

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN DEL EXTRACTO DE *Equisetum arvense*  
ENCAPSULADO EN NANOEMULSIONES

**TESIS**

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

PRESENTA  
**MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES**

Director  
DR. E. JAIME VERNON CARTER

FEBRERO DEL 2013

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.

México D.F. a 01 de Febrero del 2013

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

EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN DEL EXTRACTO DE *Equisetum arvense*  
ENCAPSULADO EN NANOEMULSIONES

Que presentó

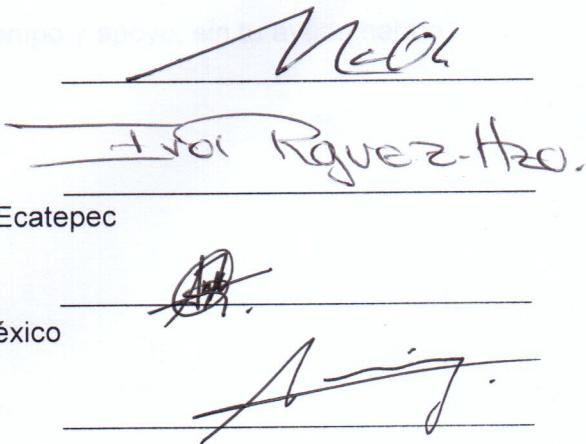
Ma. del Carmen Hernández Jaimes

Comité Tutorial:

- Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Asesor: Dr. César Pérez Alonso  
Universidad Autónoma del Estado de México
- Asesor: Dr. Benoit Fouconnier  
Universidad Veracruzana

Jurado:

- Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Secretario: Dra. Ma. Eva Rodríguez Huevo  
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec
- Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero  
Universidad Autónoma del Estado de México
- Vocal: Dr. Rubén Jiménez Alvarado  
Universidad de la Cañada



The image shows four handwritten signatures, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the President, Secretary, and two vocal members of the jury. The signatures are in black ink and are somewhat stylized.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	8
1. MARCO TEÓRICO	11
1.1 Emulsiones	12
1.1.1 Clasificación de las emulsiones con base a la fase dispersa	12
1.1.2 Aplicaciones de las emulsiones simple y dobles	13
1.1.3 Clasificación de las emulsiones con base al tamaño de gota	13
1.2 Nanoemulsiones	14
1.2.1 Composición relativa de las fases de una nanoemulsion	16
1.2.2 Diagrama de fases Pseudoternario	17
1.2.3 Formación de las nanoemulsiones	19
1.2.4 Métodos de emulsionamiento	19
1.2.5 Estabilidad de las nanoemulsiones	21
1.2.6 Factores de estabilidad de las nanoemulsiones	23
1.2.7 Fenómeno de maduración de Ostwald	24
1.3 Agentes tensoactivos	25
1.3.1 Tipos de tensoactivos	26
1.3.2 Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)	28
1.3.3 Concentración micelar crítica (CMC)	31
1.3.4 Efecto de los cotensoactivos en la formación de las nanoemulsiones	32
1.4 Compuestos activos contenidos en la fase oleosa de las nanoemulsiones o/w	33
1.5 Flavonoides: Definición y propiedades	34
1.5.1 Antioxidantes presentes en <i>Equisetum arvense</i>	35
1.5.2 Características de los antioxidantes	35
1.5.3 Actividad antioxidante	35
1.5.4 Mecanismo de acción de los antioxidantes	36
1.6 Extracción con fluido supercrítico	37
1.6.1 Principales ventajas de la técnica de EFS	38
1.6.2 Fluidos y modificadores	40
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo general	43
2.2 Objetivos particulares	43
3. HIPÓTESIS	44

4. JUSTIFICACIÓN	46
5. MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1 Estrategia experimental	49
5.2 Materiales	50
5.3 Material vegetal	50
5.4 Métodos	50
5.4.1 Extracción de los flavonoides presentes en Equisetum arvense por el método de extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico (ECO <sub>2</sub> SC)	50
5.4.2 Caracterización de EEA por HPLC	51
5.4.3 Determinación del contenido de fenoles totales	51
5.4.4 Determinación del contenido flavonoides totales	51
5.4.5 Actividad antioxidante del EEA	52
5.4.6 Preparación de las nanoemulsiones conteniendo EEA	52
5.4.7 Tamaño de las gotas de las nanoemulsiones	53
5.4.8 Diagramas de fase pseudoternarios	53
5.4.9 Diseño experimental	54
5.4.10 Eficiencia de encapsulación	55
5.4.11 Estabilidad de las nanoemulsiones	56
5.4.12 Efecto protector de las nanoemulsiones contra la degradación del EEA	56
5.4.13 Análisis estadístico	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1 Caracterización del EEA por HPLC	59
6.2 Actividad antioxidante de EEA	60
6.3 Diagramas de fase pseudoternario	61
6.4 Análisis de superficies de respuesta	62
6.5 Eficiencia de encapsulación	65
6.6 Efecto de la temperatura de almacenamiento en el tamaño de gota de las nanoemulsiones	65
6.7 Efecto protector de las nanoemulsiones en el EEA	66
7. CONCLUSIONES	68
8. PERSPECTIVAS	70
9. BIBLIOGRAFIA	72
10 ANEXO	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Principales mecanismos de inestabilidad en una emulsión simple	12
Figura 1.2 Diagrama ternario	18
Figura 1.3 Localización relativa de las nanoemulsiones en el diagrama de fases ternario	19
Figura 1.4 Proceso de cavitación	21
Figura 1.5 Perfil energético de nanoemulsiones	23
Figura 1.6 Representación de la estructura de un tensoactivo	25
Figura 1.7 Representación esquemática de la película interfacial formada por el tensoactivo	26
Figura 1.8 Propiedades que definen el parámetro de empaquetamiento de un tensoactivo	27
Figura 1.9 Clasificación de agentes emulsionantes de acuerdo a su HLB, tomado de Griffin, 1949	30
Figura 1.10 Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración	34
Figura 5.1 Estrategia experimental	49
Figura 6.1 Cromatograma del EEA obtenido mediante HPLC a 350 nm	60
Figura 6.2 Perfil de degradación de TEAC del EEA del extracto fresco libre	61
Figura 6.3 Diagramas de fase pseudoternarios de la zona de formación de las nanoemulsiones $F_i$ con diferentes valores de $TE_{mix}$ ((a) 1:0; (b) 1:0.2; (c) 1:0.3; (d)1:0.4) compuestos de EEA, AEN, EtOH, Tween 20 y agua	62
Figura 6.4 Superficie de respuesta y gráfica de contornos: tamaño de gota como una función de $FO/$ y $FO/TE_{mix}$	64
Figura 6.5 Tamaño de gota de las nanoemulsiones durante	

12 semanas de almacenamiento	66
Figura 6.6 Comparación de la actividad antioxidante del EEA libre y encapsulado almacenado a 4 y 25 °C	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Algunos usos de las emulsiones	13
Tabla 1.2 Principales características de las nanoemulsiones y emulsiones	14
Tabla 1.3 Composición relativa de las fases de las nanoemulsiones	16
Tabla 1.4 HLB de algunos agentes tensoactivos anfífilicos (Kumar y Priya 2001)	30
Tabla 5.1 Composición de las formulaciones de nanoemulsion	53
Tabla 5.2 Diseño central compuesto para las nanoemulsiones $F_{MSR,i}$ , tamaño de gota y polidispersidad	55
Tabla 6.1 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales a diferentes velocidades de flujo del cosolvente	58
Tabla 6.2 Comparación del contenido de fenoles y flavonoides totales en el EEA obtenido por dos métodos de extracción	59
Tabla 6.3 ANOVA de los datos obtenidos usando un diseño factorial $3^2$	63
Tabla 6.4 Actividad antioxidante inicial como TEAC (mM) y parámetros cinéticos de las nanoemulsiones $F_{MSR,i}$	67

---

## RESUMEN

Actualmente existe una demanda de alimentos funcionales, los cuales se definen de acuerdo con el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI; International Life Sciences Institute), como aquellos alimentos que contienen un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional, donde sus efectos positivos justifican que puedan reivindicarse sus características funcionales o incluso saludables. Lo anterior implica que un alimento sea considerado funcional porque, además de destacar en sus propiedades nutritivas, contiene algunos elementos bioactivos que al consumirlos diariamente en una dieta equilibrada contribuyen a mantener o mejorar nuestro estado de salud y bienestar. Dentro de estos elementos bioactivos se pueden mencionar las vitaminas, ácidos grasos omega-3 -6 y -9, minerales, fibra dietética, flavonoides, entre otros. Éstos últimos son compuestos a los que se les han atribuido propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antimutagénicas y antioxidantes; y debido a que el organismo humano no puede producirlos, éstos deben ser obtenidos a través de la dieta. Sin embargo, existen algunos inconvenientes en el uso extensivo de este tipo de compuestos en áreas de consumo humano; esto es debido a que las principales técnicas de extracción de estos compuestos son por medio del uso de solventes orgánicos, limitando su uso debido a la presencia de trazas de solventes remanentes en el extracto, además de su alta susceptibilidad a factores ambientales como luz, pH, temperatura y oxígeno, ocasionando la pérdida de sus propiedades funcionales en un corto tiempo. Por este motivo, surge la necesidad de protegerlos de su degradación, prolongando su funcionalidad en el tiempo y haciéndolos aptos para su aplicación en sistemas alimenticios, cosméticos y/o farmacéuticos. Una forma de contrarrestar las desventajas de las técnicas convencionales de extracción, es el uso de métodos de extracción con fluidos supercríticos, los cuales son considerados como métodos limpios debido a que no requieren el uso de solventes orgánicos tóxicos para la salud, proveen altos rendimientos de extracción, y pueden realizarse a temperaturas relativamente bajas (cerca a la temperatura ambiente), permitiendo la extracción y conservación de dichos compuestos termolábiles.

Debido a lo anterior, el objetivo de este proyecto fue extraer los compuestos flavonoides hidrófobos presentes en *Equisetum arvense* mediante extracción con

fluidos supercríticos y protegerlos de su degradación mediante su encapsulación en nanoemulsiones de tipo o/w, a través del uso de distintos agentes tensoactivos con la finalidad de maximizar el rendimiento de encapsulación, mejorar la biodisponibilidad y prolongar el tiempo de vida útil de los compuestos flavonoides.

Se encontró que los principales flavonoides presentes en el extracto de *Equisetum arvense* (EEA) fueron: quercetina 3-O-glucósido y kaempferol 3-O-glicósido en una concentración de 385 mg/g<sub>BS</sub> y 31.5 mg/g<sub>BS</sub> respectivamente. Dicho extracto presentó una actividad antioxidante mediante la inhibición del radical estable DPPH equivalente a una concentración de Trolox de 10.3mM TEAC en el extracto fresco. Los EEA se almacenaron a 4 y 25 °C, al monitorear su actividad antioxidante se observó una pérdida superior al 90 % al cabo de tres semanas independientemente de la temperatura a la cual fueron almacenados. El perfil de pérdida de actividad antioxidante se ajustó a un modelo cinético de primer orden por ser el que describió mejor su comportamiento ( $R^2 > 0.96$ ). Los parámetros cinéticos de dicha degradación fueron: constantes cinéticas de primer orden,  $k_4 = 0.661 \text{ sem}^{-1}$  y  $k_{25} = 0.804 \text{ sem}^{-1}$ , con tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) de  $1.05 \pm 0.03$  y  $0.86 \pm 0.03$  semanas para el EEA libre almacenado a 4 y 25 °C respectivamente.

La incorporación de los extractos en nanoemulsiones como forma de proteger y prolongar la funcionalidad de los compuestos bioactivos extraídos de *Equisetum arvense* se llevó a cabo mediante el desarrollo de los diagramas de fase ternarios para establecer los intervalos de concentración de cada uno de los componentes con los cuales se logra la formación de las nanoemulsiones ( $d \leq 100 \text{ nm}$ ). Se realizaron cuatro diagramas de fases, en cada uno se mantuvo constante una relación tensoactivo:cotensoactivo (TEmix) (1:0, 1:0.2, 1:0.3 y 1:0.4), para cada diagrama se diseñaron 25 formulaciones, donde la fase oleosa (FO) estuvo compuesta por una relación EEA: AEN (aceite esencial de naranja) 4:1 y la fase acuosa (FA) por agua destilada y TEmix, el contenido de FO entre el 3 y 20% (p/p). Los resultados mostraron que el uso de etanol como co-tensoactivo favoreció la formación de las nanoemulsiones, debido a que promueve la reducción de estrés en los enlaces formados en la interfase agua-aceite. Los resultados obtenidos a partir de dichos diagramas ternarios mostraron que no

hubo diferencias significativas en la formación de nanoemulsiones al utilizar relaciones de TEmix de 1:0.3 y 1:0.4, por lo que para experimentos posteriores se utilizó un TEmix de 1:0.3.

Se realizó un ANOVA para determinar el efecto de las variables independientes y sus interacciones sobre el tamaño de gota de las nanoemulsiones o/w, y mediante un polinomio de segundo grado se generó una superficie de respuesta y una gráfica de contornos que permiten visualizar el efecto de los factores involucrados en el sistema. El modelamiento de los datos mostró que al aumentar la concentración de FO, el tamaño de gota aumentó y que al aumentar la concentración de tensoactivo el tamaño de gota disminuyó. Además se encontró la mejor formulación de la nanoemulsión, en la cual se logró encapsular la mayor concentración de FO con tamaño de gota menor o igual 100 nm, la cuál consistió de 19.98 % (p/p) de FO y 0.82 de FO/TEmix donde TEmix está compuesto por una mezcla de Tween 20 y etanol en la relación antes establecida. Esta nanoemulsión fue etiquetada como  $F_{MSR,O}$  y presentó un porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE%) de  $97.5 \pm 0.5$  %, resultado similar al mostrado por  $F_{MSR,2}$  ( $97.2 \pm 0.4$  %) y  $F_{MSR,3}$  ( $97.0 \pm 0.6$  %), formulaciones que fueron elegidas al azar con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en  $F_{MSR,O}$ , encontrando que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las tres formulaciones. A las 3 formulaciones ( $F_{MRS,O}$ ,  $F_{MRS,2}$ , y  $F_{MRS,3}$ ) se les evaluó la estabilidad durante el almacenamiento a 4 y 25 °C, en base al cambio de tamaño de gota después de 12 semanas. Las nanoemulsiones almacenadas a 4 °C no mostraron ningún cambio significativo al cabo de las 12 semanas, a diferencia de las nanoemulsiones almacenadas a 25 °C, las cuales mostraron un aumento significativo en el tamaño a partir de la octava semana de almacenamiento. Por último se evaluó la protección de los compuestos flavonoides encapsulados en las nanoemulsiones encontrando que la  $F_{MSR,O}$  mostró una pérdida gradual de la actividad antioxidante la cual fue más lenta que la del EEA libre. Después de las 12 semanas de almacenamiento, la pérdida de actividad antioxidante de la  $F_{MSR,O}$  fue de  $42.0 \pm 1.9$  % a 4°C y de  $50.5 \pm 2.3$  % a 25 °C. En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el diseño experimental permitió optimizar la formulación de

las nanoemulsiones para lograr encapsular la mayor cantidad de fase oleosa posible con una alta eficiencia de encapsulación y un punto muy importante es que se logró extender el tiempo de vida de las propiedades antioxidantes del Extracto de *Equisetum arvense* encapsulado alrededor de once veces en comparación con el extracto libre.

**ABSTRACT**

At the moment there exists a demand for functional foods, which are defined by the International Life Sciences Institute (ILSI), as foods that contain a component, nutrient or non-nutrient, with selective effect on one or various functions of the body, with an added effect beyond its nutritional value, where positive effects justify their functional characteristics may be claimed or even healthy. This implies that a food is considered functional because, while highlighting its nutritional properties, it contains some bioactive elements which when they are consumed within a balanced diet, help to maintain or to improve our health and wellbeing. Among these bioactive elements may be mentioned vitamins, omega-3,-6, and -9 fatty acids, minerals, dietary fiber, flavonoids, among others. Latter are compounds that have been attributed with anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimutagenic properties, and due to the human body cannot produce them, they must be obtained through the diet. However, there are some drawbacks in the extensive use of such compounds in areas of human consumption, mainly because the techniques for extraction of these compounds is by means of the use of organic solvents, limiting their use by the of presence traces of solvent remained in the extract, besides their high susceptibility to environmental factors such as light, pH, temperature and oxygen, causing the loss of functional properties in a short time. For this reason, there is a need to protect them from degradation, prolonging its functionality over time and making them suitable for application in food, cosmetic and/or pharmaceutical systems. One way to overcome the disadvantages of the conventional techniques of extraction is the use of supercritical fluid extraction methods, which are considered as clean methods because they do not require the use of toxic organic solvents for health, provide high yields of extraction, and can be performed at relatively low temperatures (near to room temperature), and allowing the extraction and storage of thermolabile compounds.

As mention above, the aim of this project was to extract hydrophobic flavonoid compounds present in *Equisetum arvense* using supercritical fluid extraction and protect them from degradation by their encapsulation in nanoemulsions of o/w type, by using various surfactants with in order to maximize the encapsulation efficiency and to prolong their life time.

Were obtained *Extracts of Equisetum arvense* (EEA) by extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. The flavonoid compounds were identified and quantified by HPLC and found that the main flavonoids present in the extract were quercetin 3-O-glucoside and kaempferol 3-O-

glycoside in a concentration of 385 mg/g<sub>BS</sub> and 31.5 mg/g<sub>BS</sub> respectively. The extract obtained was evaluated antioxidant activity by the DPPH method, which was 10.3 mM TEAC in the extract fresh. *Equisetum arvense* extracts were stored at 4 and 25 °C, to monitor their antioxidant activity was observed over 90% loss after three weeks regardless of the temperature at which they were stored. The profile for loss of antioxidant activity was adjusted to a first order kinetic model for being the best described their behavior ( $R^2 > 0.96$ ). Kinetic parameters were obtained: first-order rate constants,  $k_{25} = 0.661 \text{ wk}^{-1}$  and  $k_4 = 0.804 \text{ wk}^{-1}$ , with half-life ( $t_{1/2}$ ) of  $1.05 \pm 0.03$  and  $0.86 \pm 0.03$  weeks for free EEA stored at 25 and 4 °C respectively. The incorporation of extracts in nanoemulsions as way to protect and extend the functionality of bioactive compounds extracted from *Equisetum arvense* was carried out by developing the ternary phase diagrams for set the concentration ranges for each of the components with which achieves the formation of the nanoemulsions ( $d \leq 100\text{nm}$ ). There were four phase diagrams in each one ratio surfactant: cosurfactant (TEmix) (1:0, 1:0.2, 1:0.3 and 1:0.4) kept constant, for each phase diagram 25 formulations where designed where in the phase oil (FO) consisted of a relationship EEA: AEN (orange oil) 4:1 and the aqueous phase (FA) of distilled water and Temix, the oil phase was varied from 3 to 20%. The results showed that the use of ethanol as co-surfactant favored formation of nanoemulsions, because it promotes the reduction of stress on the bonds formed at the oil-water interface. No significant difference in the formation of the nanoemulsions with TEmix of 1:0.3 and 1:0.4 therefore for subsequent experiments was used a TEmix of 1:0.3. No significant difference in the formation of the nanoemulsions with TEmix diagram of 1:0.3 to 1:0.4 and TEmix therefore was used for subsequent experiments one TEmix of 1:0.3

ANOVA was performed to determine the effect of independent variables and their interactions on the droplet size of the nanoemulsions o/w, and by a quadratic polynomial generated a response surface and a contour plot that allowed us to visualize the effect of the factors in the system, and found that increasing the concentration of the oily phase (FO), the droplet size increases and by increasing the surfactant concentration decreases the size, found the best formulation of nanoemulsion, in which achieved the highest concentration of encapsulated FO with droplet size less than or equal to 100 nm. This formulation consisted of 19.98% (w/w) FO and 0.82 FO/TEmix where TEmix this composed of a mixture of Tween 20 and ethanol in a ratio of 1.0:0.3. This was labeled as  $F_{\text{MSR},0}$  nanoemulsion, and presented a percentage of encapsulation efficiency (EE%) of  $97.5 \pm 0.5 \%$  this result was similar to that shown by  $F_{\text{MSR},2}$  ( $97.2 \pm 0.4 \%$ ) and  $F_{\text{MSR},3}$  ( $97.0$

$\pm 0.6 \%$  ), which were chosen at random in order to corroborate the results obtained in  $F_{MSR,O}$ , finding that there is no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the three formulations. The stability of  $F_{MRS,O}$ ,  $F_{MRS,2}$ , and  $F_{MRS,3}$ , was evaluated when they were stored at 4 and 25 °C, based on the change of droplet size after 12 weeks of storage. The nanoemulsions stored at 4 °C showed no significant change after 12 weeks, in contrast to the nanoemulsions stored at 25 °C, which showed a significant increase in size from the eighth week of storage. Finally we evaluated the protection of flavonoid compounds encapsulated in the nanoemulsions finding that  $F_{MSR,O}$  showed a gradual loss of antioxidant activity that was much slower than that exhibited by the free EEA. After 12 weeks storage, the loss of antioxidant activity  $F_{MSR,O}$  was  $50.5 \pm 2.3 \%$  at 25 °C and  $42.0 \pm 1.9 \%$  at 4 °C. Based on the results we can conclude that the experimental design allowed us to optimize the formulation of the nanoemulsions to achieve encapsulate as much as possible oil phase with high encapsulation efficiency and a very important point is that it is able to extend the life of the antioxidant properties of *Equisetum arvense* extract encapsulated around eleven times in comparison with the free extract.

# INTRODUCCIÓN

*Equisetum arvense* es una planta nativa de Centro y Sudamérica, y es comúnmente conocida como “cola de caballo”. Esta planta es usada en la medicina tradicional como un diurético y en el tratamiento de varias enfermedades como la ictericia, hepatitis, enfermedades estomacales, sangrados internos e infecciones en el tracto respiratorio entre otras (Mímica-Dukic y col., 2008; Veit y col., 1995). En algunos trabajos se ha reportado que *Equisetum arvense* contiene oleorresinas (Danielski y col., 2007), derivados hidroxicinámicos y flavonoides (Pietta y col., 1991). Se ha reportado que los flavonoides quercetina 3-O-glucósido (isoquercetina) y kaempferol 3-O-glicósido están presentes en concentraciones relativamente altas, a estos dos compuestos se les atribuyen sus propiedades antioxidantes, las cuales se ven grandemente afectadas por el estrés oxidativo. Los flavonoides de *Equisetum arvense* generalmente son extraídos con maceraciones en soluciones acuosas o con solventes orgánicos, esto no sólo restringe su uso en la industria alimentaria y cosmética debido a las trazas de solventes que quedan en el extracto, sino que también presentan un tiempo de vida corto, perdiendo rápidamente sus propiedades funcionales debido principalmente a la presencia de factores ambientales degradativos como oxígeno, temperatura, pH y luz (Verbeyst y col., 2010; Domínguez-López y col., 2008; Friedman y Jurgens 2000). Por ello se han buscado nuevas alternativas en los métodos de extracción que permitan obtener extractos que puedan utilizarse en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética principalmente. Los fluidos supercríticos tienen propiedades físicas interesantes, como baja viscosidad y alta difusividad dentro de la matriz de la muestra, esto da como resultado un transporte de masa considerablemente más rápido que los disolventes orgánicos comunes. Aunado a esto, la extracción con fluidos supercríticos (EFS) opera a bajas temperaturas, lo que la hace una técnica adecuada para la extracción de compuestos termolábiles (Ortíz-Estrada y col., 2007). Se ha reportado que los extractos obtenidos por EFS presentan una mayor capacidad antioxidante comparada con los obtenidos por solventes orgánicos debido a los altos rendimientos y la poca degradación de los flavonoides durante el proceso de extracción (Meireles 2008; Danielski y col., 2007).

A pesar del alto rendimiento y funcionalidad que la EFS podría aportar a los EEA, existe otra limitante relacionada con la baja solubilidad de los compuestos funcionales contenidos en el extracto y su alta susceptibilidad al calor, luz y oxígeno (Scalbert y Williamson 2000; Dillard y German 2000). Con la finalidad de evitar estos inconvenientes, se han incorporado estos compuestos bioactivos en gotas muy pequeñas de aceite-en-agua de tamaño nanométrico, o nanoemulsiones (o/w) (Zhou y col., 2010; Hoeller y col.,

2009). Las nanoemulsiones son sistemas vesiculares en los cuales los compuestos activos son confinados a una cavidad que consiste en un núcleo interno líquido rodeado por una membrana interfacial formada por tensoactivos (Couvreur y col., 1995). Estas nanoemulsiones pueden ser usadas en la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria como sistemas de liberación para compuestos insolubles o de baja solubilidad en agua como los flavonoides encontrados en *Equisetum arvense*, este tipo de sistemas además permite contener una alta concentración de compuestos bioactivos. Comparada con las emulsiones a escala micrométrica, las cuales presentan gotas del tamaño de micras, las nanoemulsiones presentan una mayor área superficial y tienen la facilidad de incrementar la solubilidad debido a la combinación de una gran adsorción interfacial de los compuestos del núcleo, mejor viabilidad y liberación controlada, lo cual permite una mejor precisión de focalización de los compuestos encapsulados (Mozafari y col., 2008). Una ventaja de este método es que el pequeño tamaño de las gotas está en función de la composición de la formulación. Lo cual significa que el tamaño de las gotas de las nanoemulsiones puede ser establecido mediante el diseño de la formulación (Fang y Bhandari, 2010).

# **CAPÍTULO 1**

## **MARCO TEÓRICO**

## 1.1 Emulsiones

Las emulsiones están compuestas por la mezcla de dos líquidos inmiscibles (usualmente aceite y agua) con uno de los dos líquidos disperso en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro (Becher, 2001). La fase dispersa recibe el nombre de fase interna y la fase continua recibe el nombre de fase externa. La unión de estas fases se da mediante el uso de tensoactivos los cuales reducen la tensión interfacial favoreciendo la formación de emulsiones. En la mayoría de los alimentos, el tamaño de las gotas de las emulsiones oscila entre 1 y 100  $\mu\text{m}$ . (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson 1992; Friber y Larson, 1997).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, y suelen presentar uno o varios mecanismos de desestabilización a la vez. En la Figura 1.1 se muestran éstos mecanismos.

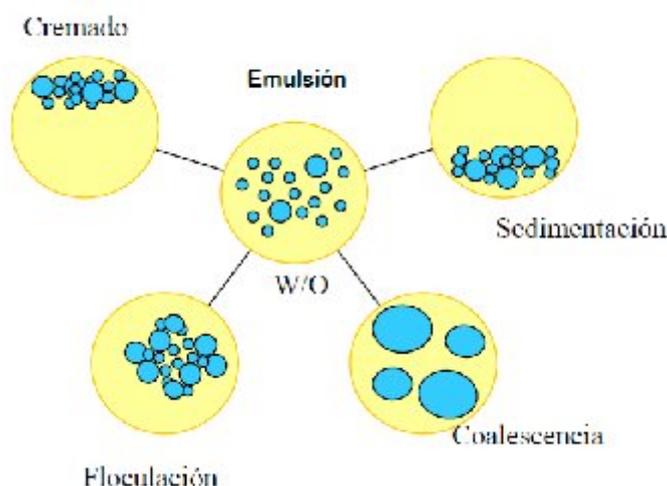


Figura 1.1 Principales mecanismos de inestabilidad en una emulsión simple.

### 1.1.1 Clasificación de las emulsiones con base a la fase dispersa

Las emulsiones pueden clasificarse dependiendo de cuál sea el líquido que compone a la fase dispersa:

- Aceite-en-agua (o/w) gotas de aceite dispersas en agua.
- Agua-en-aceite (w/o) gotas de agua dispersas en aceite.

- Aceite-en-agua-en-aceite (o/w/o) emulsión doble.
- Agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) emulsión doble. (Spasic y Hsu, 2005)

### 1.1.2 Aplicaciones de las emulsiones simples y dobles

Las emulsiones dobles tienen muchas aplicaciones, por ejemplo en: cosméticos, agricultura, alimentos, fotografía, cuero, petróleo, y liberación de drogas.

En la Tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de las aplicaciones que se les dan a la emulsiones en los diferentes campos antes mencionados.

*Tabla 1.1 Algunos usos de las emulsiones*

<b>Campo de Aplicación</b>	<b>Ejemplos de aplicaciones</b>
Ambiente y Meteorología	Emulsiones en el tratamiento de aguas residuales, en derrames de petróleos.
Alimentos	Leche, mantequilla, mayonesa, crema líquida, crema de helado, cremas, margarinas, quesos.
Geología, agricultura, y ciencia del suelo.	Insecticidas y herbicidas
Manufactura y ciencia de los materiales	Pulido de asfaltos
Biología y Medicina	Vitaminas solubles, hormonas, membranas biológicas.
Producción de petróleo y minerales	Fluidos de perforación, -acidificación de fluidos
Productos de cuidado personal	Lociones y cremas para el cuidado del cabello y de la piel.

### 1.1.3 Clasificación de las emulsiones con base al tamaño de gota.

Las emulsiones pueden clasificarse en base al tamaño de las gotas, sin embargo aún no hay una homogeneidad de los intervalos de tamaño de gota reportados por los diferentes autores, a continuación se muestra la clasificación reportada por Tadros, (2008):

- emulsiones 1 - 100  $\mu\text{m}$
- nanoemulsiones 50 – 200 nm
- microemulsiones 5 – 50 nm

Otros autores mencionan que las nanoemulsiones van de 1 a 100 nm (Shakeel y col., 2007; Sonnevile-Aubrum y col., 2004).

El uso de las nanoemulsiones tiene grandes ventajas sobre las emulsiones, en la Tabla 1.2 se mencionan las principales características de cada una de ellas.

*Tabla 1.2 Principales características de las nanoemulsiones vs emulsiones.*

<b>Características</b>	<b>Nanoemulsión</b>	<b>Emulsión</b>
Tamaño de gota (fase dispersa)	< 0.1 $\mu\text{m}$	>0.1 $\mu\text{m}$
Aspecto	Transparente ó translúcido	Opaco
Formación	Requiere poca energía	Requiere mayor energía
Estabilidad cinética	alta	Baja

Debido a que el presente trabajo se enfoca en el uso de las nanoemulsiones por lo que se va a profundizar más al respecto.

## **1.2 Nanoemulsiones**

Las emulsiones que presentan un tamaño de gota en la escala nanométrica a menudo son referidas en la literatura como miniemulsiones, (El-Aasser y Sudol, 2004), nanoemulsiones (Nakajima 1997; Sonnevile-Aubrum y col.,2004), emulsiones ultrafinas (Nakajima 1997), emulsiones sub-micrón (Amselen y Friedman 1998), etc. El término nanoemulsión (Solans y col., 2002; Tadros y col., 2004) es preferido porque además de dar una idea del intervalo de nanoescala de las gotas, éste es conciso y evita una mala interpretación con el término microemulsión (los cuales son sistemas termodinámicamente estables). Debido a su tamaño característico, las nanoemulsiones son transparentes o translúcidas a la vista y poseen estabilidad contra la sedimentación o cremado. Estas propiedades hacen a las nanoemulsiones interesantes para estudios fundamentales y para aplicaciones prácticas (por ejemplo: en el campo de la química, farmacéutica, cosmética, etc.) De igual forma que las emulsiones, las nanoemulsiones pueden ser agua-en-aceite (w/o) ó aceite-en-agua (o/w) dependiendo de cuál sea la fase dispersa y cual la fase dispersante. Las nanoemulsiones tipo o/w han sido estudiadas desde hace muchos años (El-Aasser y Sudol 2004; Amselen y Friedman 1998; Tadros y col.,2004; Antonietti y Landfester 2002; Asua 2002). En contraste, las nanoemulsiones w/o han sido estudiadas desde hace algunos años. En los últimos años, las industrias química, alimentaria,

farmacéutica y cosmética, han mostrado un gran interés en las nanoemulsiones esto es debido a sus interesantes características:

1) Tamaño de gota muy pequeño:

- i) Causa una gran reducción en el efecto de la fuerza de gravedad y el movimiento Browniano. Esto significa que no hay cremado o sedimentación durante el almacenamiento, lo cual sucede frecuentemente en las emulsiones como se muestra en la Figura 1.1.
- ii) Evita la floculación (Figura 1.1). Es decir, la débil floculación se previene y esto permite al sistema permanecer disperso sin que haya separación.
- iii) Evita la coalescencia (Figura 1.1) debido a que las gotas no son deformables y no hay fluctuaciones en la superficie.
- iv) En el caso de productos cosméticos permite depositar los sustratos uniformemente en la piel.
- v) Permite su penetración a través de la superficie áspera de la piel reforzando la entrada de los activos.
- vi) Permite una eficiente liberación de ingredientes activos a través de la piel. El gran área superficial del sistema de nanoemulsión provoca una rápida penetración de los activos.
- vii) La naturaleza transparente del sistema, su fluidez, y baja viscosidad, pueden dar una sensación agradable y ligera a la piel.
- viii) A diferencia de las microemulsiones (las cuales requieren alta concentración de agentes tensoactivos, generalmente a concentraciones del 20 % o mayores. Las nanoemulsiones pueden ser preparadas usando menores concentraciones de tensoactivo.

- ix) Las nanoemulsiones pueden ser aplicadas para liberar fragancias, las cuales pueden ser incorporadas en muchos productos de cuidado personal. (Tadros y col., 2004).

Tanto las nanoemulsiones aceite-en-agua (o/w) como las nanoemulsiones agua-en-aceite (w/o) han tenido un desarrollo activo que se ve reflejado en numerosas publicaciones y patentes (Solans y col., 2005; El-Aasser y col., 2004; Amselen y Friedman 1998; Solans y col., 2002; Izquierdo y col., 2002).

### 1.2.1 Composición relativa de las fases de una nanoemulsión.

A grandes rasgos las nanoemulsiones se dividen en:

- Nanoemulsiones directas (o/w): son nanoemulsiones de aceite en agua con estructura globular constituida por gotas de aceite dispersas en la fase acuosa.
- Nanoemulsiones inversas (w/o): son nanoemulsiones de agua en aceite de estructura globular constituida por gotas de fase acuosa dispersas en la fase aceite.

Las nanoemulsiones al igual que las emulsiones están constituidas por una fase acuosa, una fase oleosa (comúnmente se usan aceites) y un tensoactivo que se va a encargar de disminuir la tensión interfacial para favorecer la formación de las gotas que darán lugar a las nanoemulsiones, en ocasiones se adiciona un co-tensoactivo que va a ayudar al tensoactivo a disminuir la tensión interfacial para favorecer la formación de las nanoemulsiones y dependiendo de las concentraciones en las cuales se encuentren cada uno de los componentes, será el tamaño y tipo de nanoemulsión formada. A continuación se muestra la composición relativa de las fases de las nanoemulsiones.

*Tabla 1.3 Composición relativa de las fases de las nanoemulsiones*

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

### 1.2.2 Diagrama de fases Pseudoternario

Los sistemas tensoactivo-agua-aceite y aquellos en los cuales se incluye un cuarto componente como un alcohol, se utilizan en numerosas aplicaciones, desde la industria petrolera hasta la preparación de productos farmacéuticos o alimenticios. En muchos casos es de gran importancia determinar el comportamiento de fase del sistema considerado. Se entiende por comportamiento de fase la descripción del número de fases que presenta el sistema en el equilibrio. Uno de los casos más interesante es el comportamiento monofásico, situación en la cual se obtiene la solubilidad total de todos los componentes, a menudo, en forma de una nanoemulsión.

En general sobre un diagrama ternario, se buscan en particular las fronteras entre un comportamiento de fase y otro. Cuando se cambia la naturaleza de uno de los componentes, estas fronteras tienden a variar y a veces el diagrama cambia de aspecto. Es necesario por tanto estudiar el cambio de aspecto de los diagramas, a veces de manera simplificada a través de la variación del comportamiento de fase en un punto del diagrama en función de la variable estudiada.

En efecto, se enfrenta en general el problema de la representación de un efecto que pone en juego a más de tres variables. Si estas tres variables están relacionadas entre ellas donde solamente haya dos independientes, se pueden representar los efectos sobre un diagrama ternario plano. El comportamiento de fase de los sistemas ternarios se puede representar a temperatura y presión constantes, sobre un diagrama ternario clásico. (Treybal, 1951; Winkle, 1967).

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. Se refiere a la composición del sistema en relación a una propiedad que se conserva globalmente; en general, se utilizan las fracciones molares o los porcentajes en peso para representar las diferentes concentraciones.

La concentración de un componente C en un sistema ternario representado por un punto S del diagrama triangular equilátero es entonces proporcional a la altura que une el punto S al lado opuesto del vértice que representa el componente C. La Figura 1.2 muestra el principio de la representación ternaria en un triángulo equilátero. Se indica una manera simple de buscar la fracción de C en el sistema representado por S, gracias a una graduación del porcentaje de C sobre el lado BC. El porcentaje de A se leerá sobre el lado CA y el de B sobre el lado AB siguiendo las flechas.

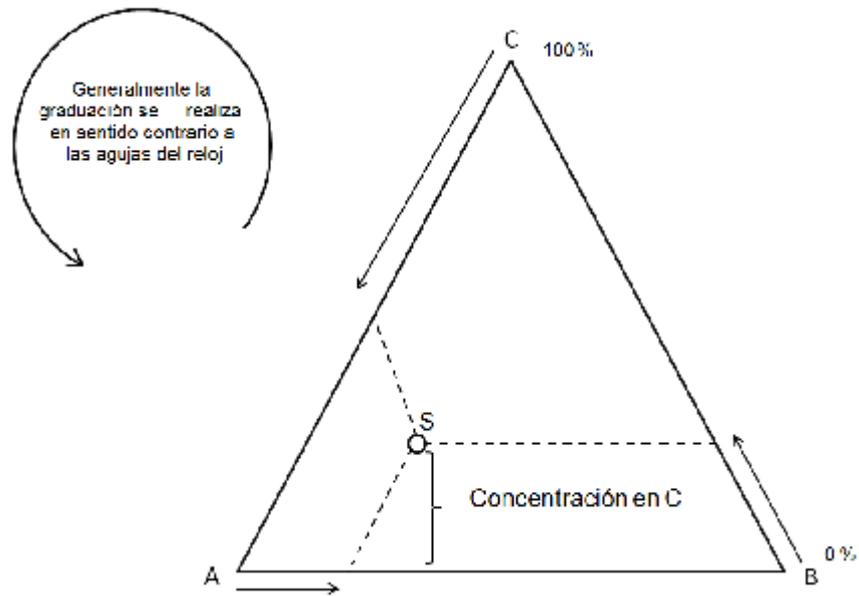


Figura 1.2 Diagrama ternario

Muchos sistemas de interés práctico, en la industria, contienen un gran número de componentes de naturaleza química diferente. Por lo que es conveniente agrupar estos en pseudo-componentes para reducir el número de variables a estudiar. En la práctica se tratará de agrupar todos los "aceites" en una sola fase; el agua, los electrólitos y los productos hidrosolubles en otra; y todos los agentes tensoactivos como un tercer pseudo-componente. Los diagramas de fase pseudo-ternarios permiten establecer las fronteras de la zona de formación de las nanoemulsiones, así como la composición y la localización relativa de los tipos de nanoemulsión: directa, bicontinua e inversa. En la Figura 1.3 aparecen diferenciadas las principales estructuras que puede adoptar una nanoemulsión. Las estructuras globulares, directas e inversas, aparecen en los extremos inferiores del diagrama y la estructura bicontinua se sitúa en la zona intermedia comprendida entre estas dos.

La localización relativa de las nanoemulsiones está dada en un diagrama de fases ternario y ésta depende del tipo de nanoemulsión (Figura 1.3).

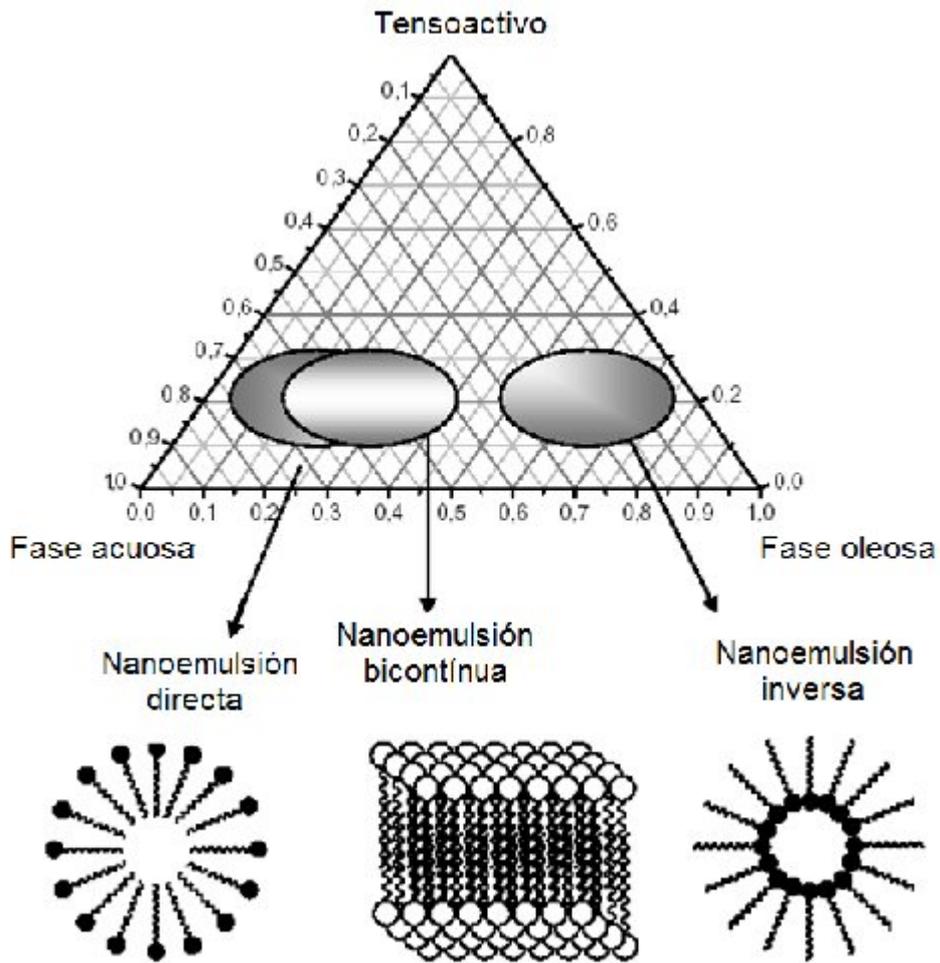


Figura 1.3 Localización relativa de las nanoemulsiones en el diagrama de fases ternario.

### 1.2.3 Formación de las nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas que no están en equilibrio, por lo que no pueden formarse espontáneamente. Consecuentemente necesitan de la presencia de al menos un tensoactivo y de la entrada de energía, generalmente de dispositivos mecánicos. Por lo que a continuación se describen los principales métodos de emulsionamiento.

### 1.2.4 Métodos de emulsionamiento

Existen tres métodos empleados en la preparación de nanoemulsiones, los cuales consisten en la aplicación de altas presiones de homogenización, el método de temperatura de inversión de fases (PIT por sus siglas en inglés) y el ultrasonido.

### *A alta presión de homogenización.*

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

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

El método de temperatura de inversión de fases, método PIT introducido por Shinoda y Saito (1968), se basa en formar la nanoemulsión utilizando un cambio brusco de temperatura (Forster y Von Rybinski, 1998). Sin embargo, su uso está limitado a sistemas formulados con tensoactivos no iónicos del tipo etoxilado, los cuales cambian su balance hidrofílico-lipofílico con la temperatura; es decir a temperaturas inferiores a la temperatura de inversión de fases ( $HLD < 0$ ) se forman nanoemulsiones aceite-en-agua mientras que a temperaturas superiores a la misma ( $HLD > 0$ ) forman nanoemulsiones agua-en-aceite (Shinoda y Kuneida, 1983).

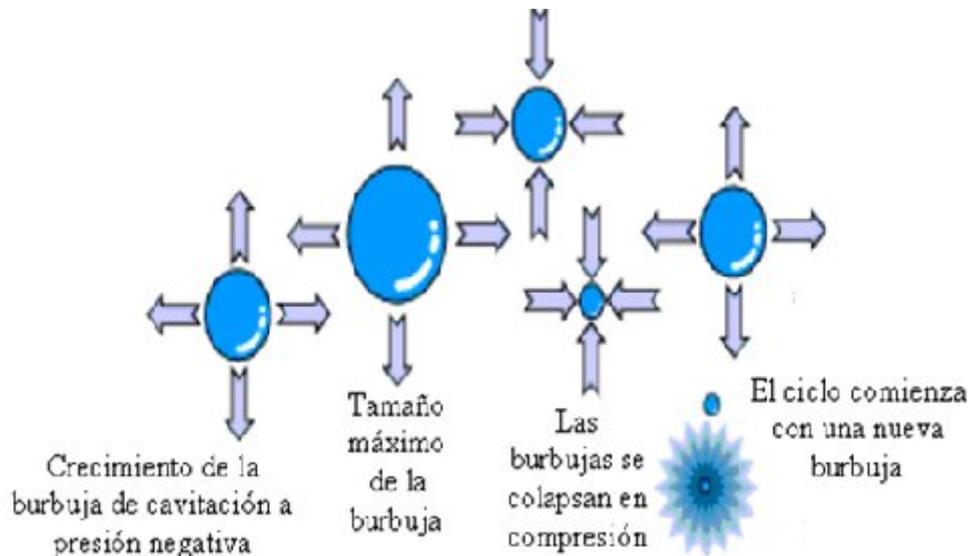
En el método PIT, el tamaño de gota alcanza un mínimo al igual que la tensión interfacial, sin embargo las gotas pequeñas son inestables y coalescen rápidamente (Salager, 2002). Cerca de la PIT se producen nanoemulsiones estables y de pequeño tamaño de gota debido al rápido enfriamiento producido (Binks y col., 1998; Friberg y Solans 1978).

En el presente trabajo se utilizará el emulsionamiento por ultrasonido por lo que se profundizará más en el tema.

### *Emulsionamiento por ultrasonido*

En un sistema de ultrasonido, el esfuerzo de corte es proporcionado principalmente por el proceso de cavitación acústica: la formación, crecimiento y subsecuente colapso de las microburbujas causado por las fluctuaciones de presión de la onda acústica (Figura 1.4).

El colapso causa niveles extremos de alta turbulencia localizada, es una implosión a escala microscópica. La acumulación de miles de estas implosiones en miniatura forman las bases de la homogenización ultrasónica.



*Figura 1.4. Proceso de cavitación*

En un ultrasonido clásico, la nube de burbujas cavitacional y consecuentemente la región de alta intensidad de velocidad de corte está enfocada en una pequeña zona adyacente a la cara del transductor.

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

### **1.2.5 Estabilidad de las nanoemulsiones.**

Desde el punto de vista termodinámico, en un sistema bifásico como las nanoemulsiones, la fase dispersa consiste de glóbulos que usualmente están en un intervalo de tamaño de diámetro menor a 100 nm.

Tales dispersiones nunca son completamente estables en el sentido absoluto, debido a que la interfase es el lugar de energía libre superficial, y si dos glóbulos se encuentran juntos hay una reducción neta en el área interfacial.

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

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

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

Conceptualmente, la estabilidad cinética de una nanoemulsión puede atribuirse a la presencia de una barrera energética entre dos niveles energéticos; esto es, una energía de activación ( $\Delta G^*$ ), la cual debe superarse antes de que se alcance el estado termodinámicamente más favorable. Una nanoemulsión que es cinéticamente estable debe tener una energía de activación significativamente más grande que la energía térmica del sistema ( $kT$ ). En realidad, las nanoemulsiones tienen un número diferente de estados metaestables, y cada uno de ellos tiene su propia energía de activación. Así, una nanoemulsión puede moverse de un estado metaestable a otro antes de alcanzar su estabilidad termodinámica como puede observarse en la Figura 1.5.

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

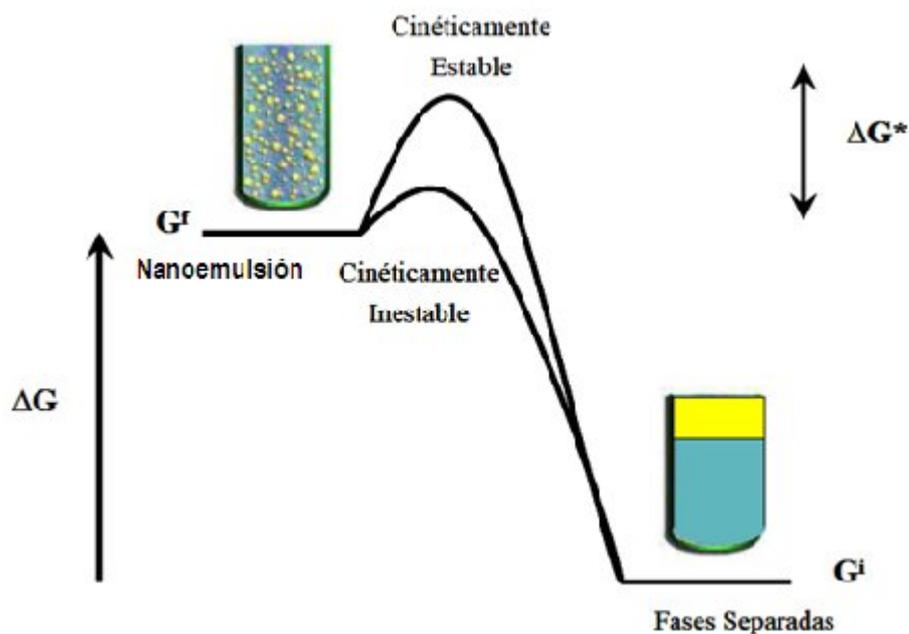


Figura 1.5 Perfil energético de nanoemulsiones.

### 1.2.6 Factores de estabilidad de las nanoemulsiones.

Como se ha mencionado, debido a que la estabilidad cinética de las nanoemulsiones es un parámetro muy importante para el diseño de dichos sistemas, principalmente para aquellos en los que se busca poder controlar la liberación de compuestos funcionales localizados en el interior de dichas nanoemulsiones, es necesario realizar una caracterización completa de dichos sistemas, monitoreando los principales factores que contribuyen a prolongar la estabilidad en el tiempo, dentro de los cuales se puede mencionar el diseño de la formulación, el tamaño de gota, la viscosidad, su potencial zeta y pH del sistema, entre otros (Gupta y Cannon 2000).

#### *Efecto del tamaño de gota sobre la estabilidad de las nanoemulsiones*

La estabilidad de las nanoemulsiones contra efectos gravitacionales como la sedimentación y/o el cremado es debida al tamaño tan pequeño de los glóbulos formados (no así en las emulsiones convencionales), los cuales tienden a moverse aleatoriamente en el medio fluido, debido principalmente al “bombardeo” heterogéneo de las moléculas del fluido sobre la superficie de las gotas que genera gradientes de presión generando el movimiento, denominado como movimiento browniano, provocando que la velocidad de

difusión de las gotas nanométricas sea más alta que la velocidad de sedimentación o cremado inducida por la fuerza de gravedad (Solans y col., 2005).

Sin embargo, este tipo de sistemas presenta fenómenos de inestabilidad debidos a la difusión molecular, mejor conocido como maduración de Ostwald (Tadros, y col., 2004).

### **1.2.7 Fenómeno de maduración de Ostwald.**

El fenómeno de maduración de Ostwald es el proceso en donde las gotas grandes de una emulsión crecen a expensas de las más pequeñas debido al transporte de masa de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua intermedia (McClements, 2005). Por este motivo, cuando las nanoemulsiones son polidispersas y existe una diferencia en solubilidad entre las gotas pequeñas y grandes, se considera a este fenómeno como el principal mecanismo de desestabilización de las nanoemulsiones.

Cabe mencionar que en una situación ideal de una distribución perfectamente monodispersa no debe haber maduración de Ostwald porque ahí no hay diferencias de solubilidad de gotas basadas en tamaño. Así una distribución estrecha será más resistente al fenómeno de maduración de Ostwald que una distribución más amplia.

Higuchi y Misra (1962) sugieren que la adición de un componente secundario menos soluble en agua puede disminuir el fenómeno de maduración de Ostwald. La difusión más lenta del componente secundario llevará a una distribución heterogénea con las gotas más pequeñas enriquecidas en el componente menos soluble y las gotas más grandes enriquecidas en el componente más soluble.

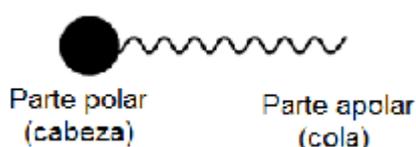
Sin embargo esta segregación interna será opuesta termodinámicamente como la presión osmótica y actuará para limitar las diferencias entre las gotas y posteriormente se alcanzará el equilibrio. Este principio ha sido aplicado exitosamente con hidrocarburos (Taylor y col., 1998) y en emulsiones con fluorocarbono (Sharma y col., 1988; Weers y col., 1994).

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

Otro factor importante en el diseño de las nanoemulsiones es la composición de la formulación, a continuación se van a detallar los principales agentes que estabilizan y forman las nanoemulsiones.

### 1.3 Agentes tensoactivos

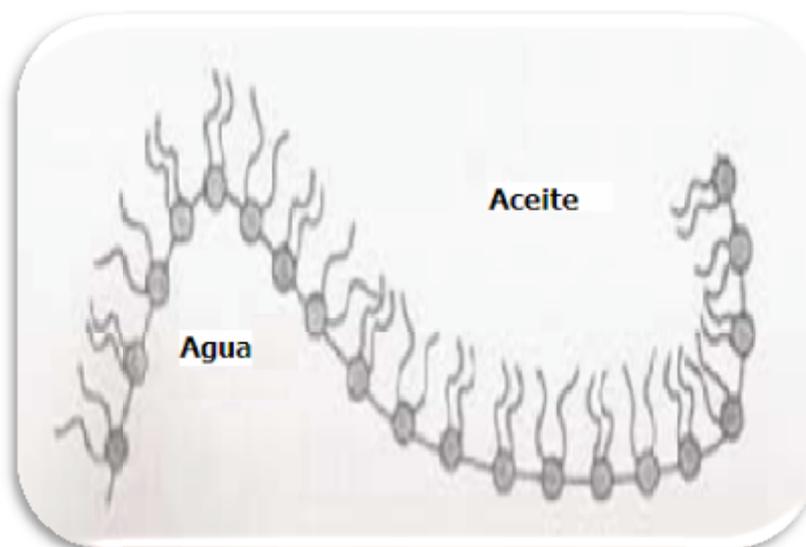
Un aspecto fundamental en la formación de nanoemulsiones es el uso de tensoactivos los cuales son moléculas con actividad superficial que se adsorben en la superficie de las gotas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que previene la agregación de las gotas y además disminuyen la tensión superficial en la interfase. La mayoría de los tensoactivos son moléculas anfifílicas, es decir contienen regiones polares y no polares en la misma molécula (Dickinson, 2003) como se muestra en las Figuras 1.6 y 1.7.



*Figura 1.6 Representación de la estructura de un tensoactivo.*

Las características deseables de un tensoactivo pueden englobarse en los siguientes puntos (Budavari y col., 1989).

- Deben reducir la tensión interfacial a alrededor de 5 dinas/cm en emulsiones preparadas con agitación (Mímica y col., 2008).
- Deben adsorberse rápidamente alrededor de las gotas dispersas como un condensado, una película no adherente que no se adelgace cuando dos gotas colisionen y no permita la floculación o coalescencia (Kobayashi y col., 2002).
- Debe tener estructura molecular específica con terminación polar para atraer al agua o terminación apolar para atraer al aceite (Schröder y Schuber 1999).
- Debe ser más soluble en la fase continua así que debe adsorberse rápidamente alrededor de las gotas de la nanoemulsión.
- Debe mostrar un adecuado potencial electrocinético (Yuan y col., 2007).
- Debe influenciar la viscosidad de la nanoemulsión (Walstra y Derker, 1996).
- Mostrar capacidad para emulsionar el sistema requerido con pequeñas concentraciones de tensoactivo (Sonneville y col., 2004).
- Debe ser relativamente económico, disponible, seguro y no tóxico (Tadros y col., 2004).



*Figura 1. 7 Representación esquemática de la película interfacial formada por el tensoactivo.*

### 1.3.1 Tipos de tensoactivos

Un factor importante en el desarrollo de nanoemulsiones, es el tipo de tensoactivo.

Existen diferentes tipos de tensoactivos que pueden ser:

- Aniónicos (sales de sodio de ácidos grasos, lauril sulfato).
- Catiónicos (contienen compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o de amonio cuaternario)
- No iónicos (monoacilgliceroles, ésteres de ácidos grasos). El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquil benceno y a veces una estructura de origen natural como un ácido graso, sobre todo cuando se requiere una baja toxicidad.

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

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

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

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

Para la elaboración de nanoemulsiones es importante mencionar que los tensoactivos deben ser capaces de formar gotas con un diámetro menor a 100nm.

Desde el punto de vista de la formación de nanoemulsiones, una característica importante de un tensoactivo es su parámetro de empaquetamiento ya que la curvatura de la interfase aceite-agua de una nanoemulsión es de la escala de tamaño del tensoactivo.

El parámetro de empaquetamiento (Israelachvill, 1994) es un concepto que define la geometría molecular de un tensoactivo en función de las tres propiedades siguientes (Figura 1.8):

- Longitud de la cadena hidrófoba,  $l_c$ .
- Volumen del grupo hidrófobo,  $V$ .
- Área de la cabeza hidrófila,  $a_o$ .

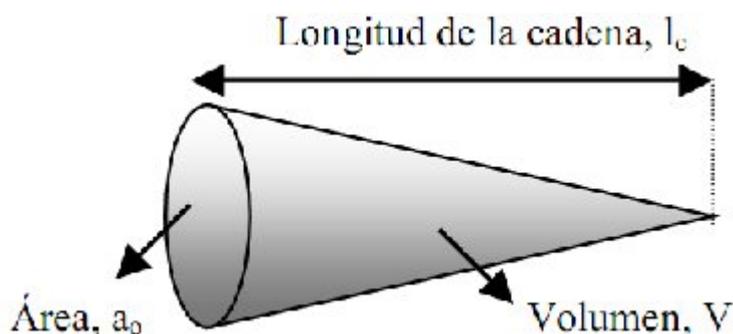


Figura 1.8. Propiedades que definen el parámetro de empaquetamiento de un tensoactivo.

El valor de  $a_o$  está regido por fuerzas hidrófilas repulsivas entre las cabezas de grupo y fuerzas hidrófobas atractivas entre la interfase hidrocarburo-agua. Los valores de  $V$  y  $l_c$  vienen determinados por la interacción estérica entre las cadenas y por la penetración del aceite en la parte hidrófoba del tensoactivo. El tipo de agregado que se forma

espontáneamente en disolución depende del valor adimensional del parámetro de empaquetamiento (Engberts y Kevelam, 1996) según la Ecuación 1.

$$\frac{V}{a_0 l_c} \dots\dots\dots (1)$$

Si la relación es menor que 1/3 se forman micelas esféricas, siendo el valor límite para estructuras cilíndricas y bicapas coplanares 1/2 y 1, respectivamente. Si el parámetro de empaquetamiento es mayor que 2 se forman estructuras inversas, cilíndricas para un valor menor que 3 y esféricas para un valor mayor. Cada una de estas estructuras corresponde al tamaño mínimo de agregado en el cual el tensoactivo alcanza un mínimo de energía libre.

El parámetro de empaquetamiento también está relacionado con el volumen de la cola hidrófoba. En general, se puede establecer que:

- Tensoactivos con cadenas lineales de hidrocarburos alifáticos y de longitudes moderadas forman preferentemente nanoemulsiones o/w. Las partes polares del tensoactivo están orientadas hacia el exterior de la micela, mientras que las cadenas hidrófobas están orientadas hacia el interior. El medio continuo es el acuoso.
- Tensoactivos con colas hidrófobas voluminosas forman nanoemulsiones bicontinuas.
- Tensoactivos con colas hidrófobas ramificadas forman nanoemulsiones w/o (Israelachvili y col., 1976). El ordenamiento de las zonas polares del tensoactivo es hacia el interior de la micela y las zonas no polares están orientadas hacia el exterior de la micela. El medio continuo es el oleoso.

A menudo se usan combinaciones de dos o más tensoactivos para las formulaciones, y la geometría del sistema será la geometría media de las especies involucradas.

### 1.3.2 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

El parámetro más característico de un tensoactivo es su HLB, que está relacionado con su capacidad emulsionante. Los tensoactivos solubles en agua favorecen la formación de emulsiones o/w, mientras que los solubles en aceite favorecen las emulsiones w/o (Bancroft, 1912). Según Griffin, el HLB es el balance del tamaño y fuerza entre la parte

hidrófila y la parte lipófila de una molécula tensoactiva (Griffin, 1949) y se basa en la composición de los grupos moleculares del tensoactivo.

Continuando con el concepto introducido por Griffin, Davies propone determinar el HLB de un tensoactivo, basándose en la asignación de un número de grupo a los grupos químicos que componen el tensoactivo como se muestra en la Ecuación 2 (Davies, 1959).

$$HLB = 7 + \text{ _número de grupo hidrofílico} + \text{ _número de grupo lipofílico} \dots \dots \dots (2)$$

Existen distintos procedimientos para medir el HLB descritos en la bibliografía (Becher, 1984), entre ellos figuran la determinación del HLB por RMN y espectroscopía de masas, calorimetría, parámetros de solubilidad, etc.

El agente tensoactivo debe estar equilibrado en cuanto a poseer la cantidad adecuada de grupos hidrosolubles y liposolubles para que se concentre en la interfase y de esta forma haga descender la tensión superficial. Por lo tanto un agente tensoactivo debe estar formado por una parte hidrofílica y otra lipofílica, equilibradas de tal modo que cuando se disperse inicialmente en la fase oleosa o en la acuosa, emigre a la interfase y se oriente con el grupo hidrofílico en el agua y el grupo lipofílico en la fase oleosa. Griffin (1949) ideó una escala arbitraria de valores que sirviesen como medida del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los agentes superficialmente activos. Así por medio de éste sistema numérico de índices HLB indicado en la Figura 1.9 es posible establecer un intervalo de la máxima eficacia para cada tipo o clase de tensoactivo, deduciéndose de esta escala que cuanto mayor es el HLB de un agente, mayor es su carácter hidrofílico; así los spans y ésteres del sorbitán, son agentes lipofílicos y, por lo tanto, tienen valores de HLB bajos (de 1.8 a 8.6), mientras que los tweens, derivados polioxietilénicos de los spans, son hidrofílicos y en consecuencia, tienen valores de HLB altos (de 9.6 a 16.7) (Kumar y Priya, 2001).

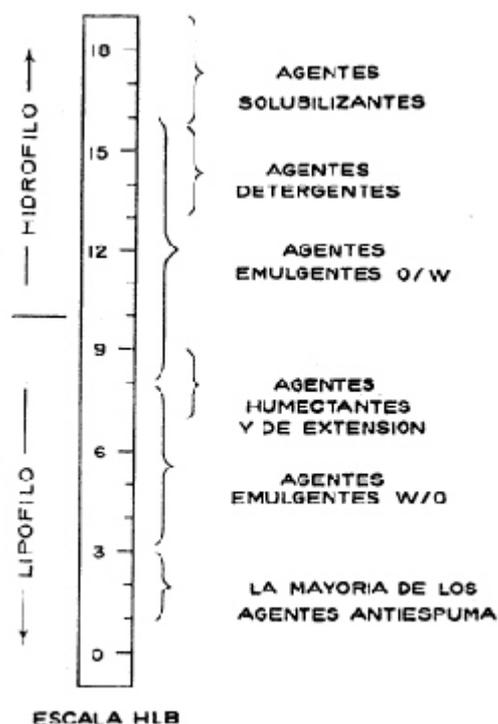


Figura 1.9 Clasificación de agentes tensoactivos de acuerdo a su HLB. Tomado de Griffin, 1949.

En la Tabla 1.4 se muestran los valores de algunos agentes emulsionantes anfifílicos.

Tabla 1.4 HLB de algunos agentes emulsionantes anfifílicos (Kumar y Priya, 2001).

SUSTANCIA	HLB
Ácido oleico	1
Monoestearato de glicerina	3.8
Monoolleato de sorbitán (span 80)	4.3
Monolaurato de sorbitán (span 20)	8.6
Gelatina (Farmagel B)	9.8
Metilcelulosa (Metocel, 15 cps)	10.5
Oleato de irietanolamina	12.0
Monoolleato de sorbitán polioxietilénico (Tween 80)	15
Monolaurato de sorbitán poli oxietilénico (Tween 20)	16.7
Oleato sódico	18

### 1.3.3 Concentración micelar crítica (CMC)

Un tensoactivo forma micelas en una solución acuosa cuando su concentración excede un nivel crítico conocido como concentración micelar crítica (CMC) (Myers, 1998; Lindman, 2001). Por debajo de la CMC, las moléculas del tensoactivo están dispersas predominando como monómeros, pero una vez que la CMC es excedida las moléculas de tensoactivo forman micelas y la concentración de monómeros permanece constante (Hiemenz y Rajagopalan, 1997). Las micelas tienen una estructura altamente dinámica porque ellas se encuentran unidas sólo por interacciones físicas que son relativamente débiles comparadas con la energía térmica del sistema. A pesar de la alta naturaleza dinámica de su estructura, las micelas del surfactante tienen un promedio bien definido de forma y tamaño bajo ciertas condiciones ambientales (Israelachvili, 1992). Así cuando el tensoactivo es adicionado a una solución por arriba de la CMC, el número, el tamaño y forma de las micelas individuales tiende a incrementar, (aunque esto podría no ocurrir a altas concentraciones del tensoactivo). Hay un cambio abrupto en las propiedades fisicoquímicas de una solución de tensoactivo cuando la CMC se excede, como son la tensión superficial, la conductividad eléctrica, la turbidez y la presión osmótica (Rosen, 1978; Jonsson y col., 1998). Esto es porque las propiedades de las moléculas dispersas como monómeros del surfactante son diferentes de aquellas en las micelas; es decir, los monómeros del tensoactivo son anfifílicos y tienen una alta actividad superficial mientras que las micelas presentan poca actividad superficial porque su superficie está cubierta con cabezas de grupos hidrofílicos. Consecuentemente, la tensión superficial de la solución decrece con el incremento de la concentración del surfactante por debajo de la CMC, pero permanece constante por arriba de ésta. La CMC de una solución de tensoactivo depende de la estructura química de su molécula tanto como de la composición de la solución y de la permanencia de las condiciones ambientales (Jonsson y col., 1998; Lindman, 2001). La CMC tiende a decrecer tanto como aumenta la hidrofobicidad de las moléculas del tensoactivo (por el incremento de la longitud de la cadena hidrocarbonada) o su hidrofobicidad decrece (por el decremento de la longitud de la cabeza con grupos no iónicos). Para tensoactivos no iónicos la CMC decrece apreciablemente con el incremento de la fuerza iónica. La CMC no es fuertemente dependiente de la temperatura (McClements, 2005).

La CMC de tensoactivos no iónicos puede ser determinada por varios métodos, incluyendo tensiometría, conductimetría, viscometría, escaneo con luz, fluorimetría, calorimetría, espectrofotometría y espectroscopía con resonancia magnética nuclear

(NMR). Los métodos más usados son tensiometría, fluorimetría y espectroscopía (Kumar y Priya, 2001).

Comúnmente, en la formación de las nanoemulsiones se adicionan otras moléculas, las cuales junto con el tensoactivo favorecen la formación de las gotas en las nanoemulsiones, generalmente, las moléculas adicionadas son alcoholes orgánicos de cadena corta o media y debido a su efecto promotor en la formación de las nanoemulsiones son llamadas cotensoactivos.

#### 1.3.4 Efecto de los cotensoactivos en la formación de las nanoemulsiones

Una baja tensión interfacial ( $\gamma_i < 10^{-3}$ ) es un prerrequisito para la formación de las nanoemulsiones. La absorción del tensoactivo en el área interfacial causa una presión bidimensional ( $\pi$ ) que disminuye la tensión interfacial de acuerdo con la ecuación  $\gamma_i = (\gamma_{o/w})_a - \pi$ , en la cual  $(\gamma_{o/w})_a$  es la tensión interfacial del aceite /agua después de que el potencial químico del tensoactivo ha sido igualado por partición en cada fase. Los resultados indican que los tensoactivos que son demasiado hidrofílicos o lipofílicos son inapropiados para la formación de las nanoemulsiones, incluso con ayuda de un co-tensoactivo. El empaque geométrico de los tensoactivos en la interfase puede ser otro factor que influye en la curvatura y fluidez de la interfase. Si las cadenas de alcohol se intercalan entre el tensoactivo una alta presión bidimensional  $\pi$  puede ser desarrollada, y la tensión interfacial disminuiría aún más ( $\gamma_i$ ) hasta tener un valor cercano a cero y se formará una nanoemulsión (Prince, 1975; Ahmad y col., 1974) como resultado de la adición de alcoholes de cadena corta como co-tensoactivos. Este tipo de co-tensoactivos también modifican el valor del HLB del tensoactivo dando como resultado un valor óptimo para la formación de las nanoemulsiones. A una concentración dada del tensoactivo, se puede lograr la eficiencia de solubilización máxima de un sistema de nanoemulsión estable mediante el ajuste de los valores óptimos de la curvatura interfacial y elasticidad a los cuales el estrés de flexión y las fuerzas de atracción en la interfase son minimizados (Leung y Shah 1987). Los alcoholes pueden actuar en la interfase para reducir la tendencia de los tensoactivos para formar películas sumamente rígidas, permitiendo así a la película interfacial tomar la diferente curvatura requerida para formar nanoemulsiones balanceadas. La efectividad de los alcoholes como co-tensoactivos está también determinada por la extensión de su distribución en la interfase. La distribución de los alcoholes entre la fase acuosa y la fase oleosa en la interfase, depende de su coeficiente de partición, los alcoholes más hidrofílicos se espera que se distribuyan principalmente

entre la fase acuosa y la capa interfacial mientras que los alcoholes hidrofóbicos se esperarían que se distribuyan primeramente entre la fase oleosa y la capa.

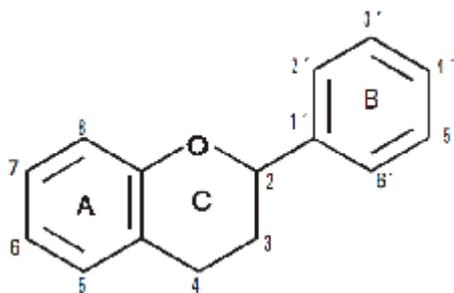
Se sabe que la cantidad de energía necesaria para la formación de las nanoemulsiones es variable. Existe un área de investigación que estudia la formación de nanoemulsiones de baja energía (Gupta y Cannon, 2000; Miller, 2006).

#### **1.4 Compuestos activos contenidos en la fase oleosa de las nanoemulsiones o/w**

Las nanoemulsiones están siendo investigadas porque se sabe que su formulación puede mejorar la efectividad del compuesto activo o fármaco de alguna manera al ser utilizadas como vehículo de liberación de compuestos activos, siendo ésta, la forma más obvia de mejorar la solubilidad del compuesto activo de baja solubilidad (Fast y Mecozzi, 2009). La principal aplicación de las nanoemulsiones de tipo o/w parece ser la encapsulación de compuestos activos poco solubles o insolubles en agua. (Gupta y Cannon, 2000; Klang y Benita, 1998). Las nanoemulsiones han sido utilizadas en la industria alimenticia como sistemas de encapsulación para la protección de ingredientes activos como antioxidantes, sabores, aromas, vitaminas, ácidos grasos y conservadores contra factores ambientales (Imafidon y Spanier, 1994; Budavari y col., 1989).

Sin embargo en los últimos años las nanoemulsiones han tenido un desarrollo activo en la industria farmacéutica y cosmética que se ve reflejado en numerosas publicaciones y patentes (Solans y col., 2005). El desarrollo de las nanoemulsiones tipo o/w, ha sido considerado como la llave del desarrollo de nuevos cosméticos y productos farmacéuticos insolubles en agua, debido a que son sistemas translúcidos, y esto se ve relacionado con frescura y pureza, se han adicionado a una gran variedad de productos como cosméticos, fragancias, cremas, etc., (Budavari y col., 1989; Mímica y col., 2008; Kobayashi y col., 2002 y Schröder y Schuber 1999). Los ingredientes activos encapsulados pueden ser liberados a través de la membrana permeable de la nanoemulsión, y fácilmente absorbidos a través de la piel.

Por otro lado, se sabe que los flavonoides poco solubles en agua son unos de los principales compuestos presentes en la naturaleza que presentan grandes beneficios a la salud, sin embargo, debido a su estructura de difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ) polihidroxilada que poseen son altamente reactivos con otras especies químicas presentes en el medio que pueden desestabilizarlos, haciéndolos susceptibles a oxidación (Figura 1.10).



*Figura 1.10 Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.*

Para evitar su inestabilidad, hay que proteger la base polihidroxilada (difencilpropano) contra factores ambientales formando una barrera física (Yuan y col., 2007; Walstra y Sonnevile y col., 2004; Tadros y col., 2004; Hyuncheol y col., 2004 y Álvarez y col., 2005) la cual es proporcionada por la capa interfacial formada por los tensoactivos en las nanoemulsiones.

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

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. También se ha reportado su uso para la prevención del cáncer, la artritis y retardan los efectos de la edad.

Existen 13 subclases de flavonoides: Chalconas, dihidrochalconas auronas, flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavanonas, flavanol, flavandioles o leucoantocianidinas, antocianidina, isoflavonoides, biflavonoides y protoantocianidinas

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

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

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

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

### **1.5.1 Antioxidantes presentes en *Equisetum arvense***

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

### **1.5.2 Características de los antioxidantes**

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

Los antioxidantes son sustancias que en bajas cantidades, actúan previniendo o retardando la oxidación de materiales fácilmente oxidables tales como las grasas debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno (González y col., 2001).

### **1.5.3 Actividad antioxidante**

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

radiación, luz solar, tabaco, ozono, drogas, contaminantes y aditivos en alimentos (González y col., 2001).

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

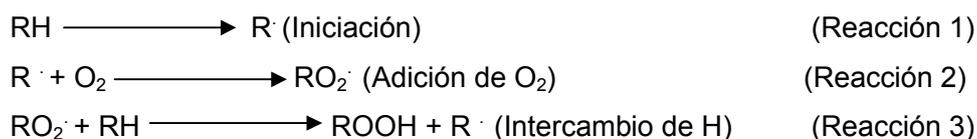
1. Sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL).
2. Sobre los glúcidos, actúan alterando las funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleucinas y la formación en prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.
3. Sobre las proteínas produciendo inactividad y desnaturalización.
4. Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis.

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

#### 1.5.4 Mecanismo de acción de los antioxidantes

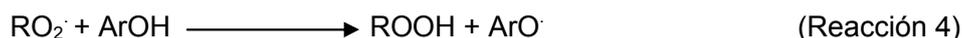
Para comprender la forma en la que actúa un antioxidante frente a un radical libre es necesario conocer los dos tipos de mecanismo por los que puede actuar, a continuación, estos mecanismos se ejemplifican para antioxidantes fenólicos (en donde el término ArOH se refiere a un compuesto que contiene al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

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



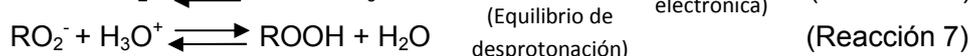
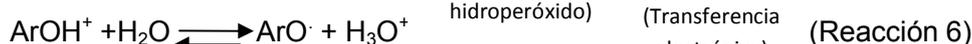
Una vez que se genera el radical  $R\cdot$ , las reacciones 2 y 3 forman una reacción en cadena que da origen a la formación de hidroperóxido lipídico (ROOH), dando lugar a la oxidación y rancidez de las grasas. La reacción 2 es mucho más rápida ( $10^9 M^{-1} S^{-1}$ ) que la 3 ( $10^1 M^{-1} S^{-1}$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

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



Para que  $ArO\cdot$  sea efectivo, debe ser estable y reaccionar lentamente con el sustrato pero rápidamente con  $RO_2\cdot$ . Es importante que la energía necesaria para arrancar ese átomo de hidrógeno sea mínima para que se transfiera fácilmente hacia el radical libre.

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



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

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

## 1.6 Extracción con fluido supercrítico

Debido a que los compuestos activos presentes en las plantas se encuentran generalmente en bajas concentraciones, en los últimos años se ha hecho una gran cantidad de investigaciones para desarrollar métodos de extracción más eficaces y selectivos para la obtención de estos compuestos que se encuentran en la matriz de las plantas. En los métodos de extracción convencionales como la hidrodestilación (destilación con vapor) y la extracción con solventes, hay pocos parámetros que pueden ajustarse para lograr la selectividad en los procesos de extracción. Por lo tanto, es deseable el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan una mayor selectividad y eficiencia de extracción. Por consiguiente, la extracción con fluido supercrítico es una técnica de extracción ambientalmente responsable y eficaz para materiales sólidos y ha

sido extensamente estudiada en la extracción de compuestos activos presentes en plantas (Modey y col., 1996).

El alto poder de solvatación de los fluidos supercríticos (FS) fue reportado por primera vez hace un siglo (Hannay y Hogarth., 1996). Actualmente, la EFS es una técnica de extracción aceptada y usada en muchas áreas. La extracción de compuestos activos extraídos de plantas con EFS es una de las áreas de aplicación más importantes.

### 1.6.1 Principales ventajas de la técnica de EFS

La EFS es una técnica de extracción alternativa prometedora debido a que tiene varias propiedades distintivas en comparación con los métodos de extracción convencionales. A continuación se resumen algunas de las principales ventajas:

1.- La EFS tiene una relativa baja viscosidad y alta difusividad (la difusividad para FS es  $\sim 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  y para solventes líquidos es  $\sim 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Por lo tanto, el FS puede penetrar dentro de los materiales sólidos porosos más eficientemente que los solventes líquidos y consecuentemente, la transferencia de masa se lleva a cabo mucho más rápido dando como consecuencia una extracción en menor tiempo. Por ejemplo, con la misma ó incluso mayor cantidad de compuestos activo extraído, el tiempo de extracción puede reducirse de horas o días con extracción sólido-líquido (S-L) a tan sólo unas decenas de minutos con EFS (Wheeler y McNally 1989; Marsili y col., 1993; Henning y col., 1994; Bruhl y col., 1999).

2.- En EFS, un fluido fresco es continuamente forzado a pasar a través de la muestra, por lo tanto esto puede proporcionar una extracción completa (Stashenko y col., 1996). El poder de solvatación del fluido puede ser manipulado por cambios de presión (P) y/o temperatura (T); dando como resultado una alta selectividad en la extracción.

3.- El poder de solvatación de los FS es particularmente usado para la extracción de muestras complejas tales como materiales de plantas (Reverchon y col., 1993). Un buen ejemplo es la extracción selectiva de la vindolina, uno de los más de 100 compuestos alcaloides presentes en las hojas de *Catharanthus roseus* (Song y col., 1992).

4.- Los solutos disueltos en el  $\text{CO}_2$  supercrítico pueden ser fácilmente separados por despresurización. Por lo tanto, en la EFS se puede eliminar el proceso de concentración

de la muestra, el cual usualmente lleva mayor tiempo y a menudo resulta en una pérdida de compuestos volátiles (Henning y col., 1994).

5.- La EFS generalmente opera a bajas temperaturas, por lo que puede ser una técnica ideal para el estudio de compuestos termolábiles (Polesello y col., 1993; Pan y col., 1995; Dron y col., 1997) y puede conducir al descubrimiento de nuevos compuestos naturales (Fuh y col., 1995). Por ejemplo, cuando la EFS fue usada para extraer jengibre, se previnieron muchas reacciones indeseables como hidrólisis, oxidación, degradación y rearreglos. Así, las dificultades comunes para la determinación de calidad presentes en la extracción convencional, se podrían evitar con la EFS (Bartley y Foley 1994).

6.- En la EFS sólo se necesitan alrededor de 0.5-1.5 gramos de muestra a diferencia de los 20-100 gramos necesario en la extracción S-L por ejemplo (Bruhl y col., 1999; Hawthorne y col., 1993; Vilegas y col., 1993). Se ha reportado que de sólo 1.5 gramos de muestra de planta fresca, pueden ser extraídos más de 100 compuestos volátiles y semivolátiles y detectados por cromatografía de gases (CG) espectroscopia de masas (MS), de los cuales 80 estuvieron en cantidad suficiente para cuantificarlos (Henning y col., 1994).

7.- La EFS no usa solventes orgánicos ó usa solventes significativamente menos hostiles al ambiente como el etanol. La EFS puede no necesitar ó sólo necesitar unos pocos mililitros de un solvente orgánico mientras que una extracción típica S-L podría requerir decenas o cientos de mililitros (Wheeler y McNally 1989; Otterbach y col., 1999).

8.- La EFS puede permitir un acoplamiento directo con un método cromatográfico, lo cual puede ser de utilidad para extraer y cuantificar directamente compuestos altamente volátiles (Huston y col., 1991; Nielsen, 1991; Smith y Burford 1992; Modey y col., 1996). En los procesos de EFS a gran escala, el fluido supercrítico, usualmente CO<sub>2</sub>, puede ser reciclado o reusado para minimizar la contaminación (Zosel y col., 1969). La EFS puede ser aplicada a sistemas de diferentes escalas, por ejemplo, escala analítica (de menos de un gramo a unos gramos de muestra), escala preparativa (varios cientos de gramos de muestra) (Fuh y col., 1995), escala planta piloto (kilogramos de muestra) (Reverchon y col., 1993) y escala industrial (toneladas de material, como la EFS de granos de café) (Lang y col., 2001).

Además de las ventajas mencionadas arriba, otra ventaja que distingue la EFS de los métodos de extracción convencionales es que puede proporcionar más información relativa a los procesos y mecanismos de extracción, dicha información puede ser usada para evaluar cuantitativamente o evaluar la eficiencia de extracción y en consecuencia optimizar el proceso.

### 1.6.2 Fluidos y modificadores

De todos los gases y líquidos estudiados, el CO<sub>2</sub> sigue siendo el fluido más comúnmente usado para la aplicación de la EFS debido a sus propiedades: bajas constantes críticas ( $T_c = 31.1\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $P_c = 72.8\text{ atm}$ ) no es tóxico ni flamable, y su disponibilidad en alta pureza tiene un bajo costo. El CO<sub>2</sub> supercrítico tiene propiedades que lo hacen un buen solvente para la extracción de compuestos no-polares tales como los hidrocarburos, sin embargo también puede disolver compuestos moderadamente polares como alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas. Para la extracción de compuestos polares, deben ser considerados materiales polares. Dos materiales que han sido utilizados exitosamente para la EFS de compuestos polares de muestras de plantas son el Freon-22 (clorodifluorometano) (Li y col., 1990; Klink y col., 1994) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) (Vandana y col., 1996).

La aplicación de modificadores es la forma más simple y efectiva para obtener la polaridad del CO<sub>2</sub> deseada. Mediante la selección de un modificador o simplemente cambiando la relación molar de un modificador, se pueden manipular fácilmente las propiedades de los fluidos. Usualmente la adición de una pequeña cantidad de un líquido modificador puede aumentar significativamente la eficiencia de extracción y consecuentemente reducir el tiempo de extracción. Por ejemplo para extraer aceites esenciales de plantas aromáticas, la adición de sólo 0.5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 500 mg de muestra en un vial de 2.5 mL de un vial de EFS puede reducir el tiempo de extracción de 90 a 30 min, y la eficiencia de extracción es consistente con la obtenida en 4 horas por hidrodestilación (Hawthorne y col., 1993).

Al menos 17 modificadores han sido estudiados en EFS de productos naturales (Henning y col., 1994). De estos modificadores, el metanol es el más comúnmente usado debido a que es un modificador polar eficiente y a su alta miscibilidad (arriba del 20%) en CO<sub>2</sub>. Se cree que un alto porcentaje de etanol podría romper los enlaces entre el soluto y la matriz de la planta. El etanol aunque no es tan polar como el metanol, puede ser una mejor opción en la EFS de productos naturales debido a su baja toxicidad. Varios autores reportan

exitosamente el uso de etanol como modificador en EFS en una variedad de compuestos orgánicos de plantas (Vandana y col.,1996; Wheeler y McNally, 1989; Chun y col.,1994; López-Ávila y Benedicto 1997). Un hallazgo interesante fue que el etanol resultó ser un modificador muy efectivo en la EFS de linuroon, mientras que el metanol fue mejor en la EFS de diuron de materiales de plantas (Wheeler y McNally 1989).

Dependiendo de las propiedades de las muestras y de los compuestos deseados, el mejor modificador, usualmente puede ser determinado basado en resultados de experimentos preliminares.

# **CAPÍTULO 2**

## **OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo General

Extraer y proteger de su degradación el extracto hidrofóbico de *Equisetum arvense* mediante su encapsulación en nanoemulsiones o/w estructuradas con una mezcla de tensoactivo-cotensoactivo y encontrar las concentraciones adecuadas de cada uno de los componentes de la nanoemulsión para lograr la máxima encapsulación, usando el método de superficies de respuesta.

## 2.2 Objetivos Particulares

- Establecer los parámetros de extracción de los compuestos activos de *Equisetum arvense* por el método de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.
- Determinar la zona de formación de las nanoemulsiones mediante el uso de diagramas pseudo-ternarios.
- Encontrar la formulación óptima a la cual se logra encapsular la mayor cantidad de extracto de *Equisetum arvense* usando el método de superficies de respuesta.
- Evaluar la protección en el tiempo del Extracto de *Equisetum arvense* encapsulado en las nanoemulsiones.

# **CAPÍTULO 3**

## **HIPÓTESIS**

La protección de los flavonoides con baja polaridad presentes en extractos de *Equisetum arvense* contra factores ambientales degradativos se puede maximizar diseñando membranas interfaciales adecuadas en sistemas dispersos de escala nanométrica mediante el uso de mezclas de tensoactivo/co-tensoactivo.

# **CAPÍTULO 4**

## **Justificación**

Actualmente existe una demanda de alimentos funcionales, es decir, alimentos que son elaborados no sólo por sus características nutricionales sino también con la finalidad de cumplir una función específica, como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades, en este tipo de alimentos se pueden adicionar diversos compuestos activos como vitaminas, minerales, ácidos grasos, flavonoides etc. Los flavonoides son compuestos que presentan actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antioxidante principalmente, el organismo humano no puede producirlos por lo que es necesario obtenerlos de la dieta, los flavonoides se encuentran en las plantas, para extraerlos generalmente se usan solventes orgánicos, limitando así su uso en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria debido a las trazas de solventes que quedan en el extracto. Desde hace algunos años se ha comenzado a utilizar la extracción con fluido supercrítico, éste es un método considerado limpio, debido a que no usa solventes orgánicos, por lo que puede utilizarse en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, se ha reportado que la eficiencia de extracción es mejor comparada con la extracción por solventes, y opera a temperaturas alrededor de la temperatura ambiente, por lo que es un método apropiado para extraer compuestos termolábiles como es el caso de los flavonoides. Sin embargo existe un inconveniente en el uso de los flavonoides, ya que una vez que son extraídos, son susceptibles a factores ambientales como luz, pH, temperatura y oxígeno, sufriendo una degradación de sus componentes provocando la pérdida de sus propiedades funcionales en un lapso de tiempo relativamente corto, por lo que surge la necesidad de protegerlos de su degradación, Para ello se ha pensado en el uso de nanoemulsiones como método de protección de los flavonoides, mediante la barrera formada por la membrana interfacial compuesta por una mezcla de tensoactivos presentes en la nanoemulsion.

El uso de nanoemulsiones tiene grandes ventajas en comparación con las emulsiones, ya que debido al pequeño tamaño de gota que poseen pueden absorberse a través de la piel entrando directamente al torrente sanguíneo, ampliando así las opciones de aplicación. La energía necesaria para formar las nanoemulsiones es menor que la requerida para formar emulsiones. Y otro punto muy importante es que las nanoemulsiones presentan estabilidad cinética lo que les da una vida útil prolongada a diferencia de las emulsiones que son sistemas altamente inestables.

# **CAPÍTULO 5**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5.1 Estrategia Experimental

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

1.- Se comenzó con la extracción de los compuestos activos de *Equisetum arvense*, mediante el método de Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico.

2.- Una vez obtenido el extracto, se elaboraron los diagramas de fase pseudoternarios para determinar las zonas de formación de las nanoemulsiones usando diferentes concentraciones de fase oleosa y de la relación tensoactivo:co-tensoactivo y se utilizó la metodología de superficies de respuesta para encontrar la formulación óptima.

3.- Por último se evaluó la estabilidad de las nanoemulsiones en el tiempo mediante los cambios en el tamaño de gota y también se evaluó la protección de los compuestos activos presentes en las nanoemulsiones, mediante su capacidad antioxidante (Figura 5.1).

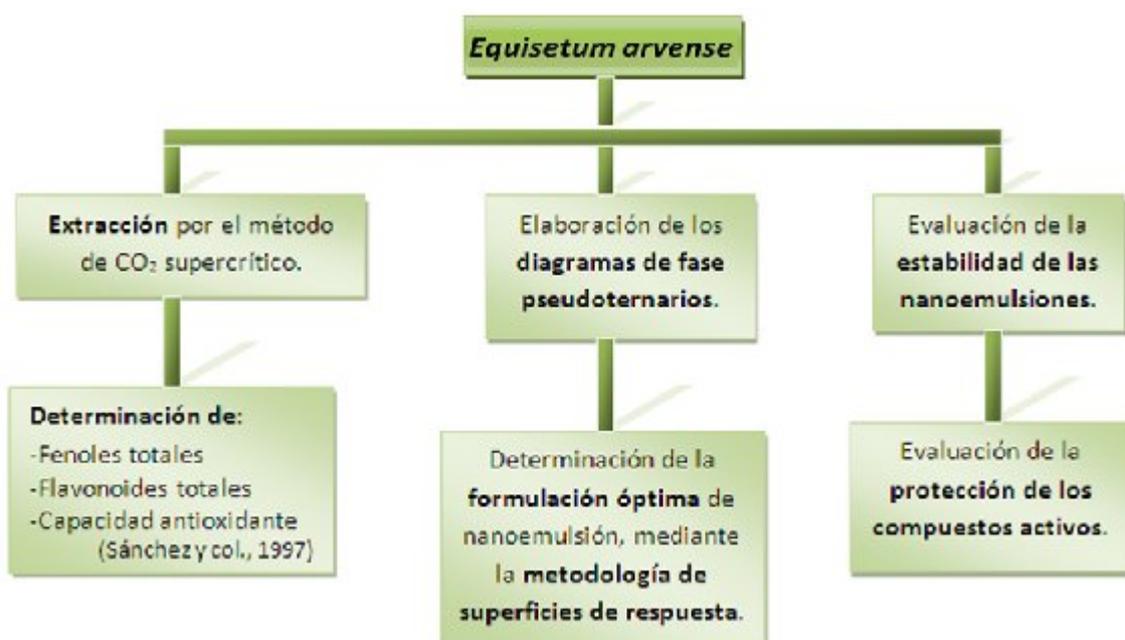


Figura 5.1 Estrategia experimental

## 5.2 Materiales

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) grado fluido supercrítico fue obtenido de INFRA, S.A de C.V. México. El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>·</sup>), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromato-2-carboxílico (TROLOX), quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrin) y kaempferol 3-O-glicósido fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Química, S.A de C.V. Toluca, Estado de México. Los solventes usados fueron etanol (EtOH), metanol (MetOH), n-hexano y ácido fosfórico (AF) grado HPLC obtenidos de J.T. Baker, México. El carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) se obtuvo de Tecsiqum, S.A de C.V. México. El aceite esencial de naranja (AEN) fue obtenido de Saframex, S.A. de C.V. México, el monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tween 20) se obtuvo de Canamex Químicos, S.A de C.V. México. Se usó agua destilada en todos los experimentos.

## 5.3 Material vegetal

La parte seca aérea de *Equisetum Arvense* (EA) fue obtenida del mercado de Sonora, ubicado en la Ciudad de México.

## 5.4 Métodos

### 5.4.1 Extracción de los flavonoides presentes en *Equisetum arvense* por el método de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (ECO<sub>2</sub>SC)

La parte aérea seca de *Equisetum arvense* fue molida con un molino (Macinino Legno, Sambonet Paderno Industrie S.P.A., Ortango, Italia) y tamizado con una malla No. 30 (0.54 mm). Se tomaron 10 g del material en polvo y se colocaron en el vial del extractor de CO<sub>2</sub> supercrítico (Modelo SFT-100 SFE, Scientific System., Inc., State College, PA, USA). La extracción se llevó a cabo mediante las siguientes condiciones: se utilizó CO<sub>2</sub> como gas acarreador a una velocidad de flujo de 2 mL/min, a 150 bar de presión y 40 °C, como co-solvente se utilizó EtOH el cual se evaluó a diferentes velocidades de flujo (0, 0.1, 0.2 y 0.3 mL/min). El proceso de extracción se llevó a cabo por dos horas con un periodo previo estático de 20 min. Del extracto de *Equisetum arvense* (EEA) obtenido se almacenó la mitad en un contenedor ámbar a 4 °C y la otra mitad a 25 °C.

#### 5.4.2 Caracterización de EEA por HPLC

La identificación y cuantificación de los flavonoides presentes en el extracto fresco de EA se llevó a cabo usando el método modificado reportado por Mímica-Dukic y col. (2008). El extracto fresco de EA fue filtrado con una membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (Econofilters Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). 20  $\mu\text{L}$  de muestra fueron inyectados en el HPLC (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) equipado con una bomba cuaternaria y un detector de arreglo de diodos-UV. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Temperatura del termostato 20  $^{\circ}\text{C}$ , con una columna Zorbax (SB-C18 4.6 X 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Se utilizaron dos solventes como gradiente de elución: (A) 0.15% ácido fosfórico en agua: MetOH (77:23) (pH = 2) y (B) MetOH. El perfil de elución fue: Isocrático: 0-36 min 100 %; gradiente: 3.6 min. 100 % A – lineal - 24 min. 80.5 % A – isocrático – 30 min – lineal -60 min. 51.8 % A – lineal – 67.2 min. 100 % B. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min. La detección de los dos principales flavonoides se llevó a cabo usando una longitud de onda de 330nm. La cuantificación de los flavonoides se realizó usando un estándar externo y se reportó como  $\text{mg/g}_{\text{base seca (BS)}}$ .

#### 5.4.3 Determinación del contenido de fenoles totales.

Al extracto obtenido se le determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu de la siguiente manera: 0.02 mL de muestra fue llevada a un volumen de 1.6 mL con agua destilada, a la cual se le agregaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin, dejando reposar durante 8 min, posteriormente se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%, dejando reposar durante 30 min a 40 $^{\circ}\text{C}$  y finalmente se midió la absorbancia a 765 nm. Se realizó una curva patrón empleando ácido gálico. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos en la extracción con solventes y se reportaron como mg equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg}_{\text{EAG}}$ ). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Roginsky y Lissi, 2005).

#### 5.4.4 Determinación del contenido de flavonoides totales.

Al extracto obtenido también se le determinó el contenido de flavonoides totales. Se tomó 1 mL del extracto y se le agregaron 0.5 mL de una solución de cloruro de aluminio al 5 % (p/v) posteriormente se llevó a 25 mL con metanol, se homogeneizó y se dejó reposar por 30 min en la obscuridad, finalmente se midió la absorbancia a 425 nm. Se realizó una curva patrón empleando quercetina. Los resultados obtenidos se compararon con los

obtenidos en la extracción con solventes. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Lamaison y Carnat, 1990).

#### **5.4.5 Actividad Antioxidante del EEA**

La actividad antioxidante fue determinada por el método de DPPH, de acuerdo con el procedimiento descrito por Sánchez-Moreno y col. (1998). Se preparó diariamente una solución del radical DPPH $\cdot$  (0.025 g/L) en MetOH. Se tomaron 3.9 mL de la solución de DPPH $\cdot$ , se mezclaron con 0.1 mL del EEA, esta mezcla se agitó vigorosamente y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min. Se preparó una muestra blanco conteniendo la misma cantidad de la solución de DPPH $\cdot$  pero sin EEA. La actividad antioxidante fue evaluada a través de la disminución de los valores de absorbancia a 515 nm, usando una curva de calibración con TROLOX (0.5-12 mM). Los datos fueron reportados como equivalentes de TROLOX (TEAC mM). Con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos de degradación del EEA en el tiempo, los datos de inhibición del radical DPPH $\cdot$ , la pérdida de actividad antioxidante (k) y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) fueron ajustados a un modelo matemático.

#### **5.4.6 Preparación de las nanoemulsiones conteniendo EEA**

Las nanoemulsiones estuvieron compuestas por una mezcla de EEA:AEN en una relación 4:1 como fase oleosa (FO), mientras que la fase acuosa (FA) estaba compuesta por agua destilada y por diferentes mezclas de Tween 20 (0.3-24 %) y EtOH (0.3-16 %) (TEmix), donde el Tween 20 y el EtOH actuaron como tensoactivo y co-tensoactivo respectivamente (Tabla 5.1). Se agregó en un contenedor la fase acuosa con el tensoactivo y co-tensoactivo y la fase oleosa se adicionó poco a poco mientras todo el sistema se sometía a homogenización con un Ultra-Turrax (Modelo T10 basic, IKA<sup>®</sup>)-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, USA) a 8000 rpm durante 3 min. La emulsión obtenida se sometió a sonicación a 70% de amplitud con una frecuencia de 20 kHz por 10 min usando un Sonic Vibra Cell (Model VCX 130PB, Newtown, CT, USA) con un homogeneizador de 6 mm de diámetro en la punta. El proceso de sonicación se llevó a cabo tres veces con un tiempo de reposo de 2 min entre cada proceso. Las nanoemulsiones obtenidas fueron almacenadas, a 4°C y 25°C por 12 semanas. Durante el proceso de elaboración de las nanoemulsiones la temperatura no se elevó más de 20°C.

### 5.4.7 Tamaño de las gotas de las nanoemulsiones

La distribución del tamaño de las gotas de las nanoemulsiones conteniendo EEA fue determinada por dispersión de luz dinámica usando un Zetasizer (Modelo Nano-ZS2000 Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, U.K.). Usando un índice de refracción de 1.334.

### 5.4.8 Diagramas de fase pseudoternarios

En cada diagrama de fases, la FO y cada uno de los TEMix (1:0, 1:0.2, 1:0.3 y 1:0.4) fueron mezclados en proporciones desde 1:2 hasta 2:1 y la fase oleosa se varió de 3 a 20 % másico como se muestra en la Tabla 5.1. Se diseñaron 25 formulaciones ( $F_i$ , donde el sufijo  $i$ , representa el número de cada formulación) las formulaciones se diseñaron de manera que permitieran delinear con precisión los límites en donde se logra la formación de las nanoemulsiones en los diagramas de fase.

*Tabla 5.1 Composición de las formulaciones de nanoemulsión*

Formulación	FO (% w/w)	FO/TEMix	Agua (% w/w)
F1	3	1.0:2.0	91.0
F2	3	1.0:1.5	92.5
F3	3	1.0:1.0	94.0
F4	3	1.5:1.0	95.0
F5	3	2.0:1.0	95.5
F6	5	1.0:2.0	85.0
F7	5	1.0:1.5	87.5
F8	5	1.0:1.0	90.0
F9	5	1.5:1.0	91.6
F10	5	2.0:1.0	92.5
F11	10	1.0:2.0	70.0
F12	10	1.0:1.5	75.0
F13	10	1.0:1.0	80.0
F14	10	1.5:1.0	83.3
F15	10	2.0:1.0	85.0
F16	15	1.0:2.0	55.0
F17	15	1.0:1.5	62.5
F18	15	1.0:1.0	70.0
F19	15	1.5:1.0	75.0
F20	15	2.0:1.0	77.5
F21	20	1.0:2.0	40.0
F22	20	1.0:1.5	50.0
F23	20	1.0:1.0	60.0
F24	20	1.5:1.0	66.6
F25	20	2.0:1.0	70.0

Estas formulaciones fueron hechas para cada TEMix (1:0, 1:0.2, 1:0.3 y 1:0.4)

Las formulaciones se llevaron a cabo mediante el proceso descrito en la sección 5.4.6 y el tamaño de gota de las  $F_i$  se midió con el procedimiento descrito en la sección 5.4.7. La ubicación de las nanoemulsiones se marcó en el diagrama de fases pseudoternario de tres componentes donde la FO, FA y TEMix, representan cada uno de los ejes respectivamente, expresados en porcentajes másicos.

En cada diagrama de fases construido, sólo se tomaron en cuenta las  $F_i$  que fueron visiblemente translúcidas y que presentaron un tamaño de gota menor o igual a 100 nm.

#### 5.4.9 Diseño experimental

Se usó la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) para estudiar el efecto de las variables independientes: concentración de FO ( $C_1$ ), y concentración de FO/TEMix ( $C_2$ ), sobre el tamaño de gota ( $Y_1$ ) de las nanoemulsiones  $F_i$ , ahora llamadas nanoemulsiones  $F_{MSR,i}$  usando una proporción de tensoactivo:co-tensoactivo 1:0.3. Los experimentos fueron diseñados de acuerdo al diseño central compuesto (DCC) usando un diseño factorial  $3^2$  con tres puntos centrales como se muestra en la Tabla 5.2. Los experimentos individuales se llevaron a cabo en orden aleatorio. Se utilizó una ecuación polinomial de segundo orden para expresar el tamaño de gota ( $Y_1$ ) de las nanoemulsiones como una función de las variables independientes (Ecuación 3):

$$Y = b_0 + b_1 C_1 + b_2 C_2 + b_{11} C_1^2 + b_{12} C_1 C_2 + \varepsilon \dots\dots\dots(3)$$

Donde:

$Y$  representa la variable de respuesta,

$b_0$  es una constante,

$b_i$  y  $b_{ij}$  son los coeficientes lineal y de interacción respectivamente

$\varepsilon$  es el error experimental

$C_1$  y  $C_2$  son las dos variables independientes estudiadas.

Los coeficientes de la ecuación de la superficie de respuesta fueron determinados usando el software Statgraphics versión Centurion XV.II (Statpoint, Inc., Warrenton, VA, USA).

*Tabla 5.2 Diseño central del compuesto para las nanocmulsiones  $F_{MSR,i}$*

Formulación	FO (% p/p)	FO/TEmix
$F_{MSR,1}$	15	2.0:1.0
$F_{MSR,2}$	10	1.0:1.5
$F_{MSR,3}$	15	1.0:1.5
$F_{MSR,4}$	15	1.0:1.0
$F_{MSR,5}$	20	1.0:1.0
$F_{MSR,6}$	15	1.0:1.5
$F_{MSR,7}$	15	1.0:1.5
$F_{MSR,8}$	15	1.0:1.5
$F_{MSR,9}$	20	1.0:1.5
$F_{MSR,10}$	20	2.0:1.0
$F_{MSR,11}$	10	2.0:1.0
$F_{MSR,12}$	10	1.0:1.0

#### 5.4.10 Eficiencia de Encapsulación

Se tomó una alícuota del extracto fresco de EA y se hizo un barrido de 400 a 700 nm en un Spectrofotómetro Spectronic Genesys 2 (Spectronic Instruments, Madison, WI, USA), la máxima absorbancia fue encontrada a  $\lambda_{m\acute{a}x} = 440$  nm.

La concentración del EEA atrapado en las nanoemulsiones se determinó de acuerdo al método modificado de Ax y col., (2003) donde 1 mL de la nanoemulsión  $F_{MSR,i}$  se adicionó a 5 mL de EtOH:hexano (1:1.5). La mezcla fue agitada durante 2 min y transferida a un embudo de separación donde se dejó reposar por 1 hora. La fase de hexano fue removida y se adicionaron nuevamente 5 mL de EtOH:Hexano en la fase de EtOH remanente y se repitió el mismo procedimiento una vez más. Se juntaron todas las fases de hexano y se midió la absorbancia a 440nm. La concentración del EEA presente en el hexano se midió usando una curva estándar del EEA sin encapsular. La eficiencia de encapsulación se determinó mediante la Ecuación 4:

$$EE\% = \frac{EEA_{FO}}{EEA_{nanocmulsión}} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

Donde:

EE % es la eficiencia de encapsulación

$EEA_{FO}$  es el EEA presente en la fase oleosa y

$EEA_{\text{nanoemulsión}}$  es el contenido del EEA inicial adicionado en la nanoemulsión  $F_{\text{MSR},i}$ .

#### **5.4.11 Estabilidad de las nanoemulsiones**

La estabilidad de las nanoemulsiones  $F_{\text{MSR},i}$  se evaluó mediante el cambio de tamaño de gota de acuerdo al método descrito anteriormente (en la sección 5.4.7) las mediciones se hicieron cada semana durante 3 meses en las nanoemulsiones almacenadas a 4 °C y 25 °C.

#### **5.4.12 Efecto protector de las nanoemulsiones contra la degradación del EEA.**

La evaluación de la protección del EEA se llevó a cabo mediante el monitoreo de los cambios en la actividad antioxidante por el método de DPPH· Para poder evaluar dicha actividad se utilizó el procedimiento descrito en la sección 5.4.10 para separar las fases de la nanoemulsión. Las mediciones se hicieron cada semana durante el almacenamiento a 4 °C y 25 °C por 12 semanas.

#### **5.4.13 Análisis estadístico**

Los resultados fueron presentados como el promedio de tres triplicados y fueron analizados con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) usando el software SigmaPlot 11.0 (Washington D.C., USA). Para analizar las diferencias entre las medias, se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

# **CAPÍTULO 6**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De las cuatro velocidades de flujo para el cosolvente que fueron utilizadas se encontró que al incrementar la velocidad, el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos también se incrementaba; sin embargo este comportamiento no se presentó a velocidades de flujo mayores a 0.2 mL/min, donde la diferencia de concentraciones no presentó diferencia significativa, por lo que el proceso de extracción para los siguientes experimentos se llevó a cabo utilizando una velocidad de flujo de 0.2mL/min.

En la tabla 6.1 se observan los rendimientos de fenoles totales y flavonoides obtenidos a las distintas condiciones de extracción.

*Tabla 6.1 Cuantificación de fenoles y flavonoides totales a diferentes velocidades de flujo del co-solvente.*

<b>150 bares y 40 °C</b>		
<b>Velocidad de flujo del Co-solvente (mL/min)</b>	<b>Fenoles Tot. (mg<sub>EAG</sub>/mL)</b>	<b>Flavonoides Tot. (mg<sub>EQ</sub>/mL)</b>
0	0.22 ± 0.04 <sub>a</sub>	0.15 ± 0.03 <sub>a</sub>
0.1	0.47 ± 0.05 <sub>b</sub>	0.29 ± 0.06 <sub>b</sub>
0.2	0.87 ± 0.03 <sub>c</sub>	0.75 ± 0.02 <sub>c</sub>
0.3	0.86 ± 0.06 <sub>c</sub>	0.73 ± 0.10 <sub>c</sub>

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia significativa ( $p \leq 0.5$ ).

EAG: Equivalentes de ac. Gálico

EQ: Equivalentes de quercetina

El contenido de fenoles y flavonoides totales encontrados en el EEA se comparó con los encontrados en el EEA obtenido por métodos convencionales mediante el uso de solventes orgánicos (Hernández-Jaimes 2009) (Tabla 6.2)

Tabla 6.2 Comparación del contenido de fenoles y flavonoides totales en el EEA

Extracción	Concentración de Fenoles Totales (mg <sub>EAG</sub> /mL)	Concentración de Flavonoides Totales (mg <sub>EQ</sub> /mL)
CO <sub>2</sub> supercrítico	0.87 ± 0.3a	0.76 ± 0.02a
Solventes orgánicos	0.81 ± 0.02b	0.70 ± 0.03b

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencia significativa ( $p \leq 0.5$ ).

EAG: Equivalentes de ac. Gálico

EQ: Equivalentes de quercetina

Se obtuvo una mayor extracción tanto de fenoles totales como de flavonoides mediante el método de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que éste es un método adecuado para la extracción de estos compuestos debido a que permite obtener rendimientos de extracción más altos en comparación con el método de extracción con solventes en un tiempo significativamente menor, cabe mencionar que la extracción con solventes se realizó en aproximadamente 5 días en comparación con el método por extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico el cual se llevó a cabo en 2 horas.

### 6.1 Caracterización del EEA por HPLC

Los flavonoides glucósidos (quercetina 3-O-glucósido y kaempferol 3-O-glicósido) presentes en el EEA fueron identificados por HPLC (Figura 6.1). Estos compuestos fueron previamente descritos como los principales constituyentes en *Equisetum arvense* (Veit y col., 1995; Veit y col., 1990). El principal compuesto fue quercitina 3-O- glicósido (385 mg/g<sub>BS</sub>) detectado a un tiempo de 30.04 min mientras que el kaempferol 3-O-glicósido también fue detectado en una cantidad considerable (31.5 mg/g<sub>BS</sub>) a un tiempo de 31.69 min. Estos resultados confirman los resultados reportados por Mímica-Dukic y col., 2008 quienes reportaron 382 mg/g<sub>BS</sub> para quercetina 3-O-glucósido y 26.20 mg/g<sub>BS</sub> para kaempferol a unos tiempos de 30.039 y 31.7 min respectivamente en EEA.

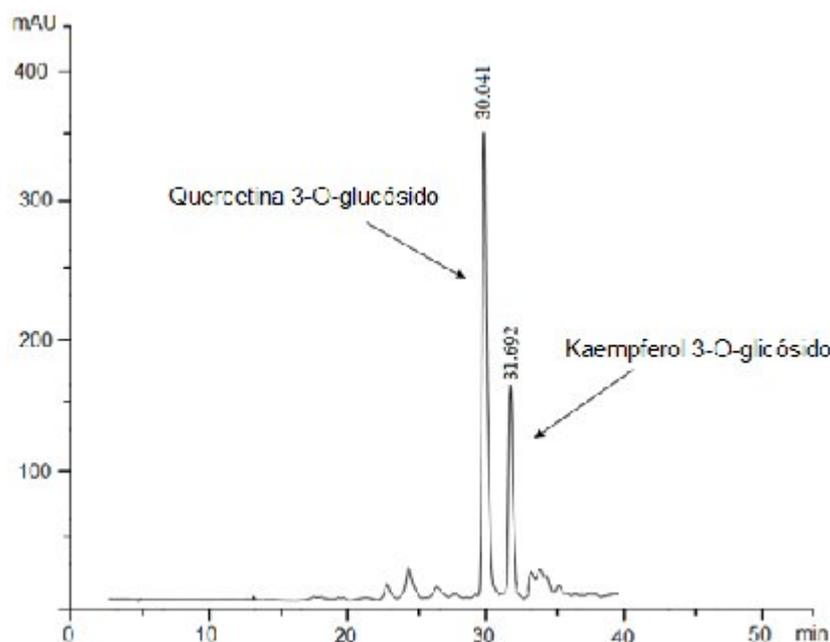


Figura 6.1 Cromatograma del EEA obtenido mediante HPLC a 350 nm.

## 6.2 Actividad Antioxidante del EEA

El extracto fresco de *Equisetum arvense* libre (sin encapsular) mostró una actividad antioxidante inicial de  $10.3 \pm 0.08$  mM TEAC, este valor se encuentra dentro del intervalo reportado para diferentes tipos de té como el negro ( $11.0 \pm 0.7$  mM TEAC) (Rechner A.R y col., 2002) y el verde ( $10.6 \pm 0.5$  mM TEAC) (Samaniego-Sánchez y col., 2011). La actividad antioxidante del EEA libre almacenado a 4 y 25 °C se redujo drásticamente, alrededor del 97% al cabo de tres semanas (Figura 6.2). Las curvas de pérdida de actividad antioxidante del extracto de EEA libre fueron ajustadas experimentalmente a varios modelos matemáticos, encontrando que el que mejor se ajustó a los datos fue el modelo cinético de primer orden. Los parámetros cinéticos para la pérdida de actividad antioxidante fueron: constantes cinéticas de primer orden (k)  $0.661$  y  $0.804$  semanas<sup>-1</sup>, con coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de  $0.983$  y  $0.962$ ; tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ )  $1.05 \pm 0.03$  y  $0.86 \pm 0.03$  semanas para el EEA libre almacenado a 4 y 25 °C, respectivamente. De acuerdo con estos resultados, la viabilidad y funcionalidad del EEA libre es limitada debido a su poca estabilidad, la cual es causada principalmente por la pérdida de actividad antioxidante, restringiendo así su consumo en fresco. Debido a lo anterior, la incorporación del EEA en las nanoemulsiones surge como una alternativa para protegerlo

de su degradación, extendiendo su tiempo de vida útil y manteniendo su actividad antioxidante.

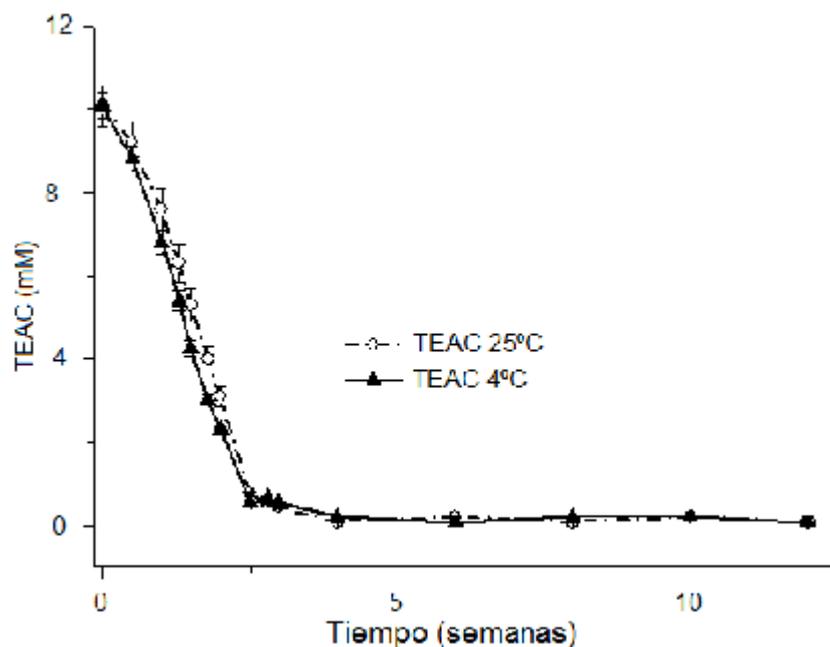


Figura 6.2 Perfil de degradación de TEAC del EEA del extracto fresco libre.

### 6.3 Diagramas de Fase Pseudoternario

Los diagramas de fase pseudoternarios fueron empleados para establecer los intervalos de concentración de cada uno de los componentes de las nanoemulsiones  $F_i$ . Se encontró que las nanoemulsiones o/w elaboradas con los cuatro TEMix (Figura 6.3a-d) fueron cinéticamente estables, ópticamente transparentes y caracterizadas por una solución líquida de una sola fase. Se comparó el efecto de los diferentes valores de TEMix en la zona de formación de las nanoemulsiones o/w (ZFo/w) encontrando que al aumentar la cantidad de EtOH, también aumentaba la ZFo/w. Esto puede ser atribuido a la capacidad del etanol para reducir el estrés de los enlaces formados en la interfase agua/aceite, dando flexibilidad a la película interfacial y permitiéndole adoptar las diferentes curvaturas requeridas para formar las nanoemulsiones en un intervalo más amplio de formulaciones (Kawakami y col., 2002). No se encontraron diferencias significativas en la ZFo/w cuando los valores de TEMix fueron de 1.0:0.3 y 1.0:0.4 respectivamente (Figure 6.3c-d), Por lo que para análisis posteriores se utilizó un TEMix de 1.0:1.03.

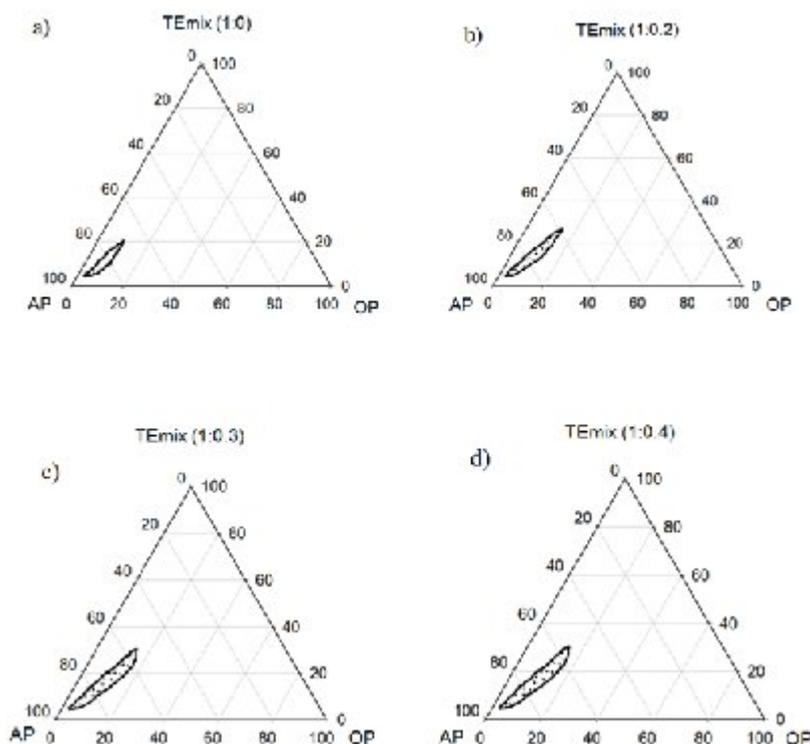


Figura 6.3 Diagramas de fase pseudoternarios de la zona de formación de las nanoemulsiones  $F_i$  (ZFo/w) con diferentes valores de TEMix ratios ((a) 1:0; (b) 1:0.2; (c) 1:0.3; (d) 1:0.4) compuestos de EEA, AEN, EtOH, Tween 20 y agua.

Cabe mencionar que los tamaños de las nanoemulsiones obtenidas mediante los diagramas de fase ternarios estuvieron alrededor de los 100 nm, sin embargo, como se mencionó anteriormente uno de los objetivos era encontrar la formulación óptima, es decir, aquella en la cual se lograra encapsular la mayor cantidad posible de fase oleosa pero manteniendo un tamaño máximo de 100nm para ello se utilizó la metodología de superficies de respuesta.

#### 6.4 Análisis de superficies de respuesta

Para visualizar el efecto de las variables independientes y de sus interacciones en el tamaño de gota de las nanoemulsiones o/w, se utilizó un método estadístico basado en el análisis de varianza (ANOVA), se determinó la significancia estadística de los efectos e interacciones, la comparación de las medias cuadradas y la estimación del error experimental, además se generó una superficie de respuesta y una gráfica de contornos a partir de un polinomio de segundo grado (Pey y col., 2002; Yuan y col., 2008). Los efectos

y las interacciones son definidas como las diferencias entre la media del tamaño de gota obtenida al nivel más bajo y la media del tamaño de gota obtenida al nivel más alto de cada variable. La Tabla 6.3 muestra los efectos estimados y las interacciones y el error estándar para cada efecto. Para los términos FO, FO/TEmix y (FO/TEmix x FO/TEmix) se obtuvieron valores grandes de F y valores pequeños de P ( $p \leq 0.5$ ) indicando un mayor efecto significativo en la variable de respuesta, el término cuadrático (FO x FO) y el término cruzado (FO x FO/TEmix) no mostraron efecto significativo ( $p > 0.05$ ), -por lo tanto, estos términos no tuvieron influencia en las propiedades de la nanoemulsión. Así el término que presentó mayor efecto en el tamaño de gota de las nanoemulsiones fue el término FO, seguido por FO/TEmix y (FO/TEmix x FO/TEmix) respectivamente.

Tabla 6.3 ANOVA de los datos obtenidos usando un diseño factorial  $3^2$

	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F	Valor P
A:EEA	4144.08	1	4144.08	289.84	0.0000
B:FO/TEmix	4641.33	1	4641.33	324.62	0.0000
AA	540.021	1	540.021	37.77	0.0000
AB	420.5	1	420.5	29.41	0.0000
BB	792.188	1	792.188	44.41	0.0000
Total error	243.063	16	14.2978		
Total (corr.)	10457.8	22			

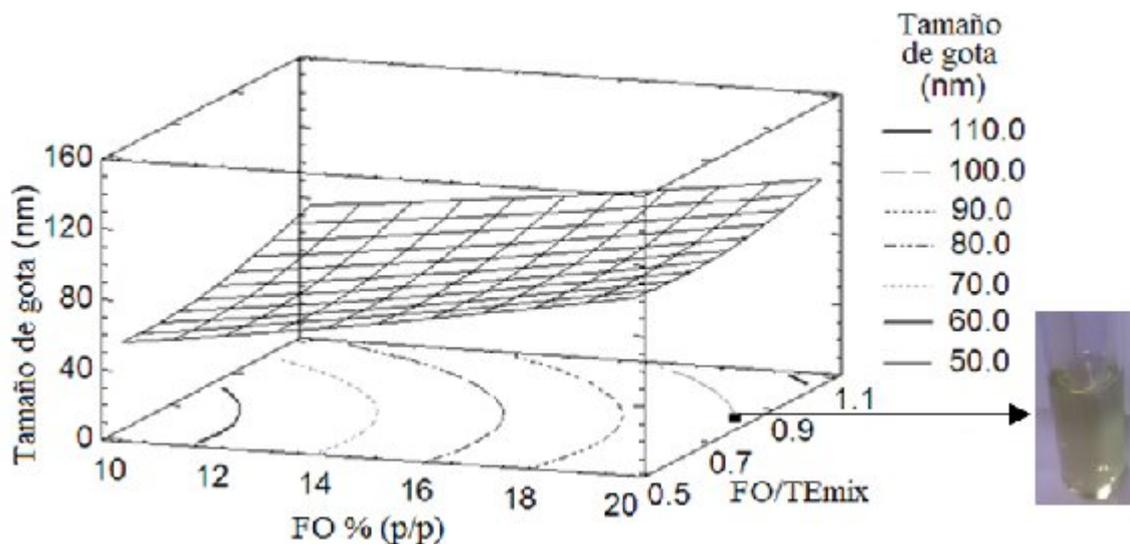
Los resultados de este estudio muestran que la respuesta experimental como una función de FO y FO/TEmix en el tamaño de gota podría ser aproximada por una ecuación cuadrática, en términos de los valores significativos (efectos con valor  $p < 0.05$ ) como sigue:

$$\text{Tamaño de gota (nm)} = a + b(\text{FO}) + c(\text{FO/TEmix}) + d(\text{FO})^2 + e(\text{FO x FO/TEmix}) + f(\text{FO/TEmix})^2$$

Donde:  $a = 36.81 \pm 2.78$ ;  $b = 3.14 \pm 0.67$ ;  $c = 62.83 \pm 4.69$ ;  $d = 0.08 \pm 0.01$ ;  $e = 1.8 \pm 0.70$  y  $f = 75.00 \pm 6.20$ .

El coeficiente de correlación obtenido  $R^2$  fue de 95.25 %, indicando que se logró un buen ajuste.

En la Figura 6.4 se muestran la superficie de respuesta y la gráfica de contornos generadas variando las dos variables independientes dentro del intervalo experimental. Estas gráficas son un medio visual que nos permite apreciar la influencia de los factores en el sistema. En este caso, el tamaño de gota de las nanoemulsiones aumenta con el incremento en la concentración de FO y con la disminución de la concentración de FO/TEmix. Esto puede ser atribuido a la habilidad del tensoactivo para reducir la tensión interfacial (en la interface aceite/agua) y el tamaño de gota y a la aplicación de energía en el sistema. Ya que al incrementar la concentración de la fase oleosa, la concentración de tensoactivo no es suficiente para reducir la tensión interfacial y por consecuencia el tamaño de gota tiende a ser más grande. Por el contrario, cuando se incrementó la concentración de tensoactivo, el tamaño de gota tendió a ser más pequeño debido a la gran reducción de la tensión interfacial (Tadros y col., 2004).



*Figura 6.4 Superficie de respuesta y gráfica de contornos: Tamaño de gota como una función de FO y FO/TEmix.*

De los datos de la superficie de respuesta y la gráfica de contornos tenemos que la mejor formulación de nanoemulsión fue aquella en la que se logró encapsular la mayor concentración de FO con tamaño de gota menor o igual 100 nm (máximo tamaño requerido para las gotas de las nanoemulsiones) (Shakeel y col., 2007; Sonnevile-Aubrun y col., 2004). La mejor formulación contuvo 19.98 % (p/p) de FO con 0.82 de FO/TEmix (Figura 6.4).

Esta nanoemulsión fue etiquetada como  $F_{MSR,O}$  y se le evaluó el % de eficiencia de encapsulación (EE%) y su estabilidad en el tiempo mediante el tamaño de gota almacenada a 4 y 25°C.

### 6.5 Eficiencia de encapsulación

La  $F_{MSR,O}$  tuvo una eficiencia de encapsulación de  $97.5 \pm 0.5$  % de EEA, este resultado fue similar al mostrado por  $F_{MSR,2}$  ( $97.2 \pm 0.4$  %) y  $F_{MSR,3}$  ( $97.0 \pm 0.6$  %), las cuales fueron elegidas al azar de la Tabla 5.2 con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos en  $F_{MSR,O}$ , encontrando que no existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las tres formulaciones. Estas eficiencias de encapsulación son del orden de las reportadas por otros autores (Suvimol y col., 2010; Ganta y Amiji 2009; Prego y col., 2006). La cantidad relativamente pequeña del EEA no incorporado en las nanoemulsiones podría ser atribuido a la pérdida normal durante el proceso de emulsificación (Tan y Nakajima, 2005).

### 6.6 Efecto de la temperatura de almacenamiento en el tamaño de gota de las nanoemulsiones.

A la  $F_{MRS,O}$ ,  $F_{MRS,2}$ , y  $F_{MRS,3}$ , se les evaluó la estabilidad almacenadas a 4 y 25 °C, con base al cambio de tamaño de gota después de 12 semanas de almacenamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.5, las nanoemulsiones almacenadas a 4 °C no mostraron ningún cambio significativo al cabo de las 12 semanas, a diferencia de las nanoemulsiones almacenadas a 25 °C, las cuales mostraron un aumento significativo en el tamaño a partir de la octava semana de almacenamiento, esto fue atribuido a la pérdida de viscosidad y al incremento de la movilidad del sistema (Tse y Reineccius, 1995), lo que favorece que se dé el fenómeno de maduración de ostwald que consiste en el crecimiento de las gotas grandes a costa de las más pequeñas hasta que éstas últimas prácticamente desaparecen. Este proceso ocurre a una velocidad que está en función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas es mayor en las gotas más pequeñas, el incremento de la velocidad del sistema también puede favorecer la coalescencia, que es la fusión de las gotas para crear unas gotas más grandes con la eliminación de parte de la interfase líquido-líquido y se cree que está relacionado con la curvatura preferida y con la rigidez de la capa del tensoactivo que estabiliza la nanoemulsión (Kavalnov, 1998), estos dos fenómenos (maduración de ostwald y coalescencia) son los principales mecanismos de desestabilización presentes en las nanoemulsiones. (Shah y col., 2010; Lifhitz y Slyosov 1961). Sin embargo, estos

efectos adversos observados a 25 °C podrían evitarse, almacenando las nanoemulsiones a temperaturas más bajas como 4°C.

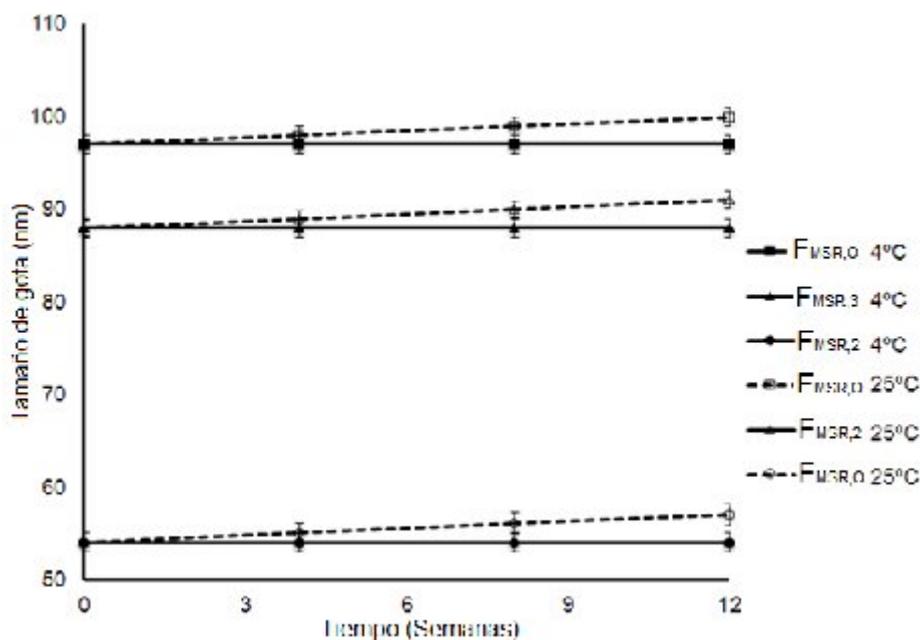


Figura 6.5 Tamaño de gota de las nanoemulsiones durante 12 semanas de almacenamiento.

### 6.7 Efecto protector de las nanoemulsiones en el EEA

La Figura 6.6 muestra los perfiles de actividad antioxidante de la F<sub>MSR,0</sub> y del EEA libre durante 12 semanas de almacenamiento a 4 y 25 °C, respectivamente. Cabe mencionar que la F<sub>MSR,2</sub> y F<sub>MSR,3</sub> no mostraron diferencias significativas en los perfiles de actividad antioxidante por lo que estos no se presentan en la gráfica. El EEA libre mostró una rápida pérdida de actividad antioxidante, independientemente de la temperatura de almacenamiento, llegando a valores casi nulos al cabo de 3 semanas de almacenamiento. La F<sub>MSR,0</sub> mostró una pérdida gradual de la actividad antioxidante que fue mucho más lenta que la presentó el EEA libre. Después de las 12 semanas de almacenamiento, la pérdida de actividad antioxidante de la F<sub>MSR,0</sub> fue de  $50.5 \pm 2.3$  % a 25 °C y de  $42.0 \pm 1.9$  % a 4°C.

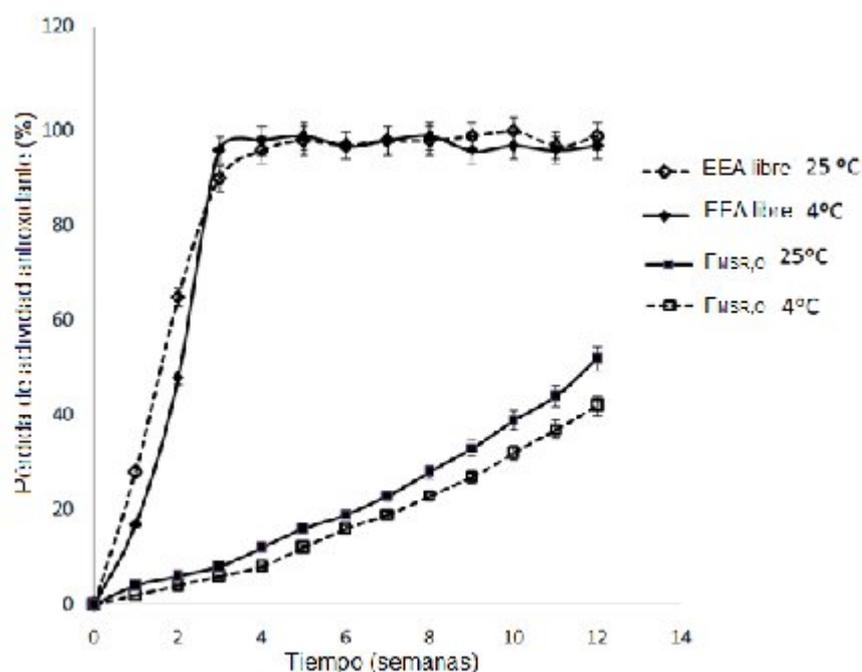


Figura 6.6 Comparación de la pérdida de actividad antioxidante del EEA libre y encapsulado almacenado a 4 y 25 °C.

Los datos experimentales de ambas temperaturas para las tres formulaciones ( $F_{MRS,0}$ ,  $F_{MRS,2}$ ,  $F_{MRS,3}$ ) se ajustaron a un modelo cinético de primer orden, los parámetros cinéticos  $k$  y  $t_{1/2}$  se muestran en la Tabla 6.4. En las tres formulaciones evaluadas la velocidad de pérdida de actividad antioxidante fue aproximadamente once veces menor comparada con el EEA libre y el tiempo requerido para reducir la actividad antioxidante a la mitad fue significativamente mayor (alrededor de 10 veces).

Tabla 6.4. Actividad antioxidante inicial como TEAC (mM) y parámetros cinéticos de las nanoemulsiones  $F_{MRS,i}$

Formulación	$k$ (semanas <sup>-1</sup> )	$R^2$	$t_{1/2}$ (semanas <sup>-1</sup> )
$F_{MRS,0}$ 4°C	0.048	0.9465	14.56 ± 0.60a
$F_{MRS,0}$ 25°C	0.056	0.9274	12.32 ± 0.40b
$F_{MRS,2}$ 4°C	0.050	0.9488	13.97 ± 0.50a
$F_{MRS,2}$ 25°C	0.057	0.9179	12.17 ± 0.40b
$F_{MRS,3}$ 4°C	0.048	0.9615	14.46 ± 0.30a
$F_{MRS,3}$ 25°C	0.058	0.9270	11.98 ± 0.40b

El valor de TEAC inicial fue de  $10.30 \pm 0.08$  (mM)

# **CAPÍTULO 7**

## **CONCLUSIONES**

---

El método de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico es una buena opción para la obtención de los compuestos bioactivos presentes en *Equisetum arvense*, debido a que nos permitió obtener un mayor rendimiento de extracción de fenoles totales y flavonoides en un tiempo considerablemente menor (2 h) en comparación con la extracción por solventes (5 días).

Los compuestos fenólicos encontrados en *Equisetum arvense* presentan un tiempo de vida media muy corto ( $14.56 \pm 0.60$  y  $12.32 \pm 0.40$  a 4 y 25 °C respectivamente) una vez que son extraídos de la planta, sin embargo, el tiempo de vida de éstos compuestos puede extenderse alrededor de once veces mediante su incorporación en nanoemulsiones o/w estabilizadas con tween 20 y etanol.

Mediante la metodología de superficies de respuesta se logró optimizar la formulación de las nanoemulsiones para lograr encapsular la mayor cantidad de fase oleosa posible con una alta eficiencia de encapsulación manteniendo un tamaño menor o igual a 100nm.

Este trabajo establece las bases para el desarrollo de productos comerciales conteniendo nanoemulsiones con extractos de *Equisetum arvense* que puedan ejercer la actividad antioxidante requerida hasta la fecha de caducidad del producto.

# **CAPÍTULO 8**

## **PERSPECTIVAS**

Dentro de las actividades que podrían realizarse a futuro se encuentra, la evaluación de la liberación de los compuestos flavonoides presentes en las nanoemulsiones bajo condiciones simuladas de la piel.

Probar diferentes mezclas de tensoactivos que permitan una mejor protección de los compuestos flavonoides presentes en el extracto de *Equisetum arvense* o incluso utilizar otros materiales para estabilizar las nanoemulsiones, por ejemplo: nanopartículas (emulsiones pickering).

# **CAPÍTULO 9**

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ahmad, S. I., Shinoda, K. y Friberg, S. 1974. Microemulsions and phase equilibria mechanism of the formation of so called microemulsions studied in connection whit phase diagram. *Journal of Colloid Interface Science*, 47:32 - 37.

Álvarez, A., Jorrat, S y Genta, M. 2005. Caracterización físico-química de jugo de limón de Tucumán. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 34:49 - 56.

Amselem, S. y Friedman, D. 1998. Submicron emulsions as drug carriers for topical administration. In: Benita S, editor. Submicron emulsions in drug targeting and delivery. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers, 153 – 173.

Antonietti, M. y Landfester, K. 2002. Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science*. 27:689 – 757.

Asua, J.M. 2002. Miniemulsion polymerization, *Progress in Polymer Science*. 27:1283 – 1346.

Ax, K., Mayer-Miebach, E., Link, B., Schuchmann, H., y Schubert, H. 2003. *Engineering in Life Sciences*, 3:199 - 201.

Bancroft W. D. 1912. The theory of emulsification. *Journal of Physical Chemistry*, 16: 177-345, 475 - 739.

Bartley, J.P. y Foley, P. 1994. Supercritical fluid extraction of Australian-grown ginger (*Zingiber officinale*). *Journal of science of food and agriculture*, 66:365 - 371.

Becher P.,1984. Hydrophile-lipophile balance: history and recent development Langmuir lecture. *Journal of dispersion science and technology*, 5: 81 - 96.

Becher, P. 2001, Emulsions: Theory and Practice. Reinhold Publishing: New York; 3rd edition; Oxford University Press.

Bergenstahl, G. 1997. Physicochemical aspects of emulsifier functionality. *Food Emulsifiers and Their Applications*, 6:147 - 172.

Binks, P. 1998. Modern Aspects of Emulsions Science, 1th edition. The Royal Society of Chemistry. Publication,Cambridge.

Bruhl, L. y Matthaus, B. 1999. Extraction of oilseeds by SFE a comparison with other methods for the determination of the oil content. *Journal Analytical Chemistry*, 364: 631 - 634.

Budavari, S., Maryadele, J., Smith, A., y Heckelman, P. 1989. *The Merck Index an encyclopedia of Chemicals, drugs and biological*. 11rd edition. Rahway, New Jersey., U.S.A.

Chun, M.K., Shin, H.W., Lee, H y Liu J. 1994. Supercritical-fluid extraction of taxol and baccatin-III from needles of taxus-cuspidata. *Biotechnology Techniques*. 8, 547 - 550.

Couvreur, P., Dubernet C., y Puisieux, F. 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Euopean Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41:2 - 13.

Danielski, L., Michielin, E.M.Z., y Ferreira, S.R.S. 2007. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO<sub>2</sub>: experimental solubility and empirical data correlation. *Journal of food engineering*, 78:1054 - 1059.

Davies J.T., 1959. Proceesings of the 2rd international congress of Surface Activity, Butterworths, London, I:426

Dickinson, E., y Stainsby, G 1982. *Colloids in Foods*, Applied Science publishers, London, UK.

Dickinson, E. 1992. *An introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford, UK, 66 - 70

Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17:25 - 30.

Dillard, C. J. y German, J. B. 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of science food agricola*, 80: 1744 – 1756.

Domínguez-López, A., Remondetto, G.E., y Navarro-Galindo, S. 2008. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. “Criollo”) infusion. *International journal of food science and technology*, 43: 322 - 325.

Dron, A., Guyer, D.E., Gage, D.A. y Lira, C.T.1997. Yield and quality of onion flavor oil obtained by supercritical fluid extraction and other methods. *Journal of food process engineering*, 20:107 - 123.

El-Aasser, M.S. y Sudol, E.D. 2004. Miniemulsions: overview of research and applications. *Journal of coating technology and research*, 1:21 – 31.

Enbergs, J. y Kevelam J. 1996. Formation and stability of micelles and vesicles. *Current opinion in colloid and interface science*, 1:779-789.

Fang, Z. y Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in food science and technology*, 21:510-523.

Fast J. P. y Mecozzi S. 2009. Nanoemulsions from intravenous Drugs Delivery. *Nanotechnology in drugs delivery*, 10:461 - 486.

Floury, J. A., Desrumaux, M. A. V., Axelos, J. y Legrand. 2003. Effect of high Pressure homogenization on methycellulose as food emulsifier. *Food Engineering* 58:227 – 238.

Forster, T. y Von Rybinski, W. 1998. Aplications of emulsions. In B. Binks (Editorial), *Modern aspects of emulsions science*. 395 - 426. Cambridge: The royal society of chemistry.

Friberg, S. y Solans, C. 1978. Emulsification and the HLB-temperature. *Colloid and Interfase science*, 66:367 - 368.

Friberg, S. E. y Larsson, K. 1997. Food emulsions, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, 1997.

Friedman, M. y Jürgens, H.S. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48:2101 - 2110.

Fuh, M.R.S., Pan, W.H., Jen H.Y y Chuo, C.M. 1995. Preparative scale supercritical carbon dioxide. *Journal of food science*, 55:95-98.

Ganta, S. y Amiji, M. 2009. Co-administration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulation to overcome multidrug resistance in tumor cells. *Molecular Pharmaceutics*, 6:928 - 939.

González, S.J., Muñiz, R. y Valls, B., 2001. Alimentos Funcionales. *Nutrición hospitalaria*, 1:84 - 91.

Griffin W. C 1949. *Clasification of surface-active agents by HLB society. Journal of the society of cosmetic chemists*, 1:311 - 326.

Gupta, P.K. y Cannon, J. B. 2000. Emulsions and microemulsions for drugs solubilization and delivery. In R. Liu Editorial. *Water insoluble drug formulation*, Denver:Interpharm Press.169 - 211.

Hannay, J.B., y Hogarth, J. 1879. On the solubility of solids in gases. *Proceedings of the royal society B*. London A 29:324 - 326.

Hawthorne, S.B., Riekkola, M. Serenius, K., Holm, Y., Hiltunen, R. y Hartonen, K. 1993. Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction for the determination of essential oils in aromatic plants. *Journal of chromatography*, 634:297 - 308.

Henning, J.A., Core, R.J., y Gardea-Torresdey, J.L. 1994. Extracting volatile compounds from single plants using supercritical fluid extraction. *Crop Science*, 34:1120 - 1122.

Hernández-Jaimes C., 2009. Encapsulación en nanoemulsiones de extractos de *Equisetum arvense*. Tesis de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.

Hiemenz, P.C., y Rajagopalan, R. 1997. Principles of Colloid and Surface Chemistry, 3rd edition, Marcel Dekker, New York, NY.

Higuchi, W. y Misra, J. 1962. Physycal degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible prevention thereof. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5:459 - 466.

Hoeller, S., Sperger, A., y Valenta, C. 2009. Lecithin based nanosemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation. *International journal of pharmaceutics*, 370:181 - 186.

Hoffmann, F., Guilherme, J., Russi, M., Nascimento, V., Morreira, L., y Matos, G. 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hidroalcoholic extrac of stems from *Equisetum arvense L.* in mice. *Pharmacological Research*, 49:239 - 243.

Huston, C.K. y Ji, H. 1991. Optimization of the analytical supercritical fluid extraction of cloves via an on-column interface to an ion trap GC/MS system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39:1229 - 1233.

Hyuncheol, O., Do-Hoon, K., Jung-Hee, C., y Young-Chul, K. 2004. Hepatoprotective and free radical scavenging activities of phenolic petrosins and flavonoids isolated from *Equisetum arvense*. *Ethnopharmacology*, 95:421 - 424.

Imafidon, G.I. y Spanier, A.M. 1994. Unraveling the secret of meat flavor trends. *Food Science and Technology*, 5:315 - 321.

Israelachvili J. N., Mitchell D. J. y Ninham B. W. 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the chemical society, faraday transactions*, 72:1525 - 1568.

Israelachvili, J.N. 1992. Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, London, UK. 1405 - 1408.

Israelachvili J. N. 1994. The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 91:1 - 8.

Izquierdo P. Esquena J., Tadros Th. F., Dederen C., Garcia M.J., Azemar N. y Solans C. 2002. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method, *Langmuir*, 18:26 - 30.

Jafari, S. M., He, Y. y Bhandari, B. 2006. Nano-emulsions production by sonication and microfluidization. A comparison. *Food Properties*, 9:475 - 485.

Jonsson, B., Lindman, B., Holmberg, K. y Kronberg, B. 1998. Surfactants and polymers in Aqueous Solution. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Kavalnov, A. S. 1998. Coalescence in emulsions in modern aspects of emulsions science. B. P. Binks (Editor), Cambridge, RSC.

Kabalnov, A. S. y Shchukin, E. D. 1992. Ostwald ripening Theory: Applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloids and Interface Science*, 38:69 - 97.

Kawakami, K., Yoshikawa, T., Moroto, Y., Kanoaka, E., Takahashi, K., Nishihara, Y. y Masuda, K. 2002. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs I. Prescription design. *Journal of controlled release*, 81: 65 - 74.

Klang, S. y Benita, S. 1998. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*. 9:119 - 152.

Klink, G., Buchs, A. y Güllacar, F.O. 1994. Supercritical fluid extraction of fatty acids and sterols from plant tissues and sediments. *Organic geochemistry*, 21:437 - 441

Kobayashi, I., Yasuno, M., Iwamoto, S., Shono, A., Satoh, K. y Nakajima, M. 2002. Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane. *Colloids Surfactant*, 207:185 - 196.

Kumar S. y Priya S. 2001. Determination of critical Micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants. *Surfactants and detergents*, 4:303 - 309.

Lamaison J.L. y Carnat A. 1990. Teneurs en acid rosmarinique en derives hydroxycinnamiques totaux et activites antioxidantes chez les Apiacees, les Boraginacees et les Lamiacees medicinales. *Pharmaceutica acta Helvetiae*, 65:315 - 320.

Lang, Q.Y., y Wai, C.M. 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- A practical review. *Talanta*, 53:771 - 782.

Leung, R. y Shah, D. O. 1987. Solubilization and phase equilibria of water-in-oil microemulsions: I effects of spontaneous curvature and elasticity of interfacial films. *Journal of Colloid and Interface Science*, 120: 320 - 329.

Li, S.F.Y., Ong, C.O., Lee, M.L. y Lee, H.K. 1990. Supercritical fluid extraction and chromatography of steroids with Freon-22. *Journal of chromatography*, 515:515 - 520.

Lifshitz, I. M., y Slyozov, V. V. 1961. The kinetics of precipitation from Supersaturated solid solution. *Physics and Chemistry of Solids*, 19:35 - 50.

- Lindman, B. 2001. Physico-chemical properties of surfactants, in *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*, Vol. 1, Holmberg, K., Ed., John Wiley & Sons, Chichester, England, Chap. 19.
- Lopez-Avila, V., Benedicto, J. 1997. Supercritical fluid extraction of kava lactones from piper methysticum (kava) herb. *Journal of high resolution chromatography*, 20:555 – 559.
- Marsili, R. y Callahan, D. 1993. Comparison of a liquid solvent extraction technique and supercritical fluid extraction for the determination of  $\alpha$ -and  $\beta$ - carotene in vegetables. *Journal of chromatographic science*. 31:422-428.
- McClements, D. J. 1999. Food emulsions. Principles, practice, and techniques. CRC Press. USA. 378.
- McClements, D.J. 2005. Foods emulsions: principles, practices, and techniques. 2nd edition, CRS Press. 1- 9.
- Meireles, M.A.A. 2008. Supercritical fluid extraction of medicinal plants. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry*. 7:3254 - 3258.
- Middleton, E. Jr., y Kandaswami C. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. The Flavonoids. *Chapman and Hall, London*, 619-652.
- Miller, C.A., 2006. Spontaneous emulsification recent developments with emphasis on self-emulsification. *Emulsions and emulsions stability*, 132:107-126.
- Mímica-Dukic, N., Simin, N., Cvejic, J., Jovin, E., Orcic, D., y Bozin, B. 2008. Phenolic compound in field Horsetail (*Equisetum arvense L.*) as natural antioxidant. *Molecules*, 13: 1455-1464.
- Modey, W. K., Mulholland, D. A. y Raynor, M. W. 1996. Application of a dynamic extraction model to the supercritical fluid extraction of the limonoid cedrelone from toona. *Journal of chromatographic science*, 34:320 – 325.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G., Cui, J., Pardakhty, A. y Yurdugul, S. 2008. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International journal of food properties*, 11:833-844.

- Myers, D. 1988. Surfactant solution: micellization and related associate phenomena. *Surfactant Science Technology*, 81-151.
- Nakajima, H. 1997. Microemulsions in cosmetics, in: C. Solans, H. Kunieda (Eds.), *Industrial applications of microemulsions*, Marcel Dekker, New York, 175 – 197.
- Nielsen, T.J. 1991. Supercritical fluid extraction coupled with gas for the analysis of aroma compounds absorbed by low-density polyethylene. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39:1234-1237.
- Ortiz-Estrada, C. H., Santoyo-Arreola, J. G., Luna-Barcenas, G., Sánchez I. C. y Vázquez-Medrano, R. C. 2007. Transición y estabilidad de fase de soluciones poliméricas en CO<sub>2</sub> supercrítico por turbidimetría. *Revista mexicana de ingeniería química*, 6:347-357.
- Otterbach, A. y Wenclawiak, B. W. Fresenius. 1999. Ultrasonic/soxxhlet/supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips. *Journal of analytical chemistry*, 365:472-474.
- Pan, W. H. T., Chang, C. C., Su, T. T., Lee, F. y Fuh, M. R. S. 1995. Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower. *Talanta*, 42:1745 – 1749.
- Pedulli, B.F., Lucarini, M, y Pedrielli, P.1997. Free radicals in biology and Enviroment; Kluwer *Academic Publishers*: Dordrecht, The Netherlands.
- Pérez-Trueba G. 2003. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Revista cubana de investigation biomedica*. 22:48 - 57.
- Pey, C. M., Maestro, A., Solé, I., González, C., Solans, C., y Gutiérrez, J. M. 2006. Nano-emulsion by low energy methods in an ionic surfactant system. *Colloid Surfaces A: Physicochemical engineering aspects*, 288: 144 - 150.
- Pietta, P., Mauri, P., Bruno, A., Rava, A., Manera, E., y Ceva, R. 1991. Identification of flavonoids from *ginkgo biliba* L, *Anthemis nobilis* L. and *Equisetum arvense* L., by high-performance liquid chromatography with diode-array UV detection. *Journal of chromatography A*, 553: 223 - 23.

- Polesello, S., Lovati, F., Rizzolo, A. y Rovida, C. 1993. Supercritical fluid extraction as a preparative tool for strawberry aroma analysis. *Journal of high resolution chromatography*, 16:555 - 559.
- Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., y Alonso, M. J. 2006. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. *Journal of control release*, 111: 299-308.
- Prince, L. M. 1975. Microemulsions: theory and practice. *Journal of colloid interface science*, 52, 182-188
- Rechner, A.R., Wagner, E., Van Buren, L., Van de Put, F., and Rice-Evans, C.A. 2002. Black Tea Represents a Major Source of Dietary Phenolics Among Regular Tea Drinkers. *Free Radical Research*, 36: 1127– 1135.
- Reverchon, E., Donsi, G. y Osseo, L. S. 1993. Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices. *Industrial and engineering chemistry research*, 32:2721 – 2726.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., y Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compound. *Trends Plant Science*, 2:152-159.
- Roginsky V., y Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92:235-254.
- Rosen, M. J. 1978. Surfactants and interfacial phenomenon. Wiley-Interscience Publishers. New York, N.Y.
- Salager, J. L. 2002. Surfactantes. Cuaderno FIRP 300 A. Versión # 2. Laboratorio FIRP. Escuela de Ingeniería Química, Universidad De Los Andes.
- Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada Granados, J.J., Blanca-Herrera, R. Villalón-Mir, M., López-García de la Serrana, and López-Martínez, M.C. 2011. The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of food composition and analysis*, 24:79–86.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A, y Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the science of food and agriculture*, 76: 270-276.

Scalbert A. y Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Nutrition*, 130:2073S-2085S.

Schröder, V. y Schubert, H. 1999. Production of emulsions using microporous, ceramic membranes. *Colloids and surfaces*, 152:103-109.

Shah, P., Bhalodia, D., y Shelat, P. 2010. Nanoemulsions: A pharmaceutical review. *Systematic reviews in pharmacy*, 1:24-32.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M, y Shafiq, S. 2007. Nanoemulsions as vehicles for Transdermal delivery of aceclofenac. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists and Technology* 8:E1-E4.

Sharma, S. K., Lowe, K. C., y Davis, S. S. 1988. Novel Compositions of Emulsifier Perfluorochemicals for Biological Uses. *Biomaterials, Artificial Cells, and artificial organs*, 16:447-450.

Shinoda, K. y Saito, H. 1968. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersion of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Colloid Interface Science*, 26:70–74.

Shinoda, K. y Kunieda, H. 1983. Phase properties of emulsions: PIT and HLB, in: P. Becher (Ed.), *Encyclopedia of emulsion technology*, Marcel Dekker, New York. 1:337–367.

Smith, R. M. y Burford, M. D. 1992. Supercritical fluid extraction and gas chromatographic determination of the sesquiterpene lactone parthenolide in the medicinal herb feverfew (*tanacetum parthenium*). *Journal of chromatography A*, 627:255-261.

Solans, C., Esquena, J., Forgiarini, A., Morales, D., Uson, N., Izquierdo, P., Azemar, N. y García M. 2002. Nanoemulsions: formation and properties. in: D. Shah, B. Moudgil, K. L. Mittal (Eds.) *Surfactants in solution: fundamentals and applications*, Surfactant Science Series Marcel Dekker, New York, 525 – 554.

Solans, C., Esquena, J., Forgiarini, A. M., Uson, N., Morales, D., Izquierdo, P., Azemar, N. y García M. J. 2003. Nano-emulsions: formation, properties, and applications. *Journal of Adsorption and agregation of surfactants in solution*, 109:524-554.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. y García-Celma M. J. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10:102-110.

Song, K.M., Park, S.W., Hong, W. H., Lee, H. y Kwak, S. S. 1992. Isolation of vindoline from catharanthus roseus by supercritical fluid extraction. *Biotechnology progress*, 8:583 – 586.

Sonneville.Aubrun O., Simonnet J.-T., y L'Alloret F. 2004. Nanoemulsions: a New Vehicle for Skincare Products. *Advances in Colloid and Interface Science*. 108-109:145-149.

Spasic, A.M. y Hsu J-P. 2005. Finely dispersed particles, Micro, Nano and Atto-Engineering. Taylor & Francis.

Stashenko, E. E., Puertas, M. A. y Combariza, M. Y. 1996. Volatile secondary metabolites from spilanthes americana obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of chromatography A*, 752:223-232.

Suvimol, S., Sang-Gi, M., Piyawan, B. y Mi-Jung, C. 2010. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food research international*, 43: 8-17.

Tadros T., Izquierdo P., Esquena J., y Solans C. 2004. Formation and Stability of Nano-emulsions. *Advances in colloids and interfase science* 108-109:303-318.

Tadros T. F. 2008. Colloids in cosmetics and personal care. Colloids and interface science series. 4.

Tan, C.P. y Nakajima, M. 2005. Effect of polyglycerol esters of fatty acids on physicochemical properties and stability of  $\beta$ -carotene nanodispersions prepared by emulsification/evaporation method. *Journal of the science of food and agriculture*, 85: 121–126.

Taylor, P. 1998. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in colloid and Interface science*, 75:107-163.

Treybal R. E. 1951. Liquid Extraction, Mac Graw Hill.

Tse, K. Y. y Reineccius, G. A. 1995. Methods to predict the physical stability of flavor-cloud emulsion. *Flavor technolgy*, 13:172-182.

- Vandana, V., Teja, A. S. y Zalkow, L. H. 1996. Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide + ethanol mixtures. *Fluid phase Equilibria*, 116:162-169.
- Veit, M., Geiger, H., Czygan, F. y Markham, K. 1990. Malonylated flavone 5-O-glucosides in the barbed aprocots of *Equisetum arvense*. *Phytochemistry*, 29:2555-2560.
- Veit, M., Beckert, C., Höhne, C., Bnauer, K. y Geiger, H. 1995. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. *Phytochemistry*, 38: 881-891.
- Verbeyst, L., Oey, I., Van der Plancken, I., Hendrickx, M, y Van Loey, A. 2010. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chemistry*, 123: 269-274.
- Vilegas, J. H. Y., Lancas, F.M., Vilegas, W. y Pozetti, G.L. 1993. Off-line supercritical fluid extraction high resolution gas chromatography applied to the study of moraceae species. *Phytochemical analysis*, 4:230 – 234.
- Walstra, P. y Derker, M. 1996. Emulsion stability, *Encyclopedia of emulsion technology*, 1–62.
- Weers, J. g., Ni. Y., Tarara, T. E., Pelura, T.J. y Arlauskas. R .A. 1994. The effect of molecular diffusion on initial particle size distributions in phospholipid stabilized fluorocarbon emulsions. *Collids and Surfaces A: Phisycoschemical and Engineering Aspects*, 84:81-87.
- Wheeler, J. R. y McNally, M. E. 1989. Supercritical fluid extraction and chromatography of representative agricultural products with capillary and microbore columns. *Journal of chromatographic science*, 27:534 – 539.
- Winkle M. 1967. Distillation, Mac Graw Hill book company, New York.
- Wright, J.S.; Johnson, E.R; DiLabio, G.A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method analysis of substituent effect, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American chemical society*, 123:1173-1183.
- Yuan Y., Gao, Y., Zhao J. y Mao, L. 2007. Characterization and stability evaluation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International* 41:61-68.

Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L. y Zhao, J. 2008. Optimization of conditions for the preparation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107: 1300- 1306.

Zosel, K. 1969. Deutsches patentamt, Berlin: Offenlegungs schrift Nr. 1. 493.190.

Zhou, H., Yue, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, J., Yan, Z. y Duan, M., 2010. Characterisation and skin distribution of lecithin-based coenzyme Q10- Loaded lipid nanocapsules. *Nanoscale Research letter*, 5: 1561-1569.

# **CAPÍTULO 9**

## **Anexo**

This article was downloaded by: [Universidad Autonoma Metropolitana], [Mr E. J. Vernon-Carter]

On: 07 January 2013, At: 10:36

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Journal of Dispersion Science and Technology

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/Idis20>

### Antioxidant Activity Degradation, Formulation Optimization, Characterization, and Stability of Equisetum Arvense Extract Nanoemulsion

C. Hernández-Jaimes<sup>a</sup>, B. Fouconnier<sup>b</sup>, C. Pérez-Alonso<sup>c</sup>, J. L. Munguía-Guillén<sup>b</sup> & E. J. Vernon-Carter<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Col. Vicentina, México, D.F., México

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Col. Vicentina, México, D.F., México

<sup>c</sup> Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México

Accepted author version posted online: 20 Jan 2012.

To cite this article: C. Hernández-Jaimes, B. Fouconnier, C. Pérez-Alonso, J. L. Munguía-Guillén & E. J. Vernon-Carter (2013): Antioxidant Activity Degradation, Formulation Optimization, Characterization, and Stability of Equisetum Arvense Extract Nanoemulsion, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34:1, 64-71

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01932691.2011.648460>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

# Antioxidant Activity Degradation, Formulation Optimization, Characterization, and Stability of *Equisetum Arvense* Extract Nanoemulsion

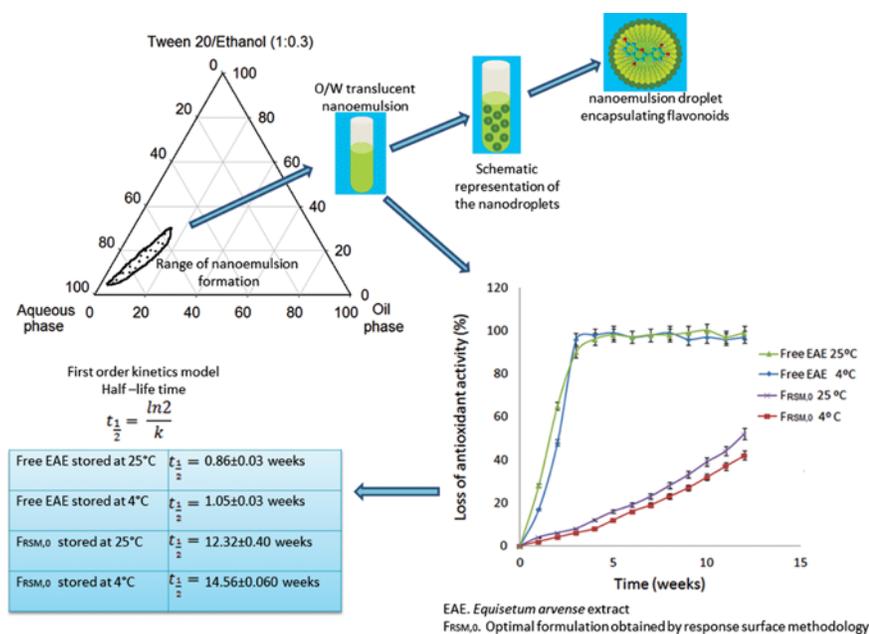
C. Hernández-Jaimes,<sup>1</sup> B. Fouconnier,<sup>2</sup> C. Pérez-Alonso,<sup>3</sup>  
 J. L. Munguía-Guillén,<sup>2</sup> and E. J. Vernon-Carter<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Col. Vicentina, México, D.F., México

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Col. Vicentina, México, D.F., México

<sup>3</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México

## GRAPHICAL ABSTRACT



*Equisetum arvense* supercritical CO<sub>2</sub> extracts (EAE) contained an initial antioxidant activity of 10.3 mM TEAC that suffered a sharp first order kinetics decay characterized by half-life time ( $t_{1/2}$ ) of  $1.05 \pm 0.03$  and  $0.86 \pm 0.03$  weeks at 25 and 4°C, respectively. The aim of the present work was to develop a nanoemulsion formulation for providing EAE protection against deleterious environmental factors and extending its shelf-life functionality. The nanoemulsion area was identified by constructing pseudoternary phase diagrams and response surface methodology was used to optimize the preparation conditions. The best formulation achieved an EAE encapsulation efficiency of  $97.5 \pm 0.5\%$  and antioxidant activity half-life time ( $t_{1/2}$ ) was extended to  $12.32 \pm 0.40$  and  $14.56 \pm 0.60$  weeks at 25 and 4°C, respectively.

Received 15 November 2011; accepted 30 November 2011.

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) for the partial financing of this work through grant 81157.

Address correspondence to E. J. Vernon-Carter, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340, México, D.F., México. E-mail: jvc@xanum.uam.mx

**Keywords** Antioxidant activity, decay kinetics, *Equisetum arvense* extracts, nanoemulsion formulation optimization

## INTRODUCTION

*Equisetum arvense* is an aerial plant native to South and Central America, and it is commonly known as “horsetail.” This plant is used in traditional medicine as a diuretic and in treatment of various diseases like urethritis, jaundice, hepatitis, stomach diseases, internal bleeding, and respiratory tract infections.<sup>[1,2]</sup> Some works have reported that *E. arvense* contains oleoresins<sup>[3]</sup>, hydroxycinnamic derivatives and flavonoids.<sup>[4]</sup> It has been found that the flavonoids quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin) and kaempferol 3-O-glycoside are present in relatively high concentrations in *E. arvense*, both compounds attributed with antioxidant properties that decrease the occurrence of oxidative stress.<sup>[1]</sup> Flavonoids from *E. arvense* are extracted from aqueous or organic solvent macerations, which not only restrict their use in food and/or cosmetic industries due to toxic solvent traces, but extracts also display a short shelf life losing rapidly their biofunctional properties mainly due to the presence of environmental factors such as oxygen, heat, pH, and light.<sup>[5-7]</sup>

Supercritical fluids have useful physical properties, such as low viscosity and high diffusivity into the sample matrix. This results in remarkably faster mass transport than in common organic solvents. Furthermore, supercritical fluid extraction (SFE) operates at low temperatures, which makes it a very suitable technique for the extraction of thermolabile compounds, such as antioxidants.<sup>[8]</sup> It has been reported that extracts obtained by SFE usually possess higher antioxidant activities than those obtained by solvent extraction,<sup>[3,9]</sup> owing to lower degradation of flavonoids.

Despite the high yield and functionality that SFE could provide to *E. arvense* extracts, there is still a limitation related with the poor water solubility and the high susceptibility to heat, light, and oxygen displayed by flavonoids.<sup>[10,11]</sup> In order to improve these drawbacks, some attempts have been made for incorporating bioactive compounds into fine droplets of oil-in-water (O/W) nanoemulsions.<sup>[12-16]</sup> These nanoemulsions can be used in pharmaceutical, nutraceutical or food industries as delivery systems for insoluble or low solubility in water flavonoids, and this type of emulsions may contain a high concentration of bioactive compounds.

Nanoemulsions are vesicular systems in which the active compounds are confined to a cavity consisting of an inner liquid core surrounded by a polymeric membrane.<sup>[17]</sup> Compared to micron-sized emulsions, nanoemulsions provide a greater surface area and have the potential to increase solubility due to a combination of large interfacial adsorption of the core compound, enhance the bioavailability, and

improve the controlled release, all of which enable better precision targeting of the encapsulated materials.<sup>[18]</sup> The benefits of this method are that the average volume sizes of particles are a function of the formulation composition, which means that nanoemulsions size can be tailored by formulation design.<sup>[19]</sup>

Thus, the aims of this work were to: a) Obtain *E. arvense* extracts (EAE) by SFE; b) Characterize the EAE obtained from SFE; c) Determine the optimal conditions for O/W nanoemulsions formation containing *E. arvense* extracts; d) Determine the stability of EAE contained in the nanoemulsions with that of free EAE stored for 12 weeks.

## EXPERIMENTAL

### Materials

*E. arvense* aerial dry parts were purchased from a local market in Mexico City. Carbon dioxide supercritical fluid (CO<sub>2</sub>SF) grade used for the SFE was obtained from INFRA, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>+</sup>), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (TROLOX), quercetin 3-O-glucoside (isoquercitrin) and kaempferol 3-O-glycoside were purchased from Sigma-Aldrich Quimica, S.A. de C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico). The solvents used were ethanol (EtOH), methanol (MeOH), *n*-hexane and phosphoric acid (PA) HPLC grade (J.T. Baker, Mexico City, Mexico). Essential orange peel-oil (EOPO) was obtained from Saframex, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) was bought from Canamex Quimicos, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Sodium azide used as preservative and was obtained from Hycel de Mexico, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Deionized water was used in all the experiments.

### Extraction of Flavonoids by SFE

Dried *E. arvense* aerial parts were ground with a grinder (Macinino Legno, Sambonet Paderno Industrie S.P.A., Ortango, Italy) and sieved through mesh 30. 10 g of powdered material were placed in the supercritical CO<sub>2</sub> extractor (Model SFT-100 SFE, Scientific Systems, Inc., State College, PA, USA) vial. The extraction was performed under the following conditions: CO<sub>2</sub>SF was used as carrier at a flow rate of 2 mL/min, at 150 bars and 40°C. EtOH (15% v/v) was used as cosolvent at 0.3 mL/min. The extraction process was carried out by 2 hours with a previous static period of 20 minutes. The EAE obtained was stored in amber containers at 4°C until required for use.

### Characterization of EAE by HPLC

The identification and quantification of flavonoids present in fresh EAE was carried out using the modified method reported by Mímica-Dukic et al.<sup>[11]</sup> The fresh EAE was filtrated through 0.45 µm cellulose membrane filter (Econofilters Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). 20 µL of the sample were injected in the HPLC system (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) equipped with a quaternary pump and an UV-diode array detector. The chromatographic conditions were: temperature 20°C thermostated, column Zorbax (SB-C18 4.6 × 150 mm, 5 µm). Two solvents were used for the gradient elution: (A) 0.15% phosphoric acid in H<sub>2</sub>O: MeOH (77:23) (pH = 2) and (B) methanol. The elution profile was: isocratic: 0–36 minutes 100A; gradient: 3.6 minutes. 100% A–linear–24.0 minutes. 80.5% A- isocratic–30 minutes–linear–60 minutes. 51.8% A–linear–67.2 minutes. 100% B. The flow rate was 1.0 mL/min. Detection of the two major flavonoids was carried out using 330 and 350 nm wavelengths. Quantification of flavonoids was done using an external standard and reporting as mg/g<sub>Dried Extract</sub> (DE).

### Antioxidant Activity of EAE

Antioxidant activity was determined by the DPPH radical scavenging activity, according with the procedure described by Sánchez-Moreno et al.<sup>[20]</sup> Stock solution of DPPH<sup>+</sup> radical (0.025 g/L) in MeOH was prepared daily. 3.9 mL of DPPH<sup>+</sup> were mixed with 0.1 mL of EAE. The mixture was shaken vigorously and left to stand at room temperature in the dark for 30 minutes. A blank sample containing the same amount of DPPH<sup>+</sup> solution was prepared. The antioxidant activity was evaluated through the decrease in absorbance value at 515 nm, using a TROLOX calibration curve (0.5–12 mM). Data were reported as TROLOX equivalent (TEAC, mM). In order to determine the kinetic parameters of EAE degradation upon storage time, DPPH inhibition data were converted to TEAC and the antioxidant activity loss rate (*k*) and EAE half-life time (*t*<sub>1/2</sub>) were adjusted to a mathematical model.

### EAE Nanoemulsions Preparation

Nanoemulsions consisted of EAE:EOPO mixture (4:1) as oil phase (OP), while deionized water and different blends (TEmix) of Tween 20 (0.3–24%), and EtOH (0.3–16%), as surfactant and cosurfactant, respectively, constituted the nanoemulsions continuous aqueous phase (AP) as shown in Table 1. In order to obtain coarse emulsions an Ultra-Turrax T10 basic (IKA-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, USA) was used at 8000 rpm for 3 minutes. The coarse emulsions were then sonicated at 70% amplitude and at a frequency of 20 kHz during 10 minutes with a Sonic Vibra Cell (Model VCX 130PB, Newtown, CT, USA) and a 6 mm diameter tip horn. The ultrasonic

TABLE 1  
Composition of nanoemulsion formulations

Formulation	OP (% w/w)	OP/TEmix	Water (% w/w)
F1	3	1.0:2.0	91.0
F2	3	1.0:1.5	92.5
F3	3	1.0:1.0	94.0
F4	3	1.5:1.0	95.5
F5	3	2.0:1.0	95.5
F6	5	1.0:2.0	85.0
F7	5	1.0:1.5	87.5
F8	5	1.0:1.0	90.0
F9	5	1.5:1.0	91.6
F10	5	2.0:1.0	92.5
F11	10	1.0:2.0	70.0
F12	10	1.0:1.5	75.0
F13	10	1.0:1.0	80.0
F14	10	1.5:1.0	83.3
F15	10	2.0:1.0	85.0
F16	15	1.0:2.0	55.0
F17	15	1.0:1.5	62.5
F18	15	1.0:1.0	70.0
F19	15	1.5:1.0	75.0
F20	15	2.0:1.0	77.5
F21	20	1.0:2.0	40.0
F22	20	1.0:1.5	50.0
F23	20	1.0:1.0	60.6
F24	20	1.5:1.0	66.6
F25	20	2.0:1.0	70.0

These formulations were made for TEmix ratios of 1:0, 1:0.2, 1:0.3 and 1:0.4.

procedure was repeated three times with a delay time of 2 minutes between each step. The nanoemulsions obtained then were stored at 4 and 25°C, respectively, for 12 weeks. During emulsification, the difference of temperature from initial coarse emulsions to final emulsion was not more than 20°C.

### Droplet Size of O/W Nanoemulsions

The average droplet size of nanoemulsions containing *E. arvensis* extracts was determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). A refractive index of 1.334 was used.

### Pseudo-Ternary Phase Diagrams

Tween 20 and EtOH were selected as surfactant and cosurfactant, respectively. Distilled water was used as AP. Surfactant and cosurfactant (TEmix) were blended in different mass ratios (1:0, 1:0.2; 1:0.3; 1:0.4). For each phase diagram, the OP made up by EAE:EOPO mixture

(4:1) and TEmix at a specific ratio was mixed thoroughly at different mass ratios from 1:2 to 2:1, and varying the OP from 3 to 20% weight as shown in Table 1. Twenty five formulations ( $F_i$ , where the subscript  $i$  represents the number of each formulation) were made so that maximum ratios were covered for the study to delineate the boundaries of phases precisely formed in the phase diagrams. Pseudo-ternary phase diagrams of OP, TEmix and AP were developed using the aqueous titration method. Slow titration with AP was performed for each mass ratio of OP and TEmix and visual observations were made for transparent and easily flowable O/W nanoemulsions. The droplet size of  $F_i$  was measured following the procedure described above. The physical state of the nanoemulsion was marked on a pseudo-three-component phase diagram with one axis representing the AP, the second one representing the OP and the third representing TEmix at fixed mass ratios.

From each phase diagram constructed, different  $F_i$ s that displayed droplet sizes smaller than 100 nm and were transparent were selected.

### Experimental Design

Response surface methodology (RSM) was used to study the effect of the independent variables: concentration of OP ( $C_1$ ), concentration of OP/TEmix ( $C_2$ ) using a surfactant:cosurfactant ratio of 1:0.3, on the droplet size ( $Y_1$ ) of the nanoemulsions  $F_i$ , now named  $F_{RSM,i}$  nanoemulsions. The experiments were designed according to the central composite design (CCD) using a  $3^2$  factorial design with three central points as shown in Table 2. Individual experiments were carried out in random order. A second order polynomial equation was used to express the droplet size ( $Y_1$ ) of the nanoemulsions as a function

of the independent variables as follows:

$$Y = b_0 + b_1C_1 + b_2C_2 + b_{11}C_1^2 + b_{12}C_1C_2 + \varepsilon, \quad [1]$$

where  $Y$  represents the response variable,  $b_0$  is a constant,  $b_i$  and  $b_{ij}$  are the linear and interactive coefficients, respectively, and  $\varepsilon$  is the experimental error.  $C_1$  and  $C_2$  are the two independent variables studied. The coefficients of the response surface equation were determined using Statgraphics software version Centurion XV.II (Stat point, Inc., Warrenton, VA, USA).

### Encapsulation Efficiency

An aliquot of fresh EAE was scanned from 400 to 700 nm using a spectrophotometer Spectronic Genesys 2 (Spectronic Instruments, Madison, WI, USA), where the maximum absorbance was found at  $\lambda_{\max} = 440$  nm. The concentration of EAE trapped within nanoemulsions was determined according with the modified method of Ax et al.<sup>[21]</sup> 1 mL of nanoemulsion  $F_{RSM,i}$  was added in 5 mL of EtOH-Hexane (1:1.5) mixture. The blend was vortexed during 2 minutes then it was transferred into a separating funnel letting rest for 1 hour. The hexane phase volume was removed and 5 mL of EtOH-hexane mixture were added to the remained ethanolic phase repeating this procedure once more. All the hexane phases were joined and the absorbance was measured at 440 nm. The concentration of EAE in the hexane phase was determined using a standard curve of free EAE. The encapsulation efficiency was determined with the following equation:

$$EE\% = \frac{EAE_{OP}}{EAE_{nanoemulsion}} \times 100,$$

where  $EE\%$  is the EAE encapsulation efficiency,  $EAE_{OP}$  is the EAE content present in the hexane phase, and  $EAE_{nanoemulsion}$  is the initial EAE content added in the nanoemulsions  $F_{RSM,i}$ .

### Stability of Nanoemulsions

The stability of nanoemulsions  $F_{SRM,i}$  was evaluated by measuring the change of droplet size, according with the method described before, every week during the storage at 4 and 25°C for 12 weeks.

### Protective Effect of Nanoemulsions against EAE Degradation

The protection against EAE degradation was done by monitoring changes in antioxidant activity by DPPH method. Measurements were done each week during storage at 4 and 25°C for 12 weeks.

TABLE 2  
Central Composite Design for  $F_{RSM,i}$  nanoemulsion

Formulation	OP (% w/w)	OP/ TEmix	Droplet size (nm)
FRSM,1	15	2.0:1.0	72
FRSM,2	10	1.0:1.5	54
FRSM,3	15	1.0:1.5	78
FRSM,4	15	1.0:1.0	82
FRSM,5	20	1.0:1.0	110
FRSM,6	15	1.0:1.5	82
FRSM,7	15	1.0:1.5	82
FRSM,8	15	1.0:1.5	83
FRSM,9	20	1.0:1.5	94
FRSM,10	20	2.0:1.0	99
FRSM,11	10	2.0:1.0	54
FRSM,12	10	1.0:1.0	72

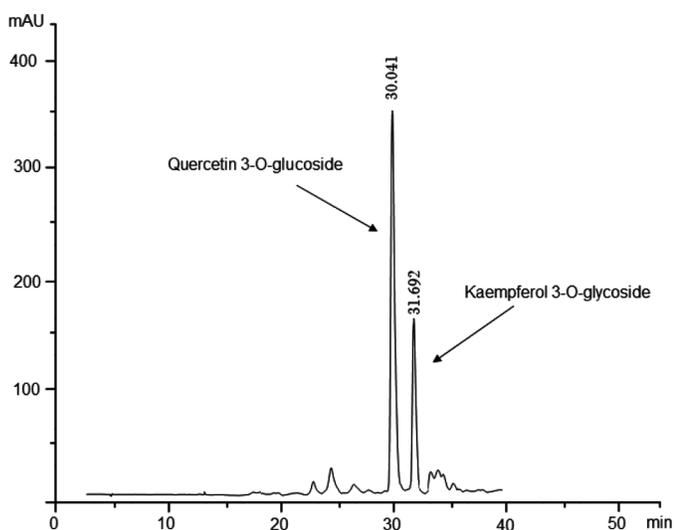


FIG. 1. HPLC chromatogram of EAE. Detection at 350 nm.

### Statistical Analysis

The results were presented as the average of at least triplicates and analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the Sigma Plot software 11.0 (Washington DC, USA). Differences among the means were compared using a Tukey test with a significance level of  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### HPLC Characterization of Extract

Flavonoids glycosides (quercetin 3-O-glucoside and kaempferol 3-O-glycoside) were identified by HPLC analysis of EAE (Figure 1). These compounds were previously described as the main constituents in *E. arvensis*.<sup>[22,23]</sup> The main compound was quercetin 3-O-glucoside (385 mg/g<sub>DE</sub>) while kaempferol 3-O-glycoside also was detected in considerable amounts (31.5 mg/g<sub>DE</sub>). These results confirm the concentrations of 382 mg/g<sub>DE</sub> for the latter compound and of 26.20 mg/g<sub>DE</sub> for the former compound reported by Mímica-Dikic et al.<sup>[1]</sup>

### Antioxidant Activity of Extract

Fresh free EAE displayed an initial antioxidant activity of 10.3 mM TEAC, which is within the antioxidant activity range reported for different brands of black tea<sup>[24]</sup> and green tea.<sup>[25]</sup> DPPH radical scavenging was drastically reduced upon storage at 25 and 4°C. At both temperatures, DPPH scavenging dropped down to scarcely 3% after 3 weeks (Figure 2). The curves of loss of antioxidant activity of the free (nonemulsified) EAE were adjusted experimentally to various mathematical models and the best fit was obtained using a first-order kinetic model. Kinetic parameters for the loss in antioxidant activity were: first order

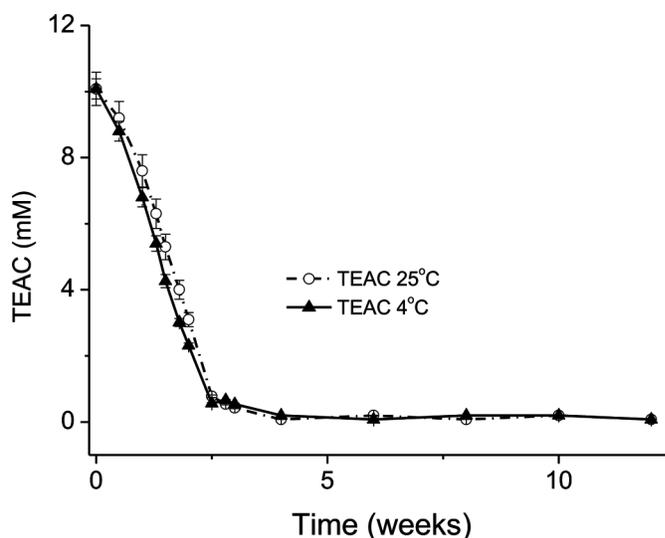


FIG. 2. Antioxidant activity decay of fresh EAE.

kinetic constants ( $k$ ) 0.661 and 0.804 weeks<sup>-1</sup>; correlation coefficients ( $R^2$ ) 0.983 and 0.962; half-life time ( $t_{1/2}$ )  $1.05 \pm 0.03$  and  $0.86 \pm 0.03$  weeks for free EAE stored at 25 and 4°C, respectively. According with these results, the bioavailability and functionality of free EAE is limited by its poor stability, caused mainly by the loss in antioxidant activity, restricting its use to fresh intake. Thus, the EAE incorporation into nanoemulsions emerges as the alternative to prolong their shelf life while maintaining the antioxidant activity.

### Pseudo-Ternary Phase Diagram

Pseudoternary phase diagrams were developed to establish the components concentration range for the formation of  $F_i$  nanoemulsions. It was found that O/W nanoemulsions created with the four TEMix ratios (Figures 3a–3d) were kinetically stable, optically transparent and characterized by a single phase of liquid solution. The effect of the different TEMix ratios over the region where O/W nanoemulsions were formed ( $R_{O/W}$ ) was compared, finding that as the EtOH content was higher, so was the resulting  $R_{O/W}$ . This could be attributed to EtOH capability for decreasing the bending stress of the oil-water interface by providing sufficient flexibility to the interfacial films allowing them to adopt different curvatures required to form nanoemulsions over a wide range of compositions.<sup>[26]</sup> Non-significant differences in  $R_{O/W}$  were found when TEMix of 1.0:0.3 and 1.0:0.4 were used (Figures 3c–3d).

### Analysis of Response Surfaces

To visualize the effect of independent variables and their interactions on the droplet size of O/W nanoemulsions, a statistical method based on ANOVA was used for

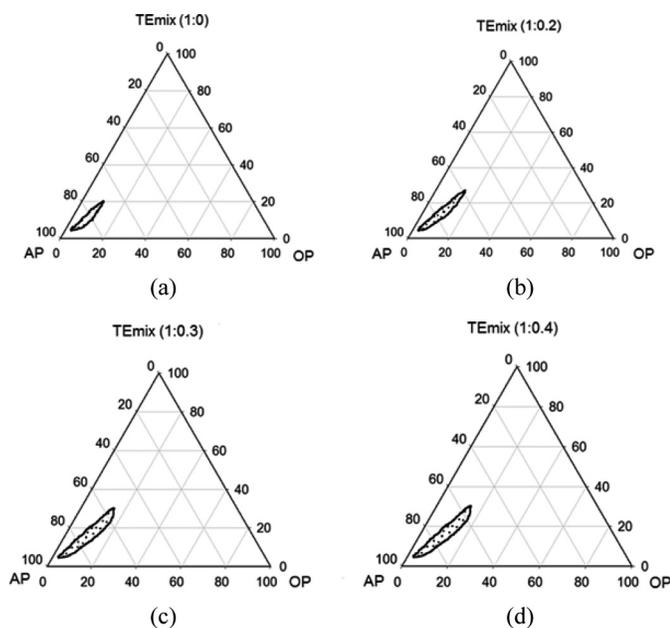


FIG. 3. Pseudo-ternary phase diagrams of  $F_1$  nanoemulsion formation region with different TEMix ratios: a) 1:0; b) 1:0.2; c) 1:0.3; and d) 1:0.4.

determining the statistical significance of effects and interactions comparing the mean square with an estimation of experimental error, and surface response and contour plots of the quadratic polynomial models were generated.<sup>[27,28]</sup> Effects and interactions are defined as the differences between the mean droplet size obtained at the low level and the mean droplet size obtained at the high level of each variable. Table 3 shows the estimated effects and interactions, also showing the standard error to each effect. For OP, OP/TEMix, and (OP/TEMix  $\times$  OP/TEMix) terms, large  $F$  values and small  $p$  values ( $p < 0.5$ ) were obtained, indicating a more significant effect on the response variable; the quadratic term (OP  $\times$  OP) and crossed term (OP  $\times$  OP/TEMix) did not show significant effect

TABLE 3

ANOVA of the data obtained using  $3^2$  factorial design

	Sum of squares	d.f.	Mean square	F-ratio	P-value
A: EAE	4144.08	1	4144.08	289.84	0.0000
B: OP/TEMix	4641.33	1	4641.33	324.62	0.0000
AA	540.021	1	540.021	37.77	0.0000
AB	420.5	1	420.5	29.41	0.0000
BB	792.188	1	792.188	55.41	0.0000
Total Error	243.063	16	14.2978		
Total (corr.)	10457.8	22			

( $p > 0.5$ ), therefore they did not have influence on nanoemulsion properties. Thus, the term with the largest effect on the droplet size of the nanoemulsions was the term OP, followed by OP/TEMix, (OP/TEMix  $\times$  OP/TEMix), respectively.

The results of this study show that experimental response as a function of OP and OP/TEMix on droplet size could be approximated by a quadratic equation, in terms of the significant variables (effects with  $p$ -value lower than 0.05) as follows:

$$\begin{aligned} \text{Droplet size (nm)} = & a + b(\text{OP}) - c(\text{OP/TEMix}) \\ & + d(\text{OP})^2 - e(\text{OP} \times \text{OP/TEMix}), \\ & + f(\text{OP/TEMix})^2 \end{aligned} \quad [3]$$

where  $a = 36.81 \pm 2.78$ ;  $b = 3.14 \pm 0.67$ ;  $c = 62.83 \pm 4.69$ ;  $d = 0.08 \pm 0.01$ ;  $e = 1.8 \pm 0.70$ ;  $f = 75.00 \pm 6.20$ .

The  $R^2$  of Equation (3) was 95.25%, indicating that a good fitting was achieved.

Surface response and contour plots generated by varying two of the independent variables within the experimental range are shown in Figure 4. These graphs offer a visual means of understanding how factors influence the measurement system. In this case, the droplet size of nanoemulsions increased with the raising in concentration of OP and the decreasing of OP/TEMix concentration. This could be attributed to surfactant's ability to reduce the interfacial tension at the oil-water interface and the droplet size after a high energy input was applied to the system. Nevertheless, when the OP concentration was increased, the surfactant concentration was not enough for reducing the interfacial tension and consequently the droplet size tended to become larger. On the contrary, when the amount of surfactant was increased, the droplet size tended to be smaller due to the greater reduction in the interfacial tension.<sup>[29]</sup>

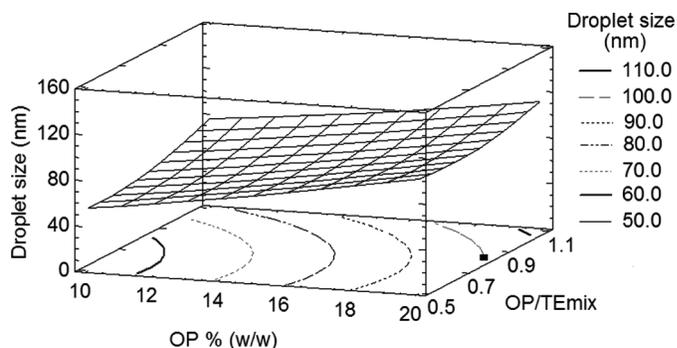


FIG. 4. Response surface and contour plots: droplet size as a function of OP and OP/TEMix.

From contour and response surface plots data, the best nanoemulsion formulation was the one that trapped the highest OP concentration with a droplet size less than or equal to 100 nm (maximum size required for nanoemulsion droplets).<sup>[30,31]</sup> The resulting best nanoemulsion was that containing a 19.98% (w/w) of OP with a 0.82 OP/TEMix ratio (Figure 4). This nanoemulsion was coded as  $F_{RSM,0}$  and it was evaluated for EE% and droplet stability when stored at 25 and 4°C.

### Encapsulation Efficiency

$F_{RSM,0}$  had a EE% of  $97.5 \pm 0.5\%$  of EAE, and this result was similar to that shown by  $F_{RSM,2}$  ( $97.2 \pm 0.4\%$ ) and  $F_{RSM,3}$  ( $97.0 \pm 0.6\%$ ), which were randomly chosen from Table 2 for corroboration purposes, finding that non-significant differences ( $p < 0.05$ ) existed between the three treatments. These encapsulation efficiencies are of the order of those reported by several other authors.<sup>[32–34]</sup> The relatively small amount of EAE not incorporated into the nanoemulsions could be attributed to a normal loss during the emulsification process.<sup>[35]</sup>

### Effect of Storage Temperature on Nanoemulsions Droplet Size

The  $F_{RSM,0}$ ,  $F_{RSM,2}$ , and  $F_{RSM,3}$  were also evaluated for stability when stored at 25 and 4°C, in terms of droplet size changes after 12 weeks of storage. The variations in droplet size are shown in Figure 5. It can be seen that the nanoemulsions at 4°C did not suffer significant changes, but those at 25°C showed a significant increase in droplet size after 8 weeks of storage. This increase in droplet size at relatively higher temperature may be due to coarsening by Ostwald ripening and/or coalescence, main mechanisms of destabilization in nanoemulsions.<sup>[36–38]</sup> Nonetheless, these adverse effects observed at 25°C could be avoided

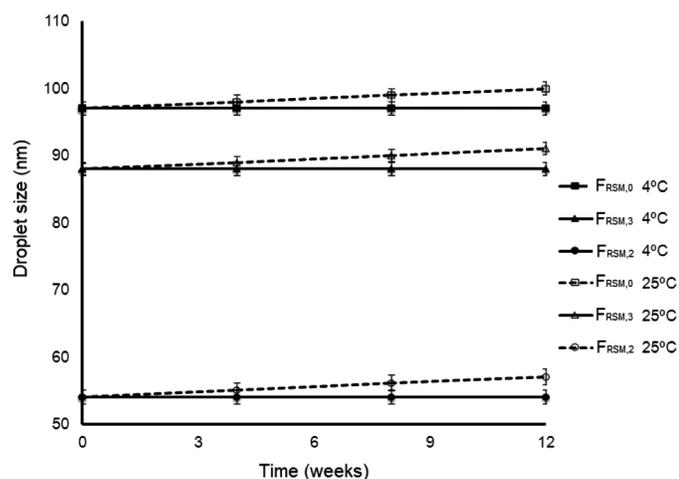


FIG. 5. Change in droplet size of nanoemulsions stored at 4 and 25°C.

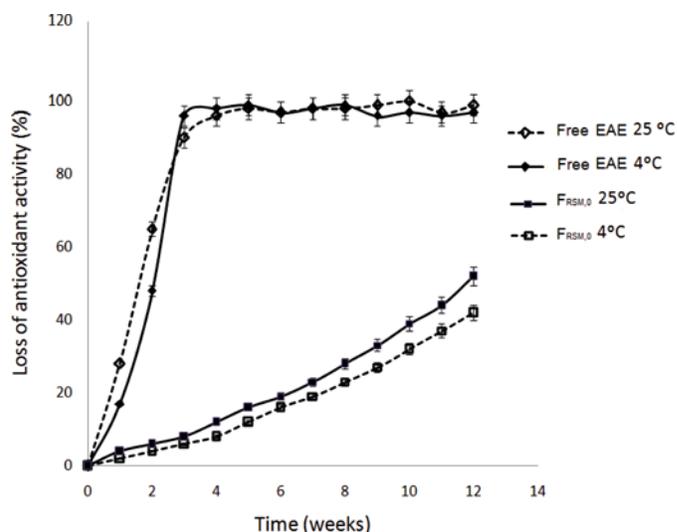


FIG. 6. Comparison of antioxidant activity loss of nanoencapsulated EAE and free EAE stored at 4 and 25°C. (Figure available in color online.)

by storing the nanoemulsions at optimum temperatures, since these systems are capable to revert to the initial nanoemulsion condition.<sup>[39]</sup>

### Protective Effect of Nanoemulsions on EAE

Figure 6 exhibits the antioxidant activity profiles for  $F_{RSM,0}$  and free EAE during 12 weeks of storage at 25 and 4°C, respectively. It should be mentioned that  $F_{RSM,2}$  and  $F_{RSM,3}$  displayed nonsignificant different antioxidant activity profiles to that shown by  $F_{RSM,0}$ , and for simplicity sake these data were not plotted in Figure 6. Free EAE showed a rapid loss in antioxidant activity, independently of storage temperature, which dropped to an almost nil value after approximately 3 weeks of storage.  $F_{RSM,0}$  displayed gradual loss in antioxidant activity that was much more milder than that suffered by the free EAE. After the 12 weeks storage period the loss in antioxidant activity for  $F_{RSM,0}$  was of  $50.5 \pm 2.3\%$  at 25°C and of  $42.0 \pm 1.9\%$  at 4°C. The experimental data at both temperatures for the three nanoemulsions fitted well a first order kinetics model, and their kinetics parameters  $k$  and  $t_{1/2}$  are given in Table 4. For all the nanoemulsions ( $F_{RSM,0}$ ,  $F_{RSM,2}$ , and  $F_{RSM,3}$ ) the antioxidant loss rate was approximately 11 times slower and the time required to decrease their antioxidant activity by half was significantly larger (over 10-fold times) than that than for the free EAE. Storage temperature affected significantly the kinetic parameters of nanoemulsions containing EAE, values of  $k$  being significantly higher and those of  $t_{1/2}$  significantly lower at 25°C than at 4°C. These results confirm that the incorporation of EAE into nanoemulsions ensures the integrity of the encapsulated bioactive compound not only throughout the nanoemulsion formation process but also during its storage.

TABLE 4  
Initial antioxidant activity as TEAC (mM) and kinetic parameters of  $F_{RSM,i}$  nanoemulsions

Sample	K (weeks <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub>
FRSM,0 4°C	0.048	0.9465	14.56 ± 0.60a
FRSM,0 25°C	0.056	0.9274	12.32 ± 0.40a
FRSM,2 4°C	0.050	0.9488	13.97 ± 0.50a
FRSM,2 25°C	0.057	0.9179	12.17 ± 0.40b
FRSM,3 4°C	0.048	0.0961	14.46 ± 0.30a
FRSM,3 25°C	0.058	0.1270	11.98 ± 0.40b

The initial TEAC value was 10.30 ± 0.08 mM.

## CONCLUSIONS

Experimental design permitted to optimize the nanoemulsion formulation for achieving a high oil phase load, high encapsulation efficiency, desired droplet size, and most importantly, to provide an extended bio functional antioxidant shelf-life to the *E. arvensis* extracts by increasing their half-life time over 11 weeks. This work establishes the basis for the development of commercial products containing *E. arvensis* extracts nanoemulsions which can exert their required antioxidant activity up to the expiry date of the product.

## REFERENCES

- [1] Mímica-Dukic, N., Simin, N., Cvejic, J., Jovin, E., Orcic, D., and Bozin, B. (2008) *Molecules*, 13: 1455–1464.
- [2] Veit, M., Beckert, C., Hohne, C., Bauer, K., and Geiger, H. (1995) *Phytochemistry*, 38 (4): 881–891.
- [3] Danielski, L., Michielin, E.M.Z., and Ferreira, S.R.S. (2007) *J. Food Eng.*, 78: 1054–1059.
- [4] Pietta, P., Mauri, P., Bruno, A., Rava, A., Manera, E., and Ceva, P. (1991) *J. Chromatogr. A*, 553: 223–231.
- [5] Verbeyst, L., Oey, I., Van der Plancken, L., Hendrickx, M., and Van Loey, A. (2010) *J. Food Chem.*, 123: 269–274.
- [6] Domínguez-López, A., Remondetto, G.E., and Navarro-Galindo, S. (2008) *Int. J. Food Sci. Tech.*, 43: 322–325.
- [7] Friedman, M. and Jurgens, H.S. (2000) *J. Agr. Food Chem.*, 48: 2101–2110.
- [8] Ortiz-Estrada, C.H., Santoyo-Arreola, J.G., Luna-Barcenas, G., Sánchez, I.C., and Vázquez-Medrano, R.C. (2007) *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 6: 347–357.
- [9] Meireles, M.A.A. (2008) *EJEAFChE*, 7 (8): 3254–3258.
- [10] Scalbert, A. and Williamson, G.J. (2000) *Nutr.*, 130: 2073S–2085S.
- [11] Dillard, C.J. and German, J.B. (2000) *J. Sci. Food Agr.*, 80: 1744–1756.
- [12] Zhou, H., Yue, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, J., Gong, Q., Yan, Z., and Duan, M. (2010) *Nanoscale Res. Lett.*, 5: 224–230.
- [13] Hoeller, S., Sperger, A., and Valenta, C. (2009) *Int. J. Pharm.*, 370: 181–186.
- [14] Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., and Zhao, J. (2008) *J. Food Res. Int.*, 41: 61–68.
- [15] Kelmann, R.G., Kuminek, G., Teixeira, H.F., and Koester, L.S. (2007) *Int. J. Pharm.*, 342: 231–239.
- [16] Brusewitz, C., Schendler, A., Funke, A., Wagner, T., and Lipp, R. (2007) *Int. J. Pharm.*, 339: 173–181.
- [17] Couvreur, P., Dubernet, C., and Puisieux, F. (1995) *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41: 2–3.
- [18] Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G., Cui, J., Pardakhty, A., and Yurdugul, S. (2008) *S. Int. J. Food Prop.*, 11: 833–844.
- [19] Fang, Z. and Bhandari, B. (2010) *Trends Food Sci. Tech.*, 21: 510–523.
- [20] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J., and Saura-Calixto, F. (1998) *J. Sci. Food Agr.*, 76: 270–276.
- [21] Ax, K., Mayer-Miebach, E., Link, B., Schuchmann, H., and Schubert, H. (2003) *Eng. Life Sci.*, 4: 199–201.
- [22] Veit, M., Beckert, C., Hohne, C., Bnauer, K., and Geiger, H. (1995) *Phytochemistry*, 38: 881–891.
- [23] Veit, M., Geiger, H., Czygan, F., and Markham, K. (1990) *Phytochemistry*, 29: 2555–2560.
- [24] Rechner, A.R., Wagner, E., Van Buren, L., Van de Put, F., and Rice-Evans, C.A. (2002) *Free Radical Res.*, 36: 1127–1135.
- [25] Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J.J., Blanca-Herrera, R., Villalón-Mir, M., López-García de la Serrana, and López-Martínez, M.C. (2011) *J. Food Compos. Anal.*, 24: 79–86.
- [26] Kawakami, K., Yoshikawa, T., Moroto, Y., Kanoaka, E., Takahashi, K., Nishihara, Y., and Masuda, K. (2002) *J. Control Release*, 81: 65–74.
- [27] Pey, C.M., Maestro, A., Solé, I., González, C., Solans, C., and Gutiérrez, J.M. (2006) *Colloid Surface A*, 288: 144–150.
- [28] Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., and Zhao, J. (2008) *Food Chem.*, 107: 1300–1306.
- [29] Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. (2004) *Adv. Colloid. Interfac.*, 108–109: 303–318.
- [30] Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., and Shafiq, S. (2007) *AAPS*, 8: 4.
- [31] Sonnevile-Aubrun, O., Simonnet, J.-T., and L'Alloret, F. (2004) *Adv. Colloid Interfac.*, 108–109: 145–149.
- [32] Suvimol, S., Sang-Gi, M., Oyyawan, B., and Mi-Jung, C. (2010) *Food Res. Int.*, 43: 8–17.
- [33] Ganta, S. and Amiji, M. (2008) *Mol. Pharmaceut.*, 6 (3): 928–939.
- [34] Prego, C., Torres, D., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E., and Alonso, M.J. (2006) *J. Control Release*, 111: 299–308.
- [35] Tan, C.P. and Nakajima, M. (2005) *J. Sci. Food Agr.*, 85: 121–126.
- [36] Shah, P., Bhalodia, D., and Shelat, P. (2010) *Sys. Rev. Pharm.*, 1: 24–32.
- [37] Taylor, P. (1995) *Colloids and Surfaces A*, 99: 175–85.
- [38] Lifshitz, I.M. and Slyozov, V.V. (1961) *J. Phys. Chem. Solids*, 19: 35–50.
- [39] Ee, S.L., Duan, X., Liew, J., and Nguyen, Q.D. (2008) *Chem. Eng. J.*, 140: 626–631.