

Tesis de Maestría

Nanopartículas cargadas con antioxidantes naturales para el desarrollo de films biodegradables para la preservación de alimentos

Guerrero León, Beatriz Alexandra

2016-08-26

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Guerrero León, Beatriz Alexandra. (2016-08-26). Nanopartículas cargadas con antioxidantes naturales para el desarrollo de films biodegradables para la preservación de alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Guerrero León, Beatriz Alexandra. "Nanopartículas cargadas con antioxidantes naturales para el desarrollo de films biodegradables para la preservación de alimentos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-08-26.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Maestría en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de alimentos.

**“NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON ANTIOXIDANTES NATURALES PARA EL
DESARROLLO DE FILMS BIODEGRADABLES PARA LA PRESERVACIÓN DE
ALIMENTOS”**

Tesis presentada para optar al título de Magister en Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de Alimentos.

Autora: **Beatriz Alexandra Guerrero León.**

Directora: Dra. Nancy Lis García.

Codirectora: Dra. Norma D'Accorso

Lugar de trabajo: Dpto. de Química Orgánica, CIHIDECAR (CONICET) FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2016

“NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON ANTIOXIDANTES NATURALES PARA EL DESARROLLO DE FILMS BIODEGRADABLES PARA LA PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS”

Resumen:

El objetivo de este estudio fue optimizar la producción y caracterizar nanopartículas cargadas con un extracto de antioxidantes provenientes de la piel de la batata. En primera instancia se realizó la obtención y caracterización del extracto de la piel de batata, variedad Arapey. Se determinó la presencia de cinco ácidos fenólicos en altas concentraciones: ácido clorogénico, ácido cafeico y tres isómeros de dicafeoilquínicos. Además se realizó un análisis térmico en el cual se determinó que las primeras degradaciones en el extracto comienzan a partir de los 135°C, y que el método propuesto para la encapsulación no interfiere en las propiedades de los antioxidantes.

Para la producción de nanopartículas se utilizó el método de emulsificación evaporación. Se partió de ácido poliláctico (PLA) de bajos pesos moleculares, previamente sintetizados en el laboratorio, para optimizar el método se realizaron tres síntesis de nanopartículas de PLA, modificando variables como el tiempo de centrifugado y el peso molecular del PLA. La caracterización se realizó por microscopia electrónica de barrido (SEM) y dispersión dinámica de luz (DLS). A partir del ensayo que presentó las mejores morfologías y distribuciones de tamaño, se realizó la encapsulación del extracto. La eficiencia de encapsulación del extracto en las nanopartículas de PLA fue evaluada observando el efecto que tiene el sistema de solventes de la fase orgánica, el peso molecular del PLA, la velocidad y tiempo de centrifugación y la concentración del extracto. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por SEM, DLS y se calculó la eficiencia de encapsulación en porcentaje (E.E%).

Se realizó un avance en el desarrollo de materiales compuestos de ácido poliláctico con las nanopartículas previamente cargadas con los antioxidantes. Los films fueron caracterizados por SEM observándose la existencia de una alta compatibilidad entre el PLA comercial utilizado para la matriz y el PLA sintetizado en el laboratorio con el cual se preparó las nanopartículas.

Palabras clave: nanopartículas, ácido poliláctico, batata, antioxidantes, ácidos fenólicos, método emulsificación evaporación del solvente, películas biodegradables.

LOADED NANOPARTICLES WITH NATURAL ANTIOXIDANTS FOR DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE FILMS FOOD PRESERVATION”

Abstract:

The objective of this study was to optimize production and characterize loaded nanoparticles with antioxidants extracted from sweet potato skin. In the first instance the preparation and characterization of skin extract sweet potato variety Arapey was made. The presence of five phenolic acids in high concentrations was determined: chlorogenic acid, caffeic acid and three isomers of dicaffeoylquinic acid. Furthermore, a thermal analysis in which it was determined that the first degradations of the extract start from 135 °C, and that the technique proposed for encapsulation does not interfere with the antioxidants properties was performed.

The evaporation emulsion technique was used for production of nanoparticles. It began with low molecular weight polylactic acid (PLA) previously synthesized in the laboratory, to optimize the method, three PLA nanoparticles synthesis were made by modifying variables as time centrifuged and the molecular weight of PLA. The characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM) and dynamic light scattering (DLS). From the trial that presented the best morphologies and size distributions, encapsulation of the extract was made. The encapsulation efficiency of extract PLA nanoparticles was evaluated by observing the effect of the solvent system of the organic phase, the molecular weight of PLA, speed and time of centrifugation and the concentration of the extract. The obtained nanoparticles were characterized by SEM, DLS and the encapsulation efficiency in percent (E.E. %) was calculated.

Progress was made in developing polylactic acid composites with nanoparticles loaded with antioxidants previously. The films were characterized by SEM observing the existence of high compatibility between the commercial PLA used as matrix and PLA synthesized in the laboratory with which nanoparticles was prepared.

Keywords: nanoparticles, poly lactic acid, sweet potato, antioxidants, phenolic acids, emulsification- solvent evaporation method, biodegradable films.

AGRADECIMIENTOS.

Llegada esta última etapa de lo que hace 3 años era todavía un sueño, quiero hacer un extensivo agradecimiento, a quienes con su apoyo, cariño, consideración, oraciones y demás formaron parte de este camino.

A mi directora, Nancy Lis, gracias por su paciencia, apoyo, nobleza, generosidad, carisma, y por cada una de sus enseñanzas.

Gracias a la Dra. Norma D´Acorssso, quién me acogió en su laboratorio, en su hogar, y me hizo formar parte del mismo, infinitamente agradecida por darme todas las oportunidades para crecer como profesional y como persona.

A la gente del Laboratorio de polímeros (Mirta, Mario, Romi, Joha, Gaby, Martín, María), gracias por su nobleza, generosidad, comprensión y conocimientos científicos, gracias por darme no una sino todas las manos necesarias para poder avanzar, de cada uno aprendí y me llevo algo.

Mi gratitud sincera y especial a Mario por su colaboración e inmensa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Graciela Corbino del INTA, por su apoyo, conocimientos y disposición en lo requerido.

A la gente del Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos del Departamento de Física, siempre prestos a colaborar.

A mis padres y hermanos, gracias, son mi todo, sin ustedes nada tiene sentido.

A toda mi familia siempre tan pendiente, orando, y constantemente alentándome a seguir adelante, me dieron ánimos en los momentos difíciles,

A la “chicas”: Lau, Ana, Alex y Regi, Dios nos puso a las cinco en el mismo camino, en el momento adecuado, por una razón especial, tuve la dicha de conocerlas y que placer haber caminado juntas en este trayecto de nuestras vidas. Gracias Mary, por tu apoyo y amistad.

A toda la gente que conocí en este trayecto de mi vida que quizá no la nombro pero la llevo en mi corazón, gracias.

DEDICATORIA.

*Señor, concédeme serenidad para aceptar todo aquello que no puedo cambiar,
fortaleza para cambiar las cosas que puedo
y sabiduría para entender la diferencia.*

Reinhold Niebuhr

A Dios.

A mi Arcángel San Miguel

A mis padres: José Miguel y Beatriz del Carmen.

A mis hermanos: Verónica, Patricio, Dayana

A ti Juan José.

ABREVIATURAS.

3,4-DCQ	3,4-dicafeolquínico
3,5-DCQ	3,5-dicafeolquínico
4,5-DCQ	4,5-dicafeolquínico
ACL	Ácido clorogénico
BHA	Butil hidroxil anisol
BHT	Butil hidroxil tolueno
CA	Capacidad antioxidante
DCM	Diclorometano
DG	Galato de dodecilo
D_h	Diámetro hidrodinámico promedio (Z-Average)
DLS	Dinamic Light Scattering. Dispersión dinámica de luz
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E.E (%)	Eficiencia de Encapsulación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Ensayos de optimización
ExpBA	Extracto de la piel de batata (variedad Arapey)
FA	Fase acuosa
FO	Fase orgánica
HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno

IC₅₀	Concentración inhibitoria al 50 %
IP	Índice de Polidispersidad
Mn	Peso molecular en número
Mw	Peso molecular en masa
NPs	Nanopartículas
OG	Galato de octilo
PCL	Poli-ε-caprolactona
PDLA	Ácido poli (D-láctico)
PDLLA	Ácido poli (DL-láctico)
PET	Polietilen-tereftalato
PG	Galato de propilo
PHB	Ácido polihidroxibutírico
PLA	Ácido poliláctico
PLLA	Ácido poli (L-láctico)
PS	Poliestireno
PVA	Alcohol polivinílico
RNS	Especies reactivas del oxígeno
ROP	Polimerización por apertura del anillo
ROS	Especies reactivas del nitrógeno
RP-HPLC	Cromatografía líquida de Alta Resolución-Fase Reversa.
SEM	Microscopia electrónica de barrido

SET	Transferencia de un electrón
TBHQ	Ter butil hidroquinona
Tg	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis termogravimétrico
Tm	Temperatura de fusión
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2-ácido carboxílico

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. OBJETIVOS -----	1
1.1. Objetivo general. -----	2
1.2. Objetivos específicos. -----	3
2. INTRODUCCIÓN -----	4
2.1 Nanotecnología. -----	5
2.1.1 Nanotecnología y sus aplicaciones. -----	6
2.2 Ácido poliláctico (PLA). -----	6
2.2.1 Generalidades.-----	6
2.2.2 Manufactura de ácido poliláctico. -----	8
2.2.3 Síntesis de PLA. -----	9
2.2.4 Propiedades físicas y químicas.-----	10
2.2.5 Aplicaciones. -----	12
2.3 Nanoencapsulación -----	16
2.3.1 Tipos de nanopartículas. -----	17
2.3.2 Nanopartículas poliméricas (NPP). -----	18
2.3.3 Métodos de preparación de Nanopartículas -----	18
2.3.4 Método de emulsificación y evaporación del solvente. -----	20
2.4 Antioxidantes. -----	22
2.4.3 Antioxidantes Naturales -----	25
2.5 Batata (Ipomea batata). -----	30
2.5.1 Generalidades -----	30
2.5.2 Taxonomía y morfología -----	31
2.5.3 Descripción botánica. -----	31
2.5.4 Composición nutricional-----	32
2.5.5 Compuestos fenólicos -----	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS -----	36

3.1	 Materiales de partida.	37
3.2	 Métodos.	37
	Obtención del Extracto de la piel de batata, variedad Arapey (ExpBA).	37
3.2.1	Obtención de Nanopartículas de Ácido poliláctico (PLA).	38
3.2.1.1	Síntesis de nanopartículas.	38
3.2.1.2	Encapsulación del extracto de piel de batata en nanopartículas de PLA.	39
3.2.2	Obtención de Films.	41
3.2.3	Caracterizaciones.	41
3.2.3.1	Caracterización del extracto.	41
3.2.3.2	Caracterización de nanopartículas de PLA y nanopartículas de PLA cargadas con el extracto.	46
3.2.3.3	Caracterización de films.	52
3.2.4	Análisis estadístico	53
4.	 RESULTADOS	54
4.1	 Caracterización del extracto de piel de batata (variedad Arapey).	55
4.1.1	Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos individuales.	55
4.1.2	Estabilidad térmica.	57
A.	Análisis Termogravimétrico (TGA)	57
B.	DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido)	58
4.1.3	Determinación de la Capacidad antioxidante (CA).	59
4.2	 Síntesis de Nanopartículas de Ácido poliláctico (PLA).	60
4.2.1	Caracterización de nanopartículas.	60
4.2.2	Encapsulación del extracto de piel batata en nanopartículas de PLA.	65
A.	Ensayos de Optimización de solventes para la encapsulación del ExpBA.	66
B.	Ensayos sobre otras variables.	71
4.2.3	Porcentaje de rendimiento.	77
4.2.4	Caracterización de Films.	78
5.	 CONCLUSIONES	81
6.	 BIBLIOGRAFÍA	84



1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

A inicios del siglo pasado gran parte de los productos industriales no combustibles como: colorantes, tintas, pinturas, medicinas, productos químicos, prendas de vestir, fibras sintéticas, embalaje flexible se producían a partir de recursos naturales (Robertson, 2008). En el transcurso de los años, los materiales biológicos fueron sustituidos por derivados del petróleo, y sus propiedades físicas y químicas, de extraordinaria versatilidad los posicionaron rápidamente en el mercado. Sin embargo, avances recientes han permitido el desarrollo de tecnologías que implican el uso de materiales provenientes de la biomasa renovable y que tienen como objetivo principal reducir los niveles de contaminación ambiental, así como optimizar el rendimiento de los productos de base biológica a bajo costo.

Una de esas tecnologías implica producción de nanocargas y su dispersión en matrices poliméricas biodegradables. Estas nanocargas de origen orgánico e inorgánico como por ejemplo: nanoplacas de arcilla y silicatos, nanotubos de carbono, nanocristales de almidón, nanofibras, nanocilindros, nanopartículas, entre otras, (Duncan, 2011), son incorporadas a las matrices poliméricas, con el objeto de mejorar las propiedades de barrera de gas, la transmisión del vapor de agua, propiedades térmicas y mecánicas.

Por otro lado, es conocido que los antioxidantes naturales han atraído gran atención debido a su papel protector contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Por ello se ha volcado un gran esfuerzo para buscar agentes terapéuticos seguros y eficaces, en beneficio de la salud de los consumidores. Investigaciones de los últimos quince años demuestran el alto potencial de la batata como fuente de compuestos de interés biológico o industrial (antioxidantes, fibra, minerales, vitaminas, etc.), algunos de los cuales actúan en la prevención de enfermedades (Yamakawa y Yoshimoto, 2001)

Con el fin de proporcionar una matriz que permita dar protección a compuestos antioxidantes, el objetivo **general** de este trabajo está enfocado en:

- Elaborar, optimizar y caracterizar nanopartículas de ácido poliláctico (PLA) cargadas con un extracto de antioxidantes provenientes de la piel de la batata.

1.2. Objetivos específicos.

Los objetivos específicos se detallan a continuación:

1. Estudios de diferentes condiciones experimentales para la obtención de nanopartículas de PLA, y su optimización en la encapsulación de antioxidantes.
2. Obtención de nanopartículas de PLA a partir de ácidos polilácticos de bajos pesos moleculares, sintetizados previamente en el laboratorio.
3. Encapsulación de antioxidantes de origen natural en nanopartículas de PLA.
4. Estudios de caracterización de las nanopartículas de PLA y las nanopartículas de PLA con antioxidantes.
5. Estudios preliminares de desarrollo de materiales compuestos de ácido poliláctico con las nanopartículas previamente cargadas con antioxidantes.



2.1 Nanotecnología.

La nanotecnología implica el estudio, diseño, fabricación, caracterización, y manipulación de estructuras, dispositivos o materiales que tienen al menos una dimensión (o contiene componentes con al menos una dimensión) de aproximadamente 1 a 100 nm de longitud (Duncan, 2011). En un nanómetro caben entre tres y cinco átomos (Figura 2 - 1).

La reducción de tamaño que se alcanza aplicando la nanotecnología, implica como principal consecuencia que se eleve el número de átomos que están en la superficie del material, aumentando considerablemente la reactividad química del mismo, además desde el punto de vista de la mecánica cuántica, se sabe que estas partículas tan pequeñas pasan a comportarse como ondas. (Gasco, 2011).

Existe un sinnúmero de materias primas tanto de origen orgánico como inorgánico (polímeros, metales, cerámicas etc.), con un alto rendimiento y potencialmente viables para la producción de materiales a nano escala.

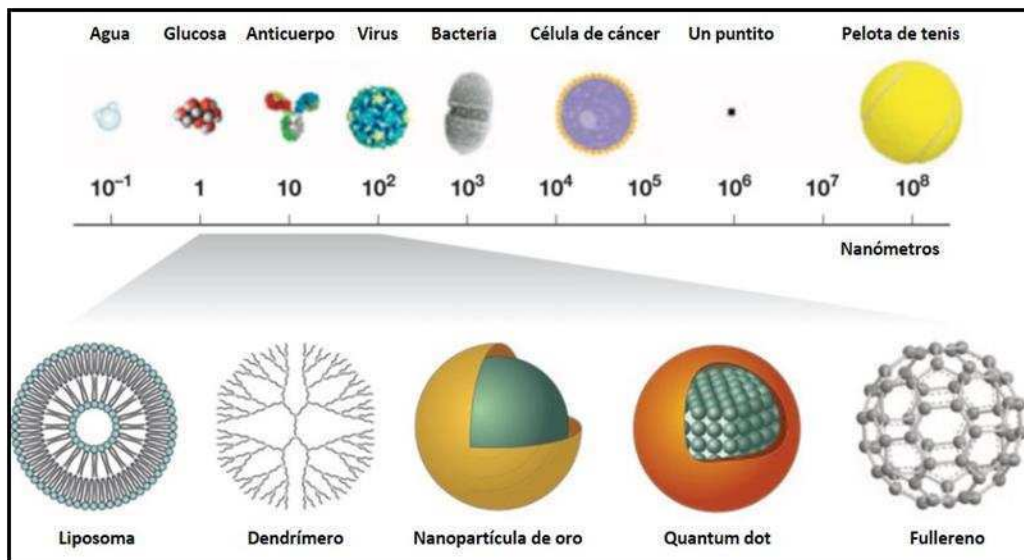


Figura 2 - 1. Escala nanométrica y unidad de medida a la que pertenecen ciertos sistemas. Tomado de García, (2012)

2.1.1 Nanotecnología y sus aplicaciones.

Existen básicamente cinco campos en los que se centra principalmente la nanotecnología (Rodgers, 2010; Guo, 2012):

- optimización de materiales más fuertes, resistentes y ligeros. (por ejemplo: plásticos o metales con nanotubos de carbono, que permitan la fabricación de aviones y vehículos más ligeros, haciendo posible también una reducción en el consumo de combustible).
- tecnología de información y comunicación: procesamiento de datos.
- en medicina: diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como en la administración de fármacos en dosis adecuadas.
- producción de energía renovable, limpia y amigable con el medio ambiente. (por ejemplo aprovechamiento de la energía solar aumentando su eficiencia y disminuyendo el costo).
- alimentación: por una lado se analiza la forma en que los alimentos son producidos, procesados, envasados, transportados y consumidos, todo ello con el fin de lograr trazabilidad e inocuidad de los productos; y por otro posibles riesgos que podría producir este tipo de tecnología en la salud.

Se estima que será a mediados del siglo XXI cuando la nanotecnología alcance su máximo desarrollo y estará completamente incorporada tanto en los procesos industriales así como en las actividades humanas diarias.

2.2 Ácido poliláctico (PLA).

2.2.1 Generalidades.

El ácido poliláctico, mejor conocido por su denominación de PLA es un poliéster alifático, sintetizado a partir del ácido láctico. Diversas son las ventajas de este polímero que atrae a la industria, entre ellas: su renovabilidad, biocompatibilidad, capacidad de procesamiento, y el ahorro energético (Rasal y Janorkar, 2010). Además, ha sido aprobado por los EE.UU. Food and Drug Administration (FDA) para el contacto directo con fluidos biológicos. El ácido poliláctico (PLA), y sus productos de degradación: H₂O y CO₂, no son tóxicos ni cancerígenos para el cuerpo humano.

No obstante, así como el PLA puede ser considerado como un material ecológico y con excelentes propiedades, este presenta muchos inconvenientes al ser confrontado con los requisitos necesarios para ciertas aplicaciones:

- Su degradación, (dependiendo las condiciones del medio, origen del polímero, estructura química, relación de isómeros etc.), puede llegar a ser demasiado lenta. Este proceso a veces tarda varios años, lo cual puede dificultar sus aplicaciones en el área médica así como en el embalaje de alimentos (Auras, y col., 2011; Kaplan, 1998)
- El PLA es un polímero muy frágil, posee menos del 10% de elongación a la rotura. Para aplicaciones que precisen un rendimiento mecánico exigente deberá ser modificado adecuadamente. (Rasal y Hirt, 2009).
- Posee una alta hidrofobicidad (debido a la presencia de grupos CH₃ laterales), lo que podría provocar una respuesta inflamatoria de los tejidos.
- Sus reducidas propiedades de barrera de gas, impiden su acceso completo a los sectores industriales, tales como el área de embalaje (Singh, 2003).

Tomando en cuenta las desventajas anteriormente citadas, así como el alto costo que implica su producción, son altas las probabilidades que este noble polímero no reciba la atención que merece.

Sin embargo consecuentes a la tendencia global, enfocada en reducir el consumo de polímeros que provengan del petróleo, es conveniente el planteo de políticas mundiales y la inversión en el desarrollo de investigaciones encaminadas a la producción de materiales biodegradables con un reducido impacto ambiental. En la Figura 2 - 2, se muestra el ciclo del PLA en la naturaleza.

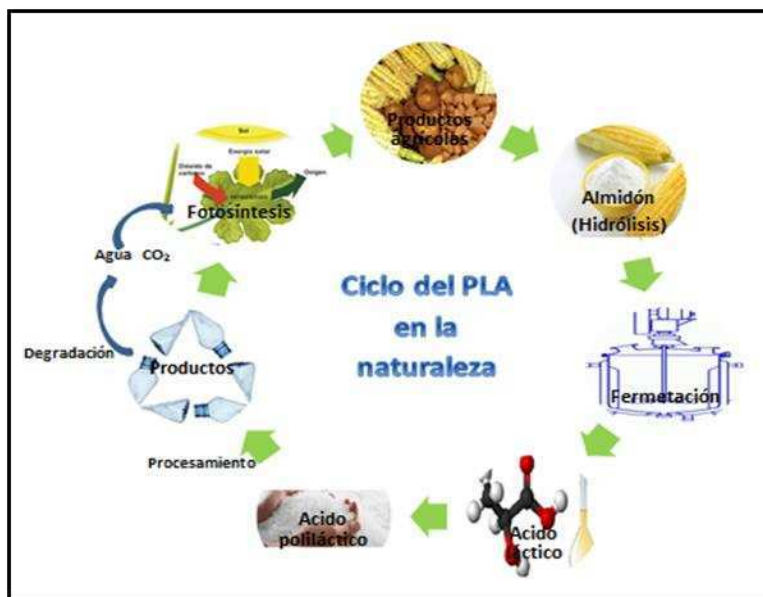


Figura 2 - 2. Ciclo del PLA en la naturaleza. Adaptado de Xiao y col., 2012.

2.2.2 Manufactura de ácido poliláctico.

La piedra angular para fabricación del PLA es el ácido láctico. Esta es una molécula orgánica relativamente sencilla, posee tres carbonos: un carbono central (unido a un grupo alcohol) y dos carbonos terminales (el uno forma parte de un grupo carboxílico y el otro de un grupo metilo). Esta es una molécula quiral que posee dos formas isoméricas ópticamente activas o enantiómeros L (+) ácido láctico y D (-) ácido láctico (ver Figura 2 - 3). La mezcla racémica (cantidades idénticas de estos isómeros) se denomina d,l-ácido láctico. Los seres humanos y otros mamíferos son productores del isómero L, mientras que las bacterias homofermentativas y heterofermentativas son capaces de producir ácido láctico tanto del tipo D, como L.

La estructura estereoquímica del PLA puede ser fácilmente modificada por polimerización de una mezcla controlada de isómeros L o D para dar polímeros amorfos o cristalinos de alto peso molecular (Kaplan, 1998). Según Green (2002), un PLA con más del 93% de la forma L tiene una estructura semi-cristalina, mientras que un PLA que contiene menos del 93% de la forma L tiene una estructura amorfa.

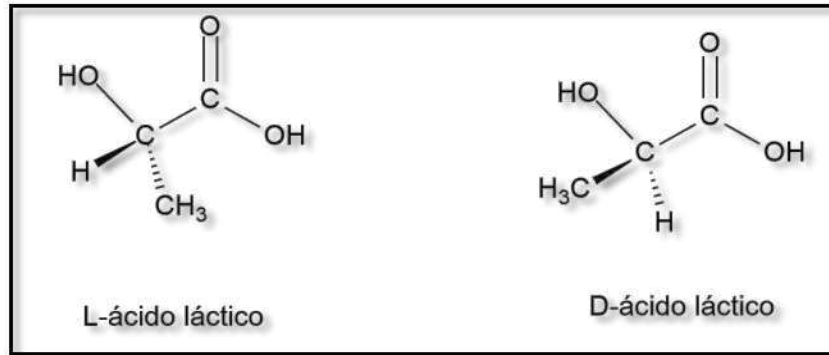


Figura 2 - 3. Enantiómeros del ácido láctico.

2.2.3 Síntesis de PLA.

Convencionalmente se emplean dos métodos, para la conversión de ácido láctico en PLA: *Polimerización directa* y *Polimerización por apertura del anillo (ROP)*.

- Polimerización directa.

El método de polimerización directa (Figura 2 - 4.), permite la manufactura de un polímero de bajo a intermedio peso molecular, esto se da debido a que el agua generada durante el proceso provoca la hidrólisis de las cadenas poliméricas. (Okada, 2002). Para alcanzar mayores pesos moleculares de PLA, empleando este método, es necesario eliminar el agua originada durante la producción, sin embargo, esto requiere altas temperaturas y alto vacío lo que implica un elevado riesgo de oscurecimiento y racemización (Vink y col., 2003)

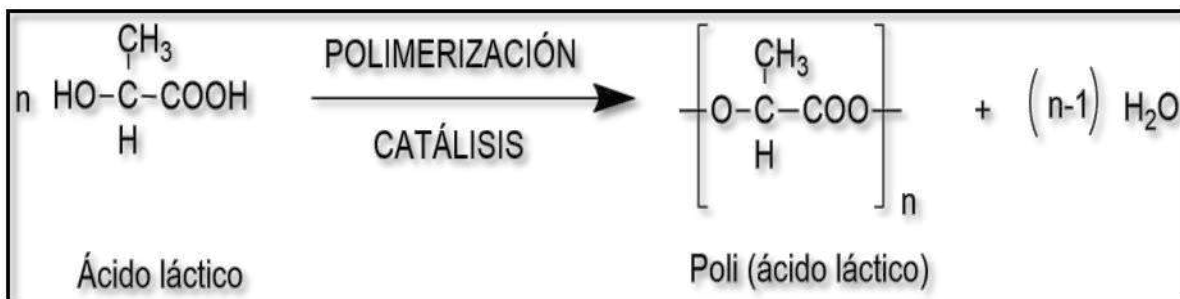


Figura 2 - 4. Polimerización directa.

- Polimerización por apertura del anillo (ROP).

El método de ROP (donde existe una conversión del ácido láctico a su dímero deshidratado: lactida), admite un alto control de la polimerización y proporciona un PLA de estructura y peso molecular definido. Es un método eficaz cuando se desea obtener un PLA de alto peso molecular ($M_w > 100.000$). La desventaja de ROP, radica en que requiere una alta pureza del monómero (lactida), lo cual conlleva a un elevado costo de producción. En la Figura 2 - 5, se esquematiza el método de ROP.

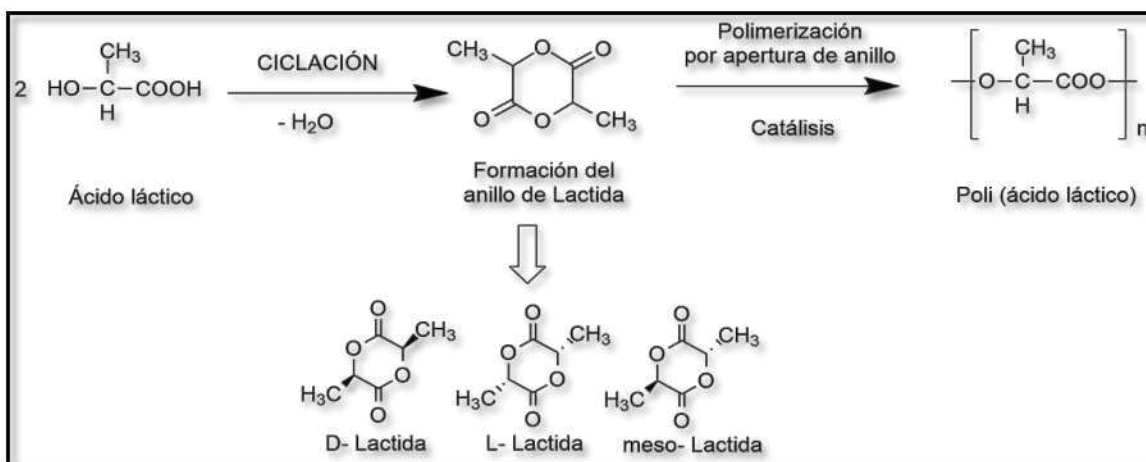


Figura 2 - 5. Polimerización por apertura del anillo.

2.2.4 Propiedades físicas y químicas.

Las propiedades físicas, mecánicas y térmicas del PLA se relacionan íntimamente con su composición, peso molecular, distribución de peso molecular y estereoquímica (Wang, 2015).

Existen cuatro variedades de PLA:

- Ácido poli (D - láctico) (PDLA), es un material cristalino con una estructura de cadena regular.
- Ácido poli (L - láctico) (PLLA), es semicristalino, y también presenta una estructura de cadena regular.
- Ácido poli (D, L- láctico) (PDLLA) es un material amorfo; y
- Meso-PLA proveniente de la meso-lactida.

El contenido de ácido láctico L, tiene un efecto representativo sobre el grado de cristalinidad de PLA, por ejemplo cuando el contenido de ácido L-láctico se reduce del 100% al 92%, la cristalinidad de PLA disminuye de 57% a 32% (Reeve y col., 1994).

PDLA, PLLA y PDLLA son solubles en disolventes comunes como: benceno, cloroformo, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dioxano y otros, pero insolubles en etanol, metanol e hidrocarburos alifáticos y se degradan mediante una simple hidrólisis del enlace éster, incluso en ausencia de una hidrolasa (Xiao y col., 2012).

Dado que el PDLLA, es un polímero amorfo, se suele emplear en dispositivos de liberación de fármacos donde es importante tener una dispersión homogénea de las especies activas dentro de una matriz monofásica. Por otra parte, el PLLA, es más adecuado en aplicaciones en las que se requiere alta fuerza mecánica y dureza, por ejemplo en suturas y dispositivos ortopédicos (Gasco, 2011).

En la Tabla 2 - 1, se detallan algunas propiedades importantes del PLA:

Tabla 2 - 1.

Propiedades del PLA. (Xiao y col., 2012; Wang Y., 2015)

Propiedades	PDLA	PLLA	PDLLA
Estructura cristalina	Cristalino	Semicristalino	Amorfo
Densidad (g/cm ³)	1,248	1,290	1,250
Temperatura de fusión (Tm)/°C	~180	~180	120 - 170
Temperatura de transición vítrea (Tg) °C	50 - 60	55 - 60	43 - 53
Temperatura de descomposición /°C.	~200	~200	185 - 200
Deformación a la rotura (%)	20 - 30	20 - 30	Variable
Resistencia a la rotura (g/d)	4,0- 5,0	5,0 -6,0	Variable
Vida media en solución salina normal a 37°C	4 – 6 meses	4 – 6 meses	2 – 3 meses

2.2.5 Aplicaciones.

Aplicaciones médicas.

La biocompatibilidad, biodegradabilidad e ideales propiedades mecánicas hacen del PLA, un polímero adecuado para ser usado en un sinnúmero de aplicaciones en el campo biomédico. Sin embargo, este tipo de biomateriales deben cumplir con una serie de requisitos mínimos (ver Tabla 2 - 2), que aseguren su correcto desempeño y no vulneren la salud del individuo. Entre las aplicaciones más comunes se encuentran:

- Asistencia operatoria: conexión, cierre y separación (anastomosis intestinal y vascular, fijación de huesos, cubierta de heridas, hemostasia, embolización vascular, extensiones del ligamento, reconstrucción de tendones y stents vasculares, etc.)
- Curación de lesiones: cicatrización de heridas, crecimiento del tejido, reconstrucción de órganos.
- Liberación controlada: a través de la encapsulación de sustancias para ser liberadas de forma gradual en el organismo.

Tabla 2 - 2.

Requisitos de biomateriales (Ikada y Tsuji, 2000).

Requisito	Detalle
No tóxico (Biológicamente seguro)	No pirogénico, no hemolítico, no mutagénico, no alérgico, no cancerígeno, no teratogénico
Efectivo	Funcionalidad, rendimiento, durabilidad
Esterilizable	Autoclave, calor seco, irradiación, óxido de etileno
Biocompatible	Interfacial, mecánica y biológicamente

Aplicaciones textiles.

Si bien el poliéster más empleado en la fabricación de fibras y tejidos, es el polietilentereftalato (PET), su uso se ha visto restringido debido a la necesidad de complejos procesos para su reciclado y ausencia de biodegradabilidad. A partir del PLA, pueden ser industrializadas diversos tipos de fibras tales como: monofilamentos, multifilamentos, filamentos continuos a

granel, fibras discontinuas, etc., que dependiendo su destino final son procesadas, obteniéndose así, materiales con propiedades mecánicas deseables tales como: alta tenacidad, buena resistencia y una adecuada estabilidad dimensional (Auras y col., 2011), además de una baja densidad, bajo índice de refracción y una alta resistencia a la luz ultra violeta (UV).

En la Tabla 2 - 3, se observan algunas propiedades diferenciales entre las fibras textiles provenientes de PLA y PET.

Tabla 2 - 3

Comparacion de las fibras de PLA y PET. (Auras y col., 2011)

Propiedades	PLA	PET
Peso especifico	1,25	1,34
Índice de refracción	1,40	1,58
Módulo de flexión (gf cm ² /cm)	0,068	0,122
Módulo de corte (gf /(cm deg))	0,64	1,53
<i>Cos θ</i> (<i>θ</i> : ángulo de contacto)	0,254	0,135
Absorción de agua (% peso)	0,5	0,3
Tiempo de combustión (min)	2	6
Generación de humo (m ³ /Kg)	63	394
Calorías de combustión (Kcal/kg)	4500	5500
Bacteriostático	≥5,9	<2,2
Bactericida	≥3,1	<0
Retención de tenacidad (%) después de 300h	95	60
Retención de enlongación (%) después de 100h	100	70

Aplicaciones en el embalaje y otras industrias.

Son diversas las aplicaciones de los materiales de embalaje constituidos por polímeros biodegradables. Comprende aquellos productos que luego de ser consumidos son inmediatamente desechados, es decir su ciclo es relativamente corto, tal es el caso de los materiales destinados al envasado de alimentos. Por otro lado existen aplicaciones que requieren mayores períodos de funcionalidad siendo necesario que las propiedades iniciales de los polímeros se mantengan en el tiempo, por ejemplo envases de artículos electrónicos, envases de cosméticos, etc. (Niaounakis, 2015).

A pesar de ser el PLA, un polímero con potenciales aplicaciones en el envasado de alimentos, no sería correcto generalizar su uso en esta área. No existe un envase ideal para todos los sistemas alimenticios, es necesario tener un conocimiento previo de las interacciones entre el material de embalaje y el alimento a envasar. Además, es importante prever como el material reaccionará a condiciones tales como: manipulación, transporte y tratamientos térmicos (calentamiento, enfriamiento, congelación, etc.).

Siracusa, y col., (2012), determinaron que la resistencia mecánica de las películas de PLA, son relativamente bajas comparadas con la resistencia mecánica de películas de polietileno de baja densidad y polietileno de alta densidad. Sin embargo comparado con películas provenientes de PET y poliestireno (PS), que constituyen polímeros ampliamente usados en la industria de alimentos, las propiedades mecánicas son similares. Así mismo observaron en varios grupos de películas de PLA valores de T_m (temperatura de fusión) y T_g (temperatura de transición vítrea) menores, que los registrados para películas de PET y PS, lo que indica que el PLA es un material adecuado para el termosellado y el procesamiento térmico.

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, según estudios realizados por Mutsuga, y col., (2008), acerca de la migración de componentes de materiales *food-contact*, cuya matriz constituida por PLA se encuentra sometida a distintas condiciones, los autores plantean que pequeñas cantidades de ácido láctico, migran de la matriz polimérica hacia el medio, y sería este ácido orgánico el que provee de las propiedades antibacteriales y antifúngicas, que distinguen al PLA de otros polimeros biodegradables. Hasta ahora, la mezcla de PLA con polímeros sintéticos, es la mejor alternativa para mejorar sus propiedades y disminuir sus limitantes.

En el campo de la agricultura, diversos son las investigaciones que plantean el uso de matrices de PLA para la encapsulación y liberación controlada de herbicidas, antibacterianos, anti fúngicos y oligoelementos deficitarios. Con el uso de estas tecnologías se busca: optimizar el control del crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta; mejorar el control de malezas; lograr una disminución de la contaminación ambiental por el uso de herbicidas; así como disminuir los volúmenes excesivamente altos de material plástico no biodegradable usado convencionalmente.

Grandes empresas, que lideran el mercado de la electrónica, han incluido en el diseño de sus dispositivos, accesorios manufacturados exclusivamente con PLA, o incluyendo otros compuestos (aditivos u otros polímeros), que mejoren la resistencia térmica, resistencia al impacto, retardo de la llama u otras características significativas. Entre los productos más representativos se encuentran: carcasas para computadoras y teléfonos móviles, enchufes, interruptores, materiales de aislamiento eléctrico para cables de alta tensión, sustratos biodegradables para placas de circuito impreso, estos últimos constituidos de una mezcla PLA/lignina, etc.

En la Figura 2 - 6, se esquematiza una clasificación de materiales manufacturados en base a PLA.

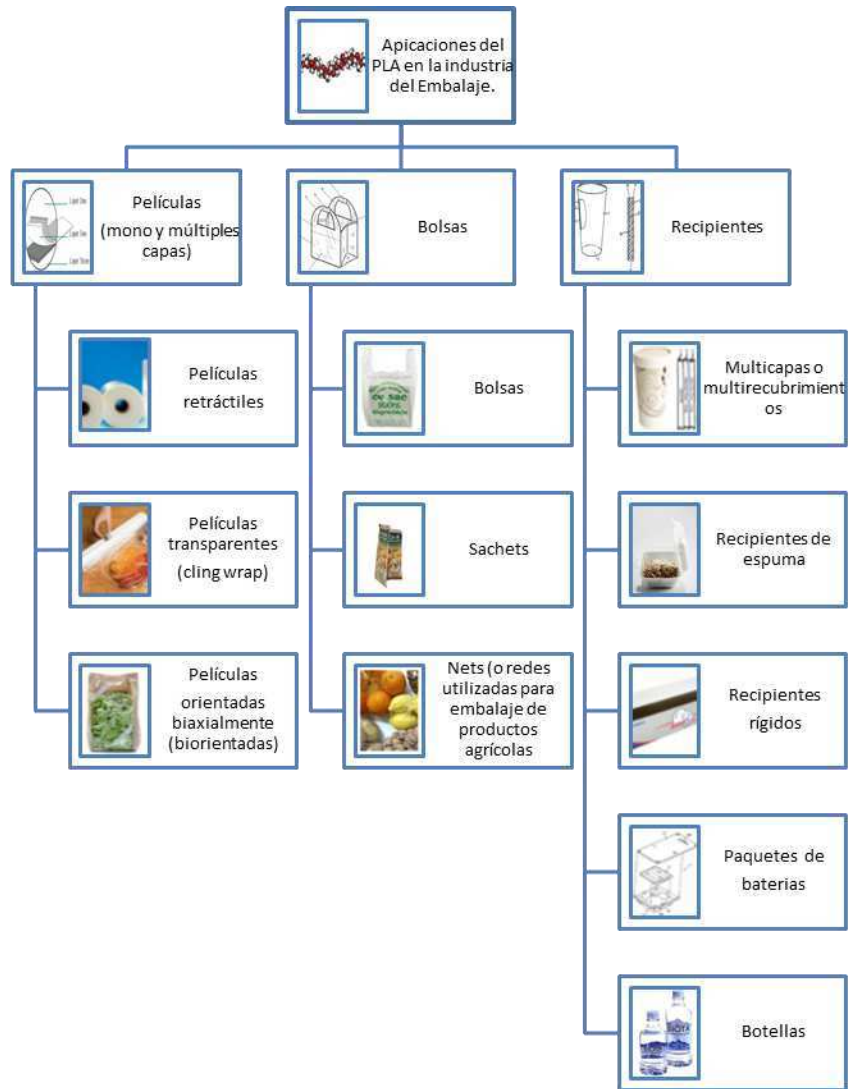


Figura 2 - 6. Clasificación de materiales manufacturados con PLA.

2.3 Nanoencapsulación

La nanoencapsulación de fármacos o moléculas bioactivas comprende la formación de partículas coloidales sólidas de tamaño nanométrico (1 a 100 nm), en cuyo interior se encuentra el ingrediente activo, el cual puede estar atrapado, encapsulado, adsorbido o químicamente unido (Jawahar y Meyyanathan, 2012). Las nanopartículas se pueden emplear para liberación de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas.

2.3.1 Tipos de nanopartículas.

El término nanopartícula es usado comúnmente tanto para nanoesferas, como para nanocápsulas (Figura 2 - 7), pero dependiendo el proceso utilizado se obtendrá alguna de ellas. Las nanoesferas son partículas matrices, cuya masa es sólida y el principio activo puede estar disperso o adsorbido a la superficie de la esfera o encapsulado uniformemente dentro de la partícula (Rao y Geckelera, 2011).

Las nanocápsulas son sistemas vasculares que actúan como un tipo de reservorio, y el principio activo se confina en una cavidad constituida por un núcleo líquido (aceite o agua), rodeado por una membrana polimérica. En este caso la sustancia activa se disuelve en el núcleo interior, sin embargo el principio activo también puede estar adsorbido a la superficie de la cápsula. (Kumari y col., 2010; Jawahar y Meyyanathan., 2012).

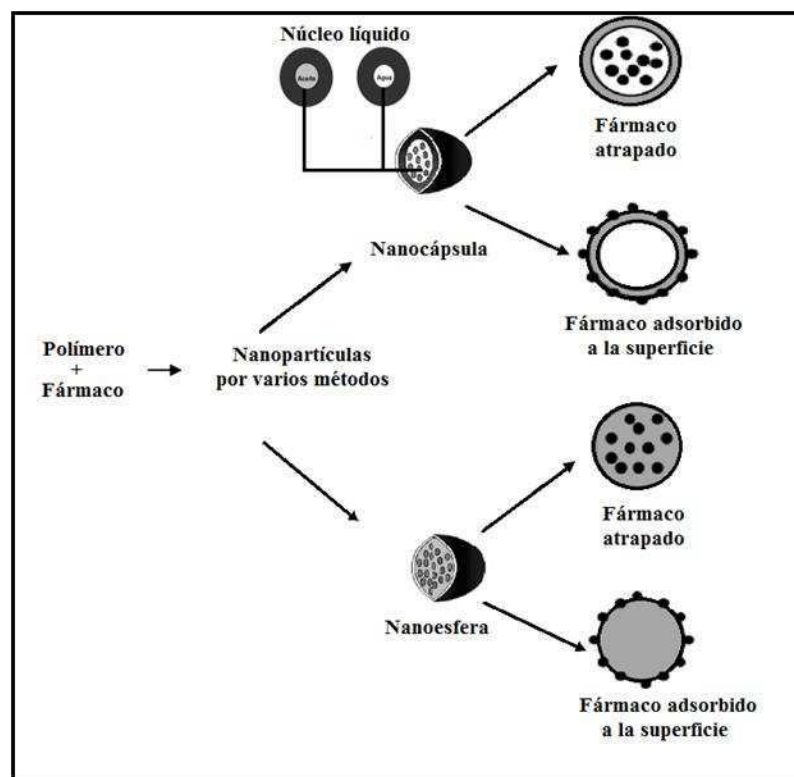


Figura 2 - 7. Tipo de nanopartículas biodegradables: Nanocápsulas y Nanoesferas. La moléculas del fármaco son atrapadas dentro o adsorbidas en la superficie. Tomado de Kumari, Kumar Yadav, y Yadav, 2010.

2.3.2 Nanopartículas poliméricas (NPP).

En líneas generales existen dos grupos de materiales a partir de los cuales puede elaborarse nanopartículas:

- Polímeros hidrofílicos naturales. Dentro de los cuales se encuentran las proteínas (albúmina, lecitina, legumina, etc.) y los polisacáridos (alginato, quitosano, dextrano, agarosa, etc.).
- Polímeros hidrófobos sintéticos. Divididos en dos grupos: el primer grupo incluye poliésteres como: poli- ϵ -caprolactona (PCL), ácido poli-láctico-co-glicólico, PLA, PS y el segundo grupo incluye: policianoacrilatos de alquilo, poli-isobutilcianoacrilato, policianoacrilatos de butilo, polimetacianoacrilatos.

Los sistemas de transporte con base en materiales poliméricos en forma de nanopartículas, deben cumplir con ciertos criterios (Jawahar y Meyyanathan, 2012):

- Fácil de sintetizar y caracterizar
- Económico
- Biocompatible
- Biodegradable
- No inmunogénico
- No tóxico
- Solubles en agua.

Debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja inmunogenicidad los poliésteres son un atractivo grupo para el desarrollo de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada. Además han demostrado una muy buena interacción con fármacos y moléculas bioactivas. (Formiga, y col., 2009)

2.3.3 Métodos de preparación de Nanopartículas

Actualmente existen una variedad de métodos destinados a la síntesis de nanopartículas poliméricas (NPP), dependiendo de las necesidades, aplicaciones y tipo de compuesto a ser encapsulado (Kumari y col., 2010). La obtención de NPP puede originarse por un lado a partir de

una macromolécula o polímero preformado tales como: PLA, PCL, ácido polihidroxibutírico (PHB), etc.; y por otro, a partir de reacciones de polimerización directa de monómeros.

Las diferentes técnicas de preparación para NPP se muestran en la Figura 2 - 8.

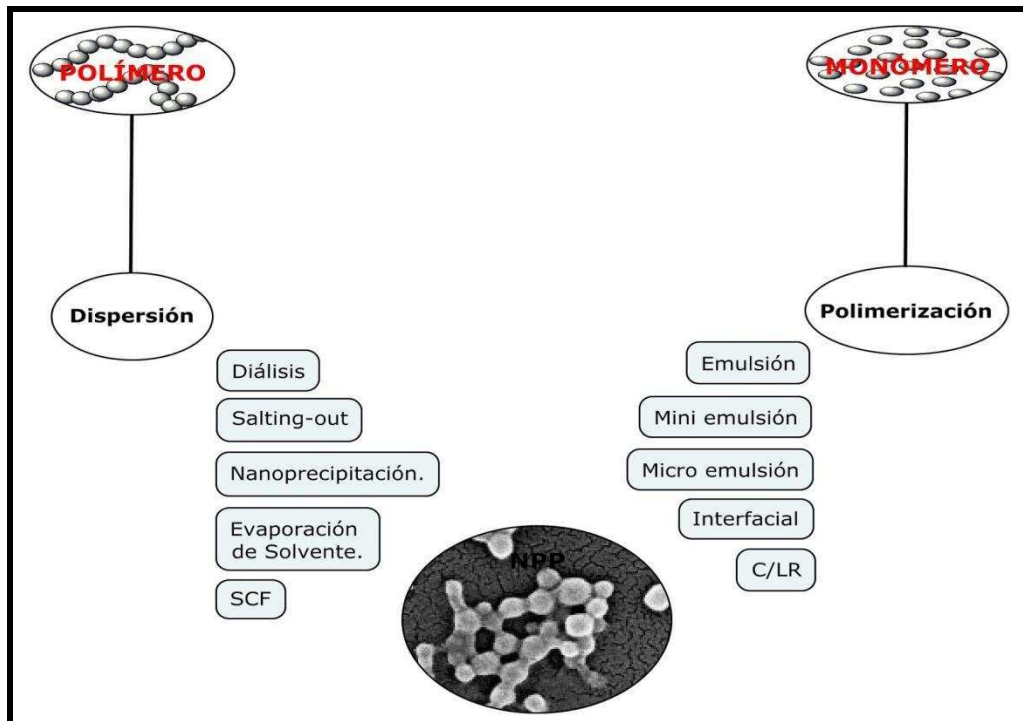


Figura 2 - 8. Técnicas de preparación de Nanopartículas poliméricas.

Para realizar una selección apropiada del método de preparación de NPP, se toman en consideración diversos factores, entre ellos:

- Tipo de sistema polimérico (libre de aditivos o reactivos tales como tensioactivos o trazas de solventes orgánicos.)
- Requerimiento de tamaño.
- Área de aplicación.

Cada método dará lugar a NPP de diferentes características, incluso su habilidad para interactuar con los principios activos contenidos en los fármacos será fuertemente influenciada por los procesos de preparación.

2.3.4 Método de emulsificación y evaporación del solvente.

El método de Emulsificación y evaporación del solvente comprende dos pasos:

El *primer paso* requiere la emulsificación de la solución polimérica (fase orgánica) en una fase que contiene el agente tensioactivo o estabilizante (fase acuosa). La fase orgánica se disuelve en un disolvente apropiado (por ejemplo: acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, etc.), y el compuesto activo se encuentra aquí disuelto y dispersado. Luego esta fase interna orgánica de la emulsión, es añadida sobre la fase externa acuosa.

Durante el *segundo paso* el solvente del polímero es evaporado por un aumento de la temperatura bajo presión o por agitación continua, induciendo a que precipite el polímero como nanoesferas y el compuesto activo se encuentra finamente disperso en la matriz del polímero. En la Figura 2 - 9, se esquematiza este método.

Las nanopartículas son recogidas por centrifugación y como paso final, la suspensión de las nanopartículas formadas se somete a una serie de lavados con agua purificada para eliminar el exceso de agente estabilizante.

Los polímeros usados con frecuencia son: ftalato acetato de celulosa, etilcelulosa, PLA, PCL y PHB.

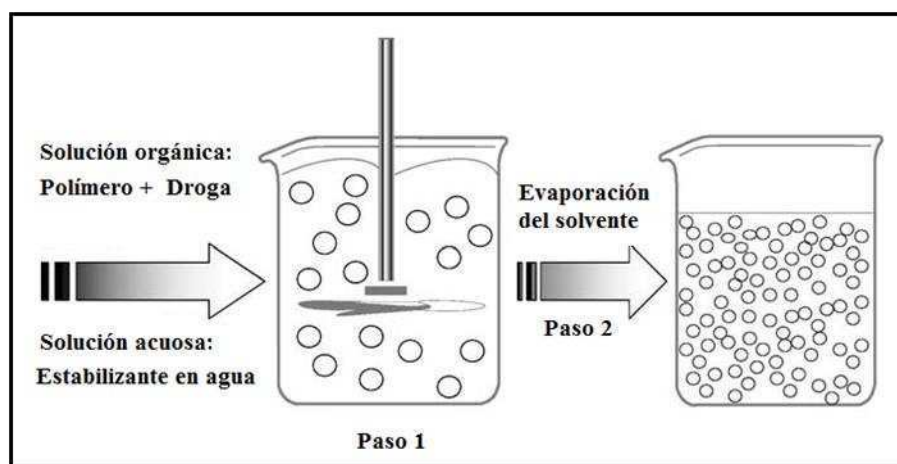


Figura 2 - 9. Esquema del método emulsificación evaporación del solvente. Tomado de: Pinto, Neufeld, Ribeiro, y Veiga, 2006.

Los métodos basados en la emulsión y evaporación del solvente, son relativamente sencillos. Sin embargo para la obtención de nanopartículas por este método es necesario realizar un ajuste de las variables más representativas. A continuación se realiza una breve revisión de los parámetros más importantes que influyen sobre las propiedades de las nanopartículas:

- **Solventes**

Entre los principales criterios que debe cumplir los solventes se encuentra: disolver adecuadamente el polímero, ser pobremente soluble en la fase continua, alta volatilidad, bajo punto de ebullición y baja toxicidad. Sin embargo, Li, Rouaud, y Poncelet (2008), demostraron que la inmiscibilidad en agua de un disolvente no es un prerrequisito absoluto para hacer una emulsión y sugiere algunas técnicas que minimizan este inconveniente:

1. La solución acuosa se encuentre previamente pre-saturada con disolvente (Bahl and Sah, 2000);
2. La fase dispersa puede estar emulsificada primero en una pequeña cantidad de solución acuosa; y después de la formación de gotas esta emulsión se vierta en una gran cantidad de solución acuosa (Freytag y col., 2000);
3. La fase dispersa puede estar emulsificada en una pequeña cantidad de solución acuosa, la solución se agita y el disolvente se evapora dando lugar a la solidificación de las nanoesferas (Sah, 1997).

- **Surfactantes**

La función de estos compuestos es la de formar una capa fina alrededor de las gotas de aceite, polímero, fármaco o principio activo, con el objetivo de reducir la tensión superficial de la fase continua evitando la coalescencia y la aglomeración de gotas así como para estabilizar la emulsión. Todos estos aditivos (alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), alginatos, gelatinas, metil celulosa, lecitina, etc.), son ampliamente usados y ejercen una fuerte influencia en el tamaño y forma de las partículas coloidales resultantes e incluso en la velocidad de liberación del fármaco.

El aumento de la concentración de surfactante puede reducir el tamaño de las nanoesferas. Sin embargo, debido a la concentración micelar crítica, la tensión superficial no puede disminuir infinitamente. Cuando la concentración del surfactante alcanza un cierto nivel, la superficie de la

solución está completamente cargada. Cualquier otra adición de surfactante se conformará como micelas y la tensión superficial de la fase acuosa no disminuirá más (Li y col., 2008).

- **Concentración del polímero, velocidad de agitación y la cantidad de fase acuosa.**

La cantidad de polímero disuelto en la fase orgánica juega un papel importante en las características de las nano y micropartículas. A pesar de esto, no hay suficientes datos publicados al respecto. Freitas y col., (2005), investigaron la influencia de la concentración del polímero y cubrieron un intervalo de concentraciones comprendidas entre 0,05% y 0,15% (w/v) de PLA en la fase orgánica. Encontrando que el diámetro de la partícula incrementa con altas concentraciones del polímero. Sin embargo, estos mismos investigadores también han encontrado que existe una fuerte y determinante relación entre la cantidad de PLA, el volumen de la fase acuosa y la velocidad de agitación sobre el tamaño de la partícula, por ejemplo al aumentar el volumen de la fase acuosa, el tamaño de la partícula también se incrementa (Lassalle y Luján Ferreira, 2007).

- **Principio activo**

Este método puede ser aplicado tanto a principios activos liposolubles como hidrosolubles, registrándose altas eficiencias de encapsulación. Entre los compuestos que se han encapsulado con esta técnica, están: albúmina, testosterona, praziquantel, ácidos nucleicos, haloperidol, clonazepam, sulfametoxazol, loperamida, ciclosporina A, etc. (Pinto y col., 2006; Formiga, y col., 2009; Lal Pal y col., 2011)

2.4 Antioxidantes.

Los antioxidantes de frutas, vegetales y bebidas juegan un rol importante en la salud humana, su potencial acción está enfocada en la reducción de aquellas enfermedades que actualmente más afectan a la población mundial (enfermedades cardiovasculares, tumorales y neurodegenerativas).

Antes de hacer una breve descripción sobre antioxidantes, es necesario definir algunos términos importantes en este tema:

- *Radical libre*: especie (átomo, molécula o ión) que contenga por lo menos un electrón desapareado en su orbital más externo, y que sea a su vez capaz de existir en forma independiente.
- *Especie reactiva*: se denomina con este término a todas aquellas especies cuya actividad se encuentra centralizada en un átomo específico (oxígeno, cloro, nitrógeno, etc.), y pueden o no ser radicales libres. En el caso de las especies reactivas que actúan sobre el oxígeno estas se denominan ROS, y para el nitrógeno RNS.
- *Antioxidantes*: compuestos que retrasan, controlan o disminuyen las reacciones de oxidación de un sustrato oxidable, actuando como un agente reductor.

2.4.1 Mecanismos de acción.

Existen diferentes mecanismos de acción de los antioxidantes:

- *Interacción directa con especies reactivas*, actuando como: estabilizadores, apagadores o “scavengers” de radicales libres. La estabilización de radicales libres por este mecanismo puede efectuarse de tres formas:
 - mediante la cesión de un electrón a la especie reactiva, o también denominado SET (Single electron transfer),
 - por transferencia directa de un átomo de hidrógeno, es decir un electrón con su protón, denominándose para este caso: HAT (Hydrogen atom transfer); y,
 - por adición directa del radical libre a su estructura.

Si bien estos mecanismos implican la conversión del antioxidante en radical libre y su posterior oxidación, la reactividad producida será baja o nula para el entorno.

- Inhiben la expresión, síntesis o actividad de enzimas pro oxidantes tales como: óxido nítrico sintetasa, ciclooxigenasa, xantino oxidasa, NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa, relacionadas con la generación de especies reactivas (RNS y ROS).
- Prevención de la formación de especies reactivas dependientes de metales (como agentes quelantes).
- Activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes, tales como: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, entre otras, gracias a

compuestos inductores de enzimas como polifenoles, curcuminoides, isotiocianatos, etc. (INTA, 2011)

Una sobreproducción de ROS o RNS en los sistemas biológicos, da lugar a un desbalance entre la formación de ROS o RNS y los mecanismos de defensa antioxidante, lo que resulta en modificaciones químicas del ADN celular, proteínas o lípidos. Este proceso conocido como estrés oxidativo o nitrosativo (según sea oxígeno o nitrógeno la especie reactiva), ha sido asociado con el proceso de envejecimiento, así como el inicio o desarrollo de un gran número de enfermedades humanas. (Wojcik, Burzynska-Pedziwiatr, y Wozn, 2010)

2.4.2 Antioxidantes sintéticos

Los antioxidantes sintéticos son producidos químicamente y generalmente considerados como “seguros”. Son ampliamente utilizados por la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia, debido a su alto grado de estabilidad, eficacia y ventaja económica.

Estos antioxidantes se dividen de acuerdo a su mecanismo de acción en:

- primarios: aquellos que interaccionan con especies reactivas y los que actúan como agentes quelantes; y,
- secundarios: aquellos que actúan descomponiendo hidroperóxidos en productos finales estables.

Los antioxidantes sintéticos de estructura molecular fenólica (ver Figura 2 - 10), son los más comercializados. La presencia de estructuras como anillos conjugados y grupos hidroxílicos permite a los compuestos fenólicos actuar como secuestradores y estabilizadores de radicales libres. Los grupos carboxílicos y carbonílicos en numerosos compuestos fenólicos inhiben la rancidez oxidativa por quelación de metales. Entre los antioxidantes sintéticos de mayor consumo encontramos: ter butil hidroquinona (TBHQ), butil hidroxí anisol (BHA), butil hidroxí tolueno (BHT), y los galatos de: propilo (PG), dodecilo (DG), octilo (OG), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), etc.

El BHA y BHT, tienen un mayor uso en la industria alimentaria, debido a que poseen una alta efectividad para el control de la oxidación en la grasa animal, además se ha demostrado tienen un efecto sinérgico.

Estudios farmacológicos y toxicológicos sugieren la posibilidad que los antioxidantes sintéticos presenten efectos tóxicos sobre el organismo y pueden llegar a ser promotores de algunos tipos de cáncer, sin embargo estas aseveraciones aún están en estudio. (Venkatesh y Sood, 2011).

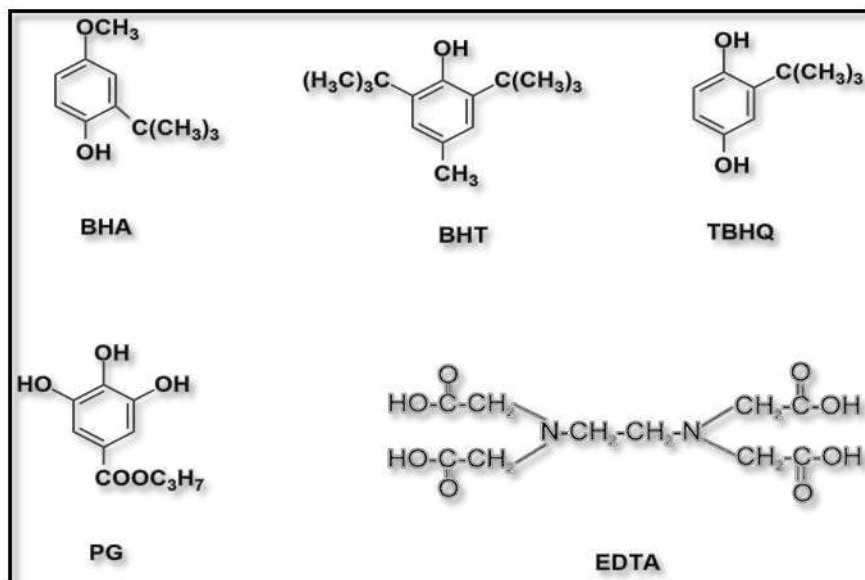


Figura 2 - 10. Antioxidantes sintéticos.

2.4.3 Antioxidantes Naturales

Existe una tendencia creciente en la búsqueda, caracterización y uso de antioxidantes naturales, como respuesta al interés de los consumidores por la ingestión de productos saludables, ecológicos, libres de sustancias químicas y que preserven el equilibrio medio ambiental. Aunado a ello, la alerta latente sobre la toxicidad y efectos cancerígenos de algunos antioxidantes sintéticos en animales en altas concentraciones, impulsan la búsqueda de métodos alternativos con el fin de remplazar estos compuestos sintéticos por antioxidantes de origen natural (Sahidi, 2015).

Los antioxidantes naturales se originan principalmente en las plantas, donde son sintetizados en grandes cantidades como parte de su metabolismo secundario y muchos de estos

compuestos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. El constante estrés oxidativo al que se encuentran sometidos los organismos vegetales ya sea por parte de radicales libres, ROS, y pro-oxidantes generados tanto de forma exógena (calor y luz) como endógena (H_2O_2 y metales de transición), han permitido que los tejidos vegetales desarrollen sistemas antioxidantes para controlar radicales libres, catalizadores de oxidación de lípidos, productos intermedios de oxidación y productos secundarios de degradación (Brewer, 2011). Estos compuestos antioxidantes incluyen polifenoles, carotenoides y vitaminas con acción antioxidante (ver Figura 2 - 11).

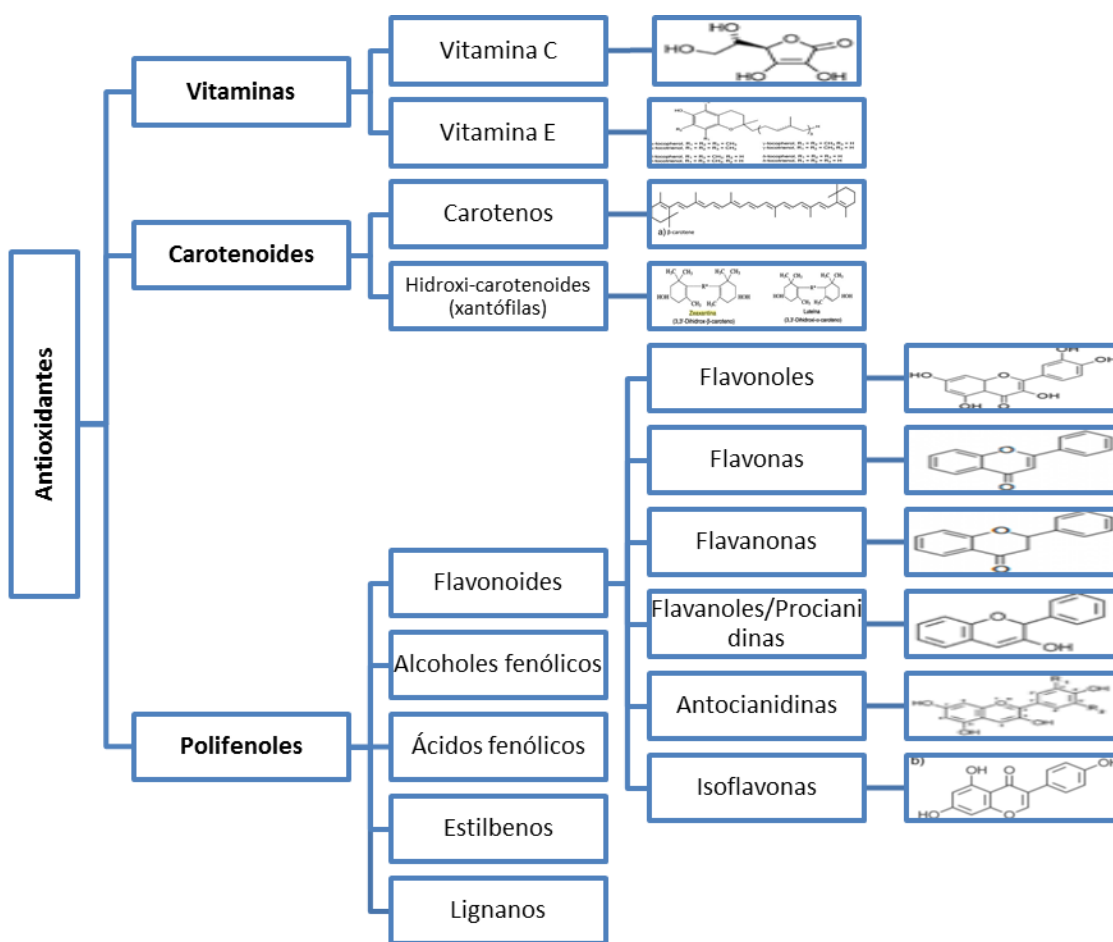


Figura 2 - 11. Antioxidantes naturales. Adaptado de Oroian y Escriche, 2015.

Del amplio grupo de antioxidantes de origen natural presentado en la figura 2 -11, detallaremos algunas características de los polifenoles, que representan nuestro grupo de interés.

Polifenoles

En la actualidad existen cerca de 8000 estructuras fenólicas que han sido reportadas. Los polifenoles se definen principalmente a partir del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: flavonoides, ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), alcoholes fenólicos, estilbenos, lignanos.

La biosíntesis de los polifenoles tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos. La ruta del ácido siquímico permite la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetato, este es el caso de los flavonoides (Quiñones, Miguel, y Aleixandre, 2012).

Los polifenoles podrían actuar mediante mecanismos como el SET y HAT, y los productos de reacción de los dos mecanismos son: especies inofensivas, radicales oxidados, radicales catiónicos y especies energéticamente estables, (Leopoldini y col., 2011).

Todos los polifenoles han mostrado evidencia en la prevención de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales una vez oxidadas se acumulan en las paredes interiores de las arterias, aumentando el riesgo de enfermedad cardíaca. Además, se han encontrado que algunos flavonoides evitan la oxidación de enzimas, preservando así su función.

Flavonoides.

Es la subclase de polifenoles más abundante del reino vegetal. Son compuestos de bajo peso molecular, que comparten un esqueleto común difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A y C se enumeran con números ordinarios y el anillo B con números primos (ver Figura 2 - 12). La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B.

El número, posición de los grupos hidroxilos y los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos), permite clasificarlos en otros subgrupos, tales como: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Quiñones y col., 2012).

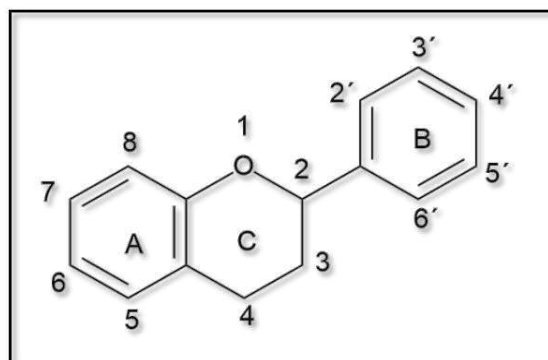


Figura 2 - 12. Estructura química de los flavonoides.

Alcoholes fenólicos

Dentro de los alcoholes fenólicos encontramos: 2-feniletanol, 3,4-dihidroxifeniletanol, también llamado hidroxitirosol y 2-(4-hidroxifenil)etanol también llamado tirosol. El tirosol e hidroxitirosol (Figura 2 - 13), son dos importantes o-difenoles presentes en las aceitunas, alpechín y aceite de oliva (Oroian y Escriche, 2015).

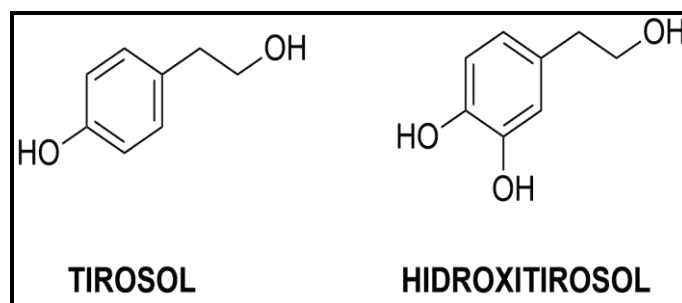


Figura 2 - 13. Alcoholes fenólicos.

Estilbenos

Estos compuestos se encuentran estructurados por dos anillos aromáticos unidos por un puente eteno, y se presentan en monomérica y oligomérica. Son moléculas cuya presencia se asocia a la resistencia de los tejidos vegetales a enfermedades fúngicas tales como las producidas por el hongo *Botrytis cinérea*, u otros factores como irradiación UV.

Uno de los estilbenos más importantes es el monómero resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno) (ver Figura 2 - 14), siendo los tejidos de la piel de la uva, una importante fuente de este compuesto (Sun y Spranger, 2005).

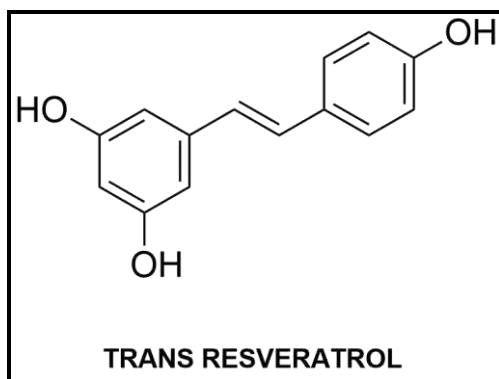


Figura 2 - 14. Estilbenos.

Lignanos

Son estructuras diméricas de unidades fenilpropanoides (C6-C3) unidas por los carbonos centrales de sus cadenas laterales. En las plantas, los lignanos actúan como sustancias de defensa contra agentes patógenos, por ejemplo el pinoresinol (ver Figura 2 - 15) es un constituyente de la resina de *Forsythia spp* y se forma cuando la planta está herida siendo tóxico para los microorganismos. El malognol (otro representante de este grupo) inhibe el crecimiento de bacterias y hongos (Shahidi y Naczka, 2003).

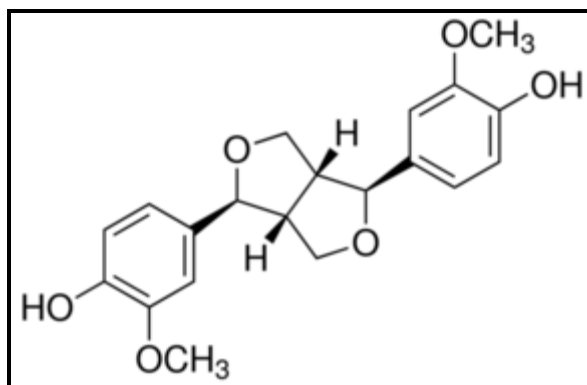


Figura 2 - 15. Lignano pinoresinol.

Ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas cuya estructura consiste en un anillo de benceno unido a un grupo carboxílico o a un ácido propenoico.

Aquellos que se unen al grupo carboxílico, se denominan derivados del ácido benzoico (hidroxibenzoicos) y los que se unen al ácido propenoico, se denominan derivados del ácido cinámico (hidroxicinámico), siendo este último el más común.

Los derivados del ácido hidroxibenzoico se encuentran principalmente en forma de glucósidos tales como los ácidos: p-hidroxibenzoico, vanílico y 3,4-dihidroxibenzoico (protocatecuato). Los ácidos hidroxicinámicos más abundantes y comunes en la naturaleza son: cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico, que con frecuencia se producen en los alimentos como ésteres derivados simples unidos al ácido quínico o glucosa. El ácido hidroxicinámico derivado más conocido por su alto potencial como antioxidante es el ácido clorogénico, que se forma partir de los ácidos cafeico y quínico (Shahidi y Naczk, 2003; Oroian y Escriche, 2015; Mattila y Hellström, 2007).

2.5 Batata (*Ipomea batata*).

2.5.1 Generalidades

La batata (*Ipomoea batatas L.*) es una planta dicotiledónea, perenne, probablemente la única de las 500 especies del género *Ipomoea* que produce raíces tuberosas comestibles. Se supone que su cultivo se originó hace 5.000 años en Centroamérica (Huang y Sun, 2000).

Este cultivo, es uno de los alimentos con mayor repunte en cuanto a su producción a nivel mundial. Su consumo va en aumento especialmente en los países Orientales. China lidera la producción mundial con aproximadamente 100 millones de toneladas (obteniendo además los más altos rendimientos) y un consumo per cápita de 23,81 Kg/año, al 2013.

En Argentina, según datos registrados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el 2014 existió un área cosechada de 25.780 hectáreas, y una producción de aproximadamente 390 mil toneladas. Según este mismo organismo el consumo per cápita al 2011 fue de 8,8 Kg/año.

Las variedades cultivadas dependen de la zona y sus preferencias de consumo, así por ejemplo: en la zona pampeana y en Cuyo hay un predominio del cultivo de variedades de piel morada y pulpa amarilla como Morada INTA y Arapey. En el NEA (Noreste Argentino), los cultivares de piel y pulpa que van de tonalidades cremas a anaranjadas, como Okinawa 100 y GEM, son los predilectos. En el NOA (Noroeste Argentino), hay una mayor producción de los

cultivares de pulpa blanca como la Santafesina Blanca y Famaillá, sin embargo existe una producción minoritaria enfocada al cultivo de variedades de piel roja y pulpa crema (Morada INTA) (Cusumano y Zamudio, 2013).

2.5.2 Taxonomía y morfología

Familia: Convolvulaceae

Género: *Ipomoea*

Especie: *batatas*

Otros nombres: boniato, camote, papa dulce, chaco, sweet potato.

La batata es una especie generalmente autoincompatible y la mayoría de sus caracteres son de herencia cuantitativa y de baja heredabilidad por ello utiliza la polinización cruzada como medio de reproducción. El cultivo tiene gran capacidad de mejora debido a su alto nivel de diversidad (Zhang y col., 2000, 2004).

2.5.3 Descripción botánica.

Es una planta herbácea y perenne, cultivada como una planta anual. Generalmente es de hábito rastrero con tallos que se extienden horizontalmente sobre el suelo desarrollando un follaje relativamente bajo.

- **Raíz.** Se diferencian dos tipos de raíz: fibrosas y reservantes o de almacenamiento. Las raíces fibrosas absorben nutrientes y agua, y sostienen a la planta, y las raíces reservantes almacenan los productos fotosintéticos. Los cultivares de batata de pulpa de color tienen altas concentraciones de β -caroteno.
- **Tallo.** Es de hábito rastrero con diferentes dimensiones de longitud y grosor de acuerdo a la variedad. La superficie puede ser glabra o pubescente, de color verde, púrpura o rojizo, con una o dos yemas por axila foliar.
- **Las hojas** se distribuyen en espiral en los tallos y según el cultivar, varían ampliamente en tamaño, largo del pecíolo y forma. Su color es por lo común verde, pero a veces se presenta una pigmentación púrpura, especialmente a lo largo de las venas y pueden tener diversos grados de pubescencia.

- **Las flores** se encuentran agrupadas en inflorescencias del tipo de cima bípara, con raquis de hasta 20 centímetros de longitud, de forma acampanulada y presentan colores que varían de un verde pálido hasta un púrpura oscuro.
- **Fruto.** Es una pequeña cápsula redondeada de aproximadamente 3 a 7 milímetros de diámetro. Cada cápsula contiene de 1 a 4 pequeñas semillas y cada una tiene entre 2 a 4 milímetros de diámetro, de forma irregular a redondeadas negras a marrones y el peso de mil semillas varía entre 20 a 25 gramos.

La batata variedad Arapey (ver Figura 2 - 16), cuya piel será utilizada en nuestro estudio, es de origen uruguayo, de ciclo corto y alto rendimiento, piel morada, pulpa amarilla de textura seca, sin manchas, más susceptible a enfermedades que Morada INTA y de hojas acorazonadas.

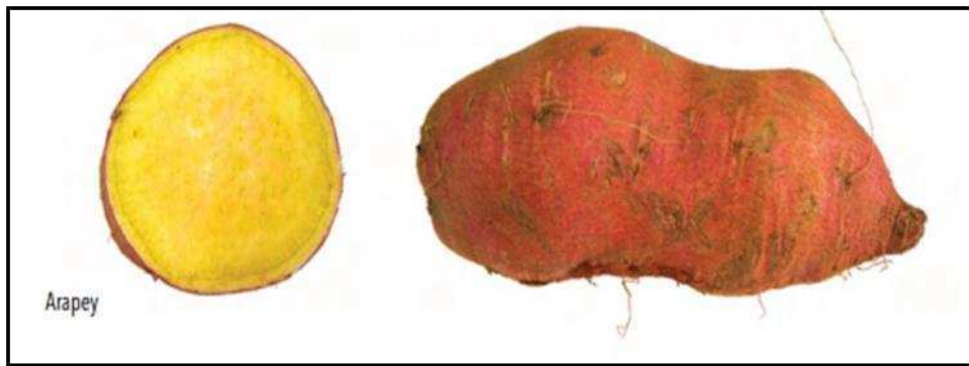


Figura 2 - 16. *Ipomea batata* Lam. Variedad Arapey. Tomado de: Martí, Corbino, y D Chludil, 2011

2.5.4 Composición nutricional

La batata es un alimento con un gran valor energético, posee un alto contenido de almidón y se encuentra entre los alimentos más nutritivos del reino vegetal. Entre los nutrientes presentes en esta raíz, se incluyen: proteínas, hidratos de carbono, minerales (calcio, hierro y potasio), carotenoides, fibra dietética, vitaminas (especialmente C, ácido fólico y B6), muy poca grasa y sodio, siendo los factores genéticos y ambientales, determinantes en la variabilidad de la composición de la misma (Benjamín, 2007). En la Tabla 2 - 4., se muestra la composición química y valor energético de la batata.

Tabla 2 - 4.

Composición química y valor energético de la valores por 100g.

BATATA		
Cantidades por cada 100 gramos		
Energía	Kcal	71,81
Agua	g	78,00
Proteínas	g	1,10
Lípidos	g	0,05
Ácidos grasos saturados	g	0,02
Ácidos grasos monoinsaturados	g	0,001
Ácidos grasos poliinsaturados	g	0,01
Colesterol	mg	0,00
Hidratos de Carbono	g	16,74
Fibra	g	3,06
Cenizas	g	1,10
Sodio	mg	6,00
Potasio	mg	417,00
Calcio	mg	34,00
Fósforo	mg	64,00
Hierro	mg	0,25
Zinc	mg	0,30
Niacina	mg	1,10
Folatos	µg	14,28
Vitamina A	µg	74,54
Tiamina (B1)	mg	0,10
Riboflavina (B2)	mg	0,14
Vitamina C	mg	13,14
Vitamina D	UI	0,00

Tomado de: SARA. Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

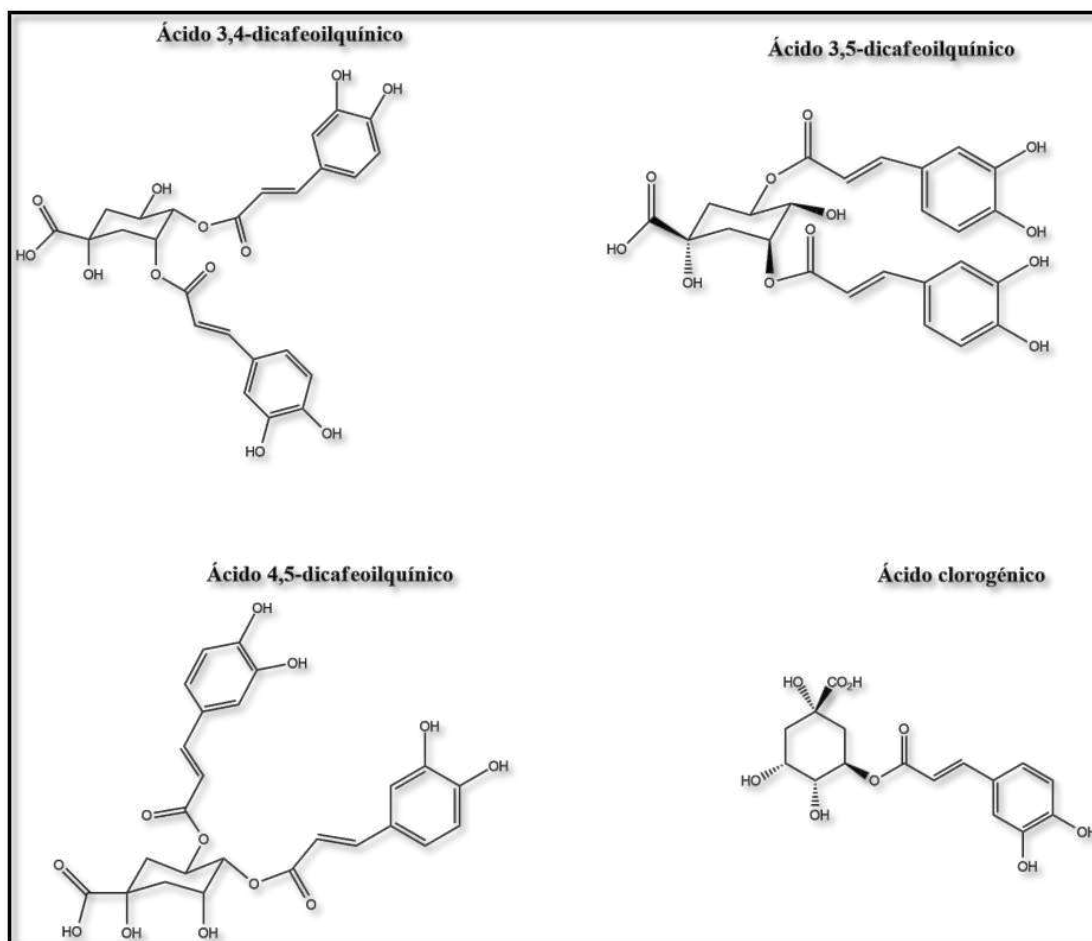
2.5.5 Compuestos fenólicos

Los principales compuestos fenólicos presentes en la batata lo constituyen las antocianinas y los ácidos fenólicos.

Se han identificado las antocianinas cianidina y peonidina en formas monoaciladas (relacionadas con el ácido cafeico) y diaciladas (ácido cafeico - ácido cafeico, ácido cafeico - p-hidroxibenzoico y ácido cafeico - ácido ferúlico), en altas concentraciones, sin embargo existen variaciones en las composiciones dependiendo los cultivares (Yuzhi, Jiang, Zhai, y Yang, 2012; Oki, y col., 2003).

Fossen (2000), menciona que las antocianinas aciladas constituyen más del 98% del contenido de antocianinas totales en batata. Esto sugiere una alta estabilidad de las antocianinas presentes en esta raíz y confirman su uso potencial como una fuente de colorantes para la industria de alimentos.

Los ácidos fenólicos identificados en batata (ver Figura 2 - 17), incluyen: ácido clorogénico y sus isómeros (3-cafeoilquínico y 4-cafeoilquínico), ácido cafeico (en muy bajas concentraciones), y los isómeros dicafeoilquínicos (DCQ): 4,5- DCQ; 3,5- DCQ y 3,4- DCQ. El ácido clorogénico y 3,5-DCQ, son reportados como los ácidos fenólicos predominantes en los tejidos de las raíces (Padda, 2008 y 2011; Jung., 2011; Bellail, y col., 2012).



Compuestos fenólicos	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido clorogénico	Cafeico	H	H
3,5-dicafeoilquínico	Cafeico	H	Cafeico
3,4-dicafeoilquínico	Cafeico	Cafeico	H
4,5-dicafeoilquínico	H	Cafeico	Cafeico
3,4,5-tricafeoilquínico	Cafeico	Cafeico	Cafeico

Figura 2 - 17. Principales compuestos fenólicos en tejidos de batata y su estructura molecular (cultivar *Ayamurasaki*). Tomado de Islam, Yoshimoto, y Yamakawa, 2003.



3.1 Materiales de partida.

- Ácido poliláctico (PLA), de pesos moleculares (Mw): 22.484 y 18.267 g/mol, sintetizado en el Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por *Condensación directa*, y cuyo tamaño fue caracterizado por Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).
- Ácido poliláctico (PLA) comercial, de alto peso molecular (L-LA 90%, 10% D-LA, Mn 200.000g/mol, en forma de pellets, provisto por Shenzhen Bright China Industrial Co., Ltd. (Wuhan, China).
- Acetona p.a. (Merck, Alemania).
- Metanol p.a. (Merck, Alemania).
- Diclorometano p.a. (DORWIL, Argentina).
- Alcohol polivinílico (PVA), SIGMA ALDRICH, 99+% hidrolizado, Mw típico: 89000 – 98000.
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (D913-2 SIGMA-ALDRICH).
- Ácido clorogénico (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido cafeico (SIGMA-ALDRICH).
- 1,5-dicafeoilquínico (SIGMA-ALDRICH).
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (TROLOX) (SIGMA-ALDRICH).
- Agua destilada
- Agua Milli-Q

3.2 Métodos.

3.2.1 Obtención del Extracto de la piel de batata, variedad Arapey (ExpBA).

El extracto metanólico de la piel de batata (ExpBA), proviene de raíces frescas cosechadas en la zona de San Pedro. El protocolo para la obtención del extracto fue proporcionado por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), Estación Experimental San Pedro (Área Poscosecha y Calidad de F y H).

Inicialmente las raíces se limpian y lavan cuidadosamente, luego se separa la piel de la pulpa, evitando que se adhieran restos de esta última y posteriormente se lleva a un

procesador manual para ser finamente picada. La piel obtenida es pesada (0,20 gramos de piel por ml de solvente) y mezclada con metanol, luego se sumerge la mezcla en un baño de agua a 80 °C por 10 minutos para optimizar la extracción. Se lleva a maceración con agitación constante por 24 horas, en un ambiente refrigerado. Finalizado el tiempo se filtra y se conserva en refrigeración a 4 °C, en frasco opaco, protegiéndolo de la luz, tal como indica la Figura 3 - 1.

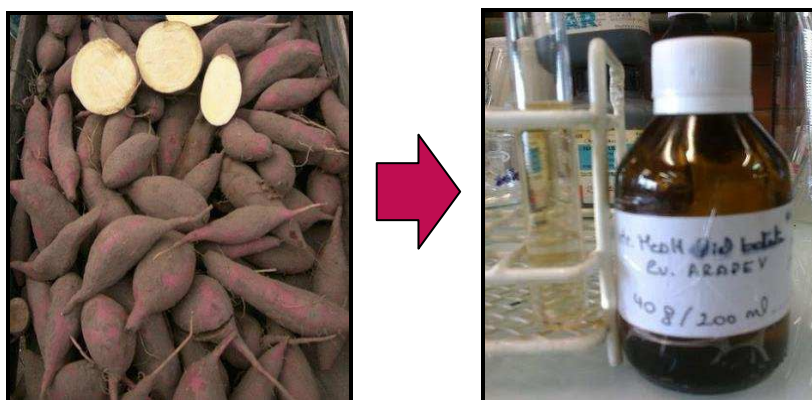


Figura 3 - 1. Batatas cosechadas y extracto de la piel obtenido.

3.2.2 Obtención de Nanopartículas de Ácido poliláctico (PLA).

3.2.2.1 Síntesis de nanopartículas.

Las nanopartículas de PLA, fueron preparadas utilizando el método de emulsificación evaporación del solvente, siguiendo un protocolo similar al presentado por Roussaki, y col, 2014, con algunas modificaciones.

Para establecer parámetros óptimos que permitan obtener nanopartículas de tamaño y morfología adecuada, se modificaron variables como: tiempo de centrifugado y peso molecular del PLA (ver Tabla 3 - 1).

Tabla 3 - 1.

Parámetros para la optimización en la obtención de nanopartículas sin carga mediante el método de emulsificación- evaporación.

Parámetros	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Tiempo de centrifugado (minutos)	20	40	20
Peso molecular (g/mol)	24.484	24.484	18.267

En este método tal como se detalló en Introducción sección 2.3.4, existen dos fases: la fase orgánica (FO), constituida por el polímero y la fase acuosa (FA) en la cual se encuentra el PVA.

El PLA, fue disuelto en concentraciones de 10 mg de polímero/mililitro de solvente (acetona). El PVA fue disuelto en concentraciones de 1% (w/v) en agua destilada y llevado a 60°C hasta su completa disolución. Posteriormente se inyectó la FO en la FA y se mantuvo en agitación por 15 minutos. Luego se llevó a un “shaker” (INNOVA 4000, Midland, ON, Canadá) a 150 rpm durante toda la noche, para la evaporación del solvente. Las nanopartículas formadas se recuperaron por centrifugación (BECKMAN J2-21M/E, California, USA). Se realizó una centrifugación inicial a 5000 rpm por 5 minutos a 5°C, para remover partículas agregadas. El sobrenadante resultante fue recuperado por centrifugaciones a una temperatura de 10 °C, a velocidad y tiempo variable, dependiendo del ensayo. Los pellets de las nanopartículas, se lavan con agua Mili-Q para eliminar los residuos de solvente y surfactante y son re suspendidos en 5 ml de agua y almacenados a 4 °C, protegidos de la luz, para luego realizar las caracterizaciones correspondientes. El método se esquematiza en la Figura 3 - 2 A.

3.2.2.2 Encapsulación del extracto de piel de batata en nanopartículas de PLA.

La encapsulación del extracto metanólico de la piel de batata (ExpBA), se realiza siguiendo, un procedimiento, tal como se indica en la Figura 3 - 2 B. En este caso se mezcla el extracto dependiendo el porcentaje a encapsular (masa de extracto por masa de polímero usado, w/w), con el polímero, constituyendo ambos la FO, para posteriormente ser inyectada en la solución acuosa de PVA 1% (w/v).

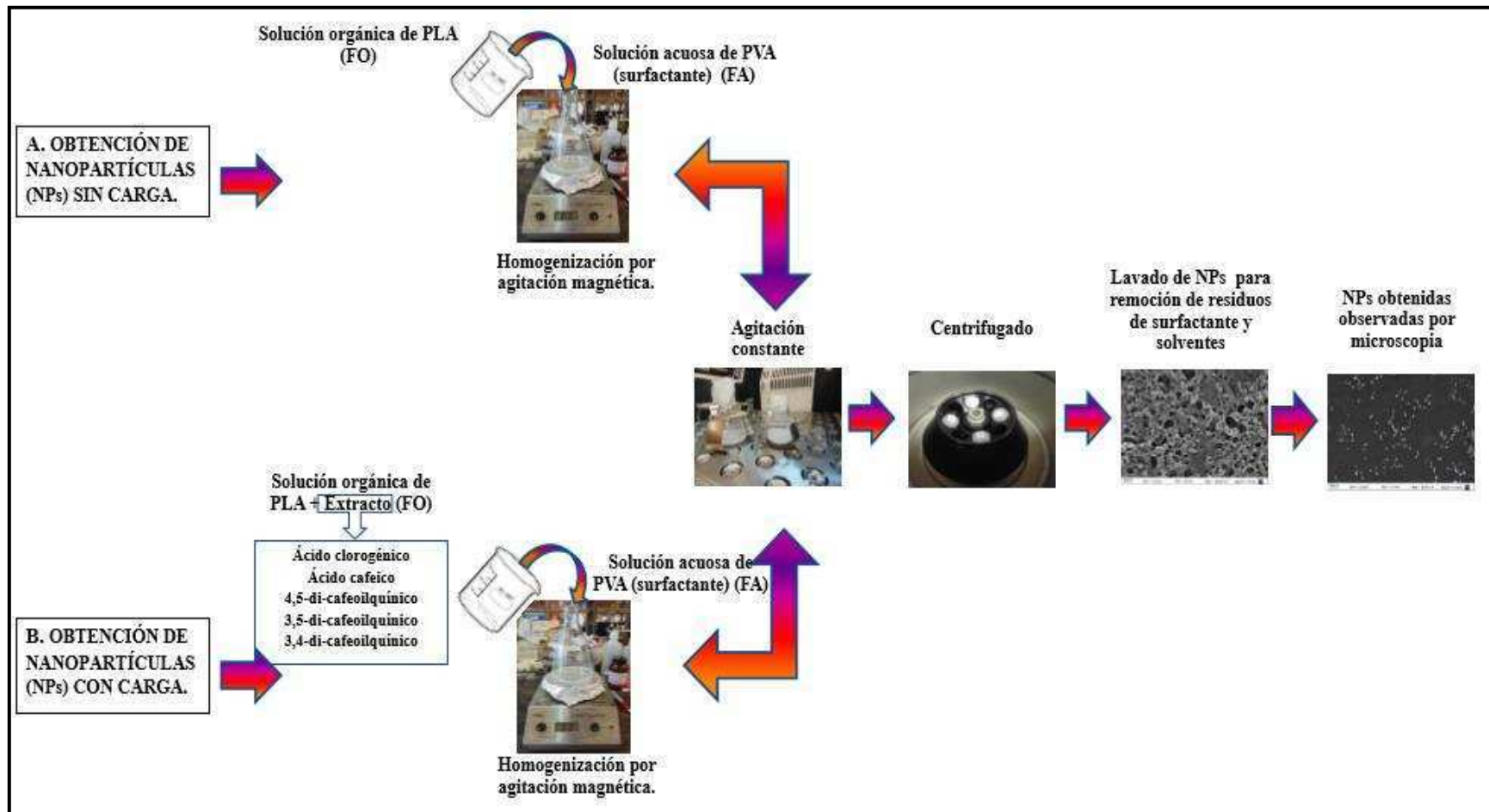


Figura 3 - 2. Proceso de obtención de Nanopartículas con carga y sin carga mediante el método de emulsificación- evaporación.

3.2.3 Obtención de Films.

La matriz de los films fue elaborada utilizando un PLA comercial de alto peso (200.000 g/mol), y purificado por coprecipitación utilizando diclorometano (DCM) y metanol como solventes.

La preparación de los films se realizó disolviendo el PLA de alto peso molecular en diclorometano 1 g en 7 ml, luego se agrega las NPs cargadas con el extracto (previamente sonicadas) en solución acuosa, se agita y se vierte en placas. Se deja evaporar el solvente por 24 horas a temperatura ambiente y luego son llevados a la estufa al vacío a 50 °C, durante 24 horas.

Se prepararon dos tipos de films para observar diferencias entre ellos:

- film de PLA
- film de PLA con NPs cargadas con el ExpBA, tomando el ensayo que presentó la mejor eficiencia de encapsulación E.E (%).

Tabla 3 - 2.

Componentes utilizados en la elaboración de films de PLA.

Film	Componentes.		
	PLA (g)	DCM (ml)	NPs (µl)
PLA	1	7	-
PLA con NPs cargadas	1	7	300

3.2.4 Caracterizaciones.

3.2.4.1 Caracterización del extracto.

Para la caracterización del ExpBA, se realizaron los siguientes análisis:

- **Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos individuales.**

Los ácidos fenólicos presentes en la piel de la batata fueron aislados, identificados y cuantificados mediante cromatografía líquida de alta resolución-fase reversa (RP-HPLC), siguiendo un protocolo descrito por el INTA. El análisis se realizó en un equipo Agilent Serie 1200, con detector UV-vis. La columna utilizada fue una ZORBAX Eclipse XDB-

C18 (Agilent Technologies), 4,6 mm, 250 mm, diámetro de partícula 5 μm . Se filtra el extracto en un filtro de membrana de 0,45 μm y luego con ayuda de una jeringa se carga en el equipo 20 μl de la muestra. Se trabajó con una velocidad de flujo de 0,7 ml/minutos (min.), y la separación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo durante aproximadamente 25 min. El extracto se eluyó usando una fase móvil Agua (A): Acetonitrilo (B). El perfil de elución fue en gradiente, solvente B: 20% de 0 a 10 min., 20% a 30% de 10 a 20 min., 30% a 50% de 20 a 30 min.

La detección e identificación de los picos se realizó con un detector UV a 320 nm, comparando los tiempos de retención del ácido clorogénico y cafeico, con los de sus respectivos estándares. Para el caso de los isómeros dicafeoilquínicos (3,4-DCQ; 3,5-DCQ y 4,5-DCQ), se utilizó el estándar 1,5-dicafeoilquínico, y se nombraron de acuerdo al orden de elución reportado en otras bibliografías que aplicaron condiciones cromatográficas similares a las realizadas en este trabajo, Padda, (2006); Jung., y otros (2011).

Mediante curvas de calibración se cuantificó los distintos ácidos fenólicos expresándolos en μg de ácido por ml de solución, para el ácido clorogénico y cafeico se utilizaron sus respectivos estándares, y para los isómeros dicafeoilquínicos el estándar 1,5-dicafeoilquínico. Se prepararon soluciones madre de los estándares en metanol: 1mg/ml para el ácido clorogénico y cafeico y de 100 $\mu\text{g/ml}$ para el 1,5-dicafeoilquínico, posteriormente se realizaron diluciones y el rango de concentración de las mismas fue de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ para los ácidos 1,5-dicafeoilquínico y cafeico y de 3 a 200 $\mu\text{g/ml}$ para el ácido clorogénico.

Cada una de estas disoluciones se inyecta en el cromatógrafo en las mismas condiciones descritas anteriormente para la identificación de los ácidos fenólicos en el extracto.

- **Análisis térmico.**

El análisis térmico hace referencia a técnicas que basadas en procesos programados de temperatura en atmósferas controladas, analizan la evolución de las propiedades físicas o mecánicas de una sustancia o de sus productos de reacción.

El análisis térmico del ExpBA se realizó con dos técnicas: termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se realizaron dos repeticiones de cada análisis.

Análisis Termogravimérico (TGA).

El análisis termogravimétrico, (del acrónimo inglés TGA, Thermal Gravimetric Analysis), se basa en el registro de forma continua de la masa de una muestra (pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación), en función del aumento de la temperatura normalmente en forma lineal con el tiempo, o en función del tiempo a temperatura constante, en una atmósfera controlada o bien en presencia de un gas reactivo. Los equipos convencionales empleados en termogravimetría constan principalmente de: una termobalanza, horno, sistema de gas de purga y procesador de datos (Skoog, Leary, y Galcer, 2001; UAM, 2008).

Para el análisis de las propiedades térmicas del extracto se utilizó un analizador termogravimétrico simultáneo/térmico diferencial (equipo Shimadzu, TGA/DTA DTG-60, Kyoto, Japón), ver Figura 3 - 3.

Previo al análisis, el extracto fue evaporado, hasta obtener una masa sólida. Se colocaron $2,0 \pm 0,2$ mg, de la muestra en crisoles de aluminio de 40 μ l, para luego ser calentada en el rango de temperatura de 30 °C a 400 °C a una velocidad de 10 °C/min., en una atmósfera de N₂ con un flujo de 30 ml/min. El procesamiento de los datos se realizó con el programa *OriginPro8* y las curvas de TGA obtenidas, permitieron la evaluación de las propiedades térmicas del extracto.



Figura 3 - 3. Equipo Shimadzu, TGA/DTA DTG-60 Kyoto, Japón.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DCS, Differential Scanning Calorimetry), mide los cambios de energía que experimenta una muestra con la temperatura. Durante el análisis (a temperatura programada), el calor fluye tanto a la muestra como a la referencia interna, originando diferencias de flujo de calor entre ambas. Todos los cambios físicos y químicos producidos, originan transiciones endotérmicas y exotérmicas, haciendo posible determinar con esta técnica las temperaturas a las que se produce un cambio de estado, un cambio estructural o un proceso degradativo, así como determinar la magnitud energética de este cambio.

Se procedió a realizar el análisis del extracto en un equipo DSC Q20 TA Instruments, (Ver Figura 3 - 4), con sistema de enfriamiento (RCS90). Se colocaron $2,0 \pm 0,2$ mg de la muestra en una pastilla de aluminio, se sella herméticamente y se coloca en el equipo. Se programa la temperatura llevando la muestra desde la temperatura ambiente hasta los $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, con un flujo de nitrógeno de $50\text{ ml}/\text{min.}$ El procesamiento de los datos se realizó con el programa *OriginPro8*.



Figura 3 - 4. Calorímetro Diferencial de Barrido Equipo DSC Q20 TA Instruments.

- **Determinación de la Capacidad antioxidante (CA).**

Los métodos desarrollados para determinar la actividad antioxidante de un producto, se basan en la capacidad de un compuesto para captar radicales libres ya sea en fase acuosa o lipídica (Chaves, Maiocchi, Sgroppo, y Avanza, 2002). El radical 2,2-difenil-1-picril-

hidracilo (DPPH), es un radical de nitrógeno orgánico y estable, el cual en su forma libre posee una absorción en el UV-visible a 517 nm. Cuando este radical se encuentra disuelto en un solvente orgánico adquiere una coloración violeta intensa y luego si es reducido por acción de un compuesto antioxidante se convierte en amarillo pálido o incoloro, tal como indica la Figura 3 - 5.

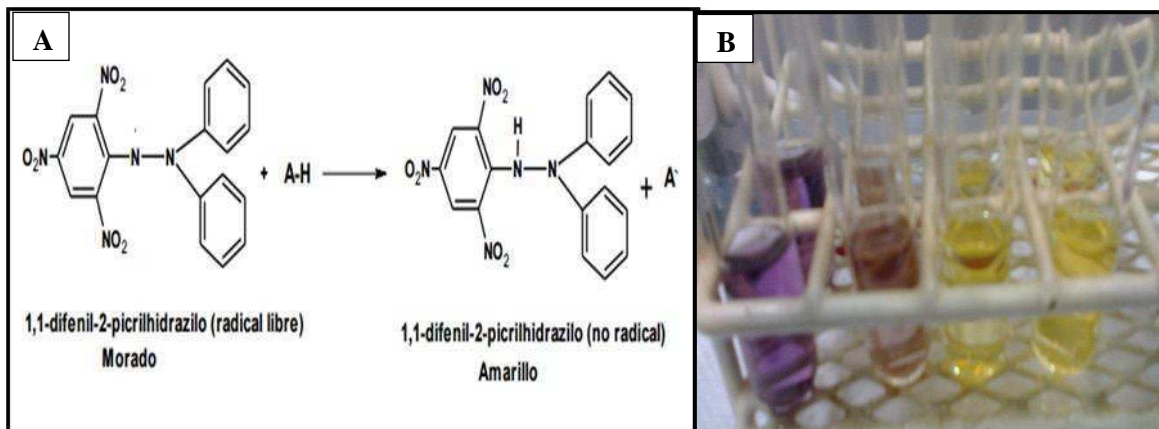


Figura 3 - 5. A. Estructura del DPPH, antes y después de la reacción con el antioxidante. B. Disminución del color violeta del DPPH, luego de reaccionar con el ExpBA a diferentes concentraciones.

El análisis de capacidad antioxidante (CA), se desarrolló siguiendo un protocolo otorgado por el INTA, el cual consistió en preparar una solución stock 0.1 mM de DPPH en metanol p.a. La solución se agita hasta que se encuentre completamente disuelta y se almacena inmediatamente luego de preparada a 4 °C protegiéndola de la luz. Se tomaron alícuotas de 2000 µl de solución de DPPH y concentraciones variables de metanol y extracto, agitándose en un “vórtex” para un correcto mezclado. La capacidad de la muestra para atrapar el radical DPPH, es evaluada por medio de la disminución de la absorbancia, leída en un espectrofotómetro (JENWAY Modelo 6705) a 515 nm, luego de 30 min., de iniciada la reacción.

En consecuencia, el DPPH restante permite tener una estimación del porcentaje de inhibición (% Inhibición), de la muestra contra este radical libre y es calculado usando la Ecuación (3-1).

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{Abs. blanco} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. blanco}} \times 100 \quad (3- 1)$$

dónde:

Abs. blanco: es la absorbancia de la solución de DPPH conteniendo metanol.

Abs. muestra: es la absorbancia de la solución de DPPH, que contiene el extracto.

Los porcentajes de Inhibición obtenidos se utilizaron para hacer una gráfica (% Inhibición vs. concentración del extracto). Mediante la ecuación obtenida ($y = 1,61x + 15,62$), se calculó la concentración inhibitoria al 50 % (IC_{50}), parámetro que corresponde al volumen de extracto utilizado para inhibir el 50% del radical DPPH. Este resultado se comparó con el antioxidante estándar 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (TROLOX), el cual es un análogo de la vitamina E. El protocolo utilizado para el Trolox es similar al mencionado para el extracto. Los resultados obtenidos se expresaron en mg de TROLOX/ml.

- **Determinación de Humedad.**

Para la analizar el contenido de humedad se siguió el método AOAC 920.151. El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante a una temperatura determinada (70°C). El proceso puede efectuarse a presión atmosférica o al vacío.

3.2.4.2 Caracterización de nanopartículas de PLA y nanopartículas de PLA cargadas con el extracto.

La caracterización de las nanopartículas tanto de su forma como de su tamaño, se realizó por microscopia electrónica de barrido (SEM) y dispersión dinámica de luz (DLS)

- **Microscopia electrónica de barrido (SEM).**

El principio del sistema SEM consiste en focalizar sobre la superficie de una muestra un haz de electrones acelerados de potencia modulada que viajan a través de un cañón de presión estrictamente controlada, y las mediciones son generalmente realizadas bajo vacío. Este haz barre la muestra en una serie de líneas y redes, emitiendo una señal (es

función de la cantidad e intensidad de electrones que devuelve la muestra e incluye: electrones secundarios, electrones retro dispersados, radiación electro magnética, etc.), que es detectada por lentes basadas en electroimanes, y posteriormente registrada en el monitor. Para el caso de las nanopartículas, esta técnica permite obtener información directa sobre su tamaño, distribución del tamaño y morfología.

Las imágenes fueron tomadas con un Microscopio electrónico FE-SEM (Carl Zeiss NTS- SUPRA 40), similar al de la Figura 3 - 6, del Centro de Microscopias Avanzadas (CMA), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.



Figura 3 - 6. Microscopio electrónico de Barrido. FE-SEM (Carl Zeiss NTS- SUPRA 40).

Una gota de la suspensión de nanopartículas diluidas y sonicadas fue depositada sobre una lámina de sílice y luego llevada a una estufa al vacío por 24 horas a 30 °C. El proceso de secado debe ser cuidadosamente realizado, para evitar el encogimiento de las nanopartículas.

Las muestras de nanopartículas son posteriormente recubiertas con una capa muy fina de oro mediante “sputtering” (pulverización catódica) por 20 segundos, para otorgarles propiedades conductoras.

El software *ImageJ* (NIH, USA), fue utilizado para el procesamiento y análisis de las imágenes SEM. Se determinó el tamaño de al menos 150 nanopartículas por cada ensayo y los datos obtenidos fueron procesados con el software *OriginPro8*.

- **DLS (Dynamic Light Scattering)**

La dispersión dinámica de luz (DLS), también conocida como dispersión de luz cuasi-elástica (QELS), es una técnica no invasiva establecida para caracterizar el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas (suspendidas en un líquido) de las regiones comprendidas entre los nanómetros hasta los micrones.

El constante movimiento browniano de las partículas, hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Las fluctuaciones de la intensidad de luz son inversamente proporcionales al coeficiente de difusión traslacional de las partículas (cuanto más grande es la partícula, más lento será el movimiento browniano). Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y, por lo tanto el tamaño de partícula.

Como las partículas se encuentran dispersadas o disueltas en un líquido (proteínas, polímeros, dispersiones coloidales, etc.), el contacto con el solvente permite que se forme una capa eléctrica dipolar a su superficie, por ello el diámetro obtenido se lo refiere en términos de hidrodinámico, medida que comprende a la partícula hidratada y solvatada (Fritsch, 2010). Por esta razón el valor obtenido por DLS, es superior al diámetro que se mide por SEM, tal como se observa en la Figura 3 - 7.

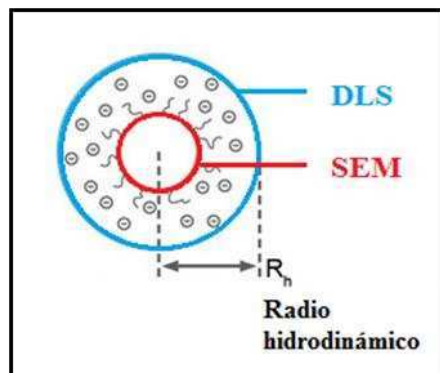


Figura 3 - 7. Diferencias en las mediciones de los tamaños medidos por SEM y DLS. Tomado de Fritsch, 2010.

Las mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) fueron realizados con un equipo Zetasizer Nano-ZS de MALVERN Instruments, en la Facultad de Farmacia y

Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Las soluciones acuosas de nanopartículas (con carga y sin carga), fueron preparadas diluyendo 100 µl de la suspensión de nano partículas en 900 µl de agua de ionizada, por triplicado a 25 ± 1 °C, y un ángulo de 173 °. La muestra debe ser correctamente diluida, sonicada y no debe presentar aglomeraciones.

Para cada muestra se determinó el diámetro hidrodinámico promedio de partícula (Z-Average) junto con la desviación estándar. También se consideró la distribución de tamaños y el Índice de Polidispersidad (IP). El IP es una medida adimensional proporcionada por el equipo tomando parámetros como: índice de refracción del disolvente y la viscosidad. Se considera una escala de 0 a 1, los valores mayores a 1 indican que la distribución es altamente polidispersa y la muestra puede no ser adecuada para ser medida por DLS. En la Tabla 3 - 3, se detallan los rangos IP con sus respectivas observaciones.

Tabla 3 - 3

Valores para diferentes IP (índices de polidispersidad), con sus respectivas observaciones.

Valores IP	Observaciones
< 0,05	Se dan normalmente con estandares de látex o partículas hechas para ser monodispersas.
< 0,08	Muestras casi monodispersas. Normalmente el DLS sólo puede dar una distribución monomodal dentro de este rango
0,08 a 0,70	Rango medio del IP. Es el intervalo sobre el cual los algoritmos de distribución mejor operan.
> 0,70	Indica una muy amplia distribución de tamaños de partícula

- **Determinación de la Eficiencia de Encapsulación (E.E%) del extracto.**

La *Eficiencia de Encapsulación (E.E%)*, es el porcentaje del compuesto atrapado en las nanopartículas relativo a la cantidad del componente usado. Es una determinación indirecta utilizada para cuantificar el compuesto no encapsulado que queda retenido en el sobrenadante luego de recuperar las nanopartículas. Esta cuantificación puede ser realizada

tanto por métodos cromatográficos como espectrofotométricos y se calcula con la siguiente ecuación:

$$E.E(\%) = \frac{\text{Cantidad total de compuesto} - \text{compuesto no encapsulado}}{\text{Cantidad total de compuesto}} \times 100 \quad (3-2)$$

En nuestro estudio la E.E%, se estimó usando Espectrometría UV-vis (Espectrofotómetro JENWAY 6705, UK). Para realizar la cuantificación de los componentes del extracto, al principio se realizó un espectro para determinar los picos de absorción máxima, los mismos que fueron observadas a 217 nm con un hombro a 250 nm y a 328 nm con un hombro a 300 nm (Figura 3 - 8).

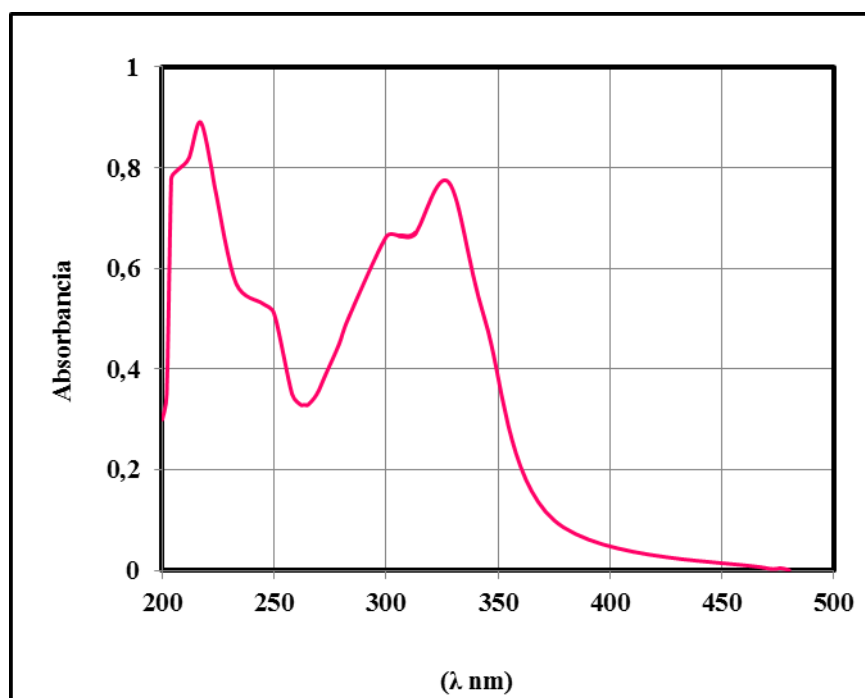


Figura 3 - 8. Espectro de absorción UV-vis, del extracto metanólico de la piel de la batata (5mg/ml), variedad Arapey.

En base al espectro realizado, se estableció la absorbancia máxima a 328 nm, así como también se tomó en cuenta la bibliografía, la misma que indica que una absorbancia a 328 nm puede ser expresada como la suma de las absorbancias de compuestos dominantes derivados del ácido hidroxicinámico (Oki, y col., 2002 y 2003).

Con el ExpBA se realizó una curva de calibración preparando una solución madre de 8 mg/ml, y luego se realizaron diluciones sucesivas en µg/ml, y el rango de concentración de las mismas fue de 1 a 410 µg/ml.

Luego de ser recuperados los pellets de nanopartículas, los sobrenadantes obtenidos, se evaporaron a una temperatura de 60°C (al vacío), el sedimento obtenido es reconstituido en metanol y se mantuvieron así por un día. Posteriormente fue filtrado y se midió la absorbancia a 328 nm, para cuantificar la cantidad de antioxidantes no encapsulados.

Ensayos de Optimización de solventes en la encapsulación de antioxidantes.

La carga de las nanopartículas se realizó previa optimización de los solventes de la fase orgánica. Se realizaron tres ensayos de optimización de solventes (EO), para evaluar si el tipo de solvente utilizado influye sobre la eficiencia E.E%. Los EO, propuestos se exponen en la Tabla 3 - 4.

Tabla 3 - 4.

Parámetros para la optimización de solventes en la obtención de nanopartículas con carga a través del método emulsificación- evaporación.

ENSAYO	Fase orgánica		Fase acuosa
	Polímero/solvente	Extracto/solvente	
EO 1	PLA/acetona	Extracto metanólico seco/Agua	PVA- Agua.
EO 2	PLA/mezcla acetona agua	Extracto metanólico seco /mezcla acetona agua (3:1)	PVA- Agua.
EO 3	PLA/acetona	Extracto metanólico	PVA- Agua.

Luego de evaluada la E.E% de los tres ensayos realizados, se seleccionó al que presentó la eficiencia más alta. Sobre este ensayo se realizaron nuevas modificaciones para

determinar la influencia de otras variables, como: peso molecular, concentración del extracto, tiempo de centrifugado y velocidad de centrifugado.

Al llegar a la etapa final de recuperación de nanopartículas, se determinaron técnicas para eliminar remanentes de solvente (metanol y acetona), tales como lavado continuo con agua deionizada y evaporación de los pellets de nanopartículas.

- **Porcentaje de rendimiento en la producción de nanopartículas.**

El porcentaje de rendimiento en la producción de nanopartículas fue realizado en función de la masa de polímero (PLA) usada, previo pesado y secado de los pellets de nanopartículas. Este fue realizado tanto para las NPs sin carga, ecuación (3 -3); como NPs cargadas con el ExpBA, ecuación (3 -4).

$$\text{Rendimiento (w \%)} = \frac{\text{Peso de las nanopartículas obtenidas}}{\text{Peso total de polímero usado}} \times 100 \quad (3 - 3)$$

$$\text{Rendimiento (w \%)} = \frac{\text{Peso de las nanopartículas obtenidas}}{\text{Peso total de extracto cargado en las NPs + Polímero}} \times 100 \quad (3 - 4)$$

3.2.4.3 Caracterización de films.

La caracterización de los films se realizó por SEM. La observación se realiza fracturando el material por medios mecánicos, tomando en cuenta la temperatura de transición vítrea (Tg). Si la Tg es menor que la temperatura ambiente, el material podrá ser fracturado en condiciones criogénicas, lo cual evita deformaciones del mismo. El procedimiento realizado se cita a continuación:

1. Recortar un área de film de 1 x 0,5 cm aproximadamente.
2. Llenar un recipiente térmico aislante con nitrógeno líquido hasta que deje de burbujear.
3. Se coloca el film dentro del nitrógeno. El punto en el que el nitrógeno deja de burbujear es cuando el film alcanzó la temperatura de enfriamiento adecuada.
4. Se toman los extremos del film con pinzas y se espera hasta que el material se fracture. Dejar secar las partes fracturadas a temperatura ambiente.

Es importante poner atención cual superficie es la de fractura a fin de realizar el montaje correcto.

Los films son posteriormente recubiertos con una capa muy fina de oro mediante “sputtering” (pulverización catódica) por 20 segundos, para otorgarles propiedades conductoras.

3.2.5 Análisis estadístico

Los valores presentados están expresados como media \pm error estándar o desviación estándar, según se indique de la media de tres repeticiones de cada uno de los ensayos, Todos los análisis estadísticos realizados en este estudio se efectuaron con el software *OriginPro8*.



4. RESULTADOS

4.1 Caracterización del extracto de piel de batata (variedad Arapey).

4.1.1 Identificación y cuantificación de ácidos fenólicos individuales.

Como se enunció en la sección de Materiales y métodos (3.2.4 Caracterizaciones), la identificación de los ácidos fenólicos se realizó eluyendo las soluciones estándares y comparando los tiempos de retención de las mismas con los cinco (5) picos obtenidos, tal como se observa en la Figura 4 - 1.

El pico uno se identificó como ácido clorogénico (ACL) y el pico dos como ácido cafeico. Los isómeros dicafeoilquínicos (pico tres: 4,5-DCQ, pico cuatro: 3,5-DCQ, pico cinco: 3,4-DCQ, fueron nombrados de acuerdo al orden de elución evidenciado en investigaciones que utilizaron procedimientos cromatográficos similares (Padda, 2006 y Jung, y otros, 2011).

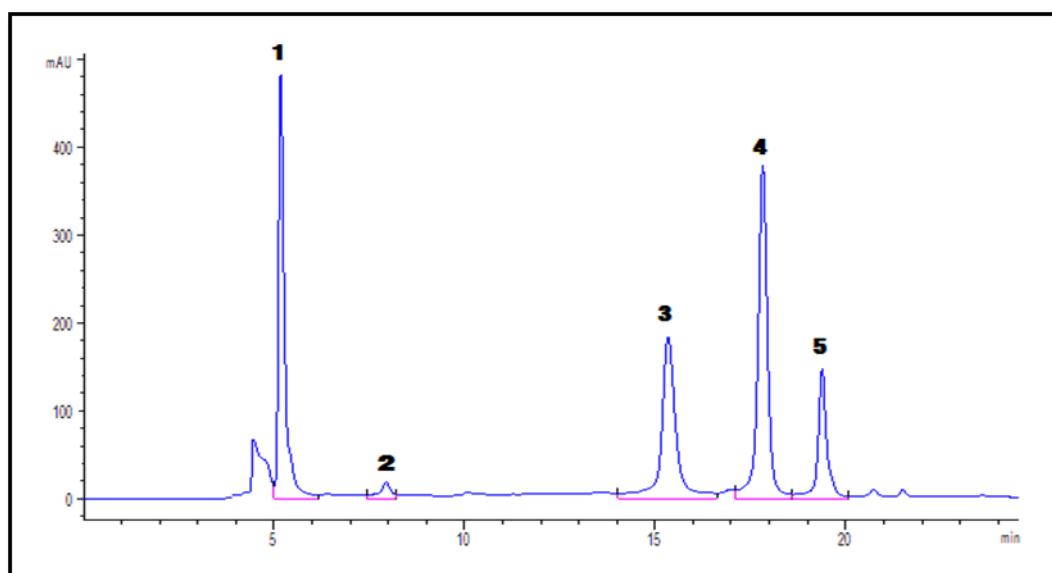


Figura 4 - 1. Cromatograma HPLC de la piel de la batata, variedad Arapey.

De las curvas de calibración obtenidas, (Ver Figura 4 - 2.), se obtuvieron las siguientes expresiones matemáticas:

- **Ácido cafeico:** $y = 77,86x + 16,87$
- **Ácido 1,5 dicafeoilquínico** $y = 39,88x - 55,18$

- **Ácido clorogénico:** $y = 33,70x - 69,01$

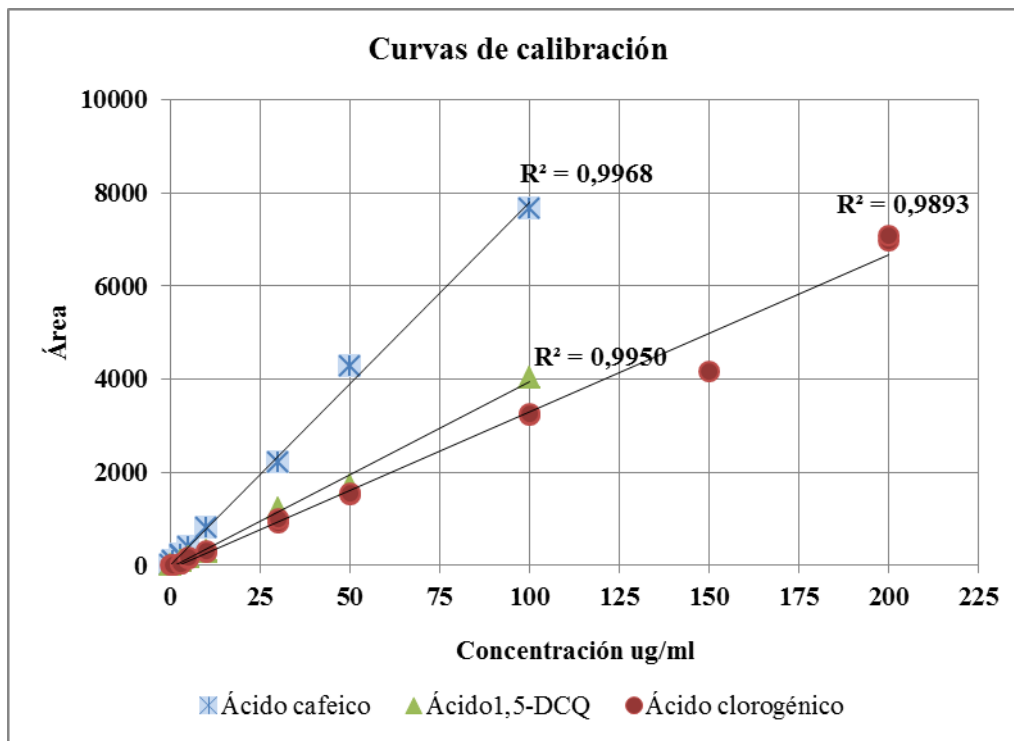


Figura 4 - 2. Curvas de calibración para los ácidos: cafeico y 1,5 dicafeoilquinico y clorogénico.

En la Tabla 4 - 1, se muestra el contenido de los ácidos fenólicos individuales presentes en la piel, expresado en $\mu\text{g/ml}$. Los ácidos fenólicos predominantes fueron el ácido 3,5-DCQ y clorogénico, mientras que el ácido cafeico se encontró en muy baja concentración con respecto a los otros ácidos. Esta mayor proporción de los ácidos 3,5-DCQ y ACL en el tejido de batatas de piel morada, ya ha sido registrada para otras variedades (*Beauregard*, *Evangeline*, *Golden Sweet*, etc.), en diversas investigaciones Padda y Picha, 2008; Jung, y otros, 2011.

Tabla 4 - 1.

Contenido de ácidos fenólicos presentes en el extracto de piel de batata (Variedad Arapey).

Ácidos fenólicos	µg/ml	mg/Kg de peso fresco
Ácido clorogénico	156,75	783,75
Ácido cafeico	2,68	13,39
Ácido 4,5-dicafeoilquínico.	117,77	188,84
Ácido 3,5-dicafeoilquínico.	167,23	836,15
Ácido 3,4-dicafeoilquínico.	59,38	296,92

La concentración de ácido clorogénico encontrado en la piel de batata, variedad Arapey (783,75 mg /Kg de peso fresco), es considerablemente superior al observado en pulpa de otras variedades de esta raíz cuyo rango oscila entre: 117 - 467 mg de equivalentes de ácido clorogénico/Kg de peso fresco (Shahidi y Naczki, 2003). Este dato es sumamente importante pues considerando que la piel de este cultivo generalmente representa un residuo que no es aprovechado, el valor agregado del cual puede ser objeto resulta en un interés económico para su comercialización.

4.1.2 Estabilidad térmica.

Como se enunció en la sección de Materiales y métodos, para la caracterización del extracto se realizaron dos tipos de análisis térmicos (TGA y DSC), estos se efectuaron con el objeto de analizar la estabilidad térmica de los compuestos antioxidantes presentes en el extracto de la piel de la batata (ExpBA) y tener información sobre el rango de temperaturas de degradación del extracto.

A. Análisis Termogravimétrico (TGA)

En la Figura 4 - 3., se presenta el termograma del extracto metanólico de la piel de batata. En primera instancia se observa una primera fase comprendida entre los 30 – 135 °C, con una pérdida de masa de 4,5 % que se corresponde a una pérdida de agua junto a la de compuestos volátiles de bajo peso molecular (Padda M. S., 2006). Desde los 135°C hasta aproximadamente los 170°C, se observa una pérdida de peso de 5,5%, atribuida a la

degradación de compuestos volátiles, lípidos polares, y pequeñas moléculas ácidas (Wang, y otros, 2015). A temperaturas superiores las pérdidas son debidas a pirólisis de compuestos como fibra insoluble: celulosa, hemicelulosa y lignina, (Wang, y otros, 2015). El residuo es de aproximadamente un 43%.

Es importante reconocer que las primeras degradaciones comienzan a partir de los 135°C, lo que nos indica que a temperaturas más bajas, el extracto es térmicamente estable, siendo esto un parámetro importante ya que nos da un rango seguro con el cual se puede trabajar con los antioxidantes presentes en el mismo. Tomando en consideración las temperaturas utilizadas en el protocolo de encapsulación, observamos que la técnica utilizada no interfiere en las propiedades de los antioxidantes.

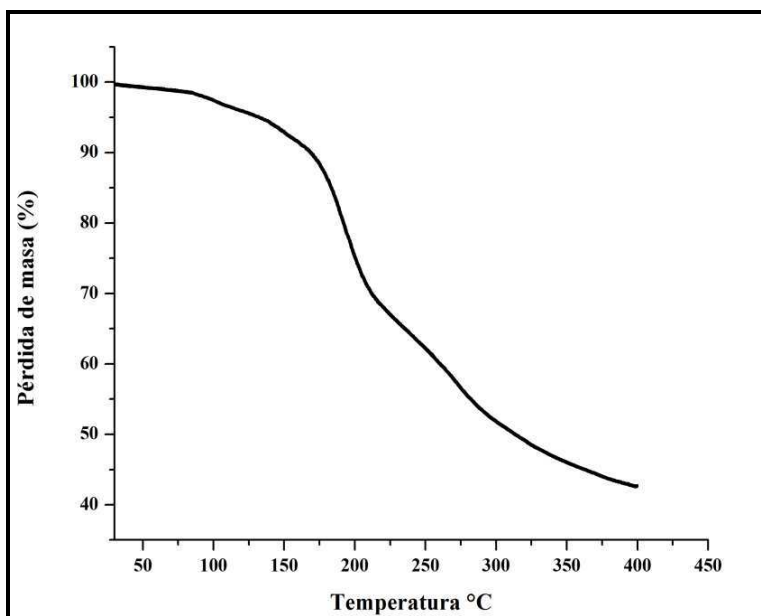


Figura 4 - 3. Curva de descomposición térmica del extracto metanólico de la piel de la batata.

B. DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido)

El termograma DSC obtenido para el extracto de batata se muestra en la Figura 4 - 4. Se evidencia la presencia de dos picos endotérmicos, correspondientes a la fusión de los componentes de extracto, el primer pico aparece a una temperatura de aproximadamente

109°C y el otro a 125°C, los mismos podrían corresponder principalmente a azúcares como fructosa (Padda M. S., 2006).

Los ácidos fenólicos como: ácido clorogénico, cafeico y los isómeros dicafeoilquínicos presentan temperaturas de fusión entre 170°C hasta 220°C (Chao, y otros, 2012 y 2014). Debido a que la pérdida de masa es mayor al 10% en el rango de temperatura de fusión de los ácidos fenólicos, el ensayo DSC no se pudo efectuar hasta esa temperatura.

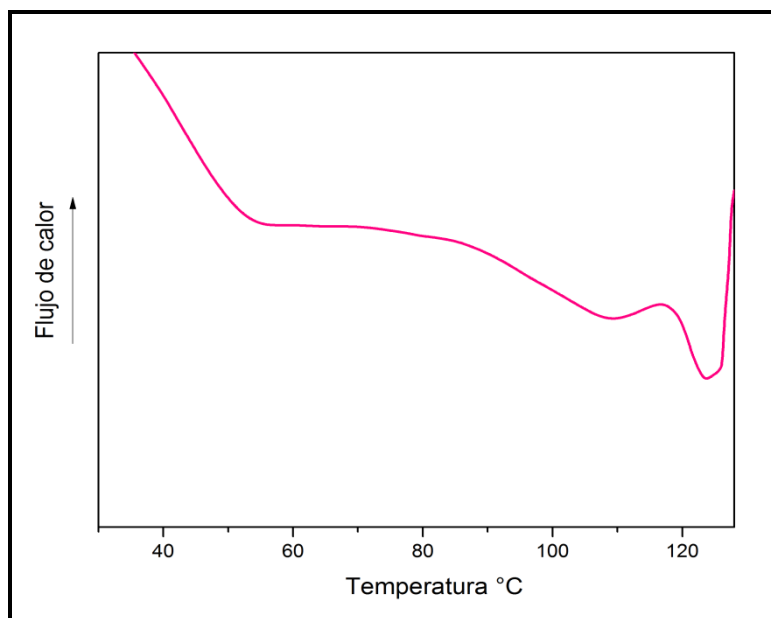


Figura 4 - 4. Termograma de Calorimetría diferencial de barrido para el extracto de la piel de batata.

4.1.3 Determinación de la Capacidad antioxidante (CA).

En la Figura 4 - 5, se observa actividad inhibitoria del extracto sobre el radical DPPH. Los resultados muestran que la actividad antirradical del extracto se incrementa, con el incremento de las concentraciones del extracto. Así mismo se obtuvo el IC₅₀, el mismo que correspondió a un volumen de 21,30 µl (1,42 mg/ml de extracto), que equivale a 476,96 mg de equivalentes TROLOX.

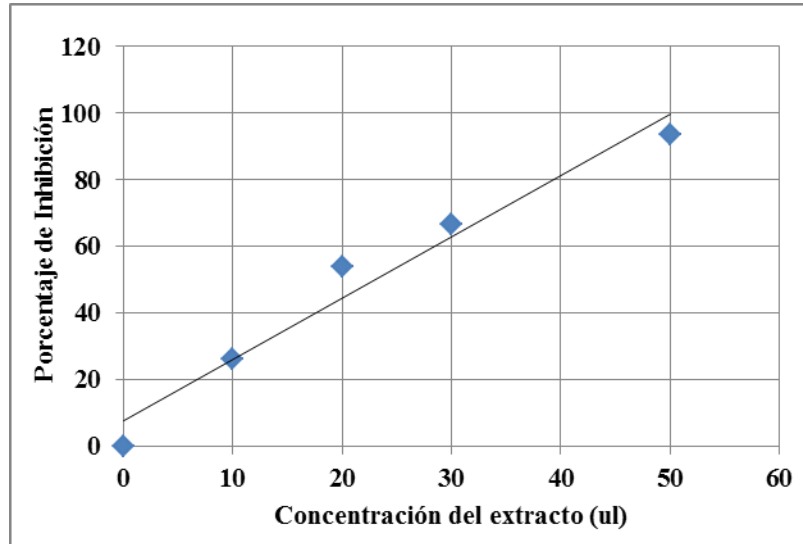


Figura 4 - 5. Inhibición del radical DPPH frente al extracto de piel de batata (Arapey), evaluado 30 minutos luego de la reacción.

Con base a los resultados obtenidos, es importante resaltar que el extracto proveniente de la piel de batata (el mismo que actualmente es un residuo 100%), nos provee la misma acción de aproximadamente 500 mg de TROLOX cuyo costo en el mercado es de aproximadamente 100 USD (dólares americanos).

4.2 Síntesis de Nanopartículas de Ácido poliláctico (PLA).

4.2.1 Caracterización de nanopartículas.

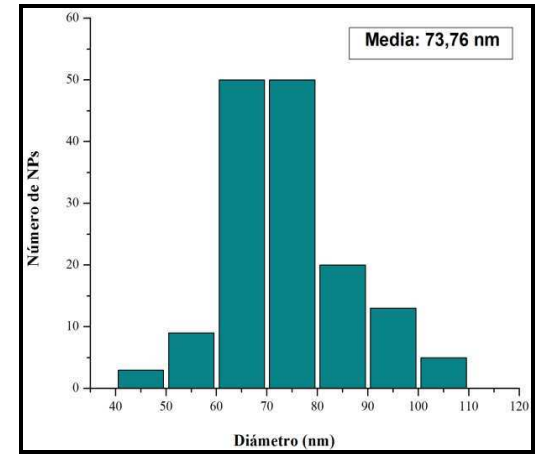
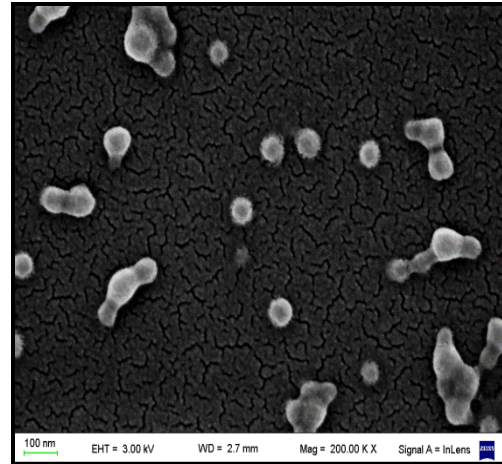
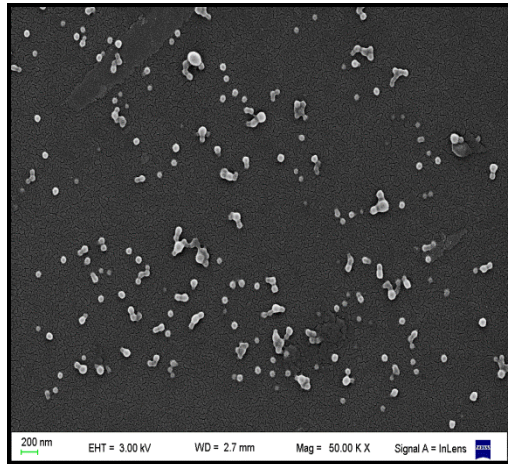
Tal como se expresó en la sección de materiales métodos, las nanopartículas de PLA fueron elaboradas por el método de *Emulsificación- evaporación*. Con el objeto de optimizar el método de preparación, se modificaron variables que puedan influir en la morfología y tamaño de la nanopartícula, para ello se realizaron tres síntesis distintas.

Las nanopartículas (NPs) fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y dispersión dinámica de luz (DLS). Un resumen de los parámetros evaluados para cada método (SEM y DLS), se muestra en la Tabla 4 - 2.

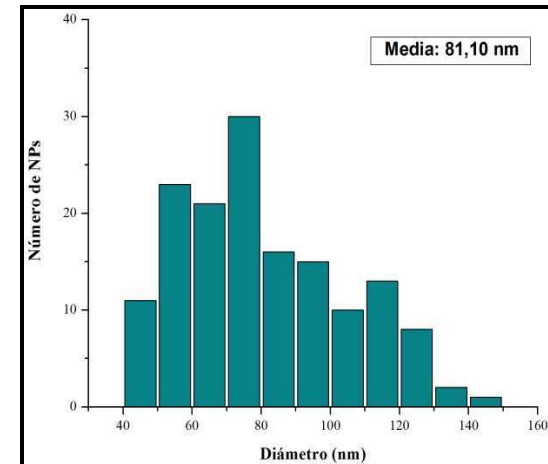
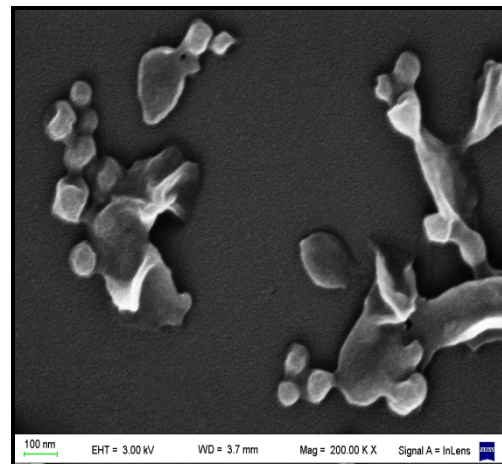
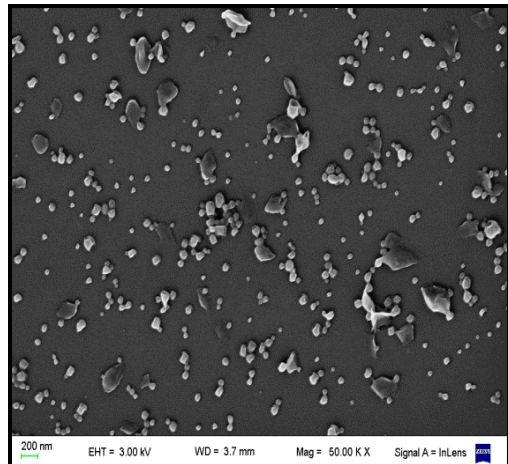
Las nanopartículas (NPs) del *Protocolo 1* (tiempo de centrifugado 20 minutos y peso molecular: 24.484 g/mol), muestran morfologías esféricas y superficie regular. Los tamaños de las NPs en este lote son homogéneos y el diámetro promedio evaluado

mediante el análisis de las micrografías fue de: 73,76 nm (ver Figura 4 - 6. A). Así mismo se determinaron los tamaños por DLS que alcanzaron un diámetro hidrodinámico promedio (D_h) de 121,50 nm, resultando superiores al encontrado por microscopía electrónica de barrido, esto debido a que en la técnica de DLS, las NPs se encuentran solvatadas. El índice de polidispersidad (IP) es de 0,13 lo que nos indica que la población fue monodispersa.

A. Protocolo 1 (tiempo de centrifugado 20 minutos y peso molecular 24. 484 g/mol)



B. Protocolo 2 (tiempo de centrifugado 40 minutos y peso molecular 24. 484 g/mol)



C. Protocolo 3 (tiempo de centrifugado 20 minutos y peso molecular 18.267 g/mol)

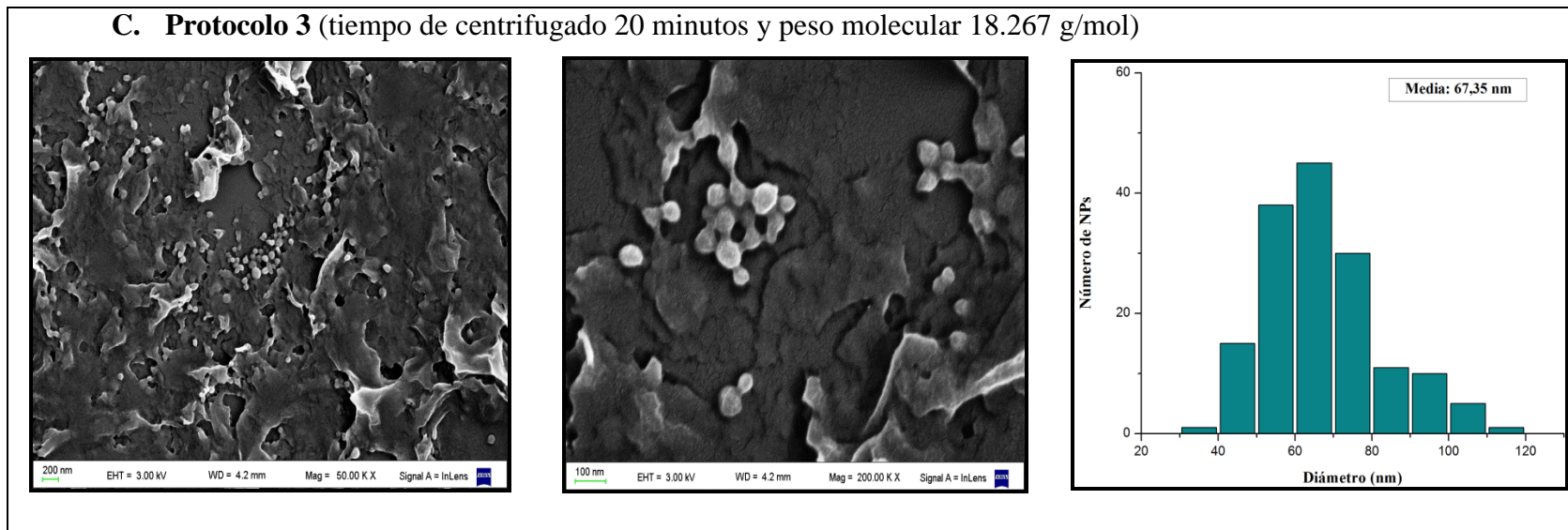


Figura 4 - 6. Fotografías obtenidas por SEM (x 50 y 200), para cada protocolo. A la derecha de cada fotografía se observa la distribución de tamaño derivada de las imágenes SEM.

Tabla 4 - 2.

Parámetros obtenidos para la evaluación de tres síntesis de nanopartículas, realizadas para optimización del método Emulsificación-evaporación.

	SEM			DLS		
	Media	Desviación estándar	Error estándar	Diámetro hidrodinámico	Desviación estándar	Índice de Polidispersidad
Protocolo 1	73,76	12,67	1,03	121,50	43,39	0,13
Protocolo 2	81,10	23,38	1,91	119,00	38,38	0,10
Protocolo 3	67,35	15,33	1,25	183,53	84,96	0,21

Para SEM, se evaluó: media, desviación estándar y error estándar y para DLS: diámetro hidrodinámico, desviación estándar e índice de polidispersidad. Datos expresados en nanómetros (nm).

Las nanopartículas del Protocolo 2 (tiempo de centrifugado: 40 minutos, y peso molecular: 24 484 g/mol) presentan morfologías heterogéneas (esféricas y poliédricas). Se evidencia la presencia de otras formaciones distintas a las NPs, tipo “hojuelas”, que son atribuidas posiblemente al surfactante (PVA), que en este caso se encuentra asociado a la mayoría de las NPs.

Este efecto se presenta a pesar de que el protocolo incluye varias centrifugaciones, y tiene su explicación probable en la temperatura utilizada. El uso de bajas temperaturas (5 a 10 °C), en el centrifugado es necesario para favorecer el precipitado de NPs. Sin embargo el PVA precipita fácilmente en ese mismo rango y al aumentar el tiempo de centrifugado se favorece aún más su precipitación. El tamaño promedio por SEM es de 81,10. El D_h registrado por DLS es de 119 nm y el IP de 0,10, (ver Figura 4 - 6. B).

En el lote de nanopartículas del *Protocolo 3* (tiempo 20 minutos y peso molecular: 18.267 g/mol), se observa grandes aglomerados de NPs, rodeadas de un “manto” que cubre la muestra en su totalidad. La presencia de surfactante es mayor que el encontrado en el *Protocolo 2*. Inferimos que este efecto es más pronunciado en este protocolo que en el anterior, debido al uso de un PLA de menor peso molecular, y esto permite una mayor afinidad con el PVA. Mientras más pequeñas son las cadenas poliméricas de PLA, la probabilidad de interacción con las moléculas de PVA aumenta, debido a que aumenta su equilibrio hidrofóbico/hidrofílico y por lo tanto sus propiedades de superficie están más activas. Es por ello que la precipitación se genera por asociación entre ellas, formando ese manto que se observa en las micrografías.

Los tamaños por SEM son de aproximadamente $67,35 \pm 15,33$ (ver Figura 4 - 6., C); mientras que el D_h registrado por DLS es de 183,53 y un IP de 0,21. Al realizar el análisis por DLS, se observó la formación de un aglomerado alrededor de la zona de los 5 000 nm.

Realizadas estas observaciones, seleccionamos las condiciones experimentales utilizadas en el *Protocolo 1* (tiempo de centrifugado 20 minutos y peso molecular: 24.484 g/mol), como idóneas para realizar la encapsulación del ExpBA.

4.2.2 Encapsulación del extracto de piel batata en nanopartículas de PLA.

La eficiencia de encapsulación (E.E %) es un parámetro que depende de las interacciones polímero – ExpPBA, así como también de la partición de la sustancia a encapsular entre la fase acuosa y la fase orgánica.

La E.E (%) del ExpPBA, fue evaluada observando el efecto que tiene el sistema de solventes de la fase orgánica, el peso molecular del PLA, la velocidad y tiempo de centrifugación y la concentración del extracto.

La curva de calibración obtenida con el ExpPBA y utilizada para realizar la cuantificación, del componente no encapsulado se muestra en la Figura 4 - 7., de esta se obtuvo la siguiente expresión matemática: $y = 0,0042x + 0,0113$. Con los datos obtenidos se determinó la E.E (%), utilizando la ecuación:

$$E.E(\%) = \frac{\text{Cantidad total de compuesto} - \text{compuesto no encapsulado}}{\text{Cantidad total de compuesto}} \times 100$$

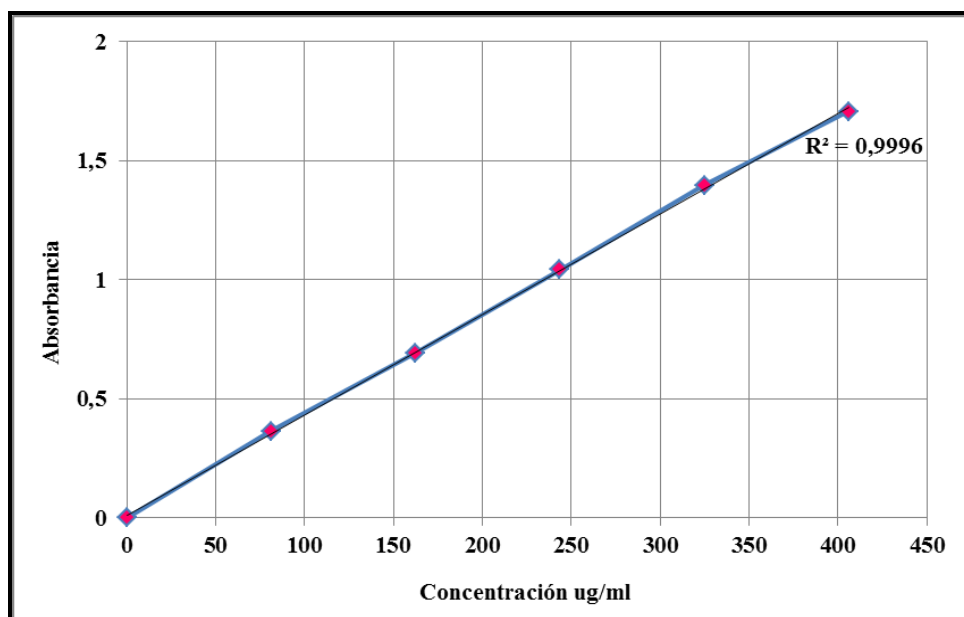


Figura 4 - 7. Curva de calibración para el extracto metanólico de la piel de la batata.

A. Ensayos de Optimización de solventes para la encapsulación del ExpBA.

A partir del Protocolo 1 (tiempo de centrifugado 20 minutos y peso molecular 24.484 g/mol), se procedió a encapsular el extracto obtenido de la piel de la batata, utilizando en la fase orgánica tres distintos sistema de solventes (Ver Figura 4 - 8.). Los sistemas se caracterizaron por SEM, DLS y se calculó la eficiencia de encapsulación en porcentaje (E.E %).

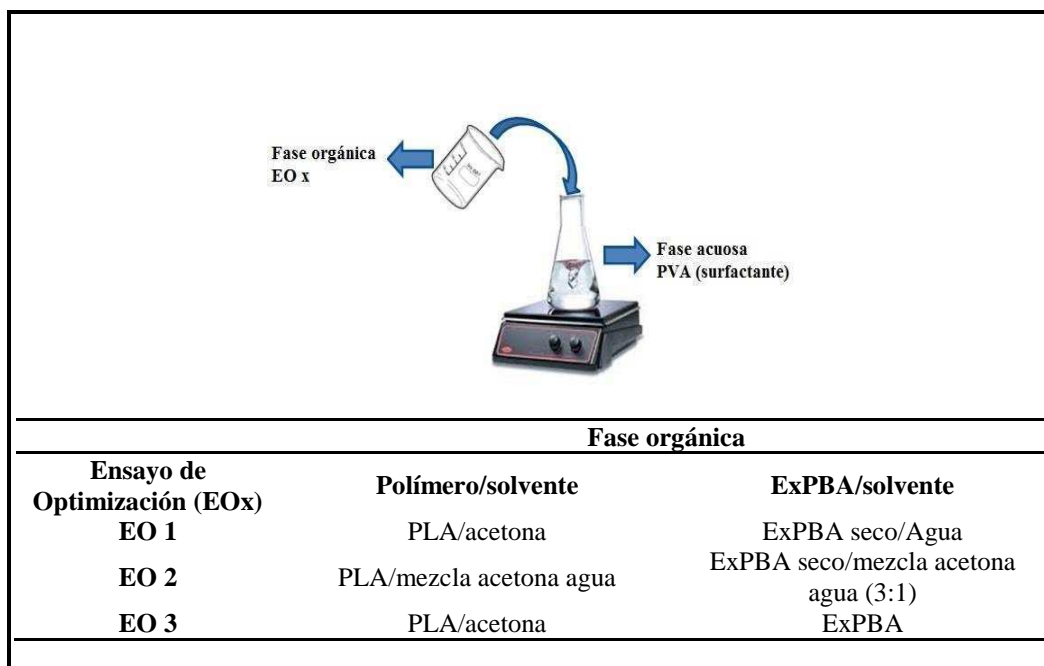
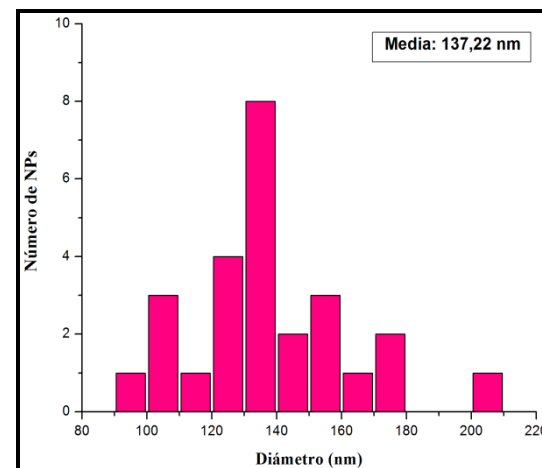
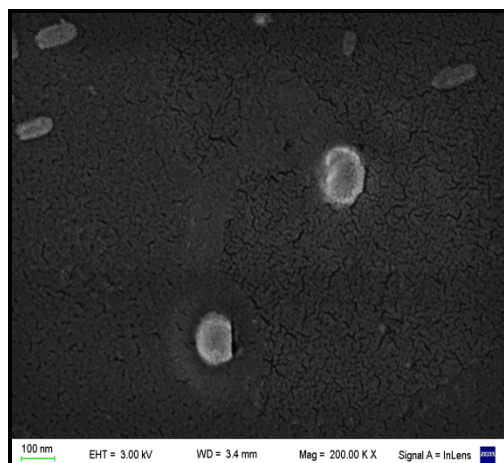
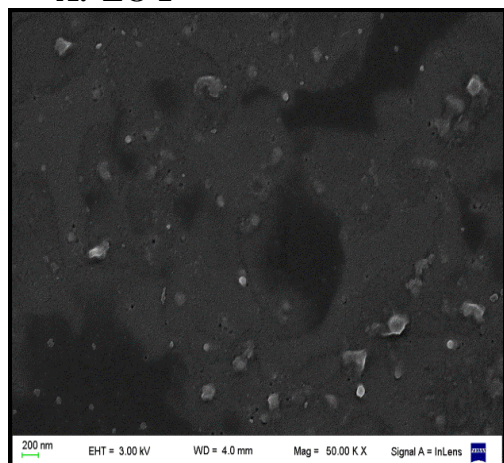


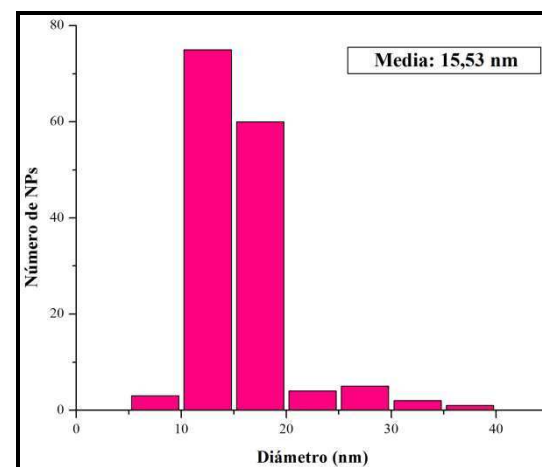
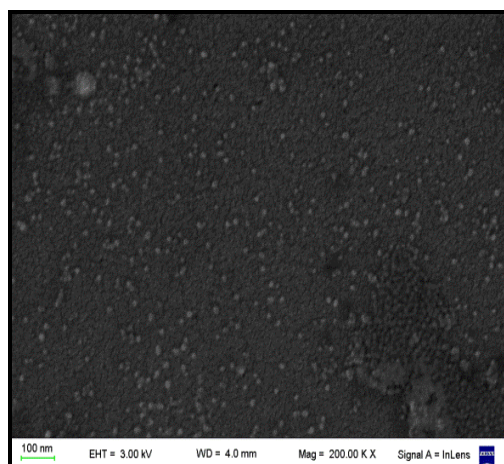
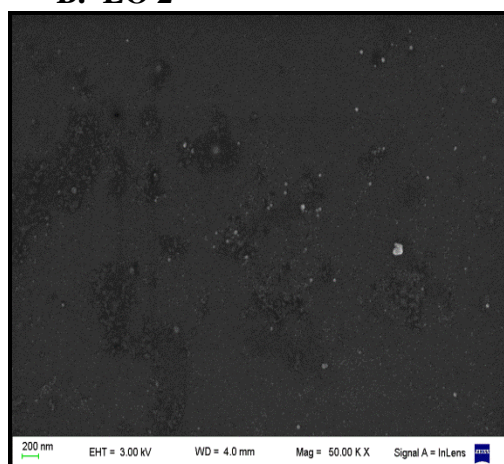
Figura 4 - 8. Sistemas de solventes utilizados para optimización de la fase orgánica en la encapsulación del extracto de la piel de batata.

El *EO 1* (ensayo de optimización) permitió obtener NPs de formas esféricas, (ver Figura 4 - 9 A). Las NPs obtenidas en este lote presentan un tamaño superior al obtenido en los otros ensayos. El tamaño medio para este lote evaluado por SEM, es de aproximadamente 137,22 nm.

A. EO 1



B. EO 2



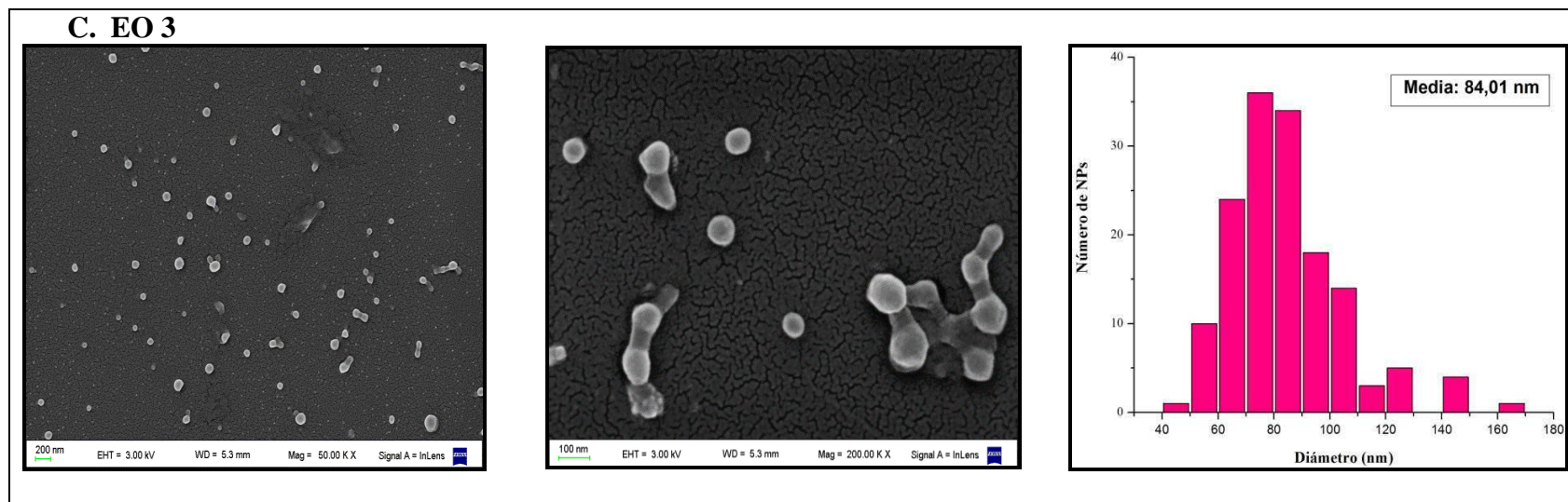


Figura 4 - 9. Fotografías obtenidas por SEM (x 50 y 200), para cada protocolo. A la derecha de cada fotografía se observa la distribución de tamaño derivada de las imágenes SEM.

Tabla 4 - 3.

Parámetros obtenidos para la evaluación de tres síntesis de nanopartículas, realizadas para optimización del método Emulsificación- evaporación.

	SEM			DLS		
	Media	Desviación estándar	Error estándar	Diámetro hidrodinámico	Desviación estándar	Índice de Polidispersidad
EO 1	137,22	24,28	4,76	183,93	76,83	0,27
EO 2	15,53	4,31	0,35	586,00	194,35	0,11
EO 3	84,01	20,29	1,66	120,83	34,84	0,11

Para SEM, se evaluó: media, desviación estándar y error estándar y para DLS: diámetro hidrodinámico, desviación estándar e índice de polidispersidad. Datos expresados en nanómetros (nm).

Los tamaños por DLS alcanzaron un D_h de aproximadamente 183,93 nm. El índice de polidispersidad (IP) es de 0,27 lo que nos indica que la población no fue homogénea tendiendo a ser polidispersa, y esto se corrobora al observar la Figura 4 - 10., en la cual se evidencia que para este ensayo también existe una población importante de NPs en la zona de los 300 nm. Así también se da la formación de un pico en la zona de los 5 μm debida a la presencia de aglomerados de surfactante residual (PVA). Para este ensayo se obtuvo una E.E (%) de 79,74%.

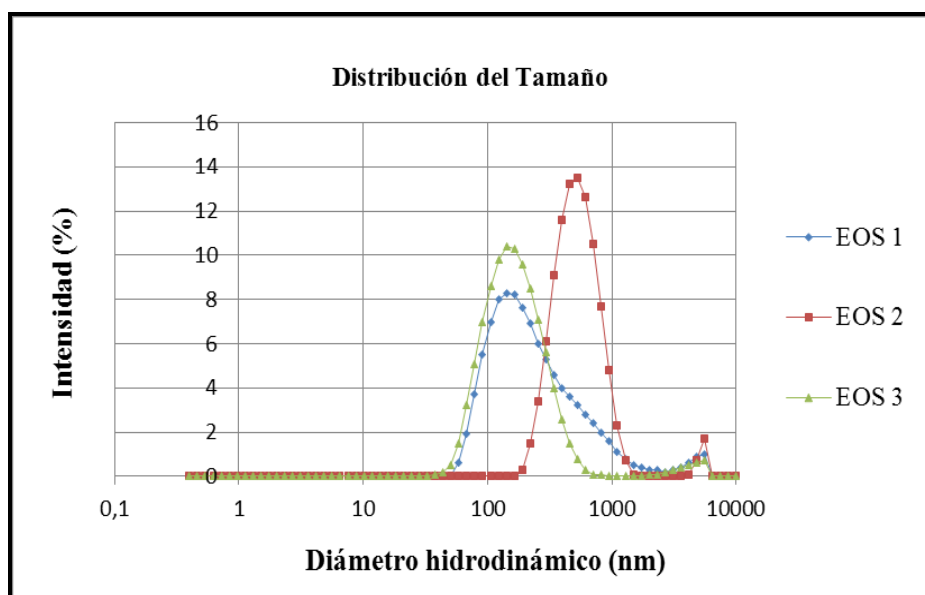


Figura 4 - 10. Distribuciones de tamaños de NPs (por intensidad), para los ensayos de optimización.

En el caso del *EO 2*, las NPs presentaron morfologías esféricas y tamaños para SEM entre aproximadamente 10 a 40 nm (Figura 4 - 9 B). El hecho de obtener NPs de tamaños pequeños utilizando un sistema de solvente acetona - agua podría justificarse debido a que la acetona al ser miscible en agua afecta el tamaño de gota del polímero en la fase acuosa y, por lo tanto, conduce a un tamaño de partícula más pequeño.

Cuando se realizó la evaluación por DLS, se observa la formación de aglomerados cuyos tamaños son de aproximadamente 500 nm y un IP de 0,11. La formación de estos aglomerados en partículas de tamaño tan pequeños, se debe a que estas tienen una mayor

área y por lo tanto mayor energía superficial. Para disminuir esta energía superficial crean aglomeraciones (fuerzas de Van der Waals atractiva entre partículas) para ser más estables.

Para este ensayo se observa que la E.E (%) es baja con respecto al anterior, (40,48 %). Esta baja eficiencia podría explicarse debido a la proporción de solventes (relación 3:1, acetona - agua), utilizada para solubilizar los componentes de la fase orgánica. Si bien el extracto es soluble en agua, no lo es totalmente en acetona, y por lo tanto los componentes no solubles en esta última migraron hacia la fase acuosa disminuyendo la cantidad atrapada dentro de las NPs.

El *EO 3* presentó NPs con morfologías esféricas y superficie regular (Figura 4 - 9 C). El metanol presente en el extracto influyó positivamente evitando la formación de aglomerados, esto debido a la baja afinidad de este solvente con el PLA, permitiendo una mejor organización de las cadenas del polímero. La viscosidad del metanol (0,59 cp. a 20 °C), podría también impedir la agregación mediante la estabilización de las nanopartículas de manera más eficiente (Peltonen, Koistinen, Karjala, Häkkinen, y Hirvonen, 2002). Los tamaños en este lote son homogéneos y el diámetro promedio evaluado por SEM, es de: 84,01 nm. Los tamaños por DLS alcanzaron un D_h de 120,83 nm. El IP fue de 0,11 lo que nos indica que la población es monodispersa. La E.E (%), fue del 96,08 %, siendo la más representativa en relación a los dos ensayos anteriores. Esta alta E.E%, nos sugiere que el metanol al formar parte de la fase orgánica, podría prevenir la partición de los antioxidantes hacia la fase acuosa.

En la Figura 4 - 11, se observa las diferentes E.E (%) obtenidas para cada EO, con su respectiva desviación estándar.

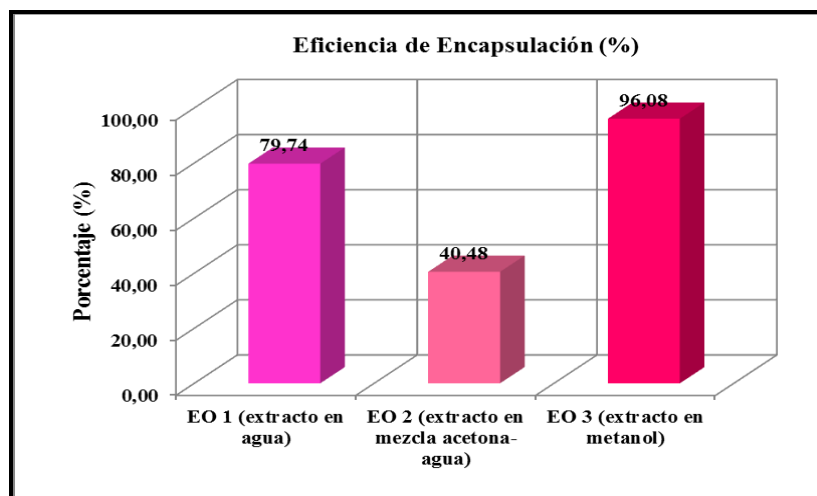


Figura 4 - 11. Eficiencias de encapsulación en porcentaje, obtenidas para diferentes ensayos.

Tabla 4 - 4.

Eficiencias de encapsulación (%)

Ensayos	E.E %
EO 1	79,74 ± 0,11
EO 2	40,48 ± 0,36
EO 3	96,08 ± 0,04

Los valores reportados son el promedio ± desviación estándar de los resultados obtenidos.

B. Ensayos sobre otras variables.

A partir del ensayo de optimización 3 (EO 3), el cual obtuvo una alta eficiencia de encapsulación, así como, morfologías y tamaños homogéneos, se realizaron modificaciones sobre otras variables, que puedan influir en la eficiencia de encapsulación. Los cambios realizados se muestran en la Tabla 4 - 5.

Tabla 4 - 5.

VARIABLES MODIFICADAS PARA EVALUAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DEL EXPBA.

	Concentración del ExpBA (%)	Peso molecular PLA (g/mol)	Velocidad de centrifugado (rpm)	Tiempo de centrifugado (min.)
Ensayo 1	20	24.484	13.000	20
Ensayo 2	20	24.484	10.000	40
Ensayo 3	20	18.267	10.000	20
Ensayo 4	60	24.484	10.000	20

- **Ensayo 1: Aumento de la velocidad de centrifugación.**

En este lote en el cual se aumentó la velocidad de centrifugación de 10.000 rpm hasta 13.000 rpm, se observó la presencia de bajas concentraciones de surfactante rodeando las NPs, la morfología de las mismas es esférica y si bien no se ven aglomeradas se observa que se encuentran formando pares (ver Figura 4 - 12 A). El diámetro promedio evaluado mediante el análisis de las micrografías fue de: 58,67 nm.

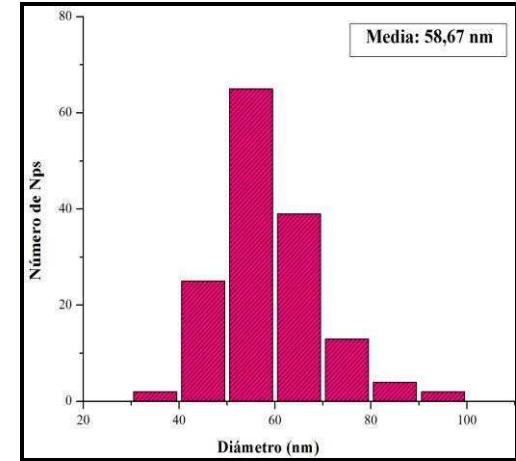
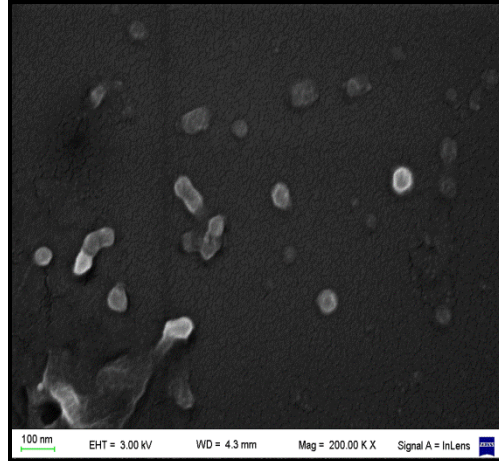
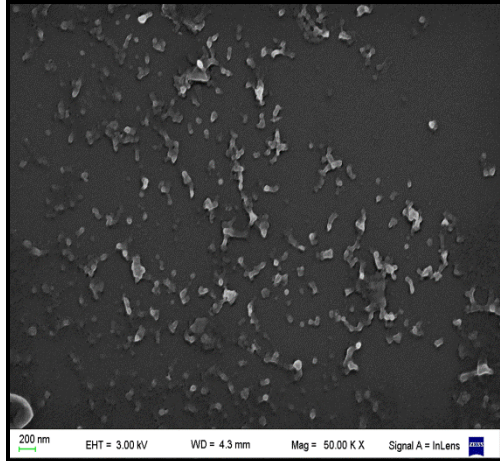
Así mismo se determinaron los tamaños por DLS que alcanzaron un D_h de 297,33; un IP de 0,36, lo que nos indica que la población es más polidispersa que en el caso del EO 3, estos tamaños son consistentes con la observación anterior de formación de pares. La E.E (%) fue de 88,63 %, observando una disminución significativa con respecto al EO 3.

- **Ensayo 2: Aumento del tiempo de centrifugación.**

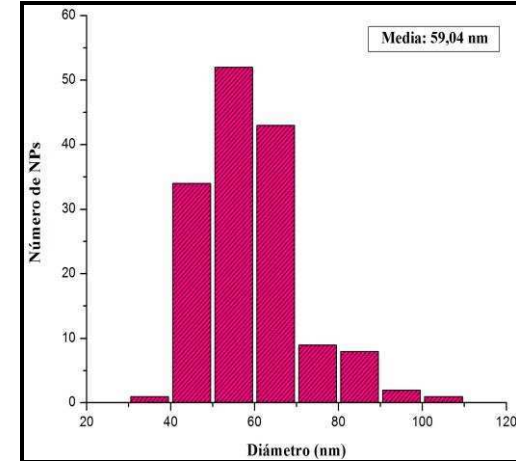
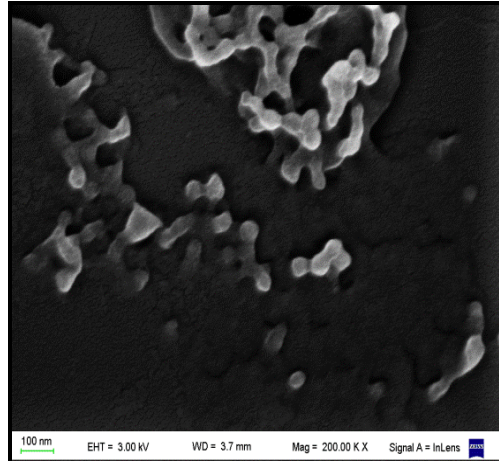
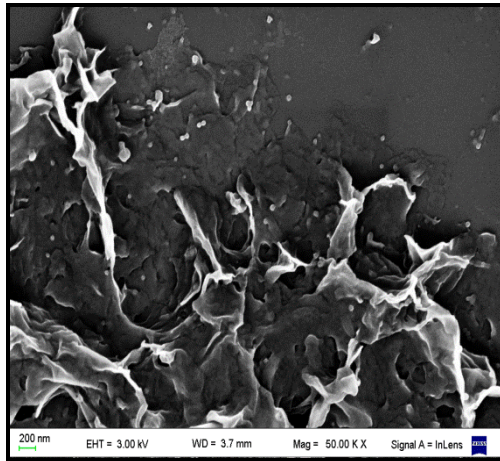
Se evidencia la presencia del surfactante (PVA) en grandes cantidades asociado a las NPs (ver Figura 4 - 12 B). Si bien la presencia de metanol en el extracto, puede favorecer que no se formen aglomerados, el aumento del tiempo (de 20 a 40 minutos) y las bajas temperaturas (5 a 10 °C) de centrifugado, siguen favoreciendo la precipitación del PVA, tal como ocurrió en la síntesis de nanopartículas sin carga en el *Protocolo 2* (dónde se aumentó el tiempo a 40 minutos).

El tamaño promedio por SEM fue de $59,04 \pm 11,80$. El D_h registrado por DLS fue de 124,27 nm y el IP de 0,20. La eficiencia de encapsulación obtenida ($92,25 \pm 1,25$), no se vio afectada significativamente con el cambio de esta variable, en relación al EO 3.

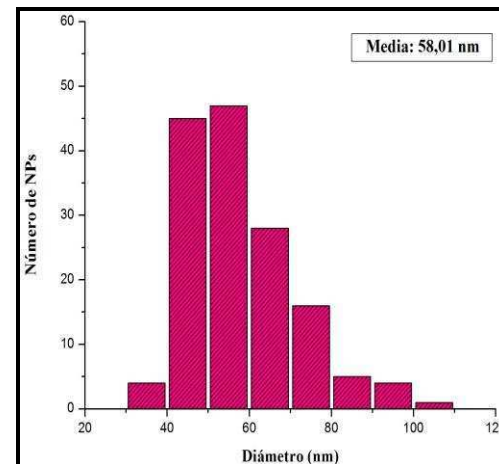
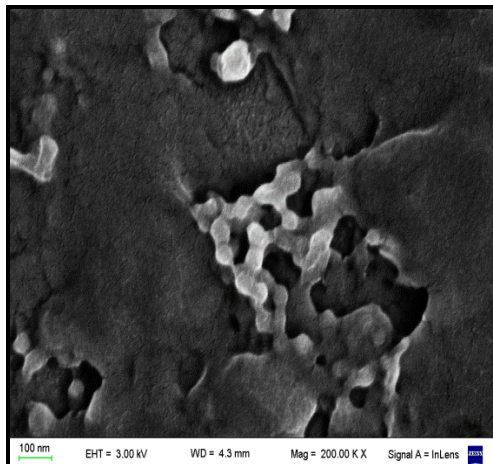
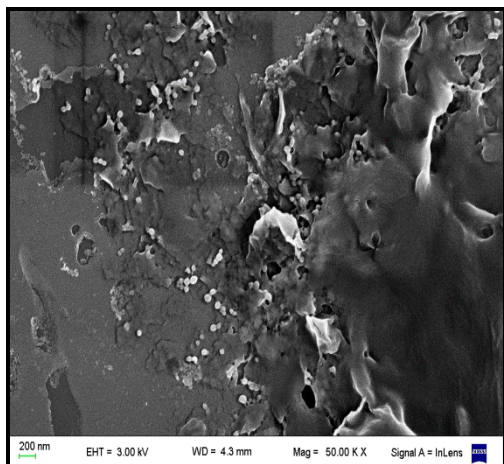
A. Aumento de la velocidad de centrifugación.



B. Aumento del tiempo de centrifugación.



C. Disminución del peso molecular.



D. Aumento de la concentración de ExpBA.

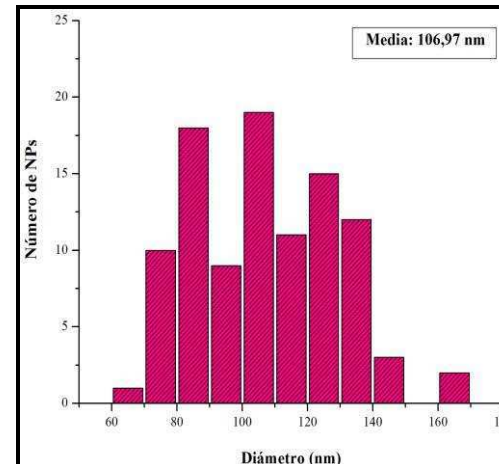
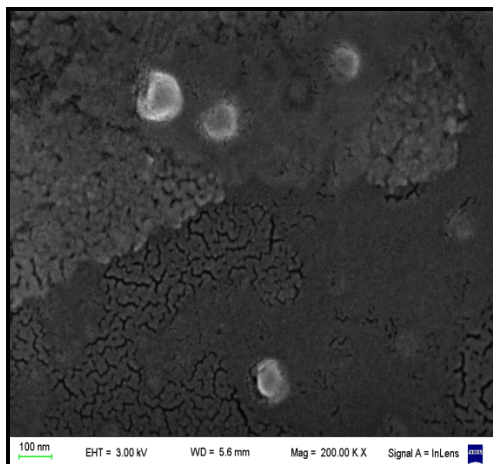
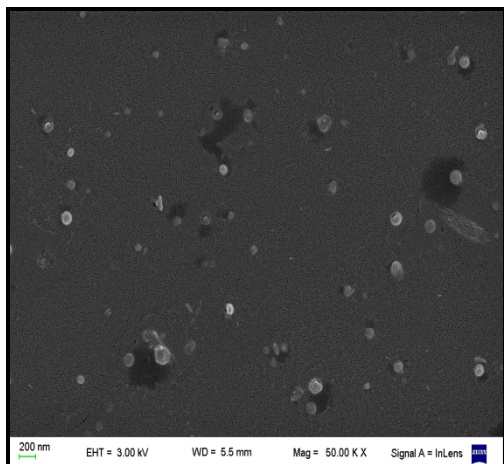


Figura 4 - 12. Fotografías obtenidas por SEM (x 50 y 200), para cada protocolo. A la derecha de cada fotografía se observa la distribución de tamaño derivada de las imágenes SEM. Datos expresados en nanómetros (nm).

Tabla 4 - 6.

Parámetros obtenidos para las síntesis realizadas para evaluar la eficiencia de encapsulación del ExpBA, mediante el método Emulsificación- evaporación.

	SEM			DLS		
	Media	Desviación estándar	Error estándar	Diámetro hidrodinámico	Desviación estándar	Índice de Polidispersidad
Aumento de la velocidad de centrifugación	58,67	10,51	0,86	297,33	167,20	0,36
Aumento del tiempo de centrifugación	59,04	11,80	0,96	124,27	46,64	0,20
Disminución del peso molecular del PLA	58,01	13,17	1,08	145,33	88,72	0,37
Aumento de la concentración del extracto	106,97	21,71	2,17	169,53	45,91	0,07

Para SEM, se evaluó: media, desviación estándar y error estándar y para DLS: diámetro hidrodinámico, desviación estándar e índice de polidispersidad. Datos expresados en nanómetros (nm).

- **Ensayo 3: Disminución del peso molecular.**

En este lote de nanopartículas, para el cual se disminuyó el peso molecular del PLA de 24.484 g/mol a 18.267 g/mol, se observan similares formaciones a las observadas en el *Protocolo 3* es decir grandes aglomerados y alta presencia de surfactante rodeando las nanopartículas. Se sigue generando una mayor interacción del PLA de menor peso molecular con el PVA, tal como se evidencia en la Figura 4 - 12 C. Los tamaños por SEM son de aproximadamente $58,01 \pm 13,17$; mientras que el D_h registrado por DLS es de 145,33, con un IP de 0,37 y una E.E (%) de 91,89 %.

- **Ensayo 4: Aumento de la concentración de ExpBA.**

Las nanopartículas de este ensayo, presentaron morfologías esféricas, no se observó la presencia de aglomerados, ni restos de surfactante (ver Figura 4 - 12 D).

Los tamaños por SEM son de aproximadamente 106,69; mientras que el D_h registrado por DLS es de 169,53, con un IP de 0,07, lo cual nos indica una población monodispersa. El aumento de la concentración del extracto podría influir en un aumento

del diámetro de la nanopartícula, tal como se registró en otras investigaciones utilizando la misma técnica, Roussaki, y col., (2014). La E.E (%) fue de 91,41.

Se observa que cuando las NPs están cargadas con el 20% y 60% del ExpBA y se mantienen las variables de tiempo 20 minutos y peso molecular 24.484 g/mol, no se forman agregados, por lo que inferimos que el aumento del tiempo, la disminución del peso y esto aunado a la bajas temperaturas utilizadas para la precipitación de las nanopartículas, tendrían una alta influencia en la formación de agregados.

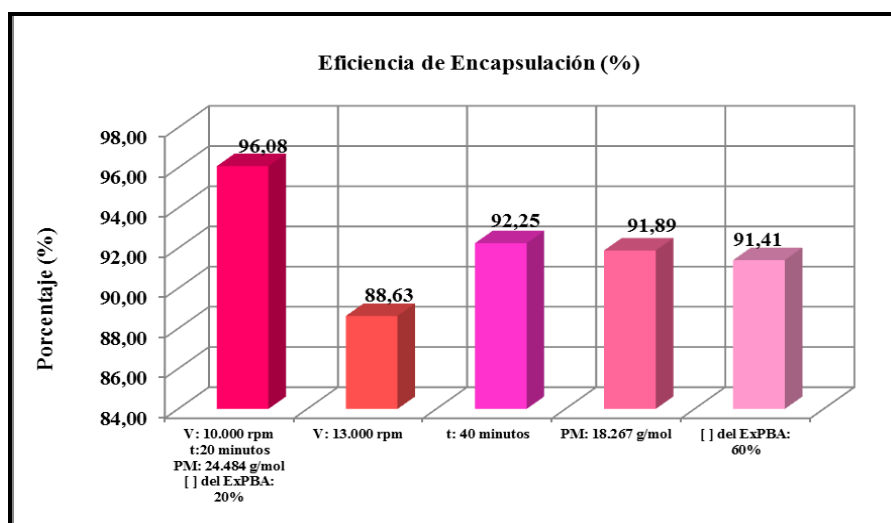


Figura 4 - 13. Eficiencias de encapsulación (%), obtenidas para diferentes ensayos. El EO3 se corresponde con los siguientes parámetros: tiempo 20 minutos, velocidad de centrifugado 10.000 rpm, peso molecular: 24.484 g/mol, concentración del ExpBA 60%.

Tabla 4 - 7.

Eficiencias de encapsulación (%).

Parámetros	E.E %
Aumento de la velocidad de centrifugación	88,63 ± 1,10
Aumento del tiempo de centrifugación	92,25 ± 1,25
Disminución del peso molecular del PLA	91,89 ± 0,91
Mayor concentración de extracto (60%)	91,41 ± 1,55

Los valores reportados son el promedio ± desviación estándar de los resultados obtenidos.

Conforme lo observado, las variables propuestas (aumento de tiempo y velocidad de centrifugado, disminución de peso molecular y aumento de la concentración), no interfieren en la eficiencia de encapsulación.

4.2.3 Porcentaje de rendimiento.

Este porcentaje se calculó para las nanopartículas obtenidas de:

- *Protocolo 1*, (NPs sin carga),
- Ensayo de optimización 3 (EO 3), (NPs cargadas con el 20% de ExpBA), y
- Ensayo en el que se aumentó la concentración del extracto (NPs cargadas con el 60 % de ExpBA);

en los cuales se observó un predominio en la masa de nanopartículas y una mínima masa de surfactante (PVA), acompañando a las mismas. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 4 - 8.

Tabla 4 - 8.

Rendimientos (%) obtenidos para tres diferentes ensayos

Ensayo	Rendimiento %
Nanopartículas sin carga	7,72 ± 0,13
Nanopartículas carga 20% de ExpBA	13,80 ± 1,10
Nanopartículas carga 60 % de ExpBA	20,00 ± 0,44

Los valores reportados son el promedio ± desviación estándar de los resultados obtenidos.

Si bien los rendimientos obtenidos para NPs de PLA sin carga fueron bajos, comparados con otras investigaciones que utilizaron técnicas similares (Maharana, Mohanty, y Singh Negi, 2010; Xin-yu, Chun-shan, y Ke-wen, 2003), las mismas que obtuvieron rendimientos superiores al 20 %, podemos observar que el rendimiento se eleva conforme se aumenta la concentración del compuesto encapsulado.

4.2.4 Caracterización de Films.

La incorporación efectiva de nanopartículas cargadas con el ExpBA en la matriz de un PLA de alto peso molecular (200.000 g/mol), fue evaluada observando las superficies de fractura por microscopia electrónica de barrido.

Para elaborar los films se utilizaron las NPs del ensayo de optimización 3 (EO 3), el mismo que prestó los siguientes parámetros:

- Peso molecular del PLA: 24.484 g/mol
- Velocidad de centrifugado: 10.000 rpm
- Tiempo de centrifugado: 20 minutos.
- Tamaño: por SEM: $84,01 \pm 20,29$ nm, y por DLS $120,83 \pm 34,84$.
- Eficiencia de encapsulación(%): $96,08 \pm 0,04$

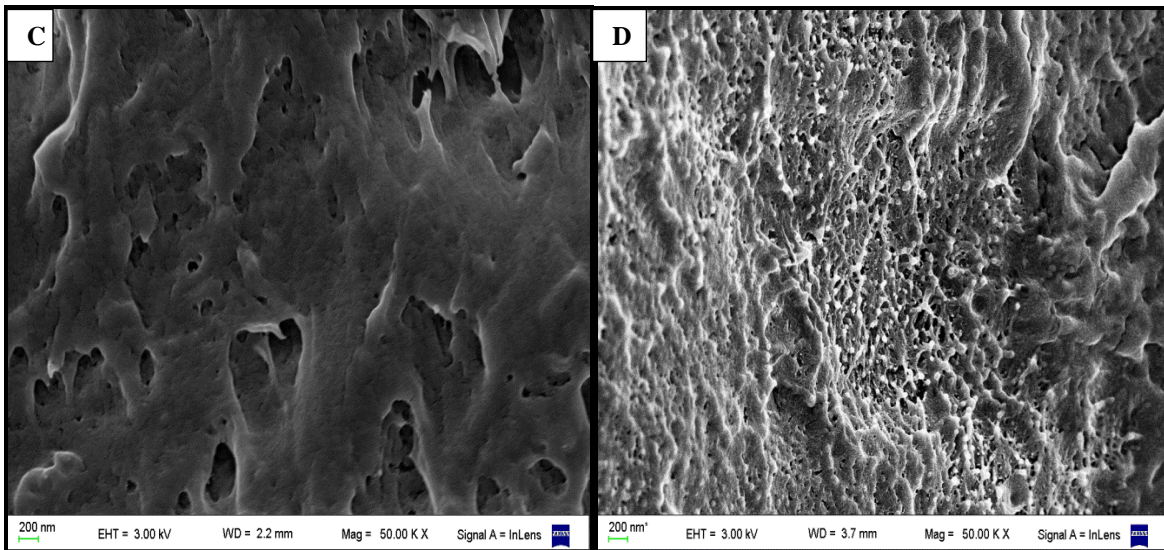
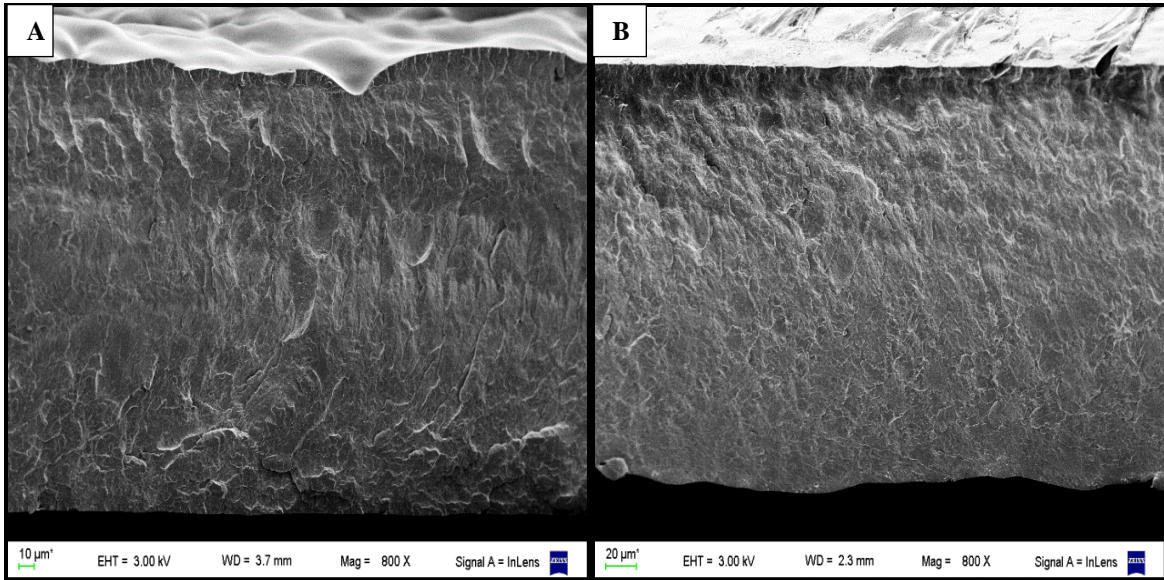
asi mismo, fueron elaborados films sin nanopartículas para determinar diferencias entre ellos.

Las micrografías obtenidas se muestran en la Figura 4 - 14. Se observa que micrométricamente no existen diferencias en su estructura tanto para el film sin carga Figura 4 - 14. A, como el film cargado Figura 4 - 14. B.

En la Figura 4 - 14. C, se presenta la superficie de fractura del film de PLA, a escala nanométrica (50.00KX), se puede apreciar que la estructura es porosa (los poros se forman a partir del proceso de vaporización del DCM durante el proceso de fabricación), obsérvese que la estructura del mismo difiere considerablemente con el film con NPs cargadas con el ExpBA (ver Figura 4 - 14. D), en el cuál se observan las NPs con una morfología esférica, y presentan un tamaño inferior a 100 nm. Se observó que la distribución fue homogénea, aunque se detectó que en la zona de fractura las NPs tendieron a agruparse linealmente (Figura 4 - 14. E).

También se pudo visualizar la compatibilidad entre el PLA comercial utilizado para la matriz y el PLA sintetizado en el laboratorio con el cual se preparó las NPs, (Figura 4 -

14. F), observándose que no hubo separación de fases entre la matriz polimérica y las NPs cargadas con el ExPBA.



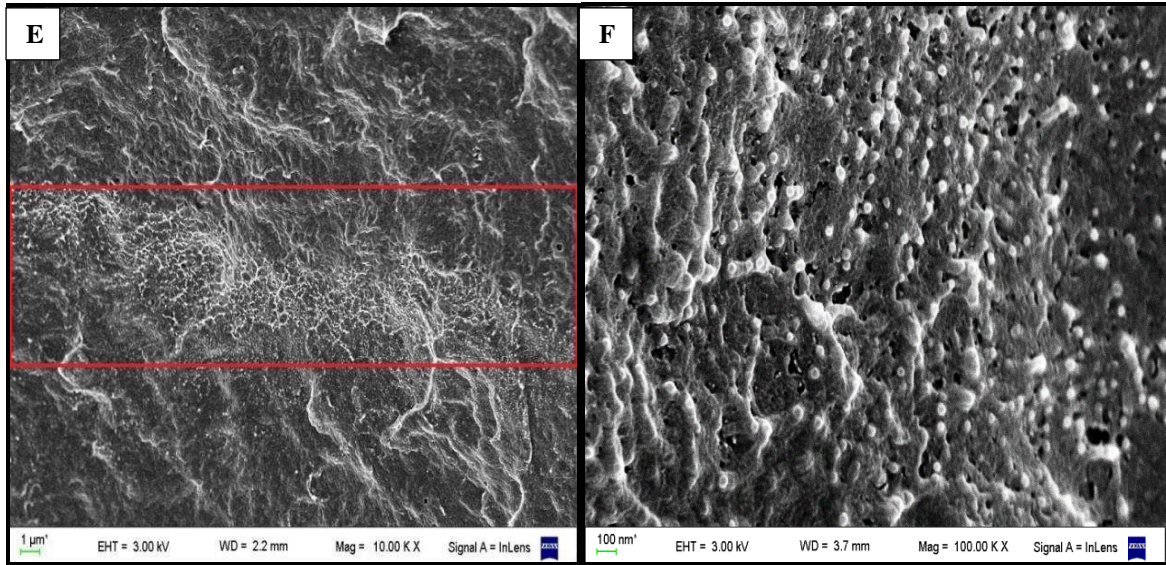
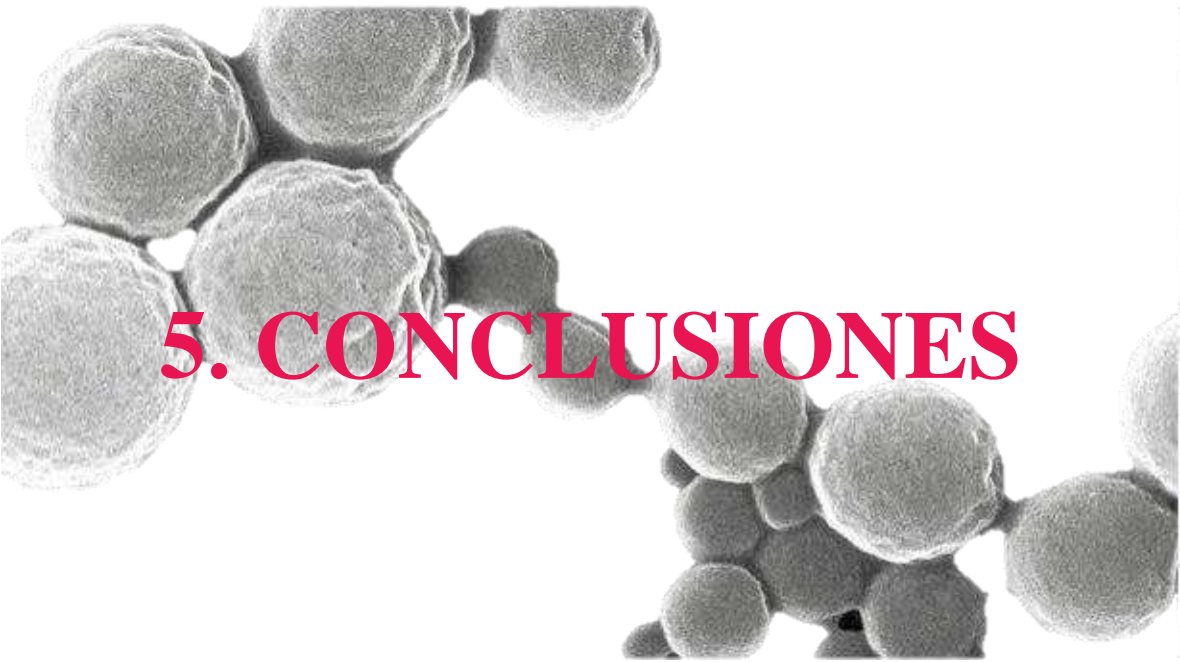


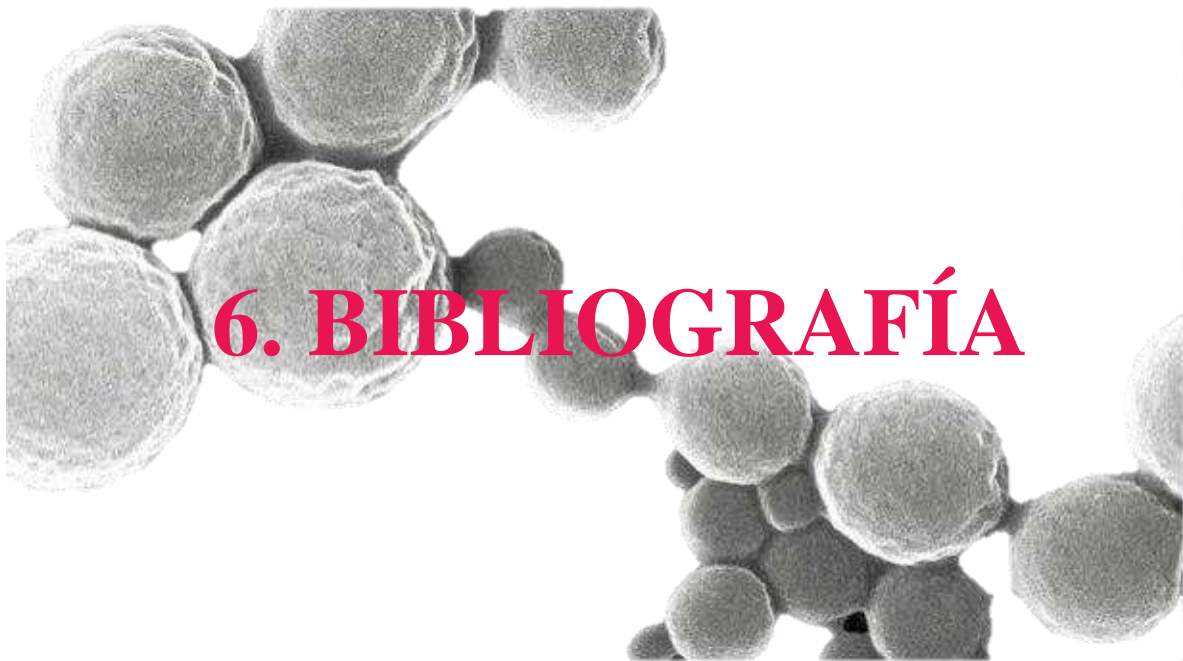
Figura 4 - 14. Estructura de la superficie de fractura del film de PLA sin carga y film con nanopartículas cargadas con ExpBA.



Al finalizar este trabajo, concluimos:

- La piel de batata (variedad Arapey) representa una excelente fuente de compuestos bioactivos, los cuales gracias a su alta capacidad antioxidante pueden ser utilizados como potentes agentes para la preservación de alimentos.
- Los compuestos antioxidantes del extracto de piel de batata, presentan una estabilidad térmica hasta aproximadamente los 130°C, razón por la cual puede ser perfectamente utilizado en técnicas de encapsulación que no excedan esta temperatura.
- Así mismo gracias a la estabilidad térmica de extracto de la piel de batata, es posible su uso en procesos industriales que no excedan estas temperaturas.
- Generalmente la piel de la batata no es consumida, y es un recurso presente en forma abundante en la zona y el cual actualmente no es aprovechado industrialmente, es evidente que a partir de ella podría realizarse una extracción y aislamiento de ácido fenólicos los cuales se encuentran en altas concentraciones. Es preciso recalcar que estos ácidos en el comercio presentan un valor económico elevado, tal es el caso de ácido clorogénico cuyo costo para 250 mg es de aproximadamente 91,00 USD (dólares americanos).
- Utilizando un PLA de bajo peso molecular sintetizado en el laboratorio fue posible la obtención de nanopartículas de tamaños óptimos para encapsulación de compuestos bioactivos, lo cual es interesante pues puede ser utilizado como “nanocarrier” para fármacos de uso *in vivo*, los cuales deben poseer tamaños inferiores a 200 nm, y una distribución de tamaño estrecha para cruzar las barreras endoteliales.
- Los tamaños de NPs oscilaron entre 15 a 140 nm al realizar la medición por microscopía electrónica de barrido y entre 120 a 586 nm para mediciones por DLS y los índices de polidispersidad indicaron que se obtuvieron poblaciones homogéneas.
- Los resultados obtenidos muestran que los cambios en la composición de los solventes de la fase orgánica influyen significativamente no solo en la eficiencia de encapsulación sino en la morfología y tamaño de las nanopartículas.

- El método de emulsificación evaporación permitió una correcta carga del extracto de la piel de batata variedad Arapey en nanopartículas de ácido poliláctico de bajo peso molecular, permitiendo obtener altas eficiencias de encapsulación.
- En la síntesis de nanopartículas sin carga, parámetros como tiempo de centrifugado y peso molecular tienen un efecto importante en el proceso, afectando su morfología así como una mayor formación de agregados. Sin embargo la eficiencia de encapsulación no es afectada mayormente al realizar cambios sobre estos parámetros.
- Gracias a la compatibilidad observada entre el PLA comercial utilizado para la matriz y el PLA sintetizado en el laboratorio con el cual se preparó las NPs, es viable la formulación de materiales compuestos de ácido poliláctico con las nanopartículas previamente cargadas con antioxidantes.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Auras, R., Lim, L.-T., Selke, S., & Tsuji, H. (2011). *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Belay, A., & Gholap, A. (2009, November,). Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 234-240.
- Ikada, Y., & Tsuji, H. (2000). Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 117–132.
- Mutsuga, M., Kawamura, Y., & Tanamoto, K. (2008, Octobre). Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide food contact materials. *Food Additives & Contaminants: Part A, Vol. 25*(10), 1283–1290.
- Xin-yu, J., Chun-shan, Z., & Ke-wen, T. (2003). Preparation of PLA and PLGA nanoparticles by binary organic solvent diffusion method. *Journal of Central South University of Technology- Springer*, 10 (3), 202-206.
- Auras, R., Lim, L.-T., Selke, S., & Tsuji, H. (2011). *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Bellail, A., Shaltout, O., Youssef, M., & El Gamal, A. (2012). Effect of Home-Cooking Methods on Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Cultivars Grown in Egypt. *Food and Nutrition Sciences*, 490-499.
- Benjamin, A. C. (2007). Sweet potato: a review of its past, present, and future role in human nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1-59.
- Brewer, M. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 223-247.

- Chao, J., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, W., & Tai Zhang, B. (2014). Survey on the Complexation Character of p-sulfonatocalix[n]arenes and Caffeic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 132, 152–159.
- Chao, J., Wang, H., Zhao, W., & Zhang, M. (2012). Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 277–282.
- Chaves, M., Maiocchi, M., Sgroppo, S., & Avanza, J. (2002). Actividad antioxidante de infusiones de yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Información Tecnológica*, 3-7.
- Cusumano, C., & Zamudio, N. (2013). *Manual técnico para el cultivo de batata (camote o boniato) en la provincia de Tucumán (Argentina)*. INTA EEA FAMAILLÁ.
- Danhier, F., Feron, O., & Pr at, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148, 135–146.
- Duncan, T. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Applications of nanotechnology in food packaging and food safe Journal of colloid and interface science*, 1-24.
- Formiga, F., Ansorena, E., Hermoso, A., Imbuluzqueta, E., Gonz alez, D., & Blanco Prieto, M. (2009). Nanosistemas a base de poli esteres. En R. A. Farmacia, *Nanotecnolog a Farmac utica. Realidades y Posibilidades Farmacoterap uticas*. (p ags. 41-101). Espa a: Vila Jato.
- Fritsch. (2010). *FRITSCH GmbH*. (Z. u. AG, Producer) Recuperado Junio 26, 2016, de FRITSCH Milling and Sizing: <http://www.fritsch-sizing.es>
- Fu, Z.-f., Tu, Z.-c., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q.-h., & Huang, T. (2016). Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*, 15, 11-18.

- García, N., Dufresne, A., Aranguren, M., & Goyanes, S. (2008). Thermoplastic cassava starch-waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. In Z. Jimenez, *Recent Advances in Research on Biodegradable Polymers and Sustainable Composites* (Vol. 2, pp. 113-121). Nova Publishers.
- García, A. M. (2012). *Síntesis y solubilización de quantum dots: su aplicación al desarrollo de sensores químicos luminiscentes*. Tesis doctoral.
- García, N. L., Lamanna, M., D'Accorso, N., Dufresne, A., Aranguren, M., & Goyanes, S. (2012). Biodegradable materials from grafting of modified PLA onto starch nanocrystals. *Polymer degradation and Stability*, 97, 2021-2026.
- Gasco, P. L. (2011). *Preparación, caracterización y evaluación biológica de nanopartículas poliméricas para la liberación controlada del Paclitaxel*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 1-9.
- González Seligra, P., Eloy Moura, L., Famá, L., Druzian, J. I., & Goyanes, S. (2015). Influence of incorporation of starch nanoparticles in PBAT/TPS composite films. *Wiley Online Library*, 65, 938-945.
- Green. (2002). Polímeros de fermentación. Los ácidos poliláctico y sus precursores, ácidos láctico. *Real. Chim.*, 79-82.
- Guo, G. K. (2012). Green nanotechnology of trends in future energy: a review. *International Journal of Energy Research*, 1-17.
- Hussein, A. K. (2015). Applications of nanotechnology in renewable energies—A comprehensive overview and understanding. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 460-476.

- INTA, I. d. (Abril de 2011). *PortalAntioxidantes*. Obtenido de Primer portal de antioxidantes, alimentos y salud en el mundo de habla hispana: www.PortalAntioxidantes.com
- Islam, M., Yoshimoto, M., & Yamakawa, O. (2003). Distribution and Physiological Functions of Caffeoylquinic Acid Derivatives in Leaves of Sweetpotato Genotypes. *Journal of Food Science*, 68(1), 111-116.
- Jamshidian, M., Arab Tehrani, E., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S. (2010). Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 552-571.
- Jawahar, N., & Meyyanathan, S. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 1, 217-223.
- Joseph, T., & Morrison, M. (2006, Abril). *Nanoforum website*. Recuperado Abril 19, 2016, de Nanoforum consortium: www.nanoforum.org
- Jung, J.-K., Lee, S.-U., Kozuk, N., Levin, C., & Friedman, M. (2011). Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29-37.
- Kaplan, D. L. (1998). *Biopolymers from renewable resources* (1 ed.). Springer.
- Kumari, A., Kumar Yadav, S., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Review. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Lal Pal, S., Jana, U., Manna, P., & Moha, G. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 228-234.

- Lassalle, V., & Luján Ferreira, M. (2007). PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromolecular Journals*, 767–783.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 288-306.
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 26–39.
- Limé, F., & Irgum, K. (2007). Monodisperse polymeric particles by photoinitiated precipitation polymerization. *Macromolecules*, 1962-1968.
- Maharana, T., Mohanty, B., & Singh Negi, Y. (2010). Preparation of Poly(Lactic Acid) Nanoparticles and Optimization of the Particle Size. *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*, 100-109.
- Martí, H., Corbino, G. B., & D Chludil, H. (febrero - marzo de 2011). La batata: el redescubrimiento de un cultivo. *Ciencia hoy*, 21 número(121), 17-23.
- Mattila, P., & Hellström, J. (2007, Abril). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 152-160.
- NanoComposix. (2012, Septiembre). *NANOCOMPOSIX.COM*. Recuperado Octubre 25, 2015, de <http://nanocomposix.com/products/dynamic-light-scattering-dls-nanoparticle-analysis>
- Niaounakis, M. (2015). *Biopolymers: Applications and Trends*. United States of America: William Andrew.
- Okada, M. (2002). Chemical syntheses of biodegradable polymers. 2002, 27,. *Progress in Polymer Science* , 87-133.
- Oki, T., Osame, M., Masuda, M., Kobayashi, M., Furuta, S., Nishiba, Y., . . . Suda, I. (2003). Simple and Rapid Spectrophotometric Method for Selecting Purple-Fleshed

- Sweet Potato Cultivars with a High Radical-Scavenging Activity. *Breeding Science*, 101-107.
- Organization, F. F. (2011). *FAOSTATDatabase*. Recuperado Diciembre 10, 2015, de: <http://faostat.fao.org>.
- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 10-36.
- Padda, M. S. (2006). *Phenolic Acid Composition and Antioxidant Activity of Sweet potatoes [Ipomoea batatas (L.) Lam.]*. Tesis doctoral, Louisiana State University, Departamento de Horticultura, , Baton Rouge, USA.
- Padda, M., & Picha, D. (2008). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweet potato genotypes. *Scientia Horticulturae*, 17-20.
- Peltonen, L., Koistinen, P., Karjala, M., Häkkinen, A., & Hirvonen, J. (2002). The Effect of Cosolvents on the Formulation of Nanoparticles From Low-Molecular-Weight Poly(l)lactide. *AAPS PharmSciTech*, 1883–1889.
- Pinto, C., Neufeld, R., Ribeiro, A., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8-21.
- Porras Loaiza, A., & Lopez Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 121-134.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 76-89.
- Rachmawati, H., Yanda, Y., & Rahma, A. (2016). Curcumin-Loaded PLA Nanoparticles: Formulation and Physical Evaluation. *Scientia Pharmaceutica*, 191–202.
- Rao, P. J., & Geckelera, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36 , 887–913.

- Rasal, R. M., & Janorkar, A. V. (2010). Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, 338-356.
- Rasal, R., & Hirt, D. (2009). Toughness decrease of PLA-PHBHHx blend films upon surface-confined photopolymerization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88A(4), 1079-1086.
- Reeve, M., McCarthy, S., Downey, M., & Gross, R. (1994). Polylactide Stereochemistry: Effect on Enzymatic Degradability. *Macromolecules*, 825-831.
- Robertson, G. (2008). State of the art biobased food packaging materials. In E. Chiellini, *Environmentally Compatible Food Packaging* (p. 592). Boca Raton, Boston, New York, Washington, DC: Woodhead Publishing Limited.
- Roussaki, M., Gaitanarou, A., Diamanti, P. C., Vouyiouka, S., Papaspyrides, C., Kefalas, P., & Detsi, A. (2014, June). Encapsulation of the natural antioxidants auresidin in biodegradable PLA nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 182-187.
- Sahidi, F. (2015). Antioxidants: principles and applications. In F. Sahidi, *Handbook of antioxidants for food preservation* (1 ed., pp. 1–14). Canadá: Woodhead Publishing;.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (2003). Biosynthesis, Classification, and Nomenclature of Phenolics in Food and Nutraceuticals. In F. Shahidi, & M. Naczk, *Phenolics in Food and Nutraceuticals* (p. 576). CRC Press.
- Singh, R. P. (2003, Agosto). Biodegradation of poly(ϵ -caprolactone)/starch blends and composites in composting and culture environments: The effect of compatibilization on the inherent biodegradability of the host polymer. *Carbohydrate Research*, 338(17), 1759-1769.
- Siracusa, V., Blanco, I., Roma, S., Tylewicz, U., Rocculi, P., & Dalla Rosa, M. (2012). Poly(lactic acid)-Modified Films for Food Packaging Application: Physical, Mechanical, and Barrier Behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, 390-401.

- Skoog, D. A., Leary, J. J., & Galcer, M. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (Quinta ed.). Mc Graw Hill.
- Sorrivas de Lozano, V., Morales, A., & Yañez, M. (2014). *Principios y práctica de la Microscopía Electrónica* (Primera ed.). Bahía Blanca, Argentina: E-book.
- Sun, B., & Spranger, I. (2005). Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciencia y Técnica Vitivinícola*, 59-89.
- UAM, U. A. (2008). *Campus de Excelencia Internacional*. Recuperado Mayo 2016, de Sitio Web del CEI UAM+ CSIC: <http://campusexcelencia.uam-csic.es>
- Venkatesh, R., & Sood, D. (2011). *A review of the physiological implications of antioxidants in food*. Massachusetts: Worcester Polytechnic Institute.
- Vink, E., Rábago, K., Glassner, D., & Gruber, P. (2003). Applications of life cycle assessment to Nature Works polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*, 403-419.
- Wang, T., Dong, X., Jin, Z., Su, W., Ye, X., & Lu, Q. (2015, Mayo). Pyrolytic characteristics of sweet potato vine. *Bioresource Technology*, 799-801.
- Wang, Y. (2015). *New Biomaterials Derived from Poly(lactic acids) – Novel Approaches to Combine Biodegradation, X-ray Contrast and Controlled Local Drug Release*. Tesis doctoral, Universitaire Pers Maastricht, Maastricht.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., & Wozn, L. (2010). A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. *Current Medicinal Chemistry*, 3262-3288.
- Xiao, L., Yang, G., Gauthie, M., & Wang, B. (2012). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, 247-284.

- Yamakawa , O., & Yoshimoto, M. (2001). Sweetpotato as food material with physiological functions. *I International Conference on Sweetpotato. Food and Health for the Future*, (pp. 179-185).
- Yuzhi, J., Jiang, Y., Zhai, W., & Yang, Z. (2012). Studies on antioxidant capacity of anthocyanin extract from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7046-7054.