82 $\pm$ 0.21	3.70 $\pm$ 0.10	14.90 $\pm$ 0.05
C18:0	1.66 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	-	3.70 $\pm$ 0.03
C18:1	9.25 $\pm$ 0.10	11.26 $\pm$ 0.3	9.60 $\pm$ 0.12	11.40 $\pm$ 0.02

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

C18:2	40.22 ±0.61	56.23 ±0.00	78.13 ±0.07	63.00 ±0.02
C18:3	3.70 ±0.02	4.58 ±0.24	7.30 ±0.07	5.70 ±0.08
Otros	7.12 ±0.78	-	-	-
C20: 5 EPA	19.07 ±0.12	-	-	-
C22: 6 DPA	1.53 ±0.01	-	-	-
C22:5 DHA	14.36 ±0.09	-	-	-

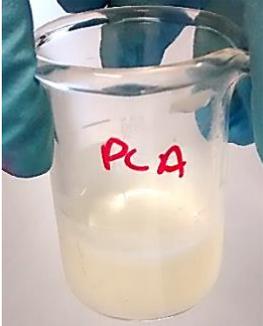
Como era de esperarse y como se describió en la sección anterior, la LPC producida en el presente trabajo tiene en su mayoría ácidos grasos insaturados:oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), siendo el linoleico el que se encuentra en mayor proporción (78.13%). Solo contiene 3.7% de ácido palmítico, un ácido graso saturado que posiblemente es aportado por el 5.3% de PC que no fue hidrolizada. El contenido de ácidos grasos saturados en los emulsificantes estudiados en orden ascendente es LPC-AGCM > PC > PC- $\omega$ 3 > LPC, con 30.27, 18.6, 4.66 y 3.7% respectivamente. Es importante resaltar que, aunque LPC tiene el menor contenido de ácidos grasos saturados con respecto a PC- $\omega$ 3, esta última tiene un mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) EPA, DHA y DPA que le aportan un total de 22 insaturaciones al sistema vs 6 insaturaciones en la LPC. Los PUFA son mucho más susceptibles a la oxidación (Araseki *et al.*, 2002; Espinosa *et al.*, 2015).

Debido al mayor contenido de ácidos grasos saturados en la LPC-AGCM se decidió estudiar si este emulsificante otorgaba un efecto protector en la oxidación de los fitoesteroles; mientras que con la LPC se evaluó si su estabilidad física y oxidativa se veía afectada con la temperatura.

**6.2. Preparación de las nanoemulsiones**

Las adaptaciones realizadas en este trabajo a las metodologías propuesta por Engel y Shubert, 2005; Cavazos-Garduño, 2013; Ochoa-Flores, 2013 y Chavez-Zamudio, 2015, para preparar las NE fueron acertadas. En la Tabla 7 se incluyen imágenes de los productos resultantes de las 3 etapas principales en la preparación de las emulsiones. En la primera columna se presenta el resultado de la preparación de la fase continua y dispersa, se observa que la PC y la LPC se disuelven bien en agua, pero los FE precipitan en los TCM; es por esto que previo a la pre-emulsificación en el Ultraturrax es necesario calentar ambas fases, asegurando de esta manera la incorporación de los FE en la fase oleosa (Christiansen *et al.*, 2002; Izadi, Nasirpour, Garoosi, y Tamjidi, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016; Zychowski *et al.*, 2016).

**TABLA 7. Fotografías de la preparación de las nanoemulsiones de fitoesteroles en sus 3 etapas.** Preparación de las fases oleosas y acuosas; preparación de la pre-emulsión con el homogenizador Ultraturrax y preparación de la nanoemulsión con ultrasonificación para las emulsiones realizadas con los emulsificantes LPC y PC.

Emulsificante	Fase acuosa y oleosa	Pre- emulsión	Nanoemulsión
PC			

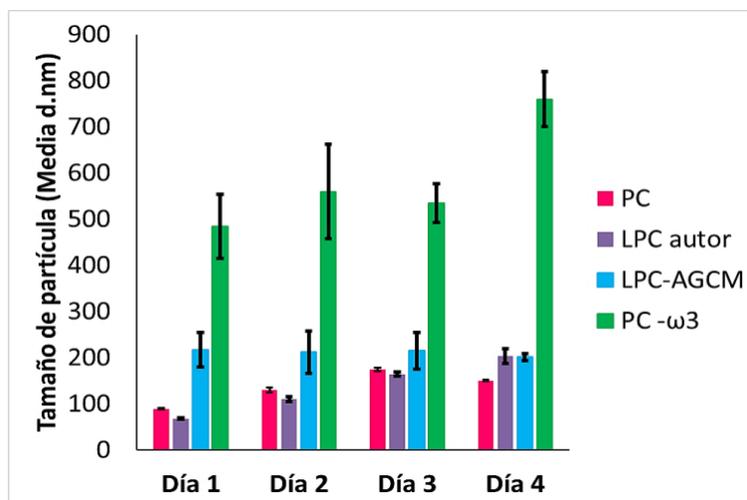


En la etapa de pre-emulsificación se mezclaron las fases oleosa y acuosa calientes con un equipo Ultraturrax, la emulsión resultante posee las características esperadas: una sola fase y color blancuzco como se observa en la Tabla 7, mientras que en la última etapa el resultado es una emulsión translúcida, lograda al pasar la pre-emulsión por el equipo de ultrasonificación.

Se destaca que la formulación y el procedimiento para hacer NE de FE utilizando ultrasonificación y emulsificantes naturales presentados en el presente trabajo no tiene precedentes. Sin embargo, en los últimos dos años se han publicado varias investigaciones con sistemas que permiten solubilizar los FE en agua como: emulsiones a diferentes escalas (macro, micro y nano), nanopolvos, nanopartículas y nanofibras, entre otros (Chen *et al.*, 2015; Di Battista *et al.*, 2015; Paaver *et al.*, 2016; Ubeyitogullari y Ciftci, 2016).

### 6.3. Características fisicoquímicas de las nanoemulsiones

Se realizaron dos experimentos, el primero de 4 días con los 4 emulsificantes mostró que las emulsiones preparadas con PC- $\omega$ 3 no eran adecuadas para la incorporación de FE, puesto que su media de tamaños de partícula y dispersión fueron los más altos de todos los emulsificantes (Figura 28).



**FIGURA 28. Evaluación preliminar de tamaños de partícula de las emulsiones formuladas con PC, LPC, LPC-AGCM y PC- $\omega$ 3 durante 4 días a 37°C**

Esto puede ser debido a la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que, como se ha reportado ampliamente, perjudican la estabilidad oxidativa (Araseki *et al.*, 2002; Cardenia *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2010; Waraho *et al.*, 2009, 2011), lo que puede ocasionar una destrucción o desestabilización de la interface que recubre la gota. Al respecto, Nii e Ishii (2004) reportan que los fosfolípidos con ácidos grasos saturados y de cadena corta son emulsificantes más potente que aquellos que cuentan con cadenas insaturadas y largas.

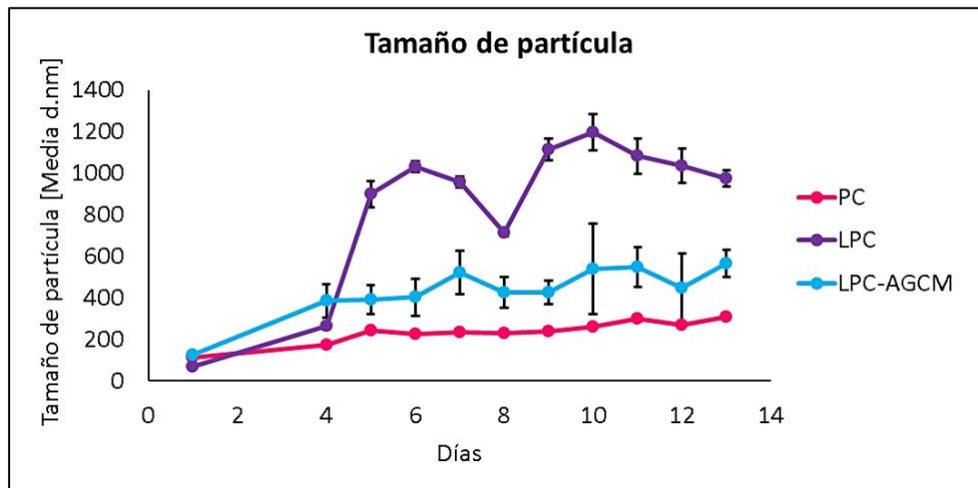
También se ha reportado, en emulsiones W/O, que debe haber una correlación entre el contenido de insaturaciones entre la fase oleosa y el emulsificante; es decir, si la fase oleosa es insaturada, se obtienen emulsiones más estables con un emulsificante con cadenas insaturadas, mientras que, si la fase oleosa es saturada, lo es con emulsificantes con cadenas saturadas. Esto es debido a la rigidez o movilidad del emulsificante y las interacciones emulsificante-aceite (Garti y Remon, 1984). Aunque las emulsiones desarrolladas en el presente trabajo son O/W es posible que esta correlación afecte el sistema, puesto que la fase oleosa en este trabajo es totalmente saturada. Además, se ha reportado que los ácidos grasos de cadenas larga contribuyen a una mayor agregación entre partículas debido a sus mayores interacciones de van der Waals (Ribeiro *et al.*, 2016). Por lo tanto, en los siguientes

experimentos se evaluaron las emulsiones realizadas con los emulsificantes PC, LPC y LPC-AGCM.

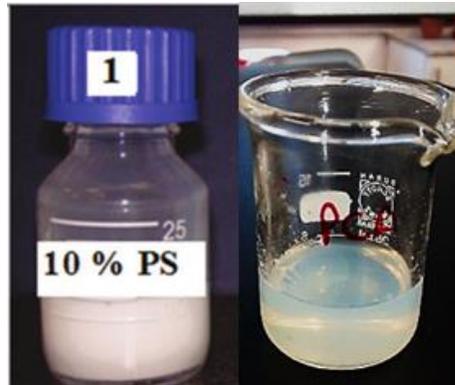
### 6.3.1. Caracterización físico-química

#### 6.3.1.1. Tamaño de partícula y potencial $\zeta$

En la Figura 29 se presentan los tamaños de partícula de las emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM. Al inicio de la experimentación, en el día 1, el tamaño medio de partícula en las emulsiones fue de 67.9, 111.3 y 127.65 nm, para las emulsiones formuladas con LPC, PC y LPC-AGCM, respectivamente. Estos valores caen dentro del rango de nanoemulsiones. En el trabajo de Ribeiro *et al.* (2016) se reportan tamaños de partícula entre 160 a 220 nm para emulsiones con un 1% de FE en TCM utilizando 2% de Tween 20 como emulsificante y en 4 ciclos de microfluidización. Sin embargo, sus emulsiones no se aprecian translucidas (como las presentadas en este trabajo), sino blancuzcas (Figura 30).



**FIGURA 29. Tamaño de Partícula de las emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM como emulsificantes. Tiempo de almacenamiento 14 días a 37°C**

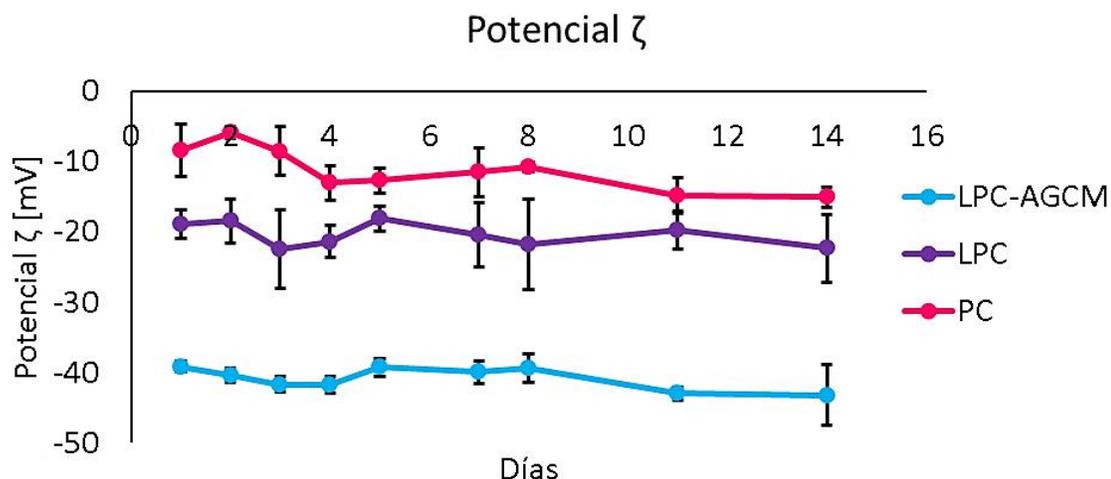


**FIGURA 30. Comparación NE obtenidas por Riberiro (2016) y el presente trabajo**

Durante el almacenamiento a 37°C, para los sistemas estudiados, el tamaño de partícula aumentó 1.78, 2.49 y 13.34 veces en las emulsiones formuladas con PC, LPC-AGCM y LPC respectivamente. El gran aumento en el TP de las emulsiones formuladas con LPC se puede deber a su composición de ácidos grasos, puesto que de entre los 3 emulsificantes, es el que presenta mayor contenido de residuos de ácidos grasos insaturados.

En la Figura 31 se describe el potencial  $\zeta$  para las emulsiones estudiadas, se observa una gran diferencia en los valores para las emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM (-11.2, -20.42 y -40.87 mV, respectivamente); estos valores permanecieron sin cambios significativos durante el tiempo de almacenamiento. Los valores absolutos de potencial  $\zeta$  de las emulsiones preparadas con PC, estuvieron por debajo de lo considerado como estable ( $>|30|$  mV), y sin embargo muestran una buena estabilidad; mientras que los de LPC y LPC-AGCM, son mayores y su estabilidad es menor, la cual evidenciada en los incrementos en el tamaño de partícula. Esto se atribuye a la particular composición molecular, como el mayor número de grupos hidroxilo presente en la LPC al tener una cadena de ácidos grasos menos, los tipos de ácidos grasos, las interacciones moleculares entre el compuesto y el emulsificante, y a la distribución espacial de cada compuesto en la emulsión que les confieren características únicas. Es por esto que el potencial  $\zeta$  no representa un parámetro clave en la estabilidad de este tipo de emulsiones.

El pH medido para estas emulsiones fue de  $4.76 \pm 0.045$ ,  $5.21 \pm 0.076$  y  $5.61 \pm 0.076$ , para PC y LPC-AGCM, respectivamente.



**FIGURA 31. Potencial  $\zeta$  de las emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM como emulsificantes. Tiempo de almacenamiento 14 días a 37°C**

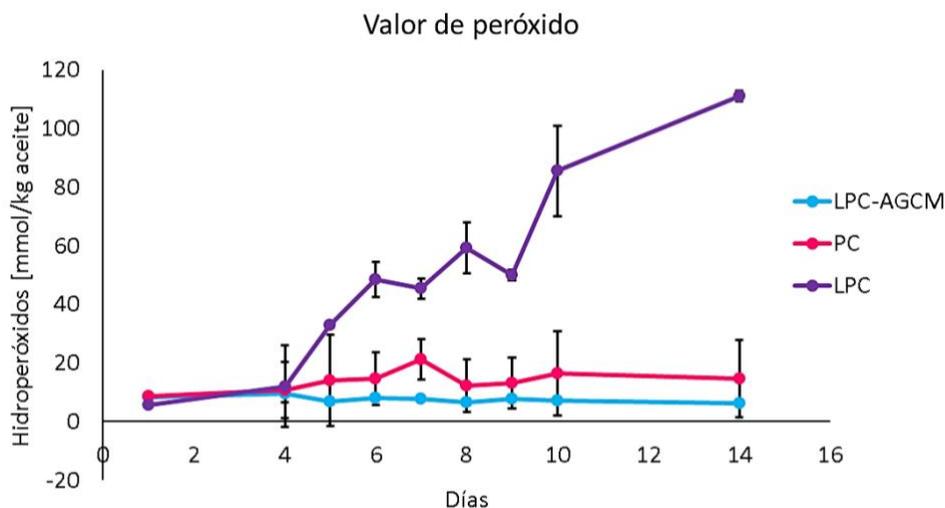
Por otra parte, el potencial  $\zeta$  puede ser un indicador de la propensión de una emulsión hacia la inestabilidad química de la emulsión. Se ha reportado que emulsiones con potencial  $\zeta$  negativo son más propensas a atraer contra-iones positivos a la interface, como los presentes en metales de transición ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , entre otros) que estimulan la formación de hidroperóxidos lipídicos (Wang y Wang, 2008; Uluata *et al.*, 2015; Cardenia *et al.*, 2011).

### 6.3.2. Características químicas

#### 6.3.2.1. Valor de peróxidos

La oxidación de los compuestos bioactivos en las nanoemulsiones, es uno de los factores claves que limitan la vida de anaquel de la emulsión. Esta es desencadenada por la permeación de radicales libres generados en la interface de la emulsión, o cerca de esta, generados por iones metálicos o condiciones ambientales como luz y

temperatura (McClements y Decker, 2000). Los productos primarios de la oxidación en las nanoemulsiones se evaluaron con el valor de peróxido durante 14 días a 37 °C (Figura 32).



**FIGURA 32. Valor de peróxidos emulsiones preparadas con PC, LPC y LPC-AGCM como emulsificantes. Almacenados a 37°C por 14 días.**

Durante el tiempo de almacenamiento no se observaron diferencias significativas en el PV para las emulsiones realizadas con PC y LPC-AGCM, confirmando la estabilidad oxidativa del emulsificante y del aceite empleado en la formulación de las emulsiones (TCM). Sin embargo, para las emulsiones de LPC, se observa un aumento de 19 veces su valor inicial. A partir del día 4, la concentración de hidroperóxidos aumenta linealmente con respecto al tiempo; esto quiere decir que se forman constantemente productos primarios de oxidación.

Por otra parte, cuando se preparan nanoemulsiones, una de las preocupaciones que surgen en su elaboración es la generación de productos de oxidación al someter los sistemas a equipos de alta energía, como el ultrasonificador, el microfluidizador, el homogenizador de alta presión, o al solubilizar los compuestos a altas temperaturas (Espinosa *et al.*, 2015). Como se puede apreciar en las Figuras, los valores iniciales de hidroperóxidos no corresponden a emulsiones oxidadas, lo que confirma que el

método y los componentes utilizados para preparar las nanoemulsiones no afectan su estabilidad oxidativa.

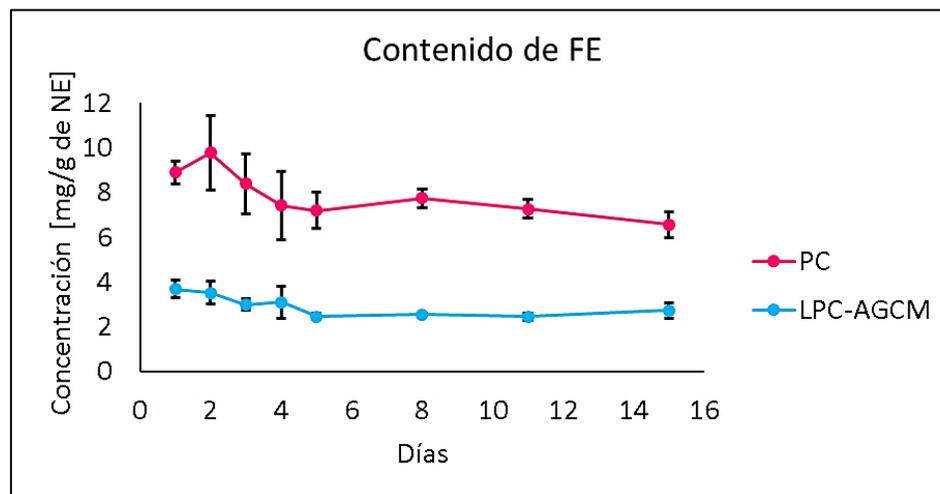
Los resultados obtenidos en el presente trabajo son mucho más bajos que los encontrados por Cercaci *et al.* (2007), quienes obtuvieron, en emulsiones de fitoesteroles preparadas en aceite de maíz y estabilizadas con lauril eter de polioxietileno 23 (Brij 35), valores de peróxido que se incrementaban rápidamente desde los 0.6 días, con un pico máximo en 800 mmol/kg de aceite a los 3 días de almacenamiento a 55°C. Después del día 3 el contenido de hidroperóxidos también decrecía rápidamente hasta el día 5 y después se mantenía constante en 200 mmol/kg aceite; estos altos valores en comparación de los reportados en el presente trabajo se pueden atribuir a la temperatura y composición de las emulsiones estudiadas.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pan *et al.* (2013), quienes demostraron que al tener un emulsificante con propiedades antioxidantes como la lecitina, no es necesario añadir compuestos antioxidantes externos para prevenir la oxidación en las emulsiones. Ese estudio también demuestra que, la diferencia en la velocidad de permeación de radicales en la emulsión, estabilizada con un emulsificante con y sin propiedades antioxidantes, como la lecitina y el Tween 20, se correlaciona con la estabilidad oxidativa del compuesto bioactivo en la emulsión.

### 6.3.2.2. Contenido de fitoesteroles en la emulsión

Con el fin de determinar la estabilidad del compuesto bioactivo en la emulsión se evaluó el contenido de FE y de POFs con los emulsificantes que mostraron una mayor estabilidad oxidativa (PC y LPC-AGCM). El emulsificante LPC-AGCM utilizado durante los experimentos, fue elaborado previamente por la M.C. Rubi Chavez, y amablemente donado para este estudio en una cantidad limitada. El estudio se ajustó a esta cantidad, por lo tanto, las emulsiones realizadas con este emulsificante mantenían la relación 10:1 emulsificante:fitoesteroles, pero en una concentración menor, la formulación de esta emulsión fue: fase continua 5% LPC-AGCM, 30% Glicerol y 60% agua; fase dispersa: 0.5% FE y 4.5 % TCM. Como se especificó en la metodología

Los resultados de la evaluación del contenido de FE en la emulsión fueron satisfactorios, indican que la emulsiones con PC y LPC pudieron encapsular el 89% y el 74% de los FE añadidos. La concentración de fitoesteroles en las NE fue de  $8.90 \pm 0.50$  y de  $3.69 \pm 0.39$  mg/g de NE, para las emulsiones formuladas con PC y LPC-AGCM respectivamente (Figura 33). Leong *et al.* (2011b) explican que el proceso de homogenización puede conducir a una pérdida de compuesto activo en la preparación de las nanoemulsiones, sus pérdidas de FE estuvieron entre el 0.5 y el 28.3%.

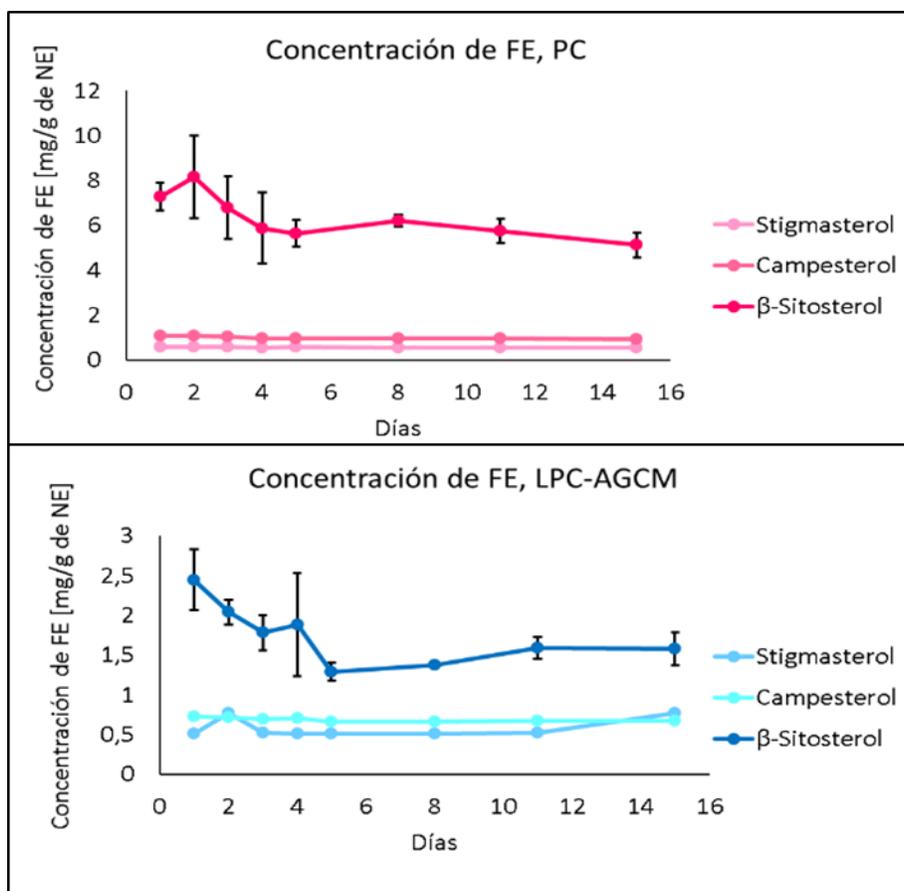


**FIGURA 33. Contenido de fitoesteroles en las emulsiones preparadas con los emulsificantes PC y LPC-AGCM.** Almacenadas a 37°C por 14 días.

También hubo congruencia entre el tipo de fitoesteroles encontrados y el tipo de fitoesteroles añadidos. El  $\beta$ -sitosterol con un porcentaje  $\geq 80\%$  fue el fitoesterol con mayor abundancia, seguido del campesterol y el estigmasterol (Figura 34).

En cuanto al periodo de almacenamiento, se puede observar una tendencia a la baja en el contenido de fitoesteroles, igual que para las emulsiones formuladas con PC y LPC, existe diferencia significativa después de los 8 días de almacenamiento para PC y de los 5 días para LPC-AGCM (Figuras 33 y 34). La disminución en el contenido de FE esta entre el 12 y el 25%. Esto se puede deber a la degradación térmica de los FE en POF durante el almacenamiento. Leal-Castañeda *et al.* (2015) reportan que durante el calentamiento con microondas la cantidad de FE presentes en su matriz modelo

disminuyó en 30% durante los primeros 1.5 minutos y hasta en 80% después de 30 minutos de calentamiento, debido a la termodegradación de los FE.

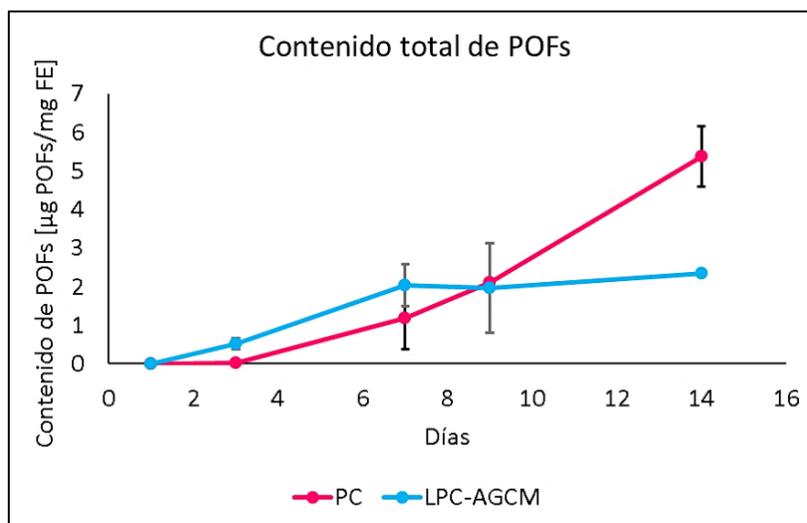


**FIGURA 34. Tipo y cantidad de fitoesteroles encontrados en las emulsiones preparadas con los emulsificantes PC y LPC-AGCM. Almacenadas a 37°C por 14 días.**

### 6.3.2.3. Contenido de POFs en la emulsión

La oxidación de los FE puede dar lugar a varios productos de oxidación como cetonas, alcoholes, epóxidos y dienos, su formación y distribución depende de la estructura del esterol, la composición de las fases y la temperatura de reacción (Cercaci *et al.*, 2007; Soupas *et al.*, 2005). Durante el almacenamiento a 37°C, los POFs se incrementaron en ambas emulsiones. En particular, se observa una tendencia exponencial a partir del día 4 para ambas emulsiones (Figura 35). La emulsión preparada con PC mostró un

mayor contenido de POPs con respecto a la preparada con LPC. Es posible que la composición de ácidos grasos de la PC pueda promover esta formación. Sin embargo, la formación de POFs es muy baja en ambos sistemas.

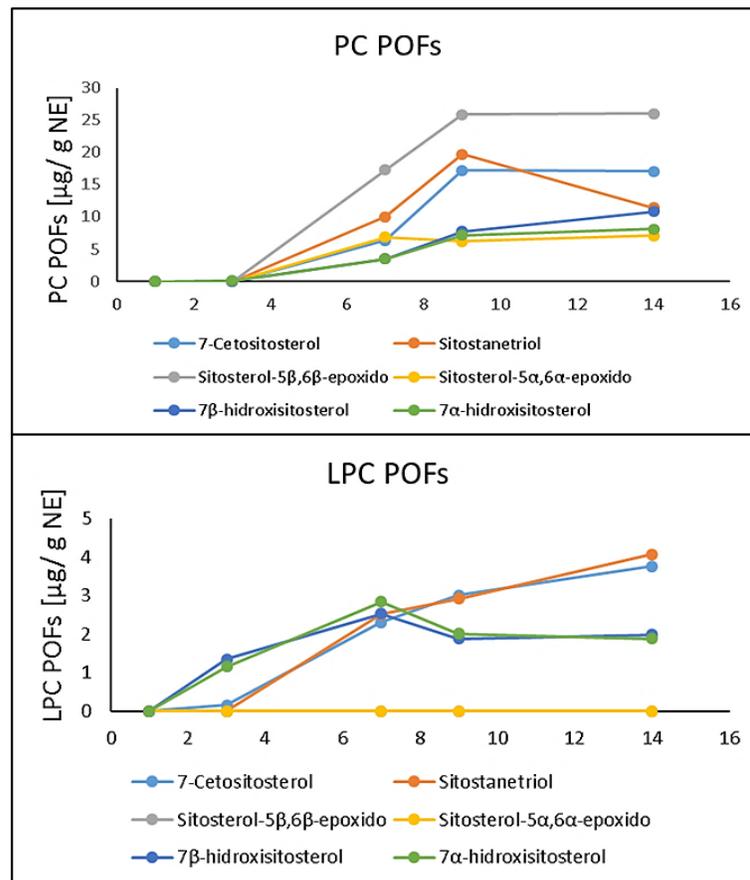


**FIGURA 35. Contenido total de óxidos de fitoesteroles en las emulsiones formuladas con PC y LPC-AGCM.** Almacenadas durante 14 días a 37°C.

Cercaci *et al.* (2007) dieron una explicación a la formación de POFs en las emulsiones. Ellos reportan que los fitoesteroles, debido a su actividad interfacial pueden migrar hacia la superficie agua-aceite de la gota, en donde el estrés oxidativo es mayor; permitiendo la formación de POFs cuando el grupo hidroxilo hidrofílico y el doble enlace se orientan hacia la fase acuosa. También aclaran que el FE con mayor actividad interfacial es el estigmasterol. Sin embargo, debido a su estructura física que les permite configurarse estrechamente en la interface, puede permitir que el fitoesterol con mayor actividad de superficie, propaguen la oxidación hacia los otros FE.

En cuanto a los óxidos encontrados, todos pertenecen a los productos de oxidación del  $\beta$ -sitosterol, el fitoesterol que se encontraba en mayor proporción en la emulsión (Figura 36). Se lograron identificar los 7-hidroxisitosterol ( $\alpha$  y  $\beta$ ), los epoxiesteroles ( $\alpha$  y  $\beta$ ), el 7-cetositosterol y el sitostanotriol. Estos óxidos de fitoesterol encontrados son análogos a los principales productos de oxidación del colesterol obtenidos por

autooxidación y termooxidación, siguiendo vías de reacción similares. El sitio principal de formación de POFs está en el C-7 del segundo anillo, donde se forman hidroperóxidos e hidroxi- y ceto-esteros. Otros productos de oxidación importantes que se pueden producir en la estructura del anillo son los epóxidos y trioles. La formación de epóxidos por autooxidación se produce por un mecanismo bimolecular que implica un radical hidropoxido y una molécula de esteroles no oxidado que una vez formado permite también la formación de trioles (Leal-Castañeda *et al.*, 2017; García-Llatas y Rodríguez-Estrada, 2011). Es interesante notar que hay una ausencia de epóxidos en las emulsiones realizadas con LPC, pero no de trioles; este aspecto debe ser evaluado en profundidad para determinar si existen otras rutas que puedan permitir su formación.



**FIGURA 36.** Productos de oxidación del  $\beta$ -sitosterol en las emulsiones preparadas con PC y LPC durante el almacenamiento. Los datos son mostrados como replicas individuales.

En ambas emulsiones uno de los compuestos predominantes es el 7-cetositosterol que se ha reportado como un compuesto clave, que indica la oxidación de los FE en los alimentos (Barriuso *et al.*, 2015; González-Larena *et al.*, 2015; Rodríguez-Estrada *et al.*, 2014).

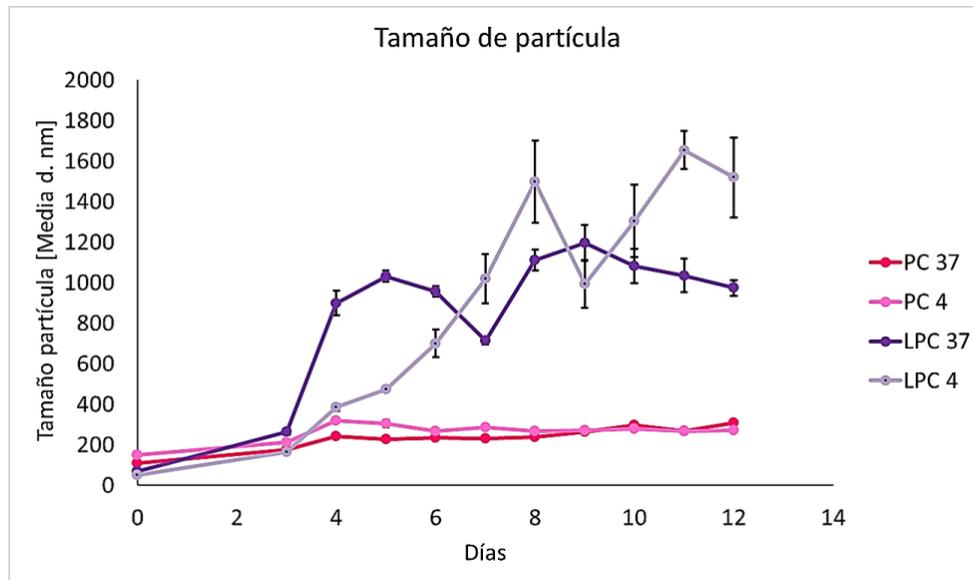
En las emulsiones preparadas con LPC, se aprecia claramente que hasta el día 7 hay mayor presencia de hidroxiesteroles que son marcadores de las primeras etapas de oxidación de los fitoesteroles; después, estos compuestos se convierten en el derivado 7-cetositosterol que es más estable (Barriuso *et al.*, 2015). En las emulsiones con PC, se observa no solo una mayor cantidad de óxidos sino también un estado más avanzado en la oxidación marcado por los compuestos epóxidos, el triol y el 7-ceto, presentes.

#### **6.4. Estabilidad de la NE con respecto a la temperatura de almacenamiento**

Se evaluó la estabilidad de las nanoemulsiones con respecto a la temperatura, utilizando dos niveles; estos fueron 4 y 37°C. Las nanoemulsiones fueron almacenadas durante 14 días a dichas temperaturas.

##### **6.4.1. Tamaño de partícula**

La evaluación del tamaño de partícula revela que la temperatura no influye en gran medida la estabilidad del emulsificante, puesto que la PC tanto a 4 como a 37°C permaneció sin alteraciones (Figura 37). Su incremento durante los 12 días de almacenamiento fue de 1.78 y 0.79 veces su valor inicial respectivamente. Mientras que para LPC se observa que a 37°C en el día 4 ya hay una gran dispersión y un alto valor en el tamaño de partícula, a 4°C esta desestabilización ocurrió hasta el día 7.



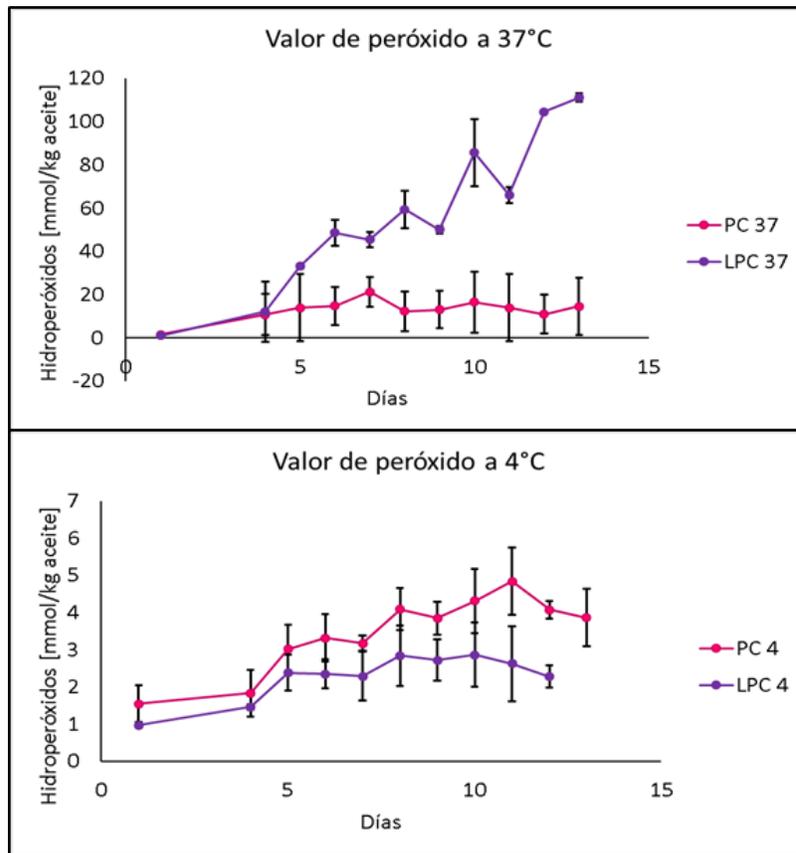
**FIGURA 37. Tamaño de Partícula de las emulsiones preparadas con PC y LPC como emulsificantes. Tiempo de almacenamiento 12 días a 37°C y 4°C.**

Además, se observa que independientemente de la temperatura este emulsificante no termina los días de evaluación con tamaños de partícula que se encuentren en el rango nano, puesto que la emulsión se desestabilizó. Las emulsiones realizadas con LPC aumentaron su tamaño de partícula en 13.34 y 28.29 veces su valor inicial para 37 y 4°C. Panpipat *et al.* (2013) también encontraron que el tamaño de partícula aumentó con el tiempo de almacenamiento y que este efecto era más pronunciado en las muestras refrigeradas a 4°C, posiblemente por la promoción de la formación de cristales a baja temperatura.

#### 6.4.2. Valor de peróxidos

En la velocidad de oxidación la temperatura juega un papel muy importante y se evidencia en el valor de peróxidos mostrado en la Figura 38, para 37°C arriba y para 4°C abajo. El máximo contenido de hidroperóxidos alcanzado a 4°C para LPC y PC fue de 3 y 6 mmol de hidroperóxidos/kg de aceite, mientras que para las muestras conservadas a 37°C el máximo valor alcanzado fue de 120 y 20 mmol de hidroperóxidos/kg de aceite. La oxidación a 37°C ocurrió más rápido y con mayor

fuerza en la NE preparada con LPC, debido muy probablemente a su composición de ácidos grasos, como se vió en las secciones anteriores. Además, su potencial  $\zeta$  más negativo pudo atraer más cationes de transición (Cercaci *et al.*, 2007; Warahoo *et al.*, 2009). En contraste, la PC permaneció invariable después del día 5.



**FIGURA 38. Valor de peróxido de NE de FE evaluadas durante 14 días a 37 y 4 °C**

#### 6.4.3. Evaluación de la estabilidad de las NE

En las Tabla 8 y 9, se presentan los resultados de estabilidad óptica obtenidos durante un mes de almacenamiento a 4 y 37°C. En las emulsiones formuladas con PC (Tabla 8) se evidencia una elevada estabilidad durante el tiempo evaluado al mostrar siempre una única fase homogénea, sin presencia de sedimentos, ni floculos que se pueden apreciar cuando el porcentaje de retrotransmisión (franjas naranjas) aumenta.

TABLA 8. Estabilidad óptica a 4 y 37°C durante un mes de almacenamiento para las emulsiones realizadas con PC.

PC	4 [°C]	37 [°C]
D1		
D15		
D30		

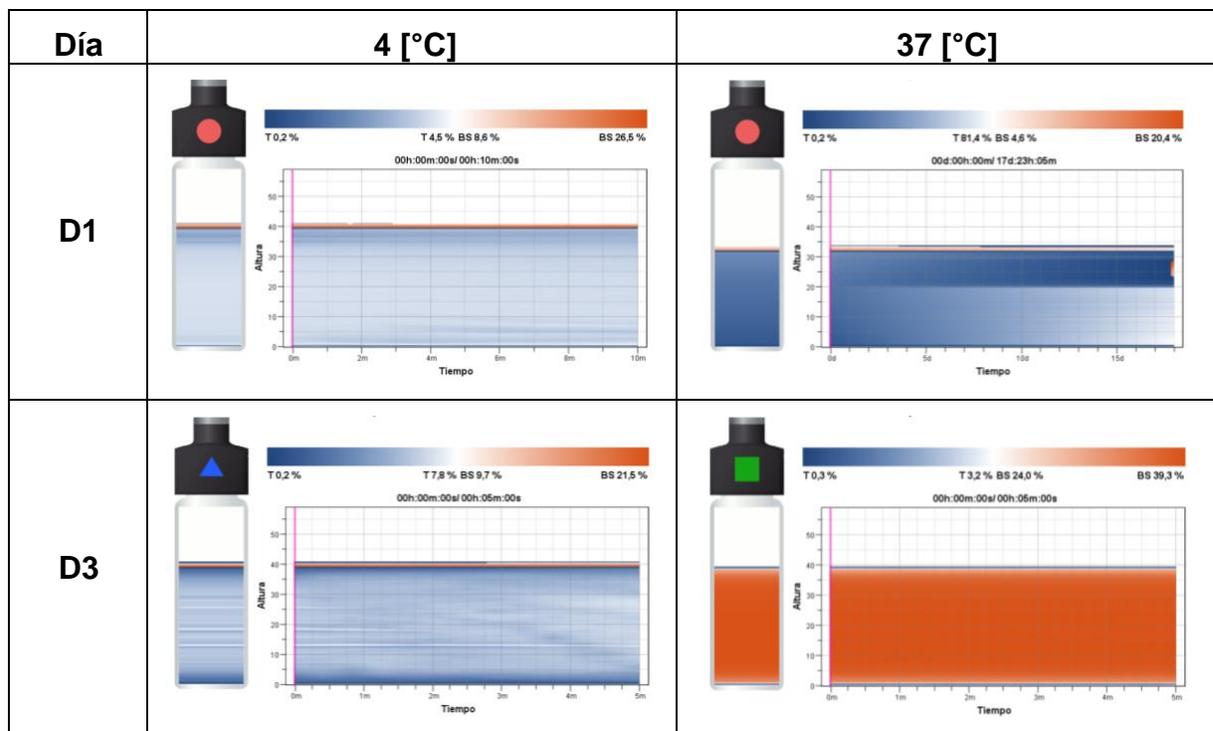
Cuando la emulsión supera los 600 nm el equipo no alcanza a detectar la luz transmitida (franja azul) ya que las grandes partículas retrodispersan la luz. A mayor tamaño de partícula, mayor porcentaje de retrodispersión y menor porcentaje de transmisión. Para las emulsiones formuladas con LPC (Tabla 9) se aprecia que a 37°C a los 3 días ya hay partículas mayores a 600 nm en toda la emulsión (se observa el recipiente totalmente naranja) y después de ahí solo les toma un día llegar hasta la separación de fases y en el día 9 se destruye totalmente la emulsión liberando sus componentes. En este punto es importante resaltar que todos los componentes migran hacia arriba, sedimentación inversa, lo que supone una correcta solubilización de los

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

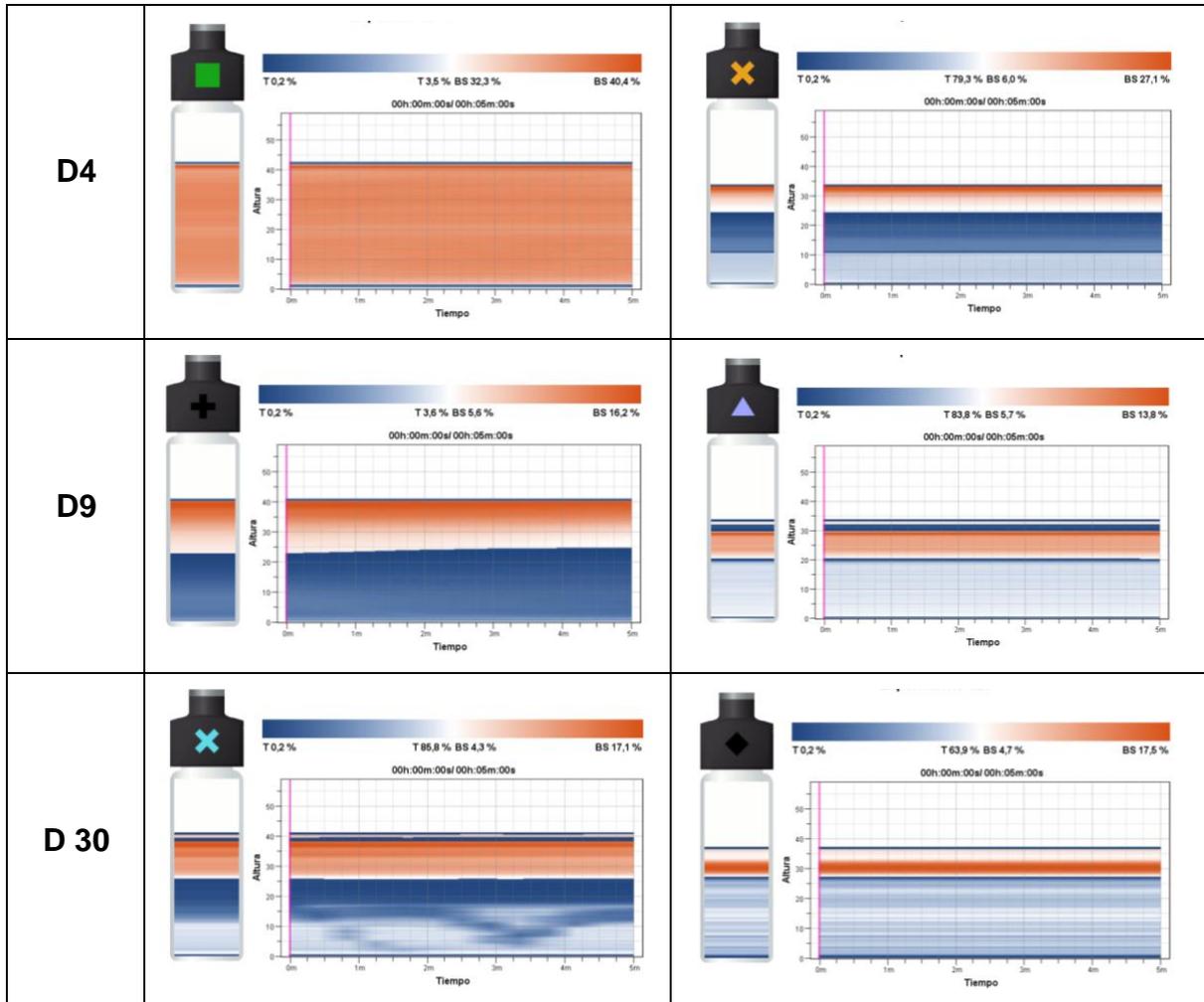
FE en la fase oleosa, lo que evita la formación de cristales de FE que al ser más densos se precipitan (Ribeiro *et al.*, 2016).

Para las emulsiones de LPC almacenadas a 4°C se observa el mismo procedimiento de desestabilización, pero mucho más lento, es así como a los 3 días aún se conserva la emulsión íntegra, a los 4 días hay partículas con más de 600 nm, pero la intensidad del color es mucho menor y se mantiene en este crecimiento de partículas (ya sea por floculación, coalescencia o ambos) hasta el día 9, día en el que la emulsión ya se separa en 2 fases y a los 30 días aún no se observa la liberación de sus componentes (*oiling off*).

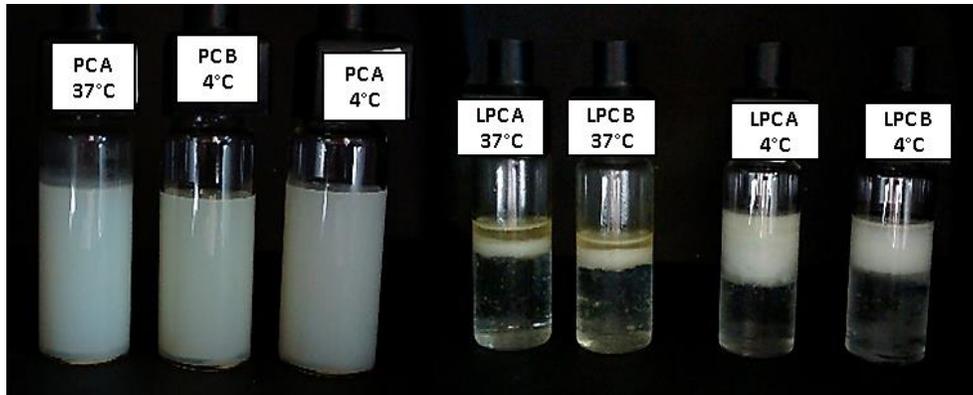
**TABLA 9. Estabilidad óptica a 4 y 37°C durante un mes de almacenamiento para las emulsiones realizadas con LPC**



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la Figura 39 se presentan las NE después de 1 mes de almacenamiento. Se observa claramente que las NE preparadas con LPC presentan separación de fases, e incluso liberación de la fase oleosa en LPC a 37°C, mientras que las NE de PC permanecen homogéneas durante todo el tiempo de estudio y aún 2 meses después para ambas temperaturas, evidenciando la idoneidad de este emulsificante en el sistema.

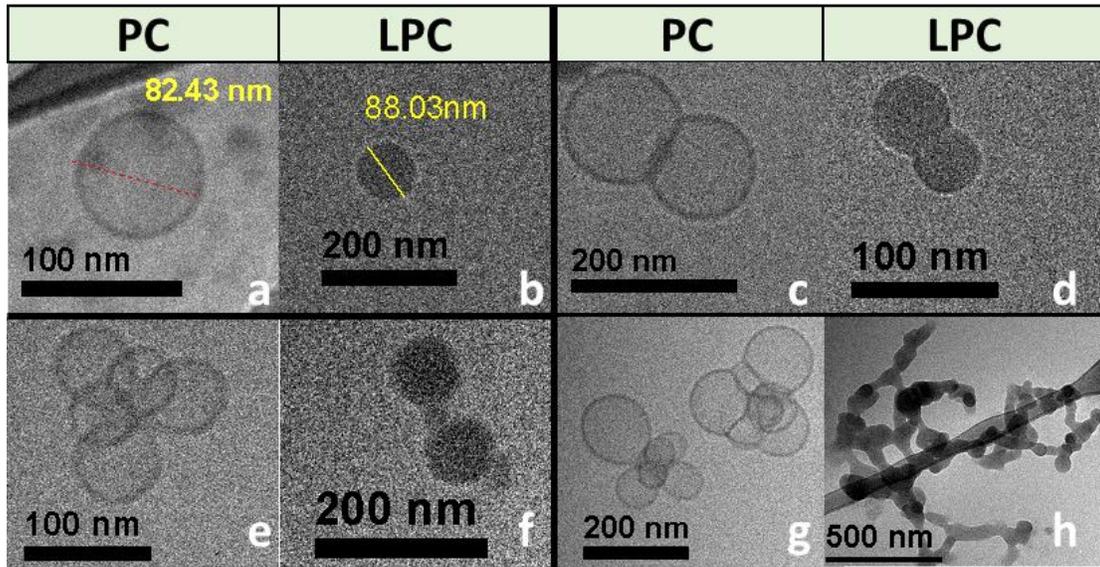


**FIGURA 39.** Estabilidad de las NE formuladas con PC (izq) y LPC (der) a 37°C (izq) y a 4°C (der) después de 1 mes de almacenamiento.

Es importante mencionar que al disminuir la temperatura: se retrasó la oxidación, se evitó la liberación del compuesto activo y aumentó en 4 días la vida de anaquel de las emulsiones preparadas con LPC. Sin embargo, se siguió notando un marcado aumento en el tamaño de partícula que se puede atribuir a la configuración estructural de la interface que requiere mayores fuerzas de repulsión que le permitan evitar la formación de flóculos, la posterior coalescencia y separación de fases. La morfología de estas emulsiones se presenta en la siguiente sección.

### 6.5. Morfología de las nanoemulsiones

Los fosfolípidos pueden existir en una variedad de formas dependiendo de su tipo, concentración, pH y tipo de aceite en la fase oleosa (Pichot *et al.*, 2013). En la Figura 40 se muestran las micrografías obtenidas en el Cryo-TEM con la morfología de las emulsiones formadas con PC y LPC respectivamente.



**FIGURA 40. Micrografías Cryo-TEM de nanoemulsiones de fitoesterol formuladas con fosfatidilcolina.**

Las estructuras observadas son gotas redondas típicas en las emulsiones, que se forman al recubrir las gotas de la fase dispersa. Las micrografías presentadas revelan que hay una gran diferencia tanto en la estructura de las gotas formadas con cada uno de los emulsificantes, como en la formación de aglomerados. Es de esperar que la estructura entre ambos emulsificantes sea diferente. Es sabido que la PC forma una estructura lamelar en la interface agua/aceite, mientras que la LPC tiene una estructura hexagonal (Li *et al.*, 2014; Van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008) que conllevan a una formación molecular de cono invertido para la LPC y de cilindro para la PC (Li *et al.*, 2014; Chávez-Zamudio, 2015), que dependiendo de su concentración podrán formar micelas en el agua.

En la Figura 40 se comparan las emulsiones en cuanto a estructura de la gota (a, b), interacción entre partículas (c, d), formación de flóculos (e, f) y forma de los aglomerados (g, h). En las emulsiones formadas con PC se observa una estructura unilamelar esférica con una interface definida (Fig. 40a) muy parecidas a las reportadas por Fox *et al.* (2014) y Manca *et al.* (2015). Los tamaños de partícula encontrados mediante esta técnica se encuentran en el rango de 80-200 nm, que es

congruente con los tamaños de partícula reportados con la técnica de dispersión de luz en la sección anterior. Además, también es congruente con el estudio de estabilidad e incremento en el tamaño de partícula, en el que las emulsiones formuladas con LPC eran más inestables, se destaca su aglomeración en forma de racimo (Fig. 40 h) muy diferente a la encontrada con PC en forma esférica (Fig. 40 g).

Los tamaños de partícula encontrados para las NE con LPC van desde los 70 a los 900 nm. Los resultados encontrados discrepan con la literatura (Chavez Zamudio, 2015; Kawaguchi *et al.*, 2008), puesto que reportan que la LPC tiene una mejor estabilidad que la PC al estabilizar emulsiones O/W. Estas diferencias se pueden deber al compuesto activo utilizado, FE, que se ha reportado que tienen actividad interfacial y pueden afectar la rigidez de la interface (Cercaci *et al.*, 2007).

Es importante resaltar que en ninguno de los sistemas evaluados se presentó formación de cristales de FE y su consecuente liberación al medio acuoso, como lo muestran en Zychowski *et al.* (2016) y Ribeiro *et al.* (2016). Es conocido que la cristalización de los FE es uno de los inconvenientes más comunes al incorporarlos en emulsiones (Ribeiro *et al.*, 2016; Izadi *et al.*, 2015; Engel y Schubert, 2005). Esto puede ser posible a la correcta solubilización de los FE en los TCM y también contribuye la propiedad anticristalizante de los fosfolípidos (Cui y Decker, 2015; Van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008). Por lo tanto, se considera que la metodología aplicada es adecuada para preparar nanoemulsiones O/W de fitoesteroles.

Finalmente, es posible comparar las emulsiones obtenidas en el presente trabajo con los resultados de Zychowski *et al.* (2016) (Figura 9) y Ribeiro *et al.* (2016) (Figura 10) que se presentaron en la sección 1.2.5, en donde se aprecia la formación de cristales de FE en sus sistemas.

## 7. CONCLUSIONES

1. Se logró formular NE O/W de FE con los emulsificantes de estudio, superando la dificultad de solubilizar los FE al aplicar temperatura, tanto en la fase dispersa (105°C) como en la continua (90°), sin mayores alteraciones en los componentes.
2. Se evaluaron las características físicas y químicas de las emulsiones. En cuanto a las características físicas se lograron obtener emulsiones de 67.9, 111.3 y 127.65 nm iniciales para las emulsiones formuladas con LPC, PC y LPC-AGCM respectivamente.

En cuanto a la estabilidad oxidativa, se encontró que el orden en el que los emulsificantes evaluados brindaron mayor protección fue LPC-AGCM > PC > LPC, evidenciado en los valores de peróxido, contenido de POFs encontrado y conservación de la concentración de FE a 37°C. Al tener más ácidos grasos saturados o de cadena media, las emulsiones fueron menos susceptibles a la oxidación y desestabilización.

3. La estabilidad de las NE se evaluó durante 1 mes. Se encontró que las emulsiones preparadas con PC fueron estables durante todo el mes tanto a 37 como a 4°C. Mientras que, las emulsiones preparadas con LPC, se desestabilizaron tanto a 37°C como a 4°C, aunque no en el mismo tiempo (4 días y 9 días, respectivamente). Por lo tanto, se encontró que la estabilidad de las emulsiones es afectada principalmente por la composición de ácidos grasos de los emulsificantes evaluados y la temperatura de almacenamiento solo retarda este proceso.

## CONCLUSIONES

4. La microscopia permitió elucidar los fenómenos de inestabilidad que gobernaban a los sistemas (floculación, coalescencia), y que complementan a los estudios de estabilidad óptica.
5. El sistema que presentó un mejor comportamiento físico, químico y por lo tanto mejor estabilidad en el tiempo para preparar NE O/W de fitoesteroles fue el desarrollado con fosfatidilcolina (PC).

## RECOMENDACIONES

Aunque la aplicación de emulsificantes modificados enzimáticamente es muy prometedora para formular emulsiones funcionales O/W, son necesarios más estudios para mejorar la estabilidad físico química de estas nanoemulsiones.

Se recomienda hacer pruebas sobre la presencia de insaturaciones y cadenas saturadas en los emulsificantes, así como también realizar estudios especializados que permitan elucidar las interacciones entre el compuesto bioactivo y el emulsificante.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

ADM, 2007. CardioAid-S Plant Sterol Esters. Product Code 040087 – Technical Data Sheet. Food Ingredient Catalog 2007–2008. ADM Natural Health and Nutrition, Decatur, Illinois. Disponible en <http://www.admworld.com> (Consultado el 15 septiembre de 2015).

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

Alexander, M., Acero Lopez, A., Fang, Y., & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 427–436. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.041>

Amate, L, Gil, A., & Ramírez, M. (2001). Feeding infant piglets with long-chain polyunsaturated fatty acids as triacylglycerols or phospholipids influences the distribution of these fatty acids in plasma lipoprotein fractions. *Journal of Nutrition* 31, 1250 – 1255.

Apprich, S., & Ulberth, F. (2004). Gas chromatographic properties of common cholesterol and phytosterol oxidation products. *Journal of Chromatography A*, 1055 (1–2), 169–176. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.123>

Araseki, M., Yamamoto, K., & Miyashita, K. (2002). Oxidative Stability of Polyunsaturated Fatty Acid in Phosphatidylcholine Liposomes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12), 2573–2577. <http://doi.org/10.1271/bbb.66.2573>

Auriou, N., & Ferreres, V. (2002). Emulsions and aqueous dispersions of phytosterols. Patent WO 2002065859

Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E., & Ferretti, G. (2011). Phytosterols, phytostanols and their esters: From natural to functional foods. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 4(3), 165–172. <http://doi.org/10.1007/s12349-010-0049-0>

Baeza Jiménez, R. (2013). Desarrollo de procesos enzimáticos selectivos para aplicaciones nutricionales. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Baeza-Jiménez, R., López-Martínez, L. X., Otero, C., Kim, I. H., & García, H. S. (2013). Enzyme-catalysed hydrolysis of phosphatidylcholine for the production of lysophosphatidylcholine. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(10), 1859–1863. <http://doi.org/10.1002/jctb.4040>

Barriuso, B., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2015). Oxysterols formation: A review of a multifactorial process. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, <http://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.027>

Biffin, J. R. (2002). Emulsion and dispersion formulations and method. Patent WO2002094221.

Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention. Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 90, 157-77.

Bonilla, J., Flávia, C. V., Gomes de Oliveira, T., Aparecida Makishi, G. L., & Amaral Sobral, P. J. (2015). Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. *Current Opinion in Food Science*, 5, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.012>.

Boon, C. S., Xu, Z., Yue, X., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2008). Factors Affecting Lycopene Oxidation in Oil-in-Water Emulsions Factors Affecting Lycopene Oxidation in Oil-in-Water. *Society*, 56, 1408–1414. <http://doi.org/10.1021/jf072929>

Bortolomeazzi, R.; Frega, N.; Lercker, G. (1990). Rapid determination of free and esterified sterols using prepacked silica columns. *Italian Journal of Food Science*, 4, 265–268

Brufau, G., Canela, M. A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28(4), 217–225. <http://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.02.003>

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

Camino, N. & Pilosof, A. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1051-1062. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.026>

Cano-Sarmiento, C. (2014). Caracterización fisicoquímica y morfométrica de emulsiones de  $\alpha$ -tocoferol elaboradas con surfactantes y obtenidas por microfluidización. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.

Canselier, J. P., Delmas, H., Wilhelm, A. M., & Abismaïl, B. (2002). Ultrasound Emulsification — An Overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1–3), 333–349.

Cardenia, V., Waraho, T., Rodriguez-Estrada, M. T., McClements, J. D., & Decker, E. A. (2011). Antioxidant and prooxidant activity behavior of phospholipids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(9), 1409–1416. <http://doi.org/10.1007/s11746-011-1807-y>

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

Cavazos-Garduño, A., Ochoa Flores, A. A., Serrano-Niño, J. C., Martínez-Sánchez, C. E., Beristain, C. I., & García, H. S. (2015). Preparation of betulinic acid nanoemulsions stabilized by  $\omega$ -3 enriched phosphatidylcholine. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 204-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.12.007>.

Cercaci, L., Rodriguez-Estrada, M. T., Lercker, G., & Decker, E. A. (2007). Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry*, 102(1), 161-167. <http://dx.doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.010>

Chanasattru, W., Decker, E. A., & McClements, J. D. (2008). Impact of cosolvents (polyols) on globular protein functionality: Ultrasonic velocity, density, surface tension and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1475–1484. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.007>

Chanasattru, W., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2009). Influence of glycerol and sorbitol on thermally induced droplet aggregation in oil-in-water emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 253–261. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.02.004>

Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2012). Influence of interfacial composition on oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by biopolymer emulsifiers. *Food Chemistry*, 131(4), 1340–1346. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.128>

Chatla, N., Rambacher, R. W., & Yao, Y. (2011). Water - soluble phytosterol derivatives for reducing cholesterol and preparation thereof. U.S. Patent 20130144076.

Chavez Zamudio, R. (2015). Biodisponibilidad de Ácido Betulínico y Curcumina en nanoemulsiones estabilizadas con lisofosfatidilcolina en un modelo murino. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2013). Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 35–56. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>

- Chen, Y.-Z., Kao, S.-Y., Jian, H.-C., Yu, Y.-M., Li, J.-Y., Wang, W.-H., & Tsai, C.-W. (2015). Determination of cholesterol and four phytosterols in foods without derivatization by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.01.010>
- Christiansen, L. I., Rantanen, J. T., Von Bonsdorff, A. K., Karjalainen, M. a, & Yliruusi, J. K. (2002). A novel method of producing a microcrystalline beta-sitosterol suspension in oil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 261–269.
- Chung, C., & McClements, D. J. (2014). Structure–function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. *Food Structure*, 1(2), 106–126. <http://doi.org/10.1016/j.foostr.2013.11.002>
- Comunian, T. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, 61, 442–457. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.003>
- Cui, L., & Decker, E. A. (2015). Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 18–31. <http://doi.org/10.1002/jsfa.7320>
- Cui, L., Cho, H. T., McClements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2016). Effects of salts on oxidative stability of lipids in Tween-20 stabilized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 197, 1130–1135. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.099>
- Dalgleish, D. G. (2004). Food Emulsion: Their Structures and Properties. pp. 1–44. En: *Food Emulsion*, 4ed, (S. E. Friberg, K. Larsson, & J. Sjoblom (Eds.)). United States: Marcel Dekker Inc.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). (2014). Senate Commission on Food Safety (SKLM). Phytosterol oxidation products in foods: Analysis, occurrence, exposure and biological effects. Hanover, Germany. December.

- Di Battista, C. A., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V., & Piña, J. (2015). The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 286, 193–201. <http://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.08.016>
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids* 17(1): 25–39.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>  
[doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.053](http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.053).
- Dutta, P. (2004). Chapter 10: Chemistry, analysis and occurrence of phytosterols oxidation products in foods. pp 397-418. En: *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals*, 1ed, (P. Dutta (Ed.)). Marcel Dekker Inc.
- Dykstra, C. M., Giles, H. D., Banerjee, S., & Pavlostathis, S. G. (2014). Biotransformation of phytosterols under aerobic conditions. *Water Research*, 58, 71–81. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.062>
- Egelhaaf, S.U., Schurtenberger, P., Müller, M. (2000). New controlled environment vitrification system for cryo-transmission electron microscopy: design and application to surfactant solutions. *J. Microsc.* 200, 128–139
- Engel, R., & Schubert, H. (2005). Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(2), 233–237. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.01.004>
- Espinosa, R. R., Inchingolo, R., Alencar, S. M., Rodriguez-Estrada, M. T., & Castro, I. A. (2015). Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. *Food Chemistry*, 182, 95–104. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.130>
- Estiasih, T., Ahmadi, K., Ginting, E., & Priyanto, A. D. (2013). Modification of soy crude lecithin by partial enzymatic hydrolysis using phospholipase A1. *International Food Research Journal*, 20(2), 843–849.

FDA, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, United States. (2010). 21 CFR Part 101- Food Labeling; Health Claim; Phytosterols and Risk of Coronary Heart Disease; Proposed Rule. Federal Register, 75(235), 1–78.

Fernandes, P., & Cabral, J. M. S. (2007). Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98(12), 2335–2350. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.006>

Field, F. J., Born, E., & Mathur, S. N. (1997). Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *Journal of Lipid Research*, 38(2), 348–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162754>

Fisher, S., Wachtel, E. J., Aserin, A., & Garti, N. (2013). Solubilization of simvastatin and phytosterols in a dilutable microemulsion system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 35–42. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.036>

Formulacion, 2013. Turbiscan Lab High Performance Stability Analyser. Disponible online en <http://www.formulacion.com/stability-turbiscan-lab.html>. (Consultado el 10 de octubre de 2015)

Fox, C. B., Mulligan, S. K., Sung, J., Dowling, Q. M., Fung, H. W. M., Vedvick, T. S., & Coler, R. N. (2014). Cryogenic transmission electron microscopy of recombinant tuberculosis vaccine antigen with anionic liposomes reveals formation of flattened liposomes. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1367–1377. <http://doi.org/10.2147/IJN.S56582>

Frankel, E. N., Satué-Gracia, T., Meyer, A. S., & German, J. B. (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2094–2099

Friberg, S., K. Larsson, & J. Sjöblom (2004). *Food Emulsions*. New York: Marcel Dekker.

Friedrich, H., Frederik, P. M., de With, G., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2010). Imaging of self-assembled structures: interpretation of TEM and cryo-TEM images. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 7850–7858.

García-Llatas, G., & Rodríguez-Estrada, M. T. (2011). Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 607–624. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.005>.

Garti, N. & Remon, G. F. (1984). Relationship between nature of vegetable oil, emulsifier and the stability of w/o emulsion. *Journal of food technology*, 19(6), 712-717

Gaupp, R. & W. Adams (2004). Acid esters of mono- and diglycerides. In *Emulsifiers in Food Technology*, R. J. Whitehurst, ed., pp. 59–85. Oxford, U.K.: Blackwell Publishing.

González-Larena, M., García-Llantas, G., Vidal, M. C., Sánchez-Siles, J.M., Barberá, R., & Lagarda, M.J. (2011). Stability of Plant Sterols in Ingredients Used in Functional Foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 59, 3524-3631. <http://doi.org/10.1021/jf1044102>.

González-Larena, M., Garcia-Llatas, G., Clemente, G., Barberá, R., & Lagarda, M. J. (2015). Plant sterol oxides in functional beverages: Influence of matrix and storage. *Food Chemistry*, 173, 881–889. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.121>

Gottemoller, T. V. (2001). Phytosterol and phytostanol compositions. Patent WO2001037681.

Goulson, M. J., Hong, C., Kim, P., Schmelzer, W. N., & Shieh, W. J. (2003). Aqueous dispersible steryl ester compositions. Patent WO2003086468.

Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M., & Boatella, J. (1995). Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *Journal of Chromatography*, 705, 289–304. [http://doi:10.1016/0021-9673\(95\)00034-K](http://doi:10.1016/0021-9673(95)00034-K)

Gylling, H., Puska, P., Vartiainen, E., & Miettinen, T. A. (1999). Retinol, vitamin D, carotenes and  $\alpha$ -tocopherol in serum of a moderately hypercholesterolemic population

consuming sitostanol ester margarine. *Atherosclerosis*, 145(2), 279–285. [http://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00078-7](http://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00078-7)

Halling, K. K., & Slotte, J. P. (2004). Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1664, 161–171. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.05.006>

Hayes, K., Perlman, D., Pronczuk, A. (2003). Prepared foods containing triglyceride - recrystallized non - esterified phytosterols. Patent WO2003043433.

He, W. Sen, Hu, D., Wang, Y., Chen, X. Y., Jia, C. S., Ma, H. Le, & Feng, B. (2016). A novel chemo-enzymatic synthesis of hydrophilic phytosterol derivatives. *Food Chemistry*, 192, 557–565. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.047>

[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/)

IKA®, 2013. IKA Ultraturrax T-25 digital: User manual. Staufen, Germany.

Inchingolo, R., Cardenia, V., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2014). Analysis of phytosterols and phytostanols in enriched dairy products by fast gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 37(20), 2911–2919. <http://doi.org/10.1002/jssc.201400322>

Izadi, Z., Nasirpour, A. & Garousi, G. (2012). Optimization of phytosterols dispersion in an oil/water emulsion using mixture design approach. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(12), 1715-1522. <http://dx.doi.org/10.1080/01932691.2011.646599>

Izadi, Z., Nasirpour, A., Garousi, G. A., & Tamjidi, F. (2015). Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5341–5346. <http://doi.org/10.1007/s13197-014-1593-2>

Kawaguchi, E., Shimokawa, K., & Ishii, F. (2008). Physicochemical properties of structured phosphatidylcholine in drug carrier lipid emulsions for drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62, 130–135. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.027>

Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 170–175. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>

Kittipongpittaya, K., Chen, B., Panya, A., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2012). Prooxidant activity of polar lipid oxidation products in bulk oil and oil-in-water emulsion. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(12), 2187–2194. <http://doi.org/10.1007/s11746-012-2128-5>

Klang, V., Matsko, N. B., Valenta, C. & Hofer, F. (2012). Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*, 43, 85-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>

Kuntsche, J., Horst, J. C., & Bunjes, H. (2011). Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 417(1–2), 120–137. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.001>

Lara, A., Rosas, M., Pastelín, G., Aguilar, C., Attie, F., & Velazquez Monroy, O. (2004). Hipercolesterolemia e hipertensión arterial en México. Consolidación urbana actual con obesidad, diabetes y tabaquismo. *Archivos de Cardiología de México*, 74(3), 231–345.

Leal-Castañeda, E. J., Hernández-Becerra, J. A., Rodríguez-Estrada, M. T., & García, H. S. (2017). Formation of cholesterol oxides in lipid medium during microwave heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*. En Prensa.

Leal-Castañeda, E. J., Inchingolo, R., Cardenia, V., Hernandez-Becerra, J. A., Romani, S., Rodriguez-Estrada, M. T., & Garcia, H. S. (2015). Effect of Microwave Heating on Phytosterol Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5539–5547. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00961>

Lemarchand, C., Couvreur, P., Vauthier, C., Costantini, D., & Gref, R. (2003). Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan.

International Journal of Pharmaceutics, 254, 77–82. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00687-7](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00687-7)

Leong, W. F., Che Man, Y. B., Lai, O. M., Long, K., Nakajima, M., & Tan, C. P. (2011a). Effect of sucrose fatty acid esters on the particle characteristics and flow properties of phytosterol nanodispersions. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 63–69. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.028>

Leong, W. F., Lai, O. M., Long, K., Che Man, Y. B., Misran, M., & Tan, C. P. (2011b). Preparation and characterization of water-soluble phytosterol nanodispersions. *Food Chemistry*, 129(1), 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.027>

Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2014). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98. <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>

Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2011). Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219(1), 124–133. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.004>

Lim, C. W., Kim, B. H., Kim, I.-H., & Lee, M.-W. (2014). Modeling and optimization of phospholipase A 1 -catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine using response surface methodology for lysophosphatidylcholine production. *Biotechnology Progress*, 31(1), 35–41. <http://doi.org/10.1002/btpr.2009>

Lin, Y., Knol, D., & Trautwein, E. A. (2015). Review: Phytosterol oxidation products (POP) in foods with added phytosterols and estimation of their daily intake: A literature review, 1–16. <http://doi.org/10.1002/ejlt.201500368>

Lindfors, L., Skantze, P., Skantze, U., Rasmusson, M., Zackrisson A., and Olsson, U. (2006). Amorphous drug nanosuspensions. Inhibition of Ostwald ripening, *Langmuir*, , 22, 906. Manca, M. L., Castangia, I., Zaru, M., Nácher, A., Valenti, D.,

Ling, W. H. & Jones, P. J. H. (1995). Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. *Life Science*, 57(3): 195-206

Mackay, J. & Mensah, G.A. 2004. The atlas of heart disease and stroke. World Health Organization and US Center of Disease Control and prevention (WHO & CDS). Part 2: Risk factors. ISBN-13 9789241562768. 112 Páginas. Disponible en:

Madrid Conesa, J., & Madrid Gomariz, A. (2006). Conoce los nuevos alimentos tú puedes. 1ed. Aran ediciones. Madrid, España. ISBN: 9788495913746.

Malvern Inc. (2013). Zetasizer Nano, User Manual. Man0485 (11). Inglaterra.

Malvern Inc. (2015). Technical document: A basic guide of particle characterization. Pg 5-8. WP120620BasicGuidePartChar

Manca, M.L., Castangia, I., Zaru, M., Nácher, A., Valenti, D., Fernández-Busquets, X., Fada, A.M. Manconi, M. (2015). Development of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyalurosomes) and their potential on skin inflammation and wound restoring. *Biomaterials*, 71(August), 100–109. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.034>

Mao, L., Yang, J., Xu, D., Yuan, F., & Gao, Y. (2010). Effects of Homogenization Models and Emulsifiers on the Physicochemical Properties of  $\beta$ -Carotene Nanoemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(7), 986-993.

Martin, D., Reglero, G., & Señoráns, F. J. (2010). Oxidative stability of structured lipids. *European Food Research and Technology*, 231(5), 635–653. <http://doi.org/10.1007/s00217-010-1324-5>

Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Biochemistry*. Pearson Education. 2<sup>nd</sup> edition. 1335 páginas. ISBN: 8478290532

McClements, D. J. (2004). *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. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00004-5>

McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297. <http://doi.org/10.1039/c0sm00549e>

McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food system. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282.

McClements, D. J., & 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. <http://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>

McClements, D. J. (2016). *Food emulsions: Principles, practices and techniques*. Third Ed. Boca Raton, US: CRC Press, Taylor and Francis group. 641 pg.

Mel'nikov, S. M., Seijen Ten Hoorn, J. W. M., & Bertrand, B. (2004). Can cholesterol absorption be reduced by phytosterols and phytostanols via a cocrystallization mechanism? *Chemistry and Physics of Lipids*, 127(1), 15–33. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.08.007>

Menéndez-Carreño, M., Knol, D., & Janssen, H. G. (2016). Development and validation of methodologies for the quantification of phytosterols and phytosterol oxidation products in cooked and baked food products. *Journal of Chromatography A*, 1428, 316–325. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.073>

Moonen, H. & Bas, H. (2004). Mono- and di-glycerides. In: *Emulsifiers in Food Technology*, R. J. Whitehurst, ed., pp. 40–58. Oxford, U.K.: Blackwell Publishing.

Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457–500. [http://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00006-1](http://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00006-1)

Morton, G. M., Lee, S. M., Buss, D. H., & Lawrence, P. (1995). Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 8(6): 429–440

Mundelein, A. A. & Miller, M. (2001). Plant sterol-emulsifier complexes. U.S. Patent 6,267,963

Muñoz, A. M., Alvarado-Ortíz, C., & Encina, C. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Horizonte Medico*, 11(2), 93–100.

Nguyen, T. T. (1999). The Cholesterol-Lowering Action of Plant Stanol Esters. *The Journal of Nutrition*, 129, 2109–2112.

NHLBI. National Heart, Lung and Blood Institute. National Institutes of Health. Department of Health and Human Services. United States Government. Coronary Heart Disease. Disponible en <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cad>. (Consultado el 12 de Octubre de 2015).

Nii, T., & Ishii, F. (2004). Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39, 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.08.017>

Noakes, M., Clifton, P. M., Doornbos, A. M. E., & Trautwein, E. A. (2005). Plant sterol ester-enriched milk and yoghurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 44(4), 214–222. <http://doi.org/10.1007/s00394-004-0513-z>

Ochoa Flores, A. A. (2013). Desarrollo de nanoemulsiones con fosfolípidos estructurados como sistemas acarreadores de curcumina. Tesis de Doctorado en Ciencias de Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

Oehrl D. L., & Boyd, L. (2004). Chapter 11: Biological effects and safety aspects of phytosterols oxides. pp: 419-430. En: *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals*, 1ed, (P. Dutta (Ed.)). United States: Marcel Dekker Inc.

Ostlund, R. E. (1999). Sitostanol formulation to reduce cholesterol absorption and method for preparing and use of same. US Patent 5932562 A.

Ostlund, R. E. (2002). Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 533–549. <http://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.020702.075220>

Ostlund, R. E. (2007). Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids*, 42(1), 41–45. <http://doi.org/10.1007/s11745-006-3001-9>

Ostlund, R. E. J., Spilburg, C. A., & Stenson, W. F. (1999). Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans 1 – 3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 826–831.

Paaver, U., Laidmäe, I., Santos, H. A., Yliruusi, J., Aruväli, J., Kogermann, K., & Heinämäki, J. (2016). Development of a novel electrospun nanofibrous delivery system for poorly water-soluble  $\beta$ -sitosterol. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(4), 500–506. <http://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.04.005>

Pan, Y., Tikekar, R. V., & 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. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.038>

Panpipat, W., Dong, M., Xu, X., & Guo, Z. (2013). Thermal properties and nanodispersion behavior of synthesized  $\beta$ -sitosteryl acyl esters: A structure-activity relationship study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 407, 177–186. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.06.030>

Perlman, D. (2014). Liquid crystalline phytosterol-glycerine complex for enhanced bioavailability and water dispersal. U.S. Patent 8,921,351

Pichot, R., Watson, R. L., & Norton, I. T. (2013). Phospholipids at the interface: Current trends and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11767–11794. <http://doi.org/10.3390/ijms130611767>

Piorkowski, D. T. & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids* 42: 5–41.

Pollak, J. O. (1953). Reduction of Blood Cholesterol in Man. *Circulation*, VII (May), 702–707. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.7.5.702>

Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle

size. Food Hydrocolloids, 25(5), 1000–1008.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017>

Quílez, J., García-Lorda, P., & Salas-Salvadó, J. (2003). Potential uses and benefits of phytosterols in diet: Present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 22(4), 343–351. [http://doi.org/10.1016/S0261-5614\(03\)00060-8](http://doi.org/10.1016/S0261-5614(03)00060-8)

Rayner, M., & Dejmek, P. (2015). *Engineering Aspects of Food Emulsification and Homogenization*. (D.-W. Sun, Ed.) (1st ed.). United States: CRC Press. Group Taylor and Francis. Boca Raton, FL

Rayner, M., D. Marku, M. Eriksson, M. Sjöö, P. Dejmek, & M. Wahlgren. (2014). “Biomass- based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 458:48–62.

Ren, Q., Xing, H., Bao, Z., Su, B., Yang, Q., Yang, Y., & Zhang, Z. (2013). Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(9), 937–952. [http://doi.org/10.1016/S1004-9541\(13\)60560-1](http://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60560-1).

Ribeiro, H. S., Gupta, R., Smith, K. W., van Malssen, K. F., Popp, A. K., & Velikov, K. P. (2016). Super-cooled and amorphous lipid-based colloidal dispersions for the delivery of phytosterols. *Soft Matter*, 12(27), 5835–46. <http://doi.org/10.1039/c6sm00601a>

Rodriguez-Estrada, M. T., Garcia-Llatas, G., & Lagarda, M. J. (2014). 7-Ketocholesterol as marker of cholesterol oxidation in model and food systems: When and how. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 792–797. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.098>

Ros, E., (2003). Inhibición de la absorción intestinal del colesterol: nueva diana terapéutica en la reducción de la colesterolemia. *Clínica e Investigación en Aterosclerosis*, 15(6), 261-275.

Rossi, L., Seijen, J. W. M., Mel'nikov, S. M., & Velikov, K. P. (2010). Colloidal phytosterols: synthesis, characterization and bioaccessibility. *Soft Matter*, 6, 928–936. <http://doi.org/10.1039/b911371a>

Rozner, S., & Garti, N. (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 282-283 (December 2005), 435–456. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.12.032>

Rozner, S., Aserin, A., & Garti, N. (2008). Competitive solubilization of cholesterol and phytosterols in nonionic microemulsions studied by pulse gradient spin-echo NMR. *Journal of Colloid and Interface Science*, 321(2), 418–425. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.01.055>

Sagalowicz, L., Leser, M., Michel, M., Watzke, H. J., Acquistapace, S., Bertholet, R. & Robert, F. (2013). Oil-in-water emulsion and its use for the delivery of functionality. U.S. Patent US 8,513,311.

Sakulku, U., Nuchuchua, O., Uawongyart, N., Puttipipatkachorn, S., Soottitantawat, A., & Ruktanonchai, U. (2009). Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 372(1–2), 105–111. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.029>

Sasako, H., Kihara, F., Koyama, K., Higashi, K., Yamamoto, K., & Moribe, K. (2016). A novel capsule-like structure of micro-sized particles formed by phytosterol ester and  $\gamma$ -cyclodextrin in water. *Food Chemistry*, 210, 269–275. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.103>

Schuler, I., Duportail, G., Glasser, N., Benveniste, P., & Hartmann, M. A. (1990). Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study. *BBA - Biomembranes*, 1028(1), 82–88. [http://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90268-S](http://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90268-S)

Schwager, J., Mohajeri, M. H., Fowler, A., & Weber, P. (2008). Challenges in discovering bioactives for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 66–72. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.016>

Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421–424.

Sivakumar, M., Tang, S. Y., & Tan, K. W. (2014). Cavitation technology – a greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions, *Ultrasonics Sonochemistry* 21, 2069–2083.

Soupas, L., Huikko, L., Lampi, A. M., & Piironen, V. (2005). Esterification affects phytosterol oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(2), 107–118. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200401096>

Sweeley, C. C.; Bentley, R.; Makita, M.; & Wells, W. W. (1963). Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society*. 85, 2497–2507.

Tadros, T. F. (2009). *Emulsion Science & Technology*. First edition. Editorial Wiley – VCH. Wokingham, United Kingdom.

Taha, D. A., Wasan, E. K., Wasan, K. M., & Gershkovich, P. (2015). Lipid-lowering Activity of Natural and Semi-Synthetic Sterols and Stanols. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 344–367.

Ubeyitogullari, A., & Ciftci, O. N. (2016). Phytosterol nanoparticles with reduced crystallinity generated using nanoporous starch aerogels. *RSC Adv.*, 6(110), 108319–108327. <http://doi.org/10.1039/C6RA20675A>

Uluata, S., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2015). Physical Stability, Autoxidation, and Photosensitized Oxidation of w-3 Oils in Nanoemulsions Prepared with Natural and Synthetic Surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(42), 9333–9340. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03572>

Vaikousi, H., Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Zawistowski, J. (2007). Phase transitions, solubility, and crystallization kinetics of phytosterols and phytosterol-oil blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1790–1798. <http://doi.org/10.1021/jf0624289>

- Valenzuela, A., & Ronco, A. M. (2004). Phytosterols and phytostanols: natural allied for the protection of cardiovascular health. *Revista Chilena de Nutrición*, 31, 161–169.
- Van Nieuwenhuyzen, W., & Tomás, M. C. (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 472–486. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>
- Vanmierlo, T., Husche, C., Schött, H.F., Pettersson, H., & Lütjohann, D. (2013). Plant sterol oxidation products –Analogues to cholesterol oxidation products from plant origin. *Biochimie* 95, 464 – 472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.021>.
- Verleyen, T., Forcades, M., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & Greyt, W. (2002). Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 117–122. <http://doi.org/10.1007/s11746-002-0444-3>.
- Vikbjerg, A. F. (2006). Enzyme Catalyzed Production of Phospholipids with Modified Fatty Acid Profile. Tesis de Doctorado. BioCentrum-DTU, Universidad de Dinamarca. Lyngby, Dinamarca.
- Wang, G., & Wang, T. (2008). Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11424–11431. <http://doi.org/10.1021/jf8022832>
- Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., & Moustaid-Moussa, N. (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 363–376. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.002>
- Waraho, T., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., McClements, J. D., & Decker, E. A. (2009). Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7112–7117. <http://doi.org/10.1021/jf901270m>
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 129(3), 854–859. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.034>

- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science and Technology*, 22(1), 3–13. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>
- Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T., & Awad, T. (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3(2), 146–154. <http://doi.org/10.1007/s11483-008-9065-8>
- Won-Tae, Y., Kab-Sig, K., Bo-Chun, K., Jung-Hee, H., & Hyung-Pyo, H. (2001). Method for dispersing plant sterol for beverage and a plant sterol - dispersed beverage, of which particle size is nanometer - scale in dispersed beverage. U.S. Patent 7.994.157.
- Wooster, T. J., Golding, M., & Sanguansri, P. (2008). Impact of oil type on nanoemulsions formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24(10), 12758–12765. <http://doi.org/10.1021/la801685v>
- Xinmei, X., Ning, X., & Jianbin, H. (2015). Physiological Function of Phytosterol and its Application. *Animal Husbandry and Feed Science*, 7(2), 67–69. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Yang, Y. & McClements, D. J. (2013). Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocolloids* 30(2): 712–720.
- Yoon, W.-T., Kim, K.-S., Kim, T., & Hong, H.-P. (2005). Mixing powder of plant sterol and emulsifier, and method for preparing the same. U.S. Patent 2005/0118203.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61-68.
- Zawistowski, J. (2007). Emulsions comprising non-esterified phytosterols in the aqueous phase. Patent WO2007071036.
- Zawistowski, J. (2010). Chap.17. Tangible health benefits of phytosterol functional foods. *Functional Food Product Development*. (J. Smith & E. Charter, Eds.) (Blackwell). Oxford, UK.

Zawistowski, J., & Jones, P. J. H. (2015). Regulatory Aspects Related to Plant Sterol and Stanol. Supplemented Foods. *Journal of AOAC International*, 98(3), 1–7. <http://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEZawistowski>.

Zychowski, L. M., Logan, A., Augustin, M. A., Kelly, A. L., Zabara, A., O'Mahony, J. A., Con, C. E., & Auty, M. A. E. (2016). Effect of Phytosterols on the Crystallization Behavior of Oil-in-Water Milk Fat Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(34), 6546–6554. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01722>