

INCIDENCIA DEL PROYECTO EN EL PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO INSTITUCIONAL

El desarrollo de este proyecto contribuye en el fortalecimiento de nuestra institución por las siguientes razones:

- a. Fortalecimiento del cuerpo académico (Química de los alimentos y ambientales) ya que participaron al menos tres de los miembros del mismo.
- b. Se contribuyó a la formación de recursos humanos, una alumna de la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo obtuvo su título de licenciatura.
- c. Este tema que se está estudiando, tiene un alto impacto a nivel nacional e internacional, debido a que se contribuye al desarrollo de aditivos alimentarios con actividad biológica, que contribuyen al diseño y desarrollo de productos alimenticios de tipo funcional.
- d. Con esta investigación se logró tener un aditivo alimentario capaz de transportar y liberar antioxidantes obtenidos de extractos naturales de frijol y maíz, especies endémicas del país. El aditivo es una herramienta que puede mejorar el tiempo de vida de los alimentos, además de proporcionar un aporte nutritivo, para preparar alimentos saludables y con características de tipo funcional.

METAS LOGRADAS

1. Formación de recursos humanos. Se concluyó una tesis de nivel licenciatura que tienen el siguiente título:
“Síntesis y caracterización de micropartículas poliméricas biodegradables de Poli(láctico-co-glicólico) para la liberación controlada de antioxidantes”
2. Presentación de avances de resultados en XVII Congreso Nacional de Ciencias y Tecnología en Alimentos, donde se obtuvo el primer lugar a nivel nacional en la modalidad de trabajo en cartel.
3. Generación de conocimientos sobre aditivos alimentarios para el transporte y liberación de antioxidantes, obtenidos de maíz y frijol.
4. Parte de los resultados que se han obtenido de este proyecto se han analizado y enviado a una revista indizada, con el título:
“Preparation and evaluation a food additive based on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled delivery of antioxidant extract from *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*”.
5. Una vez se tenga la aceptación del trabajo en la revista indicada, se procederá a solicitar el registro de la patente del sistema de transporte y liberación de antioxidantes naturales provenientes de maíz y frijól.

Antecedentes de proyecto

La síntesis de nanopartículas requiere el uso de moléculas capaces de cumplir con requisitos necesarios para la encapsulación de diversas biomoléculas, en este caso los polímeros con aplicaciones en las áreas de salud y alimentos representan un auge importante dentro de las últimas tres décadas, principalmente en lo que es el desarrollo y estudio de polímeros sintéticos que son utilizados como componentes de matrices biocompatibles y biodegradables. Dentro de esta gama de polímeros destacan poliésteres como el ácido láctico, y copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA) debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, aspectos que vuelven a estos polímeros sintéticos un punto focal para el desarrollo de sistemas de liberación y transporte de biomoléculas.

Los factores importantes que controlan la absorción, biodisponibilidad y los mecanismos de liberación de los sistemas encapsulados, se han podido manipular con el uso de poliésteres, ya que estos se pueden modificar en cuanto a su peso molecular, grado de hidrofilia, y estequiometría de cada uno, lo cual permite controlar parámetros como la degradación, el grado de encapsulación y por ende la liberación de las moléculas encapsuladas.

El empleo de diferentes polímeros depende de las características que deseamos obtener por parte del sistema así como las biomoléculas a encapsular, ya que el polímero empleado afecta de manera importante la estructura y propiedades de las partículas, lo que a su vez condiciona sus aplicaciones y la vía de administración a utilizarse.

De manera general el uso poliésteres para la formulación de nanopartículas ofrece diversas ventajas, principalmente la protección que brinda al principio activo frente a las condiciones biológicas de degradación a las cuales está expuesto, así como permitir una liberación sostenida en el tiempo evitando de esta forma administraciones repetidas que impactan directamente en la comodidad y aceptación del consumidor.

La aplicación de la nanotecnología en el campo de la alimentación permite la elaboración de alimentos más saludables, más resistentes y de mayor durabilidad, ya que la formación de nanopartículas, nanoemulsiones y nanocápsulas, permite mejorar el valor nutricional de los productos y mejora su absorción en el cuerpo, de forma que la biodisponibilidad y dispersión de los nutrientes de interés aumenta proporcionando alimentos más saludables, nutritivos y/o con mejores características organolépticas.

Dentro de la gama de poliésteres utilizados en estos sistemas, sobresalen los poliésteres alifáticos formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico. En el caso del PLGA, este corresponde a copolímeros lineales de D,L-ácido láctico y glicólico. La amplia aceptación y utilización a nivel industrial de este polímero sintético se debe a sus atractivas propiedades, las cuales se mencionan a continuación:

- Biodegradabilidad y biocompatibilidad.
- Es un polímero aprobado por la FDA y por la Agencia Europea de Medicina (EMA) para sistemas de administración de fármacos por vía parenteral.
- Capacidad de dar lugar a formulaciones bien definidas con métodos de elaboración adaptados a una amplia variedad de biomoléculas (hidrófilas o hidrófobas).
- Capacidad de brindar protección a las biomoléculas contra la degradación.
- Liberación prolongada del principio activo.

- Posibilidad de modificar características superficiales, con el fin de mejorar las interacciones con barreras biológicas.
- Posibilidad de dirigir las nanopartículas a órganos o tejidos específicos.

Por todo ello, las nanopartículas de PLGA representan hoy en día una gran oportunidad para la administración oral de diversas biomoléculas que presentan condiciones desfavorables tales como: propiedades fisicoquímicas inadecuadas para que se lleve a cabo el proceso de absorción intestinal, problemas con la solubilidad y estabilidad, o bien una disminución de la biodisponibilidad.

OBJETIVOS

General

- El objetivo del presente trabajo consta en sintetizar y caracterizar micropartículas poliméricas de Poli(láctico-co-glicólico) para la liberación controlada de antioxidantes.

Específicos

- Utilizar el método de doble emulsificación/evaporación del disolvente para la encapsulación de extractos antioxidantes de maíz morado y frijol.
- Evaluar la estabilidad in vitro de las micropartículas transportadoras de antioxidantes.
- Evaluación in vitro de las características y cinéticas de liberación de antioxidantes.

METODOLOGIA

Extracción de antioxidantes

Preparación de las muestras

Se utilizaron como material vegetal Maíz morado (*Zea mays*) y Frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), los cuales se lavaron y secaron, posteriormente se llevó a un proceso de molienda en un mortero hasta la obtención de un polvo fino, el cual se guardó protegido de la luz y la humedad en el refrigerador hasta su posterior uso.

Preparación de los extractos

Se pesaron 5 g del material seco y pulverizado tanto del maíz morado como del frijol negro, para la extracción se les adicionaron 25 mL de agua destilada y se agitó hasta homogenizar ambas disoluciones completamente. A continuación cada una de las disoluciones tanto de maíz morado como de frijol negro se centrifugaron por 15 min a 2,500 rpm; posteriormente se incubaron a 50°C durante 5 minutos, este procedimiento de centrifugar e incubar se repitió hasta completar 3 horas, es decir que se repitieron 9 veces ambas etapas.

Finalmente se separó el sobrenadante del resto del material y se cubrieron ambos extractos con papel aluminio para protegerlos de la luz y la humedad y se dejaron reposar en el refrigerador hasta su uso.

Preparación de la disolución madre de los extractos

Para las disoluciones madre se tomaron 3.5 mL de cada uno de los extractos, tanto de maíz morado como de frijol negro y se llevaron a un volumen total de 22 mL con agua destilada, con esta disolución se realizaron los experimentos de encapsulado.

Caracterización UV-Vis de antioxidantes

Se tomó 1 mL de las disoluciones madre de cada uno de los extractos y se realizó una dilución 1:10, posteriormente se evaluó por espectrofotometría UV-Vis, con el fin de determinar las longitudes de onda de máxima absorbancia y poder a partir de ellas estandarizar una concentración constante para tener reproducibilidad en todos los preparados.

Síntesis de micropartículas y nanopartículas

Materiales

El polímero poli(D,L-láctico-co-glicólico) (DLPLG) fue obtenido de los laboratorios Sigma-Aldrich, en una proporción de ácido láctico y glicólico 50:50. Peso molecular del polímero de 24,000-38,000 Da. La acetona y el metanol fueron obtenidos de Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V. Así mismo se utilizaron disoluciones de PVA (alcohol polivinílico completamente hidrolizado, peso molecular <35,000 Da) al 0.02% y PVA al 1%, el PVA (alcohol polivinílico) para la preparación de las disoluciones fue obtenido de laboratorios Sigma-Aldrich.

Síntesis por emulsificación/evaporación

Se pesaron 0.5g del polímero Poli(D,L-láctico-co-glicólico) (DLPLG) los cuales se disolvieron en 1.5 mL de acetona por 15 minutos en agitación constante, posteriormente se agregaron 2 mL de metanol, el cual ayuda a la precipitación del polímero y esta solución corresponde a la fase oleosa; después la solución polimérica se forma al adicionar la fase oleosa por goteo muy lentamente en la fase acuosa que consta de 18.5 mL de solución acuosa de PVA (alcohol polivinílico 0.02% p/v) y 3.5 mL del extracto de antioxidante tanto de maíz morado como de frijol negro, este procedimiento se realizó en el sonicador (Ultrasonic Cleaner) durante 10 minutos.

Para la evaporación del disolvente se utilizó un evaporador rotatorio con vacío, a 30°C durante 15 minutos a 40 rpm. Finalmente se centrifugó durante 20 minutos a 4,400 rpm y se separó el sobrenadante para su posterior cuantificación.

Síntesis por doble emulsificación/evaporación

Se pesaron 0.5g del polímero Poli(D,L-láctico-co-glicólico) (DLPLG) los cuales se disolvieron en 1.5 mL de acetona por 15 minutos en agitación constante, posteriormente se agregaron 2 mL de metanol, el cual ayuda a la precipitación del polímero y esta solución corresponde a la fase oleosa; posteriormente la solución polimérica se forma al adicionarla por goteo muy lentamente en la fase acuosa que consta de 9.250 mL de disolución acuosa de PVA (alcohol polivinílico 0.02% p/v) y 1.750 mL del extracto de antioxidante tanto de maíz morado como de frijol negro, este procedimiento se realizó en el sonicador (Ultrasonic Cleaner) durante 10 minutos y esta es la primera emulsión, después se agregó la disolución anterior a 11 mL de una disolución de PVA (alcohol polivinílico) concentrada (1% p/v) con el propósito de formar la segunda emulsión.

Para la evaporación del disolvente se utilizó un evaporador rotatorio con vacío, a 30°C durante 15 minutos a 40 rpm. Finalmente se centrifugó durante 20 minutos a 4,400 rpm y se separó el sobrenadante para su posterior cuantificación.

Determinación de compuestos fenólicos totales en los extractos de maíz y frijol

Técnica de Folin-Ciocalteu para la determinación de compuestos fenólicos totales

Consiste en un ensayo espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu (F-C) que se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales (taninos, compuestos fenólicos simples, flavonoides y otros) presentes en extractos o muestras usando el reactivo Folin Ciocalteu ($3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), este ensayo se fundamenta en una reacción de oxidación / reducción; gracias al carácter reductor del reactivo F-C el cual consiste en una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una λ de 760 nm.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales en los extractos

Para cada una de las muestras problema se utilizaron 250µL de la misma y se les agregó 125µL del reactivo de Folin-Ciocalteu se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se les adicionaron 625µL de Na₂CO₃ al 20% se agitaron fuertemente y se dejaron reposar durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyeron las absorbancias a 760 nm.

Preparación de la curva patrón

Para la curva se utilizaron 10 tubos, a los primeros 7 se les agregaron 100µL, 50µL, 40µL, 30µL, 20µL, 10µL y 5µL respectivamente de una solución de ácido gálico con una concentración de 0.1g/L. Para los tubos 8, 9 y 10, se agregaron 10µL de la solución de ácido gálico con una concentración de 0.1g/L y se llevaron a un volumen de 1mL con H₂O destilada, posteriormente se tomaron volúmenes de 10µL, 5µL y 1µL respectivamente para cada uno de ellos.

Después a los 10 tubos se les agregaron 125µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se obtuvo una coloración verdosa, posteriormente se metieron al sonicador durante 5 minutos a 20°C; una vez estando fuera se les adicionaron 625µL de una solución de Na₂CO₃ al 20% y se observó una coloración azul que iba disminuyendo de intensidad en cada uno de los tubos hasta perderse el color en los últimos 3 tubos. A continuación se llevaron a un volumen de 1mL con H₂O destilada y se dejaron reposar por 2 horas. Finalmente se hizo la lectura de las absorbancias en espectro UV-Vis a 760 nm.

Para el blanco se realizó el mismo procedimiento pero en lugar de utilizar la solución de ácido gálico con una concentración de 0.1g/L, se utilizó H₂O destilada.

Técnicas de Caracterización

Espectrofotometría UV-vis

La determinación de absorbancias de los extractos de Maíz morado y Frijol negro se realizó en el espectrofotómetro Optizen pop Bio en el intervalo de 200-800nm.

Infrarrojo (IR)

La determinación de los espectros infrarrojos de las muestras se realizó en el espectrofotómetro infrarrojo Nicolet Avatar 360, usando la técnica de ATR-IR-FT, en el intervalo de 400 a 4000 cm⁻¹.

Tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula fue determinada por dispersión dinámica de luz láser empleando el equipo Nanotrak Wave.

Potencial zeta

Se realizaron medidas del potencial Zeta utilizando el equipo Zeta Plus (Brookhaven instruments copr. NY). Utilizando las siguientes condiciones: una corriente de 15.79 mA, campo eléctrico de 14.35 V/cm, tiempo de muestreo 128 µs, y longitud de onda de 657 nm, las medidas se realizaron a temperatura ambiente, en una solución acuosa a pH de 7.4.

Eficiencia de encapsulamiento

Para determinar la eficiencia de encapsulamiento se utilizaron las disoluciones acuosas obtenidas por los dos métodos de síntesis utilizados, es decir por el método de emulsificación/evaporación y doble emulsificación/evaporación, estas disoluciones se centrifugaron durante 20 min a 4,400 rpm con el fin de separar el sobrenadante, y a este se le realizó la técnica de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de compuestos fenólicos totales con la finalidad de conocer la concentración de compuestos fenólicos totales que no fueron encapsulados; por otra parte a las disoluciones madre

de cada uno de los extractos también se les realizó la cuantificación de compuestos fenólicos totales, ya que esta disolución sirvió para saber la concentración de compuestos fenólicos totales que había en la disolución sin encapsular. Finalmente el cálculo de la eficiencia de encapsulación de los antioxidantes se realizó en dos partes, primero se calculó la concentración de antioxidantes encapsulados de la siguiente manera:

$$[Disolución\ madre\ de\ los\ extractos] - [Sobrenadante] = [Encapsulado]$$

Por último para determinar la eficiencia de encapsulación se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{[Encapsulado]}{[Disolución\ madre\ de\ los\ extractos]} \times 100\% = \%Encapsulación$$

Cabe resaltar que se realizó este procedimiento para cada uno de los extractos tanto de maíz morado como de frijol negro.

Perfiles de liberación

Para realizar los perfiles de liberación se utilizaron las disoluciones acuosas obtenidas a partir del método de doble emulsificación/evaporación de ambos extractos, tanto de Maíz morado como de Frijol negro, posteriormente se centrifugaron durante 20 min a 4,400 rpm con el fin de separar el sobrenadante y dejar únicamente el precipitado que se formó, a este precipitado se le agregaron 10 mL de HCl 0.1 M, a partir de aquí se tomó la primer muestra de 500 μ L que fue etiquetada como tiempo 0, posteriormente se centrifugó durante 10 min a 4,400 rpm, después de este tiempo se tomó una alícuota de 250 μ L y a esta se le realizó la técnica de Folin-Ciocalteu; las siguientes muestras se tomaron a los siguientes tiempos 1, 3, 24, 48 y 72 h y se les realizó el mismo procedimiento de centrifugar durante 10 min a 4,400 rpm, después tomar una alícuota de 250 μ L y realizarle la técnica de Folin-Ciocalteu, con la finalidad de conocer la cantidad en mg/L de compuestos fenólicos liberados a diferentes tiempos.

Cabe aclarar que a partir del tiempo 0 y mientras transcurría el tiempo para tomar las siguientes muestras, cada uno de los extractos con el HCl 0.1 M se mantenían en agitación constante en la parrilla a una velocidad de 20 rpm.

RESULTADOS

Caracterización del extracto antioxidante

Descripción fisicoquímica

pH: El extracto de maíz morado presento un pH de 6.0, mientras que el extracto de frijol negro presento un pH de 5.7.

Espectrofotometría UV-Vis: En la figura 1 se muestra el espectro de absorbancia de los extractos de Maíz morado y Frijol negro, en él se puede observar una banda ancha de absorción de gran intensidad después de los 250 nm y hasta los 380 nm aproximadamente, dicha región de absorción es característica de sistemas conjugados con transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$, y de transiciones $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $p \rightarrow \pi^*$ y $p \rightarrow \sigma^*$, representados por ejemplo por los grupos carbonilo o dienos. Es importante recalcar que los extractos de Maíz morado y Frijol negro son sistemas complejos con una gran variedad de moléculas, y aunque no es posible atribuir las bandas de absorción a grupos específicos; si podemos relacionar estas señales con los compuestos fenólicos totales que estamos midiendo puesto que dentro de su estructura se encuentran grupos carbonilo o dienos.

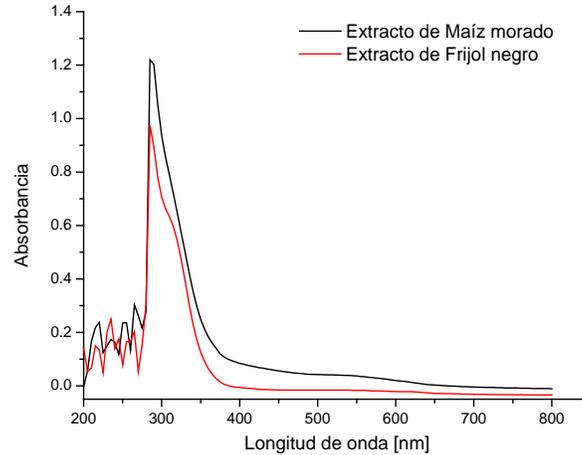


Figura 1. Espectro UV-Vis de los extractos de maíz morado y frijol negro.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales: curva patrón

En la Tabla 1 se muestran las absorbancias obtenidas a partir de la curva patrón, la cual se realizó utilizando al ácido gálico como material de referencia.

Tubo	Concentración (mg/L)	Absorbancia
1	10	1.246
2	5	0.645
3	4	0.503
4	3	0.397
5	2	0.260
6	1	0.108
7	0.5	0.038
8	0.1	0.020
9	0.05	0.021
10	0.01	0.017

Las concentraciones de compuestos fenólicos totales se obtuvieron con una ecuación que se calculó mediante regresión lineal.

$$\text{Concentración}\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{\text{Abs} - 0.00107}{0.1256}$$

Nota: Esta curva se empleó en la determinación de la concentración de compuestos fenólicos totales de las pruebas de eficiencia de encapsulado y los perfiles de liberación.

Concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto: En la Tabla 2 se muestran las concentraciones en [mg/L] de compuestos fenólicos totales obtenidas a partir de las disoluciones madre de cada uno de los extractos, tanto de Maíz morado como de Frijol negro.

Tabla 2. Concentración en mg/L de compuestos fenólicos totales en los extractos	
	Concentración [mg/L]
Disolución madre de Maíz morado	5.08 ± 0.10
Disolución madre de Frijol negro	14.37 ± 0.60

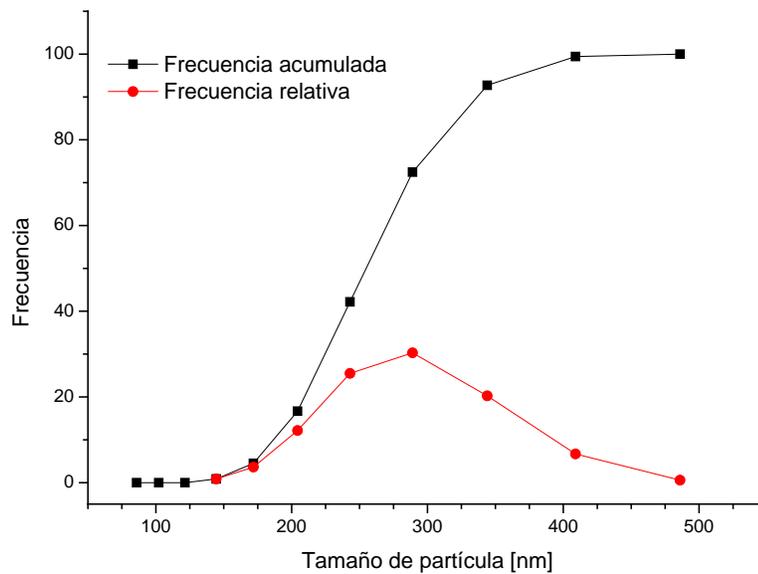
Caracterización de las nanopartículas

Tamaño de partícula

PLGA: En la figura 2 se presenta el tamaño de partícula obtenido de los encapsulados sintetizados con PLGA.

Figura 1. *Tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico) de la microemulsión de micropartículas de PLGA (negro, frecuencia acumulada; rojo, frecuencia relativa).*

En el caso de los encapsulados sintetizados con PLGA se observó un diámetro hidrodinámico promedio de 256 nm (figura 13), con una desviación estándar de 119.5, un rango de 341.5 nm y un diámetro máximo de 486 nm.



PLGA + Antioxidante de Maíz morado: En la figura se presenta el tamaño de partícula obtenido de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Maíz morado.

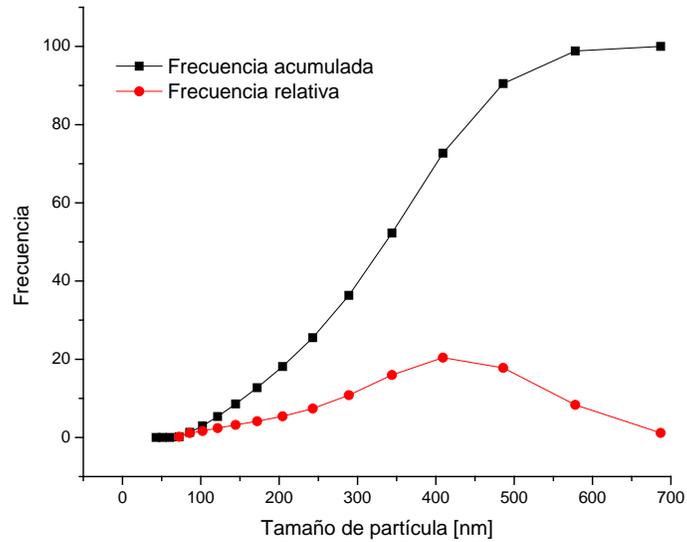


Figura 3. *Tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico) de la microemulsión de micropartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado (negro, frecuencia acumulada; rojo, frecuencia relativa).*

En el caso de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Maíz morado se observó un diámetro hidrodinámico promedio de 327 nm (figura 14), su desviación estándar fue de 130.4, con un rango de 614.7 nm y un diámetro máximo de 687 nm.

PLGA + Antioxidante de Frijol negro: En la figura 4 se presenta el tamaño de partícula obtenido de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Frijol negro.

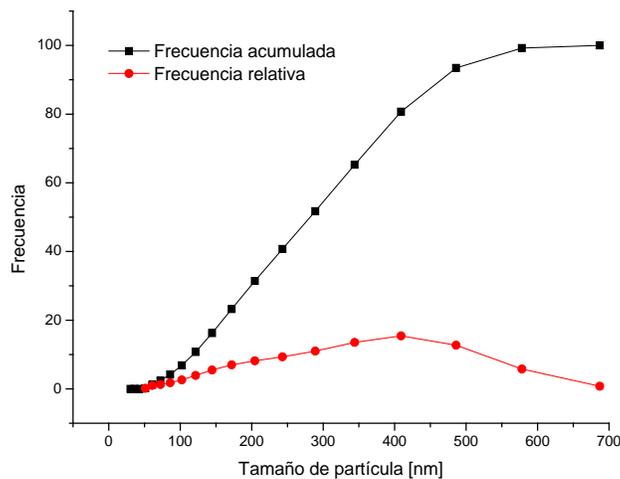


Figura 4. *Tamaño de partícula (diámetro hidrodinámico) de la microemulsión de micropartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol negro (negro, frecuencia acumulada; rojo, frecuencia relativa).*

En los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Frijol negro se observó un diámetro hidrodinámico promedio de 283.5 nm (figura 15), su desviación estándar fue de 140.8, mientras que el rango obtenido fue de 635.9 nm con un diámetro máximo de 687 nm.

Infrarrojo (IR)

Nanopartículas de PLGA

En la figura 5 se presenta el espectro IR de las nanopartículas vacías de PLGA.

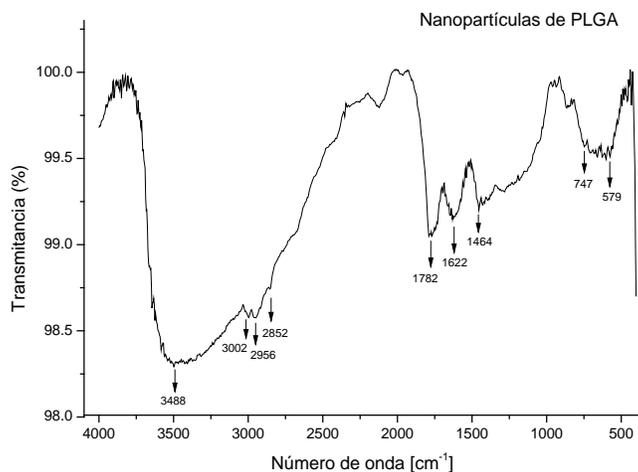


Figura 5. Espectro IR de Nanopartículas de PLGA.

En el espectro de las nanopartículas vacías de PLGA (figura 5) se observa que existe el alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H alrededor de 3488 cm^{-1} , posteriormente se observan señales con alargamientos de tensión en la región C-H que están en 3002 , 2956 y 2852 cm^{-1} , una de las bandas más sobresalientes es la que corresponde al enlace -C=O centrado en 1782 cm^{-1} ; por otra parte se observa una señal atribuible al enlace C-C en 1622 cm^{-1} , también aparece la posible vibración de tensión asimétrica de los enlaces C-O en 1464 cm^{-1} y C-H en 747 y 579 cm^{-1} .

Polímero de PLGA

En la figura 17 se presenta el espectro IR del polímero de PLGA.

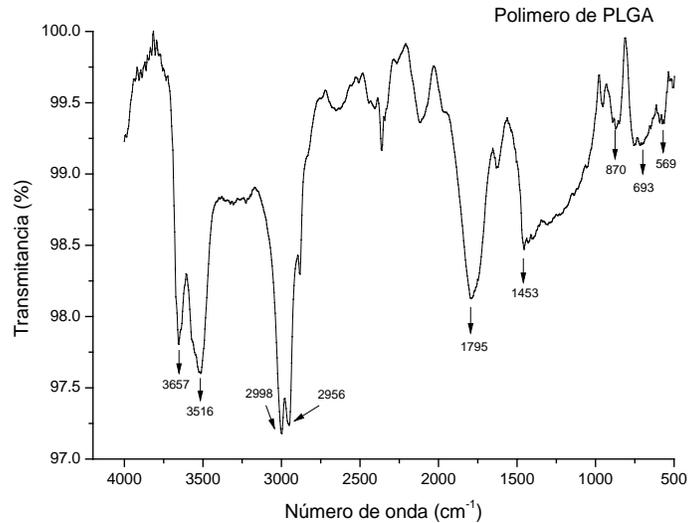


Figura 6. Espectro IR de Polímero de PLGA.

En el espectro del polímero de PLGA (figura 6) se observa el alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H entre los 3657 y 3516 cm^{-1} , posteriormente se observan señales que pertenecen a los alargamientos de la región C-H los cuales se encuentran en 2998 y 2956 cm^{-1} , la banda que sobresale en 1795 cm^{-1} es la que corresponde al enlace C=O; también aparece la posible vibración del enlace C-O en 1453 cm^{-1} , finalmente aparecen señales de los enlaces C-H en 870, 693 y 569 cm^{-1} .

PVA (alcohol polivinílico)

En la figura 7 se presenta el espectro IR del PVA (alcohol polivinílico).

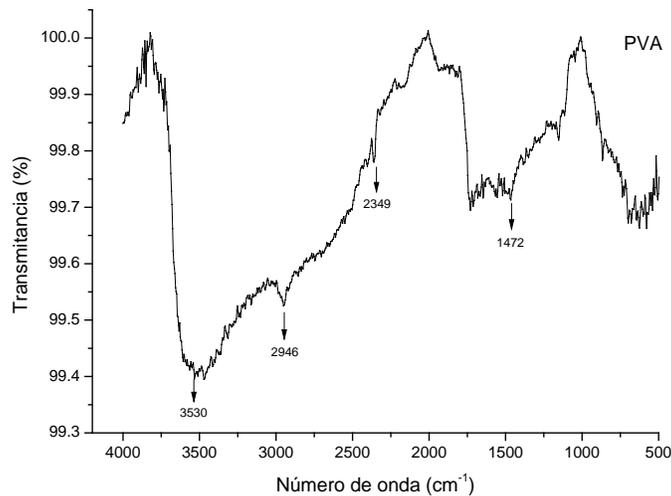


Figura 7. Espectro IR de PVA (alcohol polivinílico).

En el espectro del PVA (figura 7) aparece una señal que pertenece al alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H en 3530 cm^{-1} , posteriormente se observan alargamientos de la región

enlace C-H que se encuentran en 2946 y 2349 cm^{-1} , finalmente aparece la posible vibración del enlace C-O 1472 cm^{-1} .

Antioxidante de Maíz morado

En la figura 8 se presenta el espectro IR del antioxidante de Maíz morado.

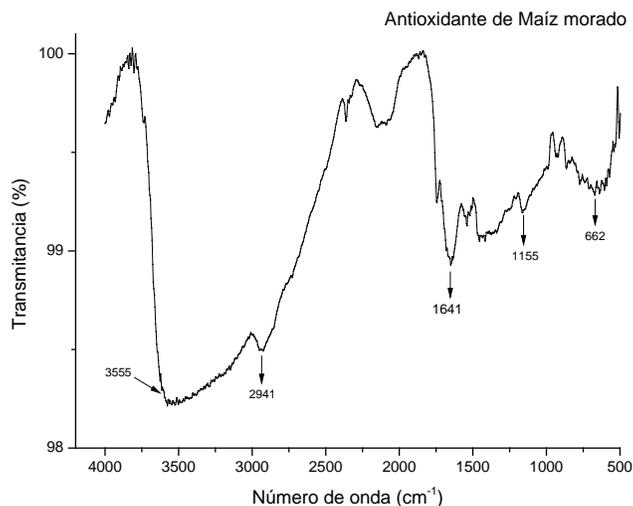


Figura 8. Espectro IR del Antioxidante de Maíz morado.

En el espectro del antioxidante de Maíz morado (figura 8) se observa el alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H en 3555 cm^{-1} , aparece también la señal que pertenece al alargamiento de la región C-H en 2941 cm^{-1} , por otra parte se observa una señal atribuible al enlace C=C en 1641 cm^{-1} ; posteriormente se aprecia una posible vibración del enlace C-O en 1155 cm^{-1} y finalmente se observa el enlace C-H en 662 cm^{-1} .

Antioxidante de Frijol negro

En la figura 9 se presenta el espectro IR del antioxidante de Frijol negro.

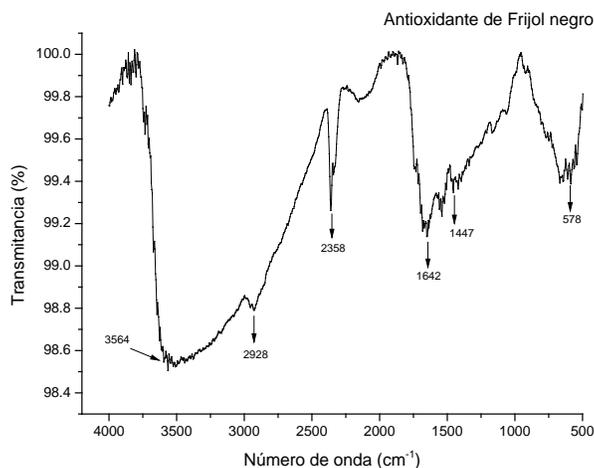


Figura 9. Espectro IR de Antioxidante de Frijol negro.

En el espectro del antioxidante de Frijol negro (figura 9) se observa el alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H en 3564 cm^{-1} , se observan también señales pertenecientes al alargamiento de la región C-H en 2928 y 2358 cm^{-1} , por otra parte en 1642 cm^{-1} aparece una señal atribuible al enlace C-C; posteriormente se aprecian posibles vibraciones del enlace C-O en 1447 cm^{-1} y finalmente se observa el enlace C-H en 578 cm^{-1} .

PLGA + Antioxidante de Maíz morado

En la figura 10 se presenta el espectro IR de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Maíz morado.

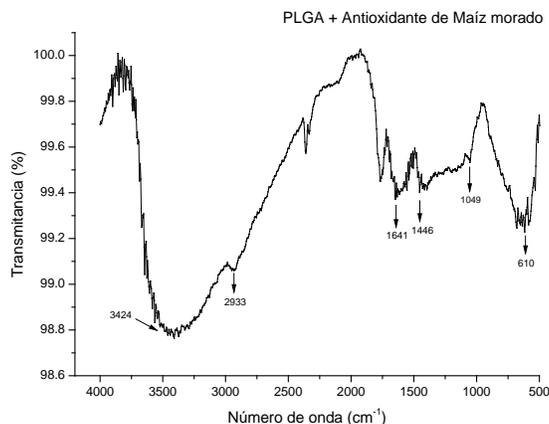


Figura 10. Espectro IR de PLGA + Antioxidante de Maíz morado.

En el espectro de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Maíz morado (figura 10) aparece el alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H en 3424 cm^{-1} , aparece también una señal perteneciente al alargamiento de la región C-H en 2933 cm^{-1} , por otra parte se observa en 1641 cm^{-1} una señal atribuible al enlace C-C; posteriormente se pueden apreciar las posibles vibraciones del enlace C-O en 1446 y 1049 cm^{-1} , finalmente se observa el enlace C-H en 610 cm^{-1} .

PLGA + Antioxidante de Frijol negro

En la figura 11 se presenta el espectro IR de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Frijol negro.

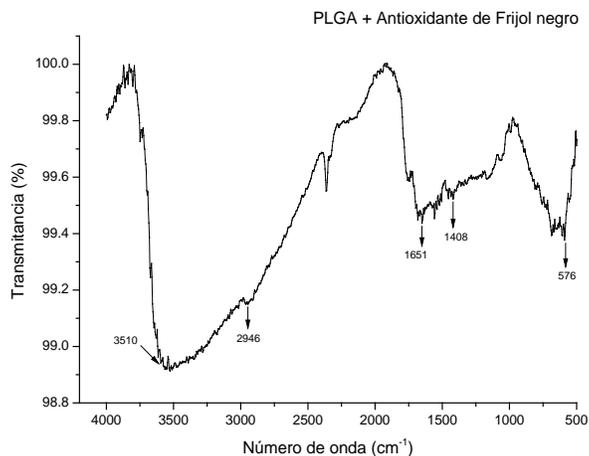


Figura 11. Espectro IR de PLGA + Antioxidante de Frijol negro.

En el espectro de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Frijol negro (figura 22) se observa que existe el alargamiento en el modo vibracional del enlace O-H alrededor de 3510 cm^{-1} , aparece también una señal que corresponde al alargamiento de la región C-H en 2946 cm^{-1} , por otra parte se observa una señal atribuible al enlace C-C en 1651 cm^{-1} ; aparece también la posible vibración del enlace C-O en 1408 cm^{-1} y el enlace C-H en 576 cm^{-1} .

Cabe mencionar que aunque no es posible establecer estructuras específicas debido a la complejidad de la muestra, fue importante realizar los espectros infrarrojos para realizar las comparaciones entre las nanopartículas vacías y las nanopartículas conteniendo a los antioxidantes de Maíz morado y Frijol negro, y de esta manera comprobar que se están encapsulando.

Potencial zeta

PLGA

En la Tabla 4 se presentan las características obtenidas respecto a la medición del potencial zeta de las nanopartículas vacías de PLGA.

Movilidad electroforética	-1.27 u/s/V/cm
Potencial Zeta	-16.2 mV
Carga	-0.03192 fC
Polaridad	Negativa
Conductividad	41 uS/cm
Viscosidad	0.992

Las nanopartículas vacías de PLGA (Tabla 4) tuvieron un potencial zeta de -16.2 mV, la movilidad electroforética se determinó en -1.27 u/s/V/cm la cual según la ecuación de Smoluchowski está relacionada con la viscosidad del medio que en este caso fue de 0.992. Al comparar la viscosidad de la partículas vacías con las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado y PLGA + Antioxidante de Frijol negro se observó un incremento por lo tanto la movilidad fue menor, puesto que el medio oponía una mayor resistencia para que las partículas se movieran. Finalmente la conductividad que presento fue de 41 uS/cm.

PLGA + Antioxidante de Maíz morado

En la Tabla 5 se presentan las características obtenidas respecto a la medición del potencial zeta de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Maíz morado.

Movilidad electroforética	1.51 u/s/V/cm
Potencial Zeta	19.3 mV
Carga	0.050 fC
Polaridad	Positiva
Conductividad	151 uS/cm
Viscosidad	0.982

Las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado (Tabla 5) tuvieron un potencial zeta de 19.3 mV, la movilidad electroforética se determinó en 1.51 u/s/V/cm, mientras que la viscosidad fue de 0.982 y al compararlo con las nanopartículas vacías de PLGA y las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol, estas presenta una viscosidad intermedia por lo que la movilidad también es mayor que la de las nanopartículas vacías de PLGA, pero menor que las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol. Finalmente la conductividad que presento fue de 151 uS/cm.

PLGA + Antioxidante de Frijol negro

En la Tabla 6 se presentan las características obtenidas respecto a la medición del potencial zeta de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Frijol negro.

Movilidad electroforética	-2.21 u/s/V/cm
Potencial Zeta	-28.3 mV
Carga	-0.06068 fC
Polaridad	Negativa
Conductividad	398 uS/cm
Viscosidad	0.974

Las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol (Tabla 6) presentaron un potencial zeta de -28.3 mV, la movilidad electroforética se determinó en -2.21u/s/V/cm, mientras que la viscosidad fue de 0.974 por lo que al compararlo con las nanopartículas de PLGA y PLGA + Antioxidante de Maíz morado la viscosidad disminuyó y por lo tanto la movilidad fue mayor en comparación con las otras. Finalmente la conductividad que presentó fue de 398 uS/cm.

Eficiencia de encapsulamiento

Síntesis por emulsificación/evaporación

En la Tabla 7 se presentan las concentraciones en mg/L de PVA (alcohol polivinílico) y PLGA utilizadas en cada emulsión, así como el rendimiento obtenido en los 2 experimentos que se realizaron utilizando el método de síntesis de emulsificación/evaporación.

PVA (g/mL)	PLGA (g/mL)	PVA (g/mL)	RENDIMIENTO %
0.0002	0.001	-----	0
0.0002	0.001	-----	0

En la Tabla 8 se muestran los porcentajes de eficiencia de encapsulamiento obtenidos a partir del método de síntesis de emulsificación/evaporación, en donde se observan porcentajes menores al 1%, lo que nos indica que existe un problema con este método, ya que los compuestos fenólicos los cuales en su mayoría son compuestos altamente hidrofílicos presentan una mayor afinidad hacia la fase acuosa de la emulsión, lo que provoca que emigren hacia ella y disminuya la cantidad que se atrapa dentro de las nanopartículas ⁴⁴, y por tal motivo se obtienen porcentajes muy deficientes.

<i>Tabla 5. Eficiencia de encapsulación de los extractos por el método de emulsificación/evaporación</i>	
Extracto	EE % (\pm SD)
Maíz morado	< a 1%
Frijol negro	< a 1%

Síntesis por doble emulsificación/evaporación

En la Tabla 9 se presentan las concentraciones utilizadas de PVA (alcohol polivinílico) y PLGA utilizadas en cada emulsión, así como el rendimiento obtenido en cada uno de los 4 experimentos que se realizaron.

<i>Tabla 6. Concentración en g/mL de PVA y PLGA utilizadas en cada emulsión con el método de doble emulsificación/evaporación.</i>			
PVA (g/mL)	PLGA (g/mL)	PVA (g/mL)	RENDIMIENTO %
0.0002	0.001	0.0002	40.95
0.01	0.001	0.01	30.52
0.0002	0.001	0.01	51.57
0.0002	0.001	0.01	67.43

En la Tabla 10 se muestran los porcentajes de eficiencia de encapsulamiento obtenidos con el método de síntesis de doble emulsificación/evaporación, los cuales muestran un cambio significativo en comparación con el método anterior, esto nos indica que al realizar una segunda emulsión favorece a que los compuestos fenólicos permanezcan atrapados en las nanopartículas, lo que contribuye a obtener mejores resultados.

<i>Tabla 7. Eficiencia de encapsulación de los extractos por el método de doble emulsificación/evaporación</i>	
Extracto	EE % (\pm SD)
Maíz morado	41.01% \pm 10.52
Frijol negro	67.43% \pm 12.23

Perfiles de liberación

En la figura 12 se muestra el perfil de liberación de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Frijol negro.

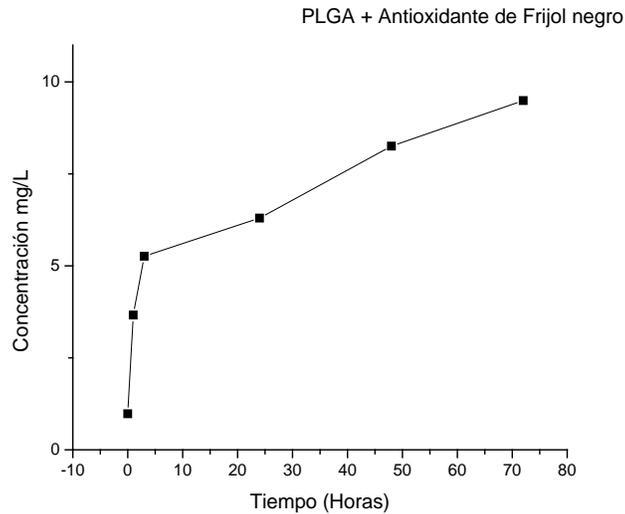


Figura 12. Perfil de liberación de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol negro.

El perfil de liberación de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol negro (figura 23) se monitoreó durante 72 horas, tiempo en el cual se liberó la mayor concentración de antioxidantes, primero se observó una liberación rápida durante las primeras 3 horas, seguida de una liberación más lenta en el lapso de las 3 hasta las 24 horas y finalmente a partir de las 24 y hasta las 72 horas de monitoreo se observó nuevamente una liberación más rápida.

En la figura 13 se muestra el perfil de liberación de los encapsulados sintetizados con PLGA conteniendo los antioxidantes de Maíz morado.

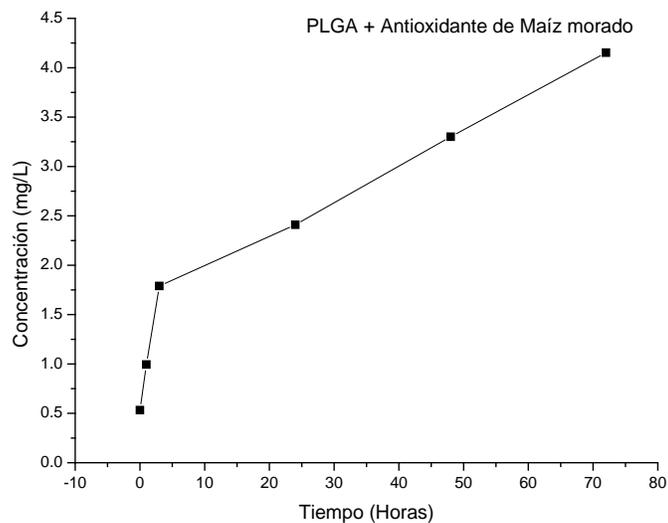


Figura 2. Perfil de liberación de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado.

El perfil de liberación de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado (figura 24) se monitoreo durante 72 horas, tiempo en el cual se liberó la mayor concentración de antioxidantes, al igual que en la gráfica anterior primero se observó una liberación rápida durante las 3 primeras horas, seguida de una liberación más lenta en el lapso de las 3 hasta las 24 horas y finalmente a partir de las 24 y hasta las 72 horas de monitoreo se observó nuevamente una liberación más rápida.

DISCUSIÓN

Extracción de los extractos antioxidantes

Se realizó la extracción acuosa de los antioxidantes de Maíz morado y Frijol negro y la cantidad de compuestos fenólicos totales se determinó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, obteniendo los siguientes resultados, en el extracto de Maíz morado se obtuvo 5.08 mg/L de compuestos fenólicos totales; mientras que para el extracto de Frijol negro se obtuvieron 14.37 mg/L, siendo este último el que presentó la mayor cantidad de estos compuesto; sin embargo a pesar de que el extracto de Frijol negro presenta la mayor concentración de compuestos fenólicos totales no es posible asegurar que tiene una mejor actividad antioxidante ya que se han realizado diversos estudios con una gran variedad de extractos y no se ha podido establecer una relación que indique que mientras mayor sea la cantidad de compuestos fenólicos totales mayor será la actividad antioxidante, puesto que los resultados obtenidos muestran diferencias entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante y esto se debe a que la capacidad antioxidante de una planta se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia de otros metabolitos antioxidantes.

Caracterización de los extractos antioxidantes

Como parte de la caracterización de los extractos antioxidantes se utilizó la espectrofotometría UV-Vis, tanto el extracto de Maíz morado como de Frijol negro poseen una composición muy compleja; sin embargo ambos extractos presentan bandas de absorción muy anchas que van de los 250 nm y hasta los 380 nm, esta región es característica de sistemas conjugados, los cuales están presentes en los compuestos fenólicos de ambos extractos. En el caso del Maíz morado podemos atribuir esta banda de absorción a las antocianinas cuyos enlaces dobles forman grupos dieno, mientras que en el extracto de Frijol negro, los taninos como el ácido gálico son uno de sus principales componentes y en cuya estructura también presenta grupos dieno y un grupo carbonilo es por eso que aunque estas señales no nos permiten conocer las estructuras específicas de cada uno de los extractos si nos permite atribuir dichas bandas tanto a las antocianinas del extracto de Maíz morado como a los taninos del extracto de Frijol negro.

Caracterización de las nanopartículas

En cuanto a la caracterización de las nanopartículas el tamaño de partícula es uno de los parámetros más importantes, y de acuerdo a los resultados el menor tamaño lo presentaron las nanopartículas vacías de PLGA con un diámetro hidrodinámico promedio de 256 nm, una desviación estándar de 119.5 y un coeficiente de variación de 0.46, seguidas de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol negro con un diámetro hidrodinámico promedio de 283.5 nm, desviación estándar de 140.8 y un coeficiente de variación de 0.49; mientras que las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado presentaron el mayor tamaño con diámetro hidrodinámico promedio de 327 nm, una desviación estándar de 130.4, y coeficiente de variación de 0.39; al comparar los resultados respecto

al coeficiente de variación observamos que las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol negro presentan la mayor variación en cuanto a tamaño y también se observó un comportamiento monomodal tanto en las nanopartículas vacías de PLGA, así como para las nanopartículas de PLGA cargadas con cada uno de los extractos antioxidantes.

Ahora bien al comparar los tamaños de partícula obtenidos con algunos artículos, observamos diferencias importantes por ejemplo en el caso de nanopartículas de PLGA cargadas con ácido ascórbico en una proporción de 85/15 % se reportaron tamaños de 130 a 200 nm, mientras que nanopartículas de PLGA que encapsulan N-acetilcisteína en el cual emplearon el método de doble emulsión se reportaron tamaños entre 192 y 217 nm; estas diferencias que observamos se pueden atribuir a parámetros como la velocidad de agitación y concentración de PVA (alcohol polivinílico) ya que estos afectan de manera importante el tamaño de las partículas.

En este sentido el artículo de nanopartículas de PLGA cargadas con ácido ascórbico utilizó el método de emulsión/evaporación de disolvente, utilizando una única concentración de 0.02% de PVA; a diferencia de nuestro método en el cual se realizó una doble emulsión y se utilizó además de la concentración de 0.02% de PVA, una concentración de 1% de PVA y es por esta razón que concluimos que el aumento en el tamaño de partícula se debió a esa segunda emulsión, lo que implica una mayor concentración de PVA, y esto se debe a que existe una fuerte adsorción del PVA en la superficie de las nanopartículas de PLGA, ya que los grupos hidroxilo de la molécula de PVA se fijan a grupos acetilo del PLGA mediante una unión hidrofóbica.

Por otra parte se realizaron espectros IR para la caracterización de las nanopartículas con la intención de establecer las diferencias estructurales entre las nanopartículas vacías y las cargadas con los antioxidantes; sin embargo debido a la complejidad de la muestra no era posible establecer las estructuras específicas pero si es posible notar algunos cambios entre las nanopartículas de PLGA y las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado y PLGA + Antioxidante de Frijol, una de los principales cambios que se pueden notar es que desaparece la banda que pertenece al alargamiento del enlace C=O el cual se encuentra en 1795 cm^{-1} , la cual es característica del éster presente en la molécula de PLGA, esta banda desaparece y aparece el alargamiento del enlace C-C en 1641 cm^{-1} para el caso de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado y en 1651 cm^{-1} para el caso de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Frijol negro comprobando así la interacción entre el polímero y los extractos antioxidantes, los cuales están siendo encapsulados dentro del polímero.

Por otra se determinó el potencial zeta de las nanopartículas vacías de PLGA, de las nanopartículas de PLGA + Antioxidante de Maíz morado y PLGA + Antioxidante de Frijol negro para las cuales se obtuvieron resultados de -16.2 mV, 19.3 mV y -28.3 mV respectivamente, esto se realizó con la finalidad de valorar la estabilidad de las partículas, puesto que lo que nosotros queremos es que exista repulsión entre las partículas evitando que estas se aglomeren o precipiten, y de acuerdo a los resultados que se obtuvieron podemos concluir que tanto las nanopartículas de PLGA, así como las nanopartículas de PLGA cargadas con el respectivo extracto antioxidante muestran una buena estabilidad ya que valores $> 30\text{ mV}$ indican micelas coloidales positivas estables y valores $< -30\text{ mV}$ corresponden a micelas negativas estables, debido a que las partículas con potencial zeta elevados tanto positivos como negativos se repelerán unas con otras.

Eficiencia de encapsulamiento

En cuanto a la eficiencia de encapsulación los mejores resultados se observaron con el método de doble emulsificación/evaporación, obteniendo un 41.01% con el extracto antioxidante de Maíz morado y un 67.43% con el extracto de Frijol negro, mientras que con el método de

emulsificación/evaporación se obtuvieron porcentajes por debajo del 1%, de esta forma se observa que el método de emulsificación/evaporación no es útil para la encapsulación de los extractos antioxidantes.

Al comparar estos resultados con lo reportado en algunos artículos se encontró un porcentaje de eficiencia de encapsulación muy parecido al que obtuvimos con el extracto de Frijol negro, en este caso se encapsuló quercetina (flavonoide con un elevado poder antioxidante) con Eudragit, y se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 68.2% utilizando el método de desplazamiento de disolvente, en el artículo relacionan este porcentaje tan bajo con la alta concentración de PVA que utilizaron durante la preparación de las partículas; sin embargo en nuestro caso no podemos atribuir los porcentajes de eficiencia de encapsulación a un parámetro en específico ya que generalmente existen diversos factores que afectan este parámetro como la velocidad y tiempo de centrifugación, el método de encapsulación, la concentración del polímero en la fase oleosa, el tipo de polímero, los tiempos de emulsificación y la presencia de aditivos en las diferentes fases de las emulsiones; los cuales pueden afectar la incorporación de las biomoléculas dentro de las matrices poliméricas y de esta manera favorecer o disminuir la eficiencia de encapsulación.

Perfiles de liberación

Al analizar los perfiles de liberación de las nanopartículas con cada uno de los extractos antioxidantes, tanto de Maíz morado como de Frijol negro se observó un comportamiento muy similar en ambos perfiles en los que se puede apreciar tres etapas, en la primera se observa una liberación inicial rápida durante las tres primeras horas que corresponde a los antioxidantes que se encontraban adsorbidos en la superficie de la nanopartícula (efecto burst), posteriormente se produjo una liberación más lenta, en la que se libera muy poca concentración de antioxidantes debido a un proceso de difusión de los antioxidantes a través de los poros y canales de la matriz polimérica, los cuales se forman por el contacto de la matriz con el medio circundante⁴⁷, y finalmente se observa nuevamente una liberación rápida de los antioxidantes, la cual comprende el proceso de erosión, ya que la matriz del polímero se desintegra a tal punto que pierde su integridad y las cadenas del polímero llegan a ser lo suficientemente pequeñas que pueden ser solubilizadas.⁴⁸

CONCLUSIÓN

De manera general podemos decir que se cumplió con el objetivo planteado al inicio del trabajo, puesto que se logró encapsular a través del método de doble emulsificación/evaporación los antioxidantes provenientes de extractos naturales de Maíz morado y Frijol negro, utilizando el polímero Poli(D,L-láctico-co-glicólico), obteniendo porcentajes de eficiencia de encapsulación de 41.01 y 67.43% respectivamente, respecto a los tamaños de partícula los encapsulados con el extracto de Frijol negro presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 283.5 nm y con el extracto de Maíz morado presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 327 nm, además se pudo comprobar la estabilidad del sistema coloidal mediante la medida del potencial zeta, cuyos valores estaban dentro del rango de los > 30 mV y < -30 mV manifestando una repulsión entre las partículas, y de esta manera no se espera la formación de aglomerados. Por otro lado el análisis con espectrofotometría UV-Vis de cada uno de los extractos tanto de Maíz morado como de Frijol negro nos permitió identificar los posibles grupos fenólicos responsables de las bandas de absorción, que en el caso del Maíz morado serían las antocianinas y para el caso del Frijol negro serían los taninos. En cuanto a los perfiles de liberación se comprobó que es posible tener un sistema de liberación prolongada de antioxidantes bajo determinadas condiciones.

Es importante resaltar que aunque esta técnica tenía la intención de poder ser utilizada dentro de la industria para la encapsulación de antioxidantes como aditivos alimentarios; los porcentajes de encapsulación que se obtuvieron son relativamente bajos respecto a otras técnicas revisadas, en las que se han logrado encapsular entre un 90 y 95%; aunque es importante recalcar que podrían realizarse modificaciones en cuanto a la síntesis de las nanopartículas y de esta manera mejorar parámetros como la eficiencia de encapsulación y así lograr que esta técnica pueda ser utilizada dentro de la industria alimentaria y de esta manera pueda competir con técnicas que resultan más costosas y laboriosas.

Finalmente aunque los porcentajes de eficiencia de encapsulación de los antioxidantes que se obtuvieron son bajos, esta técnica también podría ser una buena opción para encapsular compuestos bioactivos de rápida liberación o bien algún fármaco costoso.

Bibliografía:

1. Abdel-Aal E.S.M. and Hucl P.A. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue areolone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*. 76:350–354.
2. Akillioglu H.G. and Karakaya S. 2010. Changes in total phenols, total flavonoids, and antioxidant activities of common beans and pinto beans after soaking, cooking, and in vitro digestion process. *Food Science and Biotechnology*. 19(3):633-639.
3. Amini S.M., Gilaki M, Karchani M. (2014). Safety of Nanotechnology in Food Industries. *Electronic physician*. 6(4):962. doi: 10.14661/2014.962-968
4. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 28, 25–30.
5. Chaudhry Q. and Castle L. (2011). Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*. 22. 595e603. doi:10.1016/j.tifs.2011.01.001
6. Cho Y., Kim C., Kim N., Kim C., Park, B. (2008). Some cases in applications of nanotechnology to food and agricultural systems. *Biochip J.* 2, 183–185.
7. Choi Y., Ku J.B., Chang H.B., and Lee J. (2005). Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chemistry*. 103, 130–138.
8. Chun O.K., Kim D.O, Lee C.Y. (2003). Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of Agricultural and Nutrients Chemistry*. 51, 8067e8072.
9. Carvalho-Erbetta C.D, Alves R.J, Magalhães-Resende J., de Souza-Freitas R.F., de Sousa R.G. (2012). Synthesis and Characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 3:208-225. doi: 10.4236/jbnb.2012.32027
10. Del Pozo-Insfran D., Brenes C., Serna-Saldivar S.O., Talcott S.T. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays L.*) products. *Food Research International*. 39:696–703. doi:10.1016/j.foodres.2006.01.014
11. Fu K., Harrell R., Zinski K., Um C., Jaklenec A., Lotan N., Burke P., Klibanov A.M., Langer R. (2003). A potential approach for decreasing the burst effect of protein from PLGA nanoparticles. *J Phar Sci*. 92(8): 1582-1591.
12. Gao L.W., Oomah B.D., and Mazza G. (2002) Wheat quality: antioxidant activity of wheat millstreams. In P. Ng, & C. W. Wrigley (Eds.), *Wheat quality elucidation* (pp. 233).
13. St. Paul, MN: AACC International, AACC Press.
14. Gomez C., Moreira R.G., Castell-Perez E. (2011). Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. *Journal of Food Science*. 76(2):N16-N24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01985.x

15. Holser R.A. (2012). Principal Component Analysis of Phenolic Acid Spectra. *ISRN Spectroscopy*. Article ID 493203, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/493203>
16. Huang D., Ou B., and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6), 1841–1856.
17. López-Martínez L.X., Oliart-Ros R.M., Valerino-Alfaro G., Chen-Hsien L., Parkin L.K., García H.S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*. 42 (2009) 1187–1192
18. López-Martínez L.X., Parkin K. L., García H.S. (2012). Effect of processing of corn for production of masa, tortillas and tortilla chips on the scavenging capacity of reactive nitrogen species. *International Journal of Food Science and Technology*. 2012, 47, 1321–1327. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02976.x
19. Martirosyan and Yves-Jacques, (2014). Engineered Nanomaterials in Food: Implications for Food Safety and Consumer Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11, 5720-5750; doi:10.3390/ijerph110605720
20. Murakami H., Kobayashi M., Takeuchi H., Kawashima Y. (1999). Preparation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int J Pharm*. 187:143–152. doi:10.1016/S0378-5173(99)00187-8
21. Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., and Kanter M. (2000). Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, 19(3),312S–319S.
22. Ondricek A.J. (2010) The Neuroprotective Efficacy of Antioxidants Against In Vitro Models of Oxidative Stress and Their Theoretical Application Via Intravitreal Injection Encapsulated in Nanoparticles. Fort Worth, Tx: University of North Texas Health Science Center; from <http://digitalcommons.hsc.unt.edu/theses/147>
23. Pretsch E., Bühlmann P. and Badertscher M. Structure Determination of Organic Compounds. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2009). Fourth, Revised and Enlarged Edition. Chapter 7 IR Spectroscopy. ISBN 978-3-540-93809-5. DOI 10.1007/978-3-540-93810-1
24. Ranilla Lena Gálvez, et al. (2010). Effect of thermal treatment on phenolic compounds and functionality linked to type 2 diabetes and hypertension management of Peruvian and Brazilian bean cultivars (*Phaseolus vulgaris L.*) using in vitro methods. *Journal of food biochemistry*. 34(2):329-355.
25. Reis-Giada M. de L. (2013). Chapter 4: Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, in “Oxidative stress and chronic degenerative diseases –A role for antioxidants” Ed. In-tech.
26. Salinas-Moreno Y., Rojas-Herrera, Sosa-Montes E., Pérez-Herrera P. (2005). Anthocyanin composition in black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) varieties grown in México. *Agrociencia* 39: 385-394.
27. Shahidi F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/Nahrung* 44(3S):158-163.
28. Shahidi F. and Zhong Y. (2010). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 4067–4079. DOI: 10.1039/b922183m
29. Stevanovic M. and Uskokovic D. (2009). Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Current Nanoscience*, 2009, 5(1):1-14. DOI: 10.2174/157341309787314566.
30. Stevanovic M., Jordovic B., Uskokovic D. (2007). Preparation and Characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles Containing Ascorbic Acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 84965, 8p doi:10.1155/2007/84965.
31. Xu B., Chang S. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris L.*) as affected by thermal processing. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57(11):4754-4764.