



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ENCAPSULACIÓN EN NANOEMULSIONES DE EXTRACTOS DE  
*Equisetum arvense*.

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES**

DIRECTOR

DR. E. JAIME VERNON CARTER

DICIEMBRE DEL 2009

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México, D.F. a 10 de Diciembre del 2009.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis.

**ENCAPSULACIÓN EN NANOEMULSIONES DE EXTRACTOS DE *Equisetum arvense*.**

Que presentó:

Ma. del Carmen Hernández Jaimes

Comité Tutorial

Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter.  
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dra. María Eva Rodríguez Huevo  
Insituto de estudios superiores de Ecatepec

Asesor: Dr. César Pérez Alonso  
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité de evaluación:

Presidente: Dra. Elsa Bosquez Molina  
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario: Dra. María Eva Rodríguez Huevo  
Tecnológico de estudios superiores de Ecatepec

Vocal. Dra. Leticia Buendía González  
Universidad Autónoma del Estado de México

Vocal. Dr. Juan Orozco Villafuerte  
Universidad Autónoma del Estado de México

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter por haberme recibido en su laboratorio, por la confianza brindada, por haberme guiado en este proyecto, por su apoyo, su paciencia y sus atinados consejos. Gracias doctor.

A los miembros del comité tutorial y miembros del jurado, Dra. María Eva Rodríguez Huevo, Dr. César Pérez Alonso, Dra. Elsa Bosquez molina, Dra. Leticia Buendía González y Dr. Juan Orozco Villafuerte por su asesoría, sus sugerencias y su valiosa intervención en la realización de este trabajo.

A mis padres y hermanos, por creer en mí, por su confianza, apoyo, amistad y por estar ahí, siempre incondicionales, GRACIAS.

A Lalo, por su amor, cariño, respeto, comprensión, apoyo, paciencia y por estar a mi lado siempre en los momentos buenos y en los no tan buenos, gracias por todo, te amo.

A Jaz por su tiempo, su apoyo, por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, por su complicidad, y sobre todo por brindarme su amistad. GRACIAS.

A Ofe y César por su valiosa amistad, su tiempo, su apoyo, por compartir su experiencia y conocimientos.

A Angie, Rubén y San Eris, por compartir su experiencia y conocimientos.

A José Luis Munguía, por sus asesorías, sus atinados consejos, su tiempo y apoyo. Sin tu ayuda habría sido más difícil, gracias.

A CONACYT, por financiar el proyecto: "Acomplejamiento-desacomplejamiento intermolecular de compuestos fenólicos lipo e hidrofílicos incorporados en emulsiones dobles estabilizadas con bipolímeros para minimizar su degradación y maximizar sus propiedades funcionales" (No. Convenio: U:81157-Z).

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	7
1. MARCO TEÓRICO.....	10
1.1 Emulsiones.....	11
1.1.1 Conceptos y tipos .....	11
1.1.2 Composición y localización relativa de las fases de una nanoemulsión....	14
1.1.3 Formación de las nanoemulsiones .....	15
1.1.4 Métodos de emulsificación .....	16
1.1.5 Estabilidad de las nanoemulsiones.....	17
1.1.6 Factores de estabilidad de las nanoemulsiones.....	19
1.1.7 Fenómeno de maduración de Ostwald .....	19
1.2 Agentes emulsificantes.....	20
1.2.1 Balance Hidrofílico-lipofílico (HLB) .....	24
1.2.2 Concentración micelar crítica.....	25
1.3 Aplicación de nanoemulsiones en la industria .....	26
1.3.1 Compuestos activos poco solubles en agua.....	27
1.3.2 Emulsionamiento de flavonoides en nanoemulsiones.....	27
1.4 Flavonoides: definición y propiedades.....	29
1.4.1 Antioxidantes presentes en <i>Equisetum arvense</i> .....	30
1.4.2 Propiedades de los antioxidantes.....	30
1.4.3 Actividad antioxidante.....	30
1.4.4 Mecanismo de acción de los antioxidantes.....	31
1.4.5 Cuantificación de la capacidad antioxidante.....	32
1.4.6 Cuantificación de fenoles totales.....	32
OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo General .....	35
2.2 Objetivos particulares .....	35

HIPÓTESIS.....	36
JUSTIFICACIÓN.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
5.1 Estrategia experimental.....	41
5.2 Materiales.....	42
5.2.1 Material vegetal .....	42
5.3 Métodos .....	42
5.3.1 Extracción de los compuestos activos de <i>Equisetum arvense</i> <i>Camellia</i> <i>sinensis</i> (Té negro).....	42
5.3.2 Determinación del contenido de fenoles totales .....	43
5.3.3 Determinación de contenido de flavonoides totales .....	43
5.3.4 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH.....	43
5.3.5 Identificación de los compuestos activos.....	44
5.3.5.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	44
5.3.6 Selección del tensoactivo y formación de la nanoemulsión .....	45
5.3.7 Determinación del tamaño de gota.....	46
5.3.8 Determinación del efecto de la concentración del tensoactivo sobre el tamaño de micela y la viscosidad.....	46
5.3.9 Determinación de la zona de formación de la nanoemulsión en el diagrama de fases ternario .....	47
5.3.10 Determinación de la cantidad de nanoemulsión necesaria para cubrir el 30% de la IDR .....	47
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
6.1.1 Contenido de Fenoles Totales.....	49
6.1.2 Cinética de degradación de fenoles totales .....	49
6.1.3 Cinética de degradación de flavonoides totales .....	50
6.1.4 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH.....	51
6.2 Identificación por HPLC de los compuestos activos de <i>Equisetum arvense</i> ....	52
6.3 Selección del tensoactivo adecuado .....	54
6.3.1 Tamaño de gota.....	55

6.3.2 Efecto de la concentración del tensoactivo sobre el tamaño de gota y la viscosidad .....	56
6.4 Zona de formación de la nanoemulsiones o/w en el diagrama de fases ternario..	58
6.5 Ingesta diaria recomendada .....	59
CONCLUSIONES.....	60
3. PERSPECTIVAS .....	62
BIBLIOGRAFÍA .....	64
4. ANEXOS .....	74

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Principales mecanismos de inestabilidad en una emulsión simple .....	13
Figura 1.2 Localización relativa de las nanoemulsiones en el diagrama de fases ternario.....	15
Figura 1.3 Las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables .....	19
Figura 1.4 Representación de la estructura de un emulsionante .....	21
Figura 1.5 Representación de la película interfacial formada por el Tensoactivo.....	22
Figura 1.6. Representación del criterio de selección del tensoactivo.....	23
Figura 1.7 Clasificación de agentes emulsificantes .....	24
Figura 1.8 Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.....	28
Figura 1.9 Estructura química de la quercetina.....	29
Figura 1.10 Estructura química del kaempferol .....	29
Figura 5.1 Estrategia experimental .....	41
Figura 5.2 Cromatógrafo HPLC Agilent 1100 series.....	45
Figura 5.3 Formación de la nanoemulsión.....	46
Figura 6.1 Cinética de degradación de fenoles totales contenidos en <i>Equisetum arvense</i> y <i>Camellia sinensis</i> .....	50

Figura 6.2 Cinética de degradación de flavonoides totales contenidos en <i>Equisetum arvense</i> y <i>Camellia sinensis</i> .....	51
Figura 6.3 Porcentaje de inhibición de DPPH.....	52
Figura 6.4 Distribución de tamaño de gota.....	56
Figura 6.5 Tamaño de gota en función de la concentración de Tween 20.....	57
Figura 6.6 Zona de formación de las nanoemulsiones en el diagrama de fases ternario...	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales características de las nanoemulsiones y emulsiones.....	14
Tabla 1.2 Composición relativa de las fases de las nanoemulsiones.....	14
Tabla 1.3 HLB de algunos agentes anfífilicos.....	25
Tabla 6.1 Contenido de fenoles totales y flavonoides totales.....	49
Tabla 6.2 Tiempos de retención (tr) obtenidos de la cromatografía de líquidos de alta resolución para <i>Equisetum arvense</i> .....	53
Tabla 6.3 Características de los tensoactivos.....	54
Tabla 6.4 Viscosidad de la nanoemulsión en función de la concentración de tensoactivo.....	58



## RESUMEN

Actualmente existe una demanda de productos funcionales, es decir, que son elaborados no sólo por sus propiedades nutricionales o cosméticas sino con la finalidad de mejorar la salud y prevenir algunas enfermedades, para ello se les agregan compuestos biológicamente activos como vitaminas, minerales, fibra dietética, flavonoides, entre otros.

Los flavonoides son compuestos químicos que presentan actividad antioxidante, y pueden ser extraídos de frutas y vegetales. Una limitante en su aplicación es que debido a los grupos altamente reactivos que poseen, al ser extraídos se degradan en un lapso de tiempo corto, perdiendo sus propiedades benéficas para la salud, por lo que surge la necesidad de protegerlos de su degradación. Por tal motivo, el objetivo de este proyecto fue encapsular en nanoemulsiones tipo o/w el extracto hidrofóbico de *Equisetum arvense* a partir del establecimiento de las proporciones adecuadas de los componentes; agua, orgánico (extracto en solución aceite esencial : etanol) y tensoactivo así como la determinación de la zona de formación del sistema de nanoemulsión.

Los compuestos flavonoides fueron extraídos de *Equisetum arvense* (también conocida como cola de caballo), e identificados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), para ello se inyectaron estándares de quercetina y Kaempferol obteniendo tiempos de retención de  $52.011 \pm 0.03$  min y  $60.001 \pm 0.02$  min respectivamente, en la extracción fueron obtenidas cuatro fracciones; fracción acuosa (FA), fracción de cloroformo (FC), fracción de acetato de etilo (FAE) y fracción butanólica (FB). Los tiempo de retención obtenidos de cada una de las fracciones fueron comparados con los obtenidos con los estándares y los reportados por Mímica y col. (2008), encontrando tiempos de retención similares entre los reportados por Mímica y col, (2008) y los obtenidos en el laboratorio.

La caracterización química del extracto de *Equisetum arvense* se llevó a cabo mediante cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante, con la finalidad de poder comparar estos resultados, se realizó una extracción de *Camellia sinensis* (té negro) bajo las mismas condiciones, obteniendo que *Equisetum arvense* presenta  $0.84 \pm 0.15$  mgEAG/mL de solución y *Camellia sinensis*  $0.76 \pm 0.22$  mgEAG/mL de solución encontrando que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre ambos valores. De igual forma se encontró que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las tasas de degradación de flavonoides totales y actividad antioxidante en los extractos de ambas plantas.

Posteriormente las fracciones se llevaron a sequedad y el extracto obtenido se disolvió en una solución aceite esencial : etanol (6:1).

La siguiente parte del proyecto consistió en la formación de la nanoemulsión, para proteger los compuestos activos mediante la capa interfacial presente en la nanoemulsión formada por el tensoactivo, para ello se probaron cuatro tensoactivos (panodan, lactipol, tween 60 y tween 20) con la finalidad de elegir el que brindara las mejores características a la nanoemulsión. Obteniendo que el tensoactivo adecuado es tween 20, por lo que se utilizó dicho tensoactivo para realizar los experimentos posteriores.

Una vez elegido el tensoactivo (tween 20) se diseñaron cuatro formulaciones en donde la fase dispersa y la fase dispersante estaban compuestas por el extracto en solución aceite esencial : etanol, y agua respectivamente.

En estas formulaciones se mantuvo constante la cantidad de tensoactivo, y se varió la relación agua:orgánico para encontrar aquella con la cual se lograba la formación de la nanoemulsión para ello fue necesario medir el tamaño de gota encontrando que dicha relación agua:orgánico era 16:1. Posteriormente se elaboraron ocho formulaciones, fijando la relación a:o y variando la concentración de tween 20 (de 0.19 a 0.39 g/g de nanoemulsión), obteniendo la formación de la nanoemulsión entre concentraciones de 0.26 y 0.37 g/g de nanoemulsión y a valores mayores, se observó un precipitado, debido al exceso de tween 20. A las nanoemulsiones formadas en este experimento se les determinó tamaño de gota encontrándose valores entre 19 y 23 nm, además se midió viscosidad para determinar el efecto de la concentración de tensoactivo sobre ésta, encontrando que al aumentar la concentración de tensoactivo de igual forma aumenta la viscosidad.

Con la determinación de la relación agua:orgánico a la cual se logra la formación de la nanoemulsión y el efecto de la concentración del tensoactivo sobre el tamaño de gota, se encontró la zona de formación de la nanoemulsión en el diagrama de fases ternario encontrando que el eje de la fase acuosa va de 63 a 80%, en el eje del Tween 20 va de 20 a 37% y en el eje del orgánico, va de 0 a 17% (porcentajes máxicos).

Por último, se realizaron los cálculos correspondientes en base a la concentración de flavonoides en el extracto encontrando que aproximadamente 12.7 g de nanoemulsión son equivalentes al 30% (6.9 mg/día) de la ingesta diaria recomendada para flavonoides totales.

Los resultados obtenidos en esta investigación llevaron a concluir que el tensoactivo adecuado para la elaboración de nanoemulsiones o/w bajo las condiciones utilizadas es el Monolaurato de sorbitán polioxietileno (tween 20) ya que formó nanoemulsiones translúcidas, con un diámetro de gota de 23 a 19 nm.

El diagrama de fases ternario, indica la zona de formación de las nanoemulsiones conteniendo al extracto de *Equisetum arvense*. La viscosidad y el tamaño de gota están en función de la concentración de tensoactivo.

## ABSTRACT

At the moment there exists a great demand worldwide for products that are not only elaborated by its nutritional or cosmetic properties but with the purpose of to improve the health and to prevent some illnesses, for it are added compound biologically active as vitamins, minerals, dietary fiber, flavonoids, among others.

The flavonoids are compound chemical that present activity antioxidant, and they can be extracted of fruits and vegetables. A restrictive in their application is that due to the groups reagents that possess, when being extracted are degraded in a lapse of short time, losing their beneficent properties for the health, for it arises the necessity of protecting them of its degradation. For such a reason, the aim of this project was to encapsulate in nanoemulsions type o/w the extract hidrofobic of *Equisetum arvense* starting from the establishment of the appropriate proportions of the components; water, organic (extract in solution oils essential: ethanol) and tensoactivo as well as the determination of the area of formation of the nanoemulsion system.

The compound flavonoids was extracted of *Equisetum arvense* (also well-known as horse line), and identified by means of cromatografy of liquids of high resolution (HPLC), for they were injected standard of quercetin and Kaempferol obtaining times of retention of  $52.011 \pm 0.03$  min and  $60.001 \pm 0.02$  min respectively, in the extraction four fractions were obtained; watery fraction (FA), fraction of chloroform (FC), fraction of ethyl acetate (FAE) and fraction butanolic (BFC). The obtained time of retention of each one of the fractions was compared with those obtained with the standards and those reported by Mimica and collaborators, (2008), finding similar times of retention among those reported by Mimica and collaborators, (2008), and those obtained in the laboratory.

The chemical characterization of the extract of *Equisetum arvense* was carried out by means of quantification of total fenols, total flavonoids and activity antioxidant, with the purpose of being able to compare these results, also was carried out an extraction of *Camellia sinensis* (black tea) under the same conditions, obtaining that *Equisetum arvense* presents  $0.84 \pm 0.15$  mgEAG/mL of solution and *Camellia sinensis*  $0.76 \pm 0.22$  mgEAG/mL of solution finding that significant difference doesn't exist ( $p \leq 0.05$ ) between both values. Of equal forms was found that significant difference doesn't exist ( $p \leq 0.05$ ) between the rates of degradation of total

flavonoids and activity antioxidant in the extracts of both plants. Later the fractions were taken to dryness and the obtained extract was dissolved in a solution of oils essential: ethanol (6:1).

The following part of the project consisted on the formation of the nanoemulsion to protect the active compounds by means of the layer interfacial formed by the present tensoactivo in the nanoemulsion, for they were tried four tensoactivos (panodan, lactipol, tween 60 and tween 20) with the purpose of choosing the one that offered the best characteristics to the nanoemulsion, obtaining that the appropriate tensoactivo was tween 20, for what decided to use this tensoactivo to carry out the later experiments.

Once elect the tensoactivo (tween 20) four formulations were designed where the dispersed phase and the phase dispersante were composed by the extract in solution oils essential: ethanol, and water respectively.

In these formulations stayed constant the quantity of tensoactivo, and the relationship water:organic was varied to find that with which the formation of the nanoemulsion was achieved for it was necessary to measure the drop size finding that this relationship water:organic was 16:1. Later on eight formulations were elaborated, fixing the relationship w:o and varying the tween 20 concentration (of 0.19 to 0.39 nanoemulsion g/g), obtaining the formation of the nanoemulsion between concentrations of 0.26 and 0.37 g/g nanoemulsion, to more values, a precipitate was observed, due the tween excess 20. To the nanoemulsions formed in this experiment they were determined drop size obtaining values between 19 and 23 nm, viscosity was also measured to determine the effect of the tensoactivo concentration on this, finding that when increasing the concentration of tensoactivo equal forms the viscosity increases.

With the determination of the relationship water:organic which is achieved the formation of the nanoemulsion and the effect of the concentration of the tensoactivo on the drop size, the area of formation of the nanoemulsion was located in the ternary diagram of phases finding that the axis of the watery phase goes from 63 to 80%, in the axis of the Tween 20 go from 20 to 37% and in the axis of the organic, go from 0 to 17% (percentages mass).

Lastly, were carried out the corresponding calculations based on the flavonoides concentration in the extract obtaining that approximately 12.7 g of nanoemulsion is equivalent to 30% (6.9 mg/day) of the daily ingest recommended for total flavonoids.

The results obtained in this investigation took to conclude that the appropriate tensoactivo for the elaboration of nanoemulsions o/w low the used conditions are the monolaurato of sorbitan polioxietilen (tween 20) since it formed translucent nanoemulsions, with a drop diameter of 19 to 23 nm.

The ternary diagram of phases, indicates the area of formation of the nanoemulsions containing to the extract of *Equisetum arvense*. The viscosity and the drop size are in function of the tensoactivo concentration.

# INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una demanda de productos funcionales (PF) es decir, que son elaborados no sólo por sus características nutricionales o cosméticas sino también para cumplir una función específica como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Este tipo de productos son un campo emergente en el área alimentaria y cosmética con una posibilidad muy amplia de investigación. Entre éstos se encuentran los alimentos funcionales que contienen un componente, nutriente o no, con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, con un efecto fisiológico añadido a su valor nutricional (Silveira y col. 2003).

Dentro de los PF también se encuentran algunos productos de cuidado personal, como las cremas humectantes adicionadas con vitaminas o antioxidantes.

A los PF se les agregan componentes biológicamente activos como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia, antioxidantes entre otros. Algunos de estos componentes pueden ser extraídos de frutas o vegetales, un ejemplo claro son los flavonoides, los cuales son compuestos químicos presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos entre otros. Además se ha reportado que poseen propiedades antiinflamatorias (Russo y col., 2000), antitrombóticas (Pietta, 2000), antitumorales (Hirono, 1987), antialérgicas (Pietta, 2000) y retardan los efectos de la edad. Sin embargo, al ser extraídos, las propiedades funcionales de dichos compuestos son de corto plazo debido a la rápida oxidación que sufren bajo condiciones ambientales (luz, temperatura, sales, etc.) y/o a la degradación durante el procesamiento de alimentos, ocurriendo una pérdida total o parcial de los mismos, ocasionando la disminución de sus propiedades benéficas para la salud lo que limita su aplicación en productos para consumo humano. Debido a que el ser humano no puede producir flavonoides, éstos deben obtenerse mediante la alimentación o mediante cosméticos a través de la piel.

México cuenta con una gran diversidad de plantas consideradas y utilizadas como curativas o quimioprotectoras que se utilizan ampliamente como medicamentos preventivos alternos, principalmente en las zonas de bajos recursos económicos. Se ha reportado que los extractos obtenidos de plantas nativas de México como el tepozán (*Buddleja cordata* Kunth (Buddlejaceae)), el maguey morado (*Rhoeo discolor*), el muicle (*Justicia spicigera*), los cítricos (*Citrus* spp.), la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y la cola de caballo (*Equisetum arvense*) poseen una importante actividad antioxidante, antimutagénica, antimicrobiana,



analgésica, antihipertensiva, y fotoprotectora (Ávila y col., 2005; González y col., 2003; Cáceres y col., 2001; García y col., 2002; Sáyago y col., 2007).

Por otro lado, se considera que una de las principales metas de la industria farmacéutica y de alimentos para el siglo XXI es el desarrollo y uso de fitoquímicos con fines terapéuticos multiobjetivos dirigidos principalmente a la activación de mecanismos de defensa y de reparación del organismo humano más que a la destrucción directa de los agentes degradativos.

Desde este punto de vista una estrategia es extraer de las plantas los compuestos bioactivos e incorporarlos en nanoemulsiones con la finalidad de protegerlos de los factores ambientales degradativos y posteriormente desarrollar productos con una vida de anaquel prolongada que contengan a las nanoemulsiones.

# **CAPÍTULO 1**

## **MARCO TEÓRICO**

## 1.1 Emulsiones

### 1.1.1 Conceptos y tipos

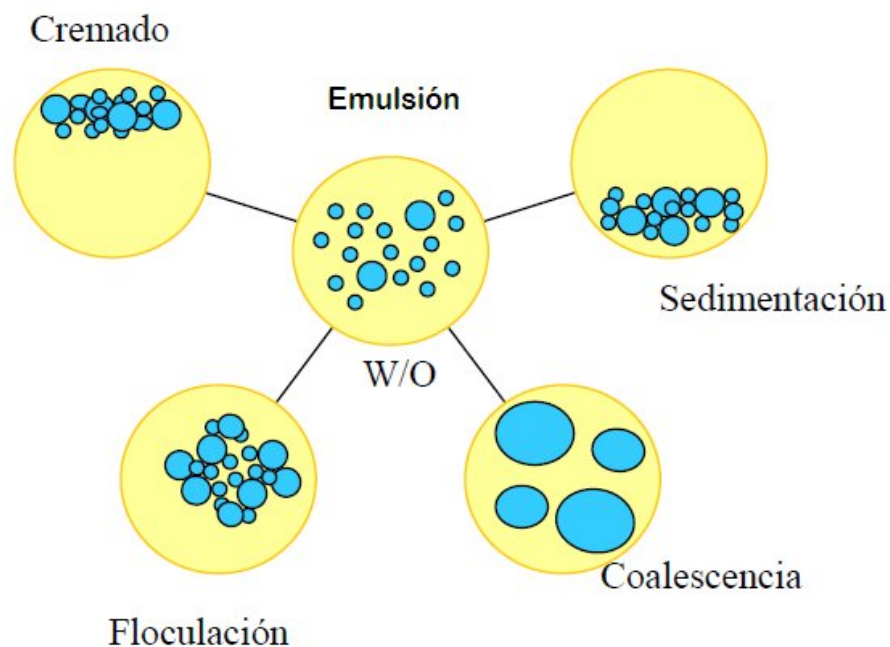
Una emulsión consiste de dos líquidos inmiscibles (usualmente aceite y agua), con uno de los dos líquidos disperso en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro (Becher, 2001). En la mayoría de los alimentos, los diámetros de las gotas usualmente oscilan entre 0.1 y 100µm (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Friberg y Larrson, 1997). Las emulsiones pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo a la distribución del espacio relativo del aceite y la fase acuosa. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamado emulsión aceite-en-agua (o /w), mientras el sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa es llamado emulsión agua-en-aceite (w/o).

La sustancia que constituye las gotas en una emulsión es llamada fase dispersa, discontinua o fase interna y el líquido circundante es llamado fase dispersante, continua o externa. La concentración de las gotas en una emulsión es usualmente descrita en términos de la fracción del volumen en la fase dispersa,  $\Phi$  (McClements, 2005).

En ambos casos (o/w ó w/o), la fase interna y externa están separadas físicamente por una fase intermedia inmiscible. (Dickinson, 1992). En años recientes se ha estudiado el uso de nanoemulsiones, es decir emulsiones que tienen un diámetro de gota menor a 100nm (Jadhav y col., 2006). Estas emulsiones también son referidas en la literatura como miniemulsiones (El-Aasser y Sudol, 2004), nanoemulsiones (Tadros y col., 2004; Sonnevile y col., 2004), emulsiones ultrafinas (Nakajima, 1997) y emulsiones submicron (Amselem y Friedman, 1998). Las nanoemulsiones son sistemas translúcidos a simple vista (Mason y col., 2006), esto las hace atractivas para el uso de productos de cuidado personal y cosméticos debido a que su transparencia se relaciona con frescura, pureza, simplicidad, humectación, etc. Además de que debido a su tamaño son fácilmente adsorbidas por la piel, por lo que son de gran interés para aplicaciones en la industria química, farmacéutica, alimenticia, etc.

El principal interés en su aplicación se debe a que el pequeño tamaño de gota:

- i) Causa una gran reducción en el efecto de la fuerza de gravedad y el movimiento Browniano. Esto significa que no hay cremado o sedimentación durante el almacenamiento, lo cual sucede frecuentemente en las emulsiones.  
Cremado: es la separación de los componentes de la emulsión basada en la densidad de las gotas. El nombre es derivado de la separación de la crema en una leche no homogeneizada. El cremado es un proceso considerado indeseable (Becher, 2001).  
Sedimentación: los glóbulos dispersados se precipitan debido a una densidad mayor que la fase continua (Becher 2001) (Fig.1.1).
- ii) Evita la floculación (Fig.1.1). Es decir, la débil floculación se previene y esto permite al sistema permanecer disperso sin que haya separación. Floculación: Se refiere al proceso en el cual racimos de dos o más gotas se comportan cinéticamente como una unidad pero las gotas individualmente mantienen su identidad (Petsev y col., 1995; Verwey y Overbeek, 1948).
- iii) Evita la coalescencia (Fig.1.1) debido a que las gotas no son deformables y no hay fluctuaciones en la superficie.  
Coalescencia: Es la colisión y subsecuentemente la fusión irreversible de dos gotas, el fin de la coalescencia es la completa separación de fases (Kabalnov y Wennerstrom, 1996).
- iv) Permite depositar los sustratos uniformemente en la piel.
- v) Permite que las nanoemulsiones penetren a través de la superficie áspera de la piel y esto refuerza la entrada de los compuestos activos.
- vi) Permite una eficiente liberación de ingredientes activos a través de la piel. La gran área superficial del sistema de nanoemulsión provoca una rápida penetración de los compuestos activos.



*Figura 1.1 Principales mecanismos de inestabilidad en una emulsión simple.*

Otras características importantes de las nanoemulsiones son:

- v) La naturaleza transparente del sistema, su fluidez tanto como la ausencia de espesor puede dar una sensación agradable y ligera a la piel.
- vi) Las nanoemulsiones pueden ser aplicadas para liberar fragancias, las cuales pueden ser incorporadas en muchos productos de cuidado personal. (Tadros y col., 2004).

Tanto las nanoemulsiones aceite-en-agua (o/w) como las nanoemulsiones agua-en-aceite (w/o) han tenido un desarrollo activo que se ve reflejado en numerosas publicaciones y patentes (Solans y col., 2005).

El uso de las nanoemulsiones tiene grandes ventajas sobre las emulsiones, en la Tabla 1.1 se mencionan las principales características de ellas.

*Tabla 1.1 Principales características de las nanoemulsiones y emulsiones.*

<b>Características</b>	<b>Nanoemulsión</b>	<b>Emulsión</b>
<b>Tamaño de gota (fase dispersa)</b>	< 100 nm	> 100 nm
<b>Aspecto</b>	transparente	Opaco
<b>Formación</b>	espontánea	Homogeneización
<b>Estabilidad cinética</b>	alta	baja

### 1.1.2 Composición y localización relativa de las fases de una nanoemulsión.

Las nanoemulsiones o/w son nanoemulsiones directas mientras que las nanoemulsiones w/o son nanoemulsiones inversas y esto depende de su composición (Tabla 1.2).

*Tabla 1.2 Composición relativa de las fases de las nanoemulsiones*

	<b>Fase acuosa (%)</b>	<b>Fase orgánica (%)</b>	<b>Tensoactivo (%)</b>
<b>Nanoemulsión Directa</b>	50-75	3-40	10-30
<b>Nanoemulsión Inversa</b>	3-35	50-75	10-30

La localización relativa de las nanoemulsiones está dada en un diagrama de fases ternario y ésta depende del tipo de nanoemulsión (Fig. 1.2).

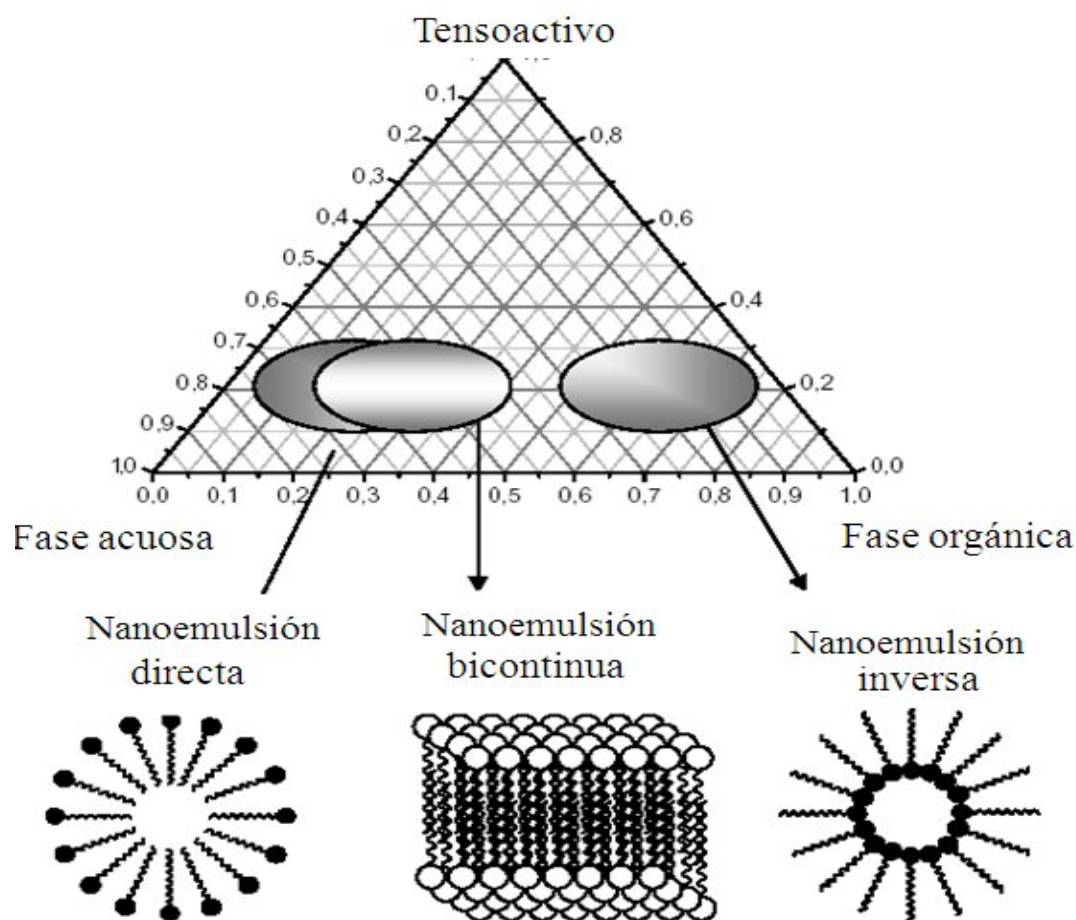


Figura 1.2 Localización relativa de las nanoemulsiones en el diagrama de fases ternario.

Tadros y col., 2004

### 1.1.3 Formación de las nanoemulsiones

Como sistema en no-equilibrio, la formación de nanoemulsiones requiere la aplicación de energía. Ésta energía puede ser aplicada por equipos mecánicos o por el potencial químico inherente de los componentes (Solans y col., 2003).

Se sabe que la cantidad de energía necesaria para la formación de las nanoemulsiones es variable. Existe un área de investigación que estudia la formación de nanoemulsiones de baja energía (Gupta y Cannon, 2000; Miller, 2006). En esta situación, se formará una

nanoemulsión por la adición de aceite y surfactantes al agua debido a la baja tensión interfacial que provocan los altos niveles de surfactante.

#### **1.1.4 Métodos de emulsificación**

Existen tres métodos que pueden ser aplicados para la preparación de nanoemulsiones.

El uso de alta presión de homogeneización, homogeneización ultrasónica y el método de temperatura de inversión de fases (PIT por sus siglas en inglés).

##### *Uso de alta presión de homogeneización.*

Los homogeneizadores de alta presión son muy utilizados en la industria para la preparación de nanoemulsiones (Solans y col., 2003; Jafari y Bhandari, 2006). Generalmente trabajan en un intervalo de presión que va de 50 a 100MPa. Recientemente se ha reportado el uso de un instrumento que alcanza presiones de 350MPa. (Floury y col., 2003). Sin embargo las presiones altas no pueden utilizarse para todo tipo de nanoemulsiones, por ejemplo los sistemas o/w que utilizan metilcelulosa como emulsionante sólo podrían estabilizarse con un homogeneizador de baja presión (150MPa) debido a que el fuerte flujo de elongación producido a presiones más altas promueve la degradación irreversible de las moléculas de cadena larga.

##### *Emulsificación ultrasónica*

La emulsificación ultrasónica es muy eficiente reduciendo el tamaño de gota pero sólo es apropiada para lotes pequeños (Walstra y Decker, 1996). Un estudio reciente en la preparación de nanoemulsiones polimerizables ha mostrado que la eficiencia del proceso de dispersión es fuertemente dependiente del tiempo de ultrasonicación a diferentes amplitudes y que cuanto más hidrofóbico es el monómero requiere mayor tiempo de sonicación (Gupta y Cannon, 2000; Miller, 2006).

##### *Método de temperatura de inversión de fases (PIT)*

El método de inversión de fases por temperatura, método PIT introducido por Shinoda y Saito, (1968) es ampliamente usado en la industria (Forster y Von Rybinski, 1998), se basa en formar la emulsión utilizando un cambio brusco de temperatura. Sin embargo, su uso está limitado a sistemas formulados con surfactantes no iónicos del tipo etoxilado, los cuales



cambian su balance hidrofílico-lipofílico con la temperatura; es decir a temperaturas inferiores a la temperatura de inversión de fases se forman nanoemulsiones aceite-en-agua mientras que a temperaturas superiores a la misma se forman nanoemulsiones agua-en-aceite (Shinoda y Kuneida, 1983).

Cerca del PIT se producen nanoemulsiones estables y de pequeño tamaño de gota debido al rápido enfriamiento producido (Brooks y col., 1998; Sottman y Strey, 1997; Friberg y Solans 1978).

#### **1.1.5 Estabilidad de las nanoemulsiones.**

Desde el punto de vista termodinámico, en un sistema bifásico, la fase dispersa consiste de glóbulos nanoscópicos, usualmente con un intervalo de tamaño menor a 100 nm en diámetro, tales dispersiones nunca son completamente estables en el sentido absoluto, porque la interfase entre las fases es el lugar de energía libre superficial, y si dos glóbulos se encuentran juntos hay una reducción neta en el área interfacial.

Las nanoemulsiones son sistemas inestables debido a que el contacto entre las moléculas de agua y el aceite no es favorable termodinámicamente.

El cambio de energía libre asociada con la formación de la nanoemulsión determina si una nanoemulsión es o no termodinámicamente estable, pero no da una indicación de la velocidad con la que las propiedades de una nanoemulsión cambian a través del tiempo, ni el tipo de cambios que pueden ocurrir, o los mecanismos físicos responsables de estos cambios.

La información acerca de la dependencia del tiempo en la estabilidad de la nanoemulsión es particularmente importante para los científicos en alimentos, en fármacos y cosmetólogos quienes necesitan crear productos que retengan sus propiedades deseables por un tiempo suficientemente largo, bajo una variedad de diferentes condiciones ambientales. Por esta razón, los investigadores se interesan más en la estabilidad cinética de las nanoemulsiones, que en su estabilidad termodinámica (McClements, 1999).

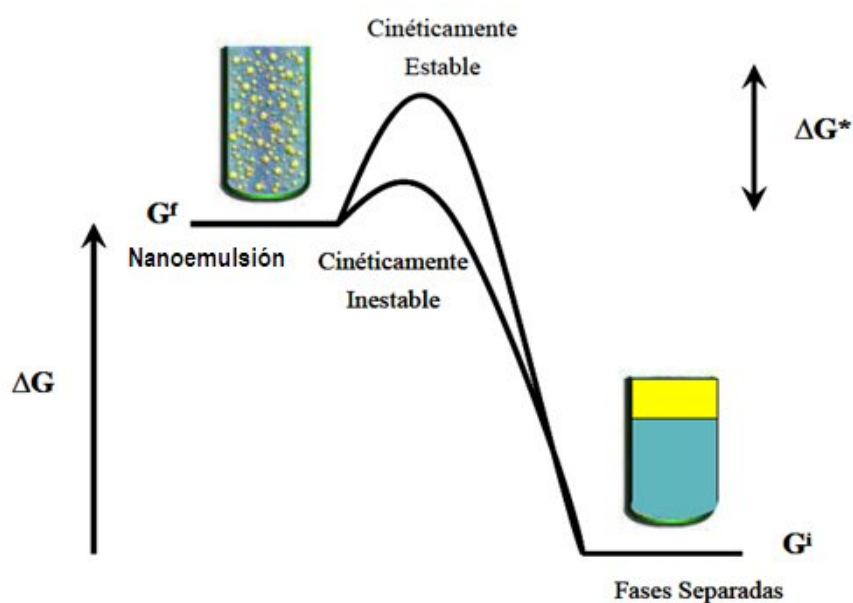
La importancia de los efectos cinéticos se destaca al comparar la estabilidad a largo plazo de las emulsiones con la misma composición pero con diferentes tamaños de gota. Una emulsión que contiene gotas pequeñas usualmente tiene una mayor vida de anaquel (estabilidad cinética más grande) que una que contenga gotas grandes, aunque sea más inestable termodinámicamente (porque tiene un área interfacial mayor) (McClements, 1999).

A pesar del hecho de que las nanoemulsiones existen en un estado termodinámicamente inestable, permanecen cinéticamente estables (metaestables) por meses o incluso años (Tadros y col., 2004).

Conceptualmente, la estabilidad cinética de una nanoemulsión puede atribuirse a la presencia de una barrera energética entre dos niveles energéticos; esto es, una energía de activación ( $\Delta G^*$ ), la cual debe superarse antes de que se alcance el estado termodinámicamente más favorable. Una nanoemulsión que es cinéticamente estable debe tener una energía de activación significativamente más grande que la energía térmica del sistema ( $kT$ ). En realidad, las nanoemulsiones tienen un número diferente de estados metaestables, y cada uno de ellos tiene su propia energía de activación. Así, una nanoemulsión puede moverse de un estado metaestable a otro antes de alcanzar su estabilidad termodinámica (Fig. 1.3).

Una nanoemulsión cinéticamente estable (metaestable) es aquella en la que no se presentan cambios marcados en la distribución del tamaño de las gotas, en su estado de agregación, o en su arreglo espacial en la escala del tiempo de observación. Esta escala de tiempo puede variar de meses a años dependiendo de la situación (Dickinson, 2003).

La estabilidad cinética es un parámetro muy importante en las nanoemulsiones pensadas para uso comercial, especialmente las elaboradas para liberación de fármacos. Algunas de las variables importantes a monitorear son: tamaño de gota, viscosidad, potencial zeta y pH (Gupta y Cannon 2000).



*Figura 1.3 Las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero pueden existir en un estado metaestable y por lo tanto ser cinéticamente estables.*

### 1.1.6 Factores de estabilidad de nanoemulsiones.

El tamaño pequeño de gota de las nanoemulsiones confiere estabilidad contra sedimentación (o cremado) porque el movimiento browniano y consecuentemente la velocidad de difusión son más altas que la velocidad de sedimentación inducida por la fuerza de gravedad (Solans y col., 2005).

El único problema de inestabilidad de las nanoemulsiones es el fenómeno de maduración de Ostwald o difusión molecular (Tadros, y col., 2004).

### 1.1.7 Fenómeno de maduración de Ostwald.

El fenómeno de maduración de Ostwald es el proceso en donde las gotas grandes crecen a expensas de las más pequeñas por el transporte de masa de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua intermedia (McClements, 2005).

Las nanoemulsiones polidispersas y la diferencia en solubilidad entre las gotas pequeñas y grandes es el principal mecanismo de desestabilización de las nanoemulsiones. (Tadros y col., 2004).

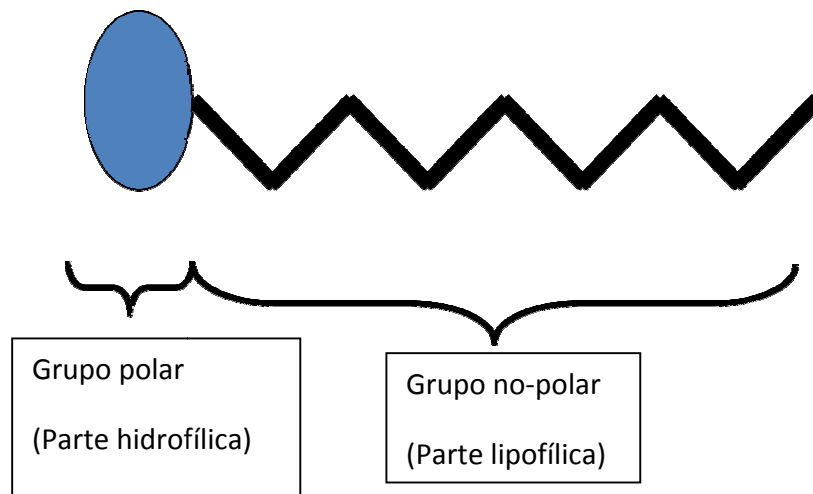
Si hay alguna difusión del contenido de la fase dispersa las gotas grandes crecerán más a expensas de las pequeñas y la media de la distribución de tamaño aumentará continuamente. Éste efecto ha sido descrito por Lifshitz y Slyozov, (1961). Y de manera independiente por Wagner (1961).

Higuchi y Misra (1962) sugieren que la adición de un componente secundario menos soluble en agua puede disminuir el fenómeno de maduración de Ostwald. La difusión más lenta del componente secundario llevará a una distribución heterogénea con las gotas más pequeñas enriquecidas en el componente menos soluble y las gotas más grandes enriquecidas en el componente más soluble. Sin embargo esta segregación interna será opuesta termodinámicamente como la presión osmótica y actuará para limitar las diferencias entre las gotas y posteriormente se alcanzará el equilibrio. Este principio ha sido aplicado exitosamente con hidrocarburo (Taylor y col., 1998) y en emulsiones con fluorocarburo (Sharma y col., 1988; Weers y col., 1994).

Con un aditivo escogido apropiadamente, la maduración de Ostwald puede ser efectivamente eliminada (Kabalnov y Shchukin, 1992).

## **1.2 Agentes emulsionantes**

Un aspecto fundamental en la formación de nanoemulsiones es el uso de emulsionantes los cuales son moléculas con actividad superficial que se adsorben en la superficie de las gotas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que previene la agregación de las gotas y además disminuyen la tensión superficial en la interfase. La mayoría de los emulsionantes son moléculas anfifílicas, es decir, contienen regiones polares y no polares en la misma molécula (Dickinson, 2003) como se muestra en la Figura 1.4.



*Figura 1.4 Representación de la estructura de un emulsionante.*

La estabilidad de las nanoemulsiones es de vital importancia en aplicaciones industriales (Cobb, 1946). Las características deseables de un emulsionante pueden englobarse en los siguientes puntos (Budavari y col., 1989).

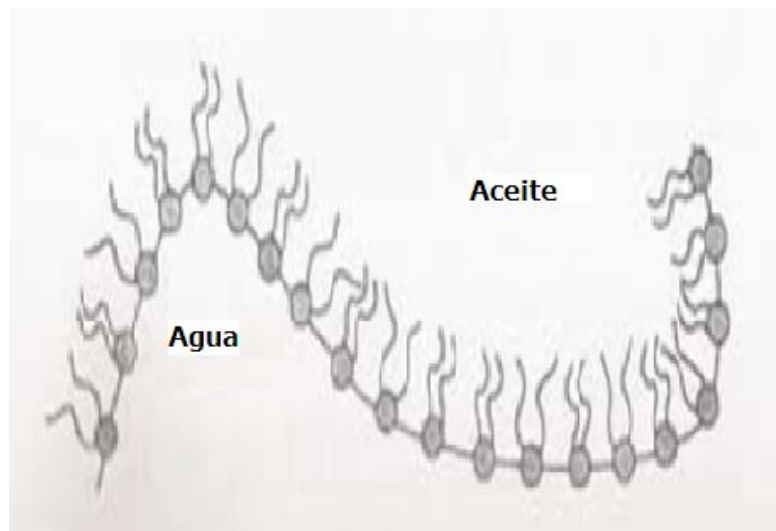
- Deben reducir la tensión interfacial a alrededor de 5 dinas/cm en emulsiones preparadas con agitación (Yuan y col., 2007).
- Deben formar una película no adherente que no se adelgace cuando dos gotas colisionen y no permita la floculación o coalescencia (Kobayashi y col., 2002).
- Debe tener estructura molecular específica con terminación polar para atraer al agua o terminación apolar para atraer al aceite (Schröder y Schuber 1999).
- Debe ser más soluble en la fase continua así que debe adsorberse rápidamente alrededor de las gotas de la nanoemulsión (Walstra y Derker, 1996).
- Mostrar capacidad para emulsionar el sistema requerido con pequeñas concentraciones de emulsionante (Sonneville y col., 2004).
- Debe ser relativamente económico, debe ser seguro y no tóxico (Tadros y col., 2004).

Los mecanismos de inestabilidad en una nanoemulsión, son influenciados por la concentración de los emulsionantes en las fases acuosas, y en mayor grado, por la concentración del emulsionante liposoluble, la naturaleza y viscosidad de la fase oleosa, la

naturaleza y concentración de los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, así como la adsorción de moléculas en las interfases (Wen y Papadopoulos, 2001).

Un factor importante en el desarrollo de nanoemulsiones, es el tipo de emulsionante, los más comunes son conocidos como tensoactivos (Kobayashi y col., 2002; Schröder y Schubert, 1999).

Por definición, un tensoactivo es una molécula anfifílica que tiene una “cabeza” con un grupo hidrofílico, el cual tiene alta afinidad por el agua y una “cola” con un grupo lipofílico que tiene alta afinidad por el aceite (Hasenhuettl, 1997) como se muestra en la Figura 1.5.



*Figura 1. 5 Representación de la película interfacial formada por el tensoactivo.*

Existen diferentes tipos de tensoactivos que pueden ser aniónicos (sales de sodio de ácidos grasos, lauril sulfato), catiónicos (contienen compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o de amonio cuaternario) y no iónicos (monoacilglicerol, ésteres de ácidos grasos). El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquil benceno y a veces una estructura de origen natural como un ácido graso, sobre todo cuando se requiere una baja toxicidad.

Los tensoactivos no iónicos no producen iones en solución acuosa y por este hecho son compatibles con cualquier otro tipo; es por esto que son excelentes candidatos para formulaciones complejas que se consiguen a menudo en aplicaciones prácticas (Kobayashi y col., 2002).

Por otra parte estos tensoactivos son menos sensibles que los aniónicos a los electrolitos, especialmente a los cationes divalentes, y pueden por lo tanto, ser utilizados en presencia de una salinidad alta. Algunos presentan muy bajo nivel de toxicidad y se utilizan en la fabricación de fármacos, cosméticos y alimentos (Salager, 2002).

En general, la cola de los tensoactivos consiste de una o más cadenas hidrocarbonadas de entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena (Bergenstahl, 1997).

Los tensoactivos juegan dos funciones principales en la formación de la nanoemulsión, una es que reducen la tensión superficial entre el aceite y el agua, esto facilita la distribución de las gotas y la otra es que estabilizan los glóbulos en contra de la coalescencia y/o agregación (Kobayashi y col., 2002).

Para la elaboración de nanoemulsiones es importante mencionar que los tensoactivos deben ser capaces de formar gotas con un diámetro menor a 100nm, por lo que deben cumplir con las siguientes características: el diámetro de la cabeza del tensoactivo debe ser dos veces menor que la longitud de la cadena carbonada y deben tener un HLB entre 8 y 17 (Tadros y col., 2004) (Fig. 1.6).

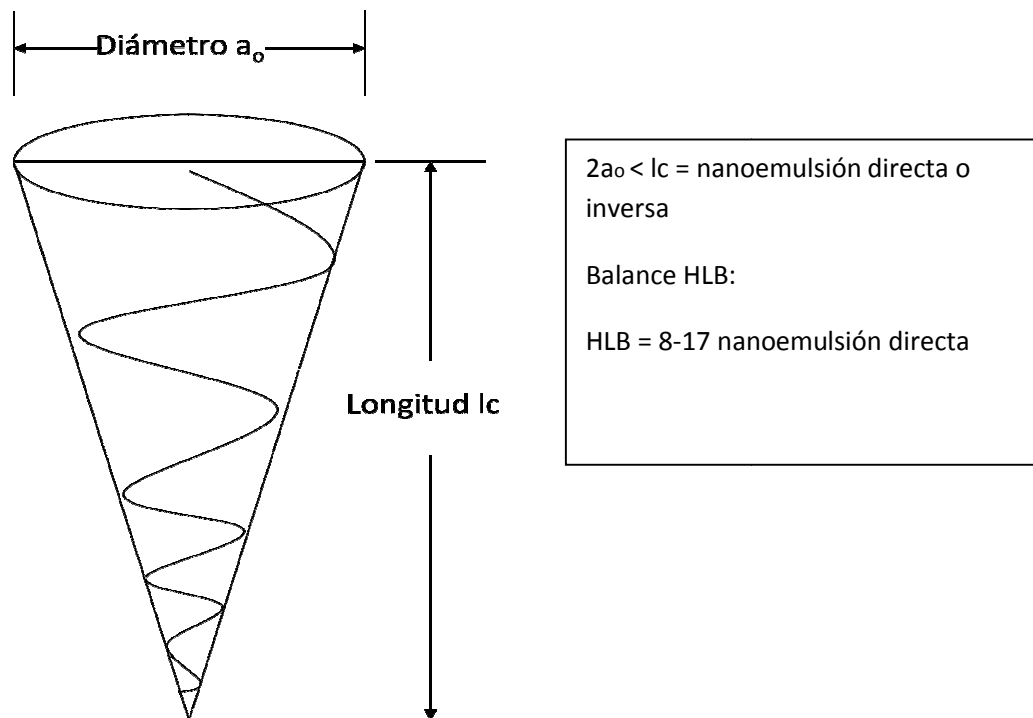


Figura 1. 6 Representación del criterio de selección de un tensoactivo

### 1.2.2 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

El agente tensoactivo debe estar equilibrado en cuanto a poseer la cantidad adecuada de grupos hidrosolubles y liposolubles para que se concentre en la interfase y de esta forma haga descender la tensión superficial. Por lo tanto un agente tensoactivo debe estar formado por una parte hidrofílica y otra lipofílica equilibradas de tal modo que cuando se disperse inicialmente en la fase oleosa o en la acuosa, emigre a la interfase y se oriente con el grupo hidrofílico en el agua y el grupo lipofílico en la fase oleosa. Griffin (1949) ideó una escala arbitraria de valores que sirviesen como medida del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los agentes superficialmente activos. Así por medio de éste sistema numérico de índices HLB (Fig.1.7) es posible establecer un intervalo de la máxima eficacia para cada tipo o clase de tensoactivo, deduciéndose de esta escala que cuanto mayor es el HLB de un agente, mayor es su carácter hidrofílico; así los spans y ésteres del sorbitán, son agentes lipofílicos y, por lo tanto, tienen valores de HLB bajos (de 1.8 a 8.6), mientras que los tweens, derivados polioxietilénicos de los spans, son hidrofílicos y en consecuencia, tienen valores de HLB altos (de 9.6 a 16.7) (Kumar y Priya, 2001).

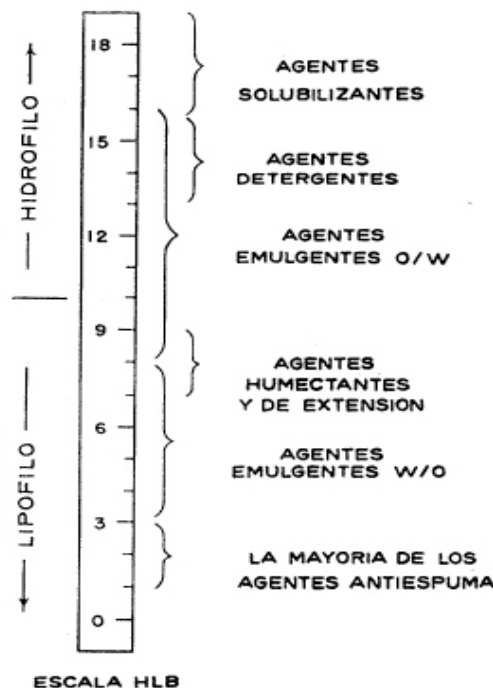


Figura 1.7 Clasificación de agentes emulsionantes de acuerdo a su HLB. Tomado de Griffin, 1949.



A continuación se muestran los valores de algunos agentes emulsionantes anfifílicos (Tabla 1.3).

*Tabla 1.3 HLB de algunos agentes emulsionantes.*

<b>SUSTANCIA</b>	<b>HLB</b>
Ácido oleico	1
Monoestearato de glicerina	3.8
Monooleato de sorbitán (span 80)	4.3
Monolaurato de sorbitán (span 20)	8.6
Goma arábica	8.0
Gelatina (Farmagel B)	9.8
Metilcelulosa (Metocel, 15 cps)	10.5
Oleato de irietanolamina	12.0
Goma tragacanto	13.2
Monooleato de sorbitán polioxietilénico (Tween 80)	15
Monolaurato de sorbitán polioxietilénico (Tween 20)	16.7
Oleato sódico	18

(Kumar y Priya, 2001).

### **1.2.3 Concentración micelar crítica (CMC)**

Un tensoactivo forma gotas en una solución acuosa cuando su concentración excede un nivel crítico conocido como concentración crítica micelar (CMC) (Myers, 1988; Lindman, 2001). Por debajo de la CMC, las moléculas del tensoactivo están dispersas predominando como monómeros, pero una vez que la CMC es excedida las moléculas de tensoactivo forman gotas y la concentración de monómeros permanece constante (Hiemenz y

Rajagopalan, 1997). Las gotas tienen una estructura altamente dinámica porque ellas se encuentran unidas sólo por interacciones físicas que son relativamente débiles comparadas con la energía térmica del sistema. A pesar de la alta naturaleza dinámica de su estructura, las gotas del tensoactivo tienen un promedio bien definido de forma y tamaño bajo ciertas condiciones ambientales (Israelachvili, 1992). Así cuando el tensoactivo es adicionado a una solución por arriba de la CMC, el número de las gotas individuales tiende a incrementar. Hay un cambio abrupto en las propiedades fisicoquímicas de una solución de tensoactivo cuando la CMC se excede, como son la tensión superficial, la conductividad eléctrica, la turbidez y la presión osmótica (Rosen, 1978; Hiemenz y Rajagopalan, 1997; Jonsson y col., 1998). Esto es porque las propiedades de las moléculas dispersas como monómeros del tensoactivo son diferentes de aquellas en las gotas; es decir, los monómeros del tensoactivo son anfifílicos y tienen una alta actividad superficial mientras que las gotas presentan poca actividad superficial porque su superficie está cubierta con cabezas de grupos hidrofílicos. Consecuentemente, la tensión superficial de la solución decrece con el incremento de la concentración del surfactante. La CMC de una solución de tensoactivo depende de la estructura química de la molécula del surfactante tanto como de la composición de la solución y de la permanencia de las condiciones ambientales (Jonsson y col., 1998; Lindman, 2001). La CMC tiende a decrecer tanto como aumenta la hidrofobicidad de las moléculas del tensoactivo (por el incremento de la longitud de la cadena hidrocarbonada) o su hidrofobicidad decrece (por el decremento de la longitud de la cabeza con grupos no iónicos).

La CMC de tensoactivos no-iónicos puede ser determinada por varios métodos, incluyendo tensiometría, viscosimetría, conductimetría, escaneo con luz, fluorimetría, calorimetría, espectrofotometría y espectroscopía con resonancia magnética nuclear (NMR). Los métodos más usados son tensiometría, fluorimetría y espectroscopía (Kumar y Priya, 2001).

### **1.3 Aplicación de nanoemulsiones en la industria**

Las nanoemulsiones están siendo investigadas porque se sabe que dependiendo de su formulación se puede mejorar la efectividad del compuesto activo o fármaco cuando son utilizadas como vehículo de liberación de compuestos activos, siendo ésta la forma más obvia de mejorar la solubilidad del compuesto activo de baja solubilidad (Fast y Mecozzi, 2009).

### **1.3.1 Compuestos activos poco solubles en agua.**

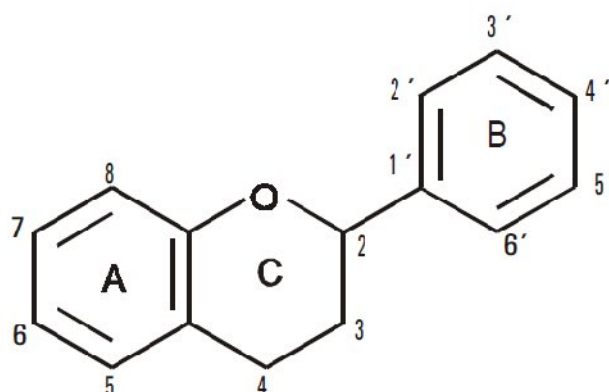
La principal aplicación de las nanoemulsiones de tipo o/w parece ser la encapsulación de compuestos activos poco solubles o insolubles en agua. (Gupta y Cannon, 2000; Klang y Benita, 1998). Las nanoemulsiones han sido utilizadas en la industria alimentaria como sistemas de encapsulación para la protección de ingredientes activos como antioxidantes, sabores, aromas, vitaminas, ácidos grasos y conservadores, contra factores ambientales (Imafidon y Spanier, 1994; Budavari y col., 1989).

Sin embargo en los últimos años las nanoemulsiones han tenido un desarrollo activo en la industria farmacéutica y cosmética que se ve reflejado en numerosas publicaciones y patentes (Solans y col., 2005). La preparación de las nanoemulsiones tipo o/w, ha sido considerada como la llave para el desarrollo de nuevos cosméticos y productos farmacéuticos solubles en agua, debido a que son sistemas translúcidos, y esto se ve relacionado con frescura y pureza por lo que se han adicionado a una gran variedad de productos como cosméticos, fragancias, cremas, etc., (Budavari y col., 1989 y Kobayashi y col., 2002). Los ingredientes activos encapsulados pueden ser liberados a través de la membrana permeable de la nanoemulsión, y fácilmente absorbidos en la piel (Tadros y col., 2004).

### **1.3.2 Emulsionamiento de flavonoides en nanoemulsiones**

Entre los principales compuestos encapsulados en nanoemulsiones se encuentran los flavonoides, los cuales, debido a la estructura de difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ) polihidroxilada que poseen son altamente reactivo, con otras especies químicas presentes en el medio que pueden desestabilizarlos, haciéndolos susceptibles a la oxidación (Fig.1.8).

Para evitar su inestabilidad, hay que proteger la base polihidroxilada (difenilpropano) contra factores ambientales formando una barrera física (Hyuncheol y col., 2004 y Álvarez y col., 2005) la cual es proporcionada por la capa interfacial formada por los tensoactivos en las nanoemulsiones.



*Figura 1.8 Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.*

*La estructura de los flavonoides está compuesta por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo de pirano (C). La actividad antioxidante de éstos compuestos depende de los grupos hidroxilo y su ubicación en la estructura básica.*

#### **1.4 Flavonoides: Definición y propiedades.**

Los flavonoides son compuestos químicos presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. También se ha reportado su uso para la prevención de la artritis y la hipertensión (Pérez-Trueba, 2003).

Existen 13 subclases de flavonoides: Chalconas, dihidrochalconas auronas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavanonas, flavanol, flavandioles o leucoantocianidinas, antocianidina, isoflavonoides, biflavonoides y protoantocianidinas (ver anexo 3).

La Quercetina y el Kaempferol de acuerdo a su estructura se encuentran clasificados dentro de los flavonoles (Pérez-Trueba, 2003) (Fig. 1.9 y 1.10).

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos.

Los flavonoides son los fenoles más abundantes en la dieta. La mayoría de estos compuestos presentan actividad antioxidante, ya que se encargan de neutralizar ó inactivar moléculas inestables y altamente reactivas llamadas radicales libres (Pérez-Trueba, 2003).

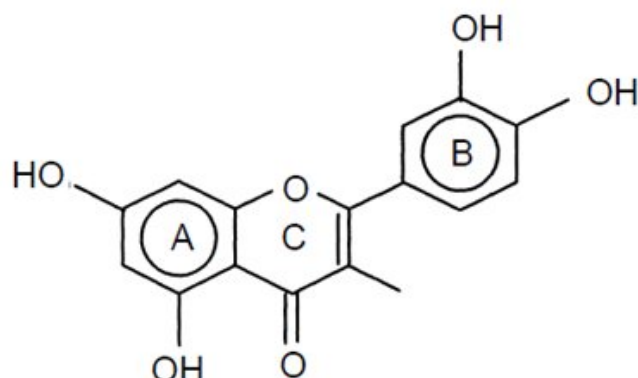


Figura 1.9 Estructura química de la Quercetina  
(Martínez y col., 2002)

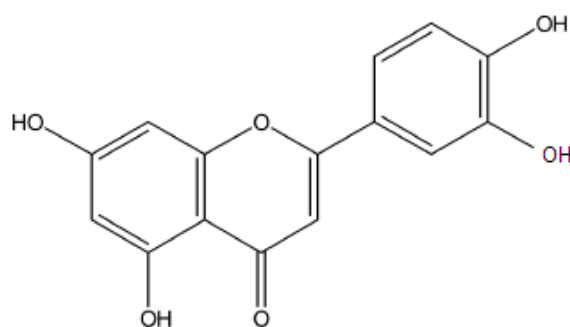


Figura 1.10 Estructura química del Kaempferol  
(Hyuncheol y col., 2004)

México cuenta con una gran diversidad de plantas consideradas y utilizadas como curativas o quimioprotectoras que son ampliamente empleadas como medicamentos preventivos alternos principalmente en las zonas de bajos recursos económicos; algunas de las cuales son especies silvestres no comerciales, tal es el caso de *Equisetum arvense*, también conocida como cola de caballo, esta planta es originaria de Centro y Sudamérica, sin embargo, en los últimos años ha aumentado su producción en México, se ha reportado que dicha planta posee un alto contenido de flavonoides los cuales le brindan capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antimutagénica y anticancerígena (Hoffman y col., 2004).

#### 1.4.1 Antioxidantes presentes en *Equisetum arvense*

Las propiedades antioxidantes de *Equisetum arvense* son atribuidas principalmente a dos flavonoles: la quercetina 3-O-glicósido y el kaempferol 3-O-glicósido, siendo éstos los que se encuentran en mayor cantidad. (Mímica y col., 2008). Y se caracterizan por tener baja solubilidad en agua.

#### 1.4.2 Propiedades de los antioxidantes

Una gran cantidad de estudios han establecido que los compuestos fenólicos de las plantas poseen propiedades antioxidantes potentes con efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos (Middleton y Kandaswami, 1994; Rice-Evans y col., 1997).

Los antioxidantes son sustancias que en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas (González y Valls, 2001).

#### 1.4.3 Actividad antioxidante

Una especie reactiva de oxígeno es un átomo o molécula con electrones desapareados, y por lo tanto, es una especie inestable. Entre estos podemos mencionar a los radicales, [ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), alcoxilo ( $RO\cdot$ ), peroxilo ( $ROO\cdot$ ) y óxido de nitrógeno ( $NO\cdot$ )] y a los no radicales [peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $\cdot O_2$ ) y peroxinitrito ( $ONOO\cdot$ )]. Éstas especies reactivas pueden ser generadas de forma endógena a través del metabolismo de la respiración, células fagocitarias, autooxidación de compuestos de carbono y la activación catalítica de algunas enzimas; y exógenamente, por radiación, luz solar, tabaco, ozono, drogas, contaminantes y aditivos en alimentos (González y Valls, 2001).

La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia para disminuir la presencia de las especies reactivas de oxígeno antes de su ataque a diversos sustratos (lípidos, proteínas, ADN). Esto es de suma importancia debido a que las especies reactivas de oxígeno producen diversas acciones sobre el metabolismo que pueden ser el origen del daño celular porque actúan:

1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).

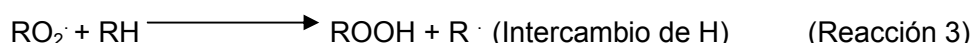
2. Sobre los glúcidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación en prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactividad y desnaturalización.
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el organismo también utiliza los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores. Por lo tanto, el problema real se presenta cuando las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobrepasan las defensas endógenas ocasionando los daños antes mencionados (González y Valls, 2001).

#### 1.4.4 Mecanismo de acción de los antioxidantes

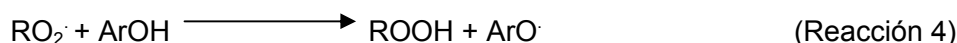
Para comprender la forma en la que actúa un antioxidante frente a un radical libre es necesario conocer los dos tipos de mecanismos por los que puede actuar, a continuación, estos mecanismos se ejemplifican para antioxidantes fenólicos (en donde el término ArOH se refiere a un compuesto que contiene al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático.)

El primer mecanismo implica la transferencia de un átomo de hidrógeno y se ilustra mediante la peroxidación lipídica en las Reacciones 1-3.



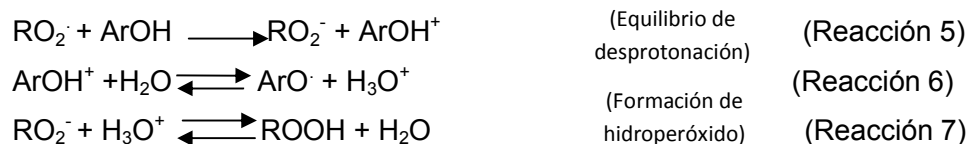
Una vez que se genera el radical R $\cdot$ , las reacciones 2 y 3 forman una reacción en cadena que da origen a la formación de hidroperóxido lipídico (ROOH), dando lugar a la oxidación y rancidez de las grasas. La reacción 2 es mucho más rápida ( $10^9\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) que la 3 ( $10^1\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Pedulli y col., 1997; Wright y col., 2001).

El papel de antioxidante ArOH es interrumpir la reacción en cadena de acuerdo a la reacción siguiente:



Para que ArO $\cdot$  sea efectivo, debe ser estable y reaccionar lentamente con el sustrato pero rápidamente con RO $_2\cdot$ . Es importante que la energía necesaria para arrancar ese átomo de hidrógeno sea mínima para que se transfiera fácilmente hacia el radical libre.

Otro mecanismo, por el cual un antioxidante fenólico puede estabilizar un radical libre es por transferencia electrónica, donde se forma primero un radical catión seguido de una rápida formación reversible en solución:

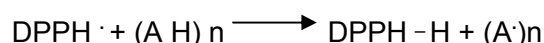


Este mecanismo es aplicado cuando el compuesto objeto de estudio es altamente sensible al disolvente utilizado. (Pedulli y col., 1997; Wright y col., 2001).

Cabe mencionar que la actividad antioxidante puede ser evaluada tanto experimental como teóricamente. Cada uno de los métodos que se enfoca en la evaluación de esta propiedad ofrece diferente confiabilidad de resultados.

#### 1.4.5 Cuantificación de la capacidad antioxidante.

Método del DPPH•. Brand-Williams y col., (1995) evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando se reduce por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antiradical se ejemplifica con la siguiente ecuación:



Donde AH es un antioxidante que actúa como antiradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (A•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas (Brand - Williams y col., 1995).

#### 1.4.6 Cuantificación de Fenoles Totales

Técnica de Folin-Ciocalteu (FC). La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de actividad antioxidante, pero puede ser útil para tales estudios, en especial si se combinan con métodos para medir actividad antioxidante.



El método de FC es uno de los métodos más antiguos para determinar el contenido de fenoles totales. Esta prueba consiste en mezclar tungstato y molibdato en un medio altamente básico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5-10 %, acuoso). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico quienes reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno  $\text{MoO}$ , este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía de uv/vis debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa en equivalentes de ácido gálico. La prueba de FC es similar a la de ABTS (2,2' Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-acido sulfónico) ya que ambos métodos ayudan a la determinación de polifenoles y monofenoles. La ventaja del método de FC sobre ABTS es que FC está relacionado con la aparición de una absorbancia que es consecuencia de la aparición de color debido a la reacción, no a una disminución de la absorbancia como ocurre con la prueba de ABTS. Otra de las ventajas es que esta prueba (FC) no requiere de una estandarización de las condiciones del análisis. Aunque, si bien el método de FC no está relacionado con la medición de actividad antioxidante, parece ser uno de los mejores métodos para estimar esta actividad antioxidante, con la excepción de que la muestra no contenga una cantidad significativa de proteína. En la literatura se pueden encontrar diversos ejemplos de la aplicación del método de FC como es el caso del vino rojo y blanco, tés y jugos (Roginsky y Lissi, 2005).

# **CAPÍTULO 2**

## **OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo General

Encapsular en nanoemulsiones tipo o/w el extracto hidrofóbico de *Equisetum arvense* a partir del establecimiento de las proporciones adecuadas de los componentes (agua, orgánico y tensoactivo) así como la determinación de la zona de formación del sistema de nanoemulsión.

Orgánico: es el extracto de *Equisetum arvense* en solución aceite esencial:etanol (6:1).

## 2.2 Objetivos particulares

- ⊙ Establecer los parámetros de extracción de los compuestos activos de *Equisetum arvense*.
- ⊙ Establecer los parámetros de preparación de la nanoemulsión (temperatura y concentración de los componentes para la formación del sistema).
- ⊙ Evaluar la formación del sistema (viscosidad y tamaño de gota).
- ⊙ Establecer los diagramas de fase ternarios para reconocer la zona de formación del sistema de nanoemulsión.

# **CAPÍTULO 3**

## **HIPÓTESIS**

A partir del establecimiento de las proporciones adecuadas de los componentes (agua, extracto de *Equisetum arvense* y tensoactivo), se puede fomentar la formación de sistemas de nanoemulsión.

# **CAPÍTULO 4**

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a la tendencia actual por utilizar productos naturales, no sólo para aplicaciones nutrimentales sino fitomédicas y cosméticas, el uso de compuestos fenólicos se ha incrementado en áreas tan diversas como la agricultura, ecología, nutrición, bebidas, medicinas naturales, pigmentación floral, pegamentos naturales entre otros. Un ejemplo claro de este tipo de compuestos son los flavonoides, los cuales han adquirido relevancia debido a la actividad biológica que ofrecen (antioxidante, antimutagénica, antiinflamatoria, etc.). El ser humano no puede producir estas sustancias químicas, por tal razón, es importante incorporarlas en el consumo diario por otros medios, como los suplementos alimenticios o los cosméticos. Por lo que los flavonoides son considerados como una buena opción para la elaboración de productos funcionales. Sin embargo la funcionalidad de los flavonoides depende en gran medida de su grado de estabilidad al momento de ser administrados al consumidor. Una limitante en la aplicación y uso extensivo de estos compuestos es que se degradan muy rápidamente, perdiendo sus propiedades funcionales en un lapso de tiempo relativamente corto.

El estudio fundamental de distintos fenómenos involucrados en el deterioro de los flavonoides y la propuesta de distintos mecanismos de acción para prevenir su degradación constituye una alternativa para el uso y aplicación de las nanoemulsiones debido a que poseen una barrera formada por un tensoactivo en la interface de las gotas que le permite proteger a dichos compuestos de su degradación.

El uso de nanoemulsiones tiene grandes ventajas sobre las emulsiones, debido a que el pequeño tamaño de gota permite la absorción a través de la piel, esto amplía las opciones de aplicación y nos lleva a considerar el uso de cosméticos, a diferencia de las emulsiones que son de mayor tamaño y sólo pueden ser administradas por medio de la ingesta de alimentos.

La formación de las nanoemulsiones se reporta como espontánea sin embargo, se requiere de cierta energía para acelerar su formación aún así la energía necesaria es menor que la requerida para formar emulsiones.

Otro punto muy importante es que las nanoemulsiones debido a su tamaño de gota presentan estabilidad cinética lo que les da una vida de anaquel prolongada a diferencia de las emulsiones que son sistemas altamente inestables.

# **CAPÍTULO 5**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 5.1 Estrategia experimental

Los experimentos realizados en el presente trabajo, se ordenaron en tres etapas.

1. Se comenzó con la extracción de los compuestos activos de *Equisetum arvense*, probando con diferentes solventes.
2. Una vez obtenido el extracto se procedió a seleccionar el tensoactivo adecuado, realizando pruebas con diferentes tensoactivos.
3. Posteriormente se llevó a cabo la formación de la nanoemulsión variando la concentración del orgánico (extracto) y del tensoactivo (Fig. 5.1).

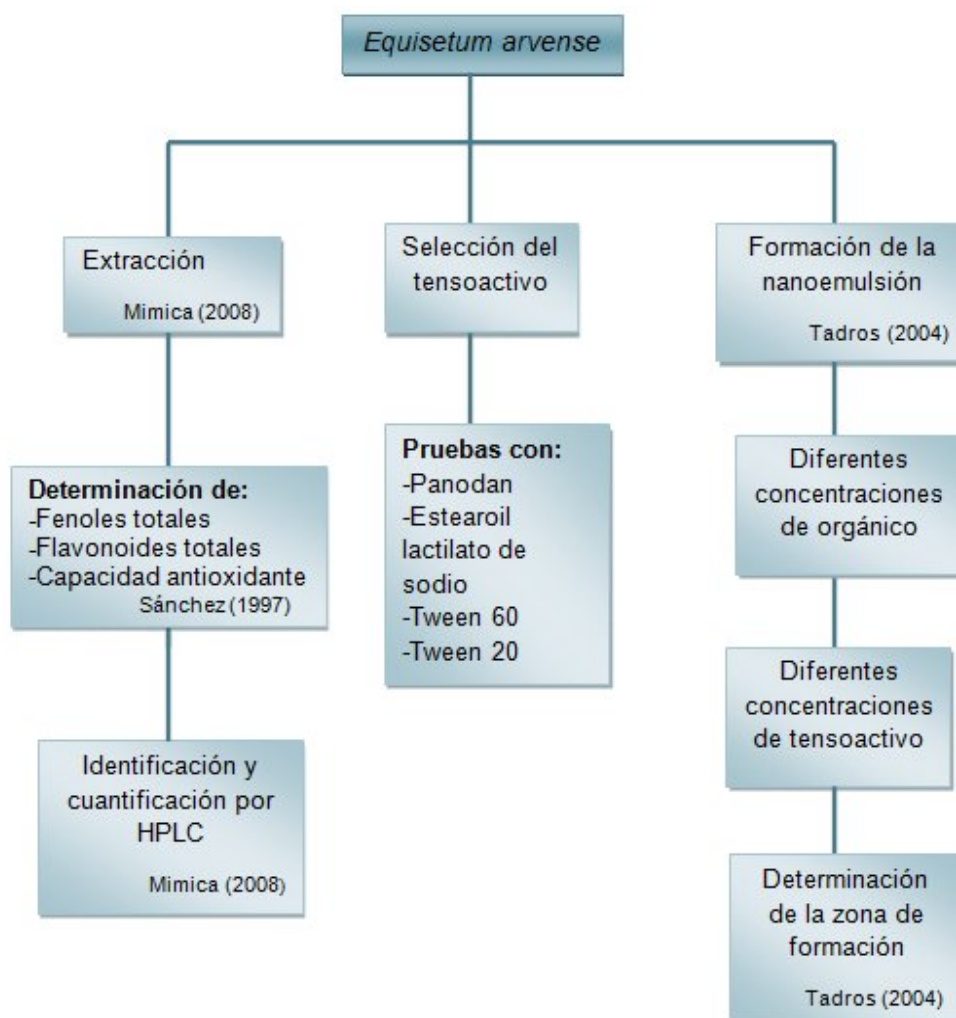


Figura 5.1. Estrategia experimental

## 5.2 Materiales

Éter de petróleo, metanol al 70%, Cloroformo, acetato de etilo, butanol y etanol. Los solventes mencionados fueron obtenidos de J.T. Baker México, grado reactivo. Agua destilada.

Quercetina (90%), kaempferol (90%) (Aldrich Chemicals, E.U.A.)

Ácido gálico (99 %) (Aldrich Chemicals, E.U.A), Folin-Ciocalteu (85 %), Carbonato de sodio (Baker México), cloruro de aluminio al 5 % (J.T Baker México), y metanol (J.T Baker), 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazol (DPPH 95 %)(Aldrich Chemicals, E.U.A )

Solución aceite esencial:etanol (6:1)

Panodan (HLB=8), Estearoil lactilato de sodio (lactipol) (HLB=11), Monoestearato de sorbitán polioxietileno (Tween 60) (HLB=14.9) y Monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tween 20) (HLB=16.7) (Canamex Químicos, México).

### 5.2.1 Material Vegetal

*Equisetum arvense* (cola de caballo), obtenida en el mercado de sonora. Se utilizó la parte aérea de la planta seca.

*Camellia sinensis* (Té negro), La carabela ®. Contiene las hojas de la planta seca.

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 Extracción de los compuestos activos de *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis* (te negro).

Con la finalidad de tener un punto de comparación en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante en el extracto de *Equisetum arvense*, se realizó una extracción de *Camellia sinensis* (té negro) y se hicieron las mismas determinaciones (contenido de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante), se eligió esta planta debido a que es una de las más estudiadas y reconocidas por sus propiedades antioxidantes.

Se maceraron 100 g de las dos plantas secas (*Equisetum arvense* y *Camellia sinensis*), con ayuda de un mortero, posteriormente se vertieron en un matraz erlenmeyer de 1000 mL

adicionando 400mL de éter de petróleo, se dejó reposar por 12 h a  $25\pm 2$  °C. Posteriormente se adicionaron 200mL de metanol (70 %) y se dejó reposar por 24 h a  $25\pm 2$  °C. El extracto obtenido fue filtrado a  $25\pm 2$  °C utilizando papel filtro whatman del No.1 y se llevó a sequedad con vacío por medio de un rotavapor Buchi R-114 con un baño B-480, Switzerland. El extracto se redisolvió en 30 mL de agua a 85 °C y posteriormente se realizaron tres separaciones líquido-líquido con cloroformo, acetato de etilo y butanol respectivamente obteniéndose una fracción acuosa (FA), una con cloroformo (FC), una con acetato de etilo (FAE), y una con butanol (FB) (Mímica y col., 2008).

### **5.3.2 Determinación del contenido de fenoles totales.**

A las fracciones obtenidas en la extracción de ambas plantas, se les determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu de la siguiente manera: 0.02mL de muestra fue llevada a un volumen de 1.6mL con agua destilada, a la cual se le agregaron 100 microlitros del reactivo de Folin, dejando reposar durante 8 minutos, posteriormente se adicionaron 300 microlitros de una solución de carbonato de sodio al 20%, dejando reposar durante 30 minutos a 40°C y finalmente se midió la absorbancia a 765nm. Se realizó una curva patrón empleando ácido gálico. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Roginsky y Lissi, 2005). Y por último se calculó el tiempo de vida media de los fenoles totales por medio del ajuste de un modelo matemático.

### **5.3.3 Determinación del contenido de flavonoides totales.**

A las fracciones obtenidas en la extracción de ambas plantas se les determinó el contenido de flavonoides totales. Se tomó 1 mL del extracto y se le agregaron 0.5mL de una solución de cloruro de aluminio al 5 % (p/v) posteriormente se llevó a 25 mL con metanol, se homogeneizó y se dejó reposar por 30 minutos en la obscuridad, finalmente se midió la absorbancia a 425 nm. Se realizó una curva patrón empleando quercetina. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Lamaison y Carnat, 1990). Y por último se calculó el tiempo de vida media de los flavonoides totales por medio del ajuste de un modelo matemático.

### **5.3.4 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH.**

La determinación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo por medio del método DPPH descrito por Brand-Williams y col. (1995). Se tomó una alícuota (0.1mL) del extracto, se

adicionaron 3.9mL de una solución metanólica de DPPH $\cdot$  ( $0.025\text{gL}^{-1}$ ), se homogeneizó, se dejó reposar en la oscuridad por 1 hora y se leyó la absorbancia a 515 nm a diferentes intervalos de tiempo. Se elaboró una curva patrón, utilizando 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazol (DPPH) determinado como equivalentes de quercetina, las mediciones se realizaron por triplicado.

Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de los radicales de DPPH mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición DPPH} = \frac{[\text{Abs (control)} - \text{Abs (muestra)}]}{[\text{Abs (control)}]} \times 100$$

Y finalmente se calculó el tiempo de vida media de los radicales DPPH en presencia de los extractos de *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis*, por medio del ajuste de un modelo matemático.

Para los experimentos posteriores sólo se trabajó con *Equisetum arvense*.

Se juntaron las tres fracciones de *Equisetum arvense* y se llevaron a sequedad en el rotavapor, el extracto se redisolvió en una solución aceite esencial:etanol (6:1). Para fines prácticos, a la mezcla aceite esencial:etanol y extracto, le denominaremos, orgánico. Cabe mencionar, que la relación de la solución aceite:etanol, se determinó de manera experimental. (Al extracto seco se le adicionó 1mL de etanol, posteriormente se le agregó aceite esencial hasta lograr la completa disolución del extracto.)

### 5.3.5 Identificación de los compuestos activos.

#### 5.3.5.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La identificación de los compuestos activos se realizó por medio de Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo (HPLC Agilent 1100 series), con una bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos (DAD) –UV, columna Zorbax (SB-C18 4.6 X 150MM, 5  $\mu\text{m}$ ) (Figura 5.2). Como fase móvil, se utilizaron dos soluciones a) 0.15 % ác. fosfórico en agua: metanol (77:23), b) metanol, con un flujo de 1 mL/min y una temperatura de 28 °C. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 350 nm (Mímica y col., 2008).

Para realizar la identificación de los compuestos, se utilizaron dos estándares: quercetina y kaempferol (SIGMA), los cuales fueron inyectados por separado en una concentración de 0.5mg/mL, en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  bajo las condiciones antes mencionadas. Fueron

previamente filtrados, con una membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Econofilters, Agilent Technologies, Germany).

Se inyectaron por separado, 20  $\mu\text{L}$  de cada una de las fracciones obtenidas en las separaciones líquido-líquido (FA, FC, FAE y FB), previamente filtradas y se realizó una comparación entre los tiempos de retención obtenidos para los estándares, los obtenidos con las muestras de las fracciones y los reportados por Mímica y col. (2008).



*Figura 5.2 Cromatógrafo HPLC Agilent 1100 series.*

### **5.3.6 Selección del tensoactivo y formación de la nanoemulsión**

Los tensoactivos son un factor importante para la formación de nanoemulsiones (Schröder y Schuber, 1999) por lo que se probaron cuatro con la finalidad de elegir el que brindara las mejores características a la nanoemulsión los cuales fueron: panodan, lactipol, tween 60 y tween 20. Una relación 19:1, agua destilada-orgánico, fue colocada en un tubo, al cual se le adicionó poco a poco el tensoactivo, mientras se sometía a sonicación (70 % de amplitud,  $25 \pm 2$  °C) durante 10 min, se dejó reposar 5 min y se sometió nuevamente a 3 ciclos de sonicación y reposo (Yuan y col. 2007) (Figura 5.3). Éste procedimiento, se ve apoyado por Walstra y Derker (1996) quienes reportan, que la emulsificación ultrasónica es eficiente para reducir el tamaño de gota debido a que la sonicación aplicada rompe las gotas, formando otras de menor tamaño.

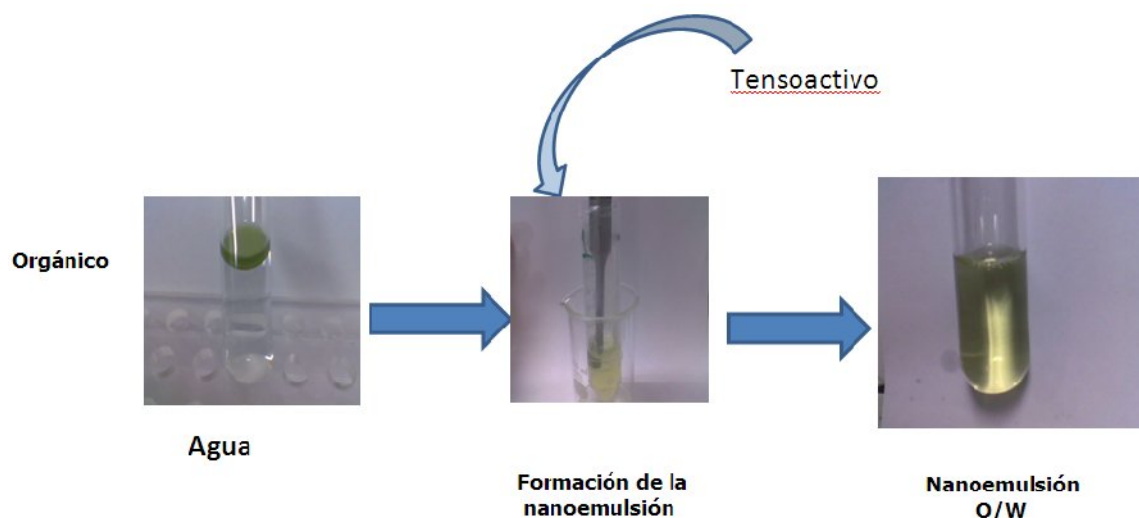


Figura 5.3. Formación de la nanoemulsión

### 5.3.7 Determinación del tamaño de gota

Se determinó la concentración micelar crítica del tensoactivo por medio de un conductivity Probe, Vernier LabPro, United States.

Posteriormente se elaboraron cuatro formulaciones, fijando la cantidad de tensoactivo y variando la relación orgánico:agua (o:a) (1:16, 1:8.5, 1:6 y 1:4.7), con la finalidad de determinar cuál era la relación (o:a) adecuada a la cual se lograba la formación de la nanoemulsión. Para determinar esta relación en las formulaciones, se midió el tamaño de gota por difracción de rayo láser en un Zeta Sizer Nano, SZ2000, Malvern Instruments, Reino Unido, seleccionando, las que tuvieran un tamaño menor a 100 nm.

### 5.3.8 Determinación del efecto de la concentración del tensoactivo sobre el tamaño de gota y la viscosidad.

Una vez definida la relación orgánico:agua, se prepararon ocho formulaciones, donde esta relación, se mantuvo constante y se varió la concentración de tensoactivo (0.14 – 0.32 g / g de nanoemulsión), para encontrar el intervalo de concentración, al cual se formaba la nanoemulsión. Se trabajó en ese intervalo y se midió viscosidad (con un Reómetro Modular Compacto, Physica MCR 300 (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany), con una

geometría de cilindros concéntricos CC27 (diámetro interno = 26.7 mm, diámetro externo 28.96 mm y un Gap = 2.26 mm)) y posteriormente se midió el tamaño de gota.

### **5.3.9 Determinación de la zona de formación de la nanoemulsión en el diagrama de fases ternario.**

Con los resultados obtenidos, en los dos experimentos anteriores se construyó un diagrama de fases ternario, donde se localizó, la zona de formación de la nanoemulsión (Tadros y col., 2004).

### **5.3.10 Determinación de la cantidad de nanoemulsión necesaria para cubrir el 30% de la ingesta diaria recomendada (IDR).**

La ingesta diaria recomendada de flavonoides totales es de 23mg/día (Tenorio y col., 2006). Debido, a que existen diversas fuentes de flavonoides, (frutas, vegetales, suplementos, cosméticos etc.) en los productos funcionales, se recomienda agregar sólo un porcentaje de IDR.

El 30% de IDR son 6.9 mg flavonoides/ día.

La determinación de la cantidad de nanoemulsión necesaria para cubrir el 30 % de la IDR se obtuvo en base a la concentración de flavonoides en el orgánico y a la cantidad de orgánico encapsulada en las nanoemulsiones.

# **CAPÍTULO 6**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 6.1.1 Contenido de Fenoles totales y Flavonoides Totales

Se realizó una comparación, del contenido de fenoles totales y flavonoides totales de *Equisetum arvense*, de *Camellia sinensis* (obtenido experimentalmente) y un valor de *Camellia sinensis* reportado por Álvarez y col. (2005) (Tabla 6.1).

La cantidad de fenoles totales y flavonoides totales presentes en *Equisetum arvense* es comparable con la cantidad presente en *Camellia sinensis*. Ya que no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los valores determinados para ambas especies.

Tabla 6.1 Contenido de fenoles totales y Flavonoides Totales.

Extracto	Concentración de Fenoles Totales (mg EAG/mL)	Concentración de Flavonoides totales (mg EQ/mL)
<i>Equisetum arvense</i>	0.84±0.15a	0.71±0.12a
<i>Camellia sinensis</i>	0.76±0.22a	0.6±0.17a
<i>Camellia sinensis</i> (Álvarez y col., 2005)	0.93	0.82

EAG: Equivalentes de ácido gálico.

No se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales entre las tres fracciones de *Equisetum arvense* (FA, FAC y FB).

### 6.1.2 Cinética de degradación de fenoles totales.

Las cinéticas de degradación de los fenoles totales contenidos en los extractos de *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis* no muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 6.1).

En ambas plantas se presenta una degradación de los compuestos fenólicos en un lapso de tiempo corto, se obtuvieron tiempos de vida media ( $t_{0.5}$ ) de 9.28±0.8 días y 8.83±0.6 días para *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis* respectivamente, estos resultados reflejan la necesidad de proteger dichos compuestos, para evitar su degradación.

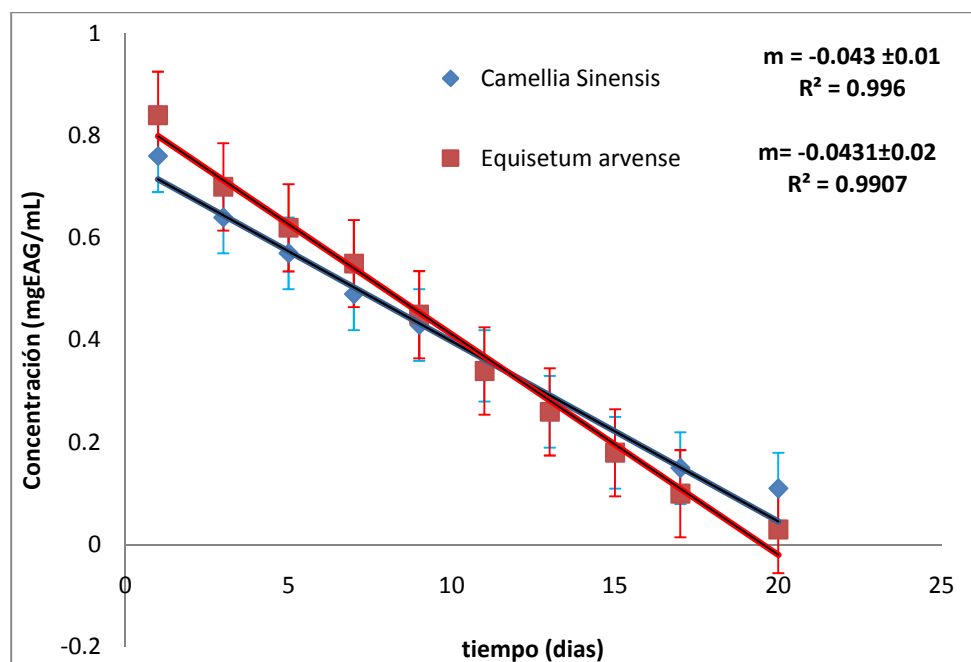


Figura 6.1 Cinética de degradación de Fenoles Totales contenidos en *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis*. Donde  $m$  = tasa de degradación (mgEAG/día).

### 6.1.3 Cinética de degradación de Flavonoides Totales

En la Figura 6.2, se muestran las cinéticas de degradación de flavonoides totales, de los extractos de *Equisetum arvense* y *camellia sinensis*. Estas curvas, muestran un comportamiento similar al que mostraron los fenoles totales, es decir, que los tiempos de vida media para *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis* fueron de  $10.62 \pm 1.1$  días y  $8.65 \pm 0.9$  días respectivamente. Estos resultados, se ven apoyados por Dillard y German, (2000) y Scalbert y Williamson, (2000) quienes reportan, que las propiedades funcionales de los flavonoides, son de corto plazo debido a la rápida oxidación que sufren estos compuestos bajo condiciones ambientales (luz, temperatura, sales, etc.) De igual forma, no existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las tasas de degradación de ambos extractos.

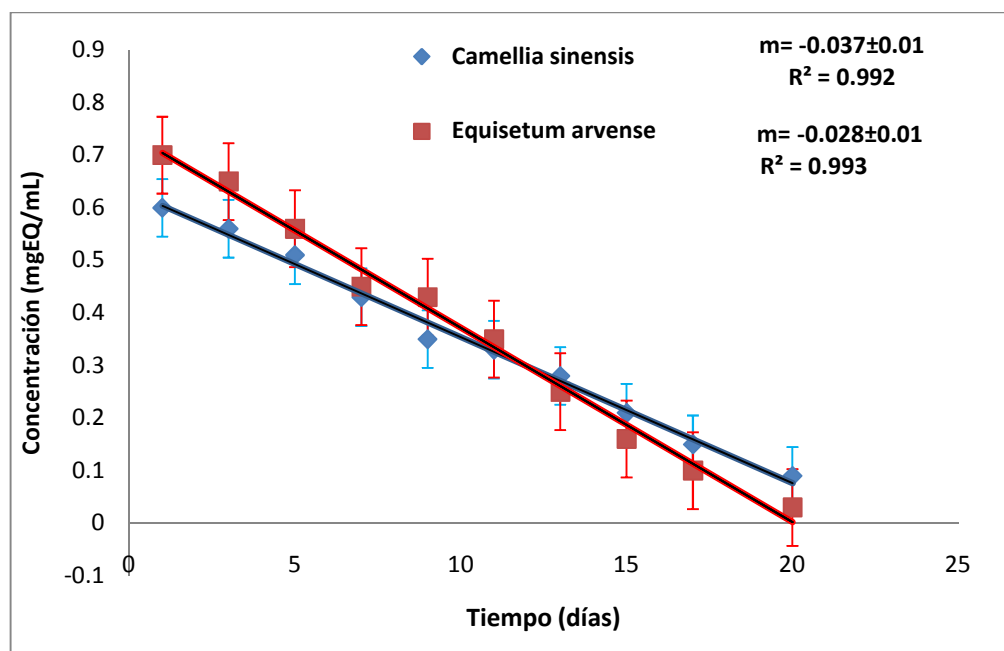


Figura 6.2. Cinética de degradación de flavonoides totales contenidos en *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis*. Donde EQ= equivalentes de quercetina y  $m$  = tasa de degradación (mgEQ/día).

#### 6.1.4 Porcentaje de inhibición de los radicales DPPH

En la Figura 6.3, se muestra el comportamiento obtenido al determinar el porcentaje de inhibición de los radicales DPPH en los dos extractos (*Equisetum arvense* y té negro). Ambos presentan un porcentaje máximo de inhibición alrededor de los 15 días. Los tiempos de vida media obtenidos para los radicales DPPH en presencia de los extractos de *Equisetum arvense* y *Camellia sinensis* fueron de  $9.4 \pm 0.7$  días y  $8.5 \pm 0.4$  días respectivamente

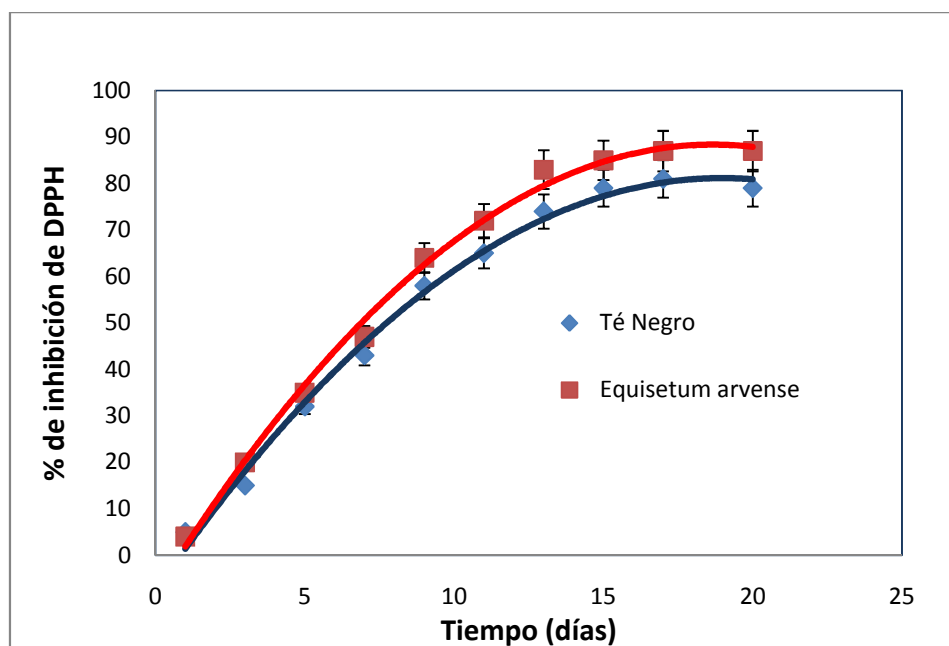


Figura 6.3. Porcentaje de inhibición de DPPH.

## 6.2 Identificación por HPLC de los compuestos activos de *Equisetum arvense*.

A partir de la extracción de los compuestos activos de *Equisetum arvense*, se obtuvieron cuatro fracciones (FA, FC, FAE y FB). Mímica y col. (2008) mencionan que en la fracción de cloroformo no se encuentra ninguno de los compuestos de interés. Para corroborarlo se inyectó en el cromatógrafo una muestra de dicha fracción y efectivamente el cromatograma no mostró ningún compuesto a la longitud de onda trabajada (350nm). Motivo por el cual se desechó dicha fracción y sólo se trabajó con las fracciones restantes (FA, FAE y FB).

Se inyectaron dos estándares: quercetina y kaempferol obteniendo tiempos de retención de  $52.011 \pm 0.03$  min y  $60.001 \pm 0.02$  min respectivamente, éstos son los principales flavonoides presentes en *Equisetum arvense* (Hyuncheol y col., 2004). De igual forma se inyectaron muestras de las tres fracciones (FA, FAE Y FB). Los tiempos de retención obtenidos en dichas fracciones, no coincidieron con los estándares, esto fue atribuido a que los estándares inyectados contienen compuestos puros y Mímica y col. (2008) mencionan que los extractos de *Equisetum arvense*, se obtienen glicosilados, razón por la cual, los tiempos de retención pueden verse afectados.

Se realizó una comparación entre los tiempos de retención obtenidos experimentalmente y los reportados por Mímica y col. (2008) (Tabla 6.2).

*Tabla 6.2 Tiempos de retención (tr) obtenidos de la cromatografía de líquidos de alta resolución para Equisetum arvense.*

<b>Compuesto</b>	<b>Fracción</b>	<b>Tiempo de retención (min) reportado por Mímica y col., 2008.</b>	<b>Tiempo de retención (min) obtenido experimentalmente</b>
<b>Quercetin 3-O-glicósido</b>	-Acuosa	ND	ND
	-Butanólica	30.26	30.26±0.03
	-Acetato de etilo	30.04	30.04±0.02
<b>Kaempferol 3-O-glicósido</b>	Acuosa	ND	ND
	-Butanólica	ND	ND
	-Acetato de etilo	31.71	31.81±0.01
<b>Ácido dicafeoil-mesotartárico</b>	Acuosa	30.62	30.60±0.03
	-Butanólica	30.96	ND
	-Acetato de etilo	ND	ND
<b>Quercetina (estándar)</b>	Acuosa	ND	ND
	-Butanólica	ND	52.05±0.03
	-Acetato de etilo	ND	ND
<b>Kaempferol (estándar)</b>	Acuosa	ND	ND
	-Butanólica	ND	ND
	-Acetato de etilo	ND	ND
<b>Compuesto fenólico</b>	Acuosa	6.49	6.51±0.02
	-Butanólica	ND	ND
	-Acetato de etilo	ND	ND

ND = No determinado

La Tabla 6.2, muestra la obtención de tiempos de retención similares a los reportados por Mímica y col. (2008) en la fracción de acetato de etilo, para quercetina 3-O-glicósido y



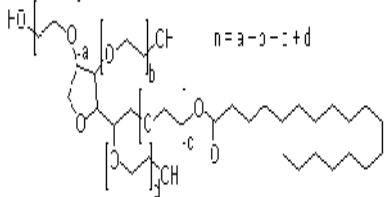

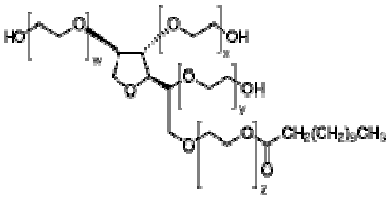

kaempferol 3-O-glicósido. En la fracción butanólica se muestran tr similares para quercetina 3-O-glicósido, en esta fracción se encontró quercetina sin glicosilar, a diferencia de Mímica y col., (2008). Y por último en la fracción acuosa se encontró similitud en los tr para ácido dicafeoil-mesotartárico y para un compuesto fenólico a identificar (Ver anexo 2).

Finalmente, la semejanza en los tiempos de retención, indica que en el extracto de *Equisetum arvense* existen Quercetina 3-O-glicósido, Kaempferol 3-O-glicósido, quercetina sin glicosilar y ácido dicafeoil-mesotartárico, entre otros.

### 6.3 Selección del tensoactivo adecuado

Se evaluó la capacidad emulsificante, de los tensoactivos utilizados para el sistema o/w, obteniendo, que panodan, lactipol y tween 60 no formaron sistemas translúcidos (característicos de las nanoemulsiones) (Solans y col., 2005) bajo estas condiciones. Las características de los tensoactivos se muestran en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3 Características de los tensoactivos.

Tensoactivo	Estructura	HLB	Nanoemulsión
<b>Panodan</b>	Formado por ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetiltartárico	8	
<b>Lactipol</b>	Formado por una combinación de ácido esteárico y ácido láctico.	11	
<b>Tween 60</b>		14.9	
<b>Tween 20</b>		16.7	

**Panodan**, no se logró la formación de la nanoemulsión (se agregó 40% de la formulación de tensoactivo), a pesar de que el HLB de este tensoactivo tiene un valor de 8, óptimo para formar nanoemulsiones tipo o/w (Kumar y Priya, 2001). Sin embargo, de acuerdo con Tadros y col. (2004), panodan no cumple con la característica de tener un diámetro de la cabeza dos veces menor a la longitud de la cadena carbonada, motivo por el cual no se logró la formación de la misma.

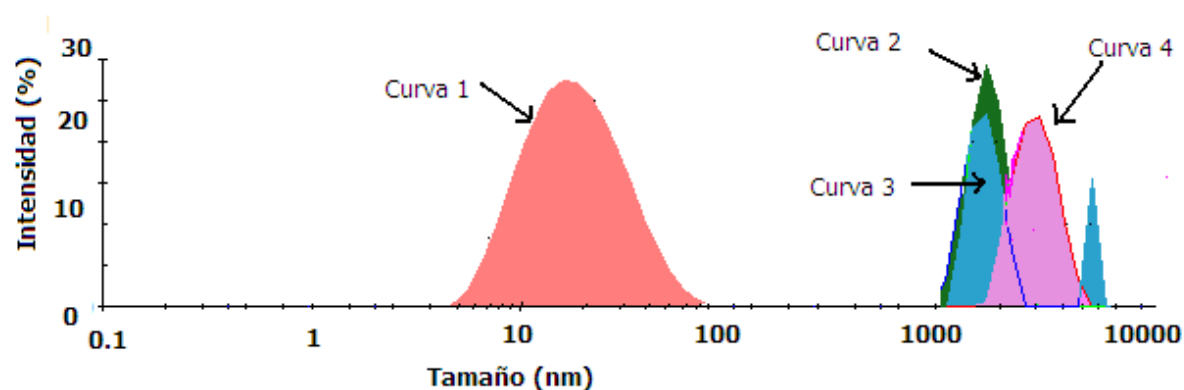
**Lactipol**, no se logró la formación de la nanoemulsión (se agregó 40% de la formulación de tensoactivo), debido a que de igual forma que el panodan, este tensoactivo no cumple con las características necesarias (el diámetro de la cabeza debe medir 2 veces menos que la longitud de la cadena carbonada) para lograr la formación de las nanoemulsiones.

**Tween 60**, no se logró la formación de la nanoemulsión (se agregó 40% de la formulación de tensoactivo) a pesar de que éste tensoactivo si cumple con las características necesarias para la formación de la misma. Esto es asumido a que el arreglo de la molécula como puede verse en la Tabla 6.3 no es el adecuado (no presenta una cadena carbonada lineal).

**Tween 20**, bastó agregar el 23% de tensoactivo para lograr la formación de la nanoemulsión debido a que cumple con las características necesarias (Tabla 6.3) para la formación de la nanoemulsión, por lo que se eligió para realizar los experimentos posteriores.

### **6.3.1 Tamaño de gota.**

Se formularon cuatro nanoemulsiones y se les midió tamaño de gota, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.4.



Número de curva	Concentración de agua (g / g nanoemulsión)	Concentración de orgánico (g / g nanoemulsión)	Relación (o/a)
1	0.64	0.04	1:16
2	0.63	0.07	1:8.5
3	0.62	0.10	1:6
4	0.61	0.13	1:4.7

La cantidad de tween 20 se mantuvo constante (4g).

Figura 6.4 Distribución de tamaño de gota.

Las nanoemulsiones, tienen un tamaño de gota < 100nm, en la Figura 6.4, puede observarse, que la única curva que cumple lo anterior es la 1. Con las otras 3 curvas, de acuerdo a su tamaño de gota, se obtienen emulsiones, que podrían utilizarse en el área alimenticia, de acuerdo a Dickinson y Stainsby (1982), Dickinson, (1992) y Friberg y Larrson, (1997), la mayoría de las emulsiones utilizadas en alimentos, presentan diámetros de gota que oscilan entre 0.1 y 100µm.

### 6.3.2 Efecto de la concentración del tensoactivo sobre el tamaño de gota y la viscosidad.

Una vez obtenida la relación adecuada de orgánico:agua (1:16), se elaboraron ocho formulaciones, fijando dicha relación y variando la concentración de tween 20 (de 0.19 a 0.39 g/g de nanoemulsión). En concentraciones de tween 20 menores a 0.25, la



nanoemulsión no alcanzó a formarse, ésta se obtuvo entre concentraciones de 0.26 y 0.37, a valores mayores, se observó un precipitado, debido al exceso de tween 20 (Fig. 6.5).

De acuerdo con Yuan y col. (2007) al incrementar la concentración de tensoactivo, la tensión superficial disminuye y por lo tanto disminuye el tamaño de las gotas, este fenómeno puede observarse en la Figura 6.5, al aumentar la concentración de tween 20, disminuye el tamaño de gota de 23 a 19nm.

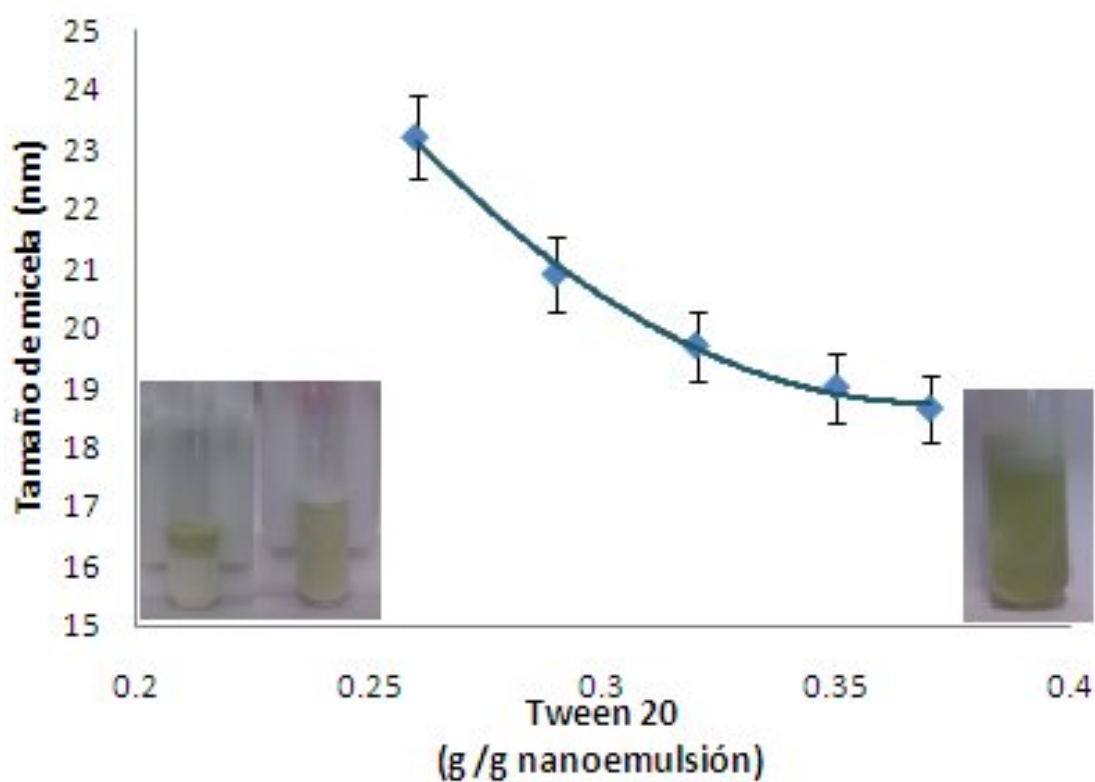


Figura 6.5 Tamaño de gota en función de la concentración de Tween 20.

A las nanoemulsiones formadas, se les midió viscosidad, para determinar, cómo afecta la concentración de tensoactivo sobre ésta (Tabla 6.4).

*Tabla 6.4 Viscosidad de la nanoemulsión en función de la concentración de tensoactivo.*

<b>Relación orgánico:agua (o:a)</b>	<b>Concentración de Tween 20 (g / g nanoemulsión)</b>	<b>Viscosidad (cP)</b>
1:16	0.26	8
1:16	0.29	13
1:16	0.32	20
1:16	0.35	23
1:16	0.37	30

Al aumentar la concentración de tensoactivo, aumenta la viscosidad del sistema, conocer este comportamiento es de utilidad ya que la cantidad de tensoactivo puede ser determinada en función de la viscosidad y del tamaño de gota deseado.

#### **6.4 Zona de formación de las nanoemulsiones o/w en el diagrama de fases ternario.**

Con la determinación de la cantidad de orgánico que es posible encapsular y el efecto de la concentración del tensoactivo sobre el tamaño de gota, se encontró la zona de formación de la nanoemulsión en el diagrama de fases ternario.

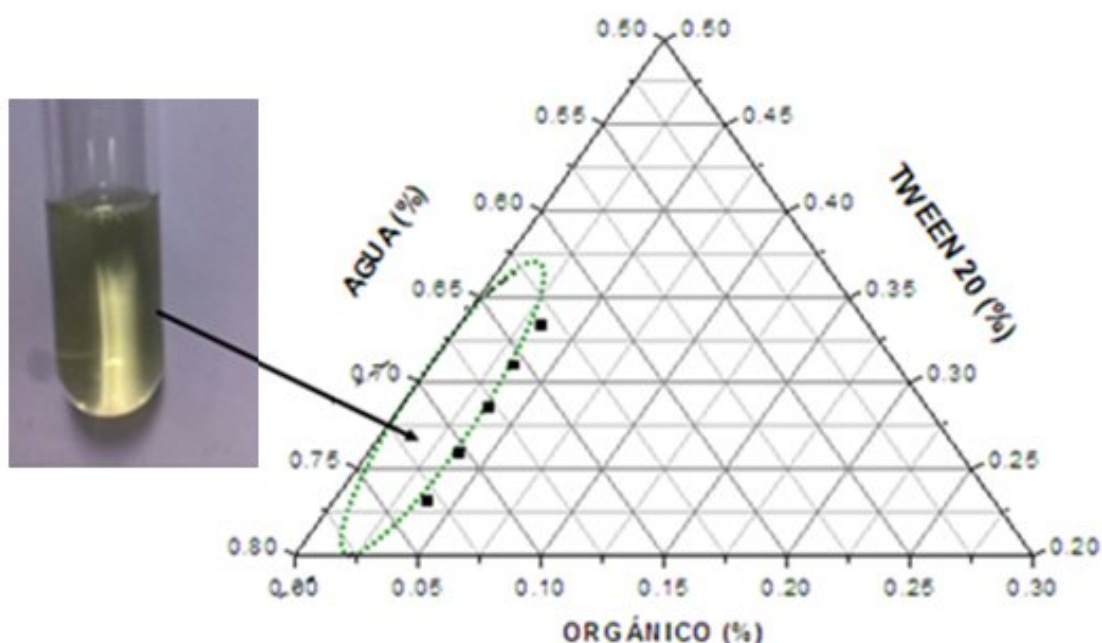


Figura 6.6. Zona de formación de las nanoemulsiones en el diagrama de fases ternario (los valores están dados en porcentajes másicos)

Como puede observarse en el diagrama de fases ternario (Fig. 6.6), la región de formación de las nanoemulsiones, en el eje de la fase acuosa va de 63 a 80 %, en el eje del tween 20, va de 20 a 37 % y en el eje del orgánico, va de 0 a 17%.

La determinación de la zona de formación, nos dice que concentración usar de cada uno de los componentes de la nanoemulsión, dependiendo del tamaño de gota y cantidad de orgánico a encapsular.

### 6.5 Ingesta diaria recomendada (IDR)

El 30% de IDR son 6.9 mg flavonoides/ día (Tenorio y col., 2006).

La concentración de flavonoides en el orgánico es de 14 mgEQ/mL

6.9 mg de flavonoides (30% de IDR) están en 0.49 mL de orgánico.

Para encapsular 1mL de orgánico, se necesitan preparar 26 gramos de nanoemulsión.

Por lo tanto para encapsular 0.49mL de orgánico (30 % de la IDR) se necesitan preparar 12.7 g de nanoemulsión.

La cual podría ser distribuida en dos aplicaciones al día de 6.4g cada una.

# **CAPÍTULO 7**

## **CONCLUSIONES**

*Equisetum arvense* posee una capacidad antioxidante comparable con *Camellia sinensis*, que es una de las plantas más estudiadas y reconocidas por su actividad antioxidante.

No existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales, ni en las cinéticas de degradación de éstos compuestos en los extractos de ambas plantas.

El tensoactivo adecuado para la elaboración de nanoemulsiones o/w bajo las condiciones utilizadas fue el Monolaurato de sorbitán polioxietileno (tween 20) debido a las características que posee, un HLB = 16.7, el diámetro de la cabeza polar es dos veces menor que la longitud de la cadena carbonada y a que formó nanoemulsiones translúcidas con un diámetro de gota de 23 a 19 nm.

El diagrama de fases ternario, indica la zona de formación de las nanoemulsiones conteniendo al extracto de *Equisetum arvense*. La viscosidad y el tamaño de gota están en función de la concentración de tensoactivo.

Aproximadamente 12.7 g de nanoemulsión son equivalentes al 30% (6.9 mg/día) de la ingesta diaria recomendada para flavonoides totales.

# **CAPÍTULO 8**

## **PERSPECTIVAS**

Dentro de las actividades que podrían realizarse a futuro se encuentra la evaluación de la protección de los compuestos activos extraídos de *Equisetum arvense*. Mediante cinéticas de degradación de los compuestos encapsulados en las nanoemulsiones.

Realizar la extracción de los compuestos activos mediante una metodología que permita utilizar solventes orgánicos aprobados por la FDA (Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos) o que incluso permita realizar la extracción sin el uso de solventes (extracción por el método de CO<sub>2</sub> supercrítico).

# **CAPITULO 9**

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Álvarez, A., Jorrat, y S. Genta, M. 2005. Caracterización físico-química de jugo de limón. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 49-56.
- Avila-Acevedo J. G., Castañeda C. M. C., Benitez F. J. C., Durán D. A., Barroso V. R., Martínez C. G., Muñoz L. J. L., Martínez C. A. y Romo de Vivar A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76:301-309.
- Amselen, S. y Friedman, D. 1998. Submicron emulsions as drug carriers for Topical administration. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. 153-173.
- Becher, P. 2001, Emulsions: Theory and Practice. New York: Oxford University Press. 7.
- Bergensstahl, G. 1997. Physicochemical aspects of emulsifier functionality. *Food Emulsifiers and Their Applications*. 6:147-172.
- Brand, W., Cuvelier, y M., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology*. 28:25-30.
- Brooks, B.W., Richmond, H.N., y Zerfa, M. 1998. Modern Aspects of Emulsions Science, *Royal Society of Chemistry Publication, Cambridge*.
- Budavari, S., Maryadele, J., Neil, O., Smith, A., y Heckelman, P. 1989. *The Merck Index an encyclopedia of Chemicals, drugs and biological*.
- Cáceres-Cortés J. R., Cantú-Garza F. A., Mendoza-Mata M. T., Chavez-González M. A., Ramos-Mandujano G. y Zambrano-Ramírez I. R. 2001. Cytotoxic Activity of *Justicia spicigera* is Inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy. Research*. 15: 691-697.
- Cobb, R. M. K. 1946. *Emulsion Technology*. H. Bennett, ed. Chemical Pub. Co., New York. 7-32.
- Dickinson, E., y Stainsby, G 1982. *Colloids in Foods*, Elsevier, Lodon,UK.

- Dickinson, E. 1992. *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford, UK. 66-70.
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*. 17:25-39
- Dillard C. J. y German J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Science Food Agricola*. 80:1744–1756.
- El-Aasser, M. S., y Sudol, E.D. 2004. Miniemulsions: overview of research and applications. *Coatings Technology and Research*, 1:20-31.
- Fast J.P., Mecozzi S., 2009. Nanoemulsions from intravenous Drugs Delivery. *Nanotechnology in Drugs Delivery*.10:461-486.
- Forster, T., y Von Rybinski, W. 1998. Applications of emulsions. *Modern aspects o emulsions science*. 395-426.
- Floury, J. A. Desrumaux, M.A.V. Axelos, J. y Legrand. 2003. Effect of high Pressure homogenization on methycellulose as food emulsifier. *Food. Engineering* 58:227–238.
- Friberg, S., y Solans, C. 1978. Emulsification and the HLB-temperature. *Colloid and Interfase science*, 66:367-368.
- Friberg , S. E.,y Larsson, K. 1997. *Food emulsions*, 3rd ed., Marcel Dekker, NewYork, NY. 1.
- García-Mesa M., Armenteros-Herrera D.M., Mahía-Vilas M., Coma-Alfonso C., Hernández-Carretero J., Díaz-Batista A. y Fernández-Montequíní J.2002. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares.*Rev.Cubana Angiología.y Circulación Vascolar* 3: 39-46.

- González, S.J., Muñiz, R., y Valls, B., 2001. Alimentos Funcionales. *Nutrición hospitalaria*. 1:84-91.
- González-Ávila M., Arriaga-Alba M., De la Garza M., Hernández-Pretelín M. del C., Domínguez-Ortiz M. A., Fattel-Fazenda S. y Villa-Treviño S. 2003. Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicology in vitro*. 17: 77-83.
- Griffin W.C., 1949. Classification of surface-active agents by HLB society. *Cosmetic chemical*. 1:311-326.
- Gupta, P.K., y Cannon, J. B. 2000. Emulsions and microemulsions from drugs solubilization and delivery. *Water insoluble drug formulation* 169-211.
- Hasenhuettl, G. L. 1997. Overview of food emulsifiers. *Food Emulsifiers and Their Applications*. Chapman and Hall, New York.
- Hiemenz, P.C., y Rajagopalan, R. 1997. Principles of Colloid and Surface Chemistry, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, NY.
- Higuchi, W. y., Misra, J. 1962. Physical degradation of emulsions Via the Molecular diffusion route and the possible prevention thereof. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 5:459-466.
- Hirono I. 1987. Bioactive molecular. Naturally occurring carcinogenes of plant origin. Toxicology pathology and Biochemistry. *Biology Pharmaceutic Bull*. 2:120-58.
- Hoffmann, F., Guilherme, J., Russi, M., Nascimento, V., Morreira, L., y Matos, G., 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological Research* 49:239-243.

- Hyuncheol, O., Do-Hoon, K., Jung-Hee, C., y Young-Chul, K. 2004. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense* *Ethnopharmacology*, 95:421-424.
- Imafidon, G.I. y Spanier, A.M. 1994. Unraveling the secret of meat flavor trends. *Food Sci. Technol.* 5:315-321.
- Israelachvili, J.N 1992. Intermolecular and Surface Forces, Academic Press, London, UK. 1405-1408.
- Jadhav, K.R., Shaikh, I.M., Ambade, K.W., y Kadam, V.L. 2006. Applications of microemulsions based drug delivery system. *Current Drug Delivery*, 3:267-273.
- Jafari, S. M., He, y., Bhandari, B. 2006. Nano-emulsions production by sonication and microfluidization- A comparison. *Food Properties*, 9:475-485.
- Jonsson, B., Lindman, B., Holmberg, K., y Kronberg, B. 1998. Surfactants and polymers in Aqueous Solution. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Kabalnov, A. S. y Shchukin, E.D. 1992. Ostwald ripening Theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloids and Interface Science*, 38:69-97.
- Kabalnov, A. S., y Wennerstrom, H. 1996. Macroemulsions stability: The oriented wedge theory revisited. *Langmuir*, 12:276-292.
- Klang, S., y Benita, S. 1998. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. 9:119-152.
- Kobayashi, I., Yasuno, M., Iwamoto, S., Shono, A., Satoh, K., y Nakajima, M. 2002. Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane. *Colloids Surfactant*. 207:185-196.

- Kumar S., y Priya S. 2001. Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor-Acceptor interaction with Iodine and correlation of CMC with Hydrophile-Lipophile Balance and other Parameters of the surfactants. *Surfactants and Detergents*, 4(3):303-309.
- Lamaison J.L., Carnat A. 1990. Teneurs en acide rosmarinique en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activités antioxydantes chez les Apiacées, les Boraginacées et les Lamiacées médicinales. *Pharmaceutica Acta Helvetica*. 65:315-20.
- Lifshitz, I. M., y Slyozov, V. V. 1961. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solution. *Physics and Chemistry of Solids*, 19:35-50.
- Lindman, B. 2001. Physico-chemical properties of surfactants, in Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry, Vol. 1, Holmberg, K., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, England, Chap. 19.
- Mason, T., Wilking, J., Meleson, K., Chang, C., y Graves, S., 2006. Nanoemulsion formation, structure and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18:R635-R666.
- Martínez-Flórez, S. J. González-Gallego, J. M. Culebras y M. J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 6:271-278.
- McClements, D. J. 1999. *Food emulsions. Principles, practice, and techniques*. CRC Press. USA. 378.
- McClements, D.J. 2005. *Food emulsions: principles, practices, and techniques* 2nd ed., CRC Press. 1-9.

- Middleton E. Jr., y Kandaswami C. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. *The Flavonoids. Chapman and Hall, London*, 619-652.
- Miller, C.A., 2006. Spontaneous emulsification recent developments with emphasis on self-emulsification. *Emulsions and emulsions stability*, 132:107-126.
- Mimica N., Simin N., Cvejic, J., Jovin E., Orcic D, y Bozin B. 2008. Phenolic Compounds in Field Horsetail (*Equisetum Arvense L.*) as Natural Antioxidants. *Molecules*, 13:1455-1464.
- Myers, D. 1988. Sufactant solution: micellization and related associate phenomena. *Surfactant Science Technology*. 81-151.
- Nakajima, H. 1997. Microemulsions in cosmetics. *Industrial applications of microemulsions*, 175.197.
- Pérez-Trueba G. 2003. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Revista. Cubana De Investigation Biomedica*. 22(1): 48-57.
- Pedulli, B.F., Lucarini, M, y Pedrielli, P. 1997. Free radicals in biology and Environment; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Petsev, D., Denkov, N., y Kralchevsky, P. 1995. Flocculation of deformable Emulsion droplets. II. Interaction energy. *Colloid and interfase Science*, 176:201-213.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidant. *Nature Product*. 63:1035-42. Rice-Evans C.A., Miller N.J., y Paganga G. 1997. Antioxidant properties of Phenolic compound. *Trends Plant Science*. 2:152-159.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., y Paganga G. 1997. Antioxidant properties of henolic compound. *Trends Plant Science*. 2:152-159.

- Roginsky V., y Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92:235-254.
- Rosen, M.J. 1978. Surfactants and Interfacial Phenomenon, *Wiley-Interscience Publishers*, New York, N.Y.
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, y Di Giacomo C.2000. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology Toxicology*. 16:91-8.
- Salager, J. L. 2002. Surfactantes. Cuaderno FIRP 300 A. Versión # 2. Laboratorio FIRP. Escuela de Ingeniería Química, Universidad De Los Andes.
- Sáyago-Ayerdi S. G., Arranz S., Serrano J. y Goñi I. 2007. Dietary fiber and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Agriculture. Food Chemycal*. 55: 7886-7890.
- Scalbert A. y Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Nutrition*. 130:2073S-2085S.
- Silveira, M., Monereo, S., y Molina B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿cerca o lejos?.*Revista Española de Salud Pública* 73:317-331.
- Sharma, S K., Lowe, K. C., y Davis, S. S.. 1988. Novel Compositions of Emulsified Perfluorochemicals for Biological Uses. *Biomaterials, Artificial Cells, and artificial organs*, 16:447-450.
- Schröder, V. y Schubert, H. 1999. Production of emulsions using microporus, ceramic membranes. *Colloids and surfaces* 152:103-109.
- Shinoda, K. H. Saito. 1968. The effect of temperature on the phase equilibrio and the types of dispersion of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Colloid Interface Science*.26:70–74.

- Shinoda, K. H. Kunieda.1983. Phase properties of emulsions: PIT and HLB, in: P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology*, vol. 1,Marcel Dekker, New York. 337–367.
- Solans, C., Esquena, j., Forgiarini, A.M., Uson, N., Morales, D., y Izquierdo, P. 2003. Nano-emulsions: fromation, properties, and applications. *Journal of Adsorption and agregation of surfactants in solution*, 109:524-554.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, N., Azemar, y M.J., García.Celma. 2005. Nano-emulsions, Elsevier, Current Opinion in *Colloid & Interface Science* 10:102-110.
- Sonneville.Aubrun O., Simonnet J.-T., y L'Alloret F. 2004. Nanoemulsions: a New Vehicle for Skincare Products. *Advances in Colloid and Interface Science*. 108-109:145-149.
- Tadros T., Izquierdo P., Esquena J., y Solans C. 2004. Formation and Stability of Nano-emulsions. *Advances in Colloids and Interfase Science* 108109:303-318.
- Taylor, P. 1998. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in colloid and Interface science*, 75:107-163.
- Tenorio, F. A., Del Valle, L., y Pastelín G. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿pueden ser una alternativa terapéutica? *Departamento de farmacología*. 76:33-45.
- Verwey, E., y Overbeek, J. 1948. Theory of the stability of lyophobic colloids. Amsterdam: *Elsevier*
- Wagner, C, 1961. Phisycal degradation of emulsions Via the molecular diffusion route and the possible prevention therefore. *Pharmaceutica Sciences*, 51 (5): 459-466.
- Walstra, P., y Derker, M. 1996. Emulsion stability, *Encyclopedia of emulsion technology*, 1–62.



- Weers, J. g., Ni. Y., Tarara, T. E., Pelura, T.J. y Arlauskas. R .A. 1994. The effect of molecular diffusion on initial particle size distributions in phospholipid stabilized fluorocarbon emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 84:81-87.
- Wen, L. y Papadopoulos, K.D. 2001. Effects of osmotic pressure on water transport in w/o emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 235:398-404.
- Wright, J.S.; Johnson, E.R; Dilabio, G.A. 2001. *Am. Chemistry Society.*, 123,1173.
- Yuan Y., Gao, Y., Zhao J., y Mao, L. 2007. Characterization and Stability Evaluation of  $\beta$ -carotene Nanoemulsions prepared by High Pressure Homogenization under Various Emulsifying Conditions. *Food Research International* 41:61-68.

# **CAPÍTULO 10**

## **ANEXOS**

## Anexo 1

## CURVAS PATRÓN

En las 3 figuras siguientes se muestran las curvas patrón de Fenoles Totales, Flavonoides totales y Capacidad antioxidante utilizadas para la cuantificación de dichos compuestos.

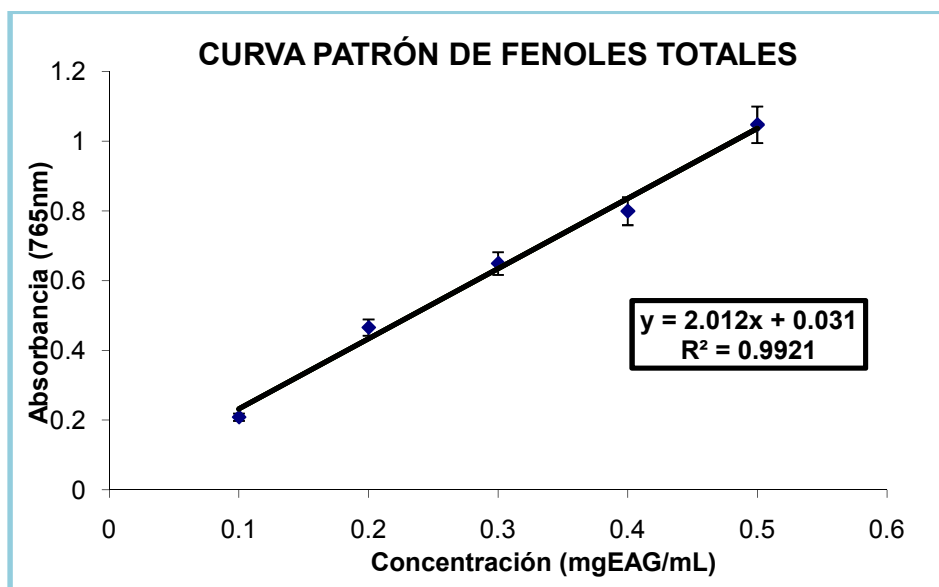


Figura. 9.1 Curva patrón de Fenoles Totales

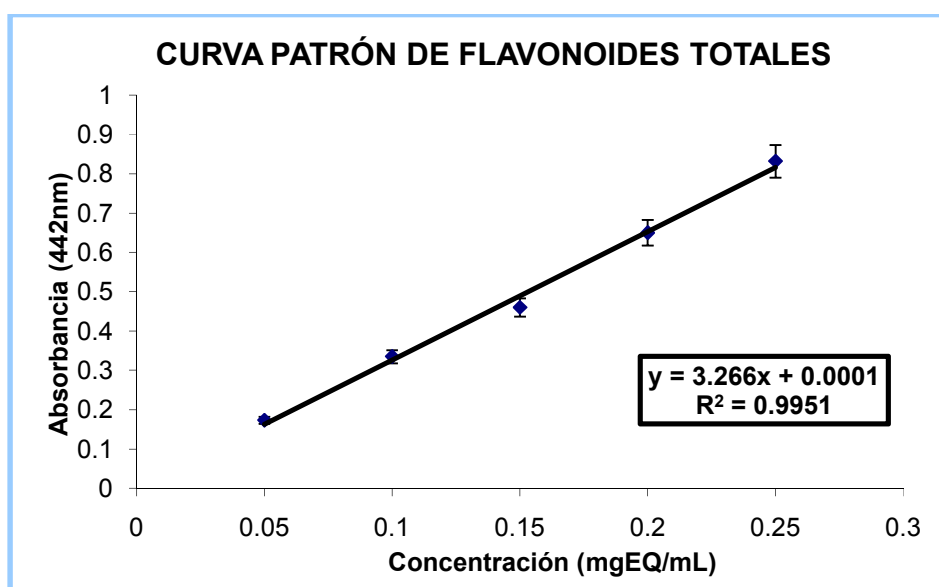


Figura 9.2 Curva Patrón de Flavonoides Totales

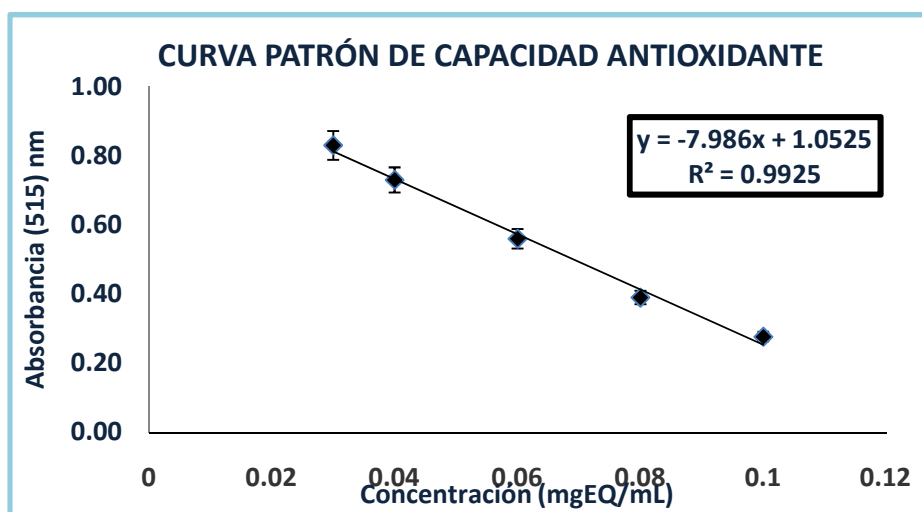


Figura 9.3 Curva Patrón de Capacidad antioxidante

**Anexo 2**

**Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

**Cromatogramas obtenidos con los estándares.**

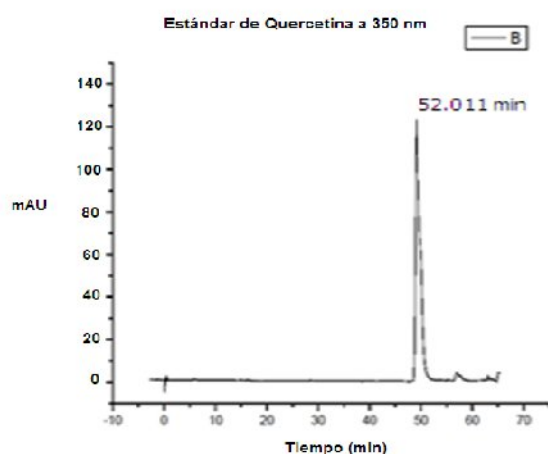


Figura 9.4 Cromatograma obtenido para el estándar de quercetina.

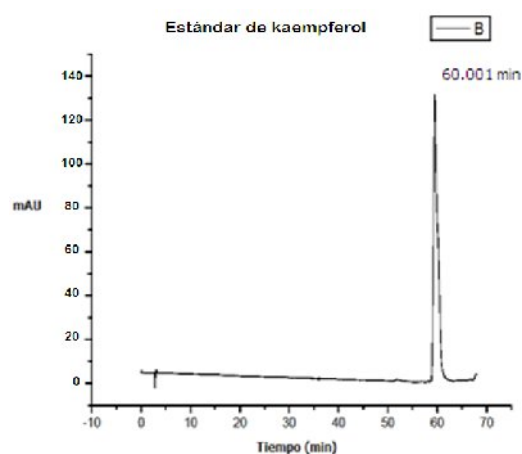


Figura 9.5 Cromatograma obtenido para el estándar de kaempferol.

**Fracción acuosa a  $\lambda = 350$  nm**

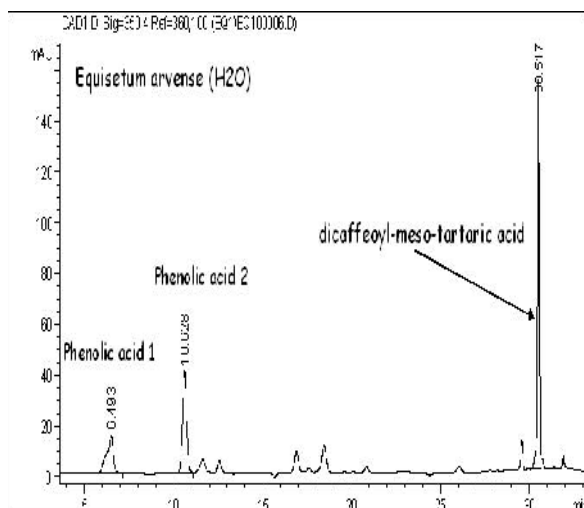


Figura. 9.6 Cromatograma reportado por Mímica y col. (2008).

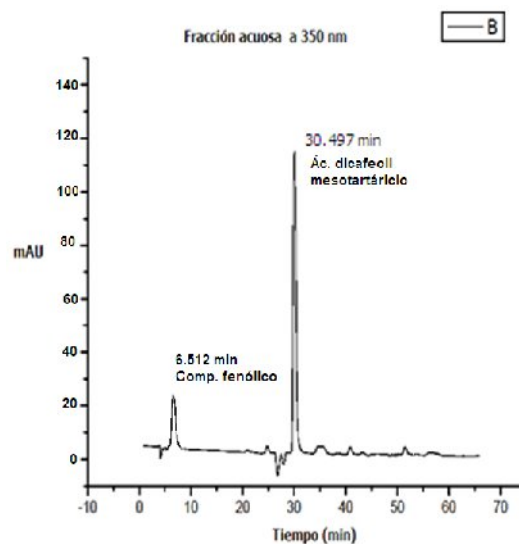


Figura. 9.7 Cromatograma obtenido en el laboratorio.

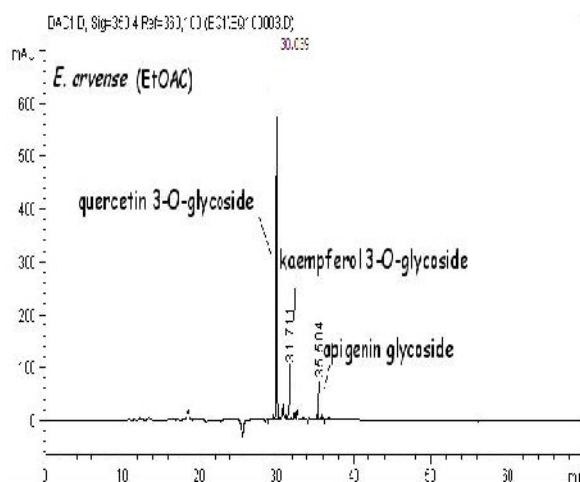


Figura 9.8 Cromatograma reportado por Mímica y col. (2008).

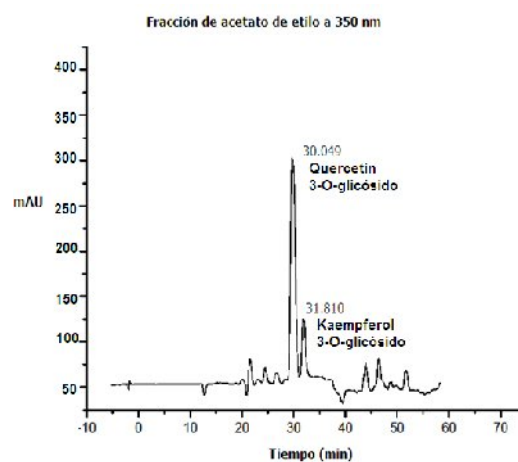


Figura 9.9 Cromatograma obtenido en el laboratorio.

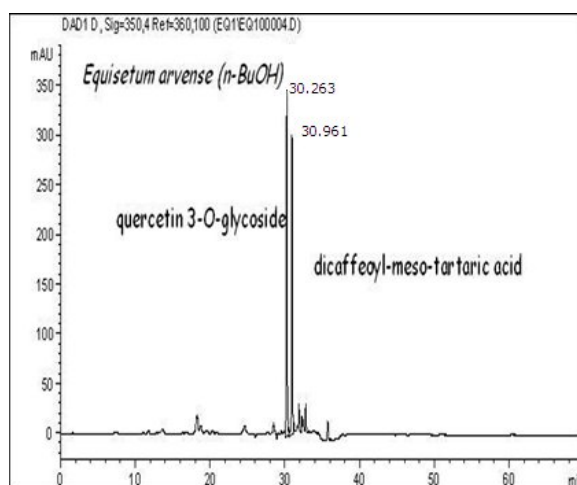


Figura 9.10 Cromatograma reportado por Mímica y col. (2008).

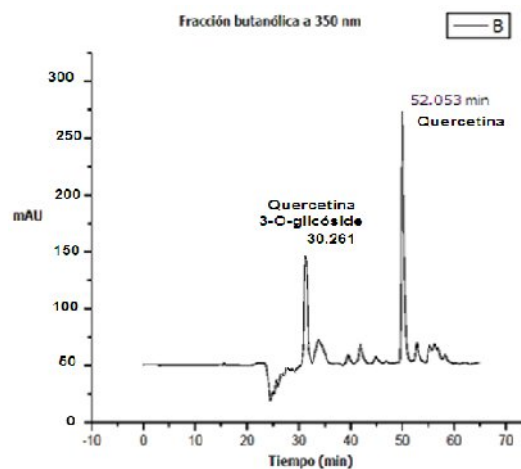
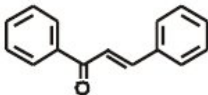
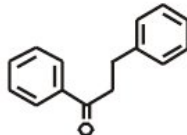
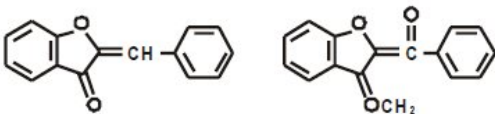
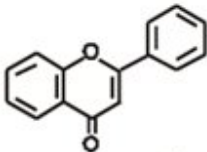
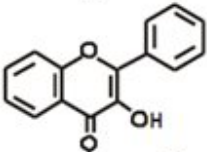
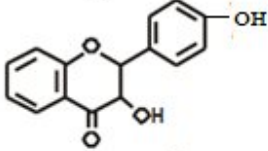
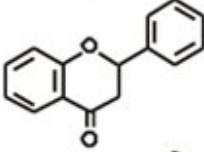
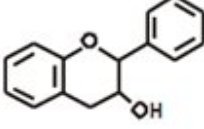


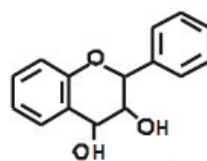
Figura 9.11 Cromatograma obtenido en el laboratorio.

## Anexo 3

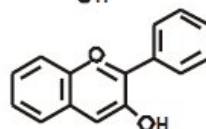
## Clasificación de los Flavonoides

Flavonoide	Estructura básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonoles	
Dihidroflavonoles	
Flavanonas	
Flavanol	

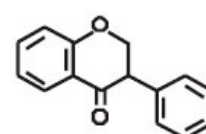
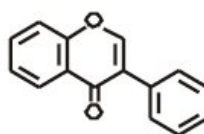
Flavandioles o  
Leucoantocianidinas



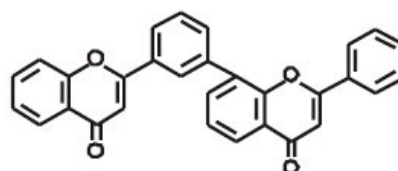
Antocianidina



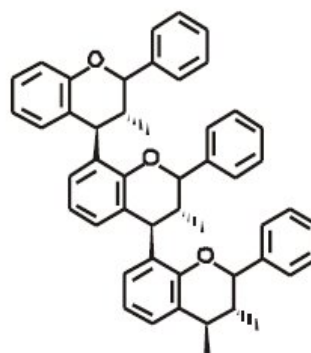
Isoflavonoides



Biflavonoides



Proantocianidinas o  
Taninos condensados



Pérez-Trueba, 2003.