



Universidad Veracruzana

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

*INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS*



Elaboración y caracterización de cristales líquidos  
bioactivos

Tesis que para obtener el grado de Maestro en  
Ciencias Alimentarias

Presenta:

I. en A. Montserrat Paulina Jiménez Escobar

Directores de Tesis:

Dr. Cesar I. Beristain Guevara

Dra. Luz Alicia Pascual Pineda

Xalapa, Veracruz

Septiembre 2017



La presente tesis titulada

**Elaboración y caracterización de cristales líquidos bioactivos**

Realizada por la

**I.A. MONTSERRAT PAULINA JIMÉNEZ ESCOBAR**

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 18 de septiembre de 2017.

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Dra. Elia Nora Aquino Bolaños

Dr. Enrique Bonilla Zavaleta

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por el apoyo otorgado mediante el Proyecto 252692.

Al Doctor César Ignacio Beristain Guevara, mi director, por contagiarme de su pasión por la ciencia, de quién aprendí que la investigación se realiza de diferentes maneras y que en el proceso adquirimos y en otros casos fabricamos herramientas propias para profundizar en nuestro objeto de estudio. El que me enseñó, la verdadera esencia de la investigación, sin perder de vista la finalidad, la capacidad de asombro y la necesidad de abordar nuestro problema desde todas las perspectivas posibles. Ejemplo de dedicación y verdadero compromiso con y para el conocimiento.

A la Doctora Luz Alicia Pascual Pineda, mi co-directora quien desde hace mucho tiempo ha sido más que una guía académica, a la que conozco, aprecio y admiro.

A mis lectores, la Dra. Elia Nora Aquino Bolaños, la Dra. Maribel Jiménez Fernández y el Dr. Enrique Bonilla Zavaleta por su disposición y sus observaciones.

## **DEDICATORIAS**

A mi abuela Bertha Lara Rodriguez por ser siempre la luz y motivación de mi camino.

A mi compañero de vida por confiar siempre en mi y ser el pilar en cada paso de mi vida, por todos los momentos experiencias y la conjunta persecución del conocimiento mutuo.

A mi sobrina Kamila por darme el ímpetu y la batería para ser una mejor persona y guía.

A mis hermanas por su confianza y apoyo incondicional.

A mis padres por motivarme a perseguir mis sueños y estar siempre a mi lado.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	2
2.1 Sistemas aceite-surfactante-agua (ASA).....	2
2.2 Formulación .....	2
2.2.1 Formulación fisicoquímica .....	3
2.2.1.2 Surfactantes .....	4
2.2.2 Variables fluomecánicas.....	6
2.2.3 Composición .....	7
2.3 Diagramas ternarios.....	8
2.4 Diagramas de Winsor.....	9
2.5 Cristales líquidos.....	11
2.5.1 Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL).....	14
2.5.1.1 Fase Lamelar .....	16
2.5.1.2 Fase hexagonal.....	17
2.5.1.3 Fase cúbica.....	18
3. ANTECEDENTES.....	23
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	26
5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	27
5.1 Objetivo General .....	27
5.2 Objetivos Específicos .....	27
6. HIPÓTESIS.....	27
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
7.1 Materiales .....	28
7.2.1 Barrido de composición unidimensional .....	28
7.2.2 Formulación del HLB.....	29
7.2.3 Elaboración del diagrama de fases pseudoternario e identificación de las fases .....	29
7.2.4 Polarimetría.....	30
7.2.5 Preparación de la fase oleosa cargada con el componente bioactivo ( $\beta$ - caroteno).....	30
7.2.6 Cuantificación de $\beta$ -caroteno. ....	30
7.2.7 Estabilidad del $\beta$ -caroteno durante el almacenamiento. ....	31

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
8.1 Barrido unidimensional.....	32
8.2 Construcción del diagrama de fases pseudoternario.....	32
8.3 Microscopía de luz polarizada.....	35
8.4 Estabilidad de carotenos.....	47
8.5 Efecto de la temperatura sobre las estructuras de Cristal Líquido.....	48
9. CONCLUSIONES.....	52
10. BIBLIOGRAFÍA.....	53
11. ANEXOS.....	57

## Índice de figuras

Figura 1 Esquema de los métodos de emulsificación según su energía. ....	6
Figura 2 Diagrama de fases pseudoternario .....	7
Figura 3 Representación esquemática de un barrido de composición .....	8
Figura 4 Comportamiento de fase de los sistemas aceite-surfactante-agua relacionado con el valor de la relación R de Winsor, extraído de Salager, 1999a. ...	10
Figura 5 Diagrama ternario en el que se esquematizan las diferentes estructuras que se pueden obtener y las zonas en que se puede encontrar cada una de ellas, tomado de Salager et al., 2015. ....	11
Figura 6. Representación esquemática del orden estructural de los cristales líquidos, adaptado de García-Colín & Rodríguez, 1995. ....	13
Figura 7 Representación de los diferentes agregados moleculares que se pueden tomar por moléculas anfifílicas en disolventes polares y no polares, tomado de Singh, 2000. ....	14
Figura 8 Representación esquemática de las diferentes estructuras cristalinas, tomado de Salager et al., 2015. ....	16
Figura 9 Estructura de la Fase Cristal Líquido Lamelar (CLL), tomado de Collings & Hird, 1997. ....	17
Figura 10 Estructura de la fase hexagonal (a) y hexagonal inversa (b), tomado de Singh, 2002. ....	18
Figura 11 Estructura de la fase cristal líquido liotrópico cúbico, extraído de Collings & Hird, 1997. ....	19
Figura 12 Representación de los diferentes diagramas para ejemplificar la influencia del tipo anfifílico (a), temperatura (b) y concentración de anfifílico (c) y su tendencia a la formación de las diferentes fases liotrópicas, adaptado de Fernández, 2006. ....	20
Figura 13 Imágen al microscopio de luz polarizada de muestras de cristal líquido, tomado de Shinoda & Friberg, 1986. ....	21
Figura 14 Fotografía de las muestras del barrido de composición unidimensional. .	32
Figura 15 Diagrama de fases para HLB 11 en el que se identifican las zonas monofásicas, bifásicas y trifásicas, así como las concentraciones a las que se encontraron cristales líquidos. ....	33

Figura 16 Diagrama de fases para HLB 12 en el que se identifican las zonas monofásicas, bifásicas y trifásicas, así como las concentraciones a las que se encontraron cristales líquidos. ....	35
Figura 17 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla de aceite-surfactante 1:9. ....	36
Figura 18 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla de aceite-surfactante 2:8. ....	37
Figura 19 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para mezcla de aceite-surfactante 3:7.	38
Figura 20 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla aceite-surfactante 4:6.	39
Figura 21 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 12, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla de aceite-surfactante 2:8 y 3:7. ....	40
Figura 22 Diferentes estructuras de los cristales líquidos para las proporciones 2:8 y 3:7 de mezcla aceite:surfactante a las relaciones 3:7 y 4:6 de mezcla:agua para HLB=11. ....	41
Figura 23. Diferencias estructurales de los cristales líquidos para las proporciones 4:6 de mezcla aceite:surfactante a las relaciones 3:7 y 4:6 de mezcla:agua para HLB=12. ....	43
Figura 24 Diagramas de fases pseudo-ternario para las diferentes mezclas de aceite-surfactante-agua, con y sin $\beta$ -caroteno. ....	44
Figura 25 Diagrama de fases HLB 11 cargado con $\beta$ -caroteno, y la ubicación de las concentraciones puntuales y las micrografías de las estructuras de cristal líquido vistas desde un microscopio de luz polarizada a 40X. ....	45



Figura 26 Gráfica de los volúmenes obtenidos de fase de cristal líquido para cada una de las mezclas del sistema adicionado con $\beta$ -caroteno para HLB 11.....	46
Figura 27 Degradación de carotenos para las diferentes muestras de CL para HLB 11, después de 15 y 30 de almacenamiento a una $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en condiciones de obscuridad.....	47
Figura 28 Muestra la gráfica de un ciclo de calentamiento que se llevó a cabo desde temperatura ambiente hasta $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente su enfriamiento hasta $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con las micrografías correspondientes a 40X en un Microscopio de luz polarizada. ....	49
Figura 29 Se muestra un segundo ciclo de calentamiento en el que se partió de la muestra de la figura 25 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se sometió a un enfriamiento lento hasta la $T=7\text{ }^{\circ}\text{C}$ y sus respectivas estructuras vistas en un microscopio de luz polarizada a 40X. ....	50
Figura 30 Se muestra un tercer ciclo de calentamiento en el que se partió de la muestra de la figura 26 a $T=7\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se sometió a un calentamiento lento hasta una $T=56\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se muestran sus respectivas estructuras vistas en un microscopio de luz polarizada a 40X.....	51
Figura 31 Curva de calibración $\beta$ -caroteno .....	57

## RESUMEN

En éste trabajo se elaboraron cristales líquidos utilizando la técnica de barrido unidimensional a partir de surfactantes grado alimenticio con el proposito de ser utilizados como vehículo y matriz de protección para biomoléculas como el  $\beta$ -caroteno. Se inició con un barrido unidimensional en el que se utilizó como variable de barrido el HLB de los diferentes surfactantes; el barrido se hizo a partir de la mezcla aceite-surfactante 50:50, posteriormente se aplicó la técnica de titulación con agua y se dejaron incubar durante 10 días a 37 °C. A continuación, se realizó la identificación de las fases mediante micriscopía y el barrido completo con los HLB que presentaron mesofases que fueron HLB 11 y 12. se compararon los diagramas de fase pseudoternarios obtenidos y las micrografías con y sin el  $\beta$ -caroteno. Finalmente, los cristales líquidos con  $\beta$ -caroteno se almacenaron durante 1 mes para cuantificar su degradación y se les aplicó tratamientos térmicos para evidenciar los posibles cambios estructurales. De éste trabajo se puede concluir que los surfactantes utilizados son adecuados para la elaboración de cristales líquidos adicionados con biomoléculas como el  $\beta$ -caroteno y que las técnicas de barrido unidimensional y construcción diagramas de fase pseudoternarios son una herramienta imprescindible para evaluar el comportamiento de fases y la influencia de las variables de formulación.

**Palabras clave:** cristales líquidos, matriz de protección,  $\beta$ -caroteno.

## SUMMARY

In this work liquid crystals were prepared using the one-dimensional scanning technique from food-grade surfactants for the purpose of being used as a vehicle and protective matrix for biomolecules such as  $\beta$ -carotene. It was started with a one-dimensional sweep in which the HLB of the different surfactants was used as the sweep variable; the sweep was made from the oil-surfactant mixture 50:50, then the titration technique was applied with water and allowed to incubate for 10 days at 37 ° C. Then the phases were identified by microscopy and the complete scanning with the HLB presenting mesophases that were HLB 11 and 12. The obtained pseudo-integer phase diagrams and the micrographs with and without  $\beta$ -carotene were compared. Finally, liquid crystals with  $\beta$ -carotene were stored for 1 month to quantify their degradation and thermal treatments were applied to evidence possible structural changes. From this work it can be concluded that the surfactants used are suitable for the elaboration of liquid crystals added with biomolecules such as  $\beta$ -carotene and that the techniques of one dimensional scanning and construction of pseudorange phase diagrams are an essential tool to evaluate the phase and the influence of formulation variables.

**Key words:** liquid crystals, protective matrix,  $\beta$ -carotene.

## 1. INTRODUCCIÓN

La ciencia y tecnología alimentaria se ha dado a la tarea desde hace ya algunos años de extraer y caracterizar una gran cantidad de compuestos contenidos en alimentos de origen animal y vegetal, sin embargo, aunque estos compuestos han reportado un efecto benéfico sobre la salud de sus consumidores, se encuentran en cantidades insuficientes y poseen baja biodisponibilidad cuando se ingieren a partir de su matriz alimentaria.

Los sistemas aceite-surfactante-agua son mezclas a partir de los cuales se pueden construir diversas estructuras como emulsiones, microemulsiones, cristales líquidos, entre muchas otras, que permiten la solubilización, protección y aumento de la estabilidad de compuestos de tipo hidrofílico, lipofílico y anfifílico.

Los cristales líquidos (CLs) son mesofases que comparten la estructura ordenada de los sólidos y la fluidez de los líquidos, además, por ser sistemas que sus constituyentes están en equilibrio, poseen estabilidad termodinámica, lo que los hace estructuras con funcionalidad mejorada para la inclusión de compuestos de interés en su matriz. La naturaleza receptiva y la diversidad de CLs ofrecen oportunidades y desafíos para la comprensión de la ciencia fundamental, y abren la puerta a numerosas aplicaciones prácticas.

Es por esta razón resulta imperante probar nuevos mesógenos grado alimenticio y las posibles estructuras de cristal líquido a formar para su uso en el mejoramiento de la solubilidad de compuestos benéficos para el ser humano tras su consumo.

En la presente investigación se estudió la elaboración y caracterización de cristales líquidos a partir de surfactantes grado alimenticio como sistema de funcionalidad mejorada para la inclusión de compuestos bioactivos en su estructura como el  $\beta$ -caroteno, para así promover la estabilidad y solubilización del compuesto en cuestión.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Sistemas aceite-surfactante-agua (ASA)**

Ciertas sustancias naturales y numerosos productos fabricados por el hombre son sistemas dispersos líquido – líquido no miscibles estabilizados por un surfactante, y son englobados bajo el término genérico de emulsión (Salager *et al.*, 2001). La mayoría de estos productos son emulsiones convencionales, que se clasifican de acuerdo con la disposición de los dos líquidos inmiscibles, como sistemas ya sea de aceite en agua o de agua en aceite. Sin embargo, recientemente ha habido un creciente interés por extender la aplicación y funcionalidad de estos productos utilizando principios de diseño estructural (McClements, 2012).

Los sistemas ASA se presentan bajo diferentes formas que pueden ser: monofásicos como las soluciones micelares o las microemulsiones, bifásicos, en el cual se obtiene el equilibrio entre dos fases; y polifásicas con la presencia de varias fases líquidas y mesofases como los cristales líquidos (Salager, 1998). La naturaleza y comportamiento del sistema dependerá de factores físicos, especialmente aquellos que han actuado durante su formulación, así como de factores fisicoquímicos; la influencia de estos últimos corresponde al efecto de las variables de formulación y de sus respectivas concentraciones o proporciones (Salager, 1998).

Por esta razón es imprescindible para el formulador conocer y controlar dichas variables, ya que se presentan como la herramienta más útil para la manipulación del diseño estructural y las características del producto final.

### **2.2 Formulación**

De manera genérica la formulación puede ser definida como el conjunto de conocimientos y operaciones que se emplean para asociar o mezclar ingredientes de origen natural o sintético, originalmente incompatibles entre sí, para obtener un producto valorado por su función de uso y su aptitud para satisfacer las necesidades preestablecidas (Aubry & Schorsch, 1999).

La formulación es extremadamente compleja por diversas razones: la primera,

es que ésta no garantiza de manera única la obtención de un cierto tipo de emulsión, se pueden obtener resultados idénticos con sistemas diferentes y se sabe que ciertos efectos pueden compensarse con otros, las formulaciones que han tenido éxito en la industria son extremadamente complejas y obtenidas por tanteo, implicando que la comprensión teórica se limite a algunos modelos muy simplificados que poco se asemejan con la realidad (Salager, 1998).

Para el caso de los sistemas ASA las variables referidas a la formulación se pueden clasificar dentro de tres grupos: formulación fisicoquímica, fluomecánicas y las variables de composición.

### **2.2.1 Formulación fisicoquímica**

La formulación fisicoquímica tiene que ver con la naturaleza de los componentes. En el sistema más simple, como el ternario mínimo, hay tres componentes: el surfactante (S), el agua (W) y el aceite (O) (Salager, 1999). Las variables de formulación fisicoquímica incluyen parámetros físicos como temperatura y presión, o químicos como la naturaleza de los constituyentes principales y aditivos, susceptibles de influir sobre los sistemas (Salager *et al.*, 2015).

En general, se requiere más de una variable para describir cada uno de ellos. El surfactante es, por ejemplo, definido por la naturaleza química de su grupo hidrofílico y la longitud de su cadena lipofílica. En lo que concierne a la fase acuosa, puede presentar uno o más electrolitos donde el tipo y la concentración deberán ser indicados. En cuanto a la fase oleosa, es frecuentemente el compuesto más difícil de describir en forma química, puesto que se debe indicar la longitud del esqueleto hidrocarbonado, la presencia eventual de grupos funcionales y la isomería de posición (Salager *et al.*, 2015).

### 2.2.1.2 Surfactantes

Los surfactantes son un grupo de compuestos anfifílicos, llamados así por mostrar una doble preferencia desde el punto de vista electrostático. Son moléculas con un grupo o cabeza polar soluble en agua (parte hidrofílica) unido a una cadena hidrocarbonada o cola apolar insoluble en agua (parte hidrofóbica). Este grupo de compuestos son por su comportamiento tensoactivos o de superficie activa, ya que pueden modificar las propiedades de las superficies y las interfases entre diferentes medios, y formar agregados en disolución acuosa y medios apolares (Figueiredo & Salinas, 2005).

Según el tipo de disociación del grupo hidrofílico (H) en fase acuosa, se denominan surfactantes aniónicos (H = éstersulfato, sulfonato, carboxilato); catiónicos (H = amonio cuaternario); noiónico (H = polímero de óxido de etileno), o anfotérico, es decir a la vez aniónico y catiónico (Salager, 1993).

A continuación se describe más a detalle a los surfactantes no iónicos, por ser los utilizados en el presente trabajo. Como ya se mencionó, este tipo de surfactantes no producen iones en solución acuosa y por este hecho son compatibles con surfactantes de cualquier otro tipo; son excelentes candidatos para formulaciones complejas que se consiguen a menudo en aplicaciones prácticas; Algunos de éstos, presentan un muy bajo nivel de toxicidad y se utilizan en la fabricación de fármacos, cosméticos y alimentos (Salager, 2002).

Estructuralmente poseen grupos como los etoxilatos, que muestran gran afinidad a las moléculas de agua, debido a las interacciones dipolo-dipolo en los puentes de hidrógeno (Ben, 2013).

TIPO	GRUPO ESTRUCTURAL	FÓRMULA MOLECULAR	n	x
NO IÓNICOS	Alquil etoxilatos	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$	12-16	1-23
	Alquilfenol etoxilados	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$	8, 9	1-23

Estructura química de surfactantes no-ionicos, tomado de Pedraza, 2009.

Los Spans y Tweens son una gama de tensoactivos no iónicos que proporcionan beneficios de formulación en una serie de aplicaciones. Por ser surfactantes no iónicos, ofrecen ventajas como, una buena estabilidad, flexibilidad de formulación y una compatibilidad más amplia. Son estables en ácidos débiles, álcalis y electrolitos y no reaccionan con ingredientes iónicos (Fernández, 2006).

Otro de los parámetros importantes a contemplar por el formulador es el balance hidrofílico lipofílico (HLB), ya que es determinante en la afinidad que presentará el surfactante frente a cada una de las fases. Este término fue acuñado por primera vez por Griffin en el año de 1949, y corresponde a una regla empírica en la que asignó un valor adimensional a una serie de surfactantes, tomando arbitrariamente la escala de 1 a 20.

Griffin ideó junto con éste concepto la regla de la mezcla, que consiste en ir variando las fracciones de dos surfactantes, mediante la cual se puede obtener una serie continua de HLB entre los valores extremos. La regla de mezcla permite, igualmente, extender la escala fuera de los límites 1-20 que corresponden a los dos surfactantes de referencia (Salaguer, 1998).

Y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HLB}_M = x_1 \text{HLB}_1 + x_2 \text{HLB}_2$$

Donde  $\text{HLB}_1$  y  $\text{HLB}_2$  son los valores de HLB de los surfactantes 1 y 2,  $x_1$  y  $x_2$  sus fracciones en peso en la mezcla y  $\text{HLB}_M$ , el HLB de la mezcla de surfactantes (Salaguer, 1998).



Es importante para el formulador poder cuantificar el efecto de estas variables sobre el balance global de interacciones entre el surfactante, el agua y el aceite, independientemente de que la aplicación sea la recuperación mejorada del petróleo o formular una pintura emulsionada, la estabilización de una emulsión alimenticia o la solubilización de un principio activo en un medicamento microemulsionado (Salager, 1999).

## 2.2.2 Variables fluomecánicas

Estas variables se refieren al procedimiento técnico ingenieril que permite a los componentes formar las diferentes fases posibles para estos sistemas (McClements & Rao, 2011). En general se dividen en métodos de alta y baja energía y se clasifican como se muestra en la Figura 1.

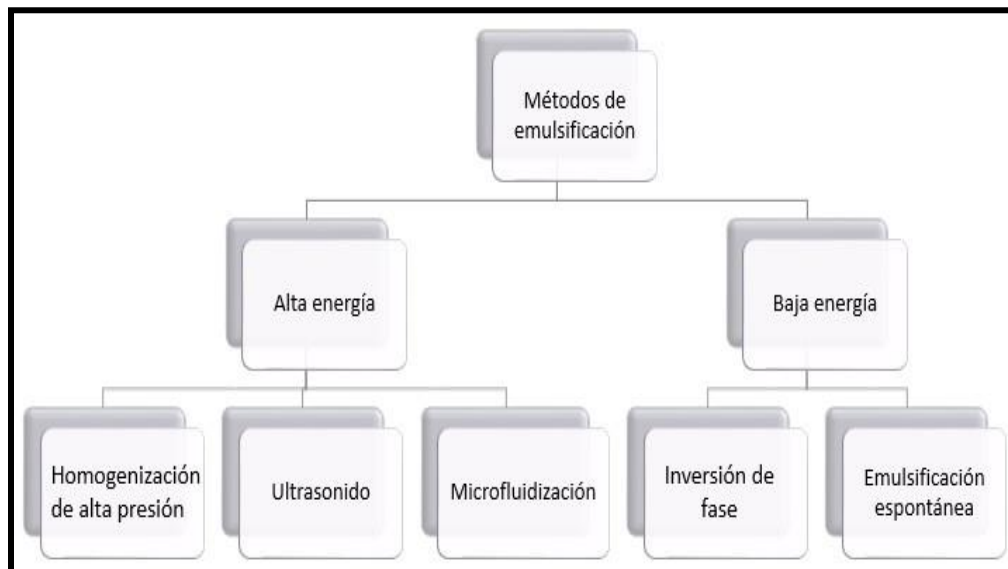


Figura 1 Esquema de los métodos de emulsificación según su energía.

En el presente trabajo se utilizarán los métodos de baja energía, ya que se busca que los sistemas sean termodinámicamente estables.

### 2.2.3 Composición

La variable de composición se refiere a las proporciones relativas que se añaden de cada componente (Chuan *et al.*, 2014). Se deberá entonces representar el comportamiento de fase en función de la composición del sistema, en general sobre un diagrama ternario o cuaternario como el de la Figura 2 (Salager & Antón, 1991).

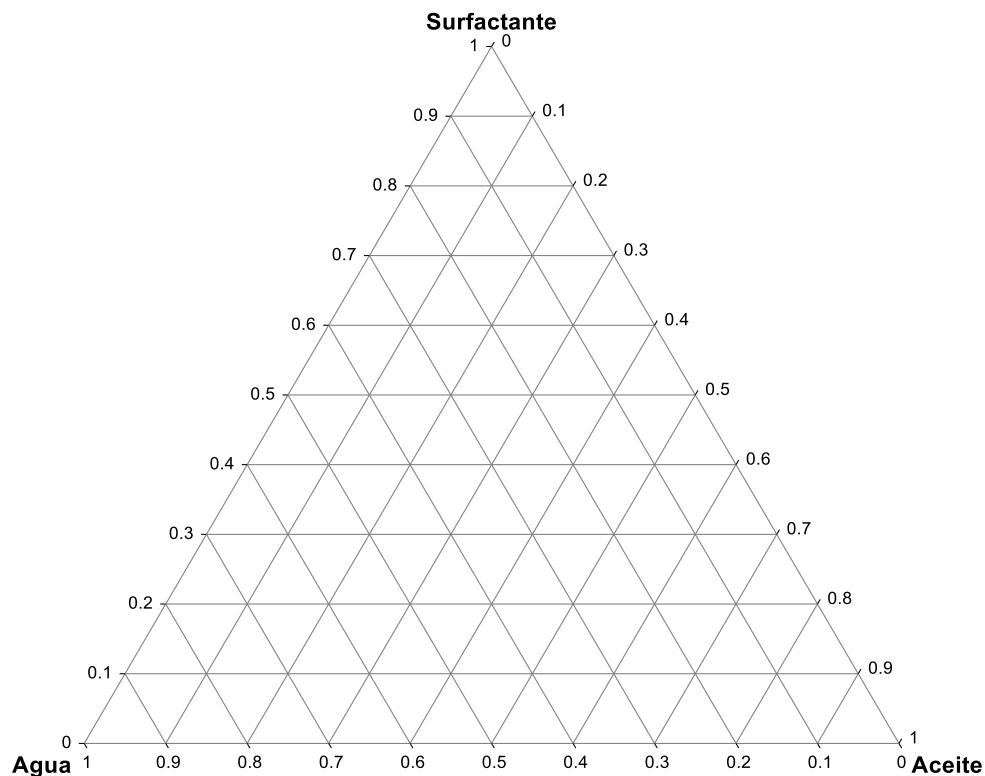


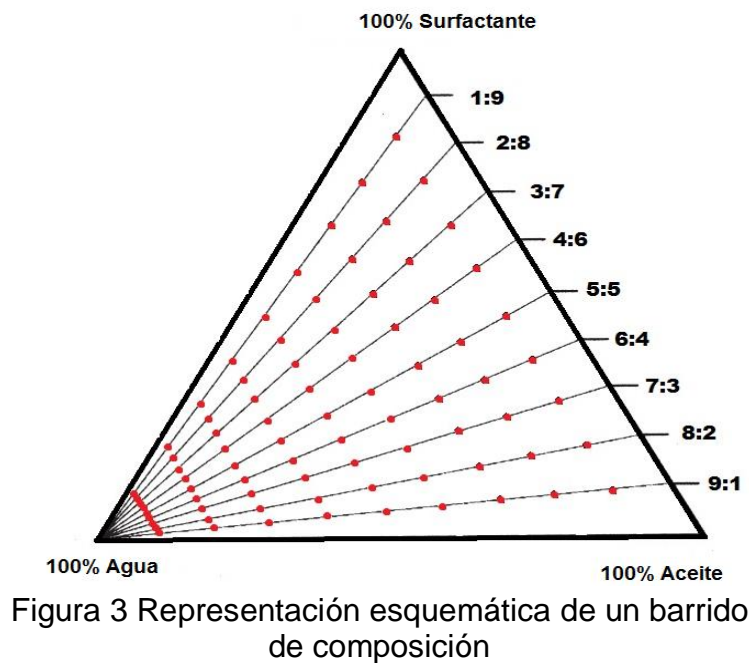
Figura 2 Diagrama de fases pseudoternario

Es esencialmente imposible preparar sistemáticamente todas las formulaciones posibles; por tanto, es primordial realizar pruebas lo más provechosas posibles con base en la información fisicoquímica (Salager *et al.*, 1998), con la finalidad de optimizar el tiempo y las variables a considerar en la elucidación de las fases a formar en un sistema determinado ASA. Existen diversos tipos de representación del comportamiento de fase, al igual que las representaciones utilizadas para dar cuenta del efecto de la variación sistemática de ciertas variables (barridos) como el comportamiento de fase (Salager & Antón, 1991).

### 2.3 Diagramas ternarios

El comportamiento de fase de los sistemas ternarios se puede representar a temperatura y presión constantes, sobre un diagrama ternario clásico, del tipo que se utiliza para describir los procesos de destilación (Treybal, 1951). La representación ternaria se realiza sobre un triángulo equilátero, utilizando el hecho de que la suma de las tres alturas formadas desde un punto interior es constante. En general se utilizan fracciones molares o los porcentajes en peso para representar las diferentes concentraciones (Salager & Antón, 1991).

Para la determinación de los comportamientos fásicos, se puede seguir el método conocido como aproximación o barrido, que consiste en ir añadiendo pequeñas cantidades, que no representen más de 1% en peso total del sistema o sobre una relación fija de los otros componentes. En la Figura 3 se muestra un ejemplo esquemático en el que los puntos rojos representan la concentración puntual de cada componente al adicionar porciones de agua a las diferentes mezclas de aceite-surfactante (Fernández, 2006).



Una vez realizada la adición se agita el tubo cerrado, para asegurar una correcta mezcla y se coloca el tiempo suficiente a la temperatura de trabajo, posteriormente se realiza una inspección visual de las fases a través del tiempo para identificar el estado de equilibrio, el número de fases, turbidez o transparencia y fluidez. Posteriormente se observan en un microscopio óptico con y sin luz polarizada para identificar las diferentes fases y aquellas que posean birrefringencia, para su posterior localización en el diagrama de fases (Fernández, 2006).

## **2.4 Diagramas de Winsor**

El concepto de Winsor fue un precursor en el sentido de que introdujo una característica fundamental, que el estado del sistema al equilibrio no dependía de una variable de formulación en particular, sino de una situación fisicoquímica que podía definirse a partir de todas las variables de formulación. Sin embargo, Winsor no pudo calcular los valores de las interacciones, y se puede decir que ni siquiera hoy se puede hacer, por la complejidad en la modelización molecular del estado líquido (Salager, 1999).

Según la teoría de Winsor, la estructura de una fase que contiene un sistema aceite- surfactante-agua, varía con el valor de  $R$  como se esquematiza en la Figura 4, que corresponde a las energías de interacción por unidad de área interfacial, entre el anfífilo y el aceite, por un lado, y el anfífilo y el agua por el otro (Salager, 1998).

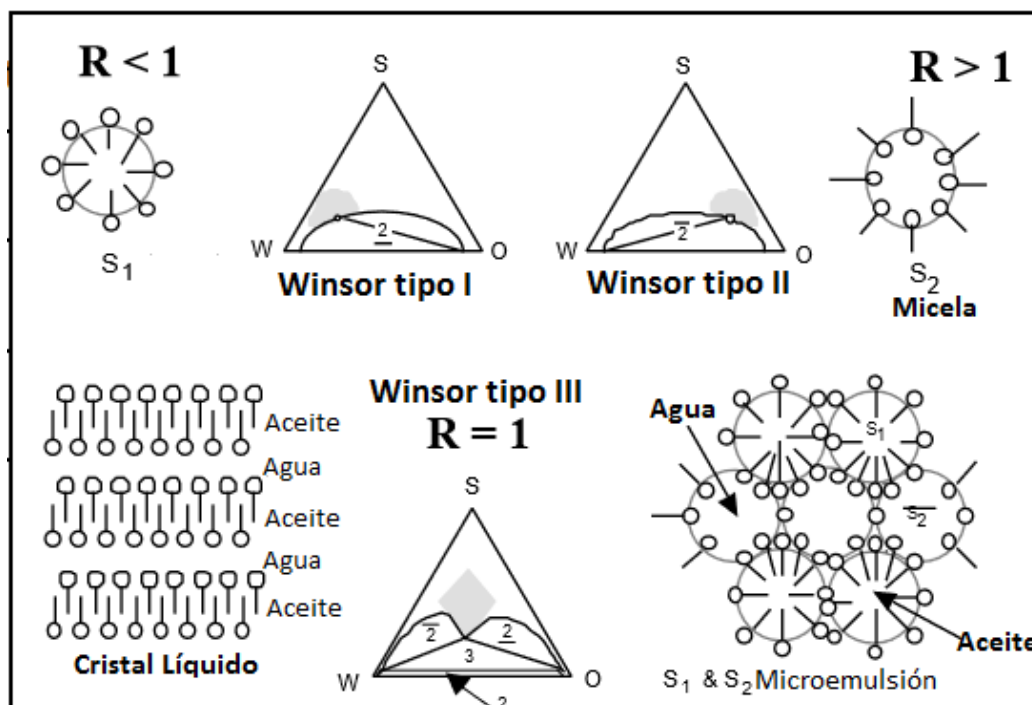


Figura 4 Comportamiento de fase de los sistemas aceite-surfactante-agua relacionado con el valor de la relación  $R$  de Winsor, extraído de Salager, 1999a.

Si  $R < 1$ , las interacciones hidrofílicas son más fuertes, y en la interfase hay más penetración del solvente del lado de la cabeza polar del surfactante, lo que produce una curvatura y una micela de tipo  $S_1$ . Si  $R > 1$ , las interacciones lipofílicas son las más fuertes y la interfase se curva en sentido contrario, produciendo una micela inversa de tipo  $S_2$ . Cuando  $R = 1$ , las tendencias hidrofílicas y lipofílicas se equilibran y se obtiene el caso III de Winsor con dos tipos de estructuras, laminar plana y estructura flexible (Salager, 1998).

Según la manipulación de las mencionadas variables de formulación, se presenta un comportamiento diferente en cuanto a la interacción y sistemas a formar en los ASA. A continuación en la Figura 5 se esquematizan las diferentes estructuras que se pueden obtener de los sistemas ASA, dependiendo la zona del diagrama en el que se encuentre, aunado a esto hay que recordar que es un esquema general y no necesariamente aplica para todas las formulaciones.

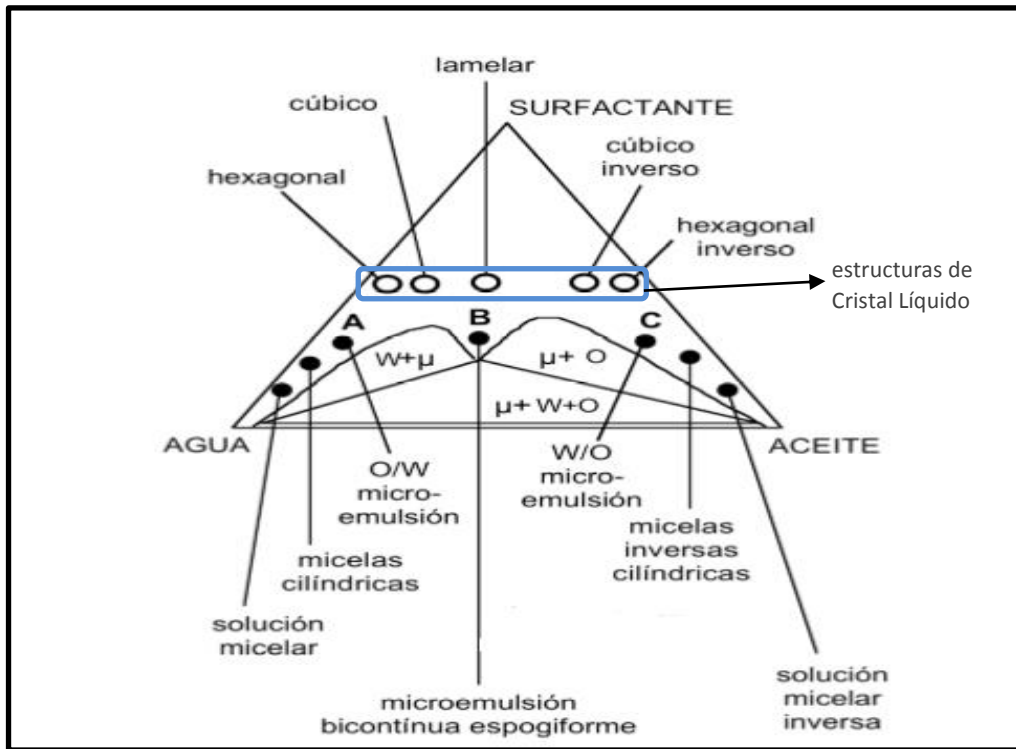


Figura 5 Diagrama ternario en el que se esquematizan las diferentes estructuras que se pueden obtener y las zonas en que se puede encontrar cada una de ellas, tomado de Salager *et al.*, 2015.

## 2.5 Cristales líquidos

Los cristales líquidos (CL) representan un estado de la materia que combina el orden y la movilidad a diferentes niveles jerárquicos, es decir, desde el nivel molecular hasta niveles macroscópicos. Esta combinación única permite que dicho sistema responda a diferentes estímulos externos tales como temperatura, campo magnético, campo eléctrico, tensión mecánica, luz, reacción química y reacción electroquímica para posteriormente encontrar una nueva configuración de energía mínima (Li, 2014).

A diferencia de los líquidos ordinarios, en los cristales líquidos las moléculas o iones que los forman se disponen de manera relativamente ordenada (Pasquali *et al.*, 2006). Estas estructuras fueron descubiertas por el botánico austriaco F.

Reinitzer en el año de 1888 y las definió como materiales que presentan propiedades intermedias entre un sólido cristalino y un líquido convencional (Hernández *et al.*, 2004).

Los cristales líquidos en general pueden tener diversos tipos de estructura molecular. Lo que todos tienen en común es que son anisotrópicos, y su forma es tal que, un eje es muy diferente de los otros, o en algunos casos, la solubilidad varía respecto a la parte de la molécula que esté interactuando (Singh, 2000).

Estructuralmente los CL se pueden clasificar según su posición molecular, ya que pueden tener ordenamiento posicional y/o orientacional. Según esta clasificación, se dividen en: nemáticos, esmécticos y colestéricos, como se muestra en la Figura 6. Los nemáticos son aquellos que poseen ordenamiento orientacional pero no posicional, los esmécticos poseen ordenamiento posicional y orientacional y los colestéricos tienen organización en capas, sin embargo, cada plano tiene una rotación con respecto al siguiente y una orientación distinta (García-Colín & Rodríguez, 1995).

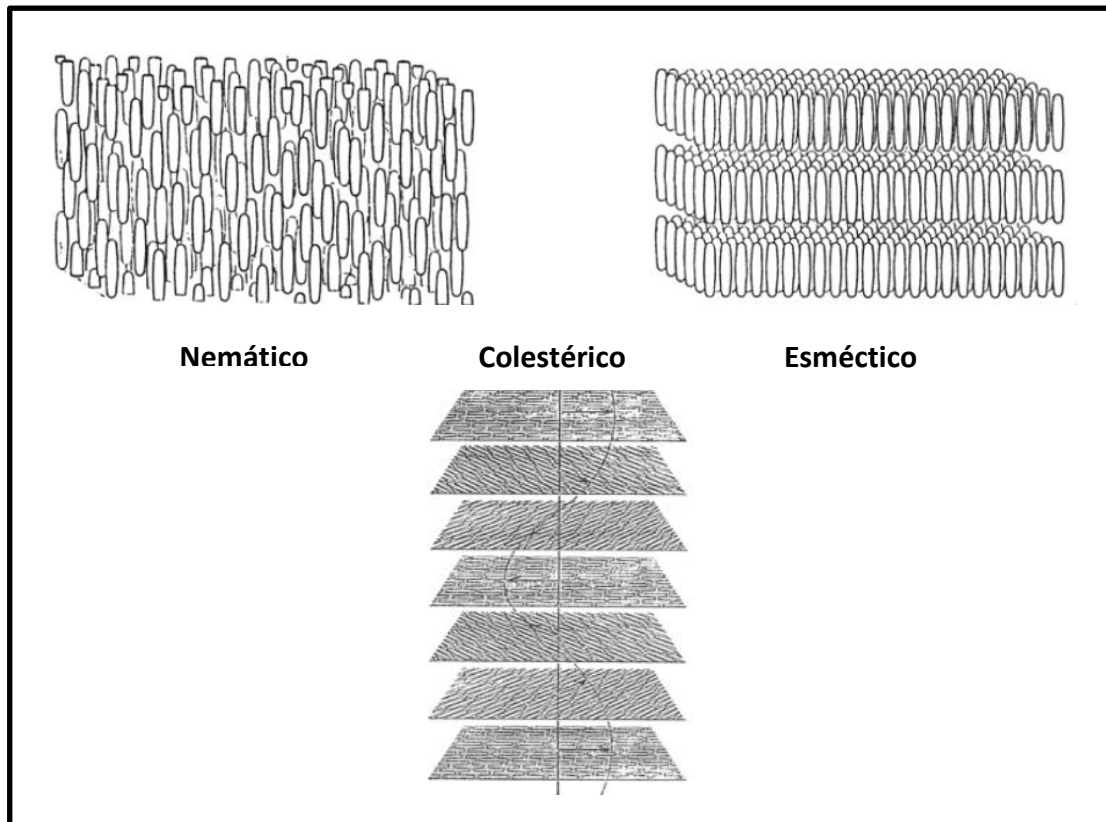


Figura 6. Representación esquemática del orden estructural de los cristales líquidos, adaptado de García-Colín & Rodríguez, 1995.

También se pueden clasificar según el mecanismo responsable de la transición de fase en liotrópicos, termotrópicos y/o anfotrópicos. Los liotrópicos son aquellos que se forman a partir de mezclas de moléculas anfifílicas con disolventes como el agua a una temperatura y concentración específica, en el caso de los termotrópicos las unidades básicas son moléculas y las transiciones de fase se forman por un cambio en la temperatura y/o presión (Figueiredo & Salinas, 2005), finalmente los materiales anfotrópicos son capaces de formar mesofases tanto termotrópicas como liotrópicas (Singh, 2000).

A principios del siglo XX, sobre la base de investigaciones del comportamiento de parámetros físico-químicos (detergencia, conductividad eléctrica y tensión interfacial) de una mezcla de anfífilos y agua, McBain propuso la idea de una micela



como un agregado de moléculas tensioactivas. Los grupos de Ekwall, Luzzati y Winsor realizaron investigaciones sobresalientes de un número de diagramas básicos de fase y establecieron las características principales de la estructura de las fases liótropicas (Figueiredo & Salinas, 2005).

### 2.5.1 Cristales Líquidos Liotrópicos (CLL)

Como se mencionó anteriormente, los CLL corresponden a la combinación de moléculas anfifílicas como los surfactantes, con disolventes. Tienen la capacidad de formar estructuras ordenadas tanto en disolventes polares como no polares. Cuando esta clase de compuestos se solvatan en un disolvente polar (por ejemplo, agua), las colas hidrófobas se reúnen y orientan la cabeza hidrófila hacia el disolvente formando agregados moleculares llamados micelas o vesículas para el caso de los surfactantes provenientes de fosfolípidos, como los que se muestran en la Figura 7 (Singh, 2000).

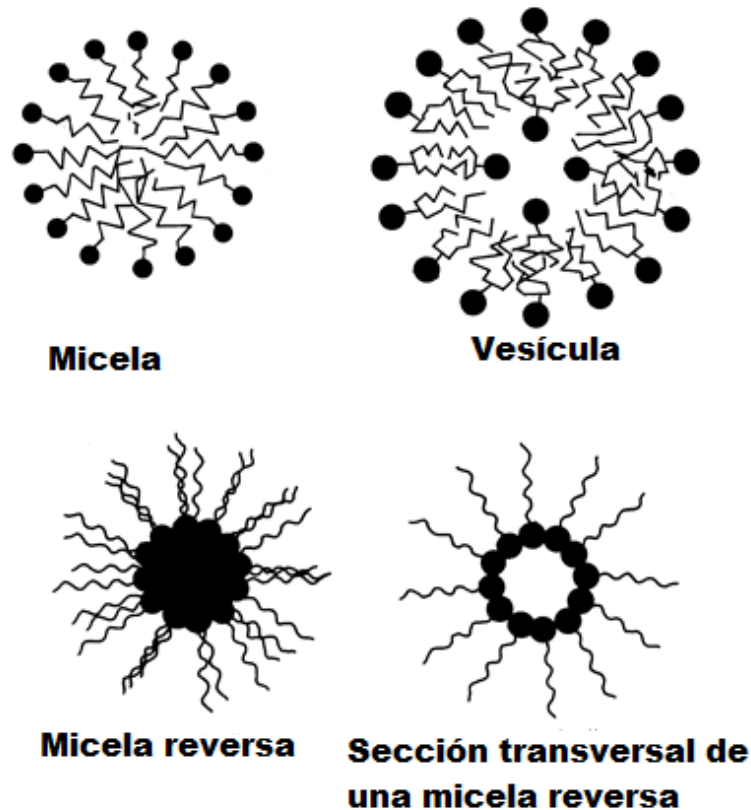


Figura 7 Representación de los diferentes agregados moleculares que se pueden tomar por moléculas anfifílicas en disolventes polares y no polares, tomado de Singh, 2000.

En el caso de mezclas de moléculas anfífilas y un disolvente, un concepto importante es la concentración micelar crítica (CMC), que se define como la concentración de moléculas anfífilas por encima de las cuales se autoensamblan en forma de micelas. Si "c" es la concentración de moléculas anfífilas en la solución, para  $c < \text{CMC}$ , las moléculas anfífilas permanecen aisladas, sin la formación de micelas, para  $c > \text{CMC}$ , la fracción de moléculas anfífilas aisladas permanece casi constante, y la concentración de micelas tiene una proporcionalidad directa con c (Figueiredo & Salinas, 2005).

Existen varios tipos de estructuras de fase de cristal líquido liótrope. Cada uno de estos diferentes tipos tiene un grado diferente de ordenación molecular dentro de la matriz del disolvente. La concentración del surfactante en el disolvente determina el tipo de fase de cristal líquido liotrópico que se exhibe. Sin embargo, también es posible alterar el tipo de fase liotrópica exhibida en cada concentración cambiando la temperatura (Collings & Hird, 1997).

Se reconocen ampliamente tres clases diferentes de estructuras de fase de cristal líquido liotrópico. Estas son las fases laminar, hexagonal y cúbica, y sus estructuras han sido clasificadas por técnicas de difracción de rayos X (Collings & Hird, 1997).

Estas mesofases liótropas existen como pares simétricos, un sistema de aceite en agua "normal" (tipo I), que consiste en agregados de lípidos en una matriz de agua continua, y su topónimo "invertido" (tipo II) versión agua-en-aceite y son los llamados: cúbicos inversos y hexagonales inversos (Li, 2014), sus estructuras se muestran en la Figura 8.

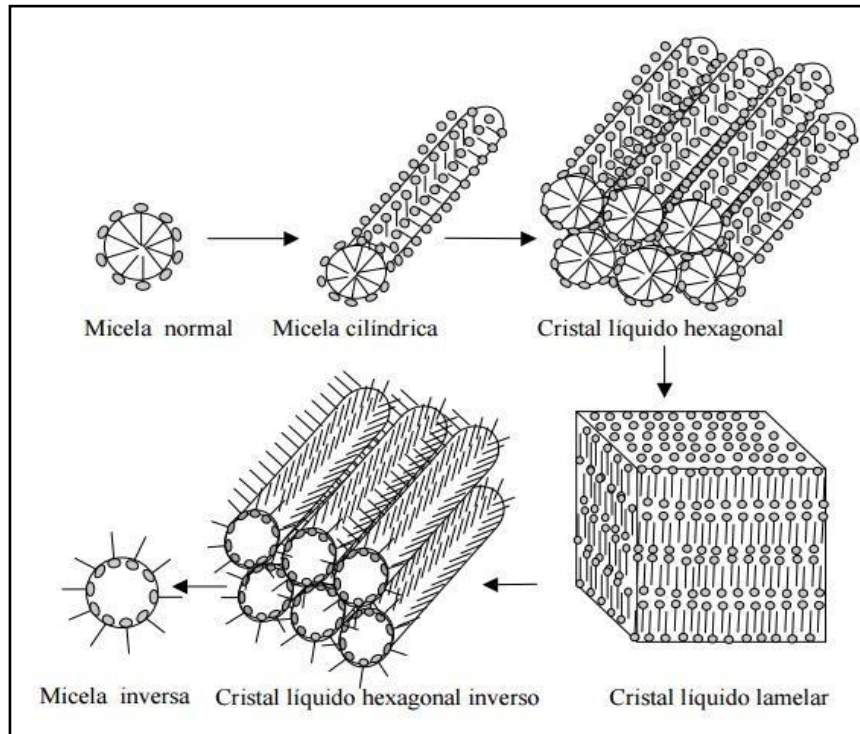


Figura 8 Representación esquemática de las diferentes estructuras cristalinas, tomado de Salager *et al.*, 2015.

### 2.5.1.1 Fase Lamelar

Los sistemas Lamelares, son sistemas termodinámicamente estables, ópticamente isotrópicos y se forman con una baja energía. Esta fase es periódica en una dimensión (Li, 2014).

Esta fase consiste en una disposición en capas de moléculas anfifílicas. La naturaleza anfifílica de las moléculas induce que el autoensamblaje sea en bicapa, se forman dos capas de cadenas no polares entrelazadas a moléculas en dirección opuesta, como se muestra en la Figura 9. Cuando los grupos de cabezas polares coinciden, están separados por una capa de agua. El espesor de la bicapa es de 10-30% menor que el doble de la longitud de una cadena no polar y el espesor de la capa de agua está entre 1 y 10 nm si el contenido de agua está entre 10 y 50% en peso. Por lo general, las fases de cristal líquido liotrópico laminar sólo existen hasta un 50% de tensioactivo y por debajo de éste la fase laminar da lugar a fases líquidas liotrópicas hexagonales o a una solución micelar isotrópica (Collings & Hird, 1997).

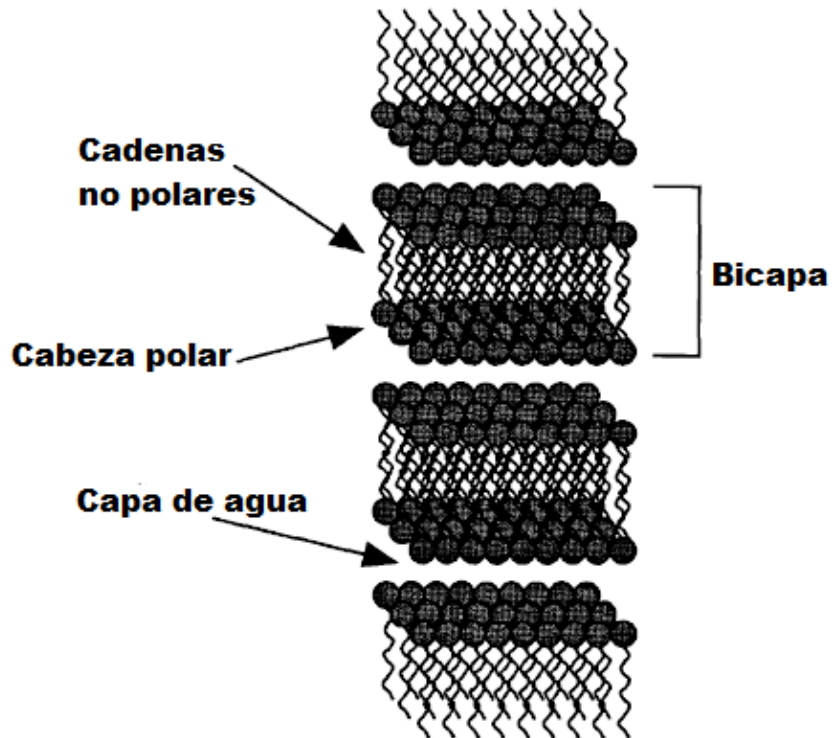


Figura 9 Estructura de la Fase Cristal Líquido Lamelar (CLL), tomado de Collings & Hird, 1997.

### 2.5.1.2 Fase hexagonal

Las fases de cristal líquido liotrópico hexagonal como su nombre lo indica, tienen un orden de agregación molecular que corresponde a una disposición hexagonal (como se muestra en la Figura 10). Por consiguiente, estas fases proporcionan texturas birrefringentes cuando se examinan mediante microscopía de polarización óptica. La fase consta de cilindros micelares en una disposición hexagonal, el diámetro de los cilindros micelares es típicamente de 10 a 30% menor que el doble de la longitud de una cadena no polar y la separación entre cilindros varía entre 1 y 5 nm dependiendo de las cantidades relativas de agua y tensioactivo. Estas fases contienen típicamente de un 30 a 60% de agua en peso, la fase hexagonal invertida es básicamente la misma que la fase hexagonal, excepto que los cilindros micelares se invierten con las cadenas no polares irradiando hacia fuera de los cilindros y ocupa regiones mucho más pequeñas en los diagramas de fase y es mucho más rara que la fase hexagonal (Singh, 2002).

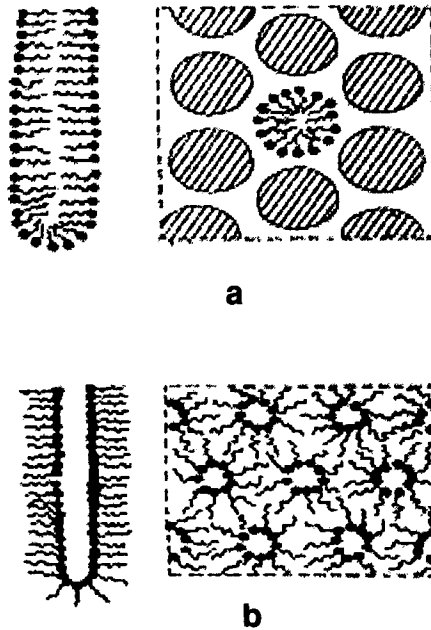


Figura 10 Estructura de la fase hexagonal (a) y hexagonal inversa (b), tomado de Singh, 2002.

### 2.5.1.3 Fase cúbica

Las fases cúbicas no son tan comunes como las fases lamelar o hexagonal. Sin embargo, las fases liotrópicas cúbicas se producen en diferentes regiones de los diagramas de fases. De acuerdo con esto, hay probablemente una gama de diferentes fases de cristal líquido liótropo cúbico, cuya estructura exacta se relaciona con su posición dentro del diagrama de fases. Estructuralmente, estas fases no están tan bien caracterizadas como las fases lamelar o hexagonal, sin embargo, se han establecido dos tipos de fases, cada una de las cuales puede ser generada de manera «normal» (agua en fase continua) o «invertida» (aceite en fase continua), lo que supone un total de cuatro tipos de fases diferentes. La fase cúbica más conocida consiste en una disposición cúbica de agregados moleculares similares a las micelas como se muestra en la Figura 11 y la segunda es la fase llamada bicontinua (Collings & Hird, 1997).

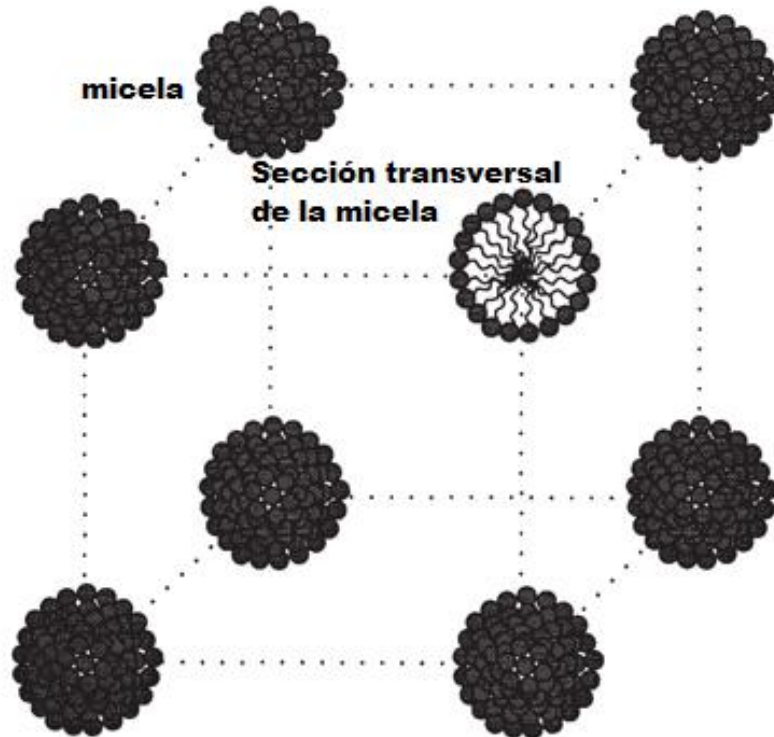


Figura 11 Estructura de la fase cristal líquido liotrópico cúbico, extraído de Collings & Hird, 1997.

La prevalencia de cada una de éstas fases liotrópicas tiene que ver con diversos factores, dentro de los que se encuentran el tipo de anfífilo, ya que dependiendo del parámetro de empaquetamiento ( $a$ ) ( $N$ =relación entre el área de la cabeza polar y la longitud y volumen de la cadena apolar) la molécula tendrá una curvatura diferente. Otros factores como la concentración del anfífilo ( $c$ ) y la temperatura ( $b$ ) también tienen una fuerte influencia, por esta razón, se han descrito diagramas específicos en los que se esquematiza la influencia de dichas variables y la tendencia de formación para cada fase, y se muestran en la Figura 12.

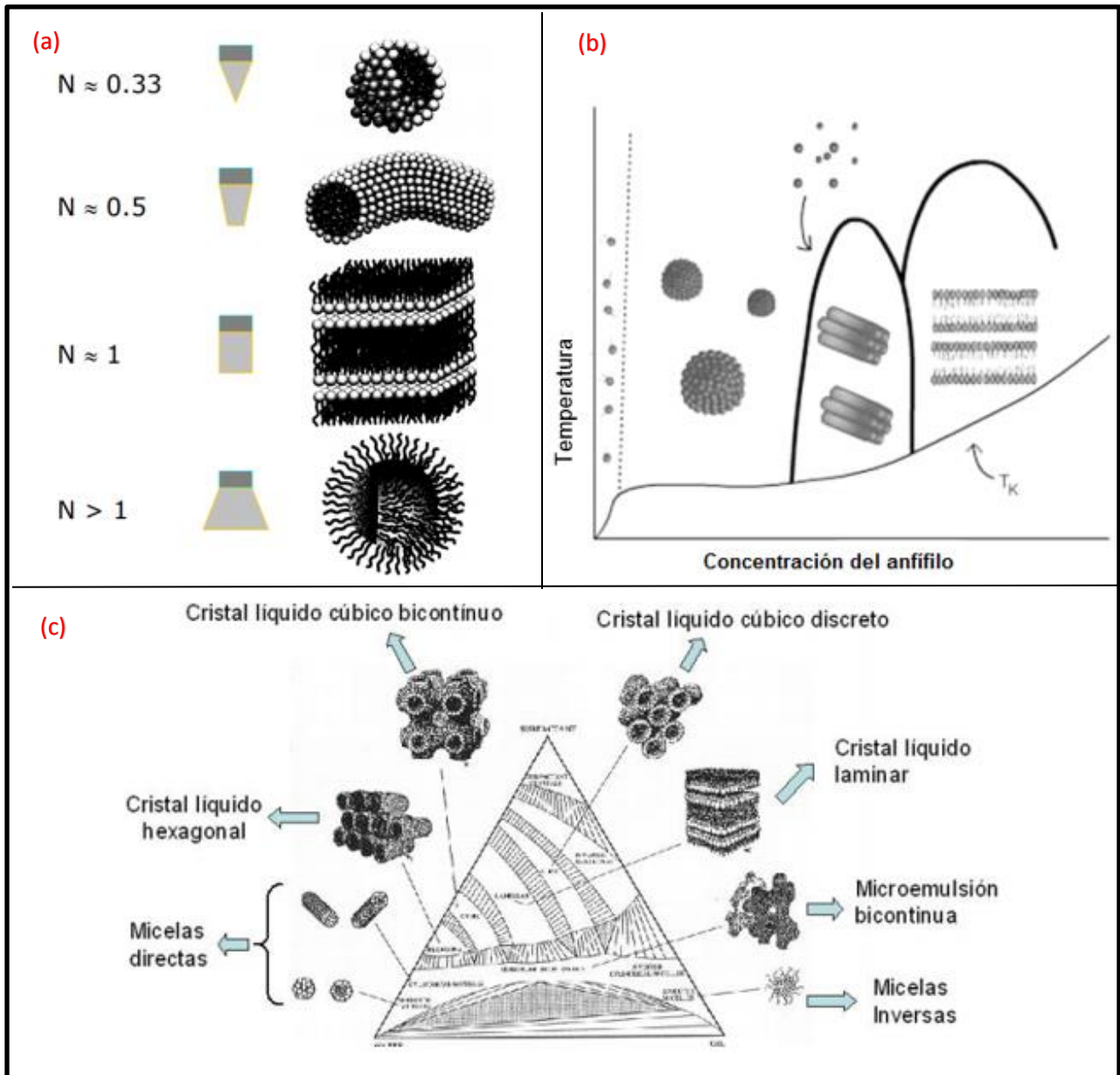


Figura 12 Representación de los diferentes diagramas para ejemplificar la influencia del tipo anfifílico (a), temperatura (b) y concentración de anfifílico (c) y su tendencia a la formación de las diferentes fases liotrópicas, adaptado de Fernández, 2006.

Debido a su estructura y ordenamiento de largo alcance, son cuerpos birrefringentes y difractan los Rayos X al igual que los sólidos cristalinos (Pasquali *et al.*, 2006), y son precisamente estas propiedades el fundamento de las técnicas más utilizadas para su identificación y caracterización.

A continuación se muestran las estructuras birrefringentes evidenciadas mediante polarizadores cruzados para un cristal líquido lamelar y hexagonal. Donde la diferencia entre las zonas claras y oscuras denotan la textura característica de cada fase.

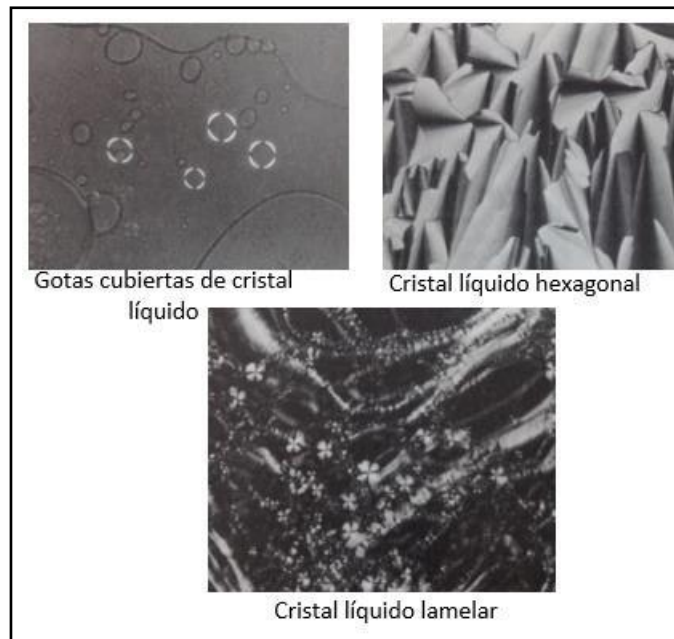


Figura 13 Imágen al microscopio de luz polarizada de muestras de cristal líquido, tomado de Shinoda & Friberg, 1986.

La birrefringencia es el fenómeno responsable de la imagen al microscopio polarizante, a la que se le denomina textura óptica y que se observa al cruzar los polarizadores. La textura óptica se debe a la orientación superficial de los directores en los límites de la muestra y a los defectos en su estructura cristalina (Pasquali *et al.*, 2006).

El comportamiento y propiedades de estas fases es lo que las hace tan interesantes y prometedoras, ya que tienen: estabilidad termodinámica, dominios hidrófilos e hidrófobos nanoescalados que están separados por las capas autoensambladas, contienen una superficie extremadamente grande y presentan la capacidad de incorporar compuestos independientemente de su solubilidad y los protegen de la degradación física y enzimática, mantienen su suministro y pueden



incrementar la permeación de lípido/disolvente que forma la estructura (Li, 2014).

Su uso se ha extendido principalmente a la industria farmacéutica y cosmética, desarrollándose diversos sistemas de suministro, se encontró que estos sistemas eran eficaces en la incorporación de grandes cantidades de fármacos y podían contener potenciadores de permeación para lograr una biodisponibilidad mejorada con capacidad para sostener y controlar su suministro. También se ha demostrado que las propiedades de las estructuras CL pueden ajustarse para regular la velocidad de liberación del fármaco transdérmico y mucosal. Esta es la razón de que en la actualidad el grueso de investigaciones y usos se han pensado para ser administrados por vía transdérmica, ya que constituye una barrera accesible para la permeación de compuestos desde matrices de CL (Li, 2014).

Es por esto que se necesita una mayor investigación en la identificación de mesógenos y sus fases, así como de posibles usos y aplicaciones en la industria de los alimentos.

### 3. ANTECEDENTES

Makai *et al.* (2003) investigaron la estructura y liberación de fármacos incluidos en cristales líquidos lamelares formados con glicerol. Ellos utilizaron surfactantes no iónicos, e incluyeron el glicerol como co-surfactante para disminuir la cantidad de surfactante en la mezcla final de los cristales líquidos; encontraron que la inclusión tanto del glicerol como de los farmacos de carácter hidrofílico e hidrofóbico tuvieron baja influencia en la formación estructural de los cristales líquidos lamelares. Las estructuras lamelares revelaron un patrón de láminas biaxiales, así como la característica cruz de malta de los materiales birrefringentes. Finalmente, concluyeron que el tensoactivo no iónico utilizado, es adecuado para la formación de CL utilizando agua como disolvente, y que los fármacos incluidos en bajas concentraciones, no produjeron cambios significativos en los CL, por lo que son estructuras aptas para la incorporación de compuestos insolubles en agua.

Amar-Yuli *et al.* (2009) estudió la solubilización de moléculas bioactivas, de carácter hidrofílico, lipofílico y anfífilo para aplicaciones alimentarias, ilustrando las transformaciones estructurales correspondientes y los métodos de análisis de dichas estructuras. El sistema modelo en el que se basó fue el de agua con monooleoil glicerol, en dicha revision tambien incluyó el uso de co-surfactantes como mecanismo para incrementar y estabilizar las fases de cristal líquido. Utilizó retinol, vitamina K y vitamina E como fármacos para ser incluidos en las estructuras de cristal líquido y explicó cómo es que influye la concentración tanto del co-surfactante como del fármaco en la inducción de cambios estructurales. Encontró que hay un límite de concentración en el que los diferentes fármacos no afectan la estructura inicial del cristal líquido, y una vez que se superan estos límites la estrucura sufre deformaciones por cambios de polaridad y del parámetro de empaquetamiento.

Chorilli *et al.* (2011) caracterizó y evaluó en un sistema *in vivo* al palmitato de retinol incluido en cristales líquidos lamelares en los que se utilizaron surfactantes no ionicos. Encontraron que la formación de los cristales líquidos fué favorecida en

la region de dominancia de la fase oleosa y hay separación de fases cuando hay un predominio de la fase acuosa. También reportaron que no hubo diferencias significativas en las regiones en las que se encontraron los cristales líquidos para sistemas cargados y no cargados con palmitato de retinol, concluyendo una baja influencia de su inclusion evidenciada por la reaparición de las cruces. La valoración in vivo consistió en la evaluación de los cristales líquidos en la zona periocular de 30 mujeres sanas con edades entre 30 y 45 años. El modelo consistió en la aplicación cutánea de los cristales líquidos en la parte periocular y parpados con movimientos circulares durante 30 días; pre y postratamiento se tomaron fotografías y se comparó la planimetría de las arrugas en un grupo control, el grupo cargado con el palmitato de retinol y un grupo mas en el que se aplicó unicamente el vehículo sin el fármaco. Como resultado del sistema biológico encontraron que hubo una respuesta positiva de la aplicación del retinil palmiato utilizando como vehículo la estructura de cristal líquido, ya que redujo las arrugas respect a la condición inicial, concluyendo que el sistema portador puede ser un método prometedor para la administración de palmitato de retinol y un vehículo adecuado para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

Xiazhong *et al.* (2012) investigó y demostró el potencial de las microemulsiones y estructuras de cristal líquido para ser utilizados como vehículos de administración de fármacos inyectables extravasculares para la liberación prolongada, utilizando transformaciones *in-situ*. Se realizó la construcción del diagrama de fases con aceite Miglyol 812N y una mezcla de (co) tensioactivos Solutol HS 15 y Span 80 con etanol. En los diagramas de fase identificaron que la manera en que podían obtener zonas más prolongadas de cristal líquido y microemulsión fue al combinar los tensoactivos para tener un HLB intermedio, y el etanol contribuyó a reducir la viscosidad de los sistemas. La construcción de los sistemas fue realizada a dos temperaturas de almacenamiento y encontraron que al incrementar la temperatura, también se incrementó la zona de las microemulsiones, especialmente hacia la zona rica en aceite. En los estudios del ensayo *in vitro* para la liberación controlada, comprobaron que el cambio de las microemulsiones a fases de cristal líquido y emulsion gruesa se llevó a cabo en la interfase microemulsión-

agua, y concluyeron que como la fase de cristal líquido tuvo una menor dispersabilidad en agua, podría traducirse en un perfil de liberación del fármaco más lento, por lo que microemulsiones que forman estructuras de cristal líquido tienen el potencial para ser utilizadas como un vehículo de suministro para fármacos de carácter hidrosolubles y liposolubles en inyecciones extravasculares.

McClements (2012) analizó la evolución reciente en la creación de emulsiones estructuradas y su potencial en aplicaciones específicas para la liberación controlada de compuestos e incremento de la estabilidad. Analizó la organización estructural, formación y aplicaciones potenciales de: emulsiones multicapa, coloidosomas, microclusters, microesferas de hidrogel y sistemas híbridos, concluyendo que es importante conocer los sistemas a nivel estructural y como es que influyen las variables fisicoquímicas, de procesamiento y composición en las estructuras y su funcionalidad.

Fonseca-Santos *et al.* (2016) desarrollaron un método simple mediante HPLC en fase reversa para la determinación de cristales líquidos gelificados *in-situ* cargados con curcumina en un modelo *in vitro*. Realizaron la determinación de los perfiles de penetración para la gelificación *in-situ* de cristales líquidos, mediante la cuantificación de curcumina en mucosa esofágica de porcino. Partieron de tres formulaciones de Aceite-Surfactante-Agua, en las que permaneció constante la cantidad de surfactante en un 40% y variaron la de agua y aceite. Ubicaron las diferentes zonas en el diagrama de fases, y así identificaron que al aumentar la cantidad de agua incrementaba la viscosidad de los cristales líquidos, haciéndolos poco viables para su administración con jeringa. Al analizar los cristales líquidos mediante polarimetría observaron las cruces de malta características de cristales lamelares, y las estructuras estriadas y ordenadas referenciadas a cristales líquidos hexagonales, lo que les permitió concluir las transiciones de fase *in-situ* provocadas por la adición de la saliva artificial, y que estos cambios estructurales incrementan la adhesión y la liberación controlada de la curcumina.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Desde hace algunos años, distintos investigadores se han encargado de la identificación, caracterización y extracción de diversos componentes de los alimentos, que a su vez han demostrado tener efectos benéficos sobre la salud de sus consumidores, sin embargo, se encuentran en bajas cantidades y presentan poca biodisponibilidad, además de ser poco solubles en fases oleosas y/o acuosas. Las emulsiones convencionales, ofrecen una opción prometedora en la solución al problema de la entrega y protección de componentes bioactivos, sin embargo, por ser sistemas inestables la cantidad de componente activo que se puede incluir en sus fases por cuestiones de cantidad, aún resulta insuficiente.

Frente a esto, los sistemas aceite-surfactante-agua basados en el diseño estructural como los cristales líquidos, ofrecen la capacidad de solubilizar altas cantidades de componentes hidrofóbicos, hidrofílicos y anfifílicos; protegen contra la hidrólisis y la oxidación, además, son sistemas de liberación controlada. Por otra parte, estudios recientes, han demostrado la liberación controlada y aumento en la estabilidad de moléculas solubilizadas en diferentes matrices de cristal líquido utilizados en la industria farmacéutica y cosmética.

Por esta razón es que resulta importante la identificación, caracterización y de nuevos mesógenos y sus mesofases para utilizarse como un medio para la solubilización, aumento de estabilidad e incremento en la biodisponibilidad de moléculas bioactivas de interés en la industria de los alimentos.

## **5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **5.1 Objetivo General**

Elaborar y caracterizar cristales líquidos a partir de surfactantes grado alimenticio para su uso como vehículo y protección de biomoléculas.

### **5.2 Objetivos Específicos**

- Realizar un barrido de formulación unidimensional, utilizando como variable el HLB.
- Realizar el diagrama de fases pseudo-ternario del HLB seleccionado.
- Evaluar cualitativamente la influencia de los parámetros de barrido sobre las fases de cristal líquido mediante técnicas polarimétricas.
- Realizar la inclusión del  $\beta$ -caroteno en los Cristales Líquidos
- Caracterizar las estructuras cristalinas mediante técnicas de Microscopía.
- Evaluar el contenido de  $\beta$ -caroteno en las fases de cristal líquido.
- Evaluar la estabilidad del  $\beta$ -caroteno durante el almacenamiento en las diferentes estructuras de cristal líquido.

## **6. HIPÓTESIS**

El método de barrido de concentración unidimensional permite obtener y caracterizar cristales líquidos como matriz de protección y vehículo de biocomponentes.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Materiales

Materiales	Proveedor
Agua bidestilada	Fisher
Aceite de Canola	Commercial Canoil <sup>®</sup>
$\beta$ -caroteno $\geq 97\%$ de pureza	SIGMA <sup>®</sup>
Tween 20	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Tween 40	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Span 20	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Span 80	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>
Hexano HPLC $\geq 95\%$ de pureza	Sigma-Aldrich <sup>®</sup>

#### 7.2.1 Barrido de composición unidimensional

El barrido de composición unidimensional se realizó mediante la técnica descrita por Sadurini y colaboradores en el 2005. Se elaboraron las diferentes mezclas de agua-surfactante-aceite utilizando como variable de barrido el HLB. Primeramente se realizaron mezclas de aceite surfactante en una relación 50:50 p/p para HLB= 4.3, 6, 8.6, 9, 10, 11, 12, 13, 15.6 y 16.7; posteriormente tanto la mezcla como el agua se atemperaron a una  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se agregó agua por titulación en una proporción de 10:90 % p/p de agua y mezcla de aceite:surfactante, finalmente se dejaron reposar durante 10 días a una  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se equilibraran las fases correspondientes.

### 7.2.2 Formulación del HLB

La formulación del HLB se realizó con base en la regla de las mezclas propuesta por Griffin en 1949. Se utilizaron como base los surfactantes y proporciones que se muestran en la siguiente Tabla 1.

**Tabla 1. Proporción y surfactante utilizado para la formulación de cada HLB.**

<i>HLB</i>	<i>Span 80 (4.3)</i> [%p/p]	<i>Tween 40</i> (15.6) [%p/p]	<i>Span 20</i> (8.6) [%p/p]	<i>Tween 20</i> (16.7) [%p/p]
4.3	100%	-----	-----	-----
6	60%	-----	40%	-----
8.6	-----	-----	100%	-----
9	-----	6%	94%	-----
10	-----	20%	80%	-----
11	-----	34%	66%	-----
12	-----	49%	51%	-----
13	-----	63%	37%	-----
15.6	-----	100%	-----	-----
16.7	-----	-----	-----	100%

La mezcla de surfactantes se realizó atemperando cada uno de estos a 50 °C, posteriormente se mezclaron las proporciones correspondientes y se agitaron a una velocidad de 3500 rpm durante 10 min en una parrilla con agitación Cole-Parmer modelo StableTemp.

### 7.2.3 Elaboración del diagrama de fases pseudoternario e identificación de las fases

La elaboración del diagrama de fases se realizó por el método de titulación con agua descrito por Chen y colaboradores en 2004. El cual consiste en realizar



un barrido de las diferentes mezclas de aceite surfactante en proporciones que van desde 10:90 p/p hasta 90:10. Posteriormente, a estas mezclas se les adicionó agua por titulación en variaciones de 10% p/p. Posterior a su preparación se dejaron incubar en una estufa ECOSHEL modelo 9025H durante 10 días en ausencia de luz y a una temperatura de 37 °C. Para la determinación del comportamiento de fase, las muestras fueron monitorizadas durante 4 semanas y se examinaron mediante inspección visual y microscopía óptica de polarización.

#### **7.2.4 Polarimetría**

Las texturas birrefringentes de los cristales líquidos se identificaron mediante el uso de un microscopio óptico LSC BLW adaptado con polarizadores cruzados. La visualización de las muestras a través de los polarizadores cruzados da un cuadro negro para las fases isotrópicas, mientras que las fases anisotrópicas dan una imagen brillante. Los patrones geométricos son claramente diferentes para las diferentes fases anisótropas, por lo tanto se utiliza para identificar las diferentes estructuras de cristal líquido. Las muestras en las que se presentó el fenómeno de birrefringencia se consideraron para su posterior caracterización.

#### **7.2.5 Preparación de la fase oleosa cargada con el componente bioactivo ( $\beta$ -caroteno).**

Se realizó la inclusión del  $\beta$ -caroteno a la fase oleosa para su uso como componente bioactivo en los cristales de HLB 11 y 12. La preparación de la fase oleosa se realizó atemperando el aceite de canola a una  $T=50$  °C, posteriormente se adicionó el  $\beta$ -caroteno en una concentración de 7mg de  $\beta$ -caroteno/g de aceite y se agitó en una parrilla con agitación Cole-Parmer modelo StableTemp a 3500 rpm durante 10 minutos. Este aceite se sustituyó por el aceite de canola puro y se realizaron las correspondientes mezclas de aceite+ $\beta$ -caroteno con surfactante para su posterior titulación con agua.

#### **7.2.6 Cuantificación de $\beta$ -caroteno.**

Se realizó mediante la metodología descrita por Henelyta y colaboradores en el 2008, con algunas modificaciones. La técnica consistió en la separación de la fase CL, posteriormente se homogenizó manualmente y se llevó a una T=40 °C durante 5 min. A partir de ésta muestra se tomó una alícuota de 25 µl y se llevó a un aforo de 10 mL con hexano en ausencia de luz, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó durante 5min en una microcentrifuga Hermle Spectrafuge™ 7M a 12000 rpm. Finalmente se tomaron 200 µL del sobrenadante y se leyó la absorbancia en un lector de microplaca iMark™ modelo 1681130 a 450 nm.

### **7.2.7 Estabilidad del β-caroteno durante el almacenamiento.**

Para la estabilidad de β-caroteno se realizaron muestras independientes para su posterior almacenamiento, ya que la técnica de cuantificación es destructiva. Una vez incubadas las muestras durante los 10 días necesarios a 37 °C, se realizó la medición inicial, posterior a esto, se dejaron en una estufa ECOSHEL modelo 9025H a 25 °C en ausencia de luz y se realizaron mediciones a los 15 y 30 días.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Barrido unidimensional

A partir de las muestras obtenidas del barrido unidimensional, se realizó la inspección visual que permitió identificar aquellos HLB en los que se presentaban fases intermedias (mesofases) que a su vez sirven como referencia para inferir que se pueden encontrar estructuras de cristal líquido. Como se muestra en la Figura 14 los HLB que presentan mesofases son 11 y 12.

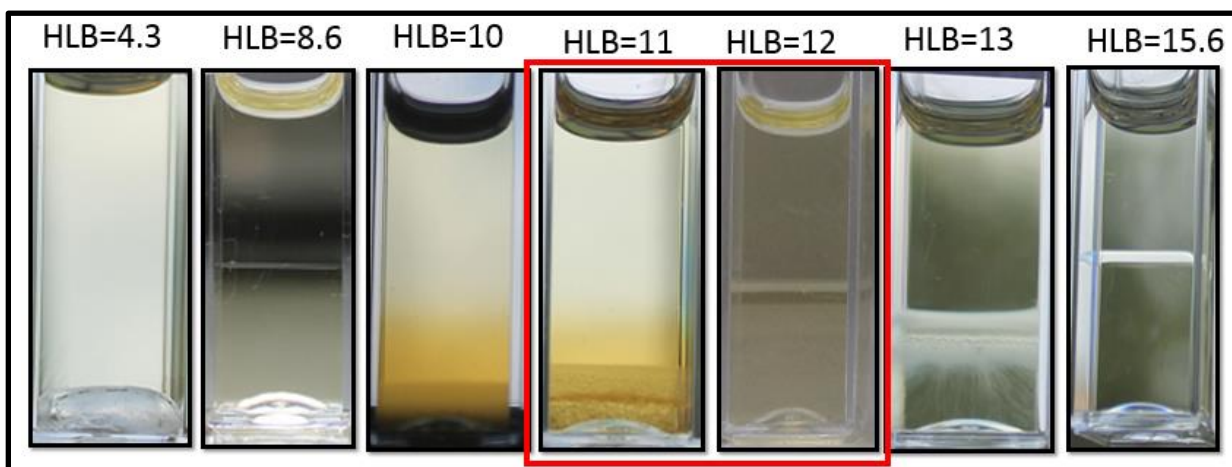


Figura 14 Fotografía de las muestras del barrido de composición unidimensional.

En general se sabe que los surfactantes son sustancias susceptibles a la formación de mesofases, sin embargo, dependerá de la cualidad y cantidad de cada uno de los componentes con los que esté interactuando. Estos sistemas pueden formarse a partir de agua y surfactante o de agua-surfactante-aceite, y de esto dependerán los tipos de estructuras que se formen (Quan Li, 2014)

### 8.2 Construcción del diagrama de fases pseudoternario

En la Figura 8 se muestra el diagrama de fases pseudoternario para HLB 11, en el que podemos identificar tres zonas diferenciadas por el número de fases

presentes en cada área, así como los puntos en los que se encontraron las estructuras de cristal líquido. Para HLB 11, tenemos que en la zona rica en surfactante (área superior del diagrama) encontramos la zona monofásica, evidenciando que su formación se favorece por cantidades altas de surfactante y se extiende conforme aumentamos la cantidad de aceite y a no mas del 10% de agua en peso. Estos resultados corresponden a lo reportado por la literatura y en diversos artículos anteriormente mencionados (Collings & Hird, 1997; Makai *et al.*, 2003; Fonseca-Santos *et al.*, 2016), ya que es justo el área donde se forma la microemulsión presumiblemente W/O, por la zona en la que se localiza dentro del diagrama.

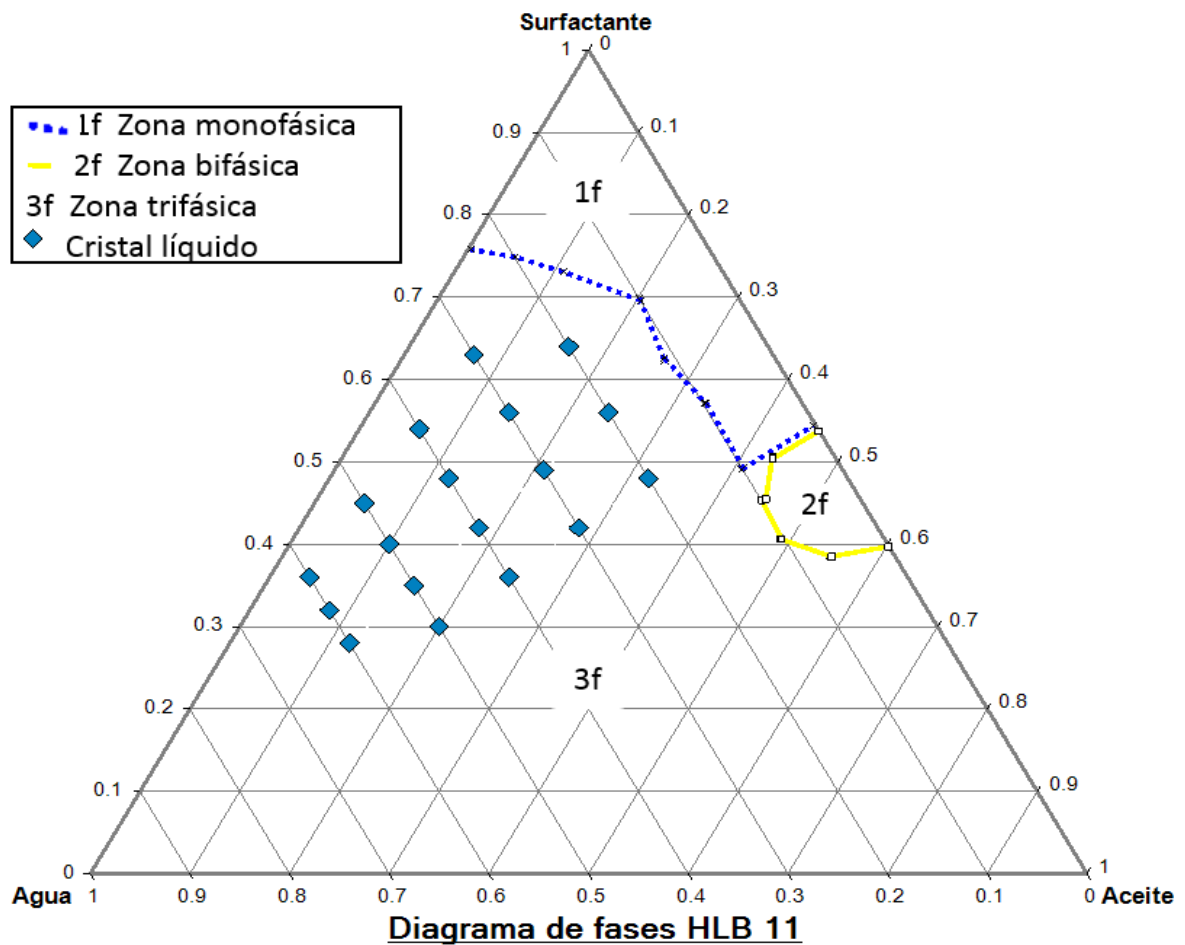


Figura 15 Diagrama de fases para HLB 11 en el que se identifican las zonas monofásicas, bifásicas y trifásicas, así como las concentraciones a las que se encontraron cristales líquidos.

Posteriormente se encuentra la zona bifásica en cantidades de surfactante y aceite que oscilan entre los 50 y 60% y por debajo del 10% de agua. En el caso de las estructuras de cristal líquido, se percibe que su formación se extiende hasta cantidades de agua por arriba del 50% y a no más de un 40% de aceite, en el caso del surfactante los CL se forman entre un 70 y poco menos del 30% de surfactante. El hecho de que podamos obtener estructuras que soportan altas cantidades tanto de la fase oleosa como acuosa abre la posibilidad de tener compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica en cantidades equiparables y suficientes.

En la Figura 16 se muestra el diagrama de fases del Sistema Aceite-Surfactante-Agua para HLB 12, y de igual manera que para HLB 11, se identifican tres zonas específicas. La primera es la zona monofásica que se encuentra en la zona superior del diagrama, y a diferencia de HLB 11 notamos que ésta zona es más pequeña, probablemente porque como es un surfactante de carácter más hidrofílico, hay una menor afinidad para concentraciones de agua y aceite más elevadas.

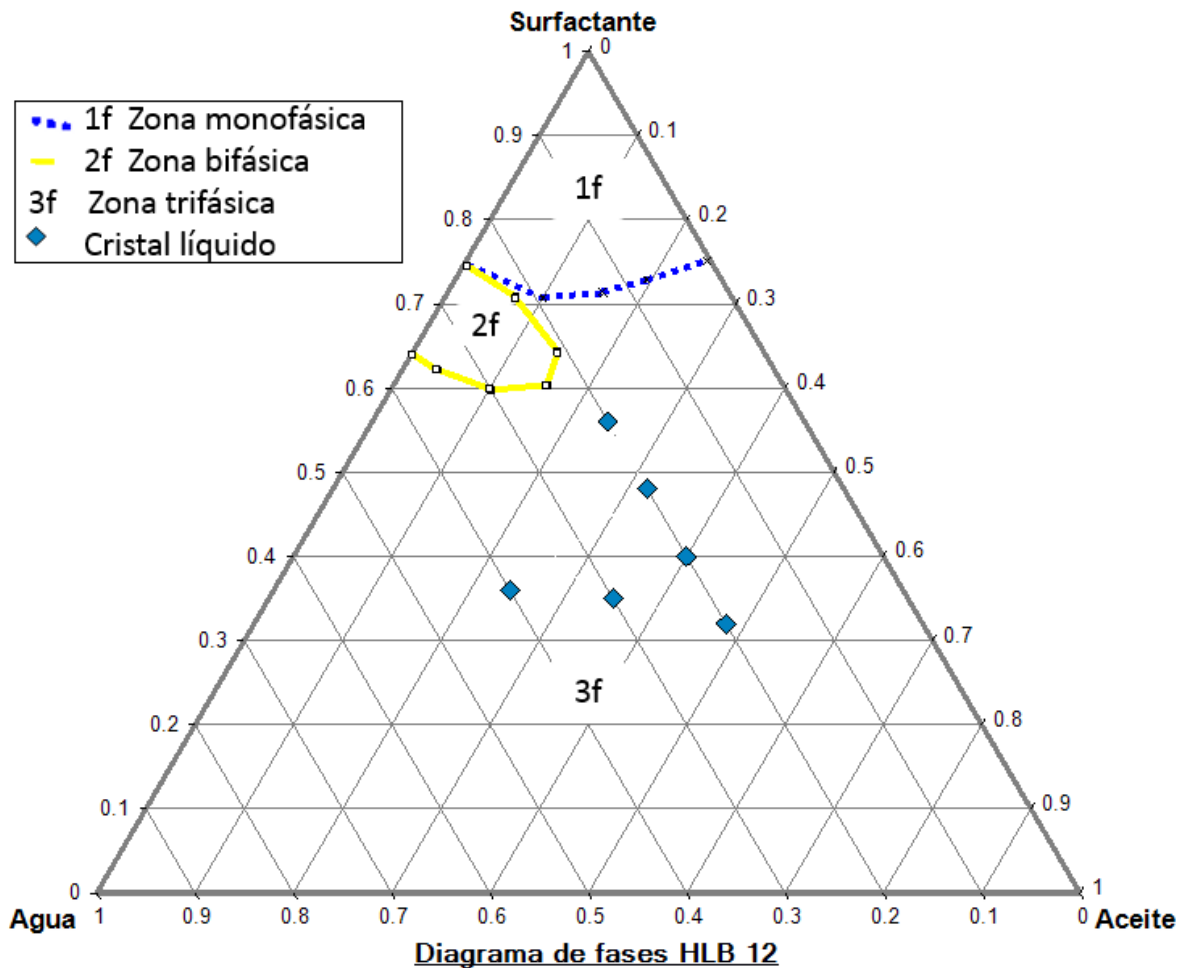


Figura 16 Diagrama de fases para HLB 12 en el que se identifican las zonas monofásicas, bifásicas y trifásicas, así como las concentraciones a las que se encontraron cristales líquidos.

En cuanto a la ubicación de las estructuras de cristal líquido, se identifica que hay diferencias importantes en la zona que se encuentran las diversas estructuras como consecuencia del HLB, esto como resultado de la afinidad que puede presentar en uno y otro sistema. Como lo reportado por Manish & Paradkar en el 2007 donde identifican la Influencia del HLB en el parámetro de empaquetamiento y por tanto el tipo de estructuras que se formarán en el equilibrio.

### 8.3 Microscopía de luz polarizada

En la Figura 17 se muestran las imágenes obtenidas del microscopio óptico de luz polarizada para la mezcla 1:9 de aceite-surfactante y su titulación con agua

desde 30 hasta 70% en peso. Se puede observar que hay diferencias de textura y en el porcentaje de fase birrefringente, lo que evidencia diferencias estructurales en los CLs debido a la variación en la concentración de los componentes; a medida que aumenta el agua y disminuye el surfactante y aceite, tenemos una menor cantidad de fase birrefringente y menor cantidad de cruces de malta.

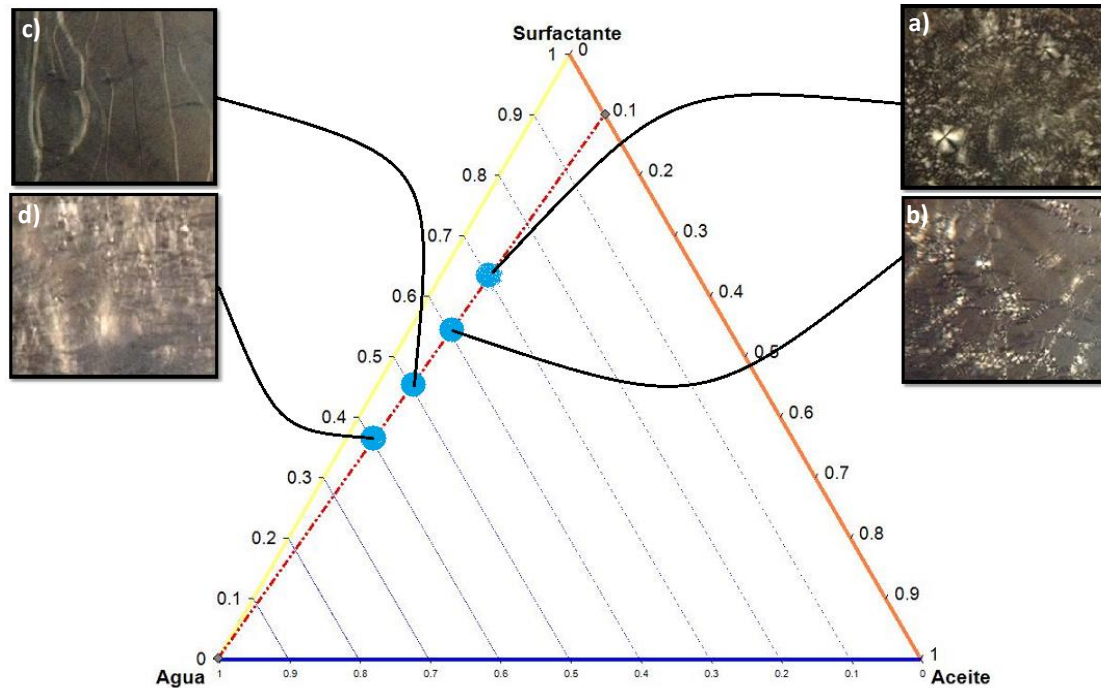


Figura 17 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla de aceite-surfactante 1:9.

Por otra parte si se comparan las micrografías obtenidas por Shinoda & Friberg en 1986, se puede notar una alta similitud en las texturas que caracterizaron estructuralmente como cristal líquido lamelar, por lo que se podría de manera no concluyente inferir que las estructuras encontradas en las imágenes a) y b) corresponden a estructuras lamelares; esto aunado a que la zona de formación de los cristales líquidos lamelares se ubican por arriba del 50% de surfactante (Collings & Hird, 1997). Para el caso de las micrografías c) y d), únicamente se identifica el fenómeno de birrefringencia ya que las texturas son poco comparables con la literatura, por esta razón requieren un mayor análisis para su caracterización.

En la Figura 18 se muestran las micrograffías de las muestras obtenidas a partir de la mezcla en una relación en peso 2:8 para aceite-surfactante respectivamente, y a la concentración de agua indicada en el diagrama.

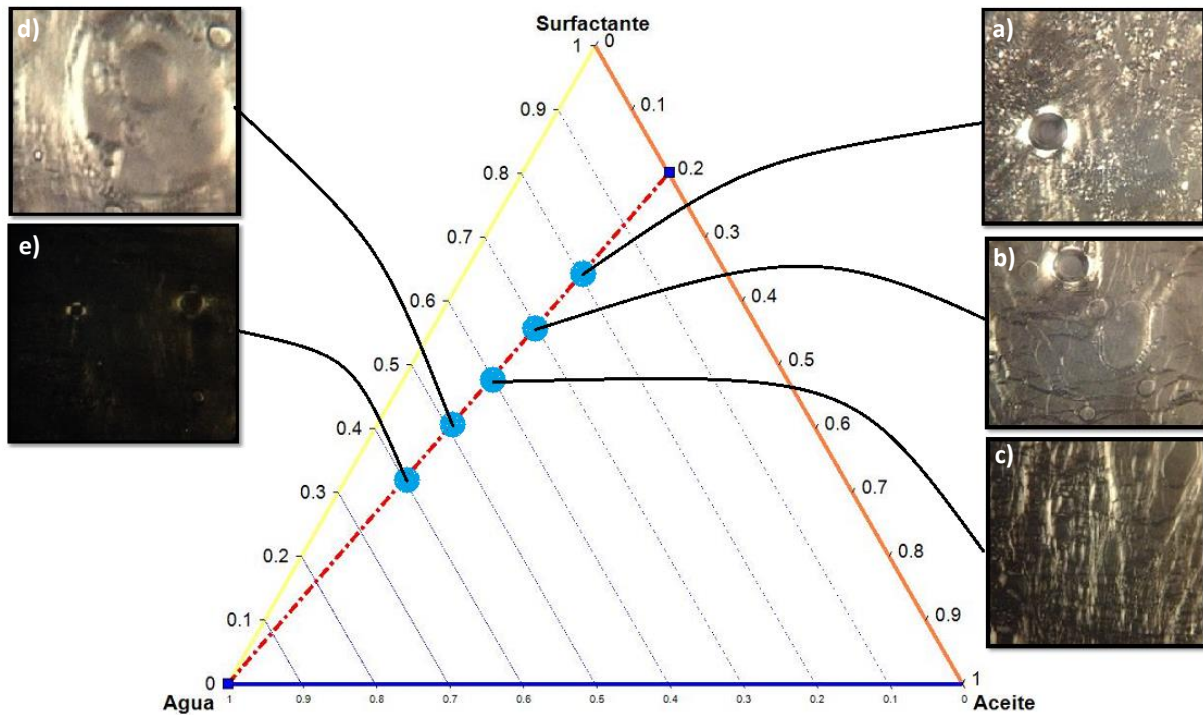


Figura 18 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrograffías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla de aceite-surfactante 2:8.

En estas nuevas proporciones podemos identificar la posible presencia de estructuras Lamelares para los casos a), b) y c); que corresponden a mezclas en las que la cantidad de surfactante esta por arriba del 50%, sin embargo, las imagenes b) y c) son más parecidas a las estructuras lamelares encontradas por Berni y colaboradores en el 2002.

Para el caso de la micrografía d) únicamente es perceptible la birrefringencia y tiene una textura difícil de comparar con la literatura. Finalmente en la micrografía e) se identifican gotas cubiertas de cristal líquido como las reportadas por Shinoda & Friberg (1986).



En la Figura 19 se muestran las micrografías que presentaron birrefringencia y su localización el diagrama de fases.

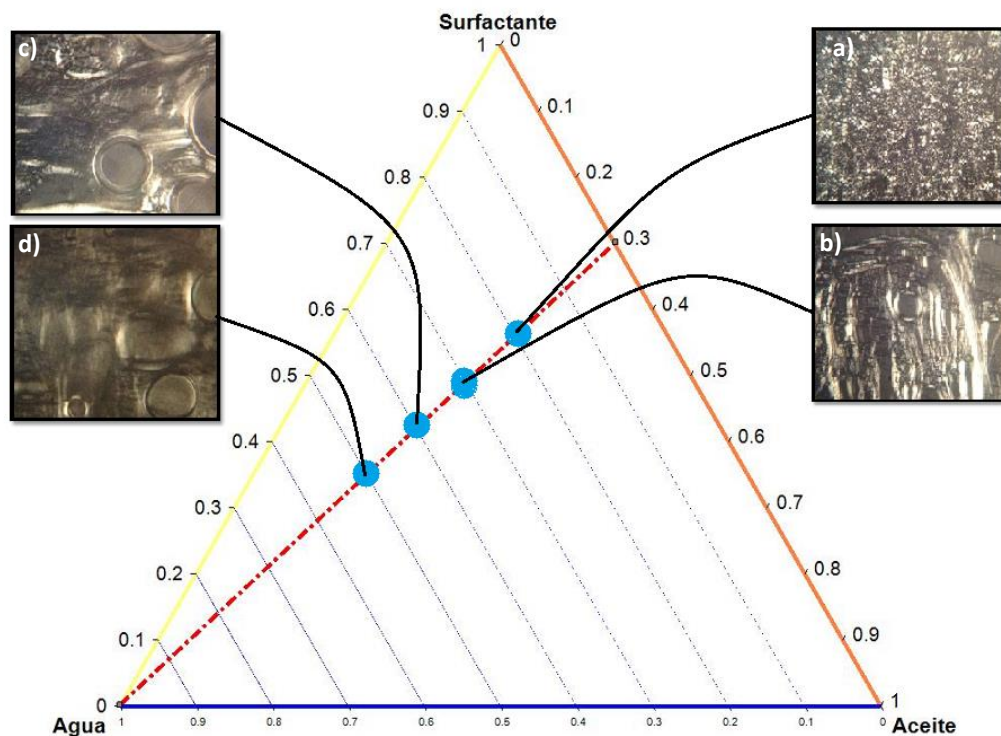


Figura 19 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para mezcla de aceite-surfactante 3:7.

En esta mezcla de aceite surfactante, las estructuras de CL presentan una mayor homogeneidad estructural cuando la cantidad de surfactante esta en concentraciones por arriba del 50% y a medida que disminuye la cantidad de aceite y surfactante, pero aumenta la de agua, se pierde la estructura, regularidad y presencia de la fase de cristal líquido lamelar. Esto puede ser por la transformación de fase que promueve una mayor cantidad de disolvente que corresponde a lo reportado por Amar-Yuli y colaboradores en el 2009 quienes identifican que al adicionar una mayor cantidad de agua o someter las muestras a calentamiento, aumenta el desorden de la cadena de hidrocarburos, dando lugar a transiciones de fase.

En la figura 20 se muestran las micrografías obtenidas para la mezcla de aceite surfactante 4:6 y la composición puntual de cada componente, así como su ubicación en el diagrama de fases.

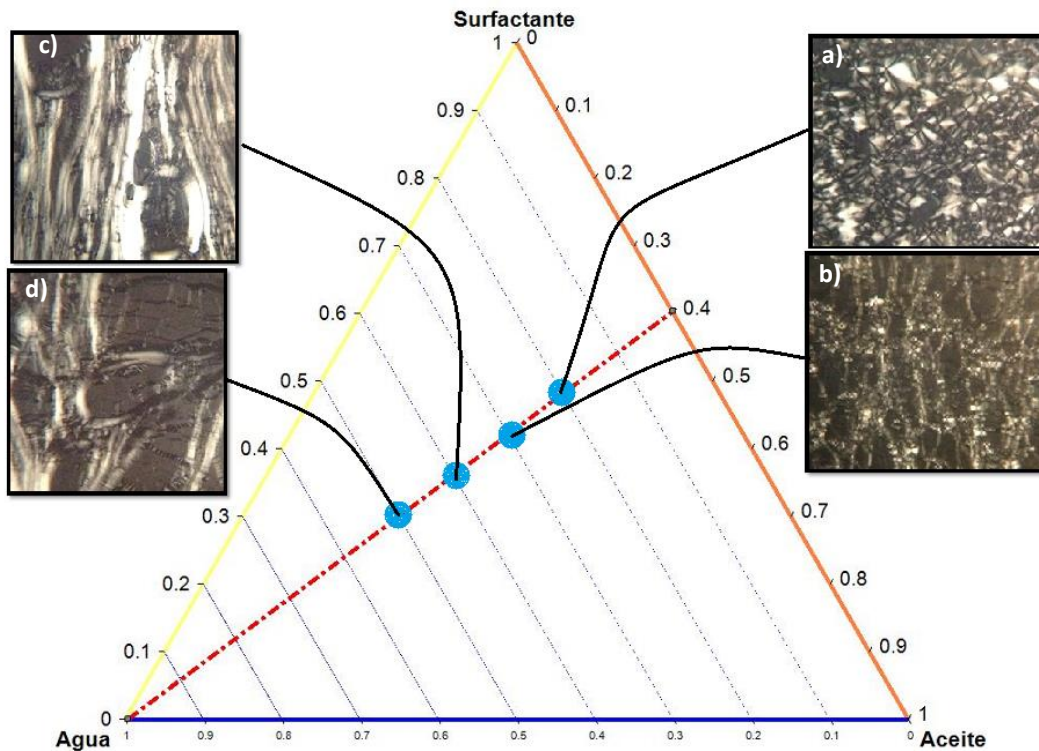


Figura 20 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 11, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla aceite-surfactante 4:6.

En este caso las micrografías evidencian lo que parecieran ser estructuras lamelares por debajo del 50% de surfactante, esto se puede deber a que como se sabe, la modificación de las variables de formulación, puede compensar ciertos efectos que permiten extender o acortar la zona en la que aparecerá una fase específica (Salager & Antón, 1998), cambiando así las condiciones generales de composición de las diferentes fases y su forma de agregación molecular.

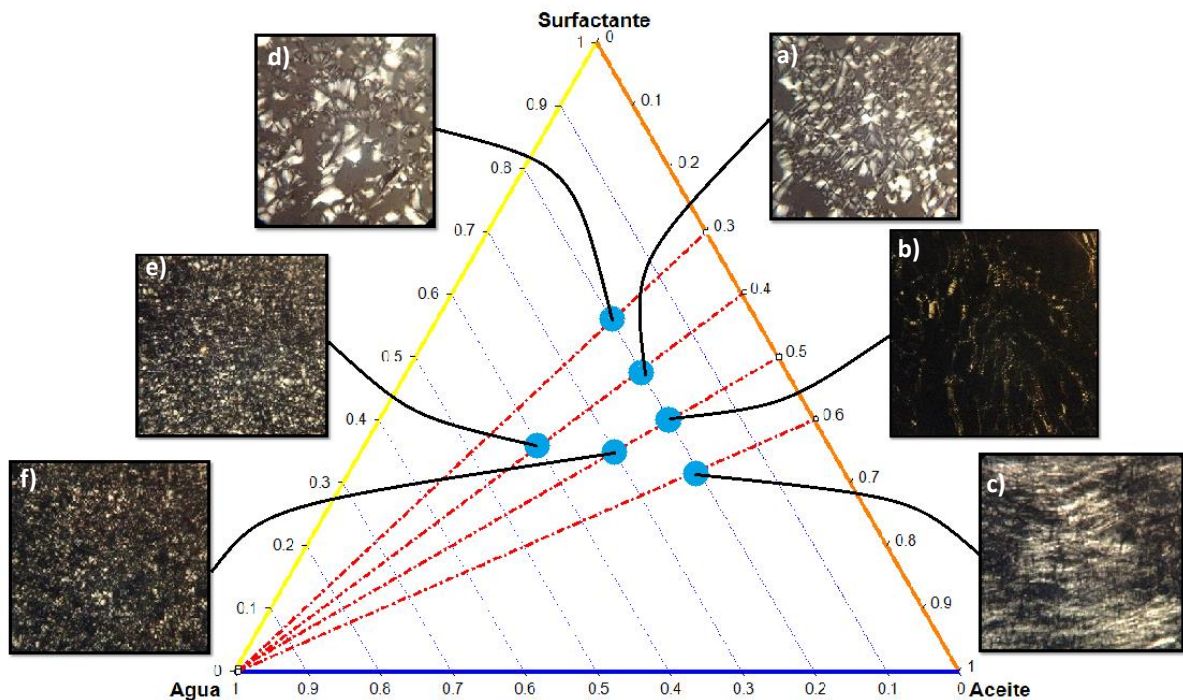


Figura 21 Diagrama de fases en el que se muestran las concentraciones y zona de los CLs para HLB 12, así como las micrografías de las estructuras birrefringentes observadas mediante luz polarizante a 40X para la mezcla de aceite-surfactante 2:8 y 3:7.

Para el caso de HLB 12 se observa que el área dentro de la cual se encuentra a los cristales líquidos es más pequeña, y sus estructuras son más regulares y definidas. También se muestran las diferentes estructuras como consecuencia del cambio de composición de la mezcla.

Hay una marcada relación entre las estructuras vecinas, lo que permite indicar que la composición a la cual se forma un cristal líquido específico, es realmente un rango de composición, rango en el que se tiene correspondencia estructural pero la composición puntual de cada componente se modifica, así como la cantidad de la mesofase formada, por lo que al identificar hacia donde crece la fase podemos afinar el barrido de composición en aumentos del 1% y así definir la formulación óptima del CL deseado y aumentar el rendimiento de la fase. Manish & Paradkar (2007), identificaron la influencia de HLB sobre las estructuras de cristal líquido que se forman al equilibrio y su facilidad y rapidez de transformación a otras

estructuras que pudieran presentar una mayor viabilidad para la liberación controlada de fármacos, por lo que el HLB es un parámetro determinante y selectivo en la formación de las diferentes fases de CL.

La siguiente etapa del trabajo consistió en la inclusión del componente bioactivo a la fase oleosa y se sustituyó por el aceite puro en las estructuras identificadas de CL para HLB 11 y 12. Posteriormente se analizaron las fases mediante microscopía de luz polarizada y se compararon para los sistemas sin  $\beta$ -caroteno y cargados con  $\beta$ -caroteno. En la Figura 22 se muestran las imágenes obtenidas para HLB 11 y una mezcla de aceite-surfactante 2:8 y 3:7.

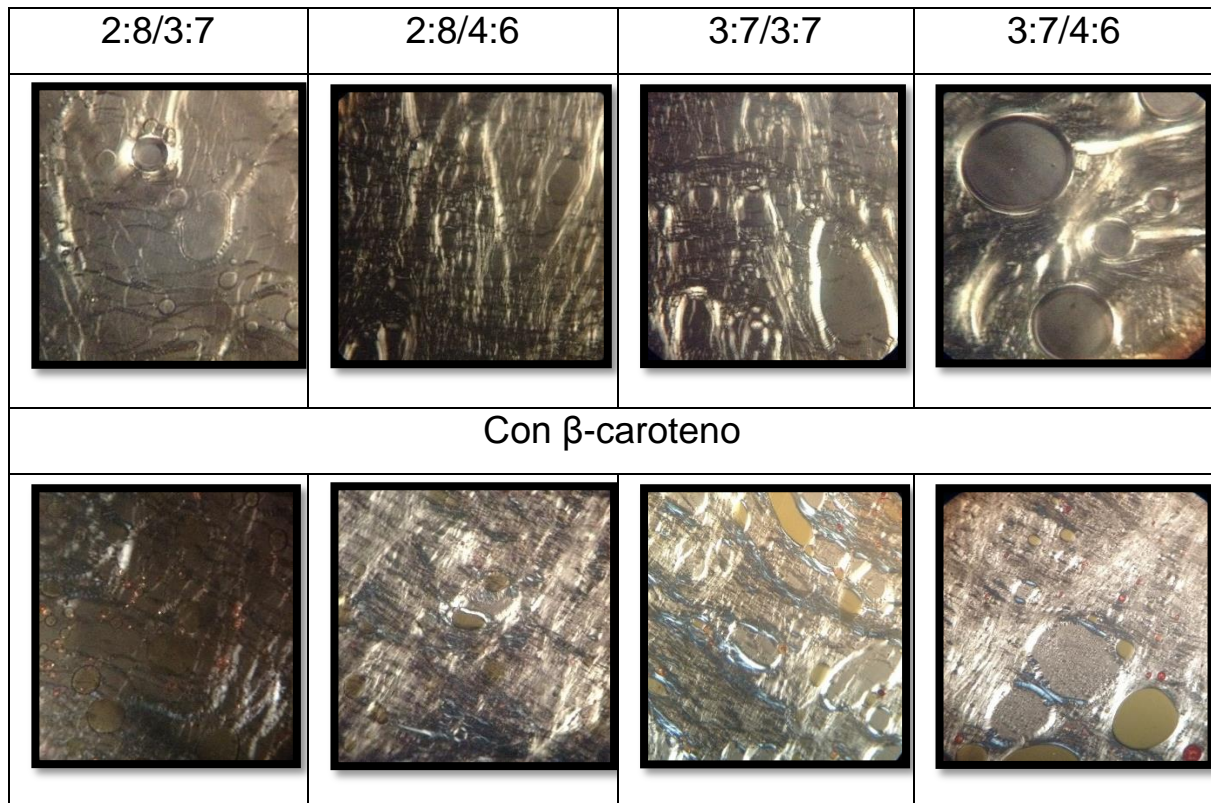


Figura 22 Diferentes estructuras de los cristales líquidos para las proporciones 2:8 y 3:7 de mezcla aceite:surfactante a las relaciones 3:7 y 4:6 de mezcla:agua para HLB=11.

Como se muestra en la Figura 22, al comparar las mismas proporciones de aceite-surfactante-agua sin y con  $\beta$ -caroteno podemos notar que hay similitud estructural en los sistemas correspondientes, al igual que lo reportado por Makai y colaboradores (2003), trabajo en el que encontraron una baja influencia a nivel estructural cuando se incluyeron fármacos de carácter hidrofílico y lipofílico en bajas concentraciones. También Chorilli y colaboradores (2011) indicaron que cuando se agregan co-surfactantes como el glicerol para disminuir la cantidad de un componente y evitar la separación de fases, no se presentan diferencias estructurales evidentes. La comparación del presente estudio se realizó con cuatro concentraciones diferentes, lo que permite inferir que hay poca influencia del componente bioactivo sobre la formación de los CLs y la estructura que estos forman. La coloración del aceite como consecuencia de la solubilización del  $\beta$ -caroteno, permite identificar las zonas en las que se posiciona el aceite en la estructura del CL, evidenciando que precisamente esta dentro de la red formada por el CL, posicionamiento que suena prometedor para actuar como una eficiente matriz de protección.

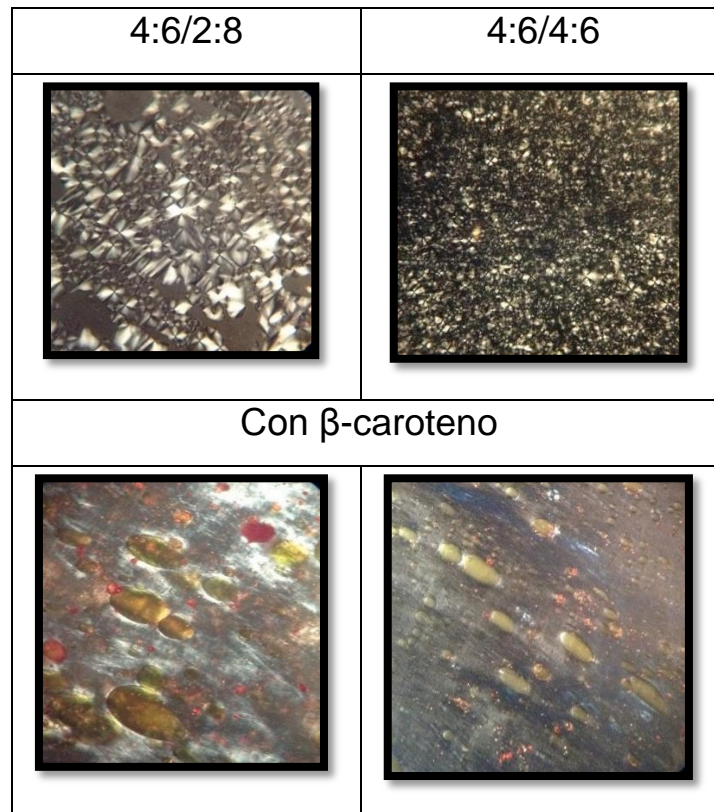


Figura 23. Diferencias estructurales de los cristales líquidos para las proporciones 4:6 de mezcla aceite:surfactante a las relaciones 3:7 y 4:6 de mezcla:agua para HLB=12.

Para el caso de HLB 12, a diferencia de las micrografías mostradas para HLB 11, se encontró que hay poca similitud en las estructuras formadas; por lo que se observa que sí hubo una influencia significativa al agregar el  $\beta$ -caroteno a la fase oleosa. Esto se puede deber a que cuando se incluye el  $\beta$ -caroteno a la fase oleosa, modifica sin duda las características inherentes del aceite de canola, y con esto las variables de formulación fisicoquímica, variando la afinidad y las interacciones entre cada una de las fases. HLB 12 tiene un balance hidrofílico-lipofílico que favorece su interacción con disolventes polares, y si el  $\beta$ -caroteno tuvo la capacidad de modificar la polaridad del aceite disminuyéndola, el surfactante tendría una menor posibilidad de interacción con la fase oleosa cargada con  $\beta$ -caroteno.

En la Figura 24 se muestran los diagramas de fase obtenidos para HLB 11 con y sin  $\beta$ -caroteno, donde se localizan las áreas en las que podemos encontrar microemulsión (ME) y las concentraciones en las que se encuentran fases de cristal líquido.

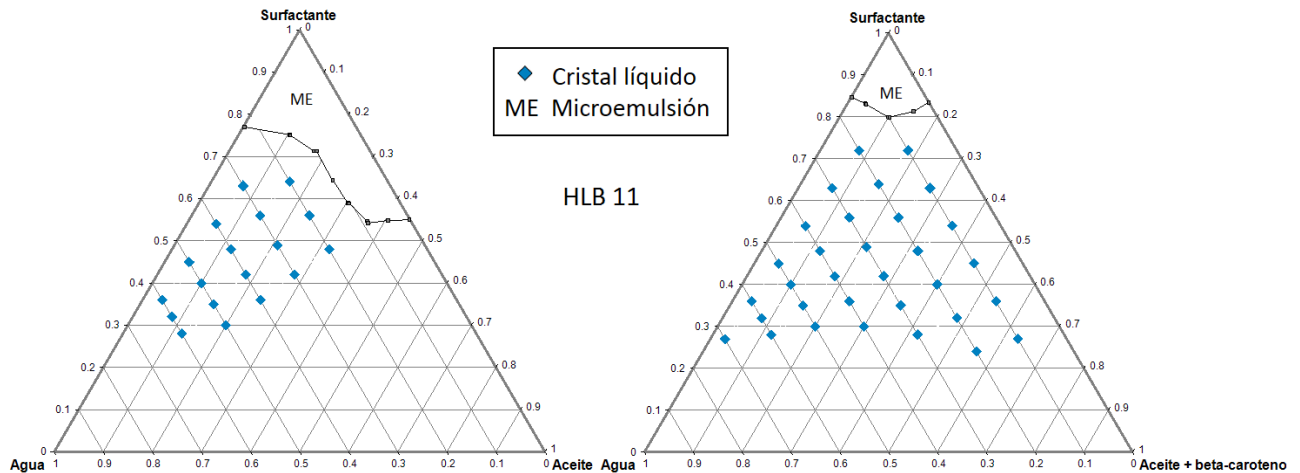


Figura 24 Diagramas de fases pseudo-ternario para las diferentes mezclas de aceite-surfactante-agua, con y sin  $\beta$ -caroteno.

En los diagramas de fase mostrados en la Figura 24, se nota que en el sistema adicionado con  $\beta$ -caroteno hay ciertos acortamientos en la zona de microemulsión y aumentos en las áreas correspondientes a la zona de formación de CLs, Chorilli y colaboradores (2011), realizaron un estudio en el que compararon las diferentes fases encontradas en un diagrama de fases al incluir o no un fármaco, e identificaron que pudieron encontrar fases iguales en ciertas zonas, pero de manera similar que en la presente investigación, tuvieron ciertas diferencias en cuanto a la extensión de dichas zonas. Esto se debe a la modificación del aceite de canola como consecuencia de la solubilización del  $\beta$ -caroteno y su influencia en las interacciones de los componentes puros.

En la Figura 25 se muestra el diagrama de fases pseudo ternario para HLB 11 con  $\beta$ -caroteno y las microfotografías asociadas a cada concentración de cristal líquido.

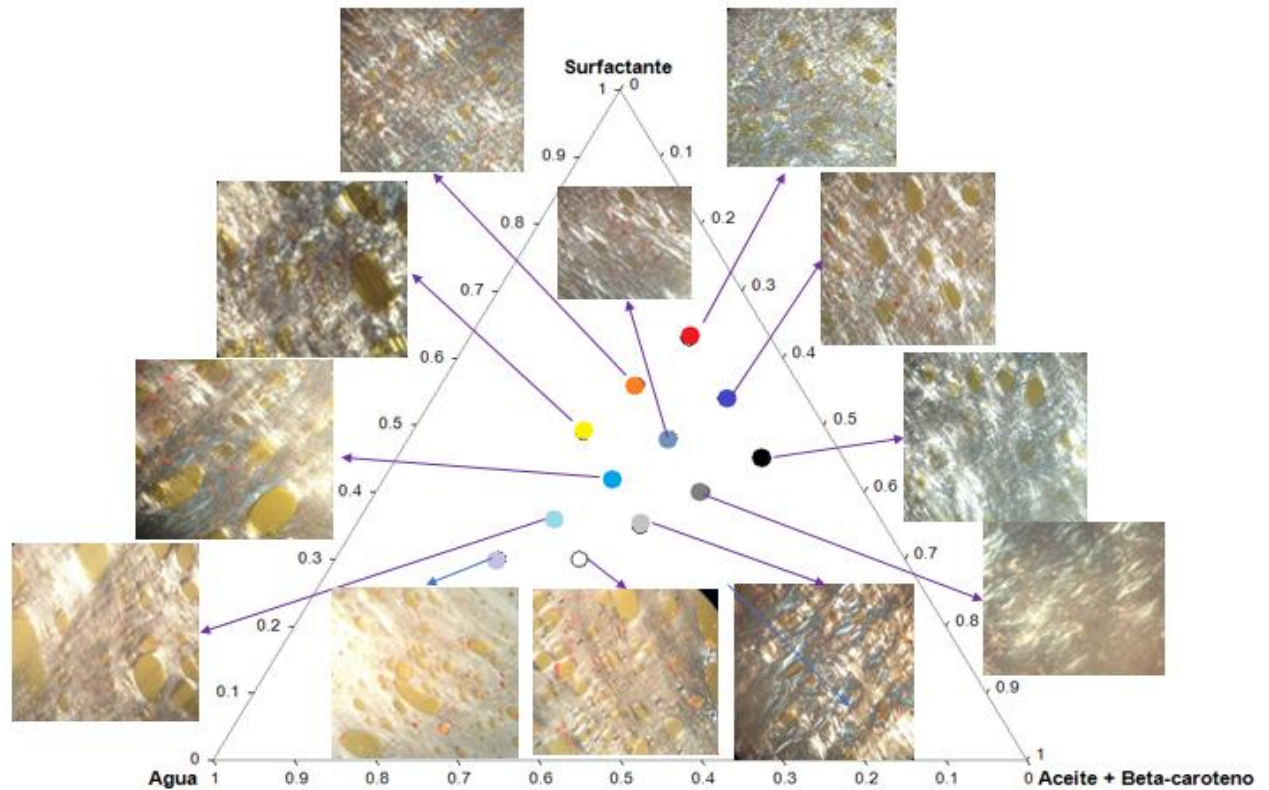


Figura 25 Diagrama de fases HLB 11 cargado con  $\beta$ -caroteno, y la ubicación de las concentraciones puntuales y las micrografías de las estructuras de cristal líquido vistas desde un microscopio de luz polarizada a 40X.

Las micrografías permiten identificar que en la parte rica en surfactante se forman micelas de menor tamaño dentro de la red de CL, a diferencia de la zona baja en surfactante. En cuanto a la forma de la red de los CLs hay una mayor regularidad en aquellas mezclas en las que permanece la cantidad de agua constante, implicando que la estructura de CL es más dependiente de la cantidad de agua y el incremento del tamaño micellar que de la cantidad de aceite y surfactante, a medida que aumenta el aceite y disminuye la cantidad de surfactante, incrementa el tamaño de las micelas. Esto corresponde con lo reportado por Salager (1993), ya que menciona la importancia de un balance entre la cantidad de fase oleosa y surfactante para tener el material anfílico necesario para cubrir las gotas de aceite.

En la Figura 26 se muestra una gráfica del volumen formado de la fase de cristal líquido para cada mezcla, todas las muestras tenían el mismo volumen total de



mezcla. El siguiente análisis nos permite evaluar la dependencia de la concentración de cada uno de los componentes en la formación de CLs, al ubicarlos dentro del diagrama de fases (correspondencia de color), se observa que el volumen formado depende de la cantidad de agua que se agrega al sistema, y cuando la proporción de agua es constante y por debajo del 30% en peso, lo que determina un mayor volumen de fase es el incremento de la fase oleosa y la disminución del surfactante.

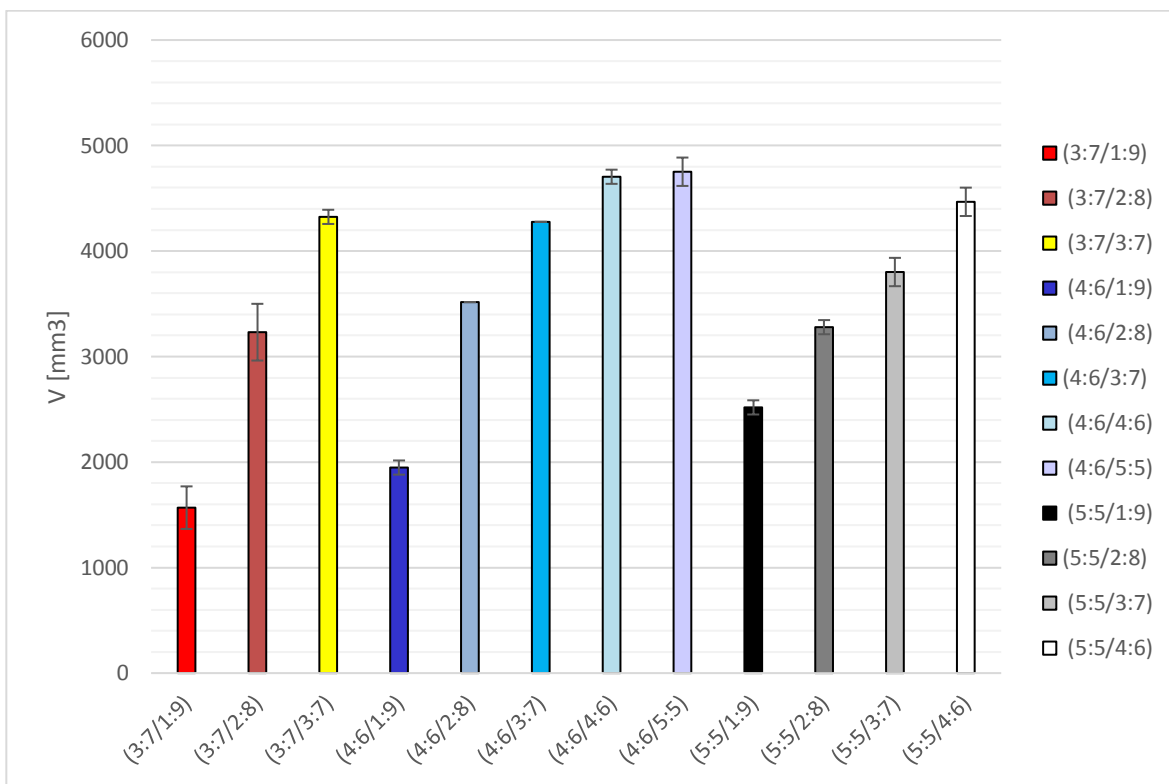


Figura 26 Gráfica de los volúmenes obtenidos de fase de cristal líquido para cada una de las mezclas del sistema adicionado con  $\beta$ -caroteno para HLB 11.

Para efecto de éste análisis resulta difícil la comparación, ya que hay poca información en la literatura acerca del rendimiento de formación de cristales líquidos en diversos sistemas, ya que regularmente hacen la evaluación a partir del cristal líquido, sin dar cuenta de los sistemas en los que hay mas de una fase en equilibrio con el CL, sin embargo, para efecto de la presente investigación, permite la formación de varias estructuras para su posterior evaluación en pro de identificar la formulación más prometedora en contenido de  $\beta$ -caroteno y protección durante el almacenamiento.

## 8.4 Estabilidad de $\beta$ -caroteno

La primer identificación importante de la Figura 27 es la cantidad de  $\beta$ -caroteno que contienen las muestras iniciales de cristal líquido, ya que la más baja esta alrededor de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CL, de  $\beta$ -caroteno, lo que de entrada suena prometedor para su elaboración y uso.

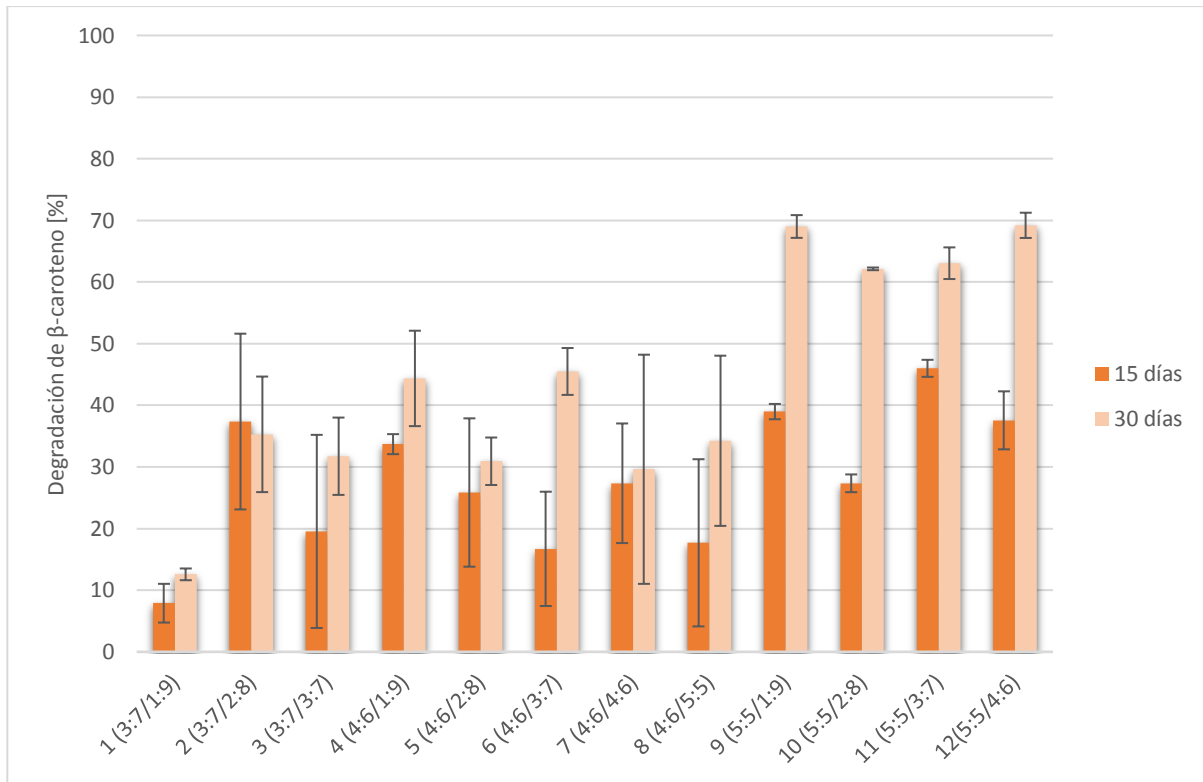


Figura 27 Degradación de carotenos para las diferentes muestras de CL para HLB 11, después de 15 y 30 de almacenamiento a una  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en condiciones de oscuridad.

El porcentaje de degradación se cuantificó a partir de la normalización de la concentración inicial de  $\beta$ -caroteno de cada muestra. De manera general lo que se identifica de la gráfica anterior es que el mayor porcentaje de pérdida se presenta en las muestras que tienen un mayor contenido de fase oleosa y una menor concentración de surfactante, situación que estructuralmente se refleja en una red de cristal líquido mas abierta y micelas de mayor tamaño. La degradación puede explicarse en términos estructurales, ya que el  $\beta$ -caroteno se encuentra más expuesto al ambiente por tener una menor red de protección y una mayor área de exposición.

En cuanto a la cantidad de agua poco se puede decir en función de la degradación, ya que no se muestra una tendencia clara para los diferentes sistemas, por lo que la mayor dependencia se inclina hacia la concentración de surfactante. Según lo reportado por diversos autores (Pasquali *et al.*, 2006; Salager, 1998; Salager & Antón, 1991), esto corresponde a que es en la zona rica en surfactante donde se presentan los sistemas de cristal líquido lamelar y son caracterizados por su acomodo en bicapas (Collings & Hird, 1997) lo que les confiere una alta estabilidad.

### **8.5 Efecto de la temperatura sobre las estructuras de Cristal Líquido**

Finalmente y con el objetivo de identificar los cambios que pueden presentar las fases de CL frente a cambios de temperatura, se realizaron ciclos de calentamiento en una muestra de CL (3:7/3:7) mediante convección forzada y sensando la temperatura con un termómetro infrarrojo Extech instruments IRT25, que permitió observar la muestra durante el calentamiento. El primer ciclo consistió en llevar la muestra hasta una  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual desaparecían las estructuras de CL, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. En la Figura 28 se muestra una gráfica que esquematiza el ciclo de calentamiento mencionado, así como las micrografías obtenidas mediante luz polarizada.

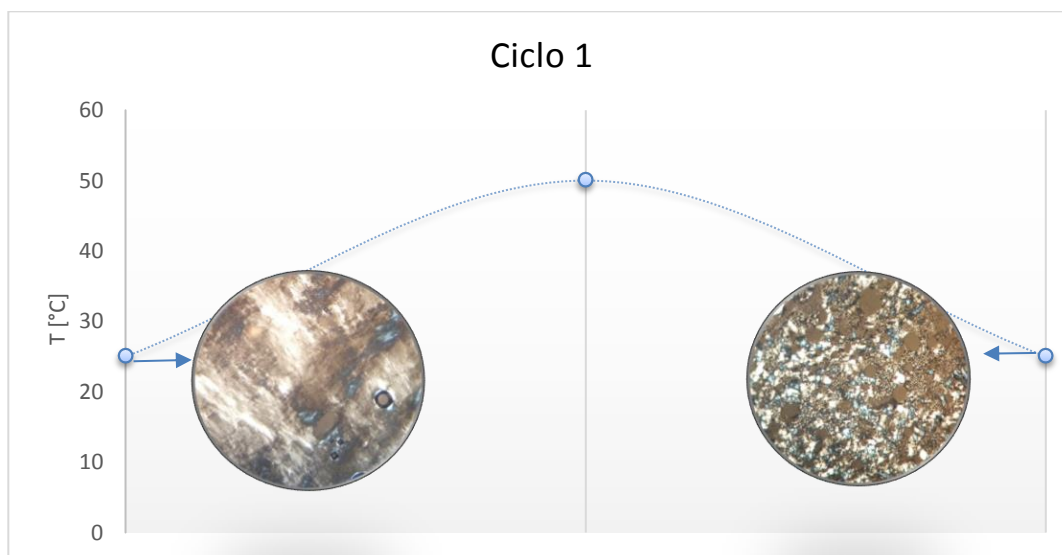


Figura 28 Muestra la gráfica de un ciclo de calentamiento que se llevó a cabo desde temperatura ambiente hasta 50 °C y posteriormente su enfriamiento hasta 25 °C con las micrografías correspondientes a 40X en un Microscopio de luz polarizada.

Las estructuras birrefringentes dan la evidencia suficiente para comprobar el cambio estructural que sufren los cristales líquidos liotrópicos frente a estímulos térmicos. Estos cambios pueden deberse en gran medida a la modificación tanto de la afinidad como del parámetro de empaquetamiento del anfífilo, ya que al aumentar la temperatura, aumenta el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas y de agua, modificando la expansión del volumen de la parte lipofílica del surfactante, pero disminuyendo la longitud de la cadena y el área del grupo de la cabeza polar, conduciendo a un aumento de la curvatura y provocando una transición de fase (Quan Li, 2014). Este efecto ha sido reportado y utilizado por diferentes autores como herramienta para identificar modificaciones realizadas en las estructuras al incluir fármacos de tipo hidrofílico y lipofílico, así como para reportar transiciones *in-situ* que podrían o no ser benéficas en función de la necesidad de liberación del fármaco.

El siguiente ciclo corresponde a un ciclo de enfriamiento, en el que partimos de la muestra del ciclo anterior y se llevó a una temperatura de 7 °C, posteriormente se observó mediante luz polarizada.

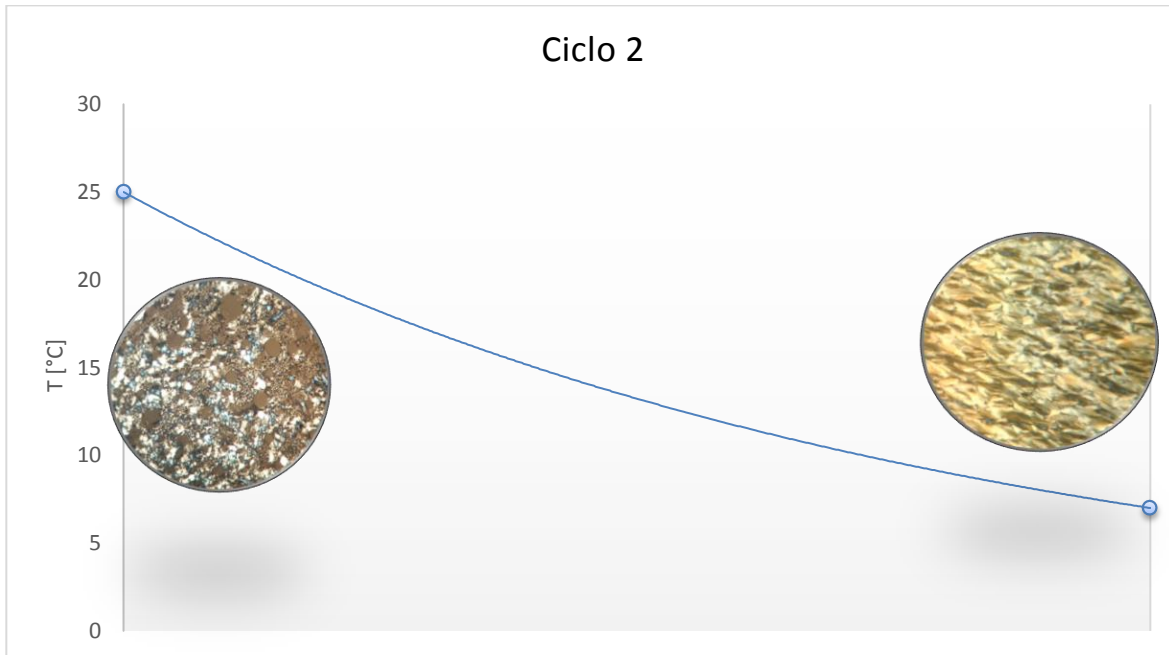


Figura 29 Se muestra un segundo ciclo de calentamiento en el que se partió de la muestra de la figura 25 a 25 °C y se sometió a un enfriamiento lento hasta la  $T=7$  °C y sus respectivas estructuras vistas en un microscopio de luz polarizada a 40X.

En éste estímulo térmico, nuevamente se presenta un cambio estructural, en el que aumenta la regularidad estructural de la fase hay un cambio en la coloración de la fase birrefringente. Esto puede deberse a que cuando descendemos la temperatura necesariamente aumenta la viscosidad el medio e inducimos un acomodo de menor energía de los grupos polares y apolares. En cuanto al cambio de coloración, sabemos que la imagen birrefringente depende del acomodo que las moléculas en el plano, por tanto, también podemos identificar cambios orientacionales y/o de posición.

El último ciclo que se muestra en la Figura 29 corresponde nuevamente a un calentamiento, se partió de la muestra anterior a 7 °C y se sometió a un calentamiento hasta la desaparición completa de los CL y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.

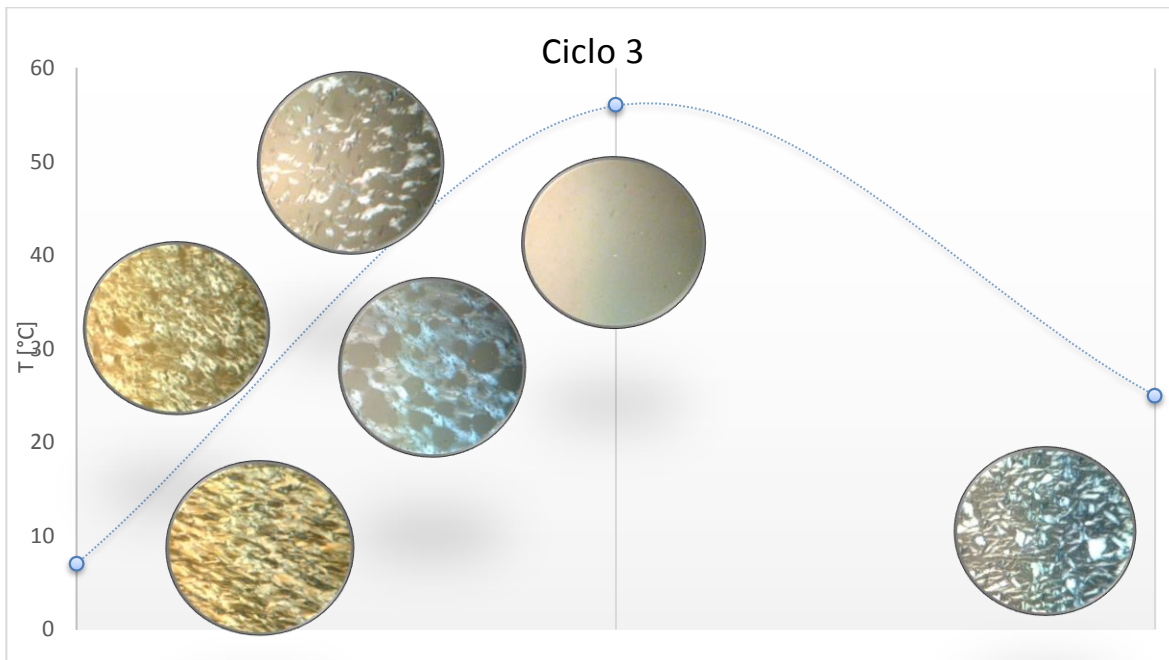


Figura 30 Se muestra un tercer ciclo de calentamiento en el que se partió de la muestra de la figura 26 a  $T=7\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se sometió a un calentamiento lento hasta una  $T=56\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se muestran sus respectivas estructuras vistas en un microscopio de luz polarizada a 40X.

En éste último ciclo se muestran las micrografías tomadas a diferentes temperaturas durante el calentamiento para evidenciar como es que se rompe la estructura del cristal líquido, es importante notar que la temperatura a la cual se disuade completamente la estructura es mayor que la de la muestra a inicial, esto puede deberse a que los cambios estructurales son irreversibles y los ciclos de calentamiento pueden modificar defectos estructurales dando como consecuencia estados de menor energía. Otra razón podría ser que como incrementamos la regularidad de la estructura de CL y por ende su tamaño, le cuesta más energía al sistema romper las redes cristalinas. Estas transformaciones estructurales nos permiten dar cuenta de la capacidad que tienen los CLs para modificar su ordenamiento frente a estímulos térmicos, propiedad dada por las características fisicoquímicas inherentes de los surfactantes no-iónicos, ya que al incrementar la temperatura modifican su afinidad y parámetro de empaquetamiento.

## 9. CONCLUSIONES

El método de barrido de composición unidimensional es una técnica experimental confiable que permite identificar mesógenos y una amplia gama de estructuras de cristal líquido.

Al posicionar las diferentes estructuras y su proporción en un diagrama de fase-pseudoternario, permite identificar la influencia de cada uno de los componentes hacia la formación de fases específicas.

Los surfactantes no-iónicos con un HLB 11 y 12, forman mesofases lamelares, hexagonales.

Las fases de cristal líquido se forman únicamente por arriba del 20% de surfactante para HLB 11 y 12.

El sistema HLB 11 adicionado con  $\beta$ -caroteno, presentó las mismas estructuras de cristal líquido que en el sistema sin dicha biomolécula.

La cantidad de fase de cristal líquido es directamente proporcional a la cantidad de agua y aceite presentes en la mezcla.

La formación de cristales líquidos con una mayor fase birrefringente se presentan en la zona rica en surfactante e incrementan con el contenido de aceite.

Los sistemas formados a partir del surfactante con HLB 11, presentan una matriz prometedora para su uso con biomoléculas de carácter hidrofóbico, como consecuencia de la baja influencia que se observó cuando se adicionó el  $\beta$ -caroteno.

Las fases de cristal líquido presentan cambios estructurales irreversibles cuando se les aplican tratamientos térmicos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Amar-Yuli I., D. Libster, 2009.** Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14: pp. 21- 32.
- Aubry J., G. Schorsch, 1999,** Formulation – Présentation Générale, *Techniques de l'Ingénieur, Traité Génie des Précédés*, J2 100: pp. 1-21.
- Bergonzi M.C., R. Hamdouch, F. Mazzacuva, B. Isacchi, A. Bilia, 2014.** Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions, *Food Science and Technology*, 59: pp. 148-155.
- Bergenstahl Björn, 2008.** Physicochemical Aspects of an Emulsifier Funtionality, In Hasenhuettl G., and R. Hartel, *Food Emulsifiers and Their Applications*, Springer Science + Business Media, New York: pp. 173-193.
- Ben Yahya, 2013,** Estructura y morfología de las fases ordenadas formadas por interacción de monómeros y sus correspondientes plímeros con el medio liotrópico AOT/agua, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Facultad de ciencia, Dpto. De Ciencias y Técnicas Fisicoquímicas: 337 p.
- Bregni Carlos, Pasquali Ricardo, Serrao Rosa, 2006.** Características e Identificación de los Cristales Líquidos Liotrópicos en *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 37: pp. 38-53.
- Berni M., C. J. Lawrence, D. Machin, 2002,** A review of the rheology of the lamellar phase in surfactant systems, *Advances in colloid and interface science*, 98: pp. 217-243.
- Calvo D., J. Ruíz, M. Valiente, 2016.** Phase Equilibria of mixtures of surfactants and viscoelastic properties of the liquid crystal phases, *Fluid Phases Equilibria*, 425: 358-364.
- Cardenas A., Salager J., 2011.** Emulsiones Multiples, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S277-C: pp. 1-30.
- Chen H., X. Chang, T. Weng, X. Zhao, Z. Gao, Y. Yang, H. Xu, X. Yang, 2004,** A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide, *Journal of Controlled Release*, 98: pp. 427-436.
- Chorilli M., P. S. Prestes, R. B. Rigon, G.R. Leonardi, L. A. Chiavacci, V. H. Sarmiento, A. G. Oliveira, M.V. Scarpa, 2011,** Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85: pp. 182-188.
- Chuan-Chuan L., Y. Hung-Yin, C. Ming-Hung, S. Chin-Min, C. Hwan-wen, Y. Wen-Jen, L. Mei-Hwa 2014.** Preparation of curcumin microemulsions with food-



grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line, *Food Chemistry*, 154: pp. 282-290.

**Collings, P., M. Hird, 1997**, *Introduction to Liquid Crystals Chemistry and Physics*, Ed. Taylor and Francis, London: 317 p.

**Fernández, A. 2006**, *Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España: 443 p.

**Figueiredo, A., S. Salinas, 2005**, *The physics of lyotropic liquid crystals. Phase transitions and structural properties*, Oxford University Press, New York: 315 p.

**Fonseca-Santos B., M. P. Daflon, M. Chorilli, 2016**, A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of in situ gelling curcumin-loaded liquid crystals in in vitro performance tests, *Arabian Journal of Chemistry*, 2016: pp. 1-9.

**García-Colín L., R. Rodríguez, 1995**, *Líquidos exóticos*, Fondo de Cultura Económica, México: 121 p.

**Griffin W., 1949**, Classification of Surface-Active Agents by HLB, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1: pp. 311-326.

**Groeneweg F., W. G. Agterof, P. Jaeger, J. M. Janssen, J. A. Wieringa, J. A. Klahn, 1998**. On the Mechanism of the Inversion of Emulsions, *Institution of Chemical*

**Heertje I., E. Roijers E., H. Hendrick, 1998**. *Liquid Crystalline Phases in the Structuring of Food Products in Lebens-Wiss. U-Technol*, Academic Press, Unilever Research Laboratorium, Vlaardingen, The Netherlands.

**Henelyta, R., C. Boon-Seang, I. Sosaku, N. Mitsutoshi, 2008**, Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method, *Food Hydrocolloids*, 22, pp. 12-17.

Hernández et al., 2004.

**Makai M., E. Csányi, Zs. Németh, J. Pálincás, I. Erós, 2003**, Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol, *International Journal of Pharmaceutics*, 256: pp. 95-107.

**Manish S., A. Paradkar, 2007**, Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, pp. 166-174.

**Mc. Clements D., 2012a**. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17: pp. 235-245.

**Mc. Clements D., 2012b**. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems, *Advances in Colloid and Interface Science*, 174: pp. 1-30.

- Mc. Clements, J. Rao, 2011**, Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate and lemon oil, *Food Hydrocolloids*, 25: pp 1413-1423.
- Pasquali R., C. Bregni, R. Serrao, 2006**, Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37 Núm. 2, pp. 38-53.
- Li Q., 2014**, *Nanoscience with Liquid Crystals. From Self-Organized Nanostructures to Applications*, Springer, Kent State University, OH USA: 429 p.
- Ribeiro H., B. Chu, S. Ichikawa, M. Nakajima, 2008**, Preparation of nanodispersions containing  $\beta$ -carotene by solvent displacement method, *Food Hydrocolloids*, 22: pp 12-17.
- Rondon-González M., V. Sadtler, L. Choplin, J. Salager, 2006**. Emulsion inversion from abnormal to normal morphology by continuous stirring without internal phase addition Effect of surfactant mixture fractionation at extreme water–oil ratio, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 288: pp. 151-157.
- Sadurini N., C. Solans, N. Azemar, M. García-Celma, 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: pp. 438-445.
- Salager, J., 1993**, Surfactantes en solución acuosa, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S201-A: 1-26.
- Salager, J., 1994**, Emulsionacion Influencia de las variables de agitación y composición, Laboratorio de formulación, unterfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S732-A: 1-29.
- Salager J., 1998**. Formulación HLB, PIT, R de Winsor, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S210A: pp. 1-16.
- Salager, J., 1999a**. Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para obtener las Propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte A. "Introducción y Conceptos de Formulación físico-química", Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S747-A: 2-19.
- Salager, J., 1999b** Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para obtener las Propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. "Propiedades de las Emulsiones y su medición", Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S747-B: pp. 2-43.
- Salager J., 2002**, Surfactantes tipos y usos, Laboratorio de Formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S300-A: pp. 1-54.

- Salager J., R. Antón, 1991**, Comportamiento de Fases de los Sistemas Surfactante-Agua-Aceite: Diagramas Barridos, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, cuaderno FIRP S220A: pp. 1-21.
- Salager J., R. Antón, J. Anderez, J. Aubry, 2015**, Formulación de Microemulsiones por el método del HLD, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S211-T: 1-33
- Shinoda K., S. Friberg 1986**, Emulsions and solubilization, Wiley-Interscience, New York: 190 p.
- Singh S., 2000**, Phase transitions in liquid crystals, Editor D. L. Mills, Department of Physics, Banaras Hindu University, Varanasi, India: 163 p.
- Singh S. 2002**, Liquid Crystals Fundamentals, Editor, D. A. Dunmur, World Scientific, Banaras Hindu University, London: 548 p.
- Treybal R., 1951**, Liquid Extraction, Mc Graw-Hill Book Company, New York: 442 p.
- Xiazhong R., D. Svirskis, R. Alany, S. Zargar-Shoshtari, Z. Wu, 2012**, In-situ phase transition from microemulsion to liquid crystal with the potential of prolonged parenteral drug delivery, International Journal of Pharmaceutics, 431: pp. 130-137.
- Zhou P., Labuza PT., 2011**. Métodos Analíticos- Calorimetría Diferencia de Barrido en Modulo de Referencia en Ciencias de los Alimentos, Enciclopedia de Ciencias de Lácteos (segunda edición), Academic Press: pp. 256-263.

## 11. ANEXOS

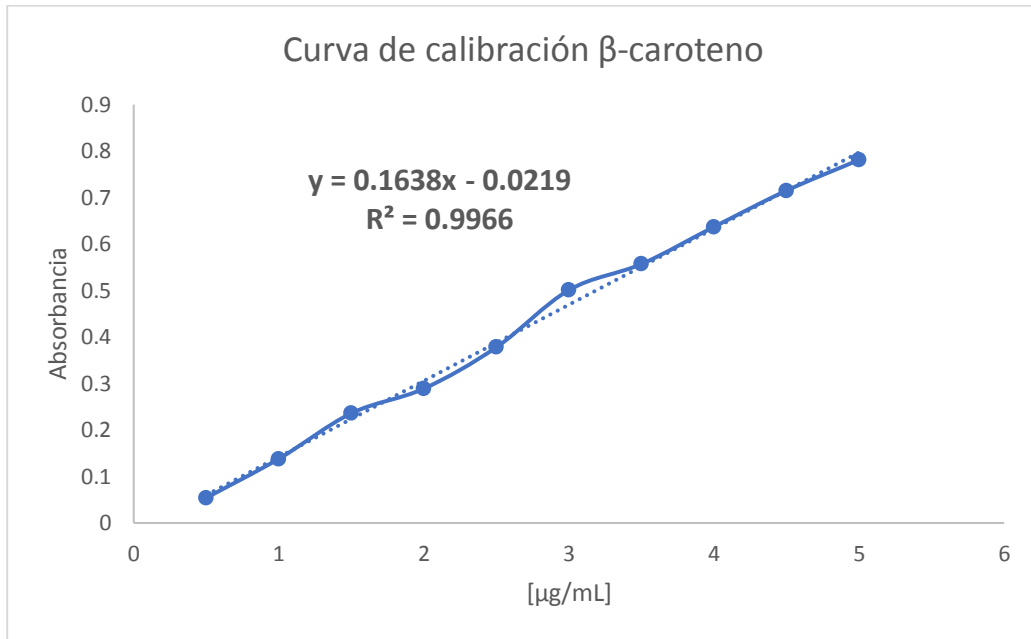


Figura 31 Curva de calibración  $\beta$ -caroteno