



**Universidad Veracruzana**

Instituto de Ciencias Básicas



Caracterización y digestión gastrointestinal de cápsulas líquidas de curcumina (*Curcuma longa L.*).

TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA

**I. en A. Karina Hernández Huesca**

DIRECTOR

**Dr. César Ignacio Beristain Guevara**

CO-DIRECTOR

**Dra. Luz Alicia Pascual Pineda**

Xalapa, Ver

Noviembre 2016



La presente tesis titulada

**"Caracterización y digestión gastrointestinal de cápsulas líquidas de curcumina (*Curcuma longa* L.)."**

Realizada por la

**I. en A. KARINA HERNÁNDEZ HUESCA**

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestro en Ciencias Alimentarias**

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 04 de noviembre de 2016.

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Dr. Oscar García Barradas

Dr. Enrique Bonilla Zavaleta

## DEDICATORIAS

Todo esto se lo dedico a mi **Madre**, por la fe que ha depositado en mí, sin su apoyo y entrega simplemente no estaría en donde me encuentro el día de hoy.

A mi **Familia** que siempre ha estado ahí apoyándome a pesar de las circunstancias y de las adversidades.

Al **Dr. César Ignacio Beristain Guevara** y a la **Dra. Luz Alicia Pascual Pineda**, por creer en mí, por brindarme su apoyo y darme la oportunidad de aprender de ellos.

A **Jesús Geovanni Garcia Calva** mi compañero de vida, por su incondicional apoyo para que pudiera cumplir este sueño.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre **Siria Huesca Acosta** un ejemplo de vida y de amor por sus hijas. Le agradezco infinitamente todos sus esfuerzos y sacrificios, que sin dudarlo primero pensó en nosotras antes que en ella, por su gran amor y por haber estado ahí animándome. Todo lo que soy te lo debo a ti, no me alcanzará la vida para agradecerte.

A mi tía **Julia Ronzón Ojeda** y **Luz del Carme Martínez Ronzón**, por el apoyo que le brindaron a mi madre y a mis hermanas, pero en especial el apoyo que me brindaron a mí.

Al **Dr. César Ignacio Beristain Guevara** y a la **Dra. Luz Alicia Pascual Pineda**, fueron mis guías en este camino, gracias por el tiempo dedicado, a pesar de sus ocupaciones siempre estuvieron ahí para ayudarme y aconsejarme. Fueron mis padres adoptivos durante estos dos años.

A la **Dra. Maribel Jiménez Fernández**, **Dr. Oscar García Barradas** y al **Dr. Enrique Bonilla Zarate**, por el tiempo y su disposición para el mejoramiento de este trabajo. Les agradezco infinitamente todo su apoyo.

A **Jesús Geovanni García Calva** por estar siempre a mi lado a pesar de las adversidades, sabes lo mucho que te amo y lo importante que eres en mi vida.

A **Susana** y **Montserrat** por brindarme su tiempo y apoyo para la realización de este trabajo, siempre les estaré agradecida.

A la vida por haber puesto en mi camino a increíbles personas, Andrés, Flor, Jaz y Mónica, no cabe duda que los mejores momentos los pasé con ustedes, nunca imaginé que llegaríamos a ser grandes amigos. **Andrés** a pesar de demostrarte mi cariño molestándote, sabes que te quiero mucho y no creo encontrar otra persona tan chistosa como tú. **Flor** a pesar de haber coincidido tiempo atrás, fue hasta ahora que descubrí la increíble persona que eres, te quiero mucho. **Jaz**, tal vez nunca te lo dije pero eres una persona ejemplar, está de más decirte lo importante que eres en mi vida y lo mucho que te quiero. **Mónica**, fuiste una persona con la que podía hablar de cualquier tema y aunque a veces me la pasaba molestándote, quiero que sepas que te quiero mucho. Pocas personas tienen la fortuna de tener amigos con quien decir tonterías y hacer locuras, morir de risa por horas. Sin dudarlo volvería a vivir estos momentos con ustedes. Los adoro.

A **Dafne**, te agradezco lo mucho que me apoyaste en el laboratorio y por compartir tus conocimientos. Una amistad valiosa que formé durante la maestría y que ni la distancia ni el tiempo podrá romper. Te quiero mucho.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. Curcuma longa L.</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Preparación de productos de la cúrcuma.....	3
2.1.2. Composición química de la cúrcuma.....	6
2.1.3. Curcuminoides.....	6
2.1.4. Curcumina.....	7
2.1.4.1. Consumo de la curcumina.....	8
2.1.4.2. Actividad antioxidante de la curcumina.....	8
2.1.4.3. Bioaccesibilidad de la curcumina.....	9
<b>2.2. Emulsiones</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Clasificación.....	11
2.2.2. Formulación de nanoemulsiones.....	13
2.2.2.1. Balance hidrofílico-lipofílico (HLB).....	17
2.2.3. Mecanismos de emulsificación.....	17
2.2.4. Formación de emulsiones.....	19
2.2.4.1. Métodos de alta energía.....	19
2.2.4.1.1. Agitación de alta cizalla.....	20
2.2.4.1.2. Homogeneizador ultrasónico.....	21
2.2.4.1.3. Homogeneizador de alta presión.....	22
2.2.4.1.4. Microfluidizadores.....	24
2.2.4.2. Métodos de baja energía.....	25
2.2.5 Estabilidad de las nanoemulsiones.....	25
2.2.5.1. Separación gravitacional.....	26
2.2.5.2. Agregación de gotas.....	27
2.2.5.3. Maduración de Ostwald.....	27
2.2.5.4. Estabilidad química.....	28
<b>2.3. Digestión <i>in vitro</i> de emulsiones</b> .....	<b>29</b>
2.3.1. Fase boca.....	30

2.3.1.1. <i>Mucina</i> .....	30
2.3.2. <i>Fase gástrica</i> .....	31
2.3.3. <i>Fase intestinal</i> .....	31
2.3.3.1. <i>Fuerza iónica y pH</i> .....	32
2.3.3.2. <i>Sales biliares</i> .....	32
2.3.3.3. <i>Lipasa</i> .....	33
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	<b>34</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>36</b>
<b>5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
5.2 <b>Objetivo general</b> .....	38
5.3 <b>Objetivos específicos</b> .....	38
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>6.1. Materiales</b> .....	39
<b>6.2. Métodos</b> .....	39
6.2.1. Solubilidad de la curcumina.....	39
6.2.2. Preparación de la fase oleosa.....	40
6.2.4. Preparación de los valores HLB.....	40
6.2.5. Preparación de las emulsiones.....	40
6.2.6. Barridos de HLB, tiempo y proporciones.....	41
6.2.7. Estudios de estabilidad durante el almacenamiento.....	41
6.2.7.1. <i>Retención de curcumina</i> .....	41
6.2.7.2. <i>Tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI)</i> .....	41
6.2.7.3. <i>Potencial <math>\zeta</math></i> .....	42
6.2.7.4. <i>pH</i> .....	42
6.2.7.5. <i>Determinación del color</i> .....	42
6.2.7.6. <i>Potencial óxido-reducción (Eh)</i> .....	43
6.2.7.7. <i>Índice de cremado</i> .....	43
6.2.7.8. <i>Actividad de captura del radical libre DPPH •</i> .....	43
6.2.8. Digestión gastrointestinal (GI) simulada.....	44
6.2.8.1. <i>Fase boca</i> .....	44

6.2.8.2. Fase estómago .....	45
6.2.8.3. Fase intestino delgado .....	45
6.2.9. Determinación de la bioaccesibilidad .....	45
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>7.1 Selección del aceite.....</b>	<b>47</b>
<b>7.2 Caracterización de las nanoemulsiones de curcumina .....</b>	<b>47</b>
<b>7.3 Evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento mediante     parámetros fisicoquímicos.....</b>	<b>52</b>
7.3.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI).....	52
7.3.2. Retención de curcumina.....	53
7.3.3. Color.....	55
7.3.4. Potencial $\zeta$ .....	57
7.3.5. Índice de cremado (IC).....	59
7.3.6. Potencial óxido–reducción (Eh).....	61
<b>7.4 Evaluación de parámetros fisicoquímicos en la digestión GI.....</b>	<b>65</b>
7.4.1. Tamaño de partícula en las fases GI.....	65
7.4.2. PDI en las fases GI.....	68
7.4.3. Potencial $\zeta$ en las fases GI.....	70
7.4.4. Retención de curcumina en las fases GI.....	71
<b>7.5. Determinación de la bioaccesibilidad de las nanoemulsiones.....</b>	<b>73</b>
7.5.1. Influencia del HLB en la bioaccesibilidad.....	73
7.5.2. Influencia del tamaño de partícula en la bioaccesibilidad.....	74
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>78</b>
<b>APÉNDICE A.....</b>	<b>86</b>
<b>APÉNDICE B.....</b>	<b>87</b>
<b>APÉNDICE C.....</b>	<b>88</b>
<b>APÉNDICE D.....</b>	<b>89</b>
<b>APÉNDICE E.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de líneas de la planta de cúrcuma (Ravindran <i>et al.</i> , 2007).	3
<b>Figura 2.</b> Preparación de productos de la cúrcuma (Vargas y López, 2000). ....	5
<b>Figura 3.</b> Compuestos responsables del color en la cúrcuma.....	8
<b>Figura 4.</b> Tipos de emulsiones y sus fases (Anandharamakrishnan, 2014).....	12
<b>Figura 5.</b> Los componentes en una emulsión distribuidos entre el aceite, agua y la región interfacial de acuerdo a su concentración y su interacción con el medio ambiente. ....	12
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de los principales métodos de emulsificación de alta energía: sistemas de rotor estator (a), homogeneización a alta presión (b), emulsificación ultrasónica (c), y dispersión de membrana (d). (Koroleva y Yurtov, 2012). ....	20
<b>Figura 7.</b> Esquema del procedimiento de preparación de emulsiones convencionales (Herrera., 2012).....	22
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de los diferentes tipos de sistemas de homogeneización a alta presión. (Koroleva y Yurtov, 2012).....	23
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de microfluidizadores con corrientes de flujo co-direccionales (a) y dirigidas en sentidos opuestos (b). (Koroleva y Yurtov, 2012).....	25
<b>Figura 10.</b> Las emulsiones ofrecen diferente estabilidad y sus aplicaciones exigen diferentes niveles de estabilidad de la emulsión. De izquierda a derecha: una emulsión estable, la emulsión ha comenzado a separarse, aparece el cremado en la emulsión (capa blanca de aceite notable en la parte superior de la fase acuosa). Fuente: AOCS Magazine.....	26
<b>Figura 11.</b> Impacto del valor HLB en el tamaño de partícula. Las formulaciones presentadas corresponden a la proporción fase o/s 1:3. ....	48
<b>Figura 12.</b> Efecto de la cantidad de surfactante y el tiempo de procesamiento en el PDI. ....	51

<b>Figura 13.</b> Apariencia de las emulsiones convencionales (muestras de lado izquierdo) y de las nanoemulsiones (muestras lado derecho) para los HLB 16.0, 15.6 y 14.0 en sus diferentes concentraciones. ....	56
<b>Figura 14.</b> Cambios en el potencial $\zeta$ durante el almacenamiento .....	59
<b>Figura 15.</b> Cremado de las nanoemulsiones a los 60 días de almacenamiento. ....	60
<b>Figura 16.</b> Índice de cremado en porcentaje para cada formulación.....	61
<b>Figura 17.</b> Influencia de la cantidad de surfactante en el Eh durante el almacenamiento de las nanoemulsiones. ....	62
<b>Figura 18.</b> Comportamiento de la actividad antioxidante al inicio y al término del almacenamiento.....	64
<b>Figura 19.</b> Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en el tamaño de partícula en las diferentes formulaciones.....	66
<b>Figura 20.</b> Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en el PDI en las diferentes formulaciones. ....	69
<b>Figura 21.</b> Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en el potencial $\zeta$ en las diferentes formulaciones.. ....	70
<b>Figura 22.</b> Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en estabilidad de la curcumina en las diferentes formulaciones. ....	72
<b>Figura 23.</b> Porcentaje de bioaccesibilidad en las diferentes formulaciones. ....	73
<b>Figura 24.</b> Influencia del tamaño de partícula en la bioaccesibilidad de las nanoemulsiones.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de la <i>Curcuma longa</i> L.....	2
<b>Tabla 2.</b> Composición de nutrientes y valores en ORAC para la planta de cúrcuma .....	6
<b>Tabla 3.</b> Características de nano, macro y microemulsiones . .....	10
<b>Tabla 4.</b> Composición química de la saliva artificial utilizada para simular las condiciones orales. ....	44
<b>Tabla 5.</b> Formulaciones que obtuvieron tamaños de partícula menores a 100 nm.....	50
<b>Tabla 6.</b> Formulaciones que obtuvieron PDI menores a 0.5.....	51
<b>Tabla 7.</b> Valores de $k$ dados en nm/día para cada nano emulsión. ....	52
<b>Tabla 8.</b> PDI al inicio y al finalizar el almacenamiento para cada HLB y concentración de surfactante.....	53
<b>Tabla 9.</b> Valores de $k$ (mg/día) para cada formulación .....	54
<b>Tabla 10.</b> Valores de ángulo Hue para cada formulación al inicio del almacenamiento.....	55
<b>Tabla 11.</b> Valores de $k$ para cada formulación .....	57
<b>Tabla 12.</b> Valores en mV de potencial zeta para cada formulación al inicio del almacenamiento.....	58

## RESUMEN

La curcumina es un fitoquímico fenólico de color amarillo extraído de los rizomas de la planta de cúrcuma (*Curcuma longa L.*) con propiedades antioxidantes que ayudan en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, Alzheimer, diabetes, entre otras. Sin embargo, al ser un compuesto lipofílico, presenta una baja bioabsorción en el cuerpo humano, por lo que al ser consumida no llega a sitios donde su acción es requerida. Sistemas de encapsulación tales como las nanoemulsiones ayudan a mejorar la bioabsorción de este tipo de compuestos ya que pueden resistir las condiciones gastrointestinales (GI) logrando que el organismo absorba una mayor cantidad de estos. El objetivo de este trabajo fue elaborar y caracterizar una nanoemulsión de curcumina (O/W) procesada por ultrasonido y evaluar su bioaccesibilidad. Se prepararon nanoemulsiones con tamaño de gota menores a 100 nm utilizando aceite de canola, curcumina y mezcla de surfactantes (Span 20, Tween 20 y Tween 40) para obtener valores de HLB (Balance hidrófilo-lipófilo) entre 8 y 16. Las nanoemulsiones resultantes se almacenaron durante 60 días y se les midió tamaño de partícula, color, cantidad de curcumina, índice de polidispersión (PDI), potencial  $\zeta$ , potencial óxido-reducción y capacidad captadora de radicales libres por el método de DPPH. Con base en los resultados del almacenamiento se usó un simulador gastrointestinal de tres fases (boca, estómago e intestino) para evaluar el efecto que tiene el HLB en la bioaccesibilidad. Las formulaciones con HLB 16.0, 15.6 y 14.0 relación 1:3 de surfactante, presentaron tamaños de partícula  $< 60$  nm, PDI  $< 0.5$  y potencial  $\zeta \approx -25$  mV. El mejor resultado obtenido fue con la formulación con el HLB 15.6, logrando incrementar hasta 4.5 veces más la bioaccesibilidad en comparación con la curcumina no emulsificada. Se concluye que existe un incremento en la estabilidad fisicoquímica y en la bioaccesibilidad para la curcumina nanoemulsificada.

**Palabras claves:** curcumina, HLB, nanoemulsión, tamaño de partícula, bioaccesibilidad.

## SUMMARY

Curcumin is a yellow phenolic phytochemical extracted from the rhizomes of turmeric plant (*Curcuma longa* L.) which has antioxidant properties that help in the treatment of diseases such as cancer, Alzheimer's disease, diabetes, and others. However being a lipophilic compound, it has low bioabsorption in the human body, so when consumed does not reach sites where their action is required. Encapsulation systems such as nanoemulsions help improve the bioabsorption of these compounds because they can resist gastrointestinal conditions making the body absorb more of these. The purpose of this work was to develop and characterize a nanoemulsion of curcumin (O/W) processed ultrasound and assess their bioaccessibility. Nanoemulsions were prepared with size smaller drop at 100 nm using canola oil, curcumin and mixture of surfactants (Span 20, Tween 20 and Tween 40) to obtain values of HLB (hydrophilic-lipophilic balance) between 8 and 16. The resulting nanoemulsions they were stored for 60 days and were measured particle size, color, retention of curcumin, polydispersity index (PDI),  $\zeta$  potential, potential redox and scavenging capacity of free radicals by the method of DPPH. It results based on storage gastro intestinal simulator (GI) of three phases (mouth, stomach and intestine) used to assess the effect on the bioaccessibility HLB. Formulations with HLB 16, 15.6 and 14 1: 3 ratio of surfactant had particle sizes <60 nm, PDI <0.5 and  $\zeta$  potential  $\approx$  -25 mV. The best result was obtained with the formulation with HLB 15.6, thereby increasing up to 4.5 times the bioaccessibility compared to the non-emulsified curcumin. It is concluded that there is an increase in the physicochemical stability and the bioaccessibility for nanoemulsified curcumin.

*Keywords:* curcumin, HLB, nanoemulsion, particle size, bioaccessibility.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia los productos funcionales, es decir, productos que son elaborados no sólo por sus propiedades nutricionales sino con la finalidad de mejorar la salud y prevenir algunas enfermedades, para ello es necesario adicionar compuestos biológicamente activos como vitaminas, minerales, fibra dietética, flavonoides, entre otros.

La curcumina es un fitoquímico fenólico natural extraído de los rizomas en polvo de la especia conocida como cúrcuma (*Curcuma longa L.*) la cual se ha informado que posee un número de actividades biológicas potencialmente benéficas, por ejemplo propiedades antioxidantes y antimicrobianas, por lo que al ser un componente lipófilo modelo, podría ser incorporado en los productos alimenticios funcionales, sin embargo, posee una baja bioaccesibilidad y pobre solubilidad en agua provocando una difícil incorporación en muchos productos alimenticios, lo que significa que sus atributos benéficos no pueden ser aprovechados. La bioaccesibilidad de los componentes lipófilos encapsulados dentro del tracto gastrointestinal puede incrementarse mediante el uso de nanoemulsiones debido a su tamaño de gota relativamente pequeño. Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales termodinámicamente inestables, de por lo menos dos líquidos inmiscibles, estando uno de los líquidos disperso como pequeñas gotas esféricas con un diámetro en el rango de 20-100 nm, dentro de otro líquido. Las nanoemulsiones aceite en agua (O/W) pueden ser preparadas por solubilización de los componentes bioactivos lipofílicos dentro de la fase oleosa y posteriormente se homogeniza dicha fase en una fase acuosa que contiene un emulsificante soluble en agua. El tamaño pequeño de las gotas en las nanoemulsiones significa que a menudo tienen diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas en comparación con las emulsiones convencionales. Se ha reportado (Solans *et al.*, 2005; Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004) que las nanoemulsiones tienen mejor estabilidad a la agregación de las partículas y la separación gravitacional debido a sus pequeños tamaños de gota, es por ello que en este trabajo se propuso la elaboración de una nanoemulsión para mejorar la estabilidad de la curcumina, evaluándola durante el almacenamiento y bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Curcuma longa* L.

El género *Curcuma* consiste en alrededor de 110 especies, distribuidas en la región tropical y pacífica de Asia (Ravindran *et al.*, 2007). La cúrcuma fue descrita como *Curcuma longa* por Linnaeus y su posición taxonómica es la siguiente (Chattopadhyay *et al.*, 2009) (Tabla 1):

Tabla 1. Taxonomía de la planta *Curcuma longa* L.

<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Subclase</b>	Commelínidas
<b>Orden</b>	Zingiberales
<b>Familia</b>	Zingiberaceae
<b>Género</b>	<i>Curcuma</i>
<b>Especie</b>	<i>Curcuma longa</i>

La cúrcuma es nativa del sur y sureste de Asia. Es cultivada en China, India, Sudamérica y el este de la India. La producción anual es de más de 240,000 toneladas, 94% del cual es producido en India (Vargas y López, 2003). La cúrcuma es una planta tropical anual, robusta, erecta con rizoma perenne, relacionada con la familia del jengibre. La planta tiene tallos trepadores que alcanzan una altura de 60 a 100 cm (Figura 1). Las hojas rectas erectas crecen teniendo de seis a diez brotes alternos, hojas dísticas rodeadas por vainas sin cuchilla que forman un pseudotallo corto. Las hojas son de color verde oscuro por encima, nervadura principal verde y por debajo verde muy claro cubierto de puntos pelúcidos. Son angostas en ambos extremos y amplios de hasta 1-2 m de largo. La inflorescencia es un pico central cilíndrico, carnoso de 10 a 15 cm de longitud, que surgen a través del pseudotallo. Las flores son de color amarillo y se presentan en cincino de dos en dos en las axilas de las brácteas. Las brácteas superiores son de color blanco; las brácteas inferiores son de color verde (Charles, 2013). La reproducción tiene lugar a través de la división de los rizomas que son filiformes, carnosos y duros. Los rizomas tienen un color amarillo marrón, una piel externa algo escamosa y una carne de color

amarillo anaranjado brillante, con extremidades blancas jóvenes, y un olor picante cuando se aplastan.

Estas ramas de rizomas son de 2-5 cm de largo, en forma de dedo, cilíndrico, comprimido, recto o torcido, con el espesor de 1.8 cm. El rizoma principal es de unos 3 cm de espesor y 5 cm de largo. La cúrcuma fresca tiene carne de color naranja brillante, mientras que el rizoma seco es de color amarillo limón a amarillo naranja (Charles, 2013).



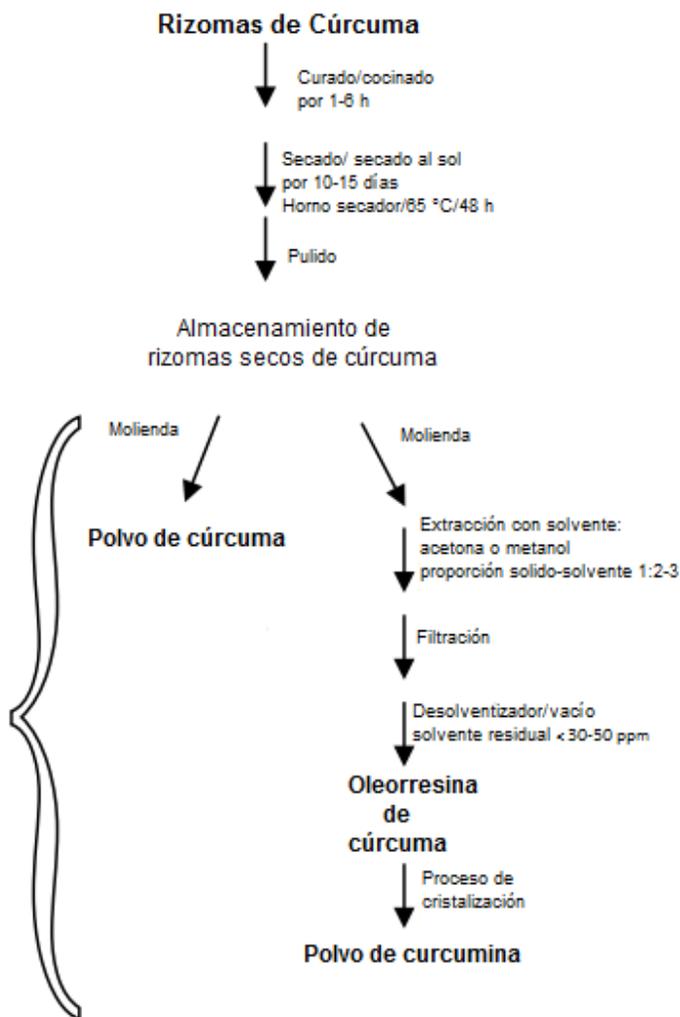
**Figura 1.** Diagrama de líneas de la planta de cúrcuma (Ravindran *et al.*, 2007).

### **2.1.1. Preparación de productos de la cúrcuma.**

El proceso general de obtención de los productos de la cúrcuma se muestra en la Figura 2. En la etapa de curado, los rizomas son cocinados para disminuir el tiempo de deshidratación y para generar un producto de color uniforme. Sin embargo, la extracción de los curcuminoides y el rendimiento son mayores a partir de rizomas no cocinados que de los cocinados; el curado por lo tanto puede implicar la pérdida del colorante. El tiempo

de curado depende del tamaño del lote tratado. Después del secado, los rizomas se vuelven duros, frágiles y de color amarillo uniforme. La humedad final puede ser alrededor de 5%, pero, por razones económicas, los rizomas se secan parcialmente aproximadamente de un 15 a un 30% y se transportan a los centros de montaje. El procedimiento de pulido mejora la apariencia de cúrcuma seca mediante la eliminación de la superficie exterior mate. La cúrcuma pulida es más atractiva, con un color amarillo brillante. A veces, el alumbre, semilla de suelo de ricino y polvo de cúrcuma se utilizan para dar un color más brillante. Los rizomas procesados se almacenan en bolsas dobles de yute en almacenes donde la fumigación se lleva a cabo periódicamente para prevenir o eliminar las plagas. La cúrcuma molida es bastante estable al calor moderado y no requiere un cuidado especial durante su producción. El polvo de la cúrcuma se almacena a granel en contenedores en el que se evita la absorción de humedad y la exposición a la luz, siendo estable hasta por 6 meses.

La oleorresina de cúrcuma es una mezcla de compuestos: ácidos grasos volátiles y no volátiles y material resinoso, entre otros. La oleorresina se utiliza principalmente como colorante alimentario y en segundo lugar como especia. Los disolventes utilizados en la extracción son los aprobados para la industria petrolera: hexano, heptano, acetona, alcohol, y dicloruro de etileno. Sin embargo, la polaridad de los colorantes de *Curcuma longa L.* limita el uso de varios disolventes siendo la acetona el mejor para extraer una oleorresina de buena calidad. El tiempo de extracción es variable, pero en un equipo Soxhlet el rendimiento es de aproximadamente 5%, el cual contiene 42% de curcuminoides en 4 a 5 h. En la extracción a nivel industrial, el rendimiento está en el rango de 10 a 12%, aunque el contenido de la curcumina es menor que la obtenida en el Soxhlet. El producto final es un aceite altamente viscoso con 4.5 a 5% de curcuminoides, un producto de color marrón-naranja intenso, de 30 a 40% de curcumina, y de 15 a 20% de aceite volátil. Para un fácil manejo, el producto altamente viscoso se mezcla con frecuencia con disolventes permitidos tales como propilenglicol o polisorbato para obtener un producto homogéneo y que se pueda verter



**Figura 1.** Preparación de productos de la cúrcuma (Vargas y López, 2000).

La oleoresina de cúrcuma se utiliza esencialmente en la cocina internacional en la carne y los productos de pescado y en algunos productos transformados como la mostaza preparada, encurtidos y condimentos para los filetes de pescado, croquetas de patatas congeladas, mantequilla y queso. La oleoresina se utiliza en el intervalo de 2 a 640 ppm. La curcumina es un polvo amarillo, cristalino (punto de fusión de 184 a 186 ° C), inodoro; poco soluble en agua, éter de petróleo y benceno; soluble en alcoholes metílico y etílico, ácido acético glacial, y en propilenglicol; muy soluble en acetona y éter etílico (Vargas y López, 2003).

### 2.1.2. Composición química de la cúrcuma

La cúrcuma contiene 6.3% de proteína, 5.1% de grasa, 3.5% de minerales, 69.4% de carbohidratos y 13.1% de humedad (Chattopadhyay *et al.*, 2009). Los aceites esenciales (5.8%) obtenidos por destilación de vapor de los rizomas como  $\alpha$ -felandreno (1%), sabineno (0.6%), cineol (1%), borneol (0.5%), zingibereno (25%) y sesquiterpenos (53%). También contiene ácido ascórbico, vitamina C, azúcares (glucosa, fructosa, arabinosa) y curcuminoides.

**Tabla 2.** Composición de nutrientes y valores en CARO para la planta de cúrcuma

Nutrientes	Unidades	Valores por 100 g
Agua	g	11.36
Energía	Kcal	354
Proteína	g	7.83
Lípidos totales (grasa)	g	9.88
Carbohidratos, por diferencia	g	64.93
Fibra, total	g	21.1
Azúcares totales	g	3.21
Calcio	mg	183
Vitamina C	mg	25.9
Vitamina B-6	mg	1.800
Vitamina B-12	mcg	0
Vitamina A, RAE	mcg-RAE	0
Vitamina A, IU	IU	0
Vitamina D	IU	0
Vitamina E	mg	3.10
Ácidos graso totales saturados	g	3.120
Ácidos grasos totales monoinsaturados	g	1.660
Ácidos grasos totales poliinsaturados	g	2.180

**Fuente:** USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Publicado 24 (2011)

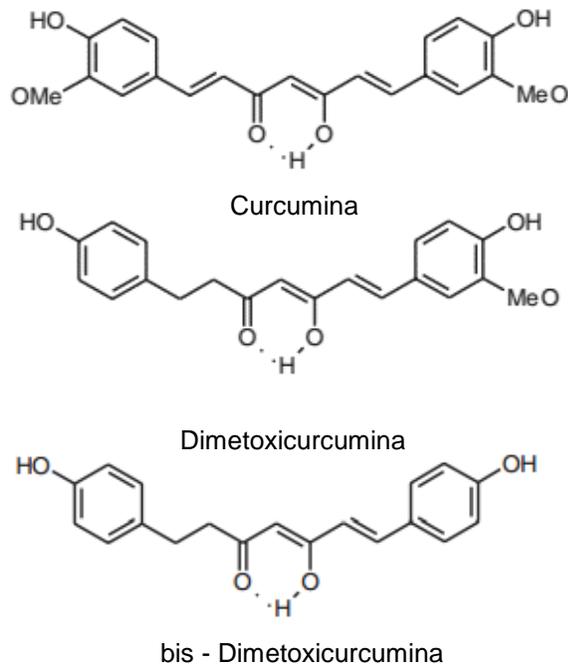
### 2.1.3. Curcuminoides

Los curcuminoides son sustancias fenólicas lipofílicas con un color amarillo característico y son derivados de los rizomas de la planta de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) (Bartosz, 2014). Los curcuminoides se componen de curcumina, dimetoxicurcumina y bisdimetoxicurcumina (Figura 3). Estos pigmentos responden de manera similar a pH alcalino con un rápido incremento en las tasas de degradación de pH 7.5 a un máximo aproximadamente de 10.2, disminuyendo de nuevo a pH en el intervalo de 10.2 a 11.95.

Sin embargo, la bisdimetoxicurcumina es más resistente a la degradación alcalina. Las vidas medias son 0.4 a 99, de 1 a 1700, y 4 a 2200 h para la curcumina, dimetoxicurcumina y bisdimetoxicurcumina, respectivamente (Vargas y López, 2003).

#### **2.1.4. Curcumina**

La curcumina 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, es una bis- $\alpha,\beta$ -insaturado  $\beta$ -dicetona con dos restos de ácido ferúlico unidas por un puente metileno (Bartosz, 2014). Es un polvo cristalino de color amarillo o naranja, de fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_6$ , punto de fusión 183 °C, soluble en alcohol y ácido acético glacial e insoluble en agua y éter. A pH 3 es de color amarillo-limón y a pH 10 de color naranja a marrón-rojizo, es estable al calor, pero sensible a la luz (lo que limita muchas veces su aplicación) (Sing de Ugaz, 1997). Este ingrediente activo comprende 2-5% de la cúrcuma y se ha demostrado que tienen propiedades antioxidantes similares a la vitamina C y E. La curcumina ha sido usada como especia y agente colorante durante cientos de años, pero ha sido recientemente que se ha comenzado a usar como anti-inflamatorio, antiviral, anti-infeccioso, hipocolesterolémico, antimicrobiano, antirreumático, citotóxico, espasmolítico, antidiabético, y antihepatotóxico. También se considera que tiene propiedades anticancerígenas y se utiliza a menudo como un antioxidante en cápsulas, tabletas, y saborizante en té (Charles, 2013). El consumo en la dieta diaria media de la curcumina se estimó en 0.4 a 1.5 mg/Kg de peso corporal en la India y 0.48 mg/Kg en Francia. Estudios en humanos mostraron que la curcumina es generalmente reconocida como segura (GRAS) y bien tolerada incluso a dosis muy altas. Un ensayo clínico Fase I mostró que las dosis orales de hasta 8 g/día durante 3 meses no eran tóxicas (Cheng *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Compuestos responsables del color en la cúrcuma.

#### **2.1.4.1. Consumo de la curcumina**

En la cocina del sudeste de Asia y la India, la cúrcuma es una especia popular utilizada en polvos de curry como saborizante de verduras, carne, pescado, arroz y platos dulces o postres también se utiliza en salsas, pollo, condimentos, quesos encurtidos, condimentos, sopas, bebidas y confitados. En los países occidentales que se utiliza generalmente como un colorante para condimentos y salsas de mostaza. También se utiliza en los quesos, encurtidos, embutidos, huevos rellenos, aderezos y sus usos culinarios se extienden. Se mezcla bien con el cilantro, jengibre, semillas de mostaza, hierba de limón, eneldo, comino, clavo y pimienta negra. La cúrcuma se utiliza ampliamente en los platos de Oriente y de Medio Oriente como condimento y colorante culinario. En cocinas de Marruecos, se le utiliza como especia para la carne especialmente de cordero, y verduras (Charles, 2013).

#### **2.1.4.2. Actividad antioxidante de la curcumina**

La actividad antioxidante de la curcumina se reportó ya desde 1975. Fuertes propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias de la curcumina lo convierten en un candidato potencial para la prevención y/o tratamiento del cáncer y otras enfermedades

crónicas (Alex *et al.*, 2010; Bao *et al.*, 2010; Bhartiya *et al.*, 2010; Biswas *et al.*, 2010). La curcumina se ha utilizado para inhibir la peroxidación lipídica utilizando linoleato, un ácido graso poli-insaturado que es capaz de ser oxidado de forma radical. Se ha informado que la curcumina actúa como un antioxidante que rompe la cadena en la posición 3' y resultando así en una reacción de Diels-Alder intramolecular y la neutralización de los radicales lipídicos. La actividad de eliminación de radicales libres de la curcumina también se ha demostrado que contribuye a sus propiedades anti-inflamatorias por la disminución de la cantidad de estrés oxidativo que puede iniciar en las reacciones inflamatorias. La actividad de eliminación de radicales libres y antioxidantes de la curcumina tiene un papel importante en la actividad anticancerígena (Karami *et al.*, 2011). Su efecto inhibitor sobre la carcinogénesis se ha demostrado en varios modelos de tumores como el cáncer oral, tumores intestinales, y carcinoma de mama en modelos animales (Zhao *et al.*, 2010).

Ishrat *et al.* (2009) estudiaron los efectos de modulación de la curcumina contra los déficits cognitivos y el daño oxidativo estrotozotocina intracerebroventricular en ratas inducidas. Su estudio sugiere que la curcumina es eficaz en la prevención de déficits cognitivos, y podría ser beneficioso para el tratamiento de la demencia esporádica de tipo Alzheimer (SDAT).

#### **2.1.4.3. Bioaccesibilidad de la curcumina**

La bioaccesibilidad es un concepto relacionado con la biodisponibilidad en el concepto de la biodegradación. Se dice que un compuesto es bioaccesible cuando está disponible para atravesar la membrana plasmática de las células epiteliales de la mucosa intestinal. La bioaccesibilidad puede ser estudiada mediante pruebas *in vitro*, las cuales determinan la fracción soluble de un compuesto tratando de emular ciertas condiciones de la digestión humana.

El potencial óptimo de la curcumina se limita debido a la mala biodisponibilidad oral y la solubilidad insuficiente en disolventes acuosos que conducen a una mala absorción, metabolismo rápido y rápida eliminación sistémica. Para superar este obstáculo, un gran número de diferentes estrategias, tales como la formulación con liposomas, fosfolípidos,

micelas o nanopartículas se han investigado por su potencial para mejorar la bioaccesibilidad de la curcumina en modelos *in vitro* (Moghadamtousi *et al.*, 2014). Se ha reportado en diferentes estudios (Wang *et al.*, 2007, Anuchapreda *et al.*, 2011, McClements *et al.*, 2012 y Sari *et al.*, 2014) que el uso de las nanoemulsiones ha incrementado la bioaccesibilidad de la curcumina, siendo el área de interés para el desarrollo de sistemas de encapsulación para la protección de la curcumina.

## 2.2. Emulsiones

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles (usualmente aceite y agua), con uno de los líquidos disperso en el otro como gotas esféricas pequeñas (McClements, 2011). El tamaño de las gotas producidas depende de la composición del sistema y el método de homogenización del mismo, cuando el promedio del radio de las gotas es <100 nm es considerada nanoemulsión, pero >100 nm se considera una emulsión convencional (McClements *et al.*, 2011). Para ser más precisos en cuanto al tamaño, se debe considerar el radio o diámetro de la gota, aplicando una definición flexible que indica que una nanoemulsión es aquella en que la gran mayoría de las gotas, tomando como base el número y el peso/volumen, tienen un radio por debajo de los 100 nm. Aunque la definición de nanoemulsiones se ha extendido hasta la escala de 1 nm, sería imposible hacer una nanoemulsión más pequeña que el tamaño de la micela del surfactante, que típicamente es de pocos nanómetros (Mason *et al.*, 2006).

Las nanoemulsiones a veces se denominan emulsiones ultra finas o miniemulsiones. Un rasgo característico de las nanoemulsiones es su estabilidad cinética. La principal diferencia entre microemulsiones y nanoemulsiones es que las primeras son termodinámicamente estables, mientras que las segundas no lo son (Koroleva. 2012). Las características cualitativas de la estabilidad de las nanoemulsiones y las emulsiones convencionales se muestran en la Tabla 3. A pesar de cierta inconsistencia semántica de los términos “microemulsión” y “nanoemulsión”, esta terminología es comúnmente aceptada en la literatura, especialmente en el extranjero.

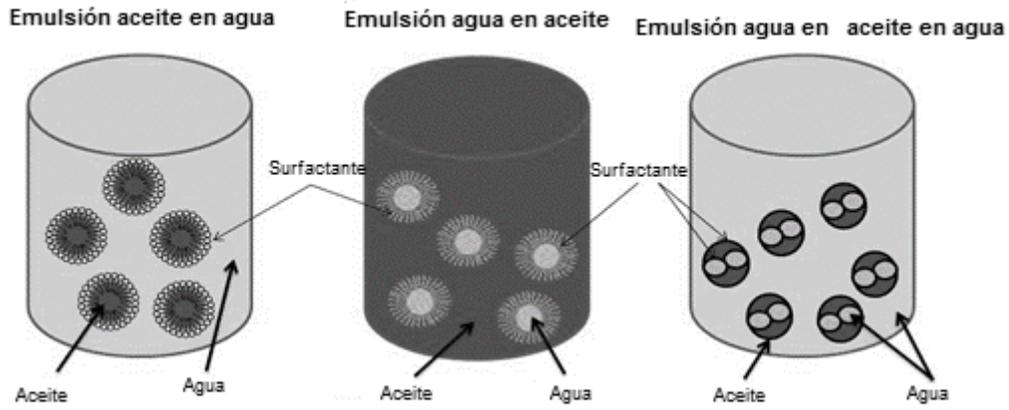
**Tabla 3.** Características de nano, macro y microemulsiones (Anandharamakrishnan, 2014).

<b>Sistema</b>	<b>Tamaño de gota nm</b>	<b>Tipo de estabilidad</b>
<i>Nanoemulsión</i>	<100 nm	Cinética
<i>Macroemulsión</i>	>100 nm	Cinética
<i>Microemulsión</i>	<100 nm	Termodinámica

Las nanoemulsiones ofrecen un gran potencial para encapsular altas concentraciones de componentes bioactivos solubles en aceite en una amplia línea de productos alimentarios (Anandharamakrishnan, 2014).

### **2.2.1. Clasificación**

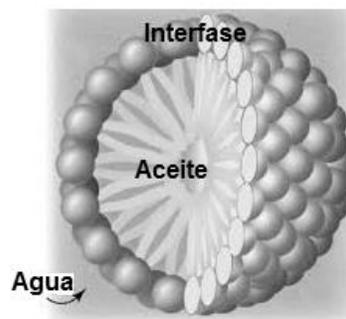
Las emulsiones pueden ser convenientemente clasificadas de acuerdo con la distribución de la fase oleosa y acuosa. Un sistema que consiste de cápsulas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamada emulsión aceite en agua u O/W (ejemplos: mayonesa, leche, crema, puré y salsas). Un sistema que consiste de gotitas de agua dispersas en una fase oleosa es llamada emulsión agua en aceite o W/O (ejemplos: margarina y mantequilla). La sustancia que forma las gotitas en una emulsión se conoce como la fase dispersa o interna, mientras la sustancia que forma el líquido circundante es llamada fase continua o externa. Esto es posible también para preparar emulsiones múltiples de tipo aceite-agua-aceite (O/W/O) o agua-aceite-agua (W/O/W). Por ejemplo, una emulsión W/O/W consiste de gotitas de agua dispersas dentro de gotitas de aceite más grandes, que a su vez se dispersan en una fase continua acuosa (McClements, 1999). En la Figura 4 se puede apreciar la fase dispersa y continua de cada tipo de emulsión.



**Figura 4.** Tipos de emulsiones y sus fases (Anandharamakrishnan, 2014).

La mayoría de las emulsiones en alimentos convenientemente se puede considerar que consiste en tres regiones que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas: el interior de las gotitas, la fase continua y la interface. Las moléculas en una emulsión se distribuyen entre estas tres regiones en función de su concentración y polaridad.

Las moléculas no polares tienden a ubicarse principalmente en la fase oleosa, las moléculas polares en la fase acuosa, y las moléculas anfifílicas en la interfase (Figura 5). Cabe señalar que en el caso del equilibrio, existe un intercambio continuo de moléculas entre las diferentes regiones, que ocurre a una velocidad que depende en el transporte de masa de las moléculas a través del sistema.



**Figura 5.** Los componentes en una emulsión distribuidos entre el aceite, agua y la región interfacial de acuerdo a su concentración y su interacción con el medio ambiente.

### **2.2.2. Formulación de nanoemulsiones**

Para hacer una emulsión estable de forma reproducible, un gran número de factores debe ser controlado. Estos incluyen la selección de una composición apropiada, el control de la orden de adición de los componentes, y la aplicación de la fuerza cortante para que se rompan de manera efectiva las gotas. Hay varios requisitos adicionales para la elaboración de nano emulsiones (Mason *et al.*, 2011).

*Fase oleosa.* La fase oleosa usada para preparar nanoemulsiones puede ser formulada por varios componentes no polares, incluyendo triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, aceites saborizantes, esenciales y minerales, ceras, sustitutos de grasas, vitaminas liposolubles y varios nutraceuticos lipofílicos (por ejemplo, carotenoides, curcumina, fitoesteroles, fitoestanoles, coenzima Q, etc.). La formación, estabilidad y propiedades de las nanoemulsiones a menudo dependen del conjunto de las características fisicoquímicas de la fase oleosa, como la polaridad, solubilidad en agua, tensión interfacial, índice de refracción, viscosidad, densidad y estabilidad química (Tadros *et al.*, 2004; McClements, 2005, Anton *et al.*, 2007; Wooster *et al.*, 2008; Anton *et al.*, 2009). Sin embargo, este mismo conjunto de características a menudo limitan el tipo de método de homogeneización que puede utilizarse para preparar una nanoemulsión con una fase oleosa en particular. Estas características físico químicas suelen a menudo limitar el tipo de método(s) de homogeneización que puede ser utilizado para preparar una nanoemulsión de una fase oleosa en particular. En la industria alimentaria, a menudo es deseable preparar nanoemulsiones utilizando aceites de triglicéridos debido a su bajo costo, abundancia y atributos funcionales o nutricionales, por ejemplo, aceite de maíz, de soya, girasol, cártamo, oliva, linaza, algas, o pescado. La mayoría de estos aceites consisten principalmente de triglicéridos de cadena larga (TCL), aunque triglicéridos de cadena media (TCM) y triglicéridos de cadena corta (TCC) se están utilizando en algunas aplicaciones alimentarias (Palamakula y Khan, 2004; Wooster *et al.*, 2008; Do *et al.*, 2009). La formación de nanoemulsiones utilizando aceites de TCM y TCL es a menudo un desafío debido a su polaridad relativamente baja, alta tensión interfacial, y alta viscosidad.

*Fase acuosa.* La fase acuosa utilizada para preparar una emulsión comúnmente consiste, principalmente de agua pero también puede contener una variedad de otros componentes polares, incluyendo co-disolventes (como alcoholes o polioles), carbohidratos, proteínas, minerales, ácidos y bases. El tipo y concentración de estos componentes determinan la polaridad, tensión interfacial, índice de refracción, reología, densidad, comportamiento de las fases, pH y fuerza iónica de la fase acuosa que, en conjunto, impactarán la formación, estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión producida. Un control cuidadoso de la composición de la fase acuosa podrá aprovecharse para optimizar la formación y mejorar la estabilidad de las nanoemulsiones. La formación de las pequeñas gotas usando métodos de homogeneización por alta presión a menudo puede facilitarse al adicionar co-disolventes solubles en agua a la fase acuosa, con la finalidad de optimizar el rango de viscosidad de la fase dispersa a la continua (McClements y Rao, 2011).

*Agentes estabilizantes.* Si sólo se homogeneizaran juntas una fase acuosa y una oleosa, el sistema producido se desestabilizaría rápidamente por diversos mecanismos, incluyendo floculación, coalescencia, maduración de Ostwald y separación gravitacional. Por esta razón es necesario, a menudo, agregar varios tipos de estabilizadores a las nanoemulsiones para mejorar su estabilidad a largo plazo. Al formar nanoemulsiones es necesario que la fase continua tenga un significativo exceso de surfactante, con la finalidad de crear nuevas áreas de superficie de las gotas en nanoescala, para ser rápidamente cubiertas durante la emulsificación, logrando así inhibir la coalescencia inducida por el cizallamiento (Mason *et al.*, 2006). Entre los diferentes tipos de estabilizadores podemos encontrar:

**a) Emulsificantes y co-emulsificantes:** La adecuada selección de un emulsificante (o combinación de ellos) es uno de los factores más importantes a considerar para el diseño apropiado de una nanoemulsión. Un emulsificante es una molécula con superficie activa que es capaz de adsorberse a la superficie de las gotas, facilitando la ruptura de las gotas y protegiéndolas contra la agregación (McClements, 2005; Kralova *et al.*, 2009). En los

métodos de alta energía los emulsificantes facilitan la ruptura de las gotas mediante un homogeneizador a través de la disminución de la tensión interfacial, lo que favorece la producción de pequeñas gotas. En los métodos de baja energía, los emulsificadores facilitan la formación espontánea de las gotas diminutas debido a su capacidad para producir tensiones interfaciales muy bajas, bajo ciertas condiciones, tanto de la solución como ambientales, ya que la estabilidad de una emulsión ante fuerzas o presiones ambientales, tales como pH, fuerza iónica, calentamiento, enfriamiento, o almacenamiento a largo plazo, a menudo está determinada, predominantemente, por el tipo de emulsificante utilizado. En la industria de los alimentos, los tipos de emulsificantes más importantes son pequeñas moléculas de surfactantes, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos, etc., y su efecto dependerá del tipo de enfoque utilizado para la formación de las nanoemulsiones. Una forma de clasificar a los emulsificantes o surfactantes es de acuerdo a sus características eléctricas:

- *Surfactantes iónicos*: la mayoría de los surfactantes iónicos de grado alimenticio están cargados negativamente, pero al menos un surfactante cargado positivamente está disponible para ciertas aplicaciones, como el arginato laúrico. Este tipo de surfactantes pueden ser utilizados para formar emulsiones por ambos métodos: de alta y de baja energía, pero puede verse limitada en productos donde se requieran altos niveles de surfactante, ya que éstos tienden a causar irritación (Sol *et al.*, 2006, Solè *et al.*, 2006, McClements y Rao, 2011).
- *Surfactantes no iónicos*: este tipo de surfactantes han sido muy utilizados para formar nanoemulsiones debido a su baja toxicidad, ausencia de irritabilidad y la capacidad de formar nanoemulsiones fácilmente por ambos métodos, de baja y de alta energía. Entre éste tipo de estabilizantes se encuentran los surfactantes de azúcar éster (como monooleato de sorbitán o monopalmitato de sacarosa), éter polioxietileno (POE) y ésteres de sorbitán etoxilado como Tween y Span (Chiu, 2006; Liu *et al.*, 2006; Jafari *et al.*, 2007; Henry *et al.*, 2009).
- *Surfactantes bipolares*: Éstos tienen dos o más grupos ionizables cargados en sentidos opuestos, en la misma molécula. Por consecuencia, pueden tener cargas netas positivas, negativas o neutras, dependiendo del pH de la solución. Los

fosfolípidos están entre los surfactantes bipolares más comunes y que además tienen categoría GRAS, lo cual permite su uso en los alimentos, como es el caso de la lecitina. Sin embargo, muchos fosfolípidos naturales no son tan efectivos cuando se usan de manera aislada para elaborar o estabilizar nanoemulsiones, pero pueden ser más efectivos cuando se usan en combinación con co-surfactantes (de Morais *et al.*, 2006; Hoeller *et al.*, 2009).

**b) Modificadores de textura:** Son sustancias que espesan o gelifican la fase acuosa y que a menudo se incorporan en productos comerciales para mejorar la estabilidad de una emulsión al retardar el movimiento de las gotas, pero también pueden usarse para dar una textura deseable a un producto, como cremosidad, espesor, fuerza de gel, etc. La mayoría de los modificadores de textura usados en la industria alimentaria son biopolímeros, como proteínas o polisacáridos (Imeson, 2010).

**c) Agentes modificadores de la densidad:** Son sustancias que usualmente se agregan a las gotas de aceite en las emulsiones O/W para igualar su densidad con la de la fase acuosa que las rodea. Su propósito es reducir las fuerzas impulsoras para la separación gravitacional, además de prevenir o retardar la cremación o la sedimentación (McClements, 2005). Estos agentes comúnmente se usan en las industrias de alimentos y bebidas, siendo los más comunes el aceite vegetal bromado (BVO), gomas de éster, goma damar y acetato isobutirato de sacarosa (SAIB).

**d) Retardadores de maduración:** Este concepto es relativamente nuevo en la industria alimentaria, pero son importantes para estabilizar ciertos tipos de nanoemulsiones de grado alimenticio, como pueden serlo aquellas que contienen aceites susceptibles a la maduración de Ostwald (OR), como aceites saborizantes, aceites esenciales y triglicéridos de cadena corta. Un retardador de la maduración es un material altamente hidrofóbico que se incorpora a las gotas de aceite para retardar o inhibir OR, el cual es un proceso donde se forman grandes gotas, creciendo a expensas de las más pequeñas, debido a la difusión de las moléculas de aceite a través de la fase acuosa. Entre los ejemplos más comunes están los triglicéridos de cadena larga, aceites minerales o goma éster, los cuales trabajan mediante la generación de una entropía de un efecto mezclado que contrarresta el efecto de OR (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004).

### **2.2.3. Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)**

A menudo, la formación y estabilidad de las nanoemulsiones puede ser mejorada al usar combinaciones de emulsificantes, más que al utilizar uno de forma aislada. Por ejemplo, al usar en conjunto un surfactante lipofílico y uno hidrofílico, puede facilitarse la formación de pequeñas partículas mediante el uso de los dos enfoques de formación de emulsiones. Además, al usar sistemas de emulsificantes mezclados, puede mejorarse la estabilidad de las nanoemulsiones a la agregación de partículas (McClements y Rao, 2011). Un enfoque usando el concepto HLB, un parámetro empírico, se aplica para determinar el contenido hidrófilo e hidrófobo de los tensioactivos y se utiliza para estudiar el comportamiento de fase de las mezclas. Este método tiene como objetivo lograr el valor HLB requerido para un aceite dado obteniendo así un sistema de emulsión estable. Un valor de HLB alto indica una alta hidrofiliidad del sistema tensioactivo y viceversa. Los valores de HLB de sistemas tensioactivos mixtos binarios pueden ser calculados mediante la fórmula de Griffin (Ecuación 1) que es aplicable para los tensioactivos no iónicos.

$$HLB_{req} = X_1HLB_1 + X_2HLB_2 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

### **2.2.3. Mecanismos de emulsificación**

Para preparar emulsiones se necesita aceite, agua, surfactante y energía. Esto puede ser considerado como la energía requerida para expandir la interfaz,  $\Delta A\gamma$  (donde  $\Delta A$  es el aumento en el área interfacial cuando la mayoría del aceite con el área  $A_1$  produce una gran número de gotitas con área  $A_2$ ;  $A_2 \gg A_1$ ,  $\gamma$  es la tensión interfacial). Puesto que  $\gamma$  es positiva, la energía para ampliar la interfaz es grande y positiva. Este término de energía no puede ser compensado por la pequeña entropía de dispersión  $T\Delta S$  (que también es positiva) y la energía libre total de la formación de una emulsión,  $\Delta G$  es positivo (Ecuación 2).

$$\Delta G = \Delta A\gamma - T\Delta S \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Por lo tanto, la formación de emulsión no es espontánea y se requiere energía para producir las pequeñas gotas. La formación de gotas grandes (pocos micrómetros) como es el caso de las macroemulsiones es bastante fácil y, por tanto, agitadores de alta velocidad, tales como el Ultraturrax o Silverson Mixer es suficiente para producir la emulsión. Por el contrario, es difícil la formación de pequeñas gotas (submicrométrica como es el caso con nanoemulsiones) y esto requiere una gran cantidad de agente tensioactivo y/o energía. La alta energía necesaria para la formación de nanoemulsiones se puede entender a partir de una consideración de la presión de Laplace  $p$  (la diferencia de presión entre el interior y exterior de la pequeña gota (Ecuación 3).

$$p = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde  $R_1$  y  $R_2$  son los radios principales de curvatura de la gota. Para una gota esférica (Ecuación 4),  $R_1 = R_2 = R$ .

$$p = \frac{2\gamma}{R} \text{ (Ecuación 4)}$$

Para romper una gota en otras más pequeñas, debe ser fuertemente deformada y esta deformación incrementa  $p$ . Esto se puede demostrar cuando una gota esférica se deforma a un elipsoide alargado. Para una gota esférica, sólo hay un radio de curvatura  $R_a$ , mientras que para una elipsoide alargada hay dos radios de curvatura  $R_{b,1}$  y  $R_{b,2}$ . En consecuencia, la tensión necesaria para deformar la gota es mayor para una gota más pequeña. Puesto que la tensión se transmite generalmente por el líquido circundante a través de la agitación, las tensiones más altas necesitan agitación más vigorosa, por lo tanto se requiere más energía para producir gotas más pequeñas. Los tensioactivos juegan un papel importante en la formación de nanoemulsiones: Al reducir la tensión interfacial,  $p$  se reduce y por lo tanto la tensión necesaria para romper una gota se reduce. Los tensioactivos evitan la coalescencia de las gotas recién formadas.

Varios procesos que ocurren durante la emulsificación, es decir, rompimiento de las gotitas, la adsorción de los tensoactivos y la colisión de gotas (que puede o no conducir a coalescencia). Cada uno de estos procesos se produce varias veces durante la emulsificación y la escala de tiempo de cada proceso es muy corto, generalmente un

microsegundo, esto demuestra que el proceso de emulsificación es un proceso dinámico y los eventos que ocurren en un rango de microsegundos podrían ser muy importantes. Para describir la formación de emulsiones se tiene que tener en cuenta dos factores principales: hidrodinámica y ciencia interfacial (Tadros, 2004)

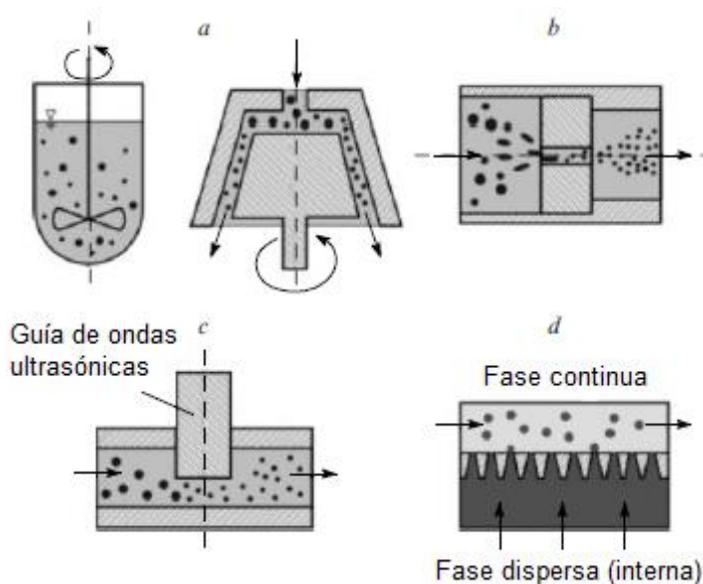
#### **2.2.4. Formación de emulsiones**

A fin de proteger los compuestos bioactivos de la degradación, se debe de obtener una nanoemulsión estable. Por lo tanto, la formación de una nanoemulsión que posee un tamaño específico para la aplicación final resulta ser un proceso crucial. Sin embargo, los sistemas que no están en equilibrio, no se pueden formar espontáneamente y requieren aporte de energía proporcionada por fuentes externas o internas. Además de la fuente de energía, algunos otros factores afectan a las características y estabilidad final de la nanoemulsión. Por ejemplo, el método de preparación, el orden de adición de los componentes (ej. aceite, agua y surfactante), la naturaleza de la fase continua y dispersa y el tipo y la cantidad de surfactante utilizado, juntos afectan la formación de la nanoemulsión. Su elaboración puede ser clasificada como métodos de alta energía o de baja energía, en función del principio fundamental. Los métodos de alta energía rompen las fases oleosa y acuosa en pequeñas gotas utilizando dispositivos mecánicos, tales como homogeneizadores de alta presión, microfluidizadores y sonicadores. En los métodos de baja energía, las nanoemulsiones se forman como resultado de las transiciones de fase que se producen durante el proceso de emulsificación cuando se alteran las condiciones ambientales (ya sea la temperatura o composición), por ejemplo., los métodos de inversión de fase (Anandharamakrishnan, 2014).

##### **2.2.4.1. Métodos de alta energía**

Cuando las nanoemulsiones se preparan por los métodos de alta energía, el tamaño de las pequeñas gotas de la fase interna a menudo excede el rango nanométrico (Figura 6). Esto es en primer lugar debido al elevado consumo de energía necesario para la dispersión, especialmente en el caso de los sistemas viscosos. Además, un aumento en el tamaño de la gota puede ser debido a la cantidad insuficiente de agente surfactante para lograr la adsorción completa de todas las gotas formadas tras la dispersión en la

interfaz. En este caso, la coalescencia se produce en el sistema, y el tamaño medio de las gotas aumenta. Un factor importante que afecta al tamaño final de las gotas es la velocidad de adsorción del surfactante, si es menor que la velocidad de coalescencia, las pequeñas gotas en la emulsión aumentarán de tamaño después de la finalización del proceso de dispersión incluso si se han formado gotas de tamaño nanométrico y hay cantidad suficiente de surfactante. Este factor es importante para las emulsiones inversas que están estabilizadas usando agentes surfactantes solubles en aceite, debido a que la velocidad de difusión de estos hacia la interfaz en la fase orgánica es mucho menor que en la fase acuosa (Koroleva y Yurtov, 2012).



**Figura 6.** Representación esquemática de los principales métodos de emulsificación de alta energía: sistemas de rotor-estator (a), homogeneización a alta presión (b), emulsificación ultrasónica (c), y dispersión de membrana (d). (Koroleva y Yurtov, 2012).

#### 2.2.4.1.1. Agitación de alta cizalla

Inicialmente, se utilizan mezcladores de alta energía y sistemas de rotor-estator para la preparación de las nanoemulsiones. Al aumentar la intensidad de mezclado en estos dispositivos se puede reducir significativamente el tamaño de las gotitas de la fase interna, pero la preparación de emulsiones con el tamaño medio de gotita de menos de  $200 \pm 300$  nm es bastante difícil. El proceso puede llevarse a cabo en el régimen de lote en mezcladores convencionales. Para realizar de un modo continuo y para aumentar la

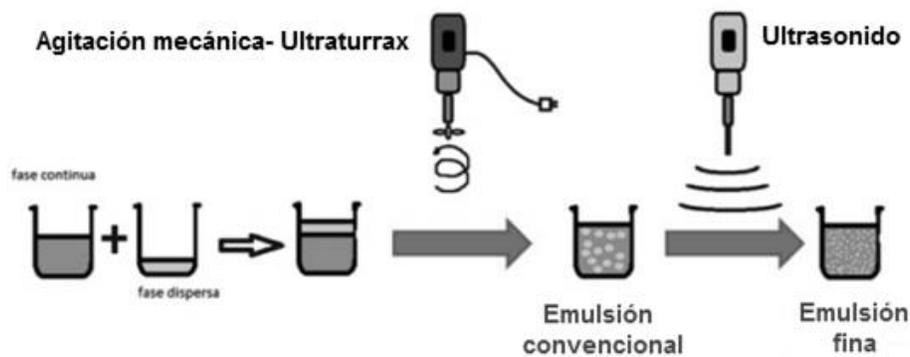
tensión de cizallamiento en la dispersión, se emplean molinos coloidales. Entre ellos, los más populares son mezcladores de flujo Silverson en el que los rotores y estatores tienen diferentes configuraciones para lograr la emulsificación más eficiente. El rotor a alta velocidad, crea una alta rarefacción dentro de la cabeza de desintegración y los componentes de la emulsión son aspirados en la unidad de rotor-estator. Bajo la acción de la fuerza centrífuga, la emulsión es expulsada a las zonas periféricas y la dispersión intensa se produce en el espacio entre el rotor y la pared interna del estator. Luego, la emulsión pasa a través del orificio exterior del estator a alta velocidad y sale del aparato.

Actualmente los equipos están diseñados de tal manera que el grado de aireación durante la emulsión sea muy bajo. A menudo, el máximo grado de dispersión posible que el sistema puede lograr no se alcanza en el régimen de un solo paso; Por lo tanto, el régimen de múltiples pasadas se utiliza convencionalmente. Cuando se utilizan medios viscosos, la eficiencia de agitación de alta cizalla disminuye considerablemente y se forman emulsiones con una alta fracción de la fase interna y con un tamaño de gota superior a 1 mm (Koroleva y Yurtov, 2012).

#### *2.2.4.1.2. Homogeneizador ultrasónico*

Estos equipos funcionan a través de ondas de ultrasonido de alta intensidad para crear fuerzas de ruptura de la intensidad necesaria para romper las fases oleosa y acuosa en gotas muy pequeñas (Figura 7). La energía que se aplica se logra a través de una sonda de ultrasonido que contiene cristales de cuarzo piezoeléctricos que se expanden y contraen en respuesta a una alternancia del voltaje eléctrico. Se coloca la punta de la sonda dentro del líquido que será homogeneizado, donde genera vibraciones mecánicas intensas que llevan a un efecto de cavitación, es decir, la formación, crecimiento y colapso de pequeñas burbujas en el líquido, las cuales generarán intensas fuerzas de ruptura en la zona alrededor de la sonda del ultrasonido, lo cual lleva a la ruptura de la gota (McClements y Rao, 2011). La eficiencia de la homogeneización también estará en función del tipo y cantidad del emulsificante utilizado, así como de la viscosidad de las fases oleosa y acuosa. Una de las preocupaciones de numerosos investigadores es que al utilizar intensidades de energía tan altas en zonas muy localizadas al homogeneizar

con el método de sonicación, conlleva a la desnaturalización de proteínas, despolimerización de polisacáridos u oxidación de lípidos (McClements y Rao, 2011).

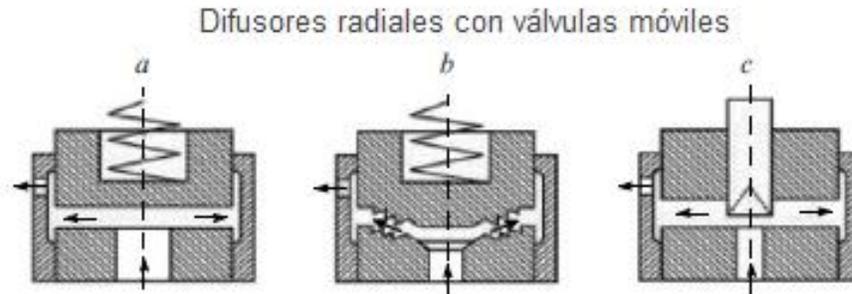


**Figura 7.** Esquema del procedimiento de preparación de emulsiones convencionales (Herrera, 2012).

#### 2.2.4.1.3. Homogeneizador de alta presión

Homogeneización de alta presión se utiliza con mayor frecuencia para la emulsificación de los sistemas de baja y media viscosidad. Los sistemas de alta presión se operan continuamente. Con respecto al tipo de direcciones de flujo en la celda de dispersión, los homogeneizadores se dividen en difusores radiales, dispersores de chorro y dispositivos de tobera. En un difusor radial convencional, el flujo de la emulsión se desvía en 90° desde la dirección de partida. Una válvula móvil hace que sea posible variar lo ancho de la ranura y por lo tanto controlar la velocidad de flujo de los líquidos emulsionados y la presión aplicada. Homogeneizadores de válvula plana son los más utilizados en la fabricación industrial de emulsiones (Figura 8a). Homogeneizadores de diferentes diseños se crean para los estudios de laboratorio, en particular, con válvulas de diversas configuraciones con plazas inclinadas para desviar el flujo a diferentes ángulos (Figura 8b), con válvulas de vanguardia para una desviación adicional de los flujos (Figura 8c), etc. (Koroleva y Yurtov, 2012). Bajo condiciones de homogeneización a alta presión, el sistema se ve afectado simultáneamente por las fuerzas de cizallamiento, la turbulencia y la cavitación. El tamaño de las gotitas en las emulsiones se determina por el régimen de flujo de fluido (que depende del diseño de la válvula y la boquilla de salida), la viscosidad del fluido y la presión producida en el homogeneizador.

Hay homogeneizadores que operan en un amplio rango de presión de 10 a 350 MPa. El ancho de la hendidura entre el émbolo y la boquilla de salida es  $10 \pm 100$  mm; Por lo tanto, la velocidad de flujo del fluido es muy alta y asciende a cientos de metros por segundos.



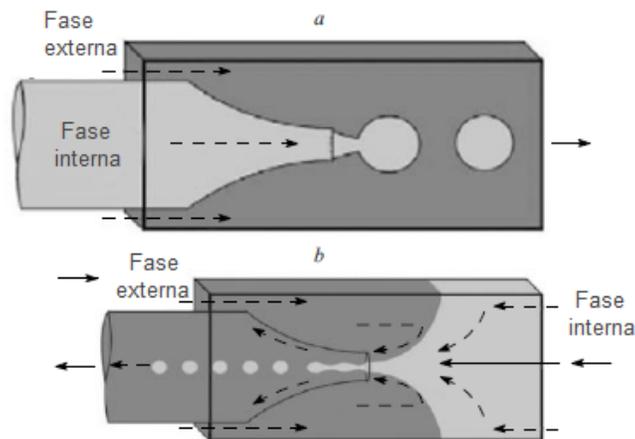
**Figura 8.** Representación esquemática de los diferentes tipos de sistemas de homogeneización a alta presión. (Koroleva y Yurtov, 2012).

El tiempo de residencia de las pequeñas gotas de emulsión en la rendija es del orden de unos pocos milisegundos. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción de surfactantes es generalmente más largo que el tiempo de formación de nuevas gotas bajo tales condiciones de dispersión; Por lo tanto, los surfactantes que se caracterizan por una muy alta velocidad de adsorción en la interfase deben ser utilizados para la preparación de las nanoemulsiones.

El tiempo total de retención de emulsiones en la zona de dispersión es corto y las gotitas formadas rápidamente salen de la zona de flujo turbulento y entran en la zona de flujo laminar, donde las gotitas insuficientemente estabilizadas coalescen. La coalescencia de las gotas en homogeneizadores de alta presión se puede hacer considerablemente más lento usando surfactantes con alta tasa de adsorción, pero no se puede detener. Es por eso que homogeneizadores de alta presión operan en el régimen de multipasos (Koroleva y Yurtov, 2012).

#### 2.2.4.1.4. Microfluidizadores

Éste tipo de equipos son similares en diseño a los homogeneizadores de alta presión, en cuanto a que involucran el uso de presiones elevadas para forzar a una emulsión premezclada a través de un orificio angosto para facilitar la ruptura de las gotas; sin embargo, el diseño de los canales a través de los cuales fluye la emulsión, es diferente (McClements y Rao, 2011). Estos dispositivos hacen posible miniaturizar los procesos químicos y bioquímicos mediante el transporte de microcantidades de un líquido en forma de gotas y burbujas a través de un sistema de microcanales a un lugar especificado y para llevar a cabo, por ejemplo, un análisis rápido del contenido de gota. En los microfluidizadores, la emulsificación ocurre a través de la colisión de las corrientes de flujo de dos fluidos inmiscibles que se mueven en microcanales bajo alta presión. La estabilidad del régimen de emulsificación depende de la humectación de las paredes del canal por los componentes de la emulsión. Por lo general, emulsiones W/O y O/W se producen en los dispositivos con superficies hidrófobas e hidrófilas, respectivamente. El ángulo de humectación puede ser controlada por la elección del material de microcanal o el uso de diversos modificadores de superficie incluyendo tensoactivos. La dispersión en estos homogeneizadores se produce bajo la acción de deformación por cizallamiento, el estrés de impacto y cavitación. Hay tres opciones básicas para la disposición de corrientes de flujo en microfluidizadores, es decir, co-direccional, en direcciones opuestas y su intersección en forma de T. La corriente de flujo de movimiento co-direccional se implementa en los dispositivos con el disposición coaxial de un capilar y un tubo (Figura 9a). Esta geometría de flujo de salida se denomina co-flujo. Si la velocidad de flujo de salida del fluido es baja, se forman prácticamente gotitas monodispersas individuales. Con el aumento de la velocidad de flujo de salida, se forma un chorro a la salida capilar; en este caso, la distribución de tamaño de las gotitas es más amplio. El movimiento de flujo de secuencia en direcciones opuestas se realiza en los dispositivos llamados "flujo de enfoque". En este caso, dos líquidos son alimentados desde diferentes lados, la fase externa capta la fase interna y entra en un capilar estrecho (Figura 9b). Gotas más pequeñas se forman con esta geometría (Koroleva y Yurtov, 2012).



**Figura 9.** Representación esquemática de microfluidizadores con corrientes de flujo co-direccionales (a) y dirigidas en sentidos opuestos (b). (Koroleva y Yurtov, 2012).

#### **2.2.4.2. Métodos de baja energía**

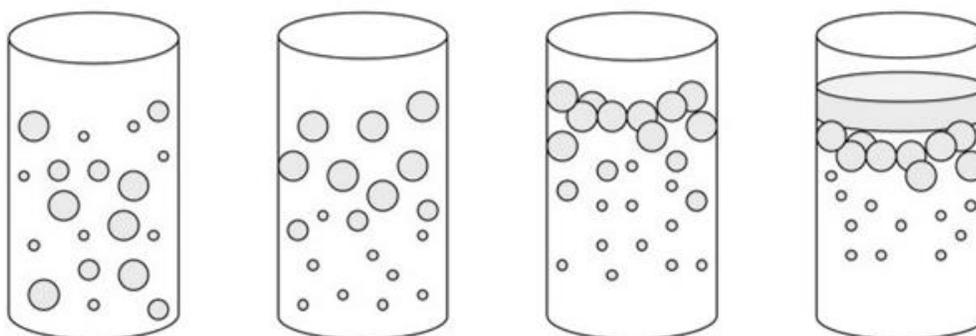
La formación de emulsiones utilizando métodos de baja energía se basa en la formación espontánea de gotitas de aceite en mezclas de emulsionantes aceite-agua ya sea cuando su composición o su entorno se modifica. Un número de métodos para la preparación de nanoemulsiones están basados en el enfoque de baja energía, incluyendo emulsificación espontánea y métodos de inversión de fase (McClements y Rao, 2011). Los métodos de baja energía suelen ser más eficaces en la producción de pequeños tamaños de gota que los métodos de alta energía, pero son a menudo más limitados en los tipos de aceites y emulsionantes que pueden ser utilizados. Por ejemplo, actualmente no es posible utilizar las proteínas o polisacáridos como emulsionantes en la mayor parte de los métodos de baja energía utilizados para formar nanoemulsiones, en lugar de ello, a menudo es necesario utilizar concentraciones relativamente altas de surfactantes sintéticos para formar nanoemulsiones mediante estas técnicas, lo cual puede limitar su uso para muchas aplicaciones alimentarias.

#### **2.2.5 Estabilidad de las nanoemulsiones**

La estabilidad es un parámetro muy importante para saber la aplicabilidad de una emulsión para producir sistemas más complejos (Márquez *et al.*, 2007). Al igual que las emulsiones convencionales, las nanoemulsiones son sistemas meta estables que tienden a la degradación con el tiempo a través de una variedad de diferentes mecanismos fisicoquímicos.

### 2.2.5.1. Separación gravitacional

Esta separación es una de las formas más comunes de inestabilidad de las emulsiones convencionales y puede adoptar la forma de formación de crema o sedimentación, dependiendo de las densidades relativas de las fases. El cremado es el movimiento hacia arriba de gotas cuando tienen una densidad menor que el líquido circundante, mientras que la sedimentación es el movimiento de gotitas hacia abajo, cuando tienen una densidad mayor que el líquido circundante.



**Figura 10.** Las emulsiones ofrecen diferente estabilidad y sus aplicaciones exigen diferentes niveles de estabilidad de la emulsión. De izquierda a derecha: una emulsión estable, la emulsión ha comenzado a separarse, aparece el cremado en la emulsión (capa blanca de aceite notable en la parte superior de la fase acuosa). Fuente: AOCS Magazine.

Los aceites comestibles líquidos (como triglicéridos o aceites saborizantes) normalmente tienen una menor densidad que el agua líquida y la formación del cremado es más evidente en emulsiones convencionales aceite en agua, mientras que la sedimentación es más frecuente en las emulsiones de agua-en-aceite. Sin embargo, si una emulsión de aceite en agua contiene lípidos cristalinos, entonces puede ser propenso a la sedimentación debido a que la densidad de los lípidos generalmente aumenta cuando se cristalizan. Nanoemulsiones aceite en agua también puede tener tendencia a la sedimentación si contienen pequeñas gotas de aceite cubiertas por una capa relativamente gruesa y densa (McClements y Rao, 2011). La velocidad de una partícula que se mueve hacia arriba en una emulsión o nanoemulsión debido a la separación gravitacional está dada por la Ecuación 5:

$$U = -\frac{2gr^2_{particula}(\rho_{particula} - \rho_0)}{9\eta_0} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde  $U$  es la velocidad de cremado,  $r_{particula}$  es el radio de la partícula,  $\rho_{particula}$  es la densidad de la partícula,  $\rho_0$  es la densidad de la fase continua,  $\eta_0$  es la viscosidad de la fase continua y  $g$  es la aceleración debido a la gravedad.

### 2.2.5.2. Agregación de gotas

Típicamente las nanoemulsiones tienen una estabilidad mucho mejor a la agregación de partículas (floculación y coalescencia) que las emulsiones convencionales, debido a la influencia de su pequeño tamaño de partícula en las interacciones coloidales (Tadros *et al.*, 2004). La naturaleza de las interacciones coloidales que operan en un sistema de nanoemulsión depende del conjunto de las propiedades físico químicas de las diferentes fases (por ejemplo, índice de refracción y constante dieléctrica), características del núcleo de la partícula (como el radio), características de la capa (grosor, carga, reología e hidrofobicidad), y las propiedades del fluido intermedio (pH, fuerza iónica, presión osmótica y temperatura). En una primera aproximación las interacciones coloidales globales entre un par de gotas en una emulsión o nanoemulsión pueden ser descritos por la suma de las interacciones de van der Waals ( $w_{VDV}$ ), electrostáticas ( $w_E$ ), estéricas ( $w_E$ ), e hidrófobas ( $w_S$ ) (Ecuación 6) (McClements, 2005):

$$w(h) = w_{VDV}(h) + w_E(h) + w_E(h) + w_S(h) \quad \text{(Ecuación 6)}$$

### 2.2.5.3. Maduración de Ostwald

La maduración de Ostwald es el proceso mediante el cual el tamaño medio de las gotas en una emulsión o nanoemulsión aumenta con el tiempo debido a la difusión de moléculas de aceite, desde pequeñas a grandes gotas de líquido a través del fluido de intervención. La fuerza impulsora de este efecto es el hecho de que la solubilidad en agua de un aceite contenido dentro de una gota esférica aumenta conforme el tamaño de las gotas disminuye, lo que significa que hay una mayor concentración de moléculas de

aceite solubilizados en la fase acuosa rodeando a una pequeña gota que a una más grande (McClements, 2005). Por lo tanto, las moléculas de aceite solubilizadas tienden a moverse desde alrededor de las gotitas más pequeñas hacia alrededor de las gotitas más grandes, debido a este gradiente de concentración.

Esto conduce a un aumento de tamaño de las gotas en el tiempo, que puede ser descrita por la ecuación 7 de estado estacionario una vez que se ha logrado (Kabanov *et al.*, 1992):

$$d(t)^3 - d(0)^3 = \omega t = \frac{32}{9} \alpha S_{\infty} D t \quad (\text{Ecuación 7})$$

Aquí,  $d(t)$  es el número medio diámetro de las gotas en el tiempo  $t$ ,  $d_0$  es el diámetro medio inicial de la gota,  $\omega$  es la velocidad de maduración de Ostwald,  $\alpha = 2 \gamma V_m/RT$ ,  $S_{\infty}$  es la solubilidad en agua de la fase oleosa en la fase acuosa,  $D$  es el coeficiente de difusión de traslación de las moléculas de aceite a través de la fase acuosa,  $V_m$  es el volumen molar del aceite,  $\gamma$  es la tensión interfacial aceite-agua,  $R$  es la constante de los gases, y  $T$  es la temperatura absoluta (McClements, 2005).

#### **2.2.5.4. Estabilidad química**

El pequeño tamaño de las gotas de lípidos en las nanoemulsiones O/W también puede afectar a la velocidad de degradación química de los componentes encapsulados, por ejemplo, debido a la oxidación o la hidrólisis. En primer lugar, el área de la superficie aceite-agua aumenta conforme el tamaño de las gotas disminuye ( $A \propto 1/r$ ), lo que significa que una mayor cantidad de la fase lipídica será expuesta a la fase acuosa circundante. Si la degradación química se produce principalmente en la interfase aceite-agua, entonces reducir el tamaño de las gotas lipídicas puede aumentar la velocidad de la reacción. En segundo lugar, si la degradación química se acelera por la presencia de luz UV o visible, entonces una nanoemulsión transparente que contiene gotas pequeñas puede ser más susceptibles a la degradación que una emulsión convencional opaca, porque la luz puede penetrar más fácilmente. Sin embargo, también hay que tener en

cuenta las diferencias en las propiedades de la capa de la interfase que rodea las gotitas de lípidos en nanoemulsiones y emulsiones (McClements *et al.*, 2012).

### **2.3. Digestión *in vitro* de emulsiones**

Los alimentos cuando son ingeridos pasan a través de la boca hasta el estómago, luego al intestino delgado y grueso (Sharkar *et al.*, 2010a). En la boca el alimento es expuesto a un gran número de procesos y cambios físico químicos, tales como la mezcla de saliva y aire, calor y frío de la temperatura corporal, cambios en la fuerza iónica y pH, deformación durante la masticación y la exposición a enzimas salivales y biopolímeros como la mucina (Sharkar *et al.*, 2010b). Los alimentos en la boca son desbaratados en pedazos más pequeños por la masticación convirtiéndolo en “bolo”. Cuando el bolo es tragado, pasa rápidamente a través de la boca hasta el esófago y luego en el estómago sufre drásticos cambios de pH y agitación mecánica debido a los movimientos peristálticos del estómago. Los alimentos parcialmente digeridos se encuentran dentro de una amplia gama de condiciones físico químicas cuando pasan a través del estómago hacia el intestino delgado, incluyendo la mezcla con diferentes tipos de enzimas (tripsina, quimo tripsina y lipasas), co enzimas (co-lipasas) y agentes activos de superficie (sales biliares y fosfolípidos) (Singh *et al.*, 2009). Los cambios fisicoquímicos que ocurren en las emulsiones durante su paso a través del tracto gastrointestinal (GI) no son entendidas claramente debido a la complejidad de los sistemas alimenticios y gastrointestinales (GI). En recientes años, un gran número de estudios han estado conduciendo a entender el comportamiento de la digestión de diferentes tipos de emulsiones utilizando modelos *in vitro* simulando las condiciones fisiológicas del tracto GI, como fluidos gástricos simulados (FGS) y fluidos intestinales simulados (FIS) conteniendo enzimas y sales biliares. Sin embargo, hay que señalar que las condiciones *in vivo* no pueden ser completamente simuladas bajo condiciones *in vitro*, por lo tanto, los resultados de estudios *in vitro* puede no correlacionarse con la digestión *in vivo* de las emulsiones. Varias ventajas de estudios *in vitro* sobre estudios *in vivo* son que se invierte menos tiempo, es más barato, más reproducible y fácil para realizar y que permite métodos simples para comparar el comportamiento de la digestión de emulsiones con diferente composición y estructura estabilizadas por diferentes tipos de emulsificantes. Sin

embargo, en el diseño de modelos de digestión *in vitro*, hay un número de factores que deberían ser considerados, incluyendo las características de la muestra, actividad enzimática, composición iónica, estrés mecánico aplicado y tiempos de digestión, todos los cuales tienen influencias significativas en la digestión *in vivo* de emulsiones. Las características del tipo de emulsión, composición, tipo de enzimas y la concentración son de la misma manera factor importante para el efecto de la digestión de emulsiones durante la digestión *in vitro* (Hurt *et al.*, 2011).

### **2.3.1. Fase boca**

Las emulsiones alimentarias están expuestas a una gama de pasos de procesamiento durante el consumo. Se mezclan con saliva, se calientan o enfrían a la temperatura corporal, se introduce aire, las emulsiones entran en contacto con las superficies orales y están expuestas a perfiles de flujo de saliva complicados. Muchos factores, tales como la velocidad de flujo, hora del día, tipo y tamaño de la glándula salival, duración y tipo de estímulo, la dieta, los fármacos, la edad, el sexo y el tipo de sangre afectan a la cantidad y la composición de la saliva secretada humana. Los estímulos para aumentar la salivación incluyen la presencia de alimentos o sustancias irritantes en la boca, y los pensamientos de o el olor de la comida. La secreción de la saliva varía de 0.3 a 7 mL por minuto (McClements y Li, 2010) con aproximadamente 0.5 a 1.5 L de saliva secretada por día. La saliva tiene un pH de 6-7 y se compone de proteínas, sustancias de bajo peso molecular (principalmente electrolitos) y más de 99% de agua. Las proteínas en la saliva (1-2 mg/mL) incluyen enzimas, inmunoglobulinas, proteínas antibacterianas, proteínas ricas en prolina (hasta 45% en peso de proteína total) y mucinas.

#### **2.3.1.1. Mucina**

Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas con varias funciones en la saliva. Por ejemplo, son responsables del comportamiento visco elástico típico de la saliva necesaria para su retención en la boca. La concentración de la mucina de alto peso molecular (MUC5B) en la saliva total es de aproximadamente 200 µg/mL (que van desde 30 a más de 500 µg/mL, dependiendo del estímulo), es decir, 10-25% en peso de

proteínas totales salivales. El alto grado de glicosilación mantiene la cadena de proteína en forma extendida, incluso bajo condiciones desnaturalizantes (bajo y alto pH y presencia de sales). Las cadenas de carbohidratos también protegen la cadena polipeptídica de la degradación enzimática y desempeñan un papel crucial en la retención de agua (Vingerhoeds *et al.*, 2005).

### **2.3.2. Fase gástrica**

#### **2.3.2.1. Fuerza iónica y pH ácido**

Generalmente el pH del estómago humano en ayuno se encuentra en un rango de 1-3 (Sarkar *et al.*, 2009b; Hur *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; McClements *et al.*, 2009) y la fuerza iónica está alrededor de 100 nM (McClements *et al.*, 2009). Sin embargo, el pH varía dependiendo de la cantidad y naturaleza del alimento ingerido y además difiere entre los individuos. Generalmente hay un incremento significativo en el pH del contenido del estómago después de consumir un alimento, seguido por un decremento del valor alto de acidez del estómago en un estado de ayuno, lo cual es debido a la secreción simulada del ácido gástrico y el tiempo que toma en regresar la acidez del pH dependerá del pH inicial, composición y cantidad de comida ingerida. Las condiciones ácidas del estómago toma una parte en algunos aspectos, como es la actividad enzimática, hidrólisis de los componentes de la comida y la destrucción de las bacterias (Kalantzi *et al.*, 2006; McClements *et al.*, 2009). Grandes fuerzas iónicas podrían contribuir a cambios electrostáticos en las emulsiones estabilizadas por proteínas principalmente para la agregación de gotas en las emulsiones inducidas por sales. Sin embargo, los cambios drásticos en el pH y la fuerza iónica en el estómago podrían resultar en cambios en las gotas de la emulsión por floculación o cambios en las películas interfaciales.

### **2.3.3. Fase intestinal**

Los alimentos provenientes del estómago logran digerirse parcialmente y en el intestino delgado son sometidos a la acción de los jugos pancreáticos, jugos intestinales y biliares. La propulsión y digestión mecánica de los alimentos son afectadas por los movimientos del intestino delgado. La digestión es completada en el intestino delgado y

al final los productos de la degradación son absorbidos a través de las vellosidades intestinales (Muthayya, 2002)

#### 2.3.3.1. Fuerza iónica y pH

El pH incrementa por la alta acidez (pH 1 a 3) en el estómago para un neutral alrededor (6-7.5) en el duodeno cuando el alimento es ingerido pasando a través del estómago hacia el interior del intestino, donde la digestión de los alimentos ocurre por enzimas pancreáticas (McClements *et al.*, 2009; Hur *et al.*, 2009; Golding y Wooster; 2010). La fuerza iónica es muy importante en el intestino delgado desde sus influencias en las interacciones electrostáticas en el sistema. Algunos tipos de iones, como son cationes divalentes, pueden promover la precipitación de las sales biliares y cadenas largas saturadas de ácidos grasos en el intestino delgado, sin embargo, decrece su digestibilidad (McClements *et al.*, 2009).

#### 2.3.3.2. Sales biliares

Las sales biliares presentes en el intestino delgado son sintetizadas del colesterol en el hígado (Beysseriat *et al.*, 2006; McClements *et al.*, 2009). El principal componente de las sales biliares es el ácido cólico (insoluble en agua), el cual es conjugado con amino ácidos (taurina o glicina), por lo tanto confieren solubilidad al agua (McClements *et al.*, 2009). Las sales biliares tienen una estructura molecular con un lado hidrofóbico y uno hidrofílico. Son biosurfactantes naturales en el lumen intestinal y son muy importantes en la digestión y adsorción de lípidos (Golding y Wooster, 2010). El lado hidrofóbico puede interactuar con sustancias que tiene características no polares mientras que el lado hidrofílico puede interactuar con sustancias que tienen características polares. Las sales biliares pueden absorberse directamente a cualquier interfaz aceite-agua recién creada o pueden desplazar los materiales tensoactivos presentes en la interfase aceite-agua, no alterando la composición y propiedades interfaciales (Hur *et al.*, 2009). En el caso de las emulsiones, las sales biliares desplazan otros surfactantes de la superficie de las gotas de la emulsión y proporcionan acceso a la lipasa pancreática hacia el núcleo del lípido emulsificado. Sin embargo, promueven la unión de la lipasa a la capa interfacial y acelerando la digestión lipídica. En este aspecto, las sales biliares juegan un papel muy importante en algunas diferentes actividades, incluyendo facilitar la deformación de gotas

lipídicas o estabilización de gotas contra la agregación y formación de micelas que solubilizan y transportan materiales hidrofóbicos (McClements *et al.*, 2009).

#### 2.3.3.3. Lipasa

Las lipasas están presentes en el estómago (lipasa gástrica) y páncreas (lipasa pancreática), donde absorben a las superficies de lípidos emulsionados y convierten a los triacilgliceroles y diacilgliceroles en monoacilgliceroles y ácidos grasos libres. La lipasa pancreática se activa cuando llega a la interfase aceite-agua donde se hidrolizan los ácidos grasos de los triglicéridos en la posición sn-1 y sn-3 resultando en la producción de monoglicéridos sn-2 y ácidos grasos libres (Hur *et al.*, 2009). Esto significa que antes de que la lipasa pancreática pueda hidrolizar las gotas de lípidos emulsificados, es necesario para que estos sean absorbidos en la superficie de las gotas de la emulsión. Estos productos de la digestión de los lípidos son solubilizados en micelas mixtas y vesículas que los transportan a las células epiteliales a través de la capa mucosa. La actividad de la lipasa pancreática depende de la presencia de co-lipasa, sales biliares, calcio y la calidad de la interface incluyendo la composición química y estructura física de la capa interfacial (McClements *et al.*, 2009). La presencia de sales biliares promueve el desplazamiento de materiales activos a otra superficie (por ejemplo, proteínas) en la interfaz, facilitando el acceso para la lipasa pancreática al núcleo lipídico emulsionado. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que puede inhibir la actividad de la lipasa pancreática sobre la base de la concentración de sales biliares. La actividad de la lipasa es probable que sea promovido a concentraciones relativamente bajas de sales biliares, que atribuyen principalmente a su capacidad para solubilizar productos de la digestión de lípidos y eliminarlos de la interfase aceite-agua, tales como monoglicéridos sn-2 y ácidos grasos libres. Por otro lado, la capacidad de la lipasa para digerir lípidos emulsionados puede ser inhibida en concentración relativamente alta de sales biliares porque las sales biliares compiten por la interfaz aceite-agua con la lipasa, evitando así que entren en estrecha proximidad con el sustrato lipídico (McClements *et al.*, 2009).

### 3. ANTECEDENTES

Las nanoemulsiones fabricadas a partir de ingredientes de grado alimenticio se están utilizando cada vez más en la industria de alimentos para encapsular, proteger y suministrar componentes funcionales lipofílicos, tales como lípidos biológicamente activos (McClements y Rao, 2011). La curcumina como un componente lipófilo modelo podría ser incorporado en los productos alimenticios funcionales por sus actividades biológicas potencialmente beneficiosas. Sin embargo, tiene una solubilidad en agua extremadamente baja (11 ng/mL), que hace que sea difícil de incorporar en muchos productos alimenticios, así como una baja biodisponibilidad, lo que implica que sus atributos benéficos pueden no aprovecharse (Maiti *et al.*, 2007). Un gran número de estudios han demostrado que la bioaccesibilidad de componentes lipofílicos funcionales dentro de cápsulas lipídicas incrementa cuando el tamaño de gota disminuye (Acosta, 2009). En este sentido Sari *et al.* (2014) intentaron superar esos problemas de inestabilidad durante el procesamiento y la biodisponibilidad de la curcumina mediante la tecnología de la nanoencapsulación y el efecto fue evaluado por el estudio de digestión simulada. La curcumina fue encapsulada en pequeñas gotas de aceite de triglicéridos de cadena media en nanoemulsiones preparadas por ultrasonido utilizando suero concentrado de proteína y Tween 80 como emulsionantes con una eficacia de encapsulación de  $90.56 \pm 0.47\%$ , partículas de diámetro promedio de  $141.6 \pm 15.4$  nm y potencial zeta de  $6.9 \pm 0.2$  mV.

McClements *et al.* (2012) investigaron el impacto de los diferentes lípidos en la encapsulación y bioaccesibilidad de la curcumina. Las nanoemulsiones de aceite en agua ( $r < 100$  nm), o emulsiones convencionales ( $r > 100$  nm), se prepararon con diferentes lípidos: triglicéridos de cadena larga, media y corta (TCL, TCM y TCC, respectivamente). Un modelo *in vitro* simulando las condiciones de digestión intestinal midió la velocidad y grado de digestión de la fase lipídica. Encontraron que la velocidad de digestión inicial disminuyó en el orden TCC>TCM>TCL, mientras que el grado de digestión final disminuyó en el orden TCM>TCC>TCL. La bioaccesibilidad de curcumina disminuye en el orden TCC>TCM>>TCL.

Anuchapreeda *et al.* (2011) tuvieron como objetivo desarrollar una nueva formulación de una nanoemulsión de curcumina con el menor tamaño de partícula, la mayor concentración de curcumina y una estabilidad físico química para la quimioterapia del cáncer. Las nanoemulsiones lipídicas de curcumina se prepararon por un método de hidratación de película delgada seguido por sonicación. En este trabajo utilizaron aceite de soya, L- $\alpha$ -fosfatidilcolina hidrogenada de yema de huevo y co-tensoactivos para formular las emulsiones. Las nanoemulsiones resultantes mostraron un diámetro medio de partículas de 47-55 nm, incorporando 23-28 mg de curcumina por 30 mL y el tamaño de partícula se mantuvo estable durante 60 días a una temperatura de 4 °C.

Por su parte Wang *et al.* (2007) caracterizaron emulsiones O/W utilizando triglicéridos de cadena media (TCM) como fase oleosa y Tween 20 como surfactante. Las formulaciones fueron homogenizadas con alta velocidad y la reducción de tamaño de gota fue por la utilización de alta presión. Como resultados obtuvieron tamaños promedio de gota que fueron desde 618.6 nm y 79.5 nm.

Si bien se han realizado estudios sobre la estabilidad fisicoquímica de las nanoemulsiones de curcumina; Con base en la información consultada hasta el momento, no se han reportado trabajos donde el objetivo fuera encapsular la mayor cantidad de este compuesto. Es por ello que este trabajo tuvo como principal objetivo elaborar nanoemulsiones con la mayor cantidad de curcumina y evaluar su bioaccesibilidad mediante un sistema gastrointestinal *in vitro*.

#### 4. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de contar con alimentos que sean más benéficos para la salud, se ve influenciada por los cambios socioeconómicos y demográficos que se están dando a nivel mundial. El aumento de la esperanza de vida, tiene como consecuencia el incremento de la edad promedio de la población, así como el aumento de los costos de servicios públicos de salud han potenciado la búsqueda de alternativas para establecer una base científica que apoye los fundamentos benéficos que se asocian a los componentes funcionales o los alimentos que los contienen. En este sentido los componentes con actividad biológica podrían contribuir a reducir las enfermedades crónicas-degenerativas (Campos *et al.*, 2013). Numerosos estudios epidemiológicos han asociado diferentes tipos de dieta con la prevención del desarrollo de enfermedades, lo que se ha atribuido a la presencia de determinados compuestos bioactivos. Se ha observado que el consumo de alimentos con alto contenido de estos componentes tiene efectos benéficos (anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes) cuando se ingieren durante un largo periodo de tiempo, en el tratamiento y en la prevención de enfermedades. Estudiar los efectos de los compuestos bioactivos aislados es de gran utilidad para determinar los mecanismos de acción, sin embargo, es bien conocido que la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos es diferente cuando se ingieren puros o cuando se consumen dentro de una matriz; en este caso se debe tener en cuenta que en un mismo alimento varios compuestos bioactivos pueden interactuar o ejercer un efecto sinérgico (Ruiz, 2010). Para incorporar estos componentes funcionales exitosamente tienen que ser diseñadas matrices de encapsulación apropiadas que proporcionen máxima estabilidad física, protección de ingredientes contra la degradación química y que permitan un control preciso de liberación de los componentes encapsulados durante la masticación y digestión para maximizar la absorción (Weiss *et al.*, 2008). Dentro de los componentes bioactivos más estudiados en los últimos años se encuentra la curcumina, un componente fenólico de color amarillo extraído de los rizomas de la cúrcuma y se ha utilizado para el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como anemia, infecciones bacterianas, resfriados, tos, infecciones virales, heridas, entre otros (Syed *et al.*, 2015). Los beneficios potenciales para la salud de la curcumina se han atribuido a una gama de efectos biológicos, incluyendo su actividad antibacteriana, antifúngica,

antiinflamatoria, antioxidante, antiviral y anticancerígena. Sin embargo, al ser un componente lipofílico, tiene una bioaccesibilidad baja, por lo que no puede llegar a sitios de acción específico. Es por ello que en los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos para el diseño y desarrollo de diferentes sistemas de liberación de biomoléculas funcionales, entre los que se encuentran las nanoemulsiones, ya que existe un creciente interés de las industrias alimentaria y farmacéutica en el uso de éstas (Kesisoglou *et al.*, 2007; McClements *et al.*, 2007; Sanguansri y Augustin, 2006), debido a que han mostrado gran potencial para la liberación de medicamentos o compuestos bioactivos poco solubles en agua, gracias a su facilidad de preparación, incremento en la bioaccesibilidad y potencial de liberación prolongada de fármacos entre otras cosas. Por lo que el principal objetivo de la investigación fue elaborar nanoemulsiones con estabilidad fisicoquímica suficientemente larga para aplicaciones comerciales e incrementar su bioaccesibilidad.

## **5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **5.1 Hipótesis**

La estabilidad físicoquímica durante el almacenamiento y la bioaccesibilidad de la curcumina se verán incrementadas a través de su incorporación en nanoemulsiones aceite en agua (O/W).

### **5.2 Objetivo general**

Elaborar y caracterizar nanoemulsiones aceite en agua (O/W) de curcumina, procesadas con ultrasonido para incrementar su estabilidad físicoquímica durante su almacenamiento y su bioaccesibilidad.

### **5.3 Objetivos específicos**

- Evaluar la solubilidad de la curcumina en aceite de canola y soya.
- Determinar la relación óptima surfactante/curcumina y fase oleosa/fase acuosa, para producir nanoemulsiones (O/W) mediante ultrasonido.
- Seleccionar y evaluar sus propiedades de las nanoemulsiones con mejor tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial  $\zeta$ .
- Evaluar tamaño de partícula, PDI y cantidad de curcumina a las nanoemulsiones bajo condiciones gastrointestinales *in vitro* para determinar su bioaccesibilidad.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

La curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadiene-3,5-diona) marca Golden Bell reactivos se utilizó como componente lipófilo nutracéutico la cual se obtuvo de la empresa Materiales y Abastos Especializados, S.A. de C.V. ubicada en Coatzacoalcos, México. El reactivo presentó un ensayo de pureza de 98.24%. El aceite de canola y soya se adquirieron en mercados locales.

Monolaurato de sorbitán (Span 20, HLB=8.6); monopalmitato de sorbitán polioxietileno (Tween 40, HLB=15.6) y Monolaurato poli etilenglicol sorbitán (Tween 20, HLB 16.7), se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La elección de los surfactantes está basado en el balance hidrofílico-lipofílico (HLB), debido a que los valores de estos surfactantes se encuentran en el rango de 8-16, que los hace adecuados para emulsiones OW, podrán hacerse combinaciones para encontrar el HLB correcto para la obtención de las nanoemulsiones (Kong *et al.*, 2001). Las enzimas para el estudio gastrointestinal (mucina, lipasa gástrica) y las sales biliares fueron obtenidas de Sigma-Aldrich.

### 6.2. Métodos

#### 6.2.1. Solubilidad de la curcumina

La solubilidad máxima de la curcumina en cada fase lipídica (soya y canola) se determinó utilizando un método espectrofotométrico de acuerdo a la técnica de (McClements *et al.*, 2012; Anuchapreeda *et al.*, 2011) con algunas modificaciones. Para la determinación de la solubilidad de la curcumina en los aceites, se añadió 1, 1.5, 2, 3, 6, 9, 12, 15 y 30 mg de curcumina a un tubo eppendorf que contenía 1 mL de aceite previamente calentado a 60 °C. Las soluciones de la mezcla se sometieron a vórtice por 3 min, se dejaron enfriar y se mantuvieron a 24 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugaron a 1750 rpm durante 15 min a 24 °C. La curcumina no disuelta, que se observó en la parte inferior del tubo eppendorf, se eliminó por centrifugación y se colectó el sobrenadante. 1 µL del sobrenadante fue diluido con 3mL de aceite en una celda y se leyó en el espectrofotómetro a 424 nm. Se empleó una celda cero con aceite puro (como control) de referencia en el espectrofotómetro. Una curva de calibración (Apéndice E) se

preparó para cada fase de aceite mediante la medición de la absorbancia como función de las concentraciones conocidas de curcumina.

#### **6.2.2. Preparación de la fase oleosa**

Después de evaluar en que aceite es más soluble la curcumina, éste se calentó a 60 °C y se adicionó 1.5 mg de curcumina por mL de aceite agitando magnéticamente por 10 min y posteriormente con un homogeneizador (Wiggen Hauser, Modelo D-500) por 20 min de acuerdo al método realizado por Ahmed *et al.* (2012). Posteriormente 30 mL de esta mezcla se llevó a baño ultrasónico en un vaso de precipitados durante 20 min. Se dejó reposar la fase oleosa durante 24 h en una estufa a 25 °C y fue centrifugada a 1750 rpm durante 15 min, se recolectó el sobrenadante y se mantuvo en refrigeración a 4 °C durante su uso.

#### **6.2.4. Preparación de los valores HLB**

Se utilizó Span 20 (HLB 8.6), Tween 20 (HLB 15.6) y Tween 40 (HLB 16.7) para formular los valores de HLB 10, 12, 14 y 16 por el método propuesto por Griffin en 1954 con la siguiente ecuación:

$$HLB_{req} = X_1HLB_1 + X_2HLB_2 \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Donde  $X_1$  y  $X_2$  son las fracciones en peso de sus HLB correspondientes.

Los surfactantes se precalentaron a 60 °C, se pesaron, según lo obtenido en la ecuación anterior, y se mantuvieron en agitación magnética durante 20 min a 60 °C.

#### **6.2.5. Preparación de las emulsiones**

Las emulsiones se prepararon por homogenización de 10% (p/p) de la fase oleosa, 10, 15, 20 y 30 % de surfactante para las relaciones 1:1, 1:1.5, 1:2 y 1:3 (p:p) fase oleosa/surfactante (O/S) y el resto de agua destilada previamente calentada a 80 °C (Wiggen Hauser, Modelo D-500) a 20 000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente (Ahmed *et al.*, 2012). Para la elaboración de las nanoemulsiones, 30 mL de la emulsión se colocaron en un vaso de precipitados, se colocó la sonda ultrasónica a una distancia de 2 cm del fondo del vaso, y se procesaron a 30% de amplitud (Cole Parmer, 20 KHz).

Para asegurar una dispersión homogénea de la energía, primero se colocó la sonda en la parte superior y posteriormente en la parte inferior de la emulsión. Durante el procesamiento en el ultrasonido, la emulsión se sumergió en un baño con hielo para reducir el calentamiento (Galindo–Álvarez *et al.*, 2011).

#### **6.2.6. Barridos de HLB, tiempo y proporciones**

Se realizaron barridos de valores HLB (8.6, 10.0, 12.0, 14.0, 15.6, 16.0 y 16.7), relaciones de fase O/S (1:1, 1:1.5, 1:2 y 1:3) y tiempo de procesamiento en intervalos de 2 min (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16). A las nanoemulsiones resultantes se les midió tamaño de partícula, PDI y potencial  $\zeta$ .

#### **6.2.7. Estudios de estabilidad durante el almacenamiento**

Las nanoemulsiones fueron almacenadas en viales de vidrio ámbar sellados a una temperatura de 4 °C durante 2 meses. Se estudiaron sus estabilidades químicas y físicas: retención de curcumina, tamaño de partícula, PDI, potencial  $\zeta$ , color, potencial óxido-reducción, actividad antioxidante y pH.

##### **6.2.7.1. Retención de curcumina**

Se determinó la retención de curcumina en las nanoemulsiones por la ruptura del sistema coloidal mediante la adición de una sal y aplicación de calor. Se preparó una solución saturada de NaCl y se añadió 500  $\mu$ L a 1 mL de emulsión en un tubo eppendorf, posteriormente se colocó en un baño de agua a punto de ebullición por 5 min. Se tomaron 30  $\mu$ L de la fase oleosa y se disolvieron en 2 mL de aceite. La concentración de curcumina (mg/mL de emulsión) fue determinada por la medición de la absorbancia de las muestras a 419 nm. Se elaboró una curva estándar con concentraciones conocidas de curcumina (Ahmed *et al.*, 2012).

##### **6.2.7.2. Tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI)**

El diámetro de las partículas de la nanoemulsiones (z average) y el PDI se midió mediante un método de dispersión de luz dinámica utilizando el equipo Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instrument, Reino Unido) a temperatura ambiente.

Se tomaron 10 µL de muestra y se colocaron en una celda desechable, se le adicionó 1 mL de agua Mili Q y se llevó a lectura. Los datos de tamaño de partícula se expresaron como la media de 3 mediciones independientes de las nanoemulsiones (Anuchapreeda *et al.*, 2011) reportado en nm.

### **6.2.7.3. Potencial $\zeta$**

Se tomaron 20 µL de muestra y se diluyeron con 2 mL de agua Mili Q. Posteriormente se llevó a lectura en el equipo Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instrument, Reino Unido) a temperatura ambiente. Los resultados se reportaron en mV. Las mediciones se hicieron por triplicado.

### **6.2.7.4. pH**

El pH de cada muestra fue medido con un potenciómetro a temperatura ambiente. El potenciómetro fue calibrado con soluciones buffer pH 4, 7 y 10. En un vial ámbar se colocaron 20 mL de muestra y se introdujo el electrodo para su medición. Se tomó como estable el pH cuando no hubo cambio del valor durante 1 min. El valor del pH de las nanoemulsiones fue evaluado por triplicado.

### **6.2.7.5. Determinación del color**

El color fue medido con un colorímetro Color Flex marca HunterLab. Se colocaron 25 mL de muestra a temperatura ambiente en un vaso de cristal en la parte superior del equipo. Se midieron los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (Day light). Con estos parámetros se obtuvo el valor de Cromo y ángulo Hue con las siguientes ecuaciones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

$$h = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Donde  $C^*$  es el valor de croma y  $h$  el ángulo hue.

#### **6.2.7.6. Potencial óxido-reducción (Eh)**

Las mediciones fueron realizadas con un electrodo indicador de platino conectado a un voltímetro (Manzocco *et al.*, 1998). Fue calibrado con una solución estándar redox (E= 215 mV a 25 °C). El electrodo fue sumergido dentro de un frasco conteniendo 10 mL de muestra y se eliminó el oxígeno de la misma por inyección de nitrógeno. Se tomaron lecturas cada min hasta que el potencial se mantuviera estable. Un potencial estable se definió arbitrariamente cuando el valor no cambiara en un período de 5 min. Las mediciones fueron realizadas por triplicado y los resultados se reportaron como el promedio de las mismas en mV.

#### **6.2.7.7. Índice de cremado**

Se utilizó el método de volumen relativo utilizado por Kundu *et al.* en 2015 para estimar la estabilidad de la emulsión usando el índice de cremado (IC). Las emulsiones recién preparadas se colocaron en frascos cilíndricos graduados de 15 mL, sellados con tapa y almacenados a 4 °C durante 60 días. Después del almacenamiento, las emulsiones se separaron en una película delgada en la parte superior (cremado) y una película turbia en el fondo (suero). El volumen inicial de la emulsión ( $V_0$ ), el volumen de la película del suero ( $V_s$ ) y el volumen final de la película del cremado ( $V_c$ ) fueron medidas al término del almacenamiento. El grado de cremado de las emulsiones fue estimado por el índice de cremado (IC) dado por:

$$IC(\%) = \frac{V_s}{V_0} \times 100 \quad \text{(Ecuación 11)}$$

#### **6.2.7.8. Actividad de captura del radical libre DPPH •**

El ensayo DPPH • se realizó en un lector de multiplaca Thermo Scientific Multiskan. Se utilizó el método propuesto por Tuba (2008) con modificaciones; este ensayo espectrofotométrico utiliza el radical estable, 1,1-difenil-2-picril-hidracil (DPPH•), como reactivo. Este ensayo se llevó a cabo en un lector de micro placa Multiskan marca Thermo Scientific, para economizar reactivos. Se preparó una solución 0.1 mM de DPPH en etanol. Se colocaron 20  $\mu$ L de la muestra diluida en etanol (1:10 v/v) y 180  $\mu$ L de DPPH. Esta solución fue incubada en total oscuridad por 30 min. La absorbancia fue medida a

517 nm comparada con un blanco sin la muestra. Una curva estándar fue preparada con concentraciones conocidas de Trolox.

### 6.2.8. Digestión gastrointestinal (GI) simulada

Para el ensayo *in vitro* GI se seleccionaron las nanoemulsiones que presentaron mayor estabilidad fisicoquímica durante su almacenamiento. Las nanoemulsiones se pasaron a través de un modelo GI de tres pasos simulando boca, estómago e intestino delgado, utilizado por Zou *et al.* (2015) con algunas modificaciones.

#### 6.2.8.1. Fase boca

Un fluido de saliva simulada (FSS) que contenía 3 mg/mL de mucina y diversas sales (Tabla 4) (Mao y McClements, 2012). El FSS y la nanoemulsión se precalentaron a 37 °C y posteriormente se mezclaron en una relación 1:1 (p:p). Después, dicha mezcla se ajustó a pH 6.8 y se colocó en una parrilla a 37 °C con agitación magnética a 100 rpm durante 10 min para imitar las condiciones orales.

**Tabla 4.** Composición química de la saliva artificial utilizada para simular las condiciones orales. (Mao y McClements, 2012)

Componente	Fórmula química	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
Cloruro de sodio	NaCl	1.594
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.328
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.636
Cloruro de potasio	KCl	0.202
Citrato de potasio	K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> • H <sub>2</sub> O	0.308
Sal sódica de ácido úrico	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> • Na	0.021
Urea	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0.198
Sal sódica de ácido láctico	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Na	0.146
Mucina gástrica porcina	-	30
Agua	H <sub>2</sub> O	Restante

#### 6.2.8.2. Fase estómago

El fluido gástrico simulado (FGS) se preparó colocando 2 gr de NaCl, 7 mL de HCl y 0,0032 g/mL de pepsina, posteriormente se llevó a 1 L con agua destilada, el fluido se calentó a 37 °C. La muestra “bolo” obtenida de la fase boca, se mezcló con FGS en una relación 1:1 (p:p). Después la mezcla se ajustó a pH 2.5 con HCl 1 M y se mantuvo en agitación magnética a 100 rpm a 37 °C durante 2 h para imitar las condiciones del estómago.

#### 6.2.8.3. Fase intestino delgado

El Fluido intestinal simulado (FIS) se preparó con CaCl<sub>2</sub> 0.5 M y NaCl 7.5 M relación 1:1 (v:v). El extracto de bilis se elaboró mezclando 375 mg de extracto de bilis en 1 L de PBS (pH 7). La suspensión de páncreas se preparó con 120 mg de lipasa en 1 L de PBS pH 7. De la muestra de “quimo” de la fase del estómago, se tomaron 24 mL y se diluyeron con solución buffer (PBS 10 mM, 6.5) para obtener una concentración final de aceite a 1%. A continuación, el quimo diluido se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 10 min y la solución se ajustó a pH 7. Posteriormente se le añadieron 3 mL de FIS a 60 mL de muestra digesta, seguido se le agregaron 7 mL de extracto de bilis y se mantuvo en agitación magnética a 100 rpm y pH 7. Finalmente se le adicionaron 5 mL de suspensión de páncreas. La mezcla se mantuvo a las mismas condiciones de agitación y temperatura durante 2 h.

#### 6.2.9. Determinación de la bioaccesibilidad

Después de la digestión *in vitro*, 30 mL de muestra digesta fueron pasadas por un filtro de membrana de 0.4 µm (filtrado yeyunal e ileal) (Minekus *et al.*, 2005) y se centrifugó a 18 000 rpm a 25 °C durante 30 min. El sobrenadante que se observó después de la centrifugación (fracción micelar) se recolectó. En algunas muestras una capa de aceite no digerido se observó en la parte superior y se eliminó de la fracción micelar. 5 mL de la digesta pura o fracción micelar se mezclaron con 5 mL de cloroformo, se llevaron a vortex y después se centrifugaron a 1750 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se recogió la capa inferior que contenía la curcumina solubilizada mientras que la capa superior se mezcló con 5 mL de cloroformo adicionales y se repitió

el procedimiento. Las dos capas de cloroformo fueron recolectadas, se mezclaron y luego se diluyeron hasta una concentración apropiada para ser analizada por un espectrofotómetro UV-visible a 419 nm. A continuación, la concentración de curcumina en la digesta pura y fracción micelar se calculó a partir de la absorbancia medida usando una curva estándar, teniendo en cuenta el factor de dilución. La bioaccesibilidad de la curcumina se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad} = 100 \times \frac{C_{\text{micelar}}}{C_{\text{inicial}}} \quad \text{(Ecuación 12)}$$

En donde  $C_{\text{micelar}}$  y  $C_{\text{inicial}}$  son las concentraciones de curcumina en la fracción micelar y la inicial, respectivamente.

#### **6.2.9. Análisis estadístico**

Cada una de las determinaciones fueron realizadas por triplicado calculando el valor de la media y desviación estándar. Para el análisis de datos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para cada parámetro analizado aplicando además una prueba de comparación de Tukey empleando como valor de significancia  $p \leq 0.05$ . Para las asociaciones entre los diferentes parámetros evaluados durante el estudio de almacenamiento, se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson ( $r$ ). Se empleó el software estadístico Sigma Stat versión 3.5.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 Selección del aceite**

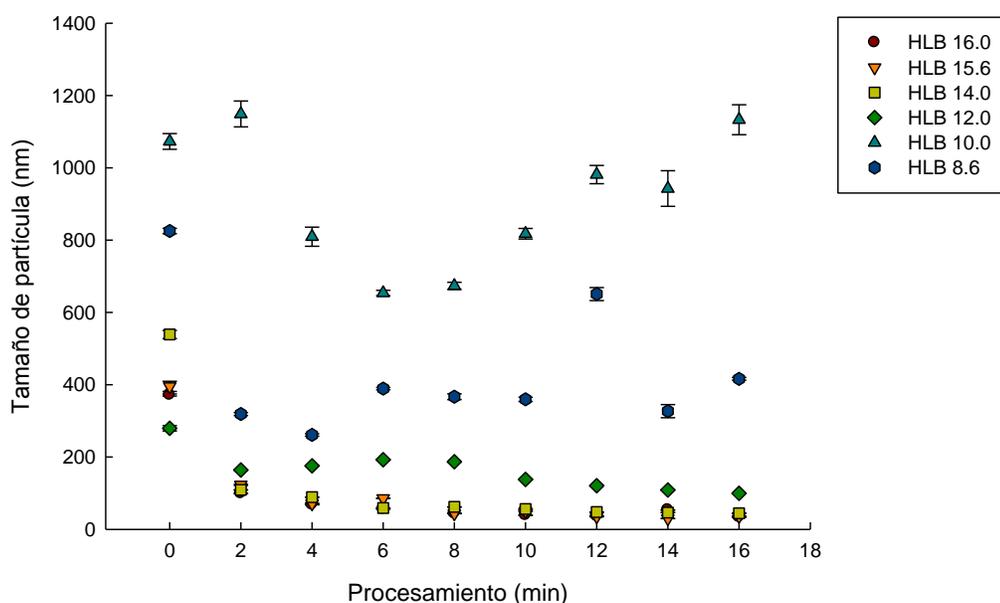
Con el propósito de obtener nanoemulsiones con la mayor cantidad de curcumina posible, se realizó una evaluación de solubilidad en los aceites propuestos, canola y soya, ya que son los más reportados como fase oleosa en emulsiones de curcumina. En el aceite de canola se pudo solubilizar una cantidad de  $1.46 \pm 0.04$  mg/mL, mientras que en el aceite de soya se logró solubilizar  $1.21 \pm 0.02$  mg/mL. Bergonzi *et al.* (2012) reportaron una solubilidad de curcumina en el aceite de soya de  $1.29 \pm 0.09$  mg/mL, lo que concuerda con lo obtenido, por otra parte no se encontró información en la literatura sobre la solubilidad en el aceite de canola. La diferencia en la cantidad de curcumina solubilizada puede deberse a la composición de ácidos grasos de cada aceite, ya que la polaridad disminuye en cuanto la cadena hidrocarbonada sea más larga y menos dobles enlaces presente. Por su parte el aceite de soya está compuesto por aproximadamente un 54% de ácido linoleico (18:2) y el aceite de canola presenta un 62% de ácido oleico (18:1), ambos aceites están constituidos mayoritariamente por ácidos grasos con cadena de 18 carbonos, sin embargo, el número de insaturaciones presentes en cada aceite es diferente, teniendo el ácido linoleico dos insaturaciones y el ácido oleico presentando sólo una insaturación, por lo que podría ser esta la razón de que haya mayor solubilización de curcumina en el aceite de canola. Sin embargo, tanto el aceite de canola y la curcumina tienen en su estructura partes polares, siendo en el aceite el extremo carboxílico y para la curcumina los anillos fenólicos, presentando de esta manera interacciones dipolo-dipolo entre estos grupos pudiendo favorecer la solubilización (Huyskens y Haulaitpirson, 1985). Con base en estos resultados, fue utilizado el aceite de canola como fase oleosa para la elaboración de las emulsiones.

### **7.2 Caracterización de las nanoemulsiones de curcumina**

#### **7.2.1. Tamaño de partícula**

Para el caso del HLB 12.0, 14.0 y 8.6 solo se realizaron las proporciones 1:1, 1:1.5 y 1:2, ya que al realizar la proporción 1:3 las emulsiones presentaban una alta viscosidad y no pudieron ser procesadas en el ultrasonido. En la Figura 11, se puede apreciar el efecto que tiene el valor HLB, proporción fase O/S y tiempo de procesamiento en el

tamaño de partícula. A valores de HLB relativamente bajos (12.0, 10.0 y 8.6) se puede observar que los tamaños de partícula se encuentran por arriba de los 100 nm, por el contrario las formulaciones con HLB 16.0, 15.6 y 14 resultaron con tamaños de partículas < 100 nm con las proporciones 1:1.5, 1:2 y 1:3 (p:p) teniendo tamaños de partícula entre 38-98 nm (en la Figura 11 se presenta la proporción 1:3 y las proporciones 1:1.5 y 1:2 están en el Apéndice A). Anton *et al.* (2009) informaron que la afinidad de un agente surfactante hacia la parte no polar juega un papel importante en la formación de la emulsión. Bouchemal *et al.* (2004) propusieron que el surfactante debe ser predominantemente hidrofílico para emulsiones O/W (y por lo tanto debe tener un alto número de HLB), sin embargo también debe presentar una parte lipofílica, de lo contrario no será soluble en la parte no polar de la emulsión.



**Figura 11.** Impacto del valor HLB en el tamaño de partícula. Las formulaciones presentadas corresponden a la proporción fase O/S 1:3. Medias  $\pm$  EE

De forma general, a mayor cantidad de surfactante las emulsiones presentaron una reducción en el tamaño de partícula, excepto para el valor de HLB de 14.0 en la proporción aceite:surfactante 1:3 (las gráficas se pueden observar en el Apéndice A). Un número de fenómenos fisicoquímicos pueden explicar la reducción observada en el tamaño con el aumento de la concentración de surfactante. Los surfactantes se adsorben

en la superficie de las gotitas de aceite para formar una capa protectora que inhibe la agregación de partículas (McClements, 2011). El área de superficie específica de una emulsión aumenta con la disminución de tamaño de las gotas, por lo que requiere una concentración de surfactante mayor para estabilizar las gotitas formadas, sin embargo puede presentarse el engrosamiento de dicha capa y presentar un incremento en el tamaño de partícula (Wang *et al.*, 2009)

En cuanto al tiempo de procesamiento, se puede observar que los tamaños iniciales de partícula dentro de los primeros 2 min disminuyen considerablemente, caso particular en las formulaciones con HLB 14.0, 15.6 y 16.0. Esto puede ser debido a que las emulsiones fueron pre-homogeneizadas con alta velocidad, por lo que en este paso se formaron las primeras micelas con tamaño nanométricos, necesitando menor energía en el proceso ultrasónico para reducir el tamaño. De los 10 a los 16 min de procesamiento, no se muestran diferencias significativas en el tamaño de gota, esto es debido a que la reducción de tamaño por ultrasonido se lleva a cabo por cavitación. Li y Floger (1978), propusieron dos etapas en el proceso de cavitación, la primera etapa es la generación de pequeñas gotas primarias, donde el campo acústico produce las ondas interfaciales, lo que provoca la explosión de la fase oleosa en pequeñas gotas. La segunda etapa consiste en la desintegración de estas gotitas primarias, donde la cavitación acústica causa turbulencia intensa y fuerzas de cizallamiento que producen la explosión asimétrica y violenta de estas burbujas que revientan aún más las gotitas primarias de aceite dispersas, generando así gotitas de tamaño nanométrico. En este trabajo la segunda etapa de la cavitación se presenta a los 10 min de procesamiento, es decir ya han estallado en casi su totalidad las gotas, por lo que el procesamiento de las emulsiones después de ese tiempo, ya no tiene cambio significativo en el tamaño. Por esta razón el tiempo de exposición en la sonda ultrasónica se dejó en 10 min, para no presentar un sobre procesamiento en las muestras. En la Tabla 5 se presentan los tamaños de partícula de las emulsiones seleccionadas para evaluar su estabilidad fisicoquímica durante 60 días de almacenamiento a 4 °C.

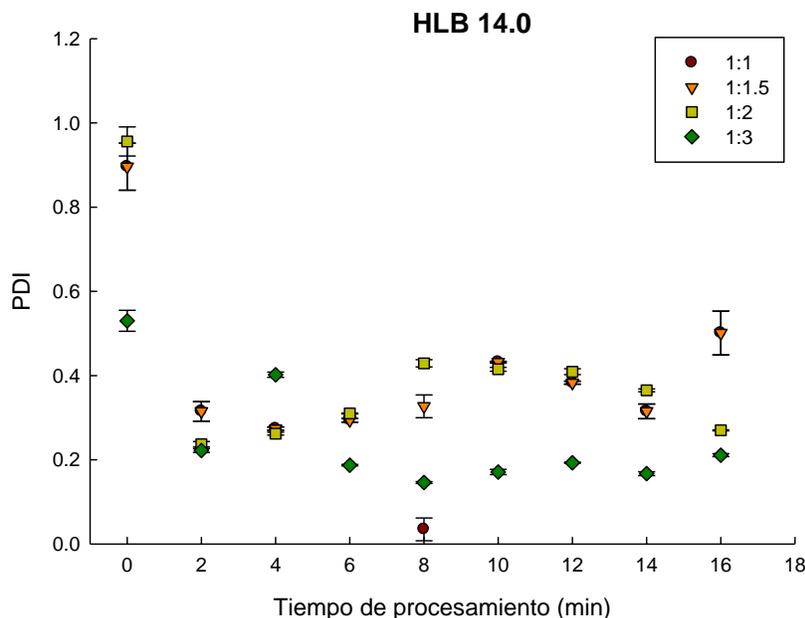
**Tabla 5.** Formulaciones que obtuvieron tamaños de partícula menores a 100 nm.

<b>Proporción</b>	<b>HLB 16</b>	<b>HLB 15.6</b>	<b>HLB 14</b>
<b>1:1.5</b>	97.12 ± 0.51 <sup>a</sup>	80.45 ± 0.45 <sup>d</sup>	66.08 ± 0.11 <sup>g</sup>
<b>1:2</b>	77.70 ± 0.65 <sup>b</sup>	60.40 ± 0.46 <sup>e</sup>	47.22 ± 0.10 <sup>h</sup>
<b>1:3</b>	38.82 ± 0.65 <sup>c</sup>	50.70 ± 1.01 <sup>f</sup>	56.18 ± 0.27 <sup>i</sup>

Medias ± DE (P<0.05). Letras iguales entre columnas, no existen diferencias estadísticas significativas.

### **7.2.2. ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN (PDI)**

El PDI nos indica la homogeneidad de los tamaños de partícula de una muestra, los valores van en un rango de 0 a 1, siendo 0 el valor donde la muestra tiene alta homogeneidad en el tamaño de las partículas y un valor de 1 cuando presenta una baja homogeneidad. Medir este parámetro es de suma importancia ya que valores bajos de PDI nos indican mayor estabilidad en una emulsión. En la Figura 12 se presenta el comportamiento del PDI en el valor de HLB 14.0 en las concentraciones 1:1, 1:1.5, 1:2 y 1:3, los resultados para los valores HLB 8.6, 10.0, 12.0, 15.6, 16.0 y 16.7 se presentan en el Anexo B. En las formulaciones con HLB 14.0, 15.6 y 16.0 los valores de PDI fueron < 0.5, alcanzando el valor más bajo en la formulación con HLB 14.0, con un PDI de 0.17. Como se observa en las gráficas (Anexo B), el comportamiento del PDI para todas las formulaciones con respecto al tiempo de procesamiento no es lineal, existen aumentos y decrementos durante todo el proceso, esto puede deberse a que la muestra en la sonda ultrasónica no recibe las ondas homogéneamente, ya que las partículas que están cerca de la sonda, logran reducir su tamaño mucho antes de las que están en las paredes del recipiente, haciendo que la muestra no tenga homogeneidad en los tamaños de partícula y por consecuencia una variación en el PDI a diferentes tiempos de procesamiento. Sin embargo, se puede apreciar que para las formulaciones con HLB 16.0, 15.6, y 12.0 se presenta una mayor estabilidad del PDI en la relación fase O/S 1:3 y para la formulación con HLB 14 en la relación 1:2 fase O/S. Para las formulaciones con HLB 10 Y 8.6 no se muestra una tendencia en los valores de PDI con respecto a la concentración de surfactante y presentaron valores entre 0.4 y 0.8, lo cual puede ser debido a que con estos valores de HLB no hubo formación de la emulsión, ya que presentaron dos fases, en la parte superior la fase oleosa y en la parte inferior la fase acuosa.



**Figura 12.** Efecto de la cantidad de surfactante y el tiempo de procesamiento en el PDI. Medias  $\pm$  DE.

Kim *et al.* (2012) reportaron que a valores de PDI de entre 0.1 y 0.4 para una nanoemulsión se puede correlacionar con una mayor estabilidad durante su almacenamiento, puesto que cuantas más partículas del mismo tamaño se encuentren en una emulsión existe menor probabilidad que se presente inestabilidad como la aglomeración, coalescencia o maduración de Ostwald. Con base en estos resultados las emulsiones que se seleccionaron para evaluar su estabilidad fisicoquímica durante su almacenamiento se muestran en la Tabla 6 con sus respectivos valores de PDI teniendo para HLB 16.0 relación 1:1.5, 1:2 y 1:3 tamaños de partícula de 97.12, 77.70 y 38.82 nm respectivamente, para el HLB 15.6 relación 1:1.5, 1:2 y 1:3 tamaños de partícula de 80.45, 60.40 y 50.70 nm respectivamente y finalmente para el HLB 14.0 relación 1:1.5, 1:2 y 1:3 tamaños de partícula de 66.08, 47.22 y 56.18 nm respectivamente

**Tabla 6.** Formulaciones que obtuvieron PDI menores a 0.5

Proporción	HLB 16.0	HLB 15.6	HLB 14.0
<b>1:1.5</b>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.43 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>
<b>1:2</b>	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
<b>1:3</b>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>

Medias  $\pm$  DE (P<0.05). Letras iguales entre columnas no existen diferencias estadísticas significativas.

### 7.3 Evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento mediante parámetros fisicoquímicos.

#### 7.3.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI)

Los datos de tamaño de partícula se ajustaron a cinéticas de orden 0 para todas las formulaciones, demostrando que la velocidad del incremento del tamaño de partícula sigue un comportamiento lineal resultando ser ésta no dependiente de la concentración de surfactante. A partir de estas cinéticas se calculó el valor de la pendiente, dicho valor representó la velocidad del aumento de tamaño de partícula reportándose como k, entre más cercano esta de cero, el incremento de tamaño de partícula es menor, por el contrario de un valor k alto que nos indica un incremento de partícula mayor.

**Tabla 7.** Velocidad del incremento del tamaño de partícula dados en nm/día para cada nanoemulsión.

	HLB 16.0		HLB 15.6		HLB 14.0	
	$r^2$	$k$ (nm/día)	$r^2$	$k$	$r^2$	$k$ (nm/día)
<b>1:1.5</b>	0.95	$0.15 \pm 0.01^{aA}$	0.90	$0.11 \pm 0.01^{aB}$	0.97	$0.14 \pm 0.01^{aA}$
<b>1:2</b>	1.00	$0.13 \pm 0.00^{bA}$	0.98	$0.08 \pm 0.01^{bB}$	0.94	$0.09 \pm 0.01^{bC}$
<b>1:3</b>	0.95	$0.10 \pm 0.00^{cA}$	0.91	$0.07 \pm 0.01^{bB}$	0.95	$0.15 \pm 0.00^{aC}$

Medias  $\pm$  DE ( $P < 0.05$ ). Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas entre filas, letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas entre columnas.

Las moléculas de surfactante estabilizan las gotas formadas a través de una combinación de la reducción de la tensión superficial y el incremento de la repulsión entre las gotitas cuando chocan entre sí. En la Tabla 7 se puede apreciar que hay un efecto del valor HLB en la repulsión de partículas, viéndose reflejado una menor velocidad de incremento. Para la nanoemulsión con valor HLB 15.6 relación 1:3 presentó la menor velocidad con un valor de  $k=0.07$  nm/día siendo la formulación con mayor estabilidad cinética. En el caso de la nanoemulsión con HLB 16.0 relación 1:1.5 y HLB 14.0 1:3 presentaron la mayor velocidad de incremento con un valor de  $k=0.15$  nm/día, teniendo al inicio del almacenamiento tamaños de partícula que se encontraban en el intervalo de 38–88 nm y para el término un intervalo de 43–96 nm (Anexo C). El valor HLB tiene un efecto en la estabilidad de las gotas y se puede suponer que en los valores probados, el

HLB 15.6 retrasa el proceso de coalescencia o floculación en las gotas en comparación con los otros valores estudiados en este trabajo. Otra tendencia observada, es que a menor tamaño de partícula el valor de  $k$  es menor para todos los casos. En las formulaciones con menores tamaños de partícula, presentaron valores de  $k$  menores, indicando que la reducción en el tamaño de partícula aumenta la estabilidad cinética de las emulsiones. Schmidts *et al.* (2010) afirmaron que el valor de HLB tiene efectos sobre la estabilidad de una emulsión y que tiene influencia en mayor o menor medida en la repulsión de las partículas entre sí, evitando el crecimiento de las gotas.

Los resultados de PDI se muestran en la Tabla 8, donde se observa el PDI inicial, es decir de la nanoemulsión recién elaborada y el PDI final de cada HLB y sus respectivas relaciones fase O/S. Los valores se encuentran por debajo de 0.5 y se puede apreciar que en algunos casos los valores no cambian. Aunque se esperaba que para las formulaciones con menores valores de  $k$  tuvieran de la misma forma un valor bajo de PDI, sin embargo, los valores son relativamente bajos según lo reportado por Kim *et al.* en 2012.

**Tabla 8.** PDI al inicio y al finalizar el almacenamiento para cada HLB y concentración de surfactante.

	HLB 16.0		HLB 15.6		HLB 14.0	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<b>1:1.5</b>	0.34±0.02 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>	0.39±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.05 <sup>a</sup>	0.38±0.03 <sup>a</sup>	0.40±0.03 <sup>a</sup>
<b>1:2</b>	0.28±0.00 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>a</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.29±0.00 <sup>b</sup>	0.45±0.01 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>a</sup>
<b>1:3</b>	0.29±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>b</sup>	0.45±0.04 <sup>a</sup>	0.51±0.03 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>

Medias ± DE (P<0.05). Letras iguales entre columnas de la misma formulación (inicial y final) no existen diferencias estadísticas significativas.

### **7.3.2. Retención de curcumina**

Para la interpretación de los datos de retención de curcumina en las emulsiones los datos se ajustaron a cinéticas de orden 0 para todas las formulaciones y todas las concentraciones de surfactante, resultando que la velocidad de pérdida de curcumina no depende de la concentración de surfactante. A partir de estas cinéticas se obtuvo el valor de la pendiente siendo ésta la velocidad de degradación de curcumina reportándose

como el valor  $k$ , un valor cercano a cero indica una menor velocidad de degradación, un valor de  $k$  cercano a 1 indica una mayor velocidad de degradación. En la Tabla 9 se pueden apreciar los valores de  $k$ , en la cual se puede apreciar que la formulación con HLB 16.0 formulación fase O/S 1:1.5 tiene la menor velocidad de degradación con una  $k=0.88 \times 10^{-4}$  mg/día. Otro fenómeno observado es que para las formulaciones con HLB 16.0 y 15.6 a mayor concentración de surfactante hay una mayor velocidad de degradación de curcumina.

**Tabla 9.** Valores de  $k$  (mg/día) para cada formulación

	HLB 16.0		HLB 15.6		HLB 14.0	
	$r^2$	$k$ (mg/día) ( $\times 10^{-4}$ )	$r^2$	$k$ (mg/día) ( $\times 10^{-4}$ )	$r^2$	$k$ (mg/día) ( $\times 10^{-4}$ )
<b>1:1.5</b>	0.99	$0.88 \pm 0.03^{aA}$	0.98	$1.11 \pm 0.01^{aB}$	0.99	$1.14 \pm 0.02^{aB}$
<b>1:2</b>	0.99	$1.00 \pm 0.02^{bA}$	0.98	$1.08 \pm 0.02^{aB}$	0.98	$4.15 \pm 0.01^{bC}$
<b>1:3</b>	0.98	$3.00 \pm 0.05^{cA}$	0.99	$3.07 \pm 0.01^{bB}$	0.99	$3.09 \pm 0.03^{cB}$

Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas entre filas, letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas entre columnas ( $P < 0.05$ ).

Para las formulaciones con HLB 14.0 ocurre que para la relación 1:2 existe una mayor degradación. Esto puede estar relacionado con el tamaño de partícula, ya que para el caso del HLB 16.0 y 15.6 con la relación 1:3 de surfactante se obtuvieron los menores tamaños de partícula (Tabla 5) y para el HLB 14.0 se obtuvo el menor tamaño de partícula con la relación 1:2 (Tabla 5). Esto puede ser causado por la reducción del tamaño de partícula ya que debido a la disminución del tamaño de gota, el área superficial incrementa, por lo que la fase lipídica está más expuesta a interacciones superficiales entre el medio ambiente que la rodea, provocando la oxidación de los componentes, siendo en este caso en particular la curcumina (McClements y Decker, 2000; Lethuaut *et al.*, 2002) por lo que de esta manera la curcumina podría estar degradándose. Wang *et al.* (2015) sometieron a la curcumina solubilizada en dimetilsulfóxido (DMSO) a una degradación forzada en condiciones de hidrólisis (ácida y alcalina), oxidación, fotólisis y estrés térmico y los productos de degradación fueron separados mediante cromatografía líquida de alta resolución, los cuales encontraron que en el proceso de oxidación los productos finales obtenidos fueron el ácido ferúlico y vainillina. Sin embargo, autores

como Waraho *et al.* (2011) afirman que la degradación de compuestos lipofílicos puede deberse a otros factores como la carga de la partícula, espesor de la interfase, el tipo de surfactante, entre otros.

Aunque la formulación HLB 16 1:3 presentó la mayor degradación, finalizó con un 74.19% de retención de curcumina a los 60 días de almacenamiento. Borrin *et al.* (2016) reportaron 85% de curcumina encapsulada con una formulación con el 0.10% de fase oleosa a los 60 días de almacenamiento, cabe destacar que en el estudio antes mencionado las formulaciones finalizaron el almacenamiento con una concentración de curcumina de 3.5 µg/mL, mientras que éste trabajo se obtuvo una concentración de 120 µg/mL de emulsión, demostrando que a pesar de tener degradación se conserva una concentración de curcumina mayor a la reportada.

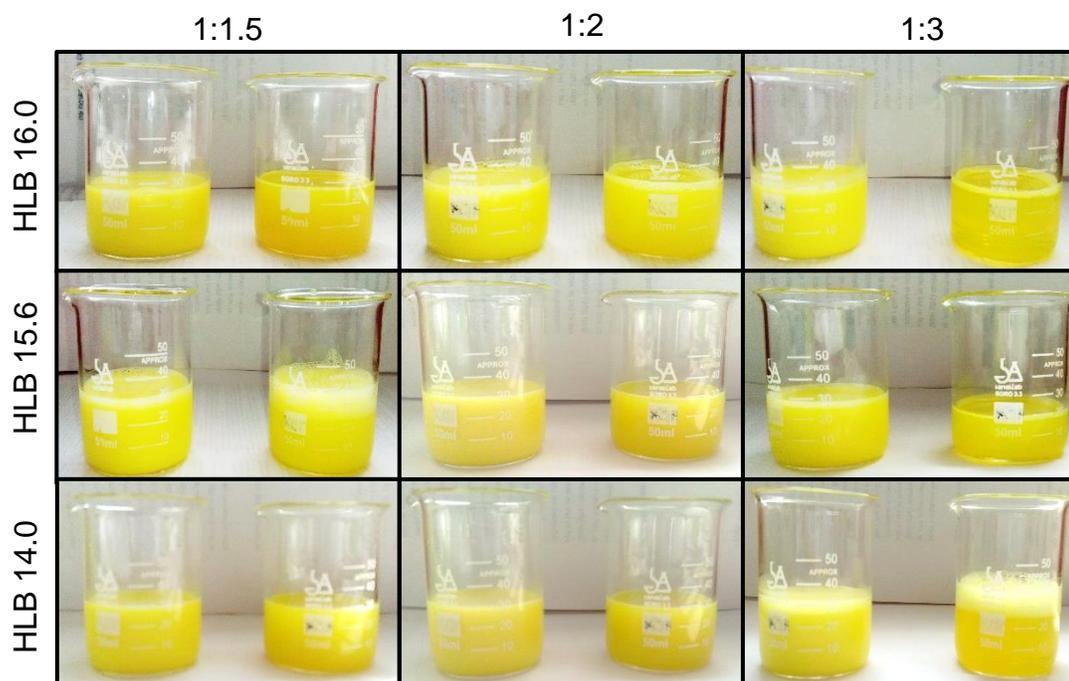
### 7.7.3. Color

La apariencia de una dispersión coloidal tiende a volverse traslúcida o transparente cuando el radio de la partícula cae por debajo de los 30 nm debido al aumento de la dispersión de la luz en el sistema coloidal (McClements, 2012). Sin embargo, las nanoemulsiones resultantes con tamaños de partícula por encima de los 30 nm presentaron una apariencia traslúcida en las formulaciones con relación 1:3 de surfactante (Figura 13). Para el estudio del color de las nanoemulsiones se calculó ángulo Hue y Cromo, donde ángulo Hue nos indica el tono y se expresa en grados que van desde 0° a 360° y Cromo que nos da la intensidad. En la Tabla 10 se encuentran los valores obtenidos para el ángulo Hue de las nanoemulsiones recién elaboradas y a las diferentes concentraciones de surfactante.

**Tabla 10.** Valores de ángulo Hue para cada formulación al inicio del almacenamiento.

	<b>HLB 16.0</b>	<b>HLB 15.6</b>	<b>HLB 14.0</b>
<b>1:1.5</b>	110.58 ± 1.33 <sup>a</sup>	118.16 ± 1.79 <sup>d</sup>	108.81 ± 0.57 <sup>a</sup>
<b>1:2</b>	128.20 ± 1.98 <sup>b</sup>	122.93 ± 2.79 <sup>d</sup>	136.49 ± 0.12 <sup>e</sup>
<b>1:3</b>	142.33 ± 2.78 <sup>c</sup>	127.00 ± 2.58 <sup>b</sup>	110.35 ± 1.45 <sup>a</sup>

Medias ± DE (P<0.05). Letras iguales entre columnas no existe diferencias estadísticas significativas.



**Figura 13.** Apariencia de las emulsiones convencionales (muestras de lado izquierdo) y de las nano emulsiones (muestras lado derecho) para los HLB 16.0, 15.6 y 14.0 en sus diferentes concentraciones.

Como se observa en la Tabla 10, los ángulos se encuentran entre los valores de 108 y 142 y basándonos en el diagrama cromático cie  $L^*a^*b$  se encuentran en el rango de color amarillo-verde. Borrin *et al.* (2016) reportaron ángulos Hue de entre 78 y 86 para nanoemulsiones de curcumina estabilizadas con Tween 80 y glicerol, mientras que en este trabajo las nanoemulsiones presentan un ángulo que se encuentran entre los valores de 108 y 142. Esto puede ser debido a las características de la curcumina utilizada para la elaboración de las emulsiones ya que los ángulos Hue reportados por Borrin *et al.* (2016) se encuentran en las tonalidades naranja-amarillo. El color de la curcumina puede variar según la especie, teniendo tonalidades de naranjas intensas a amarillos brillantes.

Para la interpretación de los datos de los valores de Croma, se realizaron cinéticas de degradación, donde los datos se ajustaron a cinéticas de orden 0, 1 y 2 y el mejor ajuste se obtuvo en orden 0, presentando la degradación de Croma una tendencia lineal respecto al tiempo. Para cada cinética se obtuvo  $k$  (pendiente) el cual nos indica la velocidad de degradación y está dada en unidades de Croma por día. En la Tabla 11 se muestran los valores de  $k$  para cada formulación, las gráficas se encuentran al final de este trabajo en el Anexo D. Se puede apreciar que para la formulación HLB 16.0 y 15.6

la mayor velocidad de degradación de croma se da a mayor concentración de curcumina, a estas concentraciones se obtuvieron para ambos casos el menor tamaño de gota. Para el caso de la formulación con HLB 14.0 relación 1:2 se obtuvo la mayor velocidad de degradación de croma, presentando a esta concentración el menor tamaño de partícula.

**Tabla 11.** Degradación de Croma para cada una de las formulaciones

	<b>HLB 16.0</b>		<b>HLB 15.6</b>		<b>HLB 14.0</b>	
	$r^2$	$k$ (uC/día) ( $\times 10^{-4}$ )	$r^2$	$k$ (uC/día) ( $\times 10^{-4}$ )	$r^2$	$k$ (uC/día) ( $\times 10^{-4}$ )
<b>1:1.5</b>	0.94	$0.24 \pm 0.03^{aA}$	0.91	$0.54 \pm 0.08^{aB}$	0.92	$0.31 \pm 0.06^{aB}$
<b>1:2</b>	0.95	$0.34 \pm 0.03^{bA}$	0.90	$0.38 \pm 0.06^{aB}$	0.95	$0.85 \pm 0.08^{bC}$
<b>1:3</b>	0.98	$0.46 \pm 0.03^{cA}$	0.97	$0.58 \pm 0.05^{aB}$	0.94	$0.39 \pm 0.04^{aB}$

Letras minúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas entre filas, letras mayúsculas iguales indican que no existen diferencias significativas entre columnas ( $P < 0.05$ ).

Esta degradación del valor de Croma en las emulsiones puede ser debido a la degradación de la curcumina, ya que como se discutió anteriormente, la reducción del tamaño de partícula puede estar provocando su degradación debido al aumento del área superficial de las gotas teniendo como consecuencia mayor superficie de contacto las gotas con la fase acuosa.

#### **7.3.4. Potencial $\zeta$**

Para que las nanoemulsiones se encuentren en total dispersión los valores de potencial  $\zeta$  deben superar los +30 o ser menores a -30 mV. Las emulsiones presentaron valores de -19 a -26 mV lo que las sitúa en el umbral de leve dispersión según la interpretación de Herrman (2010). El potencial  $\zeta$  con el que iniciaron el almacenamiento cada nanoemulsión se presenta en la Tabla 12. El potencial  $\zeta$  cambia considerablemente en las formulaciones, dependiendo el valor HLB y la concentración del surfactante.

**Tabla 12.** Valores de potencial zeta (mV) para cada formulación al inicio del almacenamiento.

	<b>HLB 16.0</b>	<b>HLB 15.6</b>	<b>HLB 14.0</b>
<b>1:1.5</b>	-26.70 ± 1.38 <sup>a</sup>	-26.87 ± 0.76 <sup>a</sup>	-21.85 ± 1.66 <sup>b</sup>
<b>1:2</b>	-19.15 ± 2.11 <sup>b</sup>	-20.45 ± 2.43 <sup>b</sup>	-21.07 ± 2.12 <sup>b</sup>
<b>1:3</b>	-21.43 ± 3.26 <sup>b</sup>	-22.30 ± 0.48 <sup>b</sup>	-22.10 ± 0.80 <sup>b</sup>

Medias ± DE (P<0.05). Letras iguales entre filas, no existe diferencias estadísticas significativas.

Las nanoemulsiones con mayor estabilidad según los valores de potencial  $\zeta$  son HLB 16 1:1.5 y HLB 15.6 1:1.5 teniendo los valores más cercanos a -30 mV, las demás formulaciones iniciaron en un rango de -19 a -22 mV no presentando diferencias estadísticamente significativas. A pesar de que los valores de potencial  $\zeta$  se encuentran en el rango de inestabilidad (-30 a +30 mV), tienen valores mayores a los encontrados en la literatura. Sari *et al.* (2014) caracterizaron nanoemulsiones de curcumina, dicha curcumina fue solubilizada en triglicéridos de cadena media utilizando concentrado de proteína de suero y Tween 80 como surfactantes. Los valores de potencial  $\zeta$  obtenidos en este trabajo fueron de  $\approx -6.9 \pm 0.2$  mV con tamaños de partícula de las nanoemulsiones de  $141.6 \pm 15.4$  nm, la diferencia de los valores de potencial  $\zeta$  pueden ser debido a que Sari *et al.* (2014) utilizaron una mezcla de surfactante con proteína como estabilizante de la emulsión.

En la Figura 14 se representan los valores del potencial  $\zeta$  para el HLB 16.0, 15.6 y 14.0 en las diferentes concentraciones de surfactante. Se puede observar que para todas las formulaciones el valor de potencial  $\zeta$  se va acercando a cero con el paso del tiempo. Este comportamiento puede ser el resultado de la pérdida de carga de las partículas durante el almacenamiento, es decir la pérdida de la estabilidad. El potencial  $\zeta$  es una medida del potencial eléctrico en la superficie interfacial de las partículas suspendidas, dichas partículas están cargadas en mayor o menor medida, lo cual las hace repelerse unas con otras evitando así cualquier aglomeración, la cual se dará más fácilmente entre menos carga exista (Pinheiro *et al.*, 2015).

Las emulsiones son sistemas metaestables que tienden a separarse con el tiempo, en caso particular, las nanoemulsiones presentaron separación gravitacional formando una película blanquecina en la superficie llamada cremado, sin embargo, esta tipo de

separación es reversible, ya que aplicando una simple agitación se puede regresar el sistema a su forma inicial.

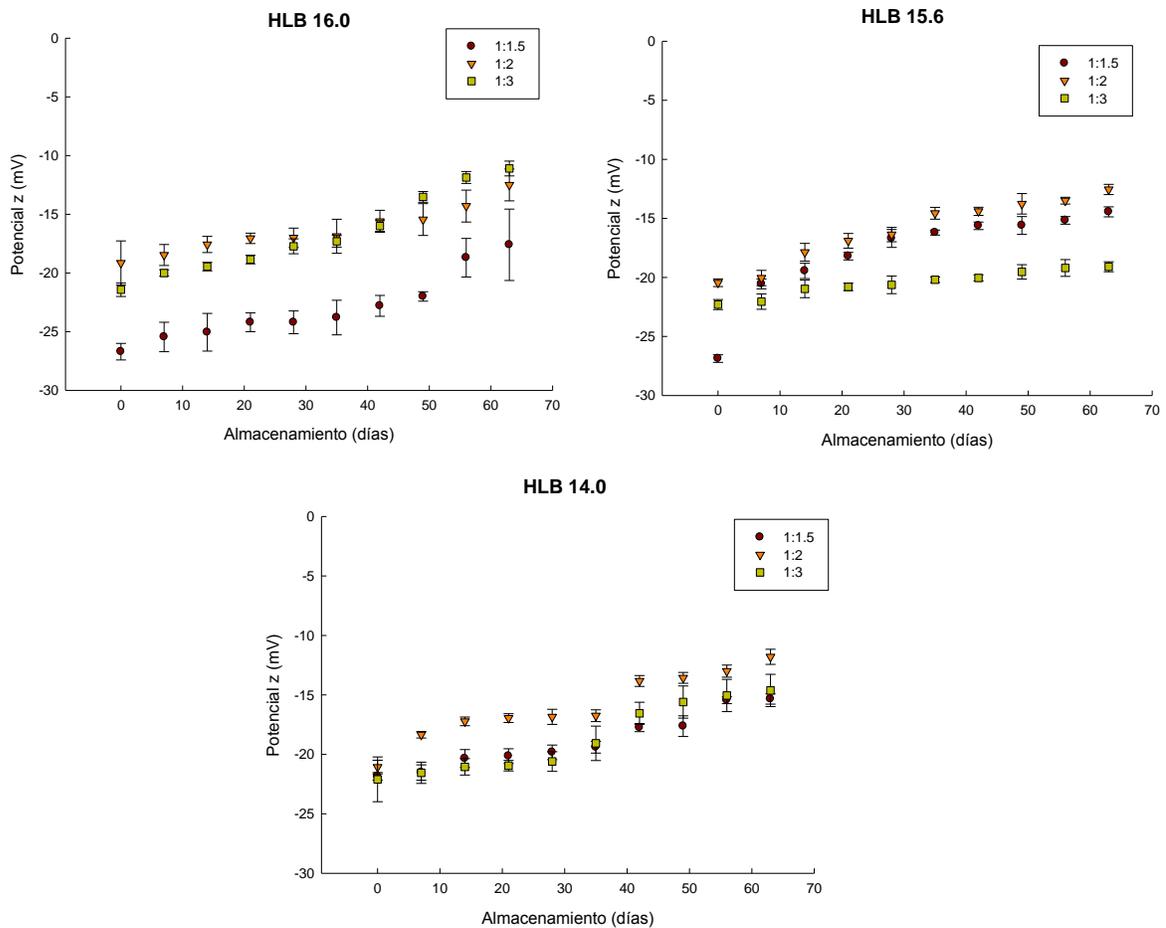


Figura 14. Cambios en el potencial  $\zeta$  (mV) durante los 60 días de

### 7.3.5. Índice de cremado (IC)

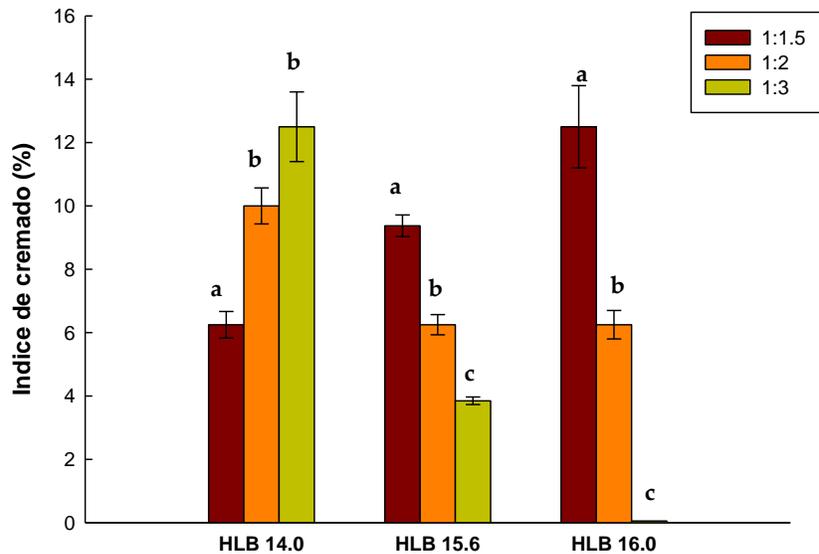
En la Figura 15 se puede observar la apariencia física de las nanoemulsiones a los 60 días de almacenamiento, las cuales tienen una capa blanquecina en la parte superior (señaladas con las flechas rojas), lo que se le conoce como cremado. En el caso de las formulaciones con valor de HLB 16.0 y 15.6 al incrementar la concentración de surfactante, se reduce el IC. Como se observa, la única nanoemulsión que está en dispersión es la formulación HLB 16.0 1:3, la cual es la que presenta menor tamaño de

partícula, por el contrario; la formulación que mayor IC presentó fue la formulación con HLB 14.0 1:3. Esto puede estar relacionado con la velocidad de crecimiento de partícula, ya que para todos los HLB las formulaciones con menor IC son las que presentan una  $k$  menor. En la Figura 16 se muestran los porcentajes de IC para cada formulación y se puede apreciar claramente el impacto que tiene el valor del HLB y la cantidad de surfactante.



**Figura 15.** Cremado de las nanoemulsiones con curcumina a los 60 días de almacenamiento.

En las nanoemulsiones con HLB 16.0 y 15.6 el IC disminuye con el incremento del surfactante y con el incremento del surfactante hay una reducción del tamaño de partícula, dicho de otra manera, la reducción del tamaño de partícula favorece en la estabilidad física de la emulsión disminuyendo el IC. Perrechil y Cunha (2010) al igual que Lovaglio *et al.* (2011) afirmaron que IC altos indicaban mayor agregación de gotas y que al incrementar el tamaño de partícula la formación del cremado se presenta mucho más rápido. Sin embargo con la formulación con HLB 14.0 pasó totalmente lo opuesto ya que con el incremento de la concentración de surfactante incrementa también el IC.



**Figura 16.** Índice de cremado en porcentaje para cada formulación. Letras iguales dentro de la misma formulación (HLB 14.0, 15.6 y 16.0) no existe diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )

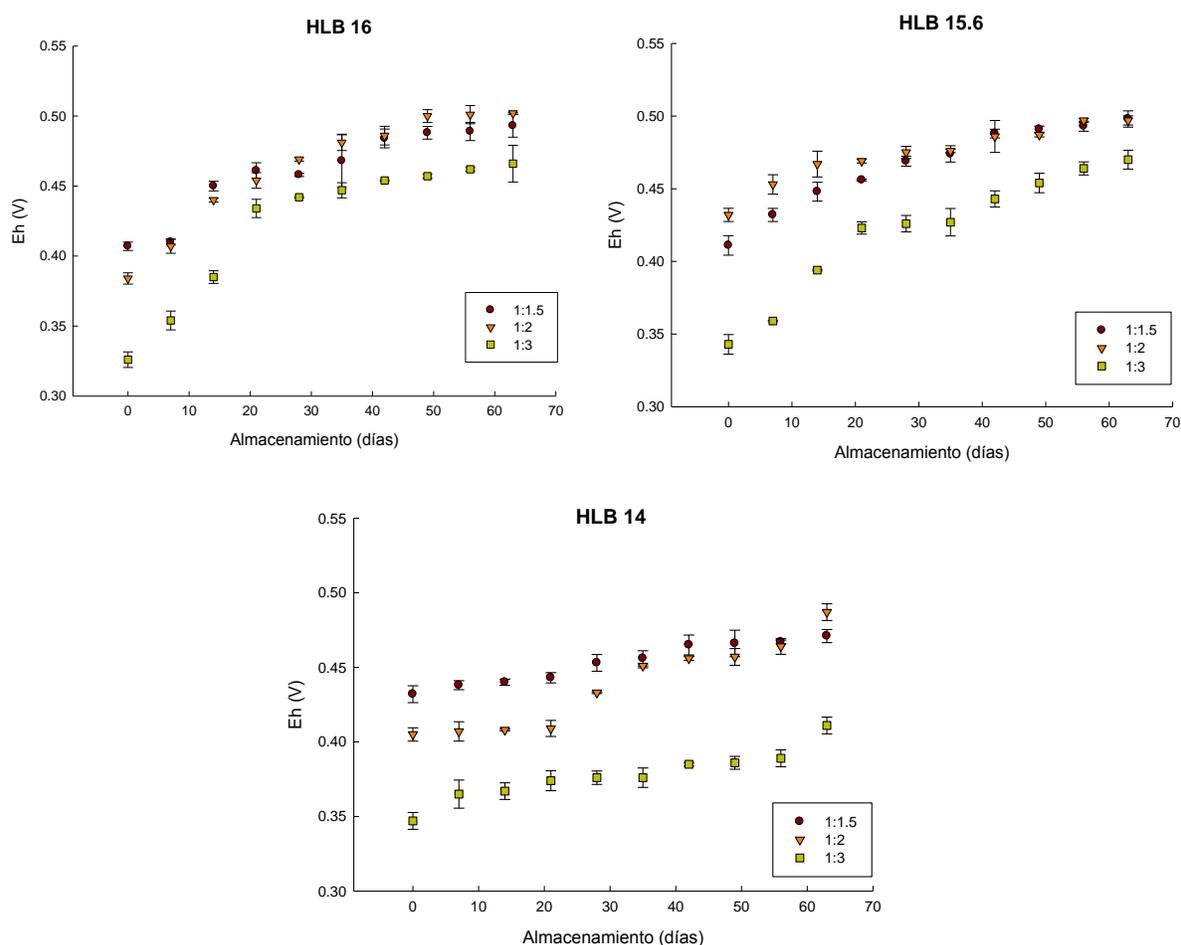
Esto puede ser debido al exceso de surfactante ya que existe una cantidad necesaria para estabilizar las gotas, evitando así la coalescencia, sin embargo, si se sobrepasa esta cantidad puede inducir a interacciones atractivas que impactan en la formación de cremado y en las propiedades reológicas, formando de ésta manera micelas y agregados de tamaño nanométrico compuestos en su totalidad por moléculas de surfactante, resultando en una atracción entre las gotas de la fase dispersa (Robins *et al.*, 2002). A pesar de que este tipo de inestabilidad es reversible aplicando agitación, si se deja por tiempos prolongados el cremado puede generar una degradación de la curcumina, puesto que en el cremado las partículas con menor densidad se desplazan hacia arriba, en este caso el aceite con la curcumina, estando expuesta en mayor o menor medida al oxígeno del medio ambiente.

### 7.3.6. Potencial óxido–reducción (Eh)

Todos los valores de potencial óxido–reducción (Eh) fueron positivos para cada formulación. Estos valores comprenden desde +0.33 a +0.47 V al iniciar el almacenamiento. Un valor Eh positivo y de alta magnitud es indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de oxidación (pérdida de electrones) y un valor Eh negativo

y de baja magnitud es indicativo de un ambiente altamente reductor (ganancia de electrones) (Galato *et al.*, 2001). Para los valores de Eh obtenidos en las nanoemulsiones se puede suponer que indican propiedades reductoras.

En la Figura 17 se representan los cambios observados en el Eh durante los 60 días de almacenamiento. Existe una tendencia en el Eh, cuando se aumenta la concentración de surfactante disminuye el valor de Eh.



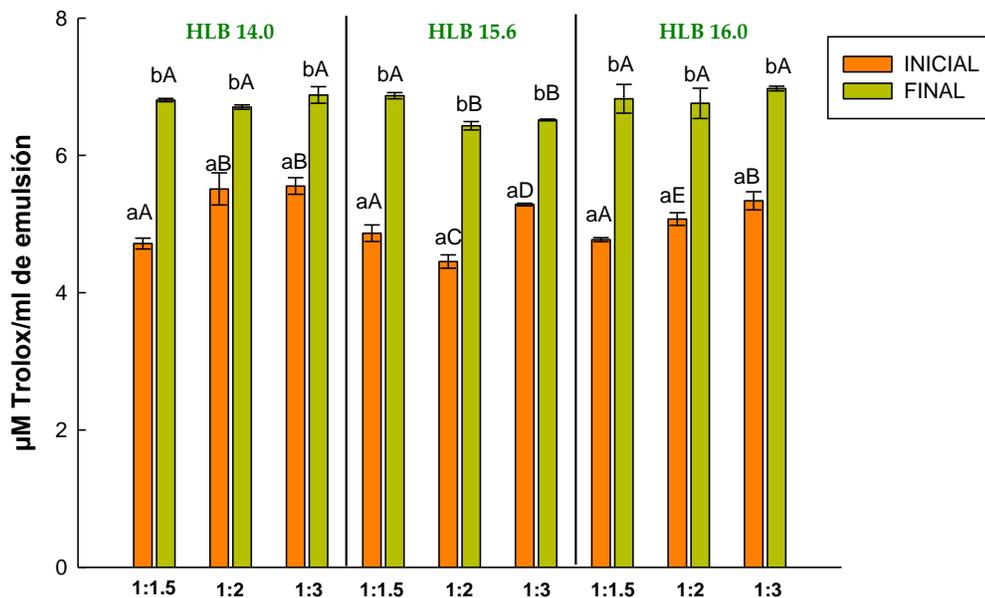
**Figura 17.** Influencia de la cantidad de surfactante en el Eh durante el almacenamiento de las nanoemulsiones. Medias  $\pm$  EE ( $P < 0.05$ )

Se ha reportado que Eh constituye la capacidad de una muestra para reducir o donar electrones proporcionando una idea del ambiente reductor total del sistema y por tanto de su actividad antioxidante en términos termodinámicos (Galato *et al.*, 2001; Nicoli *et al.*,

2004; Jiménez *et al.*, 2011; Gamboa-Gómez *et al.*, 2013). Por lo tanto la tendencia del aumento y disminución del Eh con el incremento o decremento de la concentración de surfactante puede estar ligada a la actividad antioxidante de la curcumina y el sistema de liberación de esta actividad. Cuando se aumenta la cantidad de surfactante hay una reducción del tamaño de partícula y por consiguiente una reducción en el tamaño de la gota lipídica conteniendo la curcumina, por lo que la capa de surfactante se vuelve más gruesa, quedando mayormente protegida la curcumina, afectando así el valor del Eh. También puede observarse en la Figura 17 que durante el almacenamiento el valor de Eh se va incrementando en todos los casos. Esto puede ser provocado por la inestabilidad presentada por las nanoemulsiones con el paso del tiempo. Como se discutió anteriormente, las nanoemulsiones presentaron cremado, esta inestabilidad puede estar afectando al aceite portador de curcumina. Cuando las nanoemulsiones comienzan a presentar cremado, el aceite portador queda más expuesto a la fase acuosa la cual contiene tanto prooxidantes y antioxidantes en la interfaz aceite-agua que impacta en las interacciones entre el aceite y los componentes del agua (McClements y Decker, 2000). Estas interacciones pueden resultar en la oxidación del aceite de canola, desencadenando las propiedades reductoras de la curcumina para una estabilización en el sistema, reflejándose en un incremento en la actividad antioxidante.

### **7.3.7. Actividad antioxidante de las nanoemulsiones**

La actividad antioxidante fue monitoreada al inicio y final del almacenamiento para evaluar su comportamiento utilizando el método DPPH y reportándolo como equivalentes de Trolox. En la Figura 18 se puede observar los  $\mu\text{M}$  de Trolox por mL de emulsión en donde al inicio del almacenamiento todas las formulaciones se encuentran entre 4 y 6  $\mu\text{M}$  de trolox, teniendo la mayor actividad la formulación HLB 14 1:1.5 y 1:2 con 5.55 y 5.51  $\mu\text{M}$  de trolox respectivamente. Sari *et al.* (2014) reportaron nanoemulsiones de curcumina con una actividad antioxidante de  $3.33 \pm 0.02 \mu\text{M}$  de trolox/mg de curcumina, mientras que nuestras formulaciones se encuentran por arriba, teniendo  $4.47 \pm 0.05 \mu\text{M}$  de trolox/mg de curcumina en la nanoemulsión con menor actividad.



**Figura 18.** Comportamiento de la actividad antioxidante al inicio y al término del almacenamiento. Letras minúsculas iguales no existen diferencias significativas entre la actividad antioxidante inicial y final de cada formulación. Letras mayúsculas iguales no existen diferencias significativas entre todas las formulaciones (HLB 14.0, 15.6 Y 16.0) ( $P < 0.05$ )

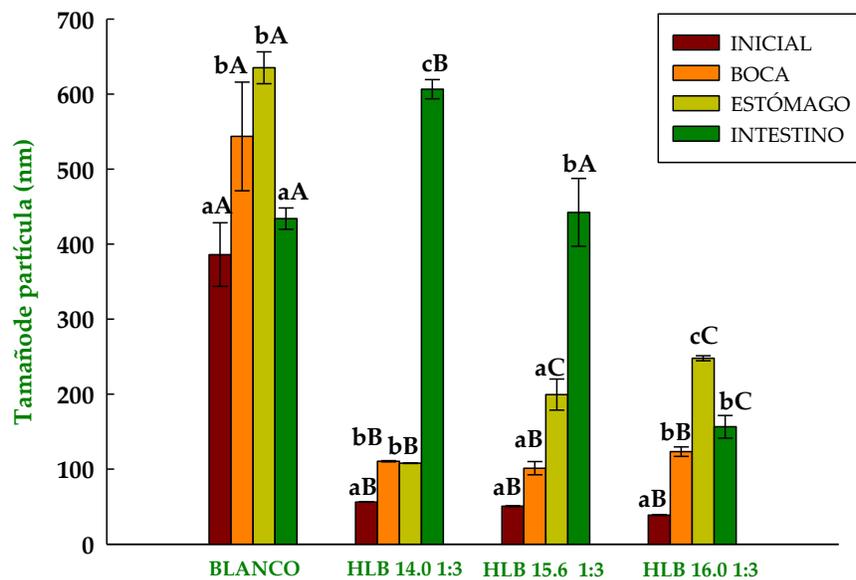
Esta diferencia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los de Sari *et al.* (2014) puede ser debido a que ellos obtuvieron emulsiones con menor cantidad de curcumina, además de que utilizaron diferentes tipos de surfactante, lo cual pudo conferirles menor protección a la curcumina. Otro comportamiento observado es que para todas las formulaciones al incrementarse la cantidad de surfactante hay mayor actividad antioxidante demostrando que la curcumina es mayormente protegida en las emulsiones que tienen mayor surfactante, lo cual puede ser debido a que se forma una capa más compacta que evita la degradación. Por otro lado, se observa que la actividad antioxidante incrementa al finalizar el almacenamiento, este mismo comportamiento fue observado por Nicoli *et al.* (2004), quienes durante el almacenamiento de té negro reportaron incrementos en el potencial Eh y la actividad antioxidante, dicho incremento en la actividad la atribuyeron a la oxidación parcial de algunos polifenoles que pueden presentar propiedades antioxidantes más fuertes que las correspondientes a formas no oxidadas, como una consecuencia del incremento en la resonancia de deslocalización,

así como también de la estabilidad de radicales ariloxi, sin embargo, esto no siempre ocurre así, ya que el comportamiento también suele depender de la matriz alimentaria de la cual se trate (Calva, 2015). Durante el almacenamiento muchos compuestos fenólicos pueden promover una progresiva polimerización formando productos macromoleculares (Manzocco *et al.*, 1998). Wang *et al.* (2016) afirmaron que la curcumina podría degradarse a compuestos con mucha mayor actividad antioxidante, entre los más estudiados la vainillina y el ácido ferúlico. La actividad antioxidante de la curcumina se ha propuesto que se asocia con la mayoría de sus efectos farmacológicos y en un estudio previo en el mecanismo de la actividad antioxidante, el ácido ferúlico y la vainillina se han identificado estructuralmente como los productos derivados de la reacción radical de la curcumina (Masuda *et al.*, 1999). La curcumina es fácilmente soluble en soluciones tales como dimetilsulfóxido, etanol, o acetona, pero es escasamente soluble en soluciones acuosas. La baja biodisponibilidad de la curcumina es debida en gran parte a su hidrófoba naturaleza, mientras que los productos de degradación tienen mayor solubilidad en agua en comparación con la misma curcumina (Aggarwal y Shung, 2009). Dada la escasa biodisponibilidad de la curcumina y sus metabolitos, la mayor solubilidad acuosa de sus productos de degradación en comparación con la curcumina en sí, las actividades similares biológicas de la curcumina y sus productos de degradación en el combate contra muchas enfermedades se propone que los productos bioactivos de la degradación contribuyen a los efectos farmacológicos observados del consumo de la curcumina.

## **7.4 Evaluación de parámetros fisicoquímicos en la digestión GI**

### **7.4.1. Tamaño de partícula en las fases GI.**

Las emulsiones sometidas a evaluación de la bioaccesibilidad mediante un sistema gastrointestinal simulado fueron aquellas que tuvieron menor velocidad de incremento de partícula (HLB 16.0, 15.6 y 14.0 relación 1:3 en los tres casos). Los tamaños de partícula para cada nanoemulsión previas a ser sometidas al sistema GI *in vitro* fueron de  $38.82 \pm 0.65$ ,  $50.70 \pm 1.01$  y  $56.18 \pm 0.27$  nm para las formulaciones HLB 16.0 1:3, HLB 15.6 1:3 y HLB 14.0 1:3 respectivamente. En la Figura 19 se pueden apreciar los cambios en el tamaño de partícula de las tres formulaciones junto con el blanco (curcumina solubilizada en aceite, homogeneizada en agua sin surfactante) al paso del sistema GI.



**Figura 19.** Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en el tamaño de partícula en las diferentes formulaciones. Diferentes letras minúsculas significan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en el tamaño de partícula de una nanoemulsión entre las fases de digestión. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el tamaño de partícula entre los tipos de nanoemulsión (Blanco, HLB 16 1:3, HLB 15.6 1:3 Y HLB 14 1:3) dentro de la misma fase de la digestión.

Se puede observar una diferencia significativa en el tamaño de partícula inicial (nanoemulsión recién elaborada) en las nanoemulsiones comparadas con el blanco (curcumina solubilizada en aceite, homogenizada en agua sin surfactante). En la fase boca para el caso de la nanoemulsión con HLB 15.6 1:3 no hubo cambio estadísticamente significativo del tamaño de gota inicial a la fase oral, lo que sugiere que las gotitas fueron relativamente estables a la coalescencia en estas condiciones. Zou *et al.* (2015) reportaron que no existió diferencia estadísticamente significativa entre el tamaño inicial y en la fase oral para emulsiones de curcumina estabilizadas con Tween 80 con tamaños de gota iniciales por arriba de los 200 nm. Ellos atribuyeron este efecto al hecho de que las gotas de aceite con curcumina fueron recubiertas por surfactantes no iónicos (igualmente se utilizó en este trabajo un surfactante no iónico Tween 40 para el HLB 15.6), que principalmente estabilizan las gotas debido a la repulsión estérica generada por los grupos de cabeza hidrófilos poliméricos. Por consiguiente, cambios en el pH, la fuerza iónica y la actividad de la mucina no tuvieron una fuerte influencia en el tamaño de partícula (Zou *et al.*, 2015). Sin embargo, para las formulaciones con HLB 14.0 1:3, HLB

16 1:3 y el blanco presentaron cambios estadísticamente significativos en el tamaño de partícula en la fase boca. Este cambio de tamaño de partícula puede ser atribuido a la acción lubricadora (formación de gel) de la mucina en las emulsiones. Estudios previos han demostrado que las moléculas de mucina en la saliva pueden promover la floculación de las gotas en las emulsiones (Sarkar *et al.*, 2010) siendo ésta una de las principales fracciones de proteínas en la saliva. Sin embargo otros componentes de la saliva como lo son las sales, pueden ser causantes de la agregación de gotas (Vingerhoeds *et al.*, 2005).

Para las formulaciones HLB 14.0 1:3 y HLB 15.6 1:3 el tamaño permanece sin diferencias significativas desde el inicio hasta la fase estómago, estos resultados demuestran que bajo estas condiciones HLB 14.0 (Tween 40 y Span 20) y HLB 15.6 (Tween 40) se logra formar una capa más compacta y mejor ordenada con mayor estabilidad en comparación con el HLB 16.0, impidiendo así la transferencia de los componentes que se encuentran en la fase acuosa con las gotas de la emulsión, evitando de esta manera el aumento considerable del diámetro de las gotas (Bautista, 2015). Para el caso del blanco tampoco se observa un cambio en el tamaño de partícula, sin embargo en la fase boca existió un aumento considerable por acción de la mucina, es decir perdió su estabilidad, por ello no existe un cambio significativo de la fase boca a la fase estómago. Para el HLB 16.0 1:3 existe un incremento en el tamaño de partícula para la fase estómago, esto puede ser consecuencia de la degradación de la barrera que cubre las gotas (Tween 20 y Tween 40) de las emulsiones debido a las condiciones ácidas (pH: 2.5) provocando la floculación y la coalescencia dando lugar a gotas de diámetro mayor.

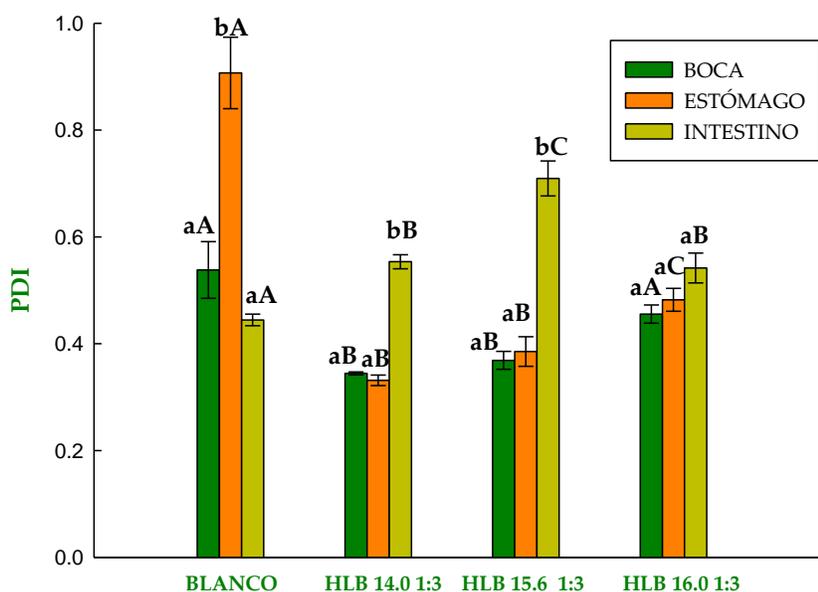
Para la fase intestinal la nanoemulsión con HLB 16 1:3 y el blanco tienen una reducción en el tamaño de partícula. Hur *et al.* (2011) reportaron resultados similares con emulsiones lipídicas con diferentes tipos de aceites, entre los cuales se encontraba el aceite de canola, en donde tuvieron un decremento en el tamaño de partícula en la fase intestinal. Esta disminución del diámetro medio de partícula se puede atribuir a la digestión de las gotas lipídicas. Cuando la lipasa se adsorbe en las interfaces de aceite-agua algunos de los triacilglicéridos encapsulados se convierten en monoacilglicérols y ácidos grasos libres, que se liberan en los alrededores de la fase acuosa y se incorporan

en micelas mixtas y vesículas. En consecuencia, hay una disminución en el volumen del aceite dentro de las gotitas durante la digestión (Hur *et al.*, 2011). Por el contrario, las formulaciones HLB 14.0 1:3 y HLB 15.6 1:3 presentaron un incremento en el tamaño de partícula en la fase intestinal.

Mao y McClements (2012) reportaron un incremento el tamaño de gota para esta fase, ellos solubilizaron una proteína en aceite de maíz y prepararon emulsiones las cuales fueron estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina y lactoferrina. Ellos aseguraron que este incremento fue resultado de la coalescencia de las gotas, reportando un tamaño mayor en la fase intestino que en la fase estómago. Estos cambios microestructurales pueden ser atribuidos a una serie de diferentes eventos fisicoquímicos que ocurren dentro de la fase del intestino delgado simulado: (a) la digestión de gotas lipídicas por la lipasa; (b) la acumulación de lípidos (c) la acumulación de gotas lipídicas; (e) formación de micelas mixtas, vesículas, y otra estructuras coloidales (McClements *et al.*, 2009; Saberi *et al.*, 2013; Trujillo *et al.*, 2013).

#### **7.4.2. PDI en las fases GI**

Para la formulación HLB 16.0 1:3 no existió un cambio significativo en el PDI (Figura 20) durante toda la digestión GI *in vitro*, en este caso la emulsión sufre alteración en el tamaño de partícula desde la fase boca ya que ocurre la coalescencia por efecto de las mucina, por lo que el PDI no sufre cambios en las tres fases. Para el caso del HLB 14 1:3 no sufrió cambios en el PDI posterior a la digestión gástrica, demostrando ser estable a las condiciones ácidas del estómago. En el caso del blanco presenta un cambio aparente después de la digestión gástrica, viéndose afectada la estabilidad de la dispersión de tamaños por las condiciones ácidas (pH 2.5). La agregación observada de las gotas puede ser debido al aumento de la fuerza iónica de la fase acuosa que rodea a las gotas lipídicas en el estómago, provocando una inestabilidad en la dispersión el tamaño de partícula (Mao y McClements, 2012). Zou *et al.* (2015) reportaron resultados similares en nanoemulsiones de curcumina, donde ellos observaron un cambio en el PDI cuando las nanoemulsiones pasaban del estómago al intestino, cambios que atribuyeron a la agregación de las gotas, formación de micelas mixtas y otras estructuras coloidales.

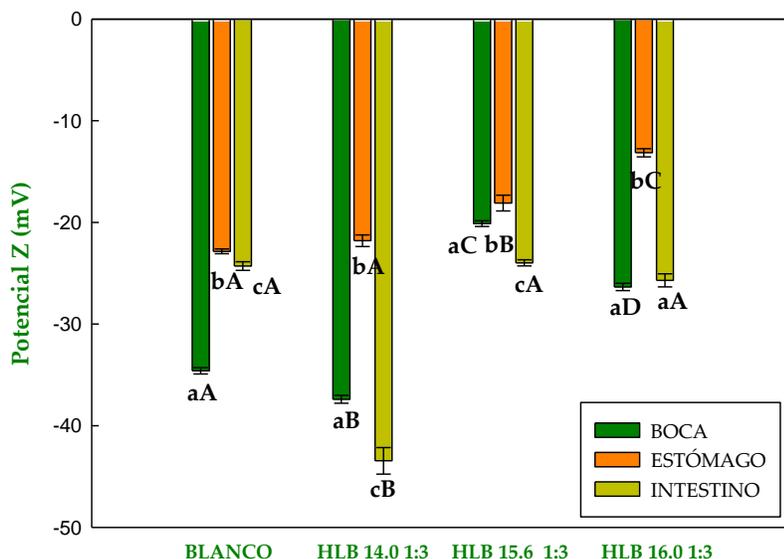


**Figura 20.** Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en el PDI en las diferentes formulaciones. Diferentes letras minúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el PDI de una nanoemulsión entre las fases de la digestión. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el PDI entre los tipos de nanoemulsión (Blanco, HLB 16 1:3, HLB 15.6 1:3 Y HLB 14 1:3) dentro de la misma fase de la digestión.

Para la nanoemulsión con HLB 15.6 relación 1:3 existe un cambio significativo en la fase intestino. Como se discutió anteriormente, el tamaño de partícula de esta formulación se mantuvo estable hasta la fase intestinal, donde ocurre la coalescencia por el efecto de las sales biliares y la lipasa, por lo que el aumento en el PDI es más notable después de la digestión gástrica. Esto indica la inestabilidad del tamaño de partícula ya que algunas gotas de aceite se mantuvieron pequeñas, mientras que algunas se fusionaron para convertirse en gotas más grandes (Cheong *et al.*, 2016).

### 7.4.3. Potencial $\zeta$ en las fases GI

Las características eléctricas (potencial  $\zeta$ ) de las partículas en las nanoemulsiones después de haber sido expuestas a las fases GI fueron medidas y los resultados se muestran en la Figura 21.



**Figura 21.** Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en el potencial  $\zeta$  en las diferentes formulaciones. Diferentes letras minúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el potencial  $\zeta$  de una nanoemulsión entre las fases de la digestión. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el potencial  $\zeta$  entre los tipos de nanoemulsión (Blanco, HLB 16 1:3, HLB 15.6 1:3 Y HLB 14 1:3) dentro de la misma fase de la digestión.

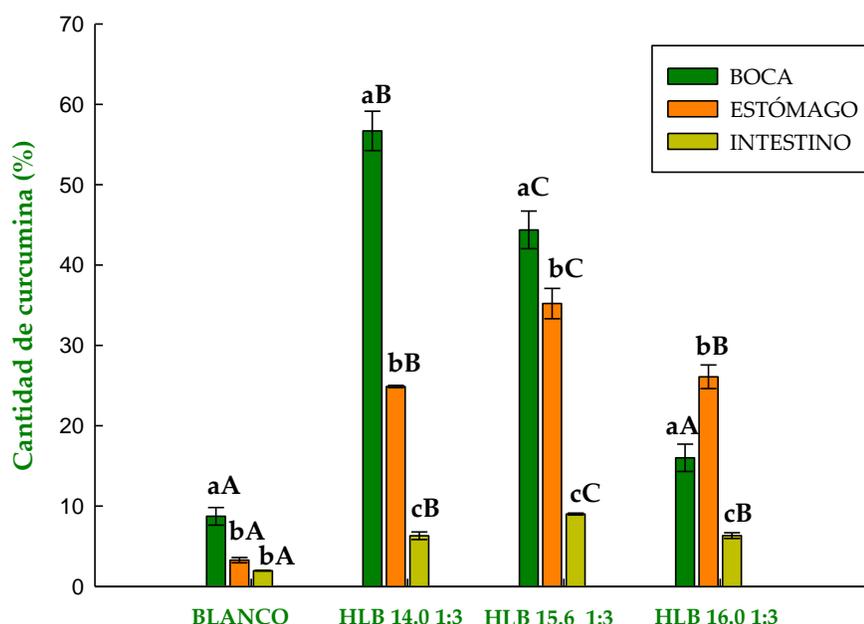
En la fase boca las nanoemulsiones tienen un potencial  $\zeta$  de  $-26.35 \pm 0.36$ ;  $-20.11 \pm 0.28$ ;  $-37.40 \pm 0.39$  y  $-34.60 \pm 0.31$  mV para las formulaciones HLB 16.0 1:3, HLB 15.6 1:3, HLB 14.0 1:2 y el blanco respectivamente. En todos los casos hay un cambio en el potencial  $\zeta$  en la fase gástrica, donde se observa un valor menos negativo de entre -13 y -22 mV, lo cual se puede atribuir al valor relativamente bajo de pH y las altas fuerzas iónicas de los fluidos gástricos. Zou *et al.* (2015), reportaron este mismo comportamiento para nanoemulsiones de curcumina, afirmando que el bajo pH conducirá a la protonación de los ácidos grasos libres presentes (-COOH) reduciendo así la carga neta de las gotas, mientras que la alta fuerza iónica dará lugar a la detección electrostática de las cargas superficiales (Israelachvili, 2011). Después de la exposición a los fluidos intestinales, se puede observar que los valores se vuelven altamente negativos  $\approx -27$  mV. Por lo que puede atribuirse a la presencia de varios constituyentes aniónicos en esta fase, tal como

sales biliares, fosfolípidos y ácidos grasos libres (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013). No hubo diferencias significativas entre las características eléctricas de las nanoemulsiones con diferentes tamaños de partículas después de la exposición en la fase intestinal. Este efecto sugiere que la composición interfacial de las gotas lipídicas no se ve afectado por el tamaño inicial de partícula.

#### **7.4.4. Retención de curcumina en las fases GI**

Las formulaciones con HLB 15.6 1:3, HLB 14.0 1:3 y el blanco presentaron pérdida de curcumina al paso del tracto GI (Figura 22). En la fase boca mantuvieron el 44.37, 56.70 y 8.73% de curcumina respectivamente, para la fase estómago 35.21, 25.89 y 3.29% respectivamente y finalmente para la fase intestinal 9.02, 6.32 y 1.97% respectivamente teniendo pérdida progresiva de la curcumina presente durante su paso a través del modelo de digestión *in vitro*. La pérdida de curcumina puede atribuirse en parte a los efectos de dilución en la concentración de las gotas lipídicas (Hur *et al.*, 2009). En cada paso del modelo de digestión se diluyen las emulsiones con la saliva simulada, jugos gástricos, jugos pancreáticos o jugos biliares. Sin embargo, para el blanco se puede observar una pérdida por arriba del 50% en la fase estómago, fenómeno no observado en las demás formulaciones, demostrando que el recubrimiento de las partículas lipídicas con surfactantes ayuda a evitar la pronta liberación de curcumina en el tracto GI.

Fenómeno contrario se observó en la nanoemulsión con HLB 16.0 1:3, la cual presentó mayor liberación de curcumina al pasar de la boca al estómago; teniendo en boca 16.02%, estómago 26.09% y en intestino 6.33%. Sari *et al.* (2014) reportaron un incremento de la cantidad de curcumina en la fase gástrica en nanoemulsiones estabilizadas con Tween 80 y concentrado de proteína de suero. Ellos atribuyeron este comportamiento a la ruptura de la capa del surfactante que cubre las gotas de las emulsiones las cuales protegen a la curcumina, provocando mayor liberación, dando como resultado el incremento en la concentración de curcumina en la fase gástrica.



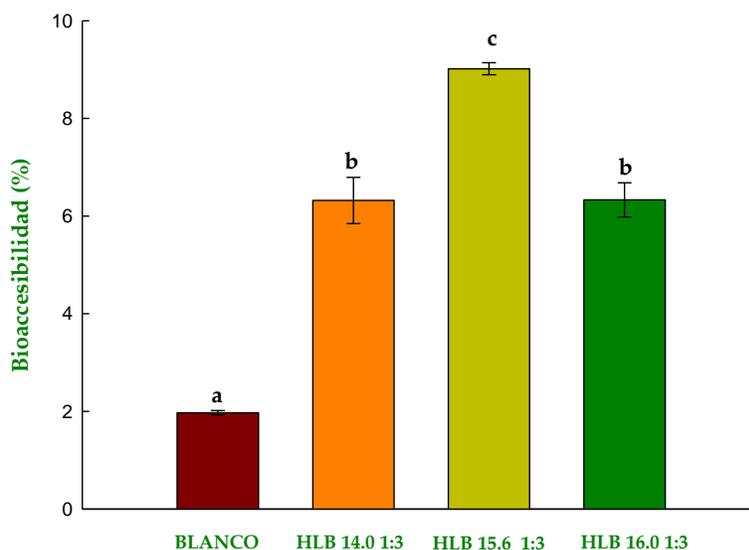
**Figura 22.** Influencia de las condiciones gastrointestinales simuladas en estabilidad de la curcumina en las diferentes formulaciones. Diferentes letras minúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de curcumina de una nanoemulsión entre las fases de la digestión. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de curcumina entre los tipos de nanoemulsión (Blanco, HLB 16 1:3, HLB 15.6 1:3 Y HLB 14 1:3) dentro de la misma fase de la digestión.

En la fase intestinal para todos los casos, existe una reducción estadísticamente significativa en la cantidad de curcumina. Como se observa en la Figura 22 la cantidad de curcumina es menor al 10% para las nanoemulsiones y menor al 2% para el blanco. Esta reducción puede deberse a varios factores como pueden ser la dilución de las nanoemulsiones con la saliva, fluidos gástrico e intestinales al paso del tracto GI. Por otra parte la reducción de la cantidad de curcumina en el intestino, puede estar asociada con la ruptura de las gotas en el estómago, por las condiciones gástricas (pH 2.5), por lo que una baja cantidad de curcumina llega al intestino para poder ser emulsificada por las sales biliares (Cheong *et al.*, 2016).

## 7.5. Determinación de la bioaccesibilidad de las nanoemulsiones.

### 7.5.1. Influencia del HLB en la bioaccesibilidad

Los resultados obtenidos para la bioaccesibilidad se presentan en la Figura 23 donde se puede observar que la bioaccesibilidad fue mayor en las nanoemulsiones en comparación con el blanco presentando hasta un 400% en el mejor de los casos. Los porcentajes de bioaccesibilidad obtenidos fueron 1.97, 6.32, 9.02 y 6.33% para la curcumina no encapsulada, HLB 14.0 1:3, HLB 15.6 1:3 Y HLB 16.0 1:3 respectivamente.



**Figura 23.** Porcentaje de bioaccesibilidad en las diferentes formulaciones. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la bioaccesibilidad entre las distintas formulaciones.

Se puede apreciar que para el HLB 14.0 y 16.0 no existe diferencia estadísticamente significativa en la bioaccesibilidad, sin embargo ambas formulaciones presentaron los porcentajes más bajos. Pinheiro *et al.* (2015) reportaron resultados bajos en cuanto a bioaccesibilidad. Ellos elaboraron nanoemulsiones de curcumina estabilizadas con lactoferrina y una combinación de lactoferrina con alginato al 50% obteniendo  $\approx 5\%$  de bioaccesibilidad en el mejor de los casos, ellos atribuyeron estos bajos porcentajes a que la curcumina se une a las moléculas de lactoferrina o a los productos de la digestión de la lactoferrina que hacen no detectable a la curcumina en la fase micelar.

Los bajos porcentajes de bioaccesibilidad obtenidos en este trabajo pueden ser resultado de la permeabilidad de los surfactantes a la acción de la lipasa. Estudios han

demostrado que el tipo de surfactante tiene influencia en bioaccesibilidad. Una posible explicación es el fenómeno de adsorción competitivo, ya que durante la emulsificación la cual ocurre en el intestino, existe un desplazamiento de las moléculas de surfactante por las sales biliares (surfactantes naturales) y la lipasa (McClements y Li, 2010). Por ejemplo, se sabe que el surfactante original en una emulsión O/W puede ser desplazado de las superficies de las gotas ya sea a través de la digestión enzimática o mediante desplazamiento por agentes activos de superficie, tales como sales biliares, fosfolípidos o enzimas.

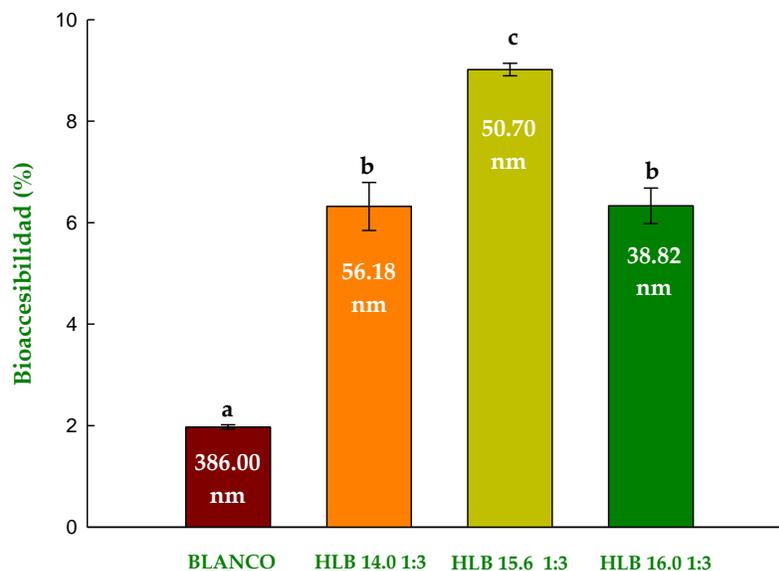
Cuando un revestimiento se utiliza para encapsular y proteger un componente bioactivo de alimentos (por ejemplo, los ácidos grasos  $\omega$ -3, carotenoides y fitoesteroles), es esencial que se rompa en el tracto GI de forma que el componente bioactivo sea liberado y absorbido, de lo contrario los beneficios potenciales del biocomponente no serán aprovechados (McClements y Li, 2010). Numerosos estudios han sido encaminados hacia el impacto de los recubrimientos en escala nanométrica en la digestibilidad de lípidos encapsulados (Mun *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007). McClements y Li (2010) reportaron una reducción en la acción de la lipasa en una nanoemulsión estabilizada con quitosano y lecitina debido a la formación de una capa gruesa alrededor de las gotas y de grandes flóculos lo que limitó el acceso de la lipasa a las gotas lipídicas.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, demostrando que la bioaccesibilidad es afectada por el valor del HLB. Estudios *in vitro* pueden proporcionar información para el diseño de recubrimientos que puedan ser impermeables a las condiciones biológicas como el pH, fuerzas iónicas y enzimas, pero que al mismo tiempo que puedan ser degradadas en sitios de acción específicos, mejorando de esta manera la bioaccesibilidad de componentes activos lipofílicos.

#### **7.5.2. Influencia del tamaño de partícula en la bioaccesibilidad de las nanoemulsiones.**

Para el caso de las nanoemulsiones con HLB 14.0 y 16.0 (% bioaccesibilidad 6.33 y 6.32 respectivamente) no existen diferencias significativas, sin embargo, para la formulación con HLB 14.0 (% bioaccesibilidad 6.33) es la que presentó mayor tamaño de partícula y menor porcentaje de bioaccesibilidad (Figura 24). Zou *et al.* (2015) reportaron

un decremento en la bioaccesibilidad en nanoemulsiones de curcumina cuando redujeron el tamaño de partícula obteniendo porcentajes de bioaccesibilidad  $\approx 60$ , muy por arriba de los obtenidos en este trabajo.



**Figura 24.** Influencia del tamaño de partícula en la bioaccesibilidad de las nanoemulsiones. Diferentes letras mayúsculas significan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la bioaccesibilidad entre las distintas formulaciones.

Cabe señalar que estos autores entre otros (Ahmed *et al.*, 2012; Sari *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2015), consideraron la bioaccesibilidad como el cociente de la cantidad de curcumina en el intestino antes de la centrifugación (cantidad de curcumina digerida en crudo) la cual no ha sido químicamente degradada, entre la cantidad de curcumina después de la centrifugación (fase micelar) la cual es una medida de la cantidad que es químicamente estable y solubilizada dentro de las micelas mixtas. En este trabajo, se calculó la bioaccesibilidad como el cociente de la cantidad de curcumina inicial (cantidad de curcumina que se encuentra disuelta en la saliva) entre la cantidad en la fase micelar (después de la centrifugación). Razón por la cual los porcentajes de bioaccesibilidad se encuentran por debajo.

Sin embargo, Zou *et al.* (2015) atribuyeron este decremento en la bioaccesibilidad a la reducción del tamaño de partícula. Existen un número de posibles mecanismos fisicoquímicos que pueden explicar estos resultados. La degradación química de la curcumina es probable que sea más lenta en gotas grandes que en gotas pequeñas, ya que tiene un área de superficie específica menor expuesta a la fase acuosa circundante. La digestión de lípidos es un fenómeno interfacial que implica la adsorción de moléculas de lipasa en la superficie de las gotas lipídicas de manera que la enzima puede entrar en las proximidades con su sustrato (generalmente triacilgliceroles). Por lo tanto, se esperaría que la velocidad de digestión de lípidos aumenta con la disminución de tamaño de la gota, ya que esto conduciría a un aumento en el área superficial de las gotas lipídicas expuestas a la lipasa (McClements y Li, 2010).

Por otra parte, es probable que fuera mayor la bioaccesibilidad de la curcumina en la fase de micela mixta formada a partir de las gotas más pequeñas debido a la digestión más rápida y extensa de lípidos. La digestión más lenta de las gotas grandes también puede haber aumentado la estabilidad química de la curcumina porque las moléculas de curcumina pasarían más tiempo dentro de los interiores hidrófobos de las gotas, en lugar de en la fase de micelas mixtas (Zou *et al.*, 2015). Se debe mencionar que el tamaño de las gotas lipídicas puede cambiar apreciablemente después de la ingestión de un sistema de liberación, por ejemplo, debido rompimiento de la gota, coalescencia, floculación o digestión (McClements *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). En consecuencia, el tamaño de las gotas que llegan al intestino delgado puede ser bastante diferentes de las que se ingieren. Por lo tanto, es importante controlar tanto la estabilidad física y la digestibilidad de gotas lipídicas dentro del tracto GI con el fin de controlar la velocidad de liberación de los ácidos grasos libres a través de la alteración de la superficie.

Con base a los resultados obtenidos, en el caso de la formulación con HLB 14.0 1:3 la cual presentó el mayor tamaño de partícula, su porcentaje de bioaccesibilidad está por debajo de la que presentó la formulación HLB 15.6 1:3 teniendo un tamaño de partícula menor siendo que el tamaño de partícula no tiene influencia en la bioaccesibilidad bajo estas condiciones por lo que el parámetro que tuvo mayor influencia fue el valor de HLB.

## 8. CONCLUSIONES

La concentración de la fase dispersa, HLB y concentración de surfactante tuvieron un efecto significativo en la disminución del tamaño de partícula e índice de polidispersión. Con el incremento en la concentración del surfactante hay un decremento en el tamaño de partícula. Resultando para las formulaciones con HLB 16.0 y 15.6 relación 1:3 y HLB 14.0 relación 1:2 de surfactante, tamaños < 60 nm y PDI < 0.5.

Durante el almacenamiento a 4 °C las nanoemulsiones con mayor estabilidad fisicoquímica fueron las formulaciones con HLB 16.0, 15.6 relación 1:3 de surfactante y HLB 14.0 con una relación 1:2 de surfactante, presentando tamaños de partícula < 60 nm, PDI < 0.5 y potencial  $\zeta \approx -20$  mV y conservando más del 85% de curcumina. Las formulaciones que obtuvieron menor tamaño de partícula, presentaron mayor degradación de curcumina, sin embargo, retuvieron mayor cantidad en comparación con otros trabajos reportados.

La actividad antioxidante al finalizar el almacenamiento tiene un incremento estadísticamente significativo, pudiendo ser respuesta de los productos de la degradación de la curcumina.

La nanoemulsión con valor HLB 15.6 relación 1:3 obtuvo mayor bioaccesibilidad, en comparación con las demás formulaciones a pesar de no presentar el tamaño de partícula menor. Estos resultados sugieren que existe protección de la curcumina por este surfactante durante el paso gastrointestinal en condiciones simuladas.

## 9. REFERENCIAS

- Abbas S., E. Karangwaa, M. Basharia, K. Hayatb, X. Honga, R. Sharifa H. y X. Zhang. **2014**. Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. Elsevier, 21: 1265-1274
- Acosta, E. **2009**. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 14:3–15.
- Aggarwal B.B. y B. Sung. **2009**. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. Trends Pharmacology Science. 30: 85–94
- Ahmed K., Y. Li, D.J. McClements y H. Xiao. **2012**. Nanoemulsion and emulsion based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. Food Chemistry, 132: 799-807
- Alex A. F., M. Spitznas, P. Tittel A., C. Kurts y N. Eter . **2010**. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG), resveratrol, and curcumin on proliferation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. Current Eye Research, 35:1021–1033
- Anandharamakrishnan C. 2014. Techniques for nanoencapsulation of food ingredients. India. Springer briefs in food, health and nutrition.
- Anton N., P. Gayet, J., P. Benoit, y P. Saulnier. **2007**. Nano-emulsions and nanocapsules by the pit method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. International Journal of Pharmaceutics, 344:44–52.
- Anton, N. y T. Vandamme F. **2009**. The universality of low-energy nanoemulsification. International Journal of Pharmaceutics, 377:142–147.
- Anton, N., P. Gayet, J., P. Benoit y P. Saulnier. **2007**. Nano-emulsions and nanocapsules by the pit method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. International Journal of Pharmaceutics, 344:44–52.
- Anuchapreeda S., Y. Fukumori, S. Okonogi y H. Ichikawa. **2011**. Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy. Journal of Nanotechnology. 2012: 1-14
- Bao W, K. Li, S. Rong, P. Yao, L. Hao, C. Ying, X. Zhang, A. Nussler, L. Liu. 2010. Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving heme oxygenase-1 induction. Journal of Ethnopharmacology, 128:549–553
- Bartosz G. **2014**. Food oxidants and antioxidants. Chemical, biological and functional properties. 1a ed. New York, E.U. CRC Press.
- Bautista H. S. **2015**. Efecto del tamaño de gota y HLB (balance hidrófilo-lipófilo) en la bioaccesibilidad de nanoemulsiones de p prika (Capsicum annum L.) (Licenciatura). Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Qu micas.
- Bergonzi M. C., R. Hamdouch, F. Mazzacuva, B. Isacchi y A. Bilia R. **2014**. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions. Food science and technology, 59: 148-155

- Beysseriat, M., E. Decker A. y J. McClements, D. **2006**. Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. *Food Hydrocolloids*, 20: 800-809.
- Bhartiya U.S., J. Joseph L., S. Raut Y. y S. Rao B. **2010**. Effect of *Ocimum sanctum*, turmeric extract and vitamin E supplementation on the salivary gland and bone marrow of radioiodine exposed mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48:566–571
- Bishwajit K. y Lutful A. M. **2014**. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *ISRN Nanotechnology*, 10:1-12
- Biswas J., D. Sinha, S. Mukherjee, S. Roy, M. Siddiqi y M. Roy. **2010**. Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal. *Human and Experimental Toxicology*, 29:513–524
- Borrin, T., Georges, E., Moraes, I., y Pinho, S. **2016**. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physico-chemical stability. *Journal Of Food Engineering*, 169: 1-9.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., y Bohn, T. **2011**. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128:14-21.
- Bouchemal K., S. Briançon, E. Perrier, H. Fessi. 2004. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Pharmaceutical nanotechnology*, 280: 241-251
- Calva E. S. 2016. Caracterización, actividad antioxidante y estabilidad de una emulsión O/W de carotenoides totales empleando jugo de zarzamora como fase continua. Maestría. Universidad Veracruzana.
- Campos S. M., L. Guerrero C. y D. Acona B. **2013**. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Universidad Autónoma de Yucatán; Yucatán, México. Omnia Publisher.
- Charles D.J. **2013**. Antioxidant properties of spices, herbs and others sources. Springer, 55: 563-580
- Chattopadhyay I., Biswas K., Bandyopadhyay U y Banerjee R. K., **2009**. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current science*, 87 (1), pp.44-53.
- Cheng. A. L., H.Hsu C., K. Lin J., M. Hsu M., F. Ho Y., S. Shen T., J. Ko Y., T. Lin J., R. Lin B., W. Ming- Shiang, S. Yu H., H. Jee S., S. Chen G., M. Chen T. y Y. Hsieh C. **2001**. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Research*, 21 (4B): 2895-2900
- Cheong, A., C. Tan y K. Nyam. **2016**. In-vitro gastrointestinal digestion of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions. *Industrial Crops And Products*, 87:1-8.
- Chiu, W. **2006**. The Preparation and Physical Properties of Jojoba Oil Nano- Emulsion, Doctoral Dissertation, Department of Applied Chemistry, China.
- de Morais, J., O. Santos, T. Delicato, R. Goncalves, P. Rocha. **2006**. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required hlb number and emulsion phase inversion methods. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27:109–115.

- Do, L., A. Withayyapayanon, J. Harwell y D. Sabatini. **2009**. Environmentally friendly vegetable oil microemulsions using extended surfactants and linkers. *Journal of Surfactants and Detergents*, 12:91–99.
- Galato D, K. Ckless, F. Susin M., C. Giacomelli, M. Ribeiro-do-Valle R. y A. Spinelli. **2001**. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. *Redox Report*, 6(4): 243-250.
- Galindo-Alvarez, J., D. Boyd, P. Marchal, C. Tribet, P. Perrin, E. Marie-Bégué, A. Durand y V. Sadtler. 2011. Miniemulsion polymerization templates: A systematic comparison between low energy emulsification (Near-PIT) and ultrasound emulsification methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 374 (1-3):134-141.
- Gamboa-Gómez C.I., D. Hernández-Saavedra, A. Gallegos-Infante J., F. González- Laredo R., L. Manzocco y E. Rocha- Guzmán N. **2013**. Polyphenolic content and antioxidant activity of leaf extracts from *Quercus durifolia*, *Quercus eduardii*, *Quercus sideroxylla* and *Quercus resinosa*. *Academic Journals*, 7(35): 2564-2573.
- Golding, M. y J. Wooster T. 2010. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15:90-101.
- Henry, J., P. Fryer, W. Frith y I. Norton. **2009**. Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilized with tweens (20 and 80), brij 96v and sucrose monoesters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338:201–206.
- Herrera M.L. **2012**. Analytical Techniques for Studying the Physical Properties of Lipid Emulsions. *Springer Briefs in Food, Health and Nutrition* 3, 18(61): 7-14.
- Herrmann K., H. Salminen y J. Weiss. 2013. Oil-in-water emulsions as a delivery system n-3 fatty acids in meat products. *Meat Science*, 114:659-667
- Hoeller, S., A. Sperger y C. Valenta. **2009**. Lecithin based nanoemulsions: a Comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 370:181–186.
- Hur, S. J., Decker, E. A. y McClements, D. J. **2009**. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114: 253-262.
- Hur, S., S. Joo, B. Lim, E. Decker y J. McClements D. **2011**. Impact of salt and lipid type on in vitro digestion of emulsified lipids. *Food Chemistry*, 126(4):1559-1564.
- Huyskens P. L. y M. Haulait-Pirson C. 1985. Influence of H-bond chains in solvents on the solubility of inert substances. *Journal of Molecular Liquids*, 31:153–176.
- Imeson A. **2010**. Food stabilisers, thickeners and gelling agents. Wiley-Blackwell. 368 p.
- Israelachvili J. **2011**. Intermolecular and surface forces, 3ª edición. London, UK: Academic Press.
- Jafari, S., Y. He y B. Bhandari. **2007**. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology*, 225:733–741.

- Jiménez M., E. Azuara, J. Vernon-Carter, G. Luna-Solano, C.I. Beristain. **2011**. Antioxidant activity of microcapsules of *Rubus* sp. juice using spray drying. Presentado en el 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11), realizado del 22 al 26 de Mayo del 2011 en Atenas, Grecia, vol III. Pags 2097-2098. ISBN: 978-960-89789.
- Kalantzi, L., K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsoon, J. Dressman y C. Reppas. **2006**. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailability/Bioequivalence Studies. *Pharmaceutical Research*, 23:165-176.
- Karami M, Alimon AR, Sazili AQ, Goh YM, Ivan M. **2011**. Effects of dietary antioxidants on the quality, fatty acid profile, and lipid oxidation of longissimus muscle in Kacang goat with aging time. *Meat Science*, 88(1):102–108
- Kesisoglou F., S. Panmai y Y. Wu H. 2007. Application of nanoparticules in oral delivery of immediate release formulations. *Current nanoscience*, 3(2): 183-190
- Kim T., E. Decker y J. Lee. (2012). Antioxidant capacities of  $\alpha$ -tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 133(1):68-75.
- Kong L., K. Beattie J. y J. Hunter R. **2001**. Effects of nonionic surfactant and sodium dodecyl sulfate layers on electroacoustics of hexadecane/water emulsions. *Colloid & Polymer Science*, 279 (7):678-687.
- Koroleva Y. M. y E. Yurtov V. **2012**. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising. *Journal Usp*, 81(1):21- 43.
- Kralova, I. y J. Sjoblom. **2009**. Surfactants used in food industry: A review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30:1363–1383.
- Kundu, P., V. Kumar y I. Mishra. **2015**. Modeling the steady-shear rheological behavior of dilute to highly concentrated oil-in-water (o/w) emulsions: Effect of temperature, oil volume fraction and anionic surfactant concentration. *Journal Of Petroleum Science And Engineering*, 129:189-204.
- Lethuaut L., F. Metro y C. Genot. 2002. Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *Oil Chemyst Society*, 79:425-430
- Li M.K. y S. Fogler H. 1978. Acoustic emulsification Part 1. The instability of the oil water interface to form the initial droplets. *Journal of Fluid Mechanics*, 88: 499–511.
- Liu, W., D. Sun, C. Li, Q. Liu y J. Xu. **2006**. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303:557–563.
- Lovaglio, R.B., J. Santos F., J. Junior, M. y J. Contiero. 2011. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85:301–305.
- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B. P., y Mukherjee, P. K. **2007**. Curcuminphospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 330:155–163.
- Manzocco L, M. Anese y M. Nicoli C. 1998. Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 31: 694-698.

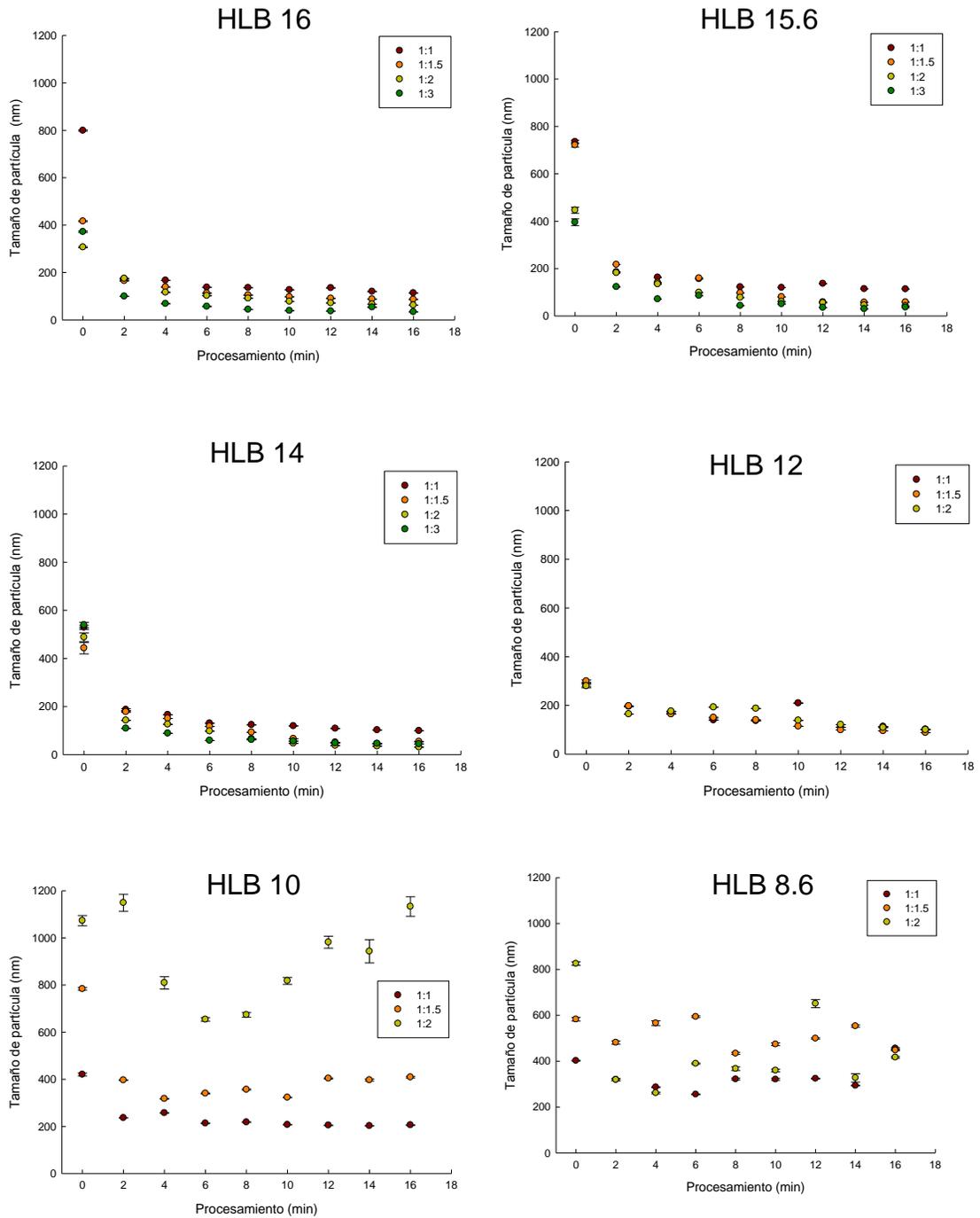
- Mao, Y. y McClements, D. **2012**. Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions. *Food & Function*, 3(10):1025.
- Márquez L. A., G. Palazolo G. y J. Wagner R. **2007**. Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology. *Colloid and Polymer Science*, (285):1119–1128
- Mason T. G. y M. Fryd M. 2012. Advanced nanoemulsions. *Annual review of physical chemistry*. 63(1):493-518.
- Mason T.G., N. Wilking, J., K. Meleson, B. Chang, C. y M. Graves S. **2006**. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 18(41):R635–R666.
- McClements D. J. **1999**. *Food Emulsions: Principles, practices and Techniques*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- McClements D. J. y E. Decker. 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*. 65:1270-1282
- McClements D. J. y J. Rao. **2011**. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 285-330
- McClements D. J., **2005**. *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. 2da ed. Boca Raton, Florida: CRC.
- McClements D. J., **2012**. *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. 3ra ed. Boca Raton, Florida: CRC.
- McClements D. J., H. Xiao, Y. Li y A. Ahmed. **2012**. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132:799-807
- McClements, D. J., E. Decker A., y Y. Park. **2009**. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1):48–67.
- McClements, D. y Y. Li. **2010**. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances In Colloid And Interface Science*, 159(2):213-228.
- Moghadamtousi Z. S., Kadir H. A., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S. y Zandi K. **2014**. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International*, 130:1-12
- Mun, S., E. Decker, Y. Park, J. Weiss y D. McClements. **2006**. Influence of Interfacial Composition on in Vitro Digestibility of Emulsified Lipids: Potential Mechanism for Chitosan's Ability to Inhibit Fat Digestion. *Food Biophysics*, 1(1): 21-29.
- Muthayya M. **2002**. *Human physiology*. 3ra ed. Jaypee Brothers. Nueva Delhi, República de la India p. 135
- Nicoli M.C., R. Toniolo y M. Anese. **2004**. Relationship between redox potential and chain-breaking activity of model systems and foods. *Food chemistry*, 88: 79-83

- Palamakula, A. y M. Khan. **2004**. Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q10 self-emulsifying drug delivery systems (Sedds). *International Journal of Pharmaceutics*, 273:63–73.
- Park, G., S. Mun, Y. Park, S. Rhee, E. Decker, E y J. Weiss. **2007**. Influence of encapsulation of emulsified lipids with chitosan on their in vivo digestibility. *Food Chemistry*, 104(2):761-767.
- Perrechil, F.A. y L. Cunha R. **2010**. Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. *Journal Food Engineering*, 97:441–448.
- Pinheiro, A., M. Coimbra y A. Vicente. **2016**. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers – Effect of interfacial composition. *Food Hydrocolloids*, 52:460-467.
- Ravindran P.N., K. Babu M. y K. Sivaraman. **2007**. *Turmeric: El genus Curcuma*. 1a ed. Florida, U.S.A.: CRC.
- Robins, M., A. Watson, y P. Wilde. **2002**. Emulsions—creaming and rheology. *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 7(5-6):419-425.
- Ruiz M. D. **2010**. *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos, Volumen 2*. Madrid, España. Editorial Panamericana
- Saberri, A. H., Fang, Y., y McClements, D. J. **2013**. Effect of glicerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 411, 105–113.
- Salvia-Trujillo L., Qian, C., Martín-Belloso, O., y McClements, D. **2013**. Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2), 1472–1480.
- Sanguansri, P. y Augustin, M. A. **2006**. Nanoscale materials development-a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 547-556.
- Sari T.P., Mann B., Kumar R., Singh R.R.B., Sharma R., Bhardwaj M. y Athira S. **2014**. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, xxx (2014):1-7
- Sarkar, A., Goh, K. K. T. y Singh, H. **2009a**. Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloids*, 23:1270-1278.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., Singh, H. y Singh, H. **2009b**. Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by [beta]-lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23:1563-1569.
- Sarkar, A., Goh, K. K. T., y Singh, H. **2010**. Properties of oil-in-water emulsions stabilized by beta-lactoglobulin in simulated gastric fluid as influenced by ionic strength and presence of mucin. *Food Hydrocolloids*, 24:534–541.
- Schmidts, T., Dobler, D., Guldán, A., Paulus, N. and Runkel, F. **2010**. Multiple W/O/W emulsions—Using the required HLB for emulsifier evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372:48-54.
- Shen, L. y H. Ji, H. **2012**. The pharmacology of curcumin: is it the degradation products? *Trends in Molecular Medicine*, 18:138-144.

- Sing de Ugaz O. L. **1997**. Colorantes naturales. 1a ed. Perú: Fondo editorial.
- Singh, H., Ye, A. y Horne, D. **2009**. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48:92-100.
- Sol, I., Maestro, A., Pey, C., González, C., Solans, C., and Guti, J. érrrez **2006**. Nano-emulsions preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288(1–3):138–143.
- Solans C., N. Sadurní, N. Azemar y J. García-Celma M. **2005**. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26:438– 445.
- Solé, I., Maestro, A., González, C., Solans, C., and J. Gutierrez. **2006**. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in anionic surfactant system. *Langmuir*, 22(20):8326–8332.
- Sonneville-Aubrun, O., T. Simonnet J. y F. L'Alloret. **2004**. Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108:145–149.
- Sonneville-Aubrun, O., T. Simonnet, J., y F. L'Alloret. **2004**. Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108:145–149.
- Syed H. K., B. Liew K., O. K. Loh G. y K. Peh K. **2015**. Stability indicating HPLC-UV method for detection of curcumin in Curcuma longa extract and emulsion formulation. *Food Chemistry*, 170: 321-326.
- Tadros T., Izquierdo P., Esquena J. y Solans C. **2004**. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109: 303-318
- Tadros, T., R. Izquierdo, J. Esquena y C. Solans. **2004**. Formation and stability of nano emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109:303–318.
- Tuba I. G. **2008**. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 30(174): 27-37.
- Vargas F.D. y López P.O., **2000**. Natural colorants for food and nutraceutical uses. 1a ed. Florida, U.S.A.: CRC.
- Vingerhoeds, M., Blijdenstein, T., Zoet, F., y Van A. G. **2005**. Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 915-922.
- Wang L., N. Lu, L. Zhao, C. Qi, W. Zhang, J. Dong y X. Hao. **2016**. Characterization of stress degradation products of curcumin and its two derivatives by UPLC–DAD–MS/MS. *Arabian Journal of Chemistry*, xx:xx
- Wang X., Jiang Y., Wang Y. W., Huang M.T., Ho C. T. y Huang Q. **2007**. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. *Food Chemistry*, 108 (2008): 419–424
- Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., y Li, X. **2009**. Design and optimization of a new self nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330: 443–448.
- Waraho, T., McClements, D., y Decker, E. **2011**. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends In Food Science and Technology*, 22: 3-13.

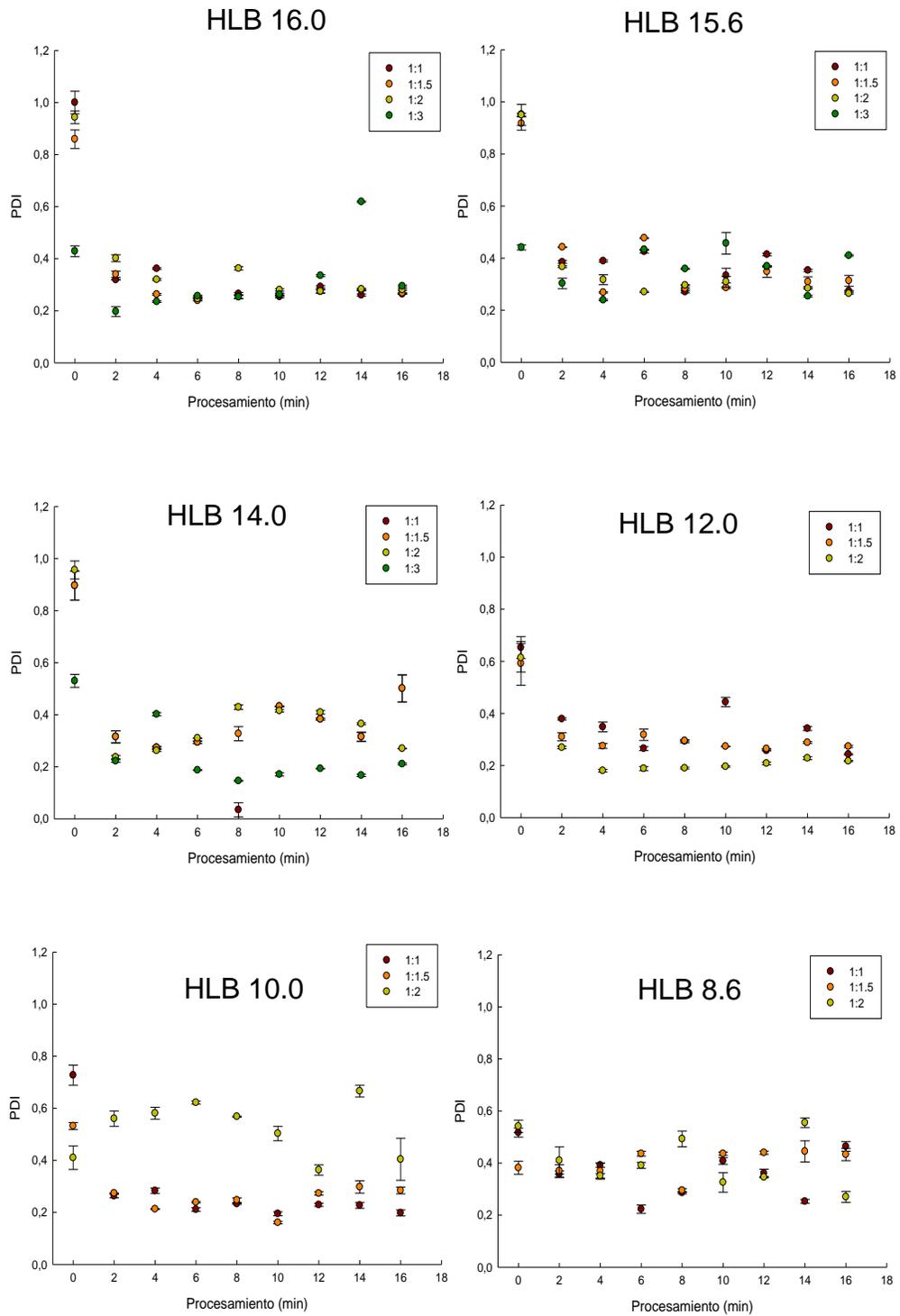
- Weiss, J., A. Decker E., D. McClements J., K. Kristbergsson, T. Helgason y T. Awad. **2008**. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3(2):146–154.
- Wooster, T., M. Golding y P. Sanguansri. **2008**. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*, 24:12758–12765.
- Zhao J., Zhang J.S., Yang B., Lv GP., Li S.P. **2010**. Free radical scavenging activity and characterization of sesquiterpenoids in four species of *Curcuma* using a TLC bioautography assay and GC-MS analysis. *Molecules*, 15:7547–7557.
- Zou, L., Zheng, B., Liu, W., Liu, C., Xiao, H. y McClements, D. **2015**. Enhancing nutraceutical bioavailability using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size on solubility and bioaccessibility of powdered curcumin. *Journal Of Functional Foods*, 15: 72-83.

## APÉNDICE A



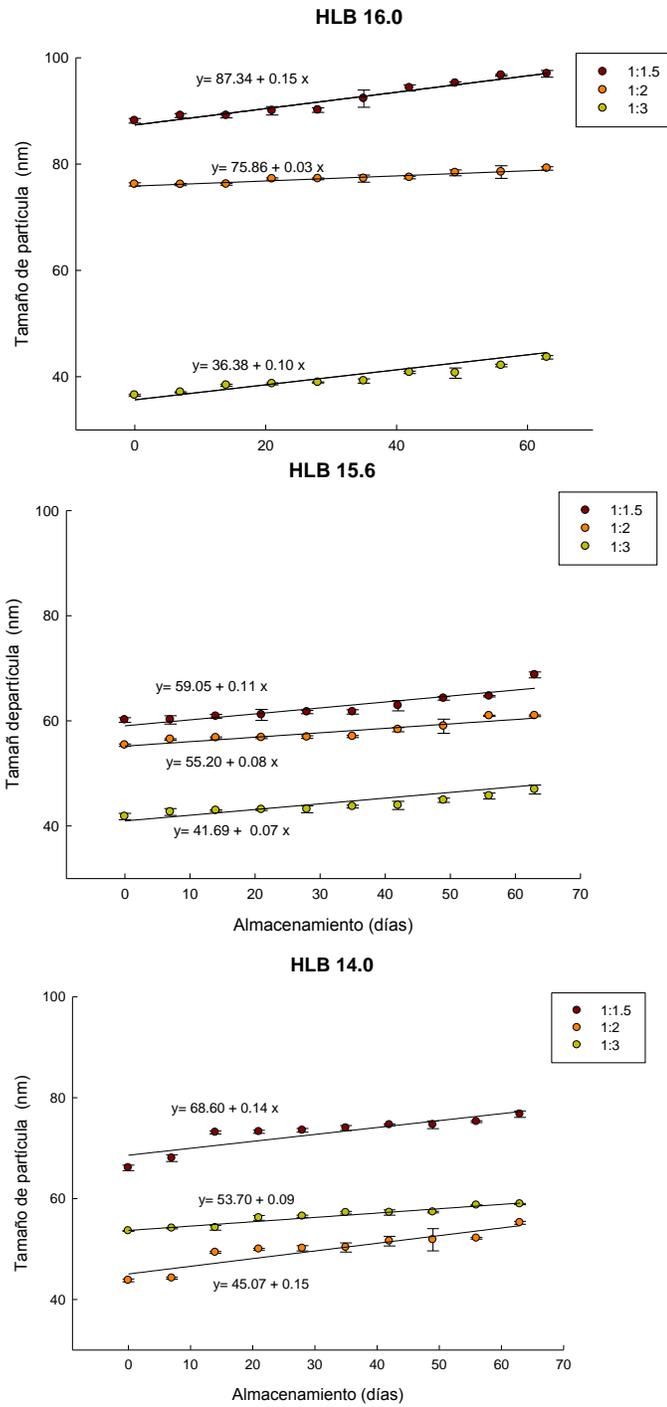
Efecto del procesamiento (min) ultrasónico en el tamaño de partícula, a diferentes valores HLB y proporciones fase oleosa/surfactante.

## APÉNDICE B



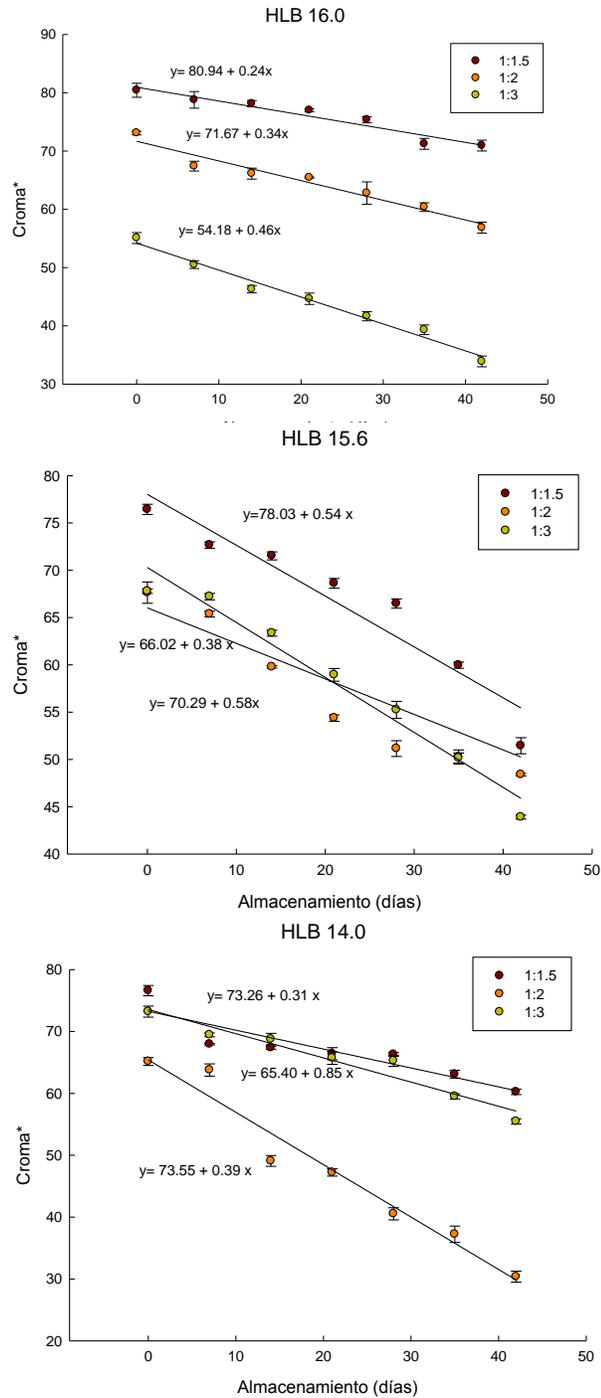
Efecto del valor HLB, concentración de surfactante y tiempo de procesamiento en el PDI.

## APÉNDICE C



Cinéticas orden cero para la velocidad de crecimiento de partícula para cada formulación

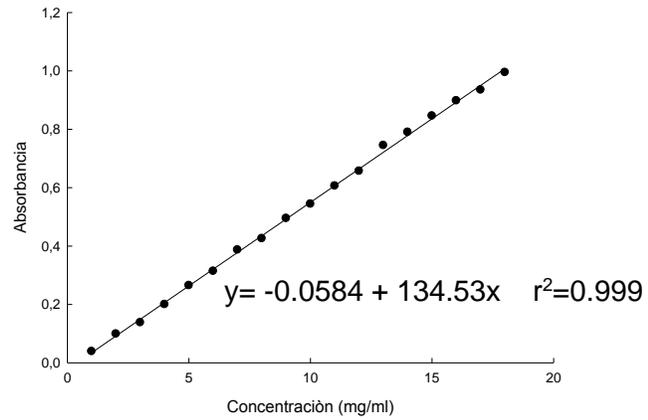
## APÉNDICE D



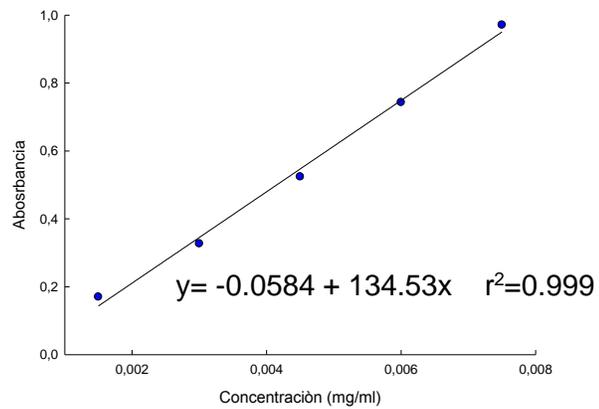
Cinéticas orden cero para la degradación de Croma para cada formulación

## APÉNDICE E

### Curva de calibración curcumina en aceite de canola



### Curva de calibración curcumina en cloroformo



### Curva para DPPH

