



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

TESIS

“Estabilidad y caracterización de cristales líquidos formulados a partir de Tween 40/Span 20 como matriz de protección y entrega de β -caroteno”

Para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

Presenta:

M. en C. Montserrat Paulina Jiménez Escobar

Director:

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Co-Director:

Dr. César Ignacio Beristain Guevara

Asesora:

Dra. Angélica Román Guerrero

Ciudad de México, a 24 de mayo del 2022

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

Ciudad de México a 24 de mayo del 2022.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis
**“Estabilidad y caracterización de cristales líquidos formulados a partir de Tween
40/Span 20 como matriz de protección y entrega de β -caroteno”**

que presentó

M. en C. Montserrat Paulina Jiménez Escobar

Comité Tutorial:

Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Co-Director: Dr. César Ignacio Beristain Guevara

Asesora: Dra. Angélica Román Guerrero

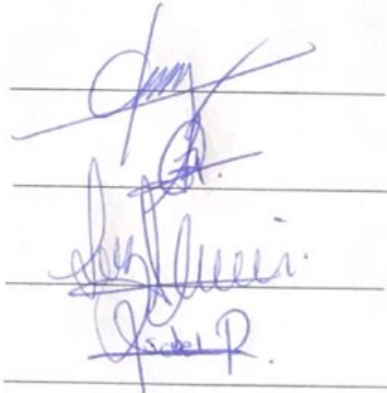
Jurado:

Presidente: Dr. José de Jesús Álvarez Ramírez

Secretario: Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal: Dra. Luz Alicia Pascual Pineda

Vocal: Dra. María Isabel Reyes Arreozola



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a través del programa de Becas Nacionales (Número de becario: 590646, CVU: 713360).

A la Universidad Autónoma Metropolitana por abrirme sus puertas y hacerme parte de esta gran casa de estudios.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos de la Universidad Veracruzana por brindarme las facilidades para realizar estancias y diversas técnicas experimentales de mi trabajo de tesis.

Al Dr Jaime Vernon y al Dr César Beristain por sus enseñanzas y por guiarme a cada paso de este trabajo, gracias por su paciencia y confianza en cada momento.

A la Dra Angélica Román por guiarme y apoyarme con sus valiosos comentarios y consejos.

A la Dra Luz Alicia Pascual por su confianza, apoyo y motivación constante

Al Dr. José Álvarez por la retroalimentación y por compartir su conocimiento y experiencia.

Al jurado por sus valiosas observaciones para mejorar el presente trabajo.

A mis compañeros por estar a mi lado y su apoyo.

Dedicatorias

A mi abuela por ser mi fuerza e inspiración siempre

A Josué, mi compañero de vida porque juntos concretamos un reto mas

A mis hermanas Pamela y Brenda y a mis sobrinas Kamila y Constanza por alentarme a ser mejor cada día

A mis padres Norma y José Antonio por darme la vida y compartirla

A Myrmin por siempre enseñarme con el ejemplo

RESUMEN

Se formularon cristales líquidos liotrópicos a partir de la mezcla de surfatantes Tween 40/Span 20 a un HLB de 11, utilizando agua como disolvente y aceite de canola como fase lipídica. Se construyeron los diagramas ternarios y en las concentraciones en las que la mezcla ternaria formó cristales líquidos se incluyó beta caroteno como molécula portadora. Los cristales líquidos blanco y con la biomolécula se analizaron mediante microscopía de luz polarizada, calorimetría diferencial de barrido, Índice de refracción, tamaño de partícula y FTIR. Los diagramas de fase mostraron que los CLL podían formarse con mezclas de surfactantes que oscilaban entre el 40 y el 63%. La concentración de W es la variable que tiene mayor influencia y se observó que cuando se incrementa el contenido de W hay un aumento del tamaño de partícula, disminución en el IR y aumento en la viscosidad aparente. Del análisis térmico se puede concluir los CLL formulados tienen buena estabilidad térmica, dado que se requieren temperaturas arriba de 60°C para causar inestabilidad o cambios irreversibles. La mejor protección de β -c se logró cuando la relación entre O+ β -c:TxSy:W fue de 36:54:10, y esta formulación mostró la mayor birrefringencia y la menor degradación. Las estructuras líquidas lipotrópicas formuladas tienen la capacidad para retener y proteger el β -caroteno y dado que la inclusión de esta biomolécula fue la variable que tuvo menos aporte en la modificación de las características de los CLL, se puede inferir que son viables para la incorporación nutracéuticos y bioactivos, que pueden ser utilizados en el desarrollo de nuevos alimentos.

ABSTRACT

Lyotropic liquid crystals were formulated from the Tween 40/Span 20 surfactant mixture at an HLB of 11, using water as the solvent and canola oil as the lipid phase. Ternary diagrams were constructed and at concentrations where the ternary mixture formed liquid crystals, beta-carotene was included as a carrier molecule. The white and biomolecule liquid crystals were analyzed by polarized light microscopy, differential scanning calorimetry, refractive index, particle size and FTIR. Phase diagrams showed that LLCs could be formed with surfactant mixtures ranging from 40 to 63%. W concentration is the most influential variable, it was observed that when W content increases there is an increase in particle size, decrease in IR and increase in apparent viscosity. From the thermal analysis it can be concluded that the formulated LLCs have good thermal stability, since temperatures above 60C are required to cause instability or irreversible changes. The best protection to β -c was achieved when the ratio of O+ β -c:TxSy:W was 36:54:10, and this formulation showed the highest birefringence and the lowest degradation. The formulated lipotropic liquid structures have the ability to retain and protect β -carotene and since the inclusion of this biomolecule was the variable that had the least contribution in modifying the characteristics of LLCs, it can be inferred that they are viable for the incorporation of nutraceuticals and bioactives, which can be used in the development of new foods.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	2
2.1 Cristales líquidos (CL).....	2
2.2 Cristales líquidos liotrópicos (CLL).....	2
2.2.1 Componentes.....	2
2.2.1.1 Surfactantes.....	3
2.2.1.2 β -caroteno.....	3
2.2.2 Composición.....	4
2.2.3 Diagrama ternario.....	4
2.2.4 Fase Lamelar.....	6
2.2.5 Fase hexagonal.....	6
2.2.6 Fase cúbica.....	7
2.3 Técnicas de análisis.....	8
2.3.1 Índice de refracción.....	8
2.3.2 Polarimetría.....	8
2.3.3 Calorimetría.....	9
2.3.4 Reología.....	9
2.4 Usos y aplicaciones.....	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1 Materiales.....	14
6.2 Preparación de la mezcla de surfactantes.....	14
6.3 Elaboración de cristales líquidos liotrópicos.....	14
6.4 Preparación de la fase oleosa.....	14
6.5 Cuantificación de β -caroteno.....	15
6.6 Polarimetría.....	15

6.7 Índice de refracción.....	15
6.8 Tamaño de partícula.....	15
6.9 Espectroscopía FTIR.....	15
6.10 Reología.....	16
6.11 Calorimetría DSC, TGA.....	16
6.12 Almacenamiento.....	16
6.13 Efecto de la temperatura en los CLL.....	17
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
7.1 Diagrama ternario.....	17
7.2 Formulación de CLL con β -c.....	18
7.3 Microscopía de luz polarizada.....	20
7.4 Índice de refracción y Tamaño de partícula.....	23
7.5 Espectroscopía IR por Transformada de Fourier (FTIR).....	25
7.6 Calorimetría.....	26
7.7 Reología.....	30
8. CONCLUSIONES.....	35
9. REFERENCIAS.....	36
10. ANEXOS.....	43
10.1 Productos obtenidos.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Usos y aplicaciones de CLL.....	10
Tabla 2 Formulaciones seleccionadas de CLL cargados con β -c.....	20
Tabla 3 Muestra los índices de refracción para las porciones superiores a la fase del CLL.....	23
Tabla 4 Concentración inicial y final de β -c, durante 5 semanas de almacenamiento a T= 25 y 37 °C, para los cristales líquidos formados a partir de las diferentes mezclas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación esquemática de un barrido de composición en un diagrama ternario.....	5
Figura 2 Estructura de la Fase Cristal Líquido Lamelar (CLL), tomado de Collings y Hird, 1997.....	6
Figura 3 Estructura de la fase hexagonal (a) y hexagonal inversa (b), tomado de Singh, 2002.....	7
Figura 4 Estructura de la fase cristal líquido liotrópico cúbico, tomado de Collings y Hird, 1997.....	7
Figura 5 Diagrama ternario para la mezcla ternaria AC-T0.34S0.66-W.....	18
Figura 6 Diagrama de ternario para la mezcla ternaria O-T0.34S0.66-W.....	19
Figura 7 Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 3:7 de O:T0.34S0.66, obtenidas con luz polarizada a 40X.....	20
Figura 8 Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 4:6 de O:T0.34S0.66, obtenidas con luz polarizada a 40X.....	21
Figura 9 Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 5:5 de O:T0.34S0.66, obtenidas con luz polarizada a 40X.....	21
Figura 10 Porcentaje de CLL obtenido a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T0.34S0.66-W.....	22
Figura 11 Muestra los índices de refracción obtenidos a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T0.34S0.66-W.....	24
Figura 12 Muestra el tamaño de partícula obtenido a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T0.34S0.66-W.....	25
Figura 13 Espectros FTIR para la línea de dilución 4:6 de O:T0.34S0.66 con 10, 20 y 30% de W y adicionadas con β -c.....	25
Figura 14 Termograma DSC de las muestras de CLL elaboradas a partir de las relaciones 3:7, 4:6 y 5:5 de O:T0.34S0.66 con 10% p/p de agua respectivamente.....	27
Figura 15 Termograma TGA en el que se esquematizan la pérdida de peso de las muestras de CLL elaboradas a partir de la relación 3:7 de O:T0.34S0.66 y con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente.....	28

Figura 16 Termograma TGA en el que se esquematiza la pérdida de peso de las muestras de CLL elaboradas a partir de la relación 4:6 de O:T0.34S0.66 y con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente.....	28
Figura 17 Termograma TGA en el que se esquematiza la pérdida de peso de las muestras de CLL elaboradas a partir de la relación 5:5 de O:T0.34S0.66 y con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente.....	29
Figura 18 Termograma DSC de las muestras de CLL elaboradas a partir de las relaciones 3:7 y 4:6 O:T0.34S0.66 con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente, durante rampa de enfriamiento y de calentamiento.....	30
Figura 19 Viscosidad aparente de las líneas de dilución 3:7 y 4:6 con 10 y 30% de W y adicionadas con β -c. A) representa una imagen macroscópica de la muestra de CLL después de ser sometida a la tasa de corte.....	31
Figura 20 Módulos G' y G'' para las líneas de dilución 3:7 y 4:6 con 10 y 30% de W. A y B son las micrografías de luz polarizada 40X obtenidas de la muestra inicial y al término de la prueba de deformación.....	32
Figura 21 Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 4:6 de O:T0.34S0.66, con 10, 20 y 30% de W e incubadas a las diferentes temperaturas (7, 25, 37 y 45°C) obtenidas con luz polarizada a 40X.....	33
Figura 22 Porcentaje de CLL obtenido a partir de las mezclas ternarias O-T0.34S0.66-W 4:6 respecto a las diferentes temperaturas de incubación.....	34
Figura 23 Porcentaje de CLL obtenido a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T0.34S0.66-W para las diferentes temperaturas de incubación.....	34

1. INTRODUCCIÓN

Los cristales líquidos son un estado de la materia que combina el orden y la movilidad a diferentes niveles, es decir, desde el nivel molecular hasta niveles macroscópicos. Esta combinación 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 mínima energía (Li, 2014).

Los cristales líquidos se dividen por su mecanismo de formación en termotrópicos y liotrópicos, estos últimos, corresponden a sistemas dispersos que se forman a partir de mezclas de moléculas anfifílicas (surfactantes como Tween y Span) con disolventes (agua), los cuales, al solvatare forman agregados moleculares con distinta ordenación (Singh, 2000), estos acomodados estructurales dependen de la concentración del surfactante y determina el tipo de fase de cristal líquido liotrópico que se exhibe (Andrienko, 2018).

Este tipo de estructuras han sido ampliamente utilizadas en la industria cosmética y farmacéutica, caracterizándose por ser una opción prometedora en la entrega selectiva y liberación controlada del compuesto activo (Hagage-Dobensky et al., 2017; Li et al., 2019; Chu et al., 2018; Xiazhong et al., 2012). En la naturaleza existe una amplia gama de compuestos lipofílicos importantes por sus propiedades antioxidantes como el β -caroteno, que no pueden ser sintetizados por el ser humano y su vía de adquisición es por medio de los alimentos (Kocher et al., 2014). Sin embargo, presentan una alta labilidad frente a factores ambientales y una baja absorción por sus características químicas inherentes. Los cristales líquidos liotrópicos (CLL) cubren estas deficiencias, principalmente, debido a su alta capacidad de solubilización para moléculas huésped, además, en estudios recientes se ha demostrado la liberación controlada y/o sostenida de moléculas solubilizadas en diferentes matrices cristalinas líquidas liotrópicas (Huang y Gui, 2018; Li et al., 2019) presentándose como una opción prometedora para aplicaciones alimentarias.

A la fecha existen pocos estudios científicos enfocados en la caracterización y estabilidad de cristales líquidos liotrópicos formulados a partir de surfactantes como Tween 40/Span 20, para su uso como matriz de protección y liberación de β -caroteno, razón por la que éste trabajo propone relacionar los parámetros fisicoquímicos, estructurales y de estabilidad en la comprensión de su posible uso.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cristales líquidos (CL)

Los cristales líquidos se pueden clasificar estructuralmente según su posición molecular en: nemáticos, esmécticos y colestéricos. Por otra parte, y según el mecanismo responsable de la transición de fase, se clasifican como liotrópicos, termotrópicos y/o anfotrópicos. Los liotrópicos son aquellos que se forman a partir de la mezcla entre moléculas de carácter anfifílico con disolventes como el agua, a una temperatura y concentración específica. En el caso de los termotrópicos, se obtienen al fundir un sólido cristalino, por lo tanto, la transición de fase se induce por cambios en la temperatura y/o presión (Andrienko, 2018). Finalmente, los materiales anfotrópicos son aquellos capaces de formar mesofases tanto termotrópicas como liotrópicas (Singh, 2000).

2.2. Cristales líquidos liotrópicos (CLL)

Los cristales líquidos liotrópicos corresponden a la combinación entre una o más moléculas anfifílicas como los surfactantes, con un disolvente. Tienen la capacidad de formar estructuras ordenadas tanto en disolventes polares como no polares, y cuando esta clase de compuestos se solvatan en un disolvente polar como el agua, las colas hidrófobas y la cabeza hidrófila se unen y orientan, formando agregados moleculares llamados micelas o vesículas para el caso de los surfactantes provenientes de fosfolípidos (Wang et al., 2018).

Existen varios tipos de estructuras de cristal líquido liotrópico y se dividen en 3 grandes grupos: lamelares, hexagonales y cúbicas. Cada uno de estos diferentes tipos tiene un grado diferente de ordenación molecular dentro de la matriz del disolvente, y es la concentración del surfactante y del disolvente quien determina el tipo 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 (Li et al., 2016).

2.2.1. Componentes

De manera genérica y al igual que en los sistemas dispersos, uno de los factores que determina las características fisicoquímicas de los CLL son las variables de formulación y composición. Las variables de formulación tienen que ver específicamente con las características inherentes de los constituyentes (surfactante-agua-aceite) como lo es su estructura molecular, actividad superficial, polaridad etc., que son susceptibles a influir sobre el sistema final (Salager et al., 2015).

2.2.1.1. Surfactantes

Los surfactantes son un grupo de compuestos anfífilicos que muestran una doble preferencia desde el punto de vista electrostático. 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 para formar agregados en disolución acuosa y medios apolares (Lindman et al., 2016). Según el tipo de disociación del grupo hidrofílico en fase acuosa, se denominan surfactantes aniónicos = éstersulfato, sulfonato, carboxilato; catiónicos = amonio cuaternario; no iónico = polímero de óxido de etileno y anfotéricos (Mukherjee et al., 2011).

Los surfactantes no-iónicos representan una importante clase de compuestos capaces de formar una amplia variedad de mesofases en sistemas binarios, ternarios y cuaternarios (Selivanova et al., 2021); poseen grupos como los etoxilatos, que muestran gran afinidad por las moléculas de agua, debido a las interacciones dipolo-dipolo en los puentes de hidrógeno (Mulet et al., 2013). Estos surfactantes no producen iones en solución acuosa y son compatibles con otros tipos de surfactantes, por lo que pueden ser integrados en formulaciones complejas (Suna y Misra, 2018). En los tensoactivos no iónicos, la solubilidad acuosa depende estructuralmente de la longitud de la cadena alquílica y de las unidades de óxido de etileno, y es precisamente la cadena del alquilo quien aporta la parte lipofílica, por lo que, tensoactivos con una cadena de alquilo de 12 átomos de carbono y con más de 5 unidades de óxido de etileno suelen ser solubles en agua a temperatura ambiente (Lindman et al., 2016). El comportamiento de fase de esta familia de surfactantes se influye directamente por la concentración y temperatura, ya que, estos parámetros tienen la capacidad de modificar la solubilidad y las propiedades interfaciales (Lima et al., 2019). Los Tweens y Spans son surfactantes de este tipo, que por su bajo peso molecular han sido utilizados de manera pura y sus mezclas en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Azum et al., 2017; van der Asdonk et al., 2017).

2.2.1.2. β -caroteno

Los carotenoides son compuestos bioactivos de gran interés para la industria alimentaria, sin embargo, solo algunos tienen potencial a nivel industrial. Los carotenoides que tienen al menos un grupo de β -ionona son precursores de vitamina A, y dado que el β -caroteno contiene dos anillos, puede ser buena fuente de esta vitamina no sintetizable por los seres humanos (Park y Choi, 2022). El β -caroteno ha sido de gran interés para la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética por su alta bioactividad como precursor de retinoides (Bogacz-Radomska y Harasim, 2018). También, es un potente

antioxidante para la prevención de cánceres, enfermedades coronarias, degeneración macular relacionada con la edad, etc. (Fernández-García, 2012), además, ayuda a controlar los defectos en la visión, mejora la salud ocular (Harvey y Ben-Amotz, 2020) y ayuda a mantener una piel y apariencia saludable, protegiéndola de lesiones provocadas por especies reactivas y radiación UV (Singh y Sambyalb, 2022). Antes de ser absorbidos estos compuestos, deben extraerse de su ambiente nativo en los tejidos vegetales y disolverse en los lípidos de la dieta, por lo que no son absorbidos activamente por el intestino, si no que sufren un proceso de absorción pasiva, limitando la bioaccesibilidad entre un 4-17% de la cantidad que se ingiere (Pokorny et al., 2001). Por dicha razón, se han diseñado una amplia gama de sistemas dispersos, que por sus características, permiten la incorporación de compuestos lipofílicos dentro de la fase oleosa, incrementando su bioaccesibilidad y la posibilidad de que el compuesto bioactivo llegue en cantidades suficientes (Pascual-Pineda et al., 2015), para causar un efecto en la salud de sus consumidores. Uno de los éxitos al formular dichos sistemas, está en la elección del aceite acarreador (Qian et al., 2012). Existen diversos estudios en los que se ha comprobado que la eficiencia en la formación de micelas es mayor cuando la fase oleosa es un triglicérido de cadena larga (Yi et al., 2014).

2.2.2 Composición

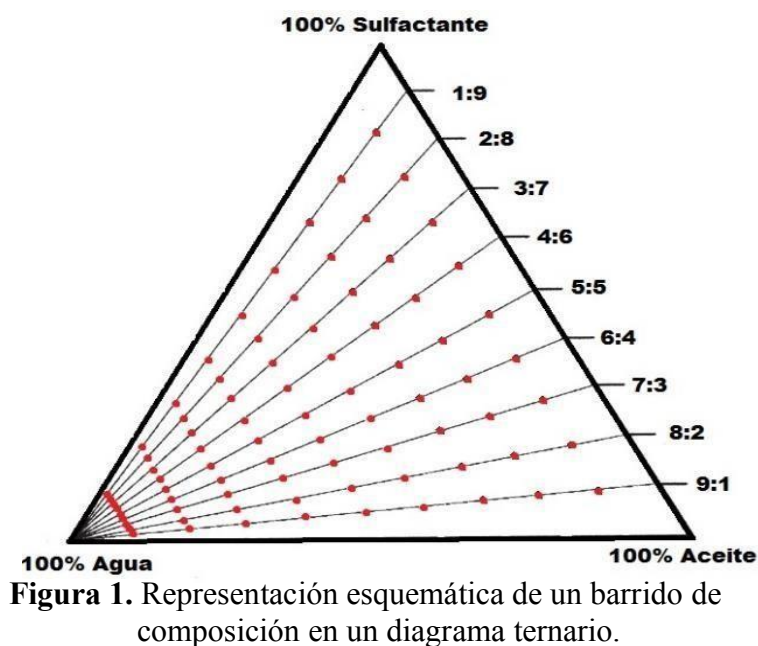
La composición se refiere a las proporciones relativas que se añaden de cada componente (Lin et al., 2014), y para los cristales líquidos liotrópicos es uno de los parámetros controlables más importantes (Andrienko, 2018). Por lo que una manera de representar el comportamiento de fase en función de la composición del sistema, es sobre un diagrama ternario o cuaternario para esquematizar y conocer así el comportamiento e influencia que ejercen sobre el sistema a formar el disolvente, la molécula anfifílica y la sustancia lipídica (Fonseca-Santos et al., 2017).

2.2.3. Diagrama ternario

Es imposible preparar sistemáticamente todas las formulaciones posibles para mezclas de dos o mas componentes; por tanto, es primordial realizar pruebas con base en la información fisicoquímica de los constituyentes (Salager et al., 1999), con la finalidad de optimizar el tiempo y las variables a considerar en la elucidación de las fases a formar en un sistema ternario determinado. Existen diversos tipos de representación del comportamiento de fase y resultan de gran utilidad para tratar las propiedades de mezclas ternarias (Costa, 1983).

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 a partir fracciones molares o los porcentajes en peso para representar las diferentes concentraciones (Salager y Antón, 1991).

Para la determinación de los comportamientos físicos, 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 1 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. Finalmente, se observan en un microscopio óptico con y sin luz polarizada para identificar las diferentes fases para su posterior localización en el diagrama de fases (Fernández, 2006).

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 diversas

técnicas como polarimetría y difracción de rayos-X (Wang et al., 2018). 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).

2.2.4 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) y consiste en una disposición en capas de moléculas anfifílicas. Por lo general, las fases de cristal líquido liotrópico laminar existen hasta alcanzar un 50% de tensioactivo, y por debajo de ésta concentración ocurren fases líquidas liotrópicas hexagonales o a una solución micelar isotrópica (Collings y Hird, 1997).

La naturaleza anfifílica de las moléculas induce que el autoensamblaje sea en bicapa (Figura 2). 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.

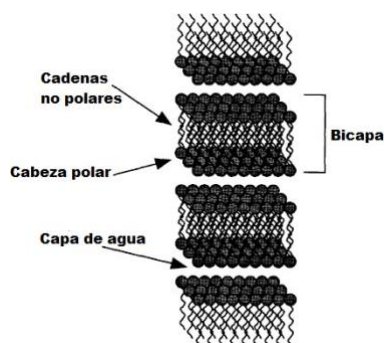


Figura 2. Estructura de la Fase Cristal Líquido Lamelar (CLL), tomado de Collings y Hird, 1997.

2.2.5 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 (Figura 3). Por consiguiente, estas fases proporcionan texturas birrefringentes cuando se examinan mediante microscopía de luz polarizada. 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 orientadas hacia fuera de los cilindros y es mucho más rara que la fase hexagonal (Singh, 2002).

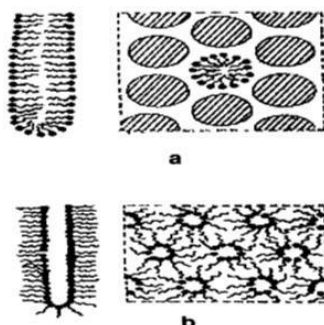


Figura 3. Estructura de la fase hexagonal (a) y hexagonal inversa (b), tomado de Singh, 2002.

2.2.6 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 4 y la segunda es la fase llamada bicontinua (Garti et al., 2012).

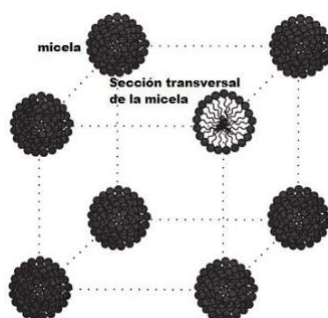


Figura 4. Estructura de la fase cristal líquido liotrópico cúbico, tomado de Collings y Hird, 1997.

2.3. Técnicas de análisis

Hasta la fecha, se han utilizado varios instrumentos para detectar las diferentes fases y sus transiciones, ya que, cada técnica proporciona información única. Estas técnicas se pueden dividir en dos categorías: técnicas directas e indirectas. Las primeras, proporcionan medidas que permiten la identificación de fases (simetría de fase), como la dispersión de rayos X de ángulo pequeño, microscopía de luz polarizada y el microscopio electrónico. Las técnicas indirectas permiten la caracterización de las fases por su comportamiento frente a ciertos estímulos como resonancia magnética nuclear, calorimetría y reología (Amar-Yuli et al., 2009).

2.3.1. Índice de refracción

El estudio de las propiedades físico-químicas de las mezclas líquidas binarias y ternarias, en un amplio rango de composición y temperatura, es una fuente importante de información para establecer la relación entre la estructura interna de los sistemas y sus propiedades físicas (Lisa et al., 2015). Las propiedades ópticas proporcionan información necesaria para realizar investigaciones de procesos de transporte en mezclas líquidas, soluciones de polímeros y dispersiones coloidales (Secheyh et al., 2011). Los CLL son anisotrópicos a consecuencia de su carácter dual como sólidos cristalinos, esta propiedad, puede estudiarse mediante técnicas como: birrefringencia, módulos sónicos, dicroísmo de índices de refracción (IR), difracción de rayos X y espectroscopía Raman. La más fácil, rápida y que requiere menor cantidad de muestra es la medida de los IR, el índice de refracción de los componentes puros y sus mezclas es una propiedad óptica de la materia, que permite controlar procesos en industrias químicas, petroquímicas y farmacéuticas de gran importancia (Secheyh et al., 2011).

2.3.2. Polarimetría

Los cuerpos anisotrópicos tales como las fases de cristal líquido, presentan un fenómeno llamado birrefringencia, que es el fenómeno responsable de que presenten una imagen al microscopio de luz polarizada, 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). En primera instancia, la estructura y coloración de las imágenes dependen del grosor de la muestra, y una vez que se elimina esta variación tendrá una dependencia directa con la diferencia de orientación provocada por el director (Andrienko et al., 2018). Esta técnica permite la identificación del tipo de cristal líquido y otras mesofases como consecuencia de la textura óptica que se genera, también permite evaluar las

propiedades físicas de los cristales líquidos en rangos de temperatura particulares, ya que, la textura que se revela dependerá de cómo se alinea la muestra. La estructura de fase de la muestra descrita se define por dos formas básicas de alineación en compuestos cristalinos líquidos, homeotrópicos y homogéneos (Collings y Hird, 1997).

2.3.3. Calorimetría

La calorimetría es una técnica experimental dinámica que permite cuantificar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante durante un tiempo determinado, o cuando es sometida a ciclos de enfriamiento y calentamiento a velocidad constante. Esta técnica es importante para conocer la estabilidad térmica de un material, así como la completa caracterización de sus fases (Mislan et al., 2019). No se puede obtener la identidad precisa de la fase, pero el nivel de cambio de entalpía involucrado en la transición de fase de manera comparativa sí proporciona alguna indicación de los tipos de fases involucradas. En consecuencia, se usa junto con microscopía de luz polarizada para determinar el tipo de mesofase específica que exhibe un material (Collings y Hird, 1997). La mayoría de las transiciones de cristal líquido otro tipo de estructura de cristal líquido son de primer orden, pero algunas son de segundo orden. Dichas transiciones de fase de segundo orden se revelan mediante una ligera inflexión en la línea de base en el calorímetro en lugar de un pico verdadero como el que se observa para una transición de fase de primer orden. Si una transición entre mesofases ha sido omitida por microscopía óptica, entonces DSC podría revelar la presencia de una transición a una temperatura particular o viceversa, es por eso que las fases de cristal líquido se identifican fácilmente mediante el uso sinérgico de microscopía de polarización óptica y calorimetría diferencial de barrido (Collings y Hird, 1997).

2.3.4. Reología

La reología de cizallamiento está posicionada como una técnica importante para la determinación de los aspectos estructurales y dinámicos de las mesofases cristalinas líquidas. La investigación del régimen viscoelástico-lineal en función de la temperatura y la composición han demostrado ser una herramienta eficaz en la determinación de las transiciones estructurales entre las fases cristalinas líquidas (Gosenca et al., 2013; Carrillo-Navas et al. 2013; Fonseca-Santos et al., 2017; Mislan et al., 2019). Para los cristales líquidos liotrópicos, es necesario además, el análisis parámetros específicos, como el Módulo de almacenamiento (G') y Módulo de pérdida (G''), para establecer así el comportamiento reológico e identificar las estructuras de CLL, ya que, al obtener los reogramas de las diferentes fases cristalinas líquidas y compararlos, permiten establecer un posible criterio de

identificación relacionado con las variables de composición (Mezzenga et al., 2005) y a nivel estructural, ya que, también se ha comprobado que un aumento en la viscosidad puede reflejar un crecimiento micelar (Lindman et al., 2016).

2.4. Usos y aplicaciones

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 el suministro. También se ha demostrado que las propiedades de las estructuras de cristal líquido 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 cristal líquido (Li, 2014). Makai et al. (2003), investigaron la estructura y liberación de fármacos incluidos en cristales líquidos lamelares formados a partir de glicerol y concluyeron que el tensoactivo no iónico utilizado, fue adecuado para la formación del CL utilizando agua como disolvente, y que los fármacos incluidos en bajas concentraciones no produjeron cambios estructurales significativos, por lo que son matrices aptas para la incorporación de compuestos insolubles en agua. Chorilli et al. (2011) caracterizaron y evaluaron cristales líquidos lamelares en los que se utilizaron surfactantes no iónicos y concluyeron que el sistema portador puede ser un método prometedor para la administración de retinil palmitato y un vehículo adecuado para aplicaciones farmacéuticas y cosméticas. En la Tabla 1 se muestran algunos de los estudios que han tenido como objetivo la formación de CLL para diferentes biomoléculas y vías de administración.

Tabla 1. Usos y aplicaciones de CLL

Biomolécula	Estructura formada	Vía de administración	Resultados	Referencia
Resveratrol	CLL lamelar	Tópica	Inhibió la inflamación en ratones	Fonseca-Santos et al., 2017
Aceite de árbol de té	CLL lamelar	Bucal	Caries dentales	Wang et al., 2018

Rosuvastatina	CLL hexagonal	Oral	Transtorno de metabolitos lipídicos en sangre	Wang et al., 2018
Tropicamida	CLL cúbica	Ocular	Exámenes oculares	Wang et al., 2018
Curcumina	CLL hexagonal (hexosomas)	Tópica	Reducción de edema	Fonseca-Santos et al., 2016
Retinil palmitato	CLL lamelar	Tópico	Reducción de las arrugas orbiculares	Chorilli et al., 2011
Anfotericina B	CLL cúbico	Oral	Incremento de la bioaccesibilidad	Yang et al., 2012
Vitamina K	CLL hexagonal	Transdermica	Incremento de la liberación transdérmica	Lopes et al., 2007

Por otro lado, 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 en sistemas como: coloidosomas (liposomas, hexosomas y cubosomas), microagregados, microesferas de hidrogel y sistemas híbridos; estos sistemas corresponden a soluciones coloidales en las que se dispersan cristales líquidos lamelares, hexagonales y cúbicos basados en un diseño estructural, en el que sus transformaciones se modulan para actuar en sitios específicos y con liberación de compuestos de manera prolongada. Finalmente, concluyó que es importante conocer los sistemas a nivel estructural y cómo influyen las variables fisicoquímicas, de procesamiento y composición en las estructuras y su funcionalidad.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se han caracterizado y modelado una amplia gama de cristales líquidos, para conocer su comportamiento termodinámico a partir de su estructura. En el caso específico de los cristales líquidos liotrópicos se han investigado algunas formulaciones diseñadas para el transporte de fármacos mediante su aplicación cutánea, dérmica y transdérmica en dichas formulaciones y se ha comprobado su alta efectividad en la solubilización de diversos compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica, así como una liberación prolongada, sin embargo, a la fecha hay poca evidencia de su uso como matrices de transporte y liberación de compuestos como el β -caroteno en sistemas alimenticios.

Por lo anterior, es imperante el diseño y caracterización de mesofases y sus diluciones a partir de surfactantes grado alimenticio que posibiliten una mayor solubilización, protección y entrega de moléculas como el β -caroteno del que se ha comprobado su efecto benéfico sobre la salud de sus consumidores al ingerirse en cantidades suficientes.

Esta investigación tiene como objetivo evaluar la relación aceite-Tween 40/Span 20-solvente, en la estructura, propiedades fisicoquímicas y estabilidad de cristales líquidos como matriz de protección de β -caroteno. Se realizará la caracterización y correlación de las diferentes estructuras, parámetros fisicoquímicos, comportamiento reológico y estabilidad de los cristales líquidos frente a estímulos mecánicos, térmicos y químicos, para realizar inferencias acerca de su posible uso. Esta evaluación nos permitirá a su vez sentar un precedente teórico práctico de cristales líquidos formulados a partir de Tween 40/Span 20 como matriz de protección y vehículo de β -caroteno.

4. HIPÓTESIS

Se pueden diseñar cristales líquidos con propiedades fisicoquímicas que permiten modular la eficiencia de incorporación de componentes bioactivos, estabilidad y capacidad de protección en su uso dentro de sistemas dispersos más complejos, a partir de la modificación de las concentraciones relativas entre surfactante-agua-aceite+ β -caroteno.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la influencia de la relación aceite-Tween 40/Span 20-solvente, en la estructura, propiedades fisicoquímicas y estabilidad de cristales líquidos liotrópicos como matriz para la protección de β -caroteno.

5.2. Objetivos particulares

1. Formular cristales líquidos liotrópicos lamelares, hexagonales y cúbicos a partir de diferentes relaciones aceite-Tween 40/Span 20-agua mediante la técnica de titulación con agua.
2. Caracterizar mediante microscopía, reología, calorimetría y FTIR las diferentes estructuras y sus propiedades.
3. Adicionar β -caroteno a los diferentes cristales líquidos liotrópicos y evaluar la concentración óptima de la molécula, tomando como parámetro, la mayor concentración permisible sin que induzca cambios estructurales.
4. Caracterizar mediante microscopía, reología, calorimetría y FTIR las diferentes estructuras cargadas con la biomolécula.
5. Evaluar el contenido de β -caroteno durante su almacenamiento a diferentes temperaturas como criterio de estabilidad.
6. Formular los CLL a diferentes temperaturas para determinar la influencia de este parámetro en el rendimiento, estructura y retención de β -caroteno.
7. Analizar la relación entre la concentración, estructura y estabilidad frente a estímulos térmicos y mecánicos en los sistemas con β -caroteno.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Materiales*

Agua bidestilada (W), Aceite de canola (AC) comercial Canoil®, β -caroteno $\geq 97\%$ de pureza (β -c), Tween 40 (T), Span 20 (S) y Hexano HPLC $\geq 95\%$ de pureza de Sigma-Aldrich®.

6.2. *Preparación de la mezcla de surfactantes*

La preparación del surfactante a un balance hidrofílico-lipofílico (HLB, por sus siglas en inglés) de 11, se elaboró a partir de la mezcla T/S, por ser el HLB en el que se obtuvieron CLL en estudios previos. Se utilizó la regla de las mezclas de Griffin, la cual consiste en variar las fracciones másicas de dos surfactantes con HLB conocido para obtener el HLB requerido. Para un HLB de 11, las fracciones másicas fueron de 0.34 para T y de 0.66 para S. La mezcla de surfactantes ($T_{0.34}S_{0.66}$) se realizó atemperando los dos surfactantes a 40 °C, posteriormente, se mantuvo la mezcla en agitación en una parrilla de agitación Cole-Parmer modelo StableTemp a 500 rpm durante 10 minutos y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

6.3. *Elaboración de cristales líquidos liotrópicos*

La elaboración de los CLL se realizó por el método de titulación con agua descrito por Chen et al. (2004). Se prepararon mezclas de $AC:T_{0.34}S_{0.66}$ en relaciones de 9:1 hasta 1:9, posteriormente, se adicionó agua por titulación. Después de su preparación, las mezclas se incubaron en una estufa ECOSHEL modelo 9025H durante 10 días en oscuridad y a una temperatura de 37 °C. Las muestras fueron monitoreadas y examinadas mediante inspección visual y microscopía óptica de luz polarizada, para la identificación y caracterización de las fases en el diagrama ternario. Aquellas muestras que presentaron birrefringencia se contemplaron para la sustitución de AC por $AC+\beta$ -c.

6.4. *Preparación de la fase oleosa*

El β -caroteno (β -c) (7 mg) fue adicionado por 1 g de aceite (AC) previamente atemperado a 50°C y se mantuvo en agitación en la parrilla de agitación a 3500 rpm durante 10 minutos, constituyendo esta mezcla la fase oleosa (O), que se utilizó para la preparación de las mezclas de $O:T_{0.34}S_{0.66}$ para su posterior titulación con agua. Se eligió esta concentración por ser en la que se obtuvo una mayor solubilización de β -caroteno en un estudio previo.

6.5. Cuantificación de β -caroteno

Esta cuantificación se realizó mediante la metodología descrita por Henelyta et al. (2008), con algunas modificaciones. La técnica consiste en la separación de la fase de CLL para su posterior homogenización, una vez realizada esta operación se llevó a 40°C durante 5 min. A partir de esta muestra se tomó una alícuota de 25 μ L y se aforó en un matraz de 10 mL con hexano en ausencia de luz. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL y se centrifugó durante 5 min en una microcentrifuga Hermle Spectrafuge™ 7M a 11773 g. Finalmente, se tomaron 200 μ L del sobrenadante para su posterior análisis en un lector de microplaca iMark™ modelo 1681130 a 450 nm.

6.6. Polarimetría

Las texturas birrefringentes de los CLL 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 como lo son los CLL dan una imagen brillante. Los patrones geométricos son característicos de las diferentes fases anisótropas, por lo que permiten identificar y diferenciar las estructuras de cristal líquido.

6.7. Índice de refracción

El índice de refracción de las mezclas iniciales de aceite:surfactante y de los cristales líquidos isotrópicos se midió en un refractómetro digital mod. 9097, ATAGO a una T= 20 °C.

6.8. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula de las diluciones de los CLL se midió en un analizador de tamaño de partícula ZetaSizer nano ZS, Malvern. Para realizar el análisis, se dispersaron los diferentes CLL en agua desionizada en una relación 1:100 y se homogenizaron en un vortex Thermo Scientific LP durante 1 min a 300 rpm.

6.9. Espectroscopía FTIR

La caracterización de los CLL por espectroscopia IR se realizó con un espectrofotómetro FT-IR-ATR Frontier, Perkin Elmer equipado con un módulo externo ATR. Para cada muestra se tomó un barrido a una resolución espectral de 4 cm^{-1} , en un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} con el objetivo de identificar todos los picos característicos. Se utilizó el software Spectrum y SpectraGryph 1.2 para el procesamiento de datos. Los espectros se normalizaron con respecto a la banda más intensa para la comparación cuantitativa de la intensidad de absorbancia de cada banda.

6.10. Reología

Las propiedades reológicas de los CLL se determinaron en un reómetro AR2000 Ex (TA Instruments) utilizando una geometría de cono-plato de 2° y 40 mm de diámetro. Se colocaron aproximadamente 1.2 mL de CLL y se dejaron equilibrar durante 5 minutos antes del análisis para permitir la recuperación estructural. Se determinó el rango viscoelástico lineal (RVL) y los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') mediante barridos de amplitud (0.01 – 1000 % de deformación a 1 Hz) (Amar-Yuli et al., 2008; García-Hernández et al., 2017). Las curvas de flujo de las diferentes formulaciones se obtuvieron variando la velocidad de cizallamiento de 0.001 a 1000 s⁻¹, se midieron el esfuerzo cortante y la viscosidad aparente.

6.11. Calorimetría DSC, TGA

Las pruebas de DSC y TGA se realizaron en un calorímetro Discovery (TA Instruments). Para el análisis por calorimetría diferencial de barrido, se transfirieron 5 mg de las muestras de CLL en charolas de aluminio herméticamente selladas y se utilizó una charola vacía como referencia. Se realizaron dos corridas independientes, en las primeras, los termogramas se registraron durante el calentamiento en un rango de temperatura de 0-200 °C, y con una rampa de 10 °C min⁻¹. Las segundas se realizaron con el objetivo de identificar las afinidades de enlace y los mecanismos subyacentes en las interacciones moleculares del agua, los termogramas se registraron durante dos ciclos, primero, un enfriamiento en un rango de temperatura de 35 a -50 °C y posteriormente un calentamiento de -50 a 150 °C, los dos con una rampa de 5°C min⁻¹. Las pruebas de termogravimetría se realizaron para caracterizar las muestras cuantitativamente, ya que, como se mencionó previamente, una vez que se realiza la mezcla y almacenamiento para la formación de los CLL, es necesario separar las fases e identificar si los componentes se encuentran en las relaciones iniciales de mezcla. Los experimentos se llevaron a cabo en una atmósfera inerte con nitrógeno de ultra alta pureza a una presión de flujo de 30 mL min⁻¹ y utilizando una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹.

6.12. Almacenamiento

Las muestras se almacenaron durante 5 semanas a 25 y 37 °C. Posteriormente se les cuantificó β -c, para identificar los cambios cinéticos mediados por la influencia de la temperatura de almacenamiento.

6.13. Efecto de la temperatura en los CLL

Para determinar la influencia de modificar la temperatura de incubación en la formación y características de los CLL, se probaron 3 temperaturas adicionales de incubación, 7, 25 y 45 °C; únicamente para la línea de dilución 4:6 titulada con 10, 20 y 30% de agua. Se cuantificó la concentración de β -c, el % de fase de CLL y se obtuvieron las micrografías correspondientes por microscopía de luz polarizada.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Diagrama ternario

Como resultados preliminares, se realizó el barrido de composición para $AC:T_{0.34}S_{0.66}$ a lo largo de las líneas de dilución , 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 y 9:1, esta primera etapa experimental permitió identificar la zona en la que se presentan los CLL. La Figura 5, esquematiza el área en la que por medio de microscopía de luz polarizada se identificaron estructuras birrefringentes y patrones geométricos de cruces de malta, estas cruces de malta se producen debido a los defectos presentes en las capas y son considerados dominios confocales (Rapalli et al., 2020). La representación de la zona en la que se formaron CLL en el diagrama ternario, permite identificar que el uso de los componentes elegidos es viable para la formación de estas estructuras en una amplia gama de concentraciones.

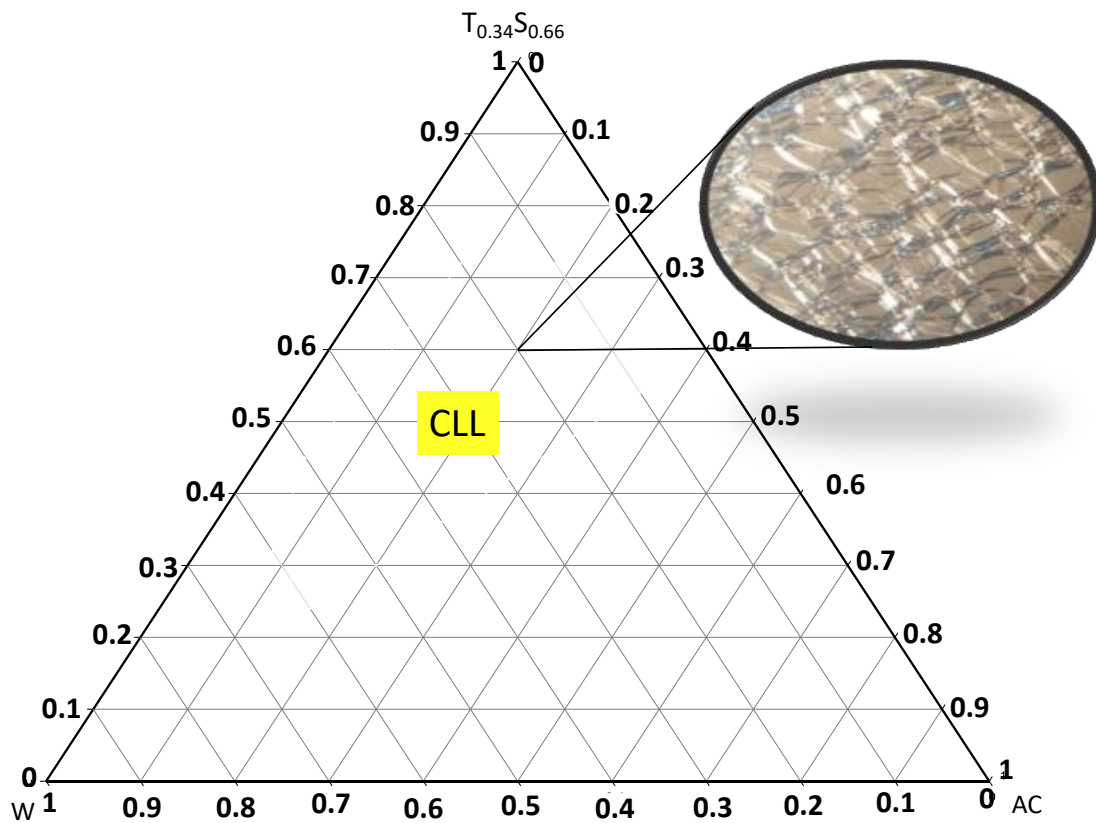


Figura 5. Diagrama ternario para la mezcla ternaria AC-T_{0.34}S_{0.66}-W

7.2 Formulación de CLL con β -c

Posteriormente, al incorporar el β -c en AC, se puede identificar que la zona de predominancia de CLL se modifica (Figura 6). Esta modificación, se puede deber a un cambio en las interacciones de los componentes que alteran el carácter lipofílico del AC, en este segundo diagrama, desplazando la formación de CLL hacia el vértice de la fase oleosa, lo que significa que el aceite tiene una mayor contribución en la formación de los CLL.

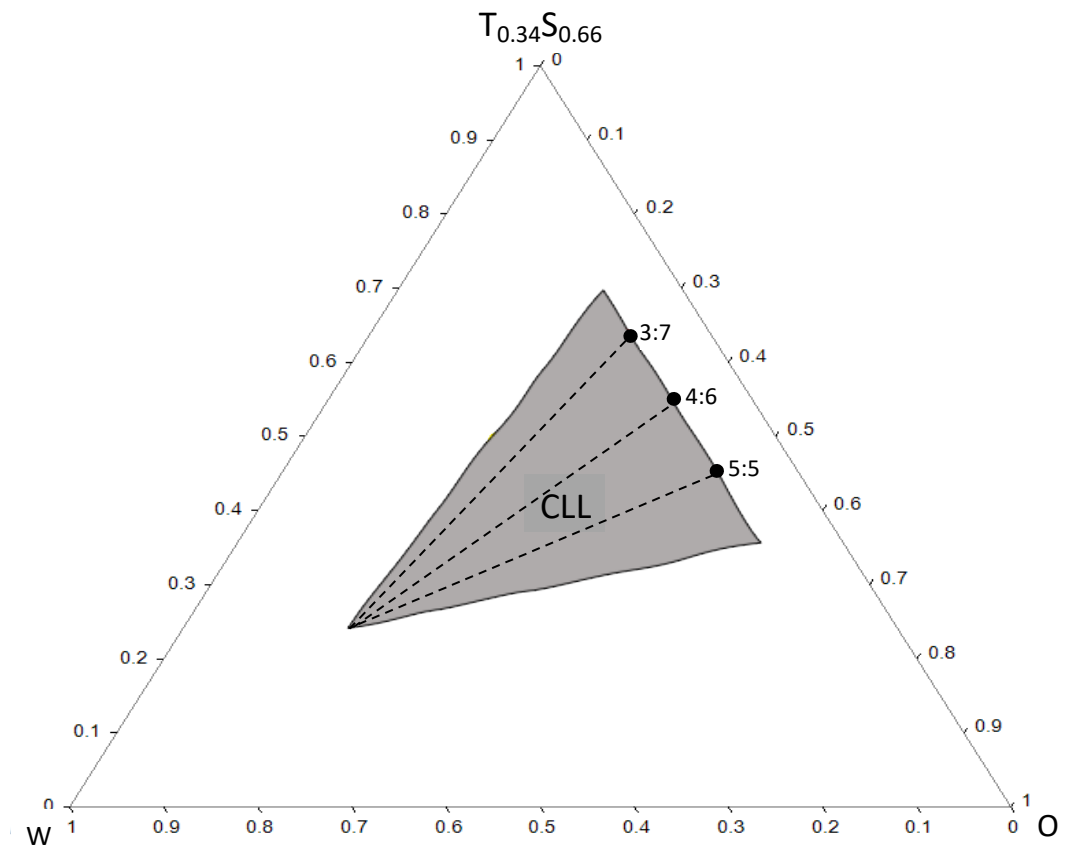


Figura 6. Diagrama de ternario para la mezcla ternaria O-T_{0.34}S_{0.66}-W

En la Tabla 2 se resume la composición de las formulaciones seleccionadas para producir CLL cargados con β -caroteno a las diferentes relaciones de agua/aceite/surfactante, que se corrieron sobre las líneas de dilución 3:7, 4:6, 5:5 que se representan en el diagrama de la Figura 6. Estas muestras fueron las que una vez sometidas a microscopía de luz polarizada revelaron tener patrones geométricos en forma de láminas biaxiales y las cruces de malta que caracterizan a los cristales líquidos (Huang et al., 2018).

Tabla 2. Formulaciones seleccionadas de CLL cargados con β -c.

Muestra (O: T_{0.34}S_{0.66}/O+ T_{0.34}S_{0.66}:W)	Formulación (% p/p)		
	O	T_{0.34}S_{0.66}	W
(3:7/9:1)	27	63	10
(3:7/8:2)	24	56	20
(3:7/7:3)	21	49	30
(4:6/9:1)	36	54	10
(4:6/8:2)	32	48	20
(4:6/7:3)	28	42	30
(5:5/9:1)	45	45	10
(5:5/8:2)	40	40	20
(5:5/7:3)	35	35	30

7.3 Microscopía de luz polarizada

Considerando que la birrefringencia es una propiedad característica de estructuras cristalinas En las Figuras 7, 8 y 9 se muestran las micrografías obtenidas mediante luz polarizada de los CLL con β -c. Estas micrografías permitieron comprobar que al incorporar el β -c en formulaciones previamente caracterizadas con aceite puro, también se obtienen imágenes birrefringentes.

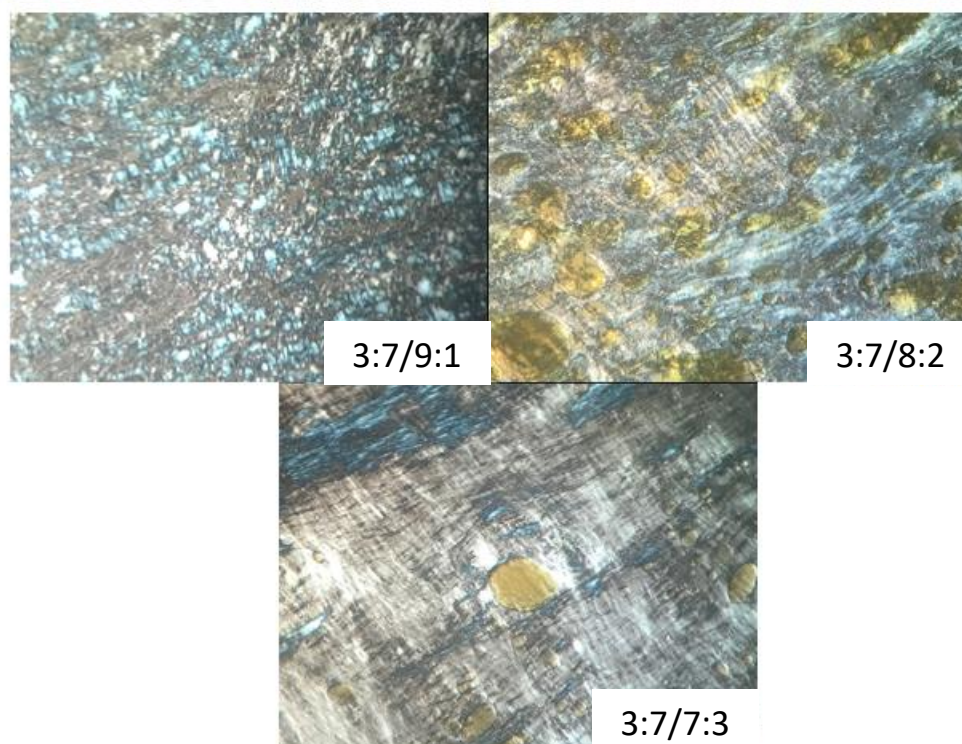


Figura 7. Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 3:7 de O:T_{0.34}S_{0.66}, obtenidas con luz polarizada a 40X.

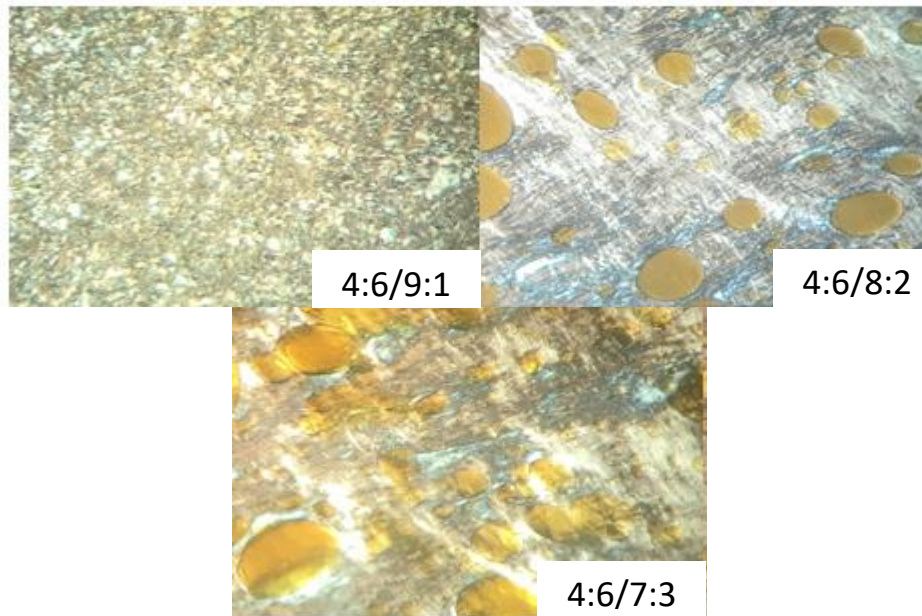


Figura 8. Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 4:6 de O:T_{0.34}S_{0.66}, obtenidas con luz polarizada a 40X.

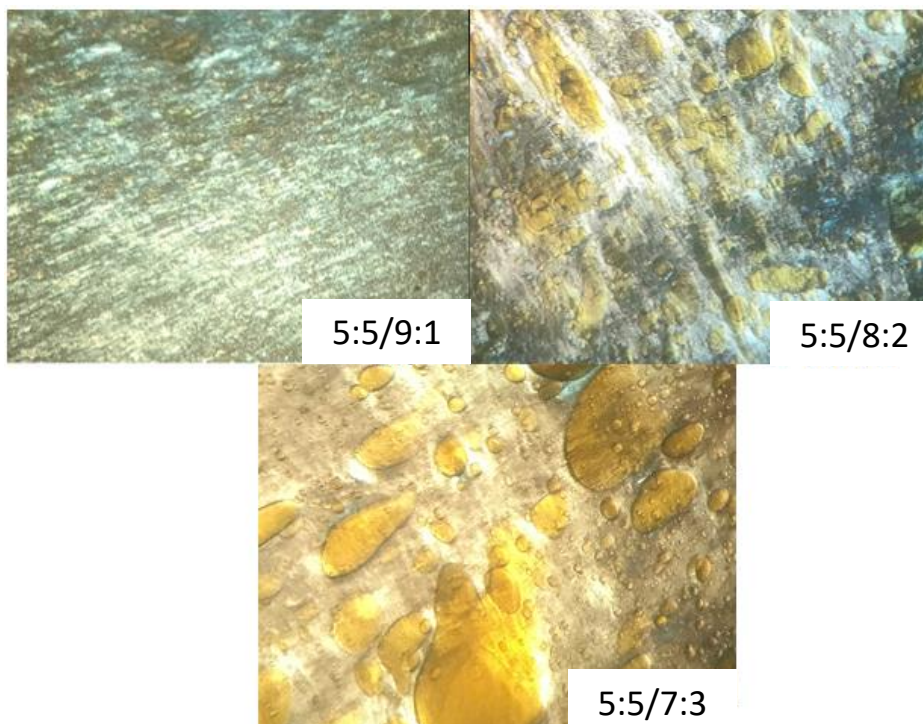


Figura 9. Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 5:5 de O:T_{0.34}S_{0.66}, obtenidas con luz polarizada a 40X.

Al realizar un análisis visual de las micrografías obtenidas, se puede identificar que cuando la muestra tiene un bajo contenido de agua, son más evidentes las cruces de malta, este patrón geométrico es característico de cristales líquidos tanto liotrópicos como termotrópicos (Wang et al., 2018). Para las mezclas en las que se fijó la relación $O:T_{0.34}S_{0.66}$ y se agregó una mayor cantidad de agua se puede identificar una menor área para la zona birrefringente, posiblemente provocado por un aumento en el grosor de la capa de agua (Andrienko, 2018) y se hacen presentes las gotas de aceite con un mayor tamaño; situación que podría indicar que por arriba de estas composiciones es probable la formación de otros sistemas dispersos como emulsiones o soluciones isotrópicas (Zhang et al., 2017).

En la Figura 10 se muestra el porcentaje obtenido de cristal líquido a partir de las diferentes mezclas ternarias $O-T_{0.34}S_{0.66}-W$, estas formulaciones se encuentran dentro de la zona sombreada que se muestra en el diagrama de la Figura 6. Se observa que la cantidad de CLL formado tiene una relación directa con la cantidad de W presente en las tres relaciones $O:T_{0.34}S_{0.66}$ seleccionadas. Por otro lado, si se hace un análisis a partir de las muestras en las que W permanece constante, lo que se hace evidente es que la cantidad de CLL tiene una variación que depende de la relación $O:T_{0.34}S_{0.66}$, ya que, cuando esta se acerca a la unidad es cuando se tiene una mayor formación de CLL.

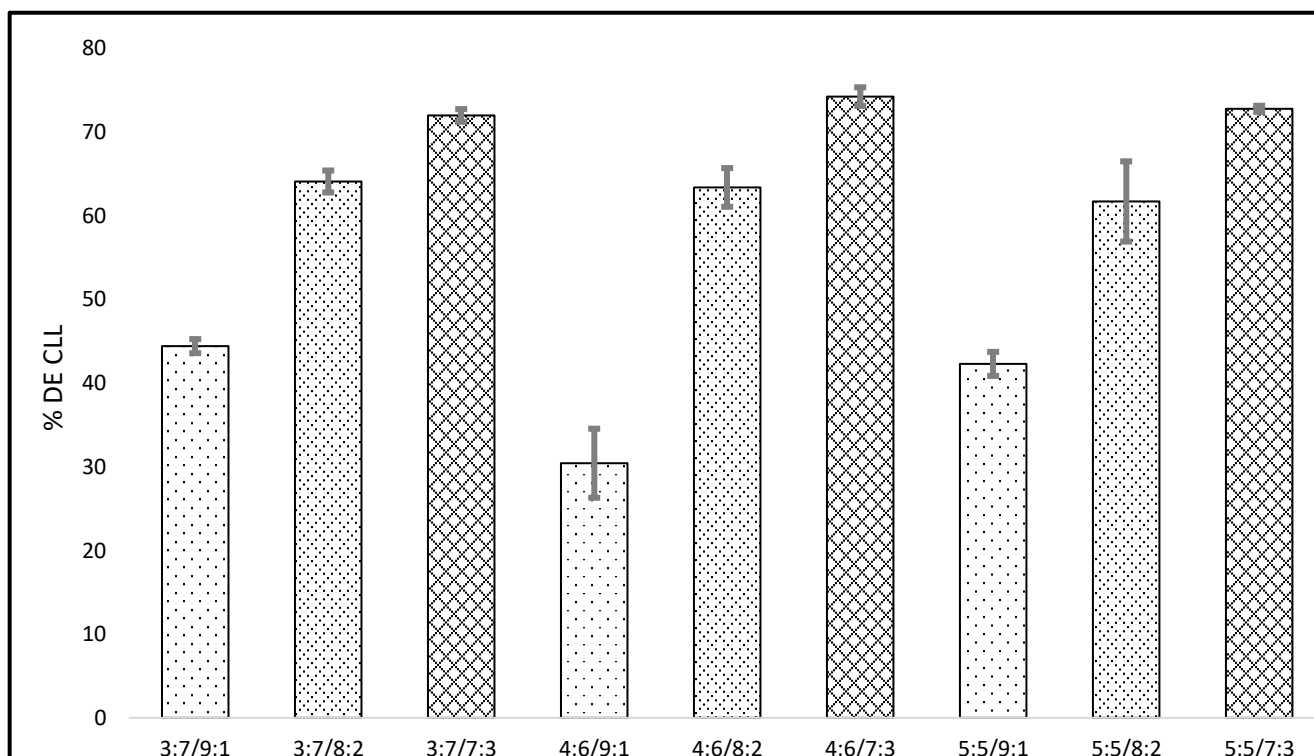


Figura 10. Porcentaje de CLL obtenido a partir de las diferentes mezclas ternarias $O-T_{0.34}S_{0.66}-W$

7.4 Índice de refracción y Tamaño de partícula

A partir los datos obtenidos para el IR mostrados en la Tabla 3, y dado que es una propiedad fisicoquímica que varía en función de la proporción de los componentes en mezclas binarias o ternarias, se determinó que las porciones superiores o remanentes al CLL, corresponden a las mezclas iniciales de O-T_{0.34}S_{0.66}, a partir de esto, podemos inferir que la cantidad de agua que se agrega en la mezcla se encuentra presente en los CLL y es por ello que el volumen obtenido de la fase es determinado por este componente.

Tabla 3. Muestra los índices de refracción para las porciones superiores a la fase del CLL.

Mezcla de O:T _{0.34} S _{0.66}	Índice de refracción
3:7	71±0.2
4:6	71.8±0.001
5:5	72.03±0.058

En el diagrama de la Figura 2, se esquematizan las líneas de dilución base y el área correspondiente para la formación de CLL, esta información junto con los datos del IR para la fase superior, permite sentar un precedente para futuras formulaciones de la influencia que tiene el aumento o disminución de cada componente sobre la estructura de la fase y por consiguiente en su comportamiento. Este índice es ampliamente utilizado en la industria azucarera y en investigaciones relacionadas con variaciones de composición en mezclas, por tener un comportamiento directamente proporcional a la concentración, permite realizar inferencias y predicciones con base en su medición (Yahya y Saghir, 2015). Sin embargo, resulta necesario continuar el análisis mediante las otras técnicas experimentales propuestas en esta investigación, para identificar la relación entre los diferentes parámetros. Por otra parte, es posible identificar que es necesario cerrar el sesgo para afinar con mayor detalle los límites de formación que se bosquejan en los diagramas ternarios para las diferentes estructuras de los CLL a partir de O-T_{0.34}S_{0.66}-W.

En la Figura 11 se representan los índices de refracción para cada uno de los CLL con β -c, pese a que se identificaron los dos IR característicos de los CL, únicamente se graficó el de mayor magnitud, con la finalidad de comparar la influencia de la concentración de cada componente en esta propiedad.

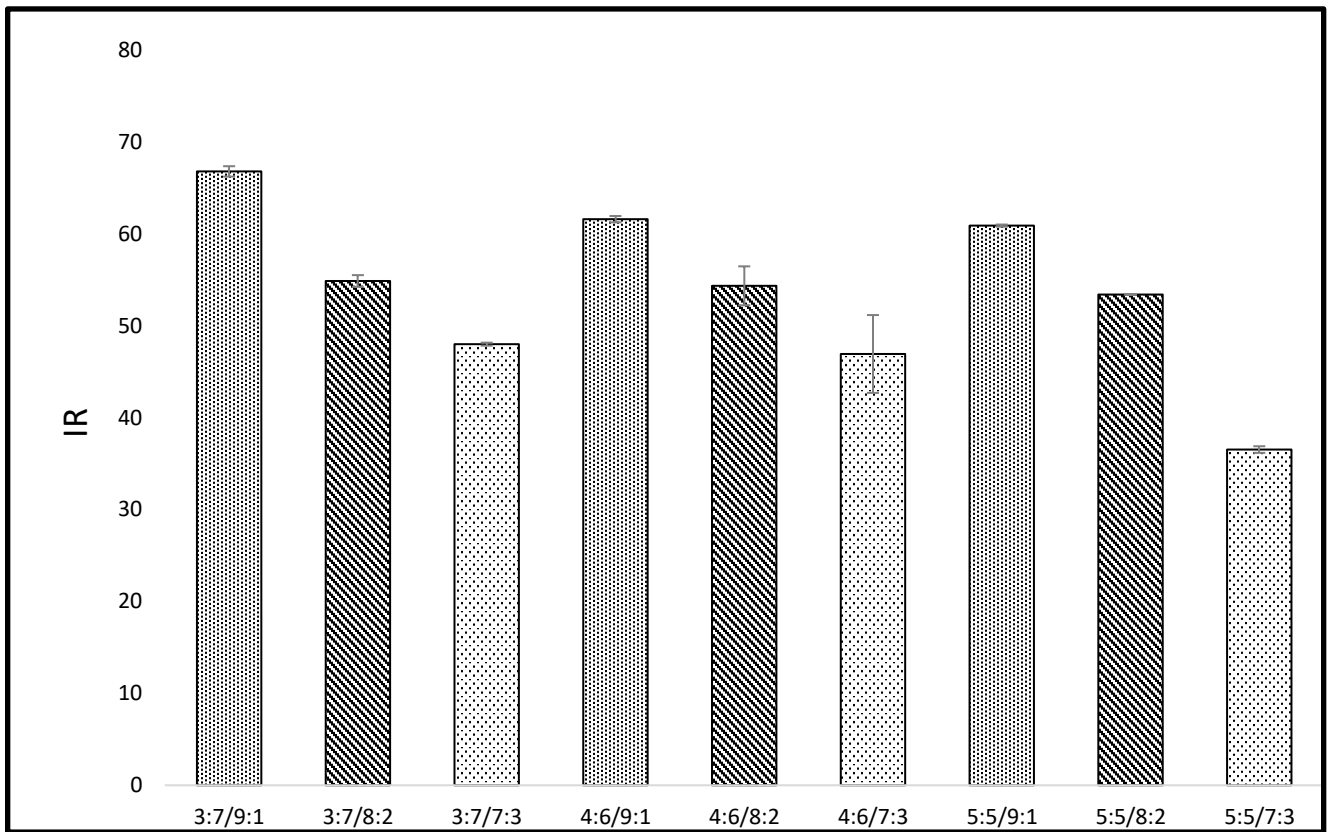


Figura 11. Muestra los índices de refracción obtenidos a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T_{0.34}S_{0.66}-W

Se identificó que el componente que tiene una mayor influencia en la variación y tendencia de esta propiedad es W, ya que, cuando la relación O:T_{0.34}S_{0.66} permanece constante hay menos diferencia para las distintas mezclas. Macroscópicamente se identifica que, las muestras con un mayor contenido de agua poseen una mayor turbidez, lo que se refleja en un menor IR respecto a las de bajo contenido de W, esta disminución del índice de refracción físicamente indica que la luz viaja a una menor velocidad (Cupo et al., 2003), dicho de otra manera, que el medio por el que atraviesa la luz ofrece una mayor resistencia a su paso. Esto se confirma con las mediciones realizadas de tamaño de partícula de las dispersiones de los CLL que se muestran en la Figura 12. Las dispersiones de estas estructuras en medio acuoso, permiten obtener las nanoestructuras constituyentes llamadas liposomas, cubosomas y hexosomas, según sea la estructura de CLL de la que provengan (Karami y Hamidi, 2016). Los resultados de tamaño de partícula junto con la tendencia del IR, explican que las muestras con mayor contenido de agua se tornan más turbias y ejercen una mayor resistencia al paso de la luz porque las partículas constituyentes de la superestructura de los CLL tienen un mayor tamaño.

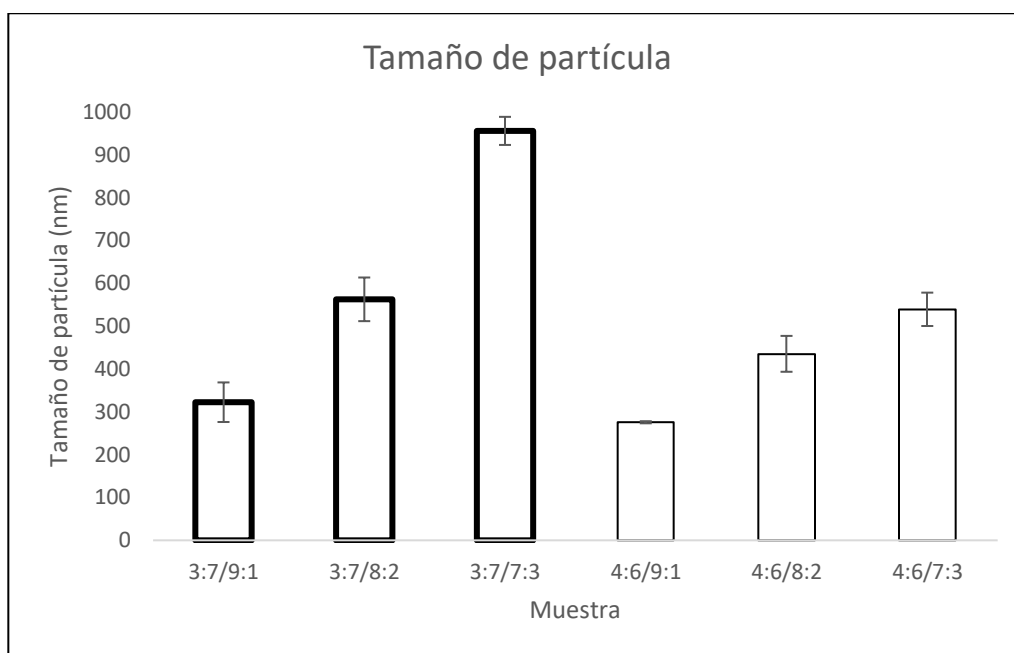


Figura 12. Muestra el tamaño de partícula obtenido a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T_{0.34}S_{0.66}-W

7.5 Espectroscopía IR por Transformada de Fourier (FTIR)

Las diferentes muestras de CLL fueron sometidas a espectroscopía infrarroja con el objetivo de obtener información sobre la naturaleza de las interacciones moleculares. Se obtuvieron los espectros de los CLL sin β -c y de la combinación con β -c y se muestran en la Figura 13.

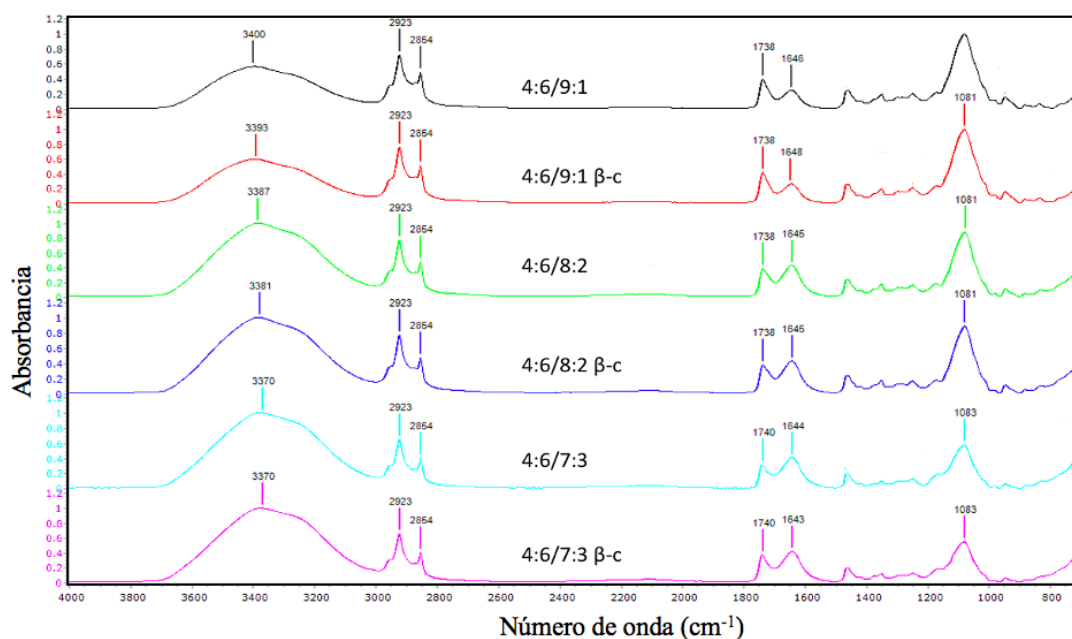


Figura 13. Espectros FTIR para la línea de dilución 4:6 de O:T_{0.34}S_{0.66} con 10, 20 y 30% de W y adicionadas con β -c.

Una de las principales bandas que se observa en todos los espectros es la situada entre 3400-3370 cm^{-1} y corresponde a la contribución de los modos de estiramiento de los grupos OH unidos por enlaces de hidrógeno, intra e intermoleculares y que para estos sistemas ternarios, podría atribuirse a la interacción del agua con las moléculas de surfactante (Selivanova et al., 2021). También, se observan desplazamientos en este número de onda (3400-3370 cm^{-1}) cuando se incrementa la cantidad de W, este cambio de frecuencia, es indicador de un debilitamiento en las interacciones entre las moléculas de W y $\text{T}_{0.34}\text{S}_{0.66}$, lo que nos permite inferir que hay una mayor proporción de agua libre cuando aumenta la cantidad de W. En el caso de las formulaciones adicionadas con β -c, también hubo un desplazamiento (3400-3393 cm^{-1}) menos evidente que para el caso en el que se incrementó la cantidad de agua, pero sí regular y decreciente atribuido a la adición de este componente. Las bandas alrededor de 2923 y 2854 cm^{-1} pueden atribuirse a las vibraciones de estiramiento de C-H simétricas y asimétricas de los grupos alcanos, la banda de 1740 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C=O de los ésteres y ácidos grasos libres, este grupo de bandas son característicos del aceite de canola y permanecieron sin cambios de desplazamiento para las diferentes formulaciones.

7.6 Calorimetría

Pese a que se sabe que la técnica de DCS no permite identificar el tipo de estructura de los CLL, es una técnica que sí proporciona información valiosa sobre las posibles transiciones térmicas de la muestra, como lo es el grado de ordenación molecular. También, permite conocer los rangos de temperatura en que nuestro sistema disperso permanece sin cambios a consecuencia de estímulos térmicos que puedan afectar su estabilidad. La Figura 14, muestra el termograma obtenido para las diferentes relaciones de O: $\text{T}_{0.34}\text{S}_{0.66}$ cuando añadimos 10% p/p de agua.

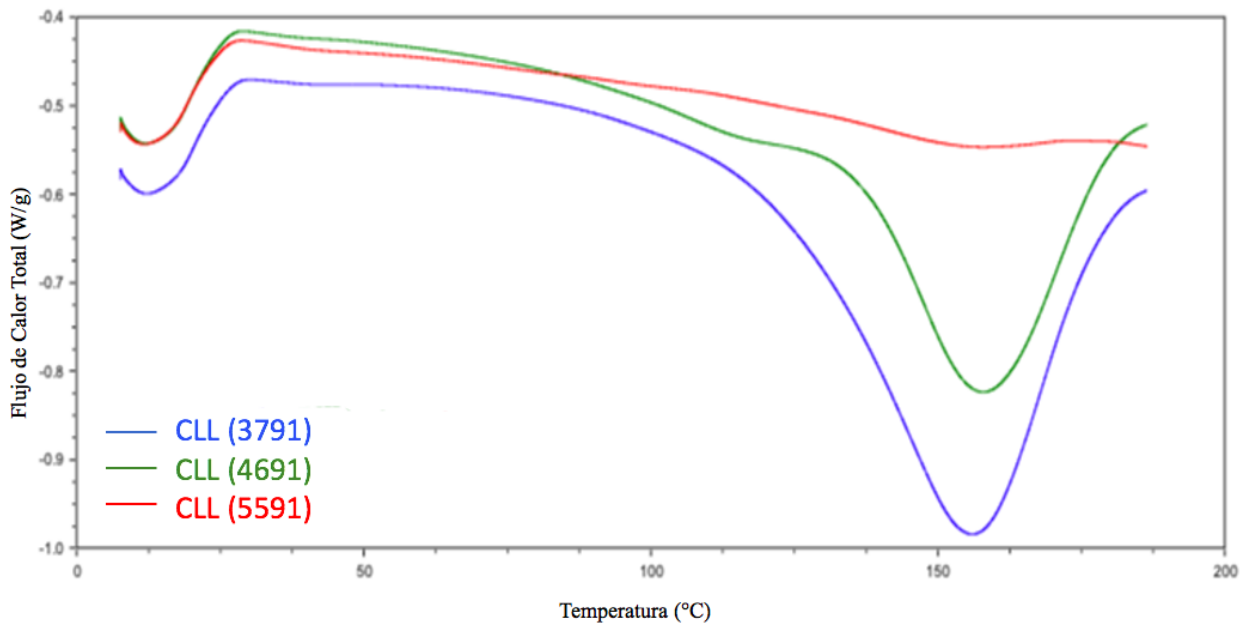


Figura 14. Termograma DSC de las muestras de CLL elaboradas a partir de las relaciones 3:7, 4:6 y 5:5 de O:T_{0.34}S_{0.66} con 10% p/p de agua respectivamente.

Como se muestra, en temperaturas por debajo de los 100 °C no ocurren cambios que puedan afectar la estabilidad de los CLL, sin embargo, al cotejar con las pruebas realizadas por TGA, se puede afinar el rango de estabilidad en términos de pérdida de W (uno de los componentes primordiales), y se acorta por debajo de 50 °C. Este rango de temperatura, es considerado como favorable para sistemas alimentarios en los que regularmente se utilizan temperaturas de almacenamiento inferiores a 50 °C. Por otra parte, en la primer etapa del calentamiento (20-25 °C), se puede identificar un incremento en el flujo de calor para las 3 muestras, este tipo de transición no ha sido reportada ni estudiada como una transición característica de CLL, sin embargo, y dado que es tanto evidente como regular su espectro para las diferentes muestras, se realizaron nuevas corridas térmicas, pero ahora durante ciclos de enfriamiento y calentamiento para verificar la regularidad de su aparición, estos termogramas se muestran y discuten más adelante. A temperaturas por arriba de 100 °C, se identifican transiciones de tipo endotérmico, que muy probablemente están relacionadas con una transición de fase. Al realizar análisis DSC de los componentes elementales, se identificó que esta señal se atribuye al surfactante, en cuanto al tipo de transición y dado que es de baja energía es probable que tenga que ver con una elongación de la cadena hidrocarbonada característica de los surfactantes no iónicos cuando se les induce un cambio de temperatura (Lima et al., 2019; Huang y Gui, 2018). También, se identificó que esta señal es de mayor magnitud cuando la mezcla total tiene un mayor contenido de surfactante, sin embargo, también podría atribuirse a que existe un mayor acoplamiento de los componentes, manifestándose en una inhibición de la señal en ese rango de temperatura.

Posteriormente, para identificar cuantitativamente % de W presente en los CLL, se realizaron pruebas termogravimétricas (Figuras 15, 16 y 17). Al someter las diferentes muestras a este análisis, se identificó que, la pérdida de peso porcentual inicial (por debajo de 100 °C) para los CLL y respecto a las 3 mezclas iniciales de O:T_{0.34}S_{0.66} (3:7, 4:6 y 5:5), no corresponde directamente con la cantidad de W agregada, pero sí de manera proporcional. Esto, probablemente se deba a que una parte del agua que se agrega por titulación queda atrapada en la fase superior, que corresponde a la mezcla de O:T_{0.34}S_{0.66} para cada formulación.

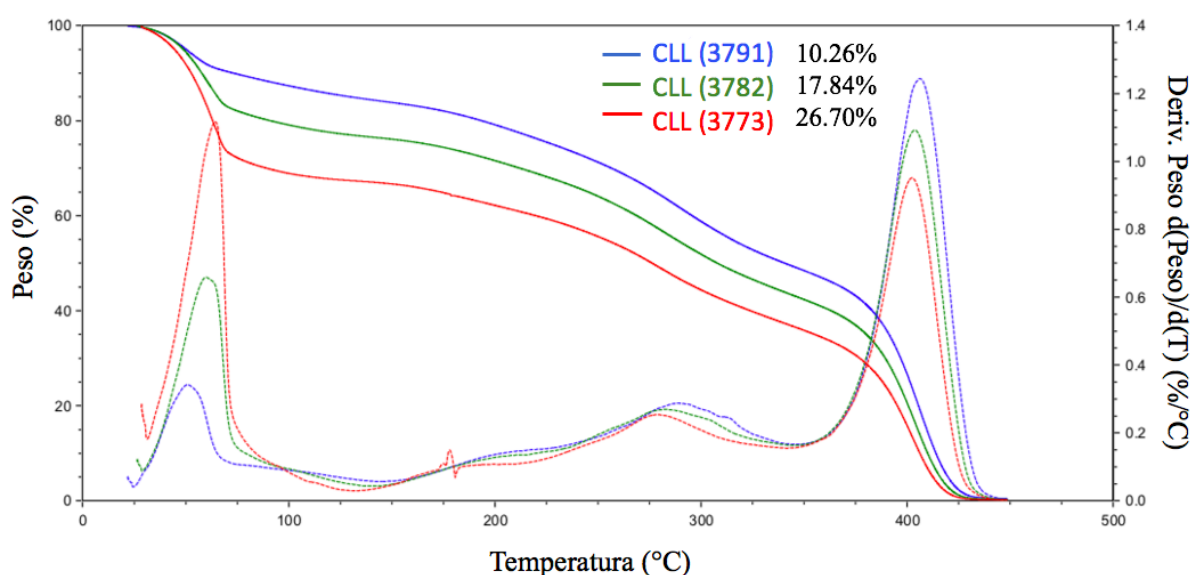


Figura 15. Termograma TGA en el que se esquematizan la pérdida de peso de las muestras de CLL elaboradas a partir de la relación 3:7 de O:T_{0.34}S_{0.66} y con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente.

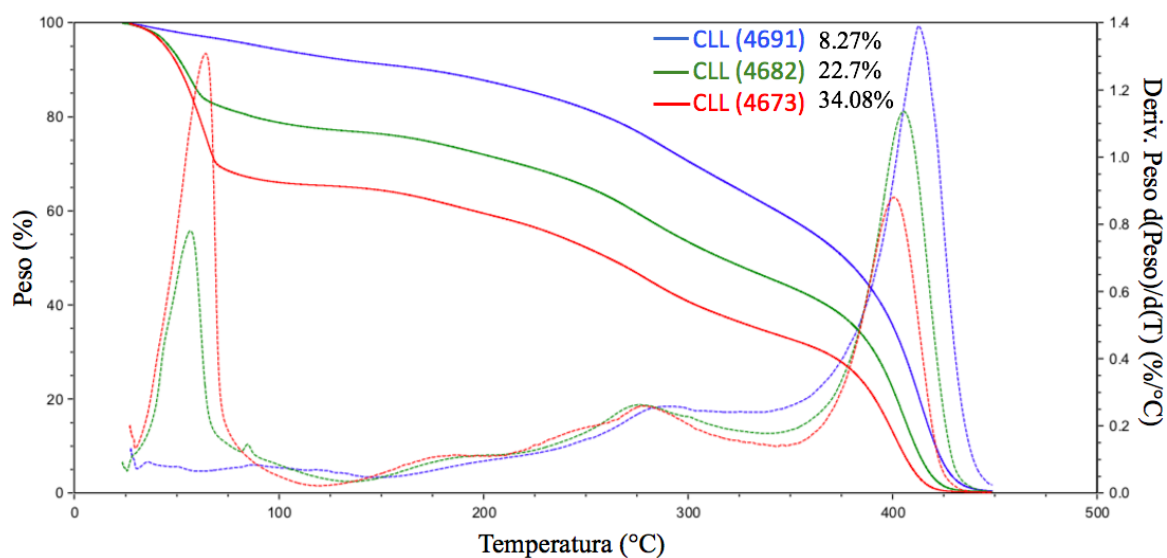


Figura 16. Termograma TGA en el que se esquematiza la pérdida de peso de las muestras de CLL elaboradas a partir de la relación 4:6 de O:T_{0.34}S_{0.66} y con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente.

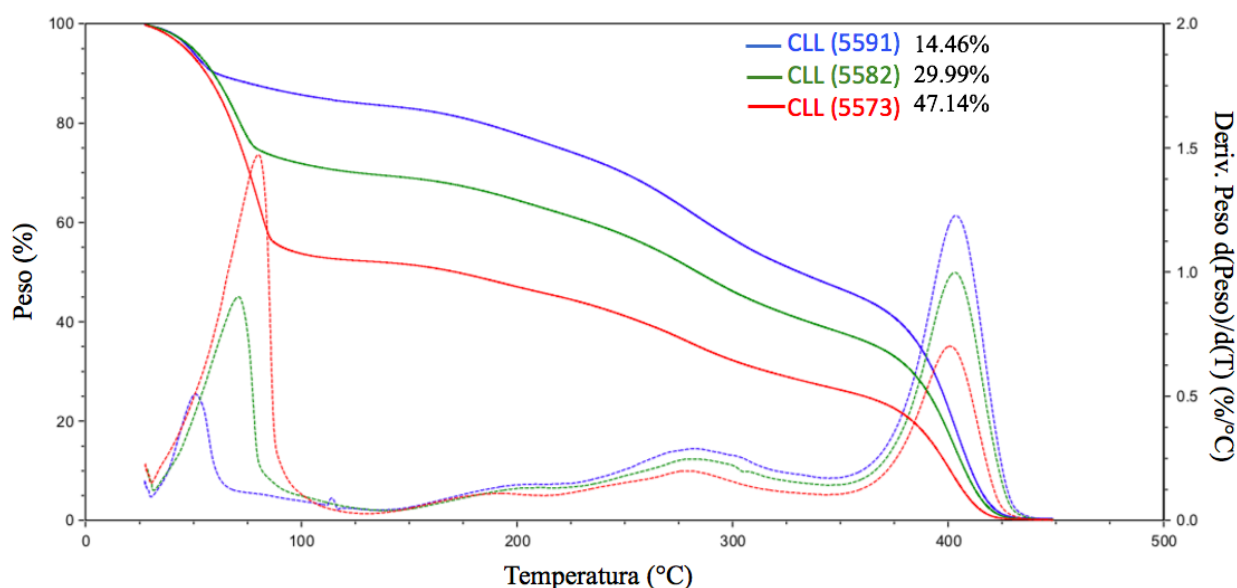


Figura 17. Termograma TGA en el que se esquematiza la pérdida de peso de las muestras de CLL elaboradas a partir de la relación 5:5 de O:T_{0.34}S_{0.66} y con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente.

Como se mencionó anteriormente DSC es una técnica que permite evidenciar el estado del agua en la muestra y evaluar así la intensidad de interacción entre las moléculas del surfactante y el agua (Wang et al., 2018). El termograma que se muestra en la Figura 18 permite identificar primeramente que, para las mezclas adicionadas con 10% W no se registró ninguna transición que pudiera ser atribuida a este componente en el rango de temperatura al que fueron sometidas las muestras; esto puede deberse a que en bajas concentraciones, las moléculas de agua que interactúan con las cabezas polares de la mezcla de tensoactivos están unidas tan fuertemente que no permiten que el agua forme enlaces de hidrógeno con sus moléculas vecinas y entonces se convierte en agua no congelable. Por otra parte, y para los casos en que la concentración de agua es mayor se identifican picos que se pueden relacionar con la congelación y cristalización de agua, en estas formulaciones es probable que el agua se posicione en la región interlaminar, permitiendo mantener el grado de libertad necesario para formar enlaces de hidrógeno y manifestarse como agua congelable (Gonseca et al., 2013; Bonacucina et al., 2012; Kodama et al., 2001). Por lo tanto, estas mismas interacciones explican los desplazamientos que presentan los picos de cristalización del agua, ya que, los tensoactivos tienen que estar sobresaturados de agua antes de que se pueda observar un pico de congelación de agua libre.

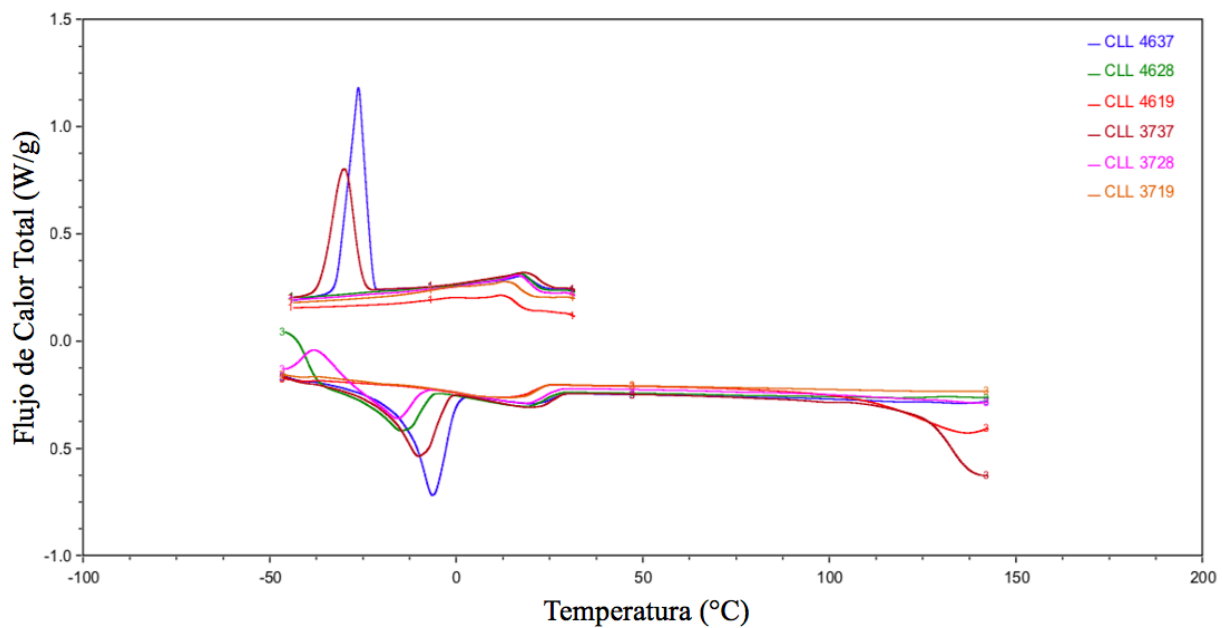


Figura 18. Termograma DSC de las muestras de CLL elaboradas a partir de las relaciones 3:7 y 4:6 O:T_{0.34}S_{0.66} con 10, 20 y 30% p/p de agua respectivamente, durante rampa de enfriamiento y de calentamiento.

7.7 Reología

Se evaluaron las propiedades reológicas de las diferentes formulaciones con el objetivo de identificar como se modifica el comportamiento de flujo en función del cambio de composición y la adición de β -c. Los resultados previos de tamaño de partícula y las micrografías de luz polarizada, revelan diferencias significativas mediadas por los cambios de composición en los CLL. En general, la cantidad de W tuvo mayor influencia que la relación O:T_{0.34}S_{0.66} y que la adición de β -c. En la Figura 19 se muestran los cambios de viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento para los diferentes CLL con β -c y sin β -c, y se puede identificar nuevamente que la cantidad de W tiene una relación directa con esta propiedad, al igual que con el tamaño de partícula.

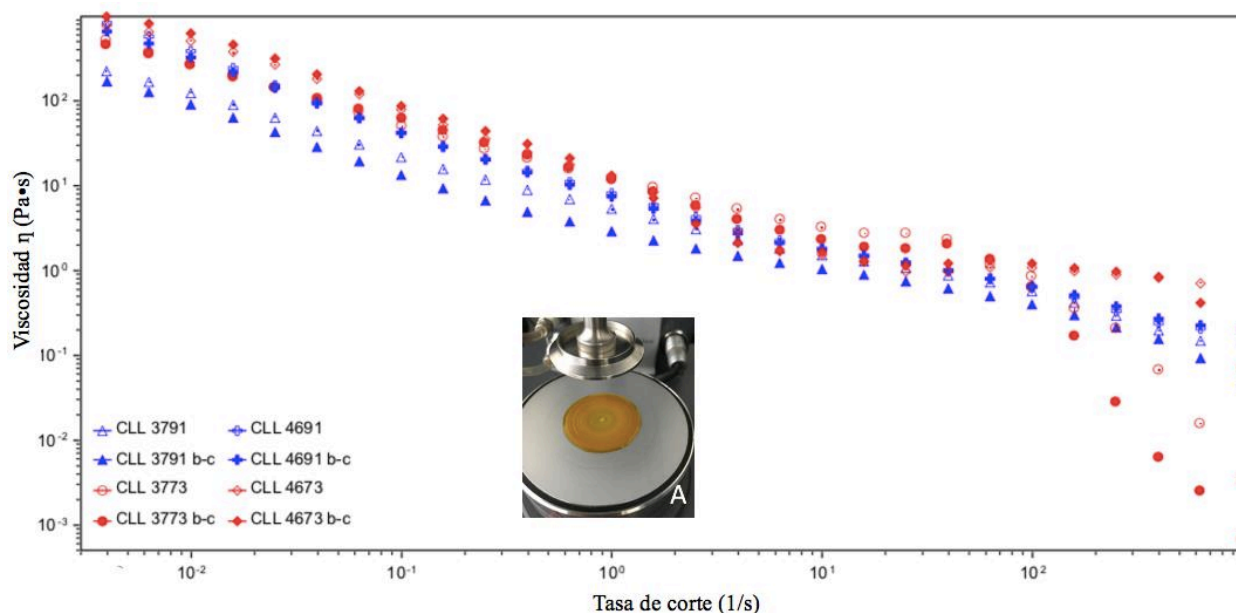


Figura 19. Viscosidad aparente de las líneas de dilución 3:7 y 4:6 con 10 y 30% de W y adicionadas con β -c. A) representa una imagen macroscópica de la muestra de CLL después de ser sometida a la tasa de corte.

En general los CLL presentaron un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento como resultado de la deformación aplicada, esta disminución puede ser debida al ordenamiento de las bicapas en dirección al flujo (Imagen A en el recuadro), lo que se refleja en una disminución de la viscosidad aparente (Carrillo-Navas et al., 2013). Por otra parte, las muestras preparadas a partir de la línea de dilución 4:6 (mayor relación O:T_{0.34}S_{0.66}) tuvieron una mayor resistencia al flujo y por lo tanto, valores de viscosidad aparente más elevados. Son estas formulaciones las que tienen una mayor proporción de moléculas de tensoactivo por cantidad de O y tienen una estructura más compacta. Por otra parte y con el objetivo de investigar las propiedades viscoelásticas de los CLL, se obtuvieron los módulos elástico (G') y viscoso (G'') mediante barridos de amplitud (%). Estos barridos permiten identificar la región viscoelástica lineal (RVL), para los dos módulos. RVL se extendió hasta aproximadamente hasta un 5% de deformación y el punto de flujo no presenta cambios significativos como consecuencia del cambio de concentración. En todas las formulaciones $G' > G''$ por lo que los CLL presentan comportamiento de materiales viscoelásticos sólidos. En el caso de la magnitud de los módulos en RVL se modificó para las diferentes formulaciones. En el caso de la relación 3:7 de O:T_{0.34}S_{0.66} cuando se incrementa el contenido de W los módulos aumentan en orden de magnitud por lo que podemos inferir que el aumento de W promueve la rigidización de la estructura global de los CLL (Marlow et al., 2018). En el caso de los CLL con una relación 4:6 de O:T_{0.34}S_{0.66} el incremento de agua provoca el efecto contrario. Las micrografías A y B de la Figura 20, muestran una vista microscópica de la modificación estructural del CLL al ser sometido a la prueba de deformación, y se confirma que al

superar el punto de cedencia, la muestra se encuentra estructuralmente modificada de su estado inicial.

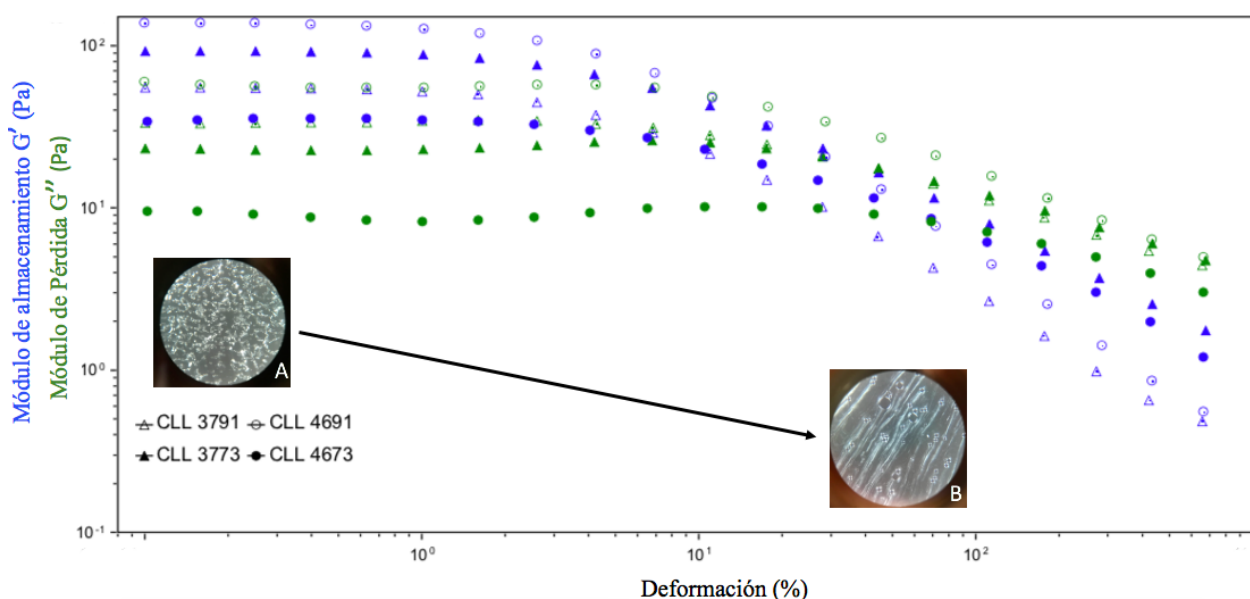


Figura 20. Módulos G' y G'' para las líneas de dilución 3:7 y 4:6 con 10 y 30% de W. A y B son las micrografías de luz polarizada 40X obtenidas de la muestra inicial y al término de la prueba de deformación.

La Tabla 4, muestra la concentración inicial y final de β -c en cada formulación durante su almacenamiento a $T=25$ y 37 °C, en esta nueva corrida de almacenamiento se pretendía obtener resultados que permitieran caracterizar el mecanismo de degradación y/o protección de la biomolécula.

Para cada muestra, las cinéticas de degradación se intentaron ajustar a orden 0, 1 ó 2. Por medio de

Muestra	C_0 [$\mu\text{g/mL}$]	C_f 25 °C [$\mu\text{g/mL}$]	C_f 37 °C [$\mu\text{g/mL}$]
(3:7/9:1)	1565.08 \pm 85.47	378.27 \pm 0.81	109.51 \pm 15.37
(3:7/8:2)	1988.77 \pm 70.82	506.47 \pm 1.62	161.00 \pm 4.68
(3:7/7:3)	1197.56 \pm 35.41	472.28 \pm 4.09	104.29 \pm 10.41
(4:6/9:1)	1237.85 \pm 86.6	1024.18 \pm 2.27	141.19 \pm 12.92
(4:6/8:2)	1086.45 \pm 32.97	515.02 \pm 9.0	224.35 \pm 19.45
(4:6/7:3)	1114.53 \pm 48.84	749.45 \pm 1.39	74.27 \pm 14.03
(5:5/9:1)	1331.87 \pm 29.3	390.48 \pm 1.43	132.05 \pm 16.97

Tabla 4. Concentración inicial y final de β -c, durante 5 semanas de almacenamiento a $T= 25$ y 37 °C, para los cristales líquidos formados a partir de las diferentes mezclas.

modelado, se pretendía calcular y comparar el tiempo de vida media para el β -c y las velocidades de degradación, sin embargo, las cinéticas no se ajustaron al mismo orden, por lo que no se pudieron comparar estos parámetros, esto nos permite identificar que los CLL formulados tienen un comportamiento de protección y estabilidad que no es proporcional a través del tiempo. Pese a esto y al comparar los resultados obtenidos en cuanto a la concentraciones iniciales y finales de β -c en los sistemas cristalinos formulados, podemos concluir que tienen concentraciones superiores a las reportadas por otros sistemas dispersos (emulsiones y nanoemulsiones), ya que, las concentraciones de estos sistemas de protección se encuentran en un rango de 2-500 $\mu\text{g/g}$ (Qian et al., 2012a; Sharif et al., 2017; Silva et al., 2011; Tan y Nakajima, 2005; Qian et al., 2012b).

En función de poder identificar la influencia de la temperatura de incubación sobre la formación CLL y su capacidad de retención de β -caroteno se sometieron a 3 diferentes temperaturas de incubación (7, 25 y 45°C) las mezclas de O: $T_{0.34}S_{0.66}/O+ T_{0.34}S_{0.66}:W$ para la línea de dilución 4:6 con 10, 20 y 30% W. En la Figura 21 se muestran las micrografías obtenidas para las muestras incubadas en las 4 diferentes temperaturas.

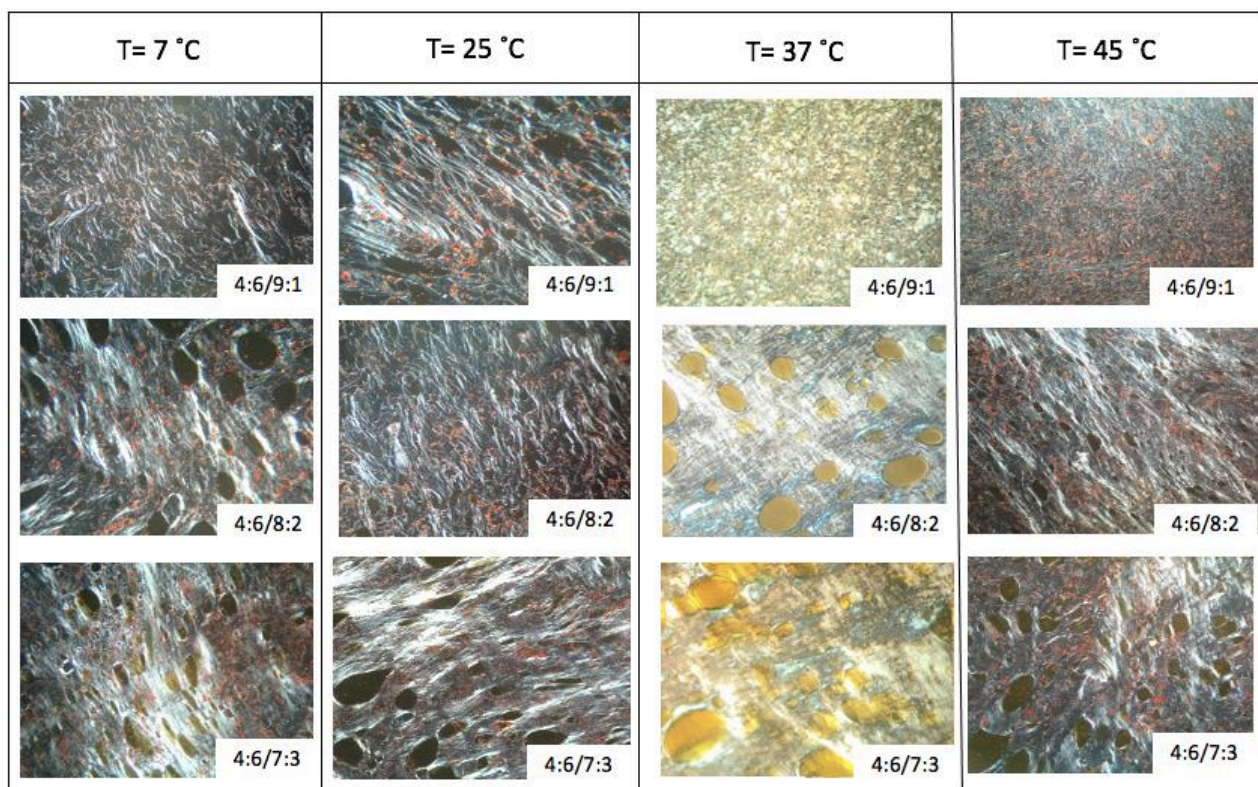


Figura 21. Micrografías de las estructuras de CLL para la relación 4:6 de O: $T_{0.34}S_{0.66}$, con 10, 20 y 30% de W e incubadas a las diferentes temperaturas (7, 25, 37 y 45°C) obtenidas con luz polarizada a 40X.

Al realizar la inspección de las muestras mediante luz polarizada se identificó que, para todas las temperaturas de incubación fue posible formar estructuras birrefringentes de CLL y con diferencias

mínimas de textura para la misma cantidad de W. En cuanto a la influencia de la temperatura sobre el % de fase de CLL, en la Figura 22 se muestra que tuvo poco efecto sobre este parámetro para la misma formulación.

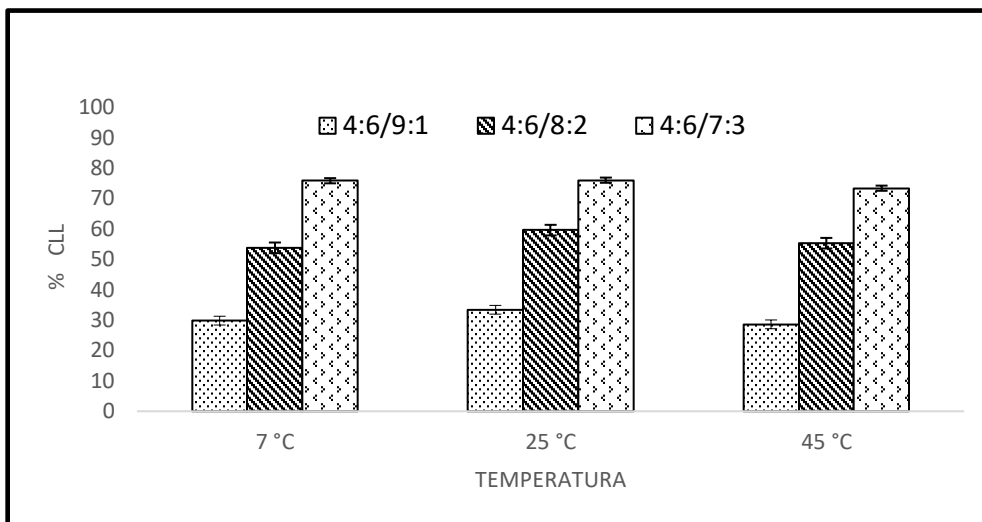


Figura 22. Porcentaje de CLL obtenido a partir de las mezclas ternarias O-T_{0.34}S_{0.66}-W 4:6 respecto a las diferentes temperaturas de incubación.

Por otra parte y de igual manera que cuando se utilizó 37°C como temperatura de incubación, los CLL conservaron la misma dependencia directa entre la cantidad de W y el % de fase de CLL que se forma. La Figura 23 muestra la concentración normalizada de β-c en los CLL como criterio para evaluar la influencia de la temperatura de incubación sobre la capacidad de carga.

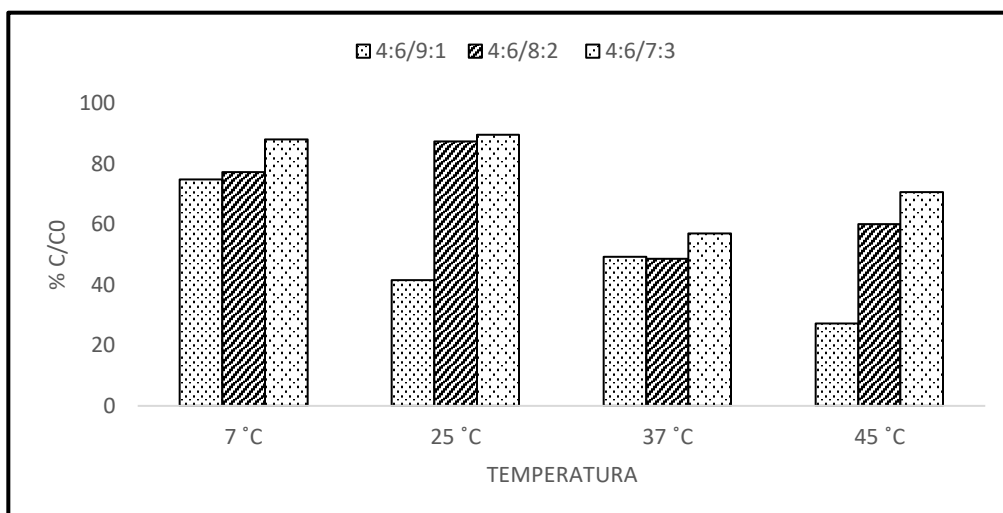


Figura 23. Porcentaje de CLL obtenido a partir de las diferentes mezclas ternarias O-T_{0.34}S_{0.66}-W para las diferentes temperaturas de incubación.

Con respecto a este parámetro, podemos concluir que a bajas temperaturas se tiene un mayor contenido de β -c en los CLL, esto es probablemente atribuido a que el β -c presenta una importante sensibilidad cuando se somete a altas temperaturas, y aun cuando la elección de las temperaturas de incubación fue inferior a la que se sabe que promueve la degradación de este compuesto (63 °C) (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2001), es importante contemplar el efecto sinérgico entre la temperatura y el tiempo de permanencia, es probable que esto provocara la disminución del contenido de β -c para las muestras que se incubaron a mayor temperatura.

8. CONCLUSIONES

La construcción de los diagramas ternarios mostró que se podían formar CLL con mezclas de tensoactivos que oscilaban entre el 40 y el 63%. Las técnicas de microscopía de luz polarizada e índice de refracción confirmaron la presencia y diferenciación de estructuras de CLL.

Las pruebas de FTIR, reología y calorimetría proporcionan evidencia de que la variación de la relación en peso de cada componente tiene influencia en las características y funcionalidad de los CLL. En este sentido, se puede concluir que, la cantidad de W es la variable que tiene mayor influencia. Para el caso de tamaño de partícula e índice de refracción (IR), se observó que cuando se incrementa el contenido de W hay una disminución del tamaño de partícula y un aumento en el IR.

El incremento de W también tiene la capacidad de modificar las interacciones inter e intramoleculares y se demuestra por los desplazamientos de bandas en FTIR. En cuanto a las propiedades de flujo de estos sistemas dispersos, reafirmaron que, al modular el tamaño de partícula y las interacciones inducidas por cambios de composición, se pueden diseñar sistemas para un fin específico en términos de adhesión y coeficiente de difusión, ya que, estas propiedades se encuentran directamente relacionadas con la viscosidad aparente y las propiedades viscoelásticas.

Del análisis térmico se puede concluir los CLL formulados tienen buena estabilidad térmica, dado que se requieren altas temperaturas (> 60 °C) para causar inestabilidad o cambios irreversibles.

Las estructuras líquidas lipotrópicas formuladas tienen la capacidad para retener y proteger el β -caroteno y dado que la inclusión de esta biomolécula fue la variable que tuvo menos aporte en la modificación de las características de los CLL, se puede inferir que son viables para la incorporación nutracéuticos y bioactivos, de otro tipo que pueden ser utilizados en el desarrollo de nuevos alimentos.

9. REFERENCIAS

- Amar-Yuli, I., Libster, D., Aserin, A., & Garti, N., 2009**, Solubilization of food bioactives within lyotropic liquid crystalline mesophases. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1), 21–32.
- Amar-Yuli, I., Wachtel, E., Shalev, D. E., Aserin, A., & Garti, N., 2008**, Low Viscosity Reversed Hexagonal Mesophases Induced by Hydrophilic Additives, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(13), 3971–3982.
- Andrienko, D., 2018**, Introduction to liquid crystals. *Journal of Molecular Liquids*, 267, 520–541.
- Azum, N., Rub, M. A., Asiri, A. M., & Bawazeer, W. A., 2017**, Micellar and interfacial properties of amphiphilic drug–non-ionic surfactants mixed systems: Surface tension, fluorescence and UV–vis studies, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 522(522), 183–192.
- Bergenstahl, B., 2008**, Physicochemical aspects of an emulsifier functionality. *Food Emulsifiers and Their Applications* (edited by G.L. Hasenhuettl & R.W. Hartel). pp. 173–194.
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J., 2018**, β -Carotene—properties and production methods, *Food Quality and Safety*, 2(2), 69–74.
- Bonacucina, G., Cespi, M., Mencarelli, G., Casettari, L., & Palmieri, G. F., 2013**, The use of acoustic spectroscopy in the characterisation of ternary phase diagrams, *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1–2), 603–610.
- Boyd, B. J., Whittaker, D. V., Khoo, S. M., & Davey, G., 2006**, Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1–2), 218–226.
- Carrillo-Navas, H., Fouconnier, B., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramírez, J., 2013**, Shear rheology of water/glycerol monostearate crystals in canola oil dispersions interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 215–224.
- Chorilli, M., Prestes, P. S., Rigon, R. B., Leonardi, G. R., Chiavacci, L. A., Sarmiento, V. H. V., Oliveira, A. G., & Scarpa, M. V., 2011**, Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system . In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85, 2, 182–188

- Chu, X., Huang, J., Li, Z., Gui, S., Li, Q., Cao, J., Jiang, J., 2018,** On the structure and transdermal profile of liquid crystals based on phytantriol, *Current drug delivery*, 15, pp.
- Collings, P., Hird, M., 1997,** Introduction to Liquid Crystals Chemistry and Physics, Ed. Taylor and Francis, London: 317 p.
- Costa, E., 1983,** Ingeniería Química, Conceptos generales, primera edición Madrid España
- Cuppo, F. L. S., Gómez, S. L., Figueredo Neto, A. M., 2003,** Behavior of the nonlinear refractive indices and birefringence in the neighborhood of first- and second-order phase transitions in lyotropic liquid crystals, *Physics Review E: Statistical Nonlinear Soft Matter Physics*, 65 (1), pp. 051711.
- Fernández, A. 2006,** Preparación, caracterización y estabilidad de emulsiones y microemulsiones O/W, Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España: 443 p.
- Fernández-García, E. 2012.** Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient. *Food Research International*, 438–450.
- Fonseca-Santos, B., dos Santos, A. M., Rodero, C. F., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M., 2016,** Design, characterization, and biological evaluation of curcumin-loaded surfactant-based systems for topical drug delivery. *International Journal of Nanomedicine, Volume 11*, 4553–4562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108675>
- Fonseca-Santos, B., Satake, C. Y., Calixto, G., Martins dos Santos, A., & Chorilli, M., 2017,** Trans-resveratrol-loaded nonionic lamellar liquid-crystalline systems: structural, rheological, mechanical, textural, and bioadhesive characterization and evaluation of in vivo anti-inflammatory activity *International Journal of Nanomedicine, Volume 12*, 6883–6893.
- Garcia-Hernandez, A., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Sosa-Hernandez, E., & Alvarez-Ramirez, J., 2017,** Effects of clay concentration on the morphology and rheological properties of xanthan gum-based hydrogels reinforced with montmorillonite particles, *Journal of Applied Polymer Science*, 134(8).
- Garti, N., Libster, D., & Aserin, A., 2012,** Lipid polymorphism in lyotropic liquid crystals for triggered release of bioactives, *Food & Function*, 3(7), 700.
- Gosenca, M., Bešter-Rogač, M., & Gašperlin, M., 2013,** Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate, *European*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 50(1), 114–122.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.04.029>

- Hagage-Dobensky, D., Aserin, A., Garti, N., 2017**, Progesterone solubilization within reverse hexagonal mesophase, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 51, pp. 254-261.
- Harvey, P. J., y Ben-Amotz, A., 2020**, Towards a sustainable *Dunaliella salina* microalgal biorefinery for 9-cis β -carotene production. *Algal Research*, 50, 102002.
- Henelyta, R., C. Boon-Seang, I. Sosaku, N. Mitsutoshi, 2008**, Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method, *Food Hydrocolloids*, 22, pp. 12-17.
- Hornero-Méndez, D., y Mínguez-Mosquera, M. I., 2001**, Rapid Spectrophotometric Determination of Red and Yellow Isochromic Carotenoid Fractions in Paprika and Red Pepper Oleoresins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3584–3588.
- Huang, Y., Gui, S., 2018**, Factors Affecting the structure of lyotropic liquid crystals and the correlation between structure and drug diffusion, *RSC Advances*, 8, pp. 6978-6987.
- Karami, Z., & Hamidi, M., 2016**, Cubosomes: remarkable drug delivery potential. *Drug Discovery Today*, 21(5), 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.004>
- Kocher, A., C. Schiborr, D. Weber, T. Grane, J. Frank, 2014**, Bioavailability and antioxidant activity of curcuminoids and carotenoids in humans, *Food Oxidants and Antioxidants*, pp.434-457.
- Kodama, M., Kato, H. & Aoki, H., 2001**, Comparison of Differently Bound Molecules in the Gel and Subgel Phases of a Phospholipid Bilayer System, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 64, 219–230
- Li, H., Dang, L., Yang, S., Li, J., & Wei, H., 2016**, The study of phase behavior and rheological properties of lyotropic liquid crystals in the LAS/AES/H₂O system, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 495, 221–228.
- Li, Y., Angelova, A., Lui, J., Garamus, V., Li, N., Drechsler, M., Gong, Y., Zou, A., 2019**, In situ phase transition of microemulsions for parenteral injection yielding lyotropic liquid crystalline carriers of the antitumor drug bufaloing, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, pp. 217-225.

- Lima, M. T., Spiering, V. J., Kurt-Zerdeli, S. N., Brüggemann, D. C., Gradzielski, M., & Schomäcker, R., 2019**, The hydrophilic-lipophilic balance of carboxylate and carbonate modified nonionic surfactants, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 569, 156–163.
- Lin, C.-C., Lin, H.-Y., Chi, M.-H., Shen, C.-M., Chen, H.-W., Yang, W.-J., & Lee, M.-H., 2014**, Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line, *Food Chemistry*, 154, 282–290.
- Lindman, B., Medronho, B., & Karlström, G., 2016**, Clouding of nonionic surfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 22, 23–29.
- Lisa, C., Ungureanu, M., Cosmațchi, P.C., Bolat, G., 2015**, The density, the refractive index and the adjustment of the excess thermodynamic properties by means of the multiple linear regression method for the ternary system ethylbenzene–octane–propylbenzene, *Thermochimica Acta*, 617, pp. 76-82.
- Lopes, L. B., Speretta, F. F. F., & Bentley, M. V. L. B. , 2007**, Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(3), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.07.006>
- 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.
- Marlow, J. B., Pottage, M. J., McCoy, T. M., De Campo, L., Sokolova, A., Bell, T. D. M., & Tabor, R. F., 2018**, Structural and rheological changes of lamellar liquid crystals as a result of compositional changes and added silica nanoparticles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(24), 16592–16603.
- McClements, D. J., 2012**. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17: pp. 235-245.
- Mislan, A. A., Foong, J. L. N., Saharin, S. M., & Zahid, N. I., 2019**, Rheological behaviour of thermotropic and lyotropic liquid crystalline phases of Guerbet branched chain glycolipids, *Fluid Phase Equilibria*, 502, 112305.
- Mukherjee, P., Padhan, S., K., Dash, S., Patel, S., Mishra, B., K., 2011**, Clouding behavior in surfactant systems, *Advances in Colloid and Interface Science*, 162, pp. 59-79.

- Mulet, X., Boyd, B. J., & Drummond, C. J., 2013**, Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 393, 1–20.
- Pascual-Pineda, L. A., Flores-Andrade, E., Jiménez-Fernández, M., & Beristain, C. I., 2015**, Kinetic and thermodynamic stability of paprika nanoemulsions, *International Journal of Food Science and Technology*, 50(5).
- Pasquali, R. C., Bregni, C., & Serrao, R., 2006**, Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(2), 38–53.
- Park, J., & Choi, S. J., 2022**, Influence of interfacial characteristics and antioxidant polarity on the chemical stability of β -carotene in emulsions prepared using non-ionic surfactant blends, *Food Chemistry*, 369, 130945.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M., 2001**. Antioxidantes de los alimentos. España: ACRIBIA, S.A.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J., 2012a**, Inhibition of β -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants, *Food Chemistry*, 135(3), 1036–1043.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J., 2012b**, Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility, *Food Chemistry*, 135(3), 1440–1447.
- Salager, J., 1999** 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.
- Sechenyh, V. V., Legros, J-C., Shevtsova, V., 2011**, Experimental and predicted refractive index properties in ternary mixtures of associated liquids, *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43, 11, pp. 1700-1707.
- Selivanova, N., Gubaidullin, A., & Galyametdinov, Y., 2021**, Characterization of hexagonal lyotropic liquid crystal microstructure: Effects of vitamin E molecules, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 620, 126570.
- Sharif, H. R., Goff, H. D., Majeed, H., Liu, F., Nsor-Atindana, J., Haider, J., Liang, R., & Zhong, F., 2017**, Physicochemical stability of β -carotene and α -tocopherol enriched

nanoemulsions: Influence of carrier oil, emulsifier and antioxidant, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 529(May), 550–559.

Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., Coimbra, J. S. R., Carneiro-Da-Cunha, M. G., & Vicente, A. A., 2011, Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification- evaporation technique, *Journal of Food Engineering*, 102(2), 130–135.

Singh, R. V., & Sambyal, K., 2022, An overview of β -carotene production: Current status and future prospects. *Food Bioscience*, 47, 101717.

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.

Suna, P., y Misra, P. K., 2018, Effect of ionic and nonionic surfactants on the phase behaviour and physicochemical characteristics of pseudoternary systems involving polyoxyethylene(20)sorbitan monooleate, *Surfaces and Interfaces*, 10, 19–26.

Tan, C. P., & Nakajima, M., 2005, β -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation, *Food Chemistry*, 92(4), 661–671.

Treybal R., 1951, Liquid Extraction, Mc Graw-Hill Book Company, New York: 442 p.

van der Asdonk, P., Collings, P. J., & Kouwer, P. H. J., 2017, Fully Stable and Homogeneous Lyotropic Liquid Crystal Alignment on Anisotropic Surfaces, *Advanced Functional Materials*, 27(28), 1–10.

Wang, X., Zhang, Y., Gui, S., Huang, J., Cao, J., Li, Z., Li, Q., & Chu, X., 2018, Characterization of Lipid-Based Lyotropic Liquid Crystal and Effects of Guest Molecules on Its Microstructure: a Systematic Review, *AAPS PharmSciTech*, 19(5), 2023–2040.

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.

- Yahya, M., Saghir, M., Z., 2015**, Prediction and Experimental measurement of refractive index in ternary hydrocarbon mixtures, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 60 (8) pp. 2329–2342.
- Yang, Z., Tan, Y., Chen, M., Dian, L., Shan, Z., Peng, X., & Wu, C., 2012**, Development of Amphotericin B-Loaded Cubosomes Through the SolEmuls Technology for Enhancing the Oral Bioavailability. *AAPS PharmSciTech*, 13(4), 1483–1491. <https://doi.org/10.1208/s12249-012-9876-2>
- Zhang, L., Li, X., & Wang, Z., 2017**, Construction, in vitro release and rheological behavior of apigenin-encapsulated hexagonal liquid crystal, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 475–481.

10. ANEXOS

Productos obtenidos

Publicación obtenida de la Tesis

Jiménez-Escobar, M. P., Pascual-Pineda, L. A., Vernon-Carter, E. J., & Beristain, C. I. (2021). Enhanced β -carotene encapsulation and protection in self-assembled lyotropic liquid crystal structures. LWT, 135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110056>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00267

Matrícula: 2181800584

Estabilidad y caracterización de cristales líquidos formulados a partir de Tween 40/Span 20 como matriz de protección y entrega de β -caroteno

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 24 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE DE JESUS ALVAREZ RAMIREZ
DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA
DRA. LUZ ALICIA PASCUAL PINEDA
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MONTSERRAT PAULINA JIMENEZ ESCOBAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

2022



MONTSERRAT PAULINA JIMENEZ ESCOBAR
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JOSE DE JESUS ALVAREZ RAMIREZ

VOCAL

DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA

VOCAL

DRA. LUZ ALICIA PASCUAL PINEDA

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO