



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS

POSGRADO

UNIDAD MONTERREY

**“DESARROLLO DE NANOEMULSIONES DE ACEITES
ESENCIALES CÍTRICOS ESTABILIZADAS CON GOMAS DE
ORIGEN NATURAL”**

**Tesis como Requisito para obtener el Grado de Maestría en
Ciencias de Materiales Presenta:**

MAIRA BERENICE MORENO TREJO

DIRECTORAS DE TESIS:

DRA. MARGARITA SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

DRA. ÁNGELA SUAREZ JACOBO

Apodaca, Nuevo León, México

Noviembre del 2013

Agradecimientos

Dicen que la gratitud es la llave maestra que abre todas las puertas de la posibilidad y escoger las palabras adecuadas para agradecerles a todas aquellas personas que me permiten cerrar este ciclo de mi vida, requiere de toda mi capacidad de redacción. Gracias por su apoyo y su paciencia.

A mis asesoras de tesis, Dra. Margarita Sánchez Domínguez y Dra. Ángela Suarez Jacobo, por su constante y valiosa guía, todas las enseñanzas otorgadas y además de su infinita paciencia, compromiso tanto con el proyecto como con mi persona y por ser geniales y críticas.

Un agradecimiento especial al Dr. Servando Aguirre Tostado por todo el apoyo otorgado, que sin él no estuviera aquí.

Al comité de evaluación, Dra. Tania Lara Cisneros y Dr. Rodrigo Mayén Mondragón por sus oportunos comentarios y sus valiosos conocimientos.

Un profundo agradecimiento al Centro de Investigación en Materiales Avanzados (Unidad Monterrey) por permitirme utilizar sus instalaciones y darme una gran experiencia en este ciclo de mi vida. A las autoridades directivas, investigadores y al cuerpo de técnicos que fueron muy amables conmigo, pero en especial un enorme agradecimiento a la técnico MC. Patricia Cerda por todo el inmenso apoyo durante las caracterizaciones de las diversas muestras y durante la fase de análisis.

Al Centro de investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (Unidad Noroeste) por permitirme el acceso a los equipos para la formulación de mis nanoemulsiones; en dicha institución MC. Lilia Torres recibe de mí un gran agradecimiento por ser una gran persona conmigo y apoyarme en todo.

A la Incubadora de Nanotecnología del Instituto de Innovación y Transferencia de Tecnología de Monterrey por prestarme sus instalaciones para hacer pruebas microbiológicas, por lo que quiero agradecer muy en especial al Dr. Guillermo Acosta por las capacitaciones otorgadas y a la practicante QFB. Ashanti Rodríguez por no rendirse conmigo y aportar valiosas ideas que sacaron este proyecto adelante.

A Frutech por la donación de sus aceites esenciales cítricos y la capacitación otorgada.

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado una beca para realizar esta investigación.

A mis compañeros quienes me acompañaron en esta trayectoria de aprendizaje y conocimiento.

A mi madre por siempre estar conmigo en cada mi momento de mi vida, por su preocupación, cariño infinito, por darme todo lo necesario y mucho más para ser una buena estudiante e hija. Le dedico este trabajo porque debo agradecerle de aquí hasta el infinito por todos sus sacrificios. Te extraño.

Índice

Agradecimientos	ii
Índice	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	viii
Resumen	1
I. Introducción	3
II. Antecedentes	6
2.1 Emulsiones	6
2.1.1 Inestabilidad de las Emulsiones	7
2.1.2 Diseño de Emulsiones Convencionales	9
2.2 Nanoemulsiones	10
2.2.1 Propiedades y Limitaciones de las nanoemulsiones.....	10
2.2.2 Formación de Nanoemulsiones	12
2.2.3 Estabilidad de Nanoemulsiones.....	15
2.3 Emulsificantes.....	17
2.3.1 Tipos de emulsificantes.....	18
2.3.2 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)	20
2.3.3 Tween 80 y Span 20	22
2.3.4 Concentración micelar crítica (CMC)	24
2.4 Gomas	26
2.4.1 Goma de Mezquite.....	26
2.4.2 Goma arábica	27
2.4.3 Similitudes y Diferencias entre la Goma arábica y de mezquite.	27
2.4.4 Goma de Nopal	29
2.5 Aceites Esenciales Cítricos.....	30
2.6 Estudios Previos	32
III. Justificación.....	36
IV. Objetivos	38
4.1 Objetivo General.....	38
4.2 Objetivos Específicos	38
V. Hipótesis.....	39

VI.	Materiales y Métodos	40
6.1	Materiales.....	40
6.2	Métodos.....	42
6.2.1	Etapa 1: Caracterización de Materias Primas	42
6.2.2	Etapa 2.- Desarrollo de formulaciones de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos.....	54
6.2.3	Etapa 3.- Caracterización de las nanoemulsiones obtenidas para selección de la formulación más óptima.	60
VII.	Resultados	63
7.1	Etapa 1: Caracterización de Materia Prima y Purificación de Goma de Mezquite.....	63
7.1.1	Caracterización de las gomas comerciales.....	63
7.1.2	Obtención de goma de mezquite y su caracterización.....	67
7.1.3	Análisis termogravimétrico (TGA/DTA) de las gomas.....	71
7.1.5	Estudios de Tensión Interfacial Agua/Aceite utilizando diferentes gomas.....	76
7.1.6	Análisis de los Aceites Esenciales Cítricos.....	79
7.1.7	Actividad Antibacterial.....	85
7.2	Etapa 2.- Desarrollo de la metodología general para la formulación de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos.....	87
7.3	Etapa 3.- Estudio sistemático para el desarrollo y caracterización de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos.....	91
7.3.1	1ª Serie de experimentos.....	91
7.3.2	2ª Serie de Experimentos.....	97
7.3.3	3ª Serie de Experimentos.....	100
7.3.4	4ª Serie de Experimentos.....	101
7.3.5	Seguimientos de tamaño en función del tiempo.....	104
7.3.6	Actividad Antimicrobiana.....	110
VIII.	Conclusiones.....	118
8.1	Conclusiones General	118
8.2	Etapa 1	118
8.3	Etapa 2.....	119
8.4	Etapa 3.....	119
IX.	Trabajo a Futuro.....	122
X.	Referencias.....	123
XI.	Anexos	128

11.1 ANEXO A.- Aprobación de la FDA para el Tween 80.....	128
11.2 ANEXO B.- Aprobación de la FDA para el Span 20.....	130
11.3 ANEXO C.- Prueba de CMI	137
11.4 ANEXO D.- Siembra de Cajas	141
11.5 ANEXO E.- Tinciones simples	142

Índice de Figuras

Nombre de la Figura	Página
Figura 2.1.- Procesos de desestabilización de las emulsiones.	8
Figura 2.2.- Representación esquemática de emulsificación espontánea.	15
Figura 2.3.- Maduración de Ostwald en descripción gráfica.	17
Figura 2.4.- Estructura de un surfactante o tensoactivo.	18
Figura 2.5.- Criterio de selección de un tensoactivo para la formación de nanoemulsiones aceite en agua.	20
Figura 2.6.- Clasificación de agentes emulsionantes de acuerdo a su HLB.	21
Figura 2.7.- Molécula del Tween 80.	23
Figura 2.8.- Molécula de Span 20.	24
Figura 2.9.- Estructuras de Sacáridos de la Goma de Mezquite.	28
Figura 2.10.- Estructura Primaria de la Goma de Mezquite.	28
Figura 2.11.- Estructura Primaria de la Goma Arábica.	29
Figura 2.12.- Sacáridos que componen a la goma de nopal.	30
Figura 2.13.- Componentes principales del aceite esencial de limón persa.	31
Figura 6.1.- Diagrama de Etapa 1 Original.	42
Figura 6.2.- Primer grupo de viales.	44
Figura 6.3.- Reómetro ARG2 en proceso de medición con control de temperatura mediante chaqueta termostatzada.	44
Figura 6.4.- Condición de muestra para medición en Tensiómetro.	45
Figura 6.5.- Gotas de Goma en Medio Oleoso.	45
Figura 6.6.- Perlas de Mezquite.	46
Figura 6.7.- Perlas de Mezquite calidad GMA y GMB.	46
Figura 6.8.- Perlas reducidas de tamaño por medio de molienda.	47
Figura 6.9.- Perlas de mezquite convertidas en polvo fino.	47
Figura 6.10.- Filtrado de la goma de mezquite para eliminar impurezas.	48
Figura 6.11.- Goma Filtrada y Limpia (Izq.)/Goma con Impureza (Der.).	48
Figura 6.12.- Goma secada por horno (Izq.) /Goma secada por Liofilización (Der.).	48
Figura 6.13.- Titulador en proceso de medición de aldehídos.	51
Figura 6.14.- Rotación Óptica en Polax.	52
Figura 6.15.- Caja de CMI.	53
Figura 6.16.- Explicación Gráfica de los experimentos de CMI.	53
Figura 6.17.- Microfluidizer M-110P de Microfluidics.	54
Figura 6.18.- Diagrama de funcionamiento del Microfluidizer.	55
Figura 6.19.- Diagrama de Procesamiento de la Etapa 2: formación de nanoemulsiones.	55
Figura 6.20.- Muestra preparada para DLS.	61
Figura 7.1.- Gráfica de Reología estacional de las Gomas de Green Corp y Goma Arábica.	64
Figura 7.2.- Gráfica de Reología estacional de goma de nopal a 25°C, a diferentes concentraciones.	66
Figura 7.3.- Viscosidad Aparente vs velocidad de cizalla de goma arábica disuelta en agua.	67
Figura 7.4.- A) Goma de Mezquite con textura densa (GML-2); B) Goma de Mezquite liofilizada al 40% (GML-3) C) Goma de Mezquite con textura "esponjada" (liofilizada al 20%).	68
Figura 7.5.- Gráfica de Reología Estacional de las distintas Gomas de mezquite liofilizadas y Goma Arábica al 20%.	69
Figura 7.6.- Curva Termogravimétrica de Goma Arábica.	71
Figura 7.7.- Termograma Primario de las Gomas.	72
Figura 7.8.- Termograma Derivado de las Gomas.	72
Figura 7.9.- Análisis de FT-IR de la goma arábica, goma de mezquite y sus fracciones reportado en la literatura.	74
Figura 7.10.- Gráfica de FT-IR de las Gomas.	75
Figura 7.11.- A) Gota de Goma de Mezquite con Ambiente de Limón Persa, B) Gota de Goma de Mezquite en Ambiente de Toronja Rosa + Girasol, C) Gota de Goma de Nopal en Ambiente de Limón Persa + Girasol, D) Gota de Goma de Nopal en Ambiente de Toronja Rosa.	77
Figura 7.12.- Perfil cromatográfico de la muestra analizada por GC/MS de Aceite Esencial de Limón Persa.	83
Figura 7.13.- Perfil de cromatográfico de la muestra analizada por GC/MS de Aceite Esencial de Toronja Rosa.	84
Figura 7.14.- Resultado del Experimento A1: Presencia de Bacterias en Micropozos.	86
Figura 7.15.- Resultado del Experimento A2: Presencia de Bacterias en Micropozos.	87
Figura 7.16.- Proceso para la formulación de las nanoemulsiones A) Fase oleosa y acuosa de las nanoemulsiones, B) Preparación de pre-emulsión mediante agitación de alta velocidad C) Acondicionamiento del Homogeneizador, D) Proceso de Alta Presión, E) Recolección de la Muestra, F) Muestra Lista para Esterilización.	88
Figura 7.17.- Gráfica de Resultados de Tamaño de Gota* del experimento A3.	90
Figura 7.18.- Poblaciones de Tamaños de Gota en Experimento Goma Arábica 15 V.	93
Figura 7.19.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Lecitina 1 V.	94
Figura 7.20.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Tween 80 15 V.	94
Figura 7.21.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Lecitina 50%/Goma Arábica 50% 7 V.	95
Figura 7.22.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Tween 80 50% / Goma Arábica 50% 7 V.	96
Figura 7.23.- Tamaños de Gota en Experimento Tween 80 50% / Lecitina 50% 7 V.	96
Figura 7.24.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de las Nanoemulsiones de la 2ª Serie.	98
Figura 7.25.- Fotografía de la nanoemulsión 3B recién recolectada del Homogeneizador.	99
Figura 7.26.- Distribución del Tamaño por Volumen de los Controles de Ajuste para 3B.	101

Figura 7.27.- Fotografía de Control 3 con 10 V.	102
Figura 7.29.- Distribución del Tamaño por Volumen de los Controles de Comparación Negativos.	103
Figura 7.28.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de los Controles de Comparación Positivos.	103
Figura 7.30.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control Delta a 10 Vueltas en Homogeneizador.	105
Figura 7.31.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control 2 a 3 Vueltas en Homogeneizador.	106
Figura 7.32.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control 3 a 10 Vueltas en Homogeneizador.	107
Figura 7.33.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control 4 a 5 Vueltas en Homogeneizador.	107
Figura 7.34.- Esquema del arreglo propuesto para la interfase de las gotas de nanoemulsión.	108
Figura 7.35.- Conjunto de gráficas de seguimiento: A) Seguimiento Experimento 6A; B) Seguimiento Experimento 4; C) Seguimiento Experimento 3C; D) Seguimiento Experimento 3D.	109
Figura 7.36.- Gráficas de Seguimiento de Control Delta 10 V y sus repeticiones.	110
Figura 7.37.- Caja de Micropozos para determinación del CMI.	111
Figura 7.38.- Caja de Micropozos con crecimientos de bacterias.	111
Figura 7.39.- Fotografía de <i>Escherichia coli</i> en nanoemulsión Control Delta.	112
Figura 7.40.- Fotografía de <i>Escherichia coli</i> en nanoemulsión Control 2.	112
Figura 7.41.- Nanoemulsiones para esterilización.	113
Figura 7.42.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de Control 3 10V con tratamiento de UV.	116
Figura 7.43.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de Control Delta 10V con tratamiento de UV.	116

Índice de Tablas

Nombre de la Tabla	Página
Tabla 2.1.- HLB de agentes emulsionantes importantes para la investigación.	21
Tabla 6.1.- Reactivos y Equipos.	40
Tabla 6.2.- Experimentos para la puesta en marcha (todos a 10000 psi).	56
Tabla 6.3.- Experimentos de Formulación Primera Serie.	57
Tabla 6.4.- Experimentos de Formulación Segunda Ronda.	58
Tabla 6.5.- Experimentos de Formulación Tercera Ronda.	58
Tabla 6.6.- Experimentos de Formulación Cuarta Ronda.	59
Tabla 6.7.- Las Mejores Vs. Las peores Nanoemulsiones.	59
Tabla 7.1.- Parámetros Reológicos del modelo Carreau de las gomas de Green Corp y arábica comercial.	65
Tabla 7.2.- Parámetros Reológicos del modelo Carreau de las gomas de mezquite liofilizadas y goma arábica al 20%.	69
Tabla 7.3.- Detalles del TGA y DTA de las diferentes gomas.	73
Tabla 7.4.- Tensión Interfacial de Goma de Mezquite en los diferentes medios.	77
Tabla 7.5.- Tensión Interfacial de Goma de Nopal en los diferentes medios.	77
Tabla 7.6.- Tensión Interfacial de Goma Arábica en los diferentes medios.	78
Tabla 7.7.- Tensión de Interfacial de Goma de Mezquite liofilizada.	78
Tabla 7.8.- Tensión Interfacial de Goma de Mezquite Horneada.	78
Tabla 7.9.- Datos de Densidad e Índice de Refracción de Aceite de Toronja Rosa.	79
Tabla 7.10.- Densidad e Índice de Refracción del Aceite de Limón Persa.	79
Tabla 7.11.- Densidad e Índice de Refracción del Aceite de Limón Persa con Aceite de Girasol.	79
Tabla 7.12.- Densidad e Índice de Refracción del Aceite de Toronja Rosa con Aceite de Girasol.	79
Tabla 7.13.- Datos de Densidad e Índice de Refracción del Aceite Girasol.	80
Tabla 7.14.- Concentración de Aldehídos.	80
Tabla 7.15.- Porcentaje de Área relativa de los compuestos identificados en el aceite esencial de Limón Persa por comparación con la librería Wiley.	82
Tabla 7.16.- Porcentaje de Área relativa de los compuestos identificados en el aceite esencial de Toronja Rosa por comparación con la librería Wiley.	83
Tabla 7.17.- Rotación Óptica de los aceites esenciales de Limón Persa y de Toronja Rosa.	85
Tabla 7.18.- Nanoemulsiones de estudio exploratorio para puesta en marcha.	89
Tabla 7.19.- Condiciones para las Nanoemulsiones de la 1ª Serie.	92
Tabla 7.20.- Muestras de nanoemulsiones seleccionadas de la 1ª Serie, de acuerdo a su comportamiento de distribución de tamaño de gota a 25°C.	92
Tabla 7.21.- Composición y condiciones (número de vueltas) de las nanoemulsiones estudiadas en la "2ª Serie" de experimentos.	98
Tabla 7.22.- Composiciones y condiciones de la tercera serie de experimentos.	100
Tabla 7.23.- Composiciones y condiciones de la 4ª serie de experimentos.	101
Tabla 7.24.- Resultados de CMI para nanoemulsiones esterilizadas 40 minutos. Bacteria utilizada: <i>Escherichia coli</i> .	114
Tabla 7.25.- Resultados de CMI para nanoemulsiones esterilizadas 40 minutos. Bacteria utilizada: <i>S. Aerus</i>	114
Tabla 7.26.- Resultados de CMI para nanoemulsiones esterilizadas 10 minutos.	114

Resumen

El estudio de las emulsiones es de gran interés y suma importancia debido a que existe una gran gama de procesos de formulación así como productos con aplicaciones reales como los que utilizamos día a día. Dentro de este campo de estudio el empleo de nanoemulsiones tiene mayores ventajas sobre las emulsiones, ya que el pequeño tamaño de gota permite ampliar las opciones de aplicación, además de presentar una mayor estabilidad en comparación con las emulsiones. Sin embargo, la formación de nanoemulsiones (al igual que la formación de las emulsiones) no es espontánea, por lo tanto, se requiere de cierta energía para su elaboración.

Esta investigación se centra en la formulación de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos en agua, estabilizados con gomas naturales, utilizando un homogeneizador microfluídico de alta presión para la obtención de características fisicoquímicas y estabilidad cinética apropiada. El proceso de experimentación se dividió en tres etapas, las cuales son: 1) caracterización de la materia prima y limpieza, purificación y caracterización de la goma de mezquite; 2) formulación de las nanoemulsiones; y 3) caracterización de las nanoemulsiones y estudio de sus propiedades antibacteriales.

Se efectuó un análisis químico exhaustivo para comparar la calidad entre varios tipos de aceites; en base a esta caracterización se eligió al Limón Persa como la fase oleosa. Por otro lado, por cuestiones de poca disponibilidad de la goma de mezquite comercial, fue necesario preparar en el laboratorio goma de mezquite a partir de perlas de mezquite, y de acuerdo a su caracterización se encontró una composición y comportamiento reológico similar al de la muestra de goma arábica comercial.

Al establecer las condiciones generales de los métodos de obtención de las nanoemulsiones por homogenización a alta presión se establecieron varias composiciones que presentaron condiciones de estabilidad y tamaño correspondientes a nanoemulsiones, con un tamaño de gota promedio incluso bastante más pequeño a

la meta propuesta (200 nm), a dichas nanoemulsiones se les dió un seguimiento por 4 meses para estudiar su estabilidad en función del tiempo. Tomando en cuenta los resultados de tamaño y estabilidad, la mejor nanoemulsión obtenida tiene una composición de aceite de limón persa (9.86%), goma de mezquite (4.93%), Span 20 (1.446%), Tween 80 (4.89%) y agua desionizada (78.86%) con un tamaño promedio de 41 nm. Los componentes utilizados en las nanoemulsiones de esta investigación son normalmente utilizados en el área de alimentos, cosmética y farmacéutica.

Otro resultado importante encontrado durante el desarrollo de esta tesis fue la comprobación del poder antimicrobiano que estas nanoemulsiones basadas en aceites esenciales cítricos presentan contra bacterias comunes como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las nanoemulsiones sugieren que con la presencia desde un 6.25% al 25% en concentración de las nanoemulsiones el poder antimicrobiano impide el crecimiento de dichas bacterias, por lo que presentan un gran potencial para una aplicación en productos de higiene y limpieza.

1. Introducción

Actualmente, uno de los campos de la ciencia más interesantes e innovadores para el desarrollo tecnológico es sin duda la nanotecnología. En sus primeras aplicaciones, la nanotecnología fue usada para introducir nuevos materiales en la industria química, ofreciendo resultados exitosos, debido a las nuevas y mejoradas propiedades que suelen tener los materiales cuando presentan tamaño nanométrico.

A raíz de estos desarrollos la nanotecnología abre sus áreas de aplicación extendiéndose en diferentes sectores, como el farmacéutico, los cosméticos y los alimentos, mediante el uso de emulsiones formadas por gotas de tamaño nanométrico (nanoemulsiones). Además, la nanotecnología ha llegado al campo del diseño de emulsiones basadas en componentes naturales y esto es importante ya que dichos sistemas cuentan con propiedades únicas que permiten su uso en los sectores mencionados anteriormente, debido no sólo a sus propiedades sino también a su biocompatibilidad y biodegradabilidad.

Una emulsión se define como una dispersión coloidal de al menos dos líquidos de diferente polaridad (usualmente aceite y agua), en la cual uno de los líquidos se encuentra disperso como pequeñas gotas (fase dispersa) en el otro líquido (fase continua). Debido a la inmiscibilidad de éstos líquidos, una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable y la llamada “estabilidad de la emulsión” se puede lograr únicamente de forma cinética conferida por la presencia de un sistema surfactante localizado de manera orientada en la interface aceite/agua, el cual por ser capaz de disminuir la tensión interfacial, facilita también la dispersión de un líquido en el otro. Por lo tanto, una emulsión cinéticamente estable es aquella que no presenta ningún cambio discernible en la distribución de tamaños de las gotas, en su estado de agregación o en su arreglo espacial dentro del volumen de muestra durante el tiempo de observación (Dickinson and Stainsby 1988).

Las nanoemulsiones son un tipo de emulsiones con tamaño de gota muy pequeño (entre 20 y 200 nm, esto puede variar según la literatura (Sonneville-Aubrun, Simonnet et al. 2004; Qian and McClements 2011; Donsì, Annunziata et al. 2012; McClements 2012) lo cual les confiere una apariencia transparente o translúcida y una

alta estabilidad cinética. Estas propiedades las hacen atractivas para diferentes aplicaciones que involucren una adecuada liberación de componentes activos, una vida de anaquel suficientemente larga y una estética a nivel comercial.

Durante los últimos años, la población ha centrado su atención al uso de materiales de origen natural debido a los grandes problemas que los materiales sintéticos o artificiales pueden causar a la salud y al medio ambiente. Algunas estrategias de las industrias para aumentar la estabilidad y la solubilidad de los ingredientes activos implican utilizar compuestos químicos totalmente artificiales, pero éstos pueden llegar a ser perjudiciales o tóxicos para el ser humano. Es por ello que el emplear compuestos de origen natural en las formulaciones de nanoemulsiones es muy importante ya que abre un nuevo campo de desarrollo, que sea amigable con el ambiente y conveniente a la salud de los consumidores. Por tanto a la industria en general se le está exigiendo cada vez más la implementación del uso de materiales naturales alternativos.

Cabe señalar que México dispone de una gran fuente de materiales naturales que ofrecen grandes oportunidades para el desarrollo de nuevos productos. Específicamente en el tema de emulsiones y nanoemulsiones el uso de gomas de origen natural es un factor clave, tal es el caso de la goma de mezquite (*Prosopis laevigata*) que es empleada como un co-surfactante en esta investigación.

Se ha reportado que, químicamente, la goma de mezquite es una sal neutra de un polisacárido ramificado de naturaleza ácida, formado por un núcleo de residuos de β -D-galactosa, constituyendo un esqueleto de uniones (1-3) y ramificaciones (1-6), conteniendo L-arabinosa (formas cíclicas de piranosa y furanosa), L-ramnosa, β -D-glucuronato y 4-o-metil- β -D-glucuronato como azúcares simples o cadenas laterales de oligosacáridos. La goma de mezquite también contiene una pequeña cantidad de proteína (0.7-5.8%) ubicada en la parte central de la estructura principal, siendo químicamente muy similar a la goma arábica (Orozco-Villafuerte, Cruz-Sosa et al. 2003).

La mayoría de los aceites esenciales cítricos han sido estudiados (naranja, toronja, limón, mandarina, etc.) y se ha determinado su composición química lo cual ha permitido establecer usos y valor comercial de los mismos; los aceites cítricos constituyen el sector más grande de la producción mundial de aceites esenciales (Díaz, Arrázola et al. 2005). Los aceites esenciales cítricos son el principal subproducto del procesamiento de la industria de jugos de frutos cítricos. Su uso no está restringido a las industrias de sabores y fragancias ya que diversos estudios han probado su potencial uso terapéutico como sustancias antimicrobianas y antiplasmídicas con una futura aplicación en tratamientos oncológicos y en tratamientos conjuntos con antibióticos (Janssen, Scheffer et al. 1987; Chander, Lansdown et al. 1994; Karlson, Borg-Karlson et al. 1996).

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron nanoemulsiones de aceites cítricos en agua, utilizando goma de mezquite y ésteres de sorbitan etoxilados como surfactantes, empleando homogeneización a alta presión (microfluidizer) como método de emulsificación. Debido a que la materia prima es de origen natural, se llevó a cabo una caracterización profunda de la misma para poder evaluar la calidad de los materiales. Además, se estableció un procedimiento para la obtención de goma de mezquite, un estudio sistemático para determinar las condiciones óptimas de formulación para las nanoemulsiones con el tamaño de gota más pequeño y la mejor estabilidad cinética.

II. Antecedentes

2.1 Emulsiones

El tamaño de gota de las emulsiones se encuentra típicamente entre 0.5 y 10 μm , por lo cual presentan un aspecto lechoso. Son termodinámicamente inestables (Lissant 1974), y esto implica que no se formen espontáneamente y por tanto se requiere un gran aporte de energía para su formación; además, sus características (tamaño de gota y estabilidad) dependen fuertemente del método de preparación. Sin embargo, mediante una formulación adecuada, las emulsiones pueden poseer cierta estabilidad cinética la cual les permita ser utilizadas o aplicadas por un determinado período de tiempo.

Las emulsiones se pueden clasificar de varias maneras:

- 1) En función del tamaño de gota, se clasifican en macroemulsiones ($> 500 \text{ nm}$) y nanoemulsiones ($< 500 \text{ nm}$).
- 2) En función de la concentración de la fase dispersa, se denominan como emulsiones diluidas (fracción en volumen de fase dispersa $\phi < 0.2$), emulsiones concentradas ($0.2 < \phi < 0.74$) y emulsiones altamente concentradas ($\phi > 0.74$).
- 3) En función de la naturaleza de la fase dispersa, se encuentran las emulsiones de aceite-en-agua (O/W por sus siglas en inglés), que se refiere a gotas de aceite dispersas en una fase continua acuosa, y las emulsiones de agua-en-aceite (W/O por sus siglas en inglés), que se refiere a gotas de agua dispersas en una fase continua de aceite (Lissant 1974; Dickinson 1992; Friberg and Larsson 2004).

La preparación de emulsiones se realiza generalmente por el método de dispersión (emulsificación), en presencia de sustancias surfactantes, que para el caso de las emulsiones se denominan emulgentes o emulsificantes. Los surfactantes son moléculas que contienen una parte no polar y otra polar, por lo que es posible que se disuelvan tanto en agua como en disolventes orgánicos o aceites. Cuando los surfactantes se encuentran en presencia de agua y aceite, se localizan en la interface

de una manera orientada (la parte polar hacia el agua y la parte no polar hacia el aceite). Dependiendo del predominio de una de las partes de la molécula sobre la otra, el surfactante tendrá un carácter predominantemente hidrofílico o lipofílico, y por consiguiente, presentará una mayor afinidad por el agua o por los aceites; esta característica se conoce como balance hidrofílico-lipofílico (HLB por sus siglas en inglés)(Becher 1957).

2.1.1 Inestabilidad de las Emulsiones

La inestabilidad de las emulsiones es un proceso que involucra diferentes mecanismos que contribuyen a la transformación de una emulsión uniformemente dispersada en un sistema separado en fases. Existen diversos mecanismos que originan la inestabilidad de las emulsiones entre los que se encuentran (Friberg and Larsson 1997):

- **Cremado:** Ocurre cuando la fase dispersa se concentra en la parte superior, causada por el movimiento de las gotas que poseen una densidad inferior a la de la fase continua.
- **Sedimentación:** Es similar al cremado pero en este caso la fase dispersa es más densa que la fase continua, por tanto las gotas se acumulan hacia el fondo del recipiente que las contiene.
- **Floculación:** Es la agregación de gotas, sucede cuando la energía cinética liberada durante las coaliciones lleva a las gotas a través de una barrera de fuerzas repulsivas y dentro de una región donde las fuerzas atractivas operan y causan que las gotas se peguen unas con otras.

En los tres casos anteriores, las gotas mantienen su individualidad y por tanto el tamaño de gota no cambia, es decir, son procesos reversibles y es posible recuperar la emulsión original mediante procesos de agitación suave.

Por otra parte, existen otro tipo de mecanismos irreversibles en los cuales el tamaño de gota sí cambia:

Coalescencia: Ocurre cuando dos gotas chocan, pierden su identidad y forman una sola gota de mayor tamaño. En una emulsión, entre mayor sea el tamaño de gota mayor es la tendencia a la coalescencia. De este modo, emulsiones de gotas finas generalmente presentan mejor estabilidad que las emulsiones de tamaño de gota grande (Lissant 1974).

Maduración de Ostwald: La base de este tipo de desestabilización es la difusión molecular del componente de la fase dispersa a través de la fase continua. Este fenómeno se da de las gotas pequeñas hacia las gotas grandes, por tanto las gotas pequeñas se van disolviendo hasta desaparecer y las grandes van incorporando las moléculas provenientes de las gotas pequeñas por lo que crecen de tamaño. Debido a que este mecanismo está fuertemente ligado a la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua, el fenómeno aumenta al aumentar la temperatura.

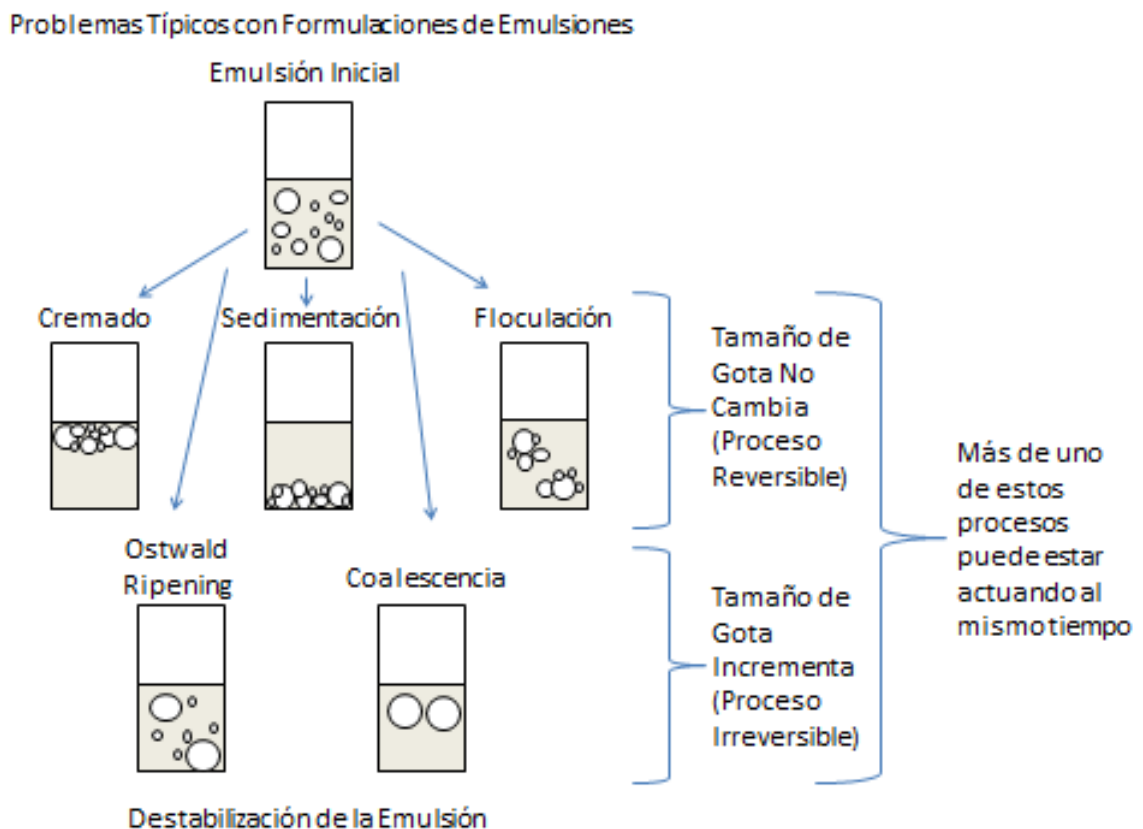


Figura 2.1.- Procesos de desestabilización de las emulsiones.

Como se mencionó anteriormente, generalmente las emulsiones contienen agentes emulgentes para estabilizar las dos fases inmiscibles (Lissant 1974). Sin la presencia de agentes emulgentes las fases de una emulsión (aceite, agua) se separan inmediatamente (Friberg and Larsson 1997). Una excepción son las emulsiones tipo “pickering”, las cuales son estabilizadas utilizando partículas en lugar del emulgente (Binks and Fletcher 2001).

2.1.2 Diseño de Emulsiones Convencionales

Hay un número limitado de factores que pueden ser manipulados para que las gotas de las emulsiones convencionales sean diseñadas para proporcionar ciertas propiedades funcionales, entre los cuales se destacan:

- Características de la gota: La composición, la concentración y la distribución de tamaño de gota de las emulsiones pueden ser controlados mediante la selección cuidadosa de los componentes y las condiciones de preparación (McClements 2010; McClements 2012)
- Características interfaciales: El espesor, la carga eléctrica, la reología, la permeabilidad y la liberación controlada de activos de la capa interfacial de surfactante que estabiliza las gotas se puede controlar mediante la selección apropiada de los emulsionantes y otros componentes activos de superficie (McClements 2010; McClements 2012).
- Características generales: La densidad, viscosidad, índice de refracción, y la tensión interfacial entre la fase acuosa y oleosa pueden ser controlados por la selección de aceites apropiados y / o mediante el uso de aditivos en alguna de las fases, tales como agentes espesantes, agentes gelificantes, agentes de carga, sales, y cosolventes (McClements 2010; McClements 2012).

2.2 Nanoemulsiones

La principal ventaja de utilizar los enfoques anteriores para crear propiedades funcionales en las emulsiones es que son relativamente sencillos y baratos de implementar, lo cual es importante para muchas aplicaciones industriales. Aun así, hay algunas aplicaciones en donde se requiere desempeños especiales o mejorados para proporcionar atributos funcionales que no se puede lograr usando métodos convencionales (McClements 2012). Las nanoemulsiones consisten en una dispersión fina de aceite en agua o de agua en aceite dependiendo del tipo de fase continua, según la variada literatura se consideran en un rango de tamaño de 20-500 nm (Forgiarini, Esquena et al. 2000; Solans, Izquierdo et al. 2005; McClements 2012). Dichas nanoemulsiones presentan diferentes tipos de aplicaciones, generalmente como vehículos para las áreas de cosmetología, diagnóstico, medicina y biotecnología (Sarker 2005).

Los términos como emulsiones submicrónicas, miniemulsiones y emulsiones ultrafinas son utilizados como sinónimos (El-Aasser, Lack et al. 1988; Lowell, Amselem et al. 1999; Okamoto, Nakajima et al. 2005). Las nanoemulsiones son una mezcla de una fase oleosa y una fase acuosa y la estabilidad se obtiene utilizando agentes emulsificantes, se caracteriza por ser un sistema traslúcido comparado con las emulsiones convencionales o con las microemulsiones.

El tamaño de gota tan pequeño de las nanoemulsiones no solo minimiza la coalescencia, coagulación, precipitación si no también ayuda a una mejor liberación del agente activo que está en el interior de la misma. (Beltran and Gutierrez 2007).

2.2.1 Propiedades y Limitaciones de las nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son una formulación muy atractiva, por sus propiedades, muestran grandes ventajas en diferentes campos de la investigación, esto se debe a las siguientes propiedades (Tadros, Vincent et al. 1983; Tadros 2006):

- Las nanoemulsiones estables no muestran problemas de cremación o sedimentación por su tamaño de gota, a menos que haya también

poblaciones con tamaño de gota más grandes. Los problemas mencionados anteriormente son muy comunes en las emulsiones convencionales. Básicamente ambos problemas se asocian a la fuerza de gravedad, pero en el caso de las nanoemulsiones el tamaño de gota es tan pequeño que minimiza el trabajo de la fuerza de gravedad sobre las gotas.

- El proceso de coalescencia de las gotas es más lento, debido a que como se mencionó anteriormente, proviene de gotas que han aumentado su tamaño lo que provoca inestabilidad en la emulsión. De acuerdo al tamaño de gota de las nanoemulsiones este problema disminuye ya que se previene la deformación y la fluctuación de la superficie.
- La dispersabilidad de la nanoemulsión es muy alta comparada con la de la emulsión porque el tamaño de gota previene la floculación y este proceso hace que el sistema se disperse sin separación.
- La formulación de la nanoemulsión aunque depende de varios factores, provee una rápida penetración de los agentes activos involucrados debido a la alta área superficial de las gotas, por lo que se debe tener un cuidado especial en la incompatibilidad de la formulación con el receptor del agente activo.
- La formulación de las nanoemulsiones requiere de baja cantidad de surfactante comparado con las microemulsiones. Por ejemplo para una microemulsión en su preparación se puede llegar a requerir hasta un 20-25% mientras que para una nanoemulsión con frecuencia del 5 al 10% es suficiente.
- Las propiedades de transparencia y fluidez de las nanoemulsiones, son estéticamente atractivas a los usuarios para la dosificación de algún producto.

Aunque este tipo de emulsiones proporciona grandes ventajas, muchas veces el tamaño reducido de las gotas limita su uso. Algunas de las limitaciones conocidas son las siguientes (Thomson 1871):

- Las propiedades de transparencia y fluidez son causadas por la reducción del tamaño de gota, esto ocasiona que el proceso se torne caro o requiera de instrumentación y de métodos de proceso muy específicos, ya que entre menor sea el tamaño de gota deseado, más energía es requerida para la formación de la nanoemulsión.
- Algunos de los procesos incluyen la homogenización por alta presión (microfluidización), y la ultrasonificación, equipos que requieren financiamiento para su adquisición.
- El proceso de formulación determina la estabilidad de las nanoemulsiones, una inestabilidad crea un gran problema durante el almacenamiento de éstas en un período de tiempo más largo.
- La maduración de Ostwald es el principal factor asociado con la inestabilidad de este tipo de formulaciones. Esto es debido a la alta tasa de curvatura de las pequeñas gotas ya que muestran una mayor solubilidad en comparación con gotas más grandes con un pequeño radio de curvatura.
- Mayor porcentaje de surfactante y co-surfactante es requerido para la fabricación de las nanoemulsiones, limitando su producción.

2.2.2 Formación de Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones poseen tamaños pequeños de gota y baja polidispersidad, lo cual generalmente les confiere una alta estabilidad cinética y apariencia translúcida. Estas características las hacen objeto de numerosos estudios debido a su interés teórico y aplicaciones prácticas (Lee and Tadros 1982; El-Aasser, Lack et al. 1988; Forgiarini, Esquena et al. 2000; Sharma, Bansal et al. 2010).

Debido a que las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, no pueden formarse espontáneamente y por lo tanto requieren de la aplicación de energía para su formación. Esta energía puede ser suministrada por métodos de dispersión (fuerza de cizalla) o por métodos fisicoquímicos (de condensación o baja energía)(Sharma, Bansal et al. 2010).

Varios métodos han sido sugeridos para la preparación de las nanoemulsiones (Robert Nicolosi 2008; Rao and McClements 2011; Donsì, Annunziata et al. 2012; McClements 2012; Ostertag, Weiss et al. 2012; Salvia-Trujillo, Rojas-Graü et al. 2013). Son dos los objetivos básicos al momento de la preparación de una nanoemulsión, el primero es el alcanzar el rango de tamaño de gota de 100 a 500 nm y el segundo es proporcionar la condición de estabilidad. Para la formación de las nanoemulsiones se requiere una gran cantidad de energía. Esta energía puede ser proporcionada por un equipo mecánico o el potencial químico inherente dentro de los componentes.

2.2.2.1 Métodos de Dispersión: Fuerza de cizalla (Alta Energía)

En los métodos de dispersión, el tamaño y la polidispersidad de las gotas de las nanoemulsiones dependen de la energía aplicada durante el proceso de emulsificación, del tiempo durante el cual se aplica la energía, y de la composición, especialmente de la relación surfactante/fase dispersa.

Entre los equipos de dispersión más eficaces para producir nanoemulsiones están los homogeneizadores de alta presión y los generadores de ultrasonido, la energía que suministran estos equipos produce suficiente cizalla para romper las gotas de la emulsión en otras más pequeñas (Tadros, Vincent et al. 1983; McClements 2012)

2.2.2.2 Métodos Físicoquímicos -Inversión de fases (Baja energía)

Cuando en un sistema en equilibrio termodinámico cambian las variables del sistema como la temperatura y la composición (salinidad, relación O/W (aceite/agua), etc), éste pasa a una condición metaestable o de desequilibrio con una energía libre mayor. En estas condiciones se producen transiciones de fases que, en sistemas conteniendo surfactante, dan lugar a la formación de emulsiones con tamaño de gota pequeño. Entre los métodos físicoquímicos utilizados para obtener nanoemulsiones se encuentra el de la temperatura de inversión de fases o método PIT (por sus siglas en inglés), donde se produce la inversión de una emulsión O/W a W/O (o viceversa) por incremento o disminución de temperatura (Shinoda 1967; Shinoda and Saito 1968).

Se utiliza el término temperatura HLB (T_{HLB}) para definir la temperatura en la cual las interacciones hidrófilas-lipófilas del surfactante están balanceadas, es decir, el surfactante no tiene solubilidad preferencial por el agua o por el componente oleoso y su curvatura natural es cero. A temperaturas inferiores a la temperatura HLB, el surfactante es hidrófilo y forma micelas o emulsiones normales (curvatura positiva) mientras que a temperaturas superiores a la temperatura HLB el surfactante es lipófilo y forma micelas o emulsiones inversas (curvatura negativa). Esta terminología se utiliza para poner el acento sobre las diferencias entre la Temperatura HLB (T_{HLB} o PIT) y el concepto de HLB (Miñaña-Pérez M 1982). La T_{HLB} de un sistema depende no sólo del surfactante sino también del aceite (es decir, de la combinación surfactante/aceite); también otros componentes tienen una gran influencia sobre la T_{HLB} , como son el cosurfactante, la presencia de electrólitos, ácidos, bases, etc.

Otro método para obtener nanoemulsiones es el PIC (*phase inversion composition* o inversión de fases por composición), en el cual se produce una inversión de fases W/O a O/W por adición de agua en sistemas constituidos por agua, surfactante y aceite sin necesidad de una fuerte agitación y a temperatura constante. Como en el método PIT, por este método el sistema pasa por ciertas transiciones de fase que promueven la formación de nanoemulsiones de tamaño pequeño y controlado. Cabe mencionar que tanto para llevar a cabo el método PIT como el PIC, es necesario realizar estudios previos de comportamiento fásico muy detallados, con el fin de identificar las zonas de cristal líquido laminar y microemulsiones bicontinuas, las cuales se cree juegan un rol muy importante en la formación de nanoemulsiones por éstos métodos (Izquierdo, Esquena et al. 2002).

Algunos autores denominan a este tipo de procesos (PIT y PIC) como emulsificación espontánea, ya que la emulsión se forma al entrar en contacto los componentes del sistema, en ausencia de (o poca) agitación (Figura 2.2) (Miller ; Rang and Miller 1999). Debido a que las emulsiones son inestables, es imposible que éstas se formen espontáneamente. Si las fases líquidas no se encuentran inicialmente en equilibrio, se considera que cierto proceso dinámico tal como: difusión, fluctuaciones térmicas, o una tensión interfacial ultrabaja, conduce la emulsificación cuando las fases

se han puesto en contacto sin agitación (Rang and Miller 1999). Estudios mecánicos relacionan la emulsificación espontánea con la condensación y crecimiento de gotas formadas en un sistema muy saturado estabilizado por surfactante, o con la formación de fases de cristal líquido laminar al entrar en contacto mezclas de agua, surfactante y aceite (Wakerly, Pouton et al. 1986; El-Aasser, Lack et al. 1988; Rang and Miller 1999).

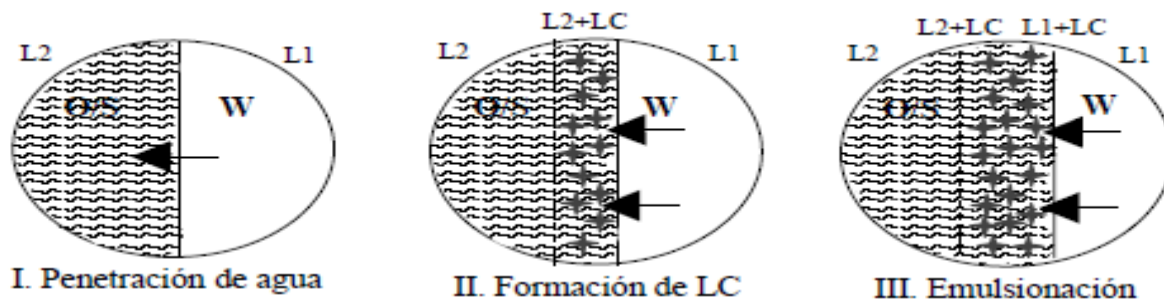


Figura 2.2.- Representación esquemática de emulsificación espontánea (LC = cristal líquido laminar).

2.2.3 Estabilidad de Nanoemulsiones

Debido a que la mayoría de los estudios describen la alta estabilidad cinética de las nanoemulsiones, a continuación se consideran los factores que influyen en este hecho:

Teniendo en cuenta que la agitación térmica en gotas menores a $0.5 \mu\text{m}$ de diámetro (movimiento Browniano) es mayor que la velocidad de sedimentación producida por la fuerza de gravedad (Tadros, Vincent et al. 1983), puede decirse que las nanoemulsiones son estables respecto al mecanismo de sedimentación.

Respecto a la floculación, no está claro si las gotas pueden adherirse por deformación y formar una película plana. Por una parte la presión de Laplace es muy grande en las gotas pequeñas y podría oponerse a la deformación de las gotas pero la agitación térmica de las gotas incrementa los choques, facilitando la deformación de las mismas (Batchelor 1976).

Estudios efectuados sobre la estabilidad de las nanoemulsiones describen su estabilidad respecto a la coalescencia (Taylor and Ottewill 1994; Taylor 1995;

Katsumoto, Ushiki et al. 2000; Katsumoto, Ushiki et al. 2000). Se considera que las moléculas de surfactante que estabilizan las gotas de las nanoemulsiones son adsorbidas en la interface agua/componente oleoso en forma de monocapas, aunque se ha descrito que otras estructuras como bicapas y multicapas de surfactante podrían tener importancia en la estabilización de nanoemulsiones (Suzuki, Takei et al. 1989; Forgiarini, Esquena et al. 2000). Otro estudio reporta que las gotas de las nanoemulsiones se comportan como esferas rígidas, bajo estas condiciones las gotas no se deforman lo suficiente para formar una película plana entre gotas floculadas evitándose la coalescencia (Katsumoto, Ushiki et al. 2000). Sin embargo, este último caso depende de la naturaleza del sistema surfactante utilizado.

El principal mecanismo de desestabilización de las nanoemulsiones es la maduración de Ostwald, el cual consiste en el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas (Figura 2.3). Este mecanismo es altamente dependiente de las condiciones iniciales de las nanoemulsiones, es decir del grado de polidispersión de las gotas y de las interacciones entre éstas (Katsumoto, Ushiki et al. 2000). Además de tener una dependencia de la tensión interfacial entre la fase acuosa y oleosa, así como de la reología de la capa de surfactante; mientras menor sea la tensión interfacial y mientras más viscosa sea la capa de surfactante, la maduración de Ostwald será menor.

La velocidad de maduración de Ostwald puede ser reducida formando emulsiones con baja polidispersión en el tamaño de gota, o añadiendo un segundo componente a la fase dispersa que sea insoluble en la fase continua (Higuchi and Misra 1962); de esta manera, con tal de mantener en equilibrio el potencial químico dentro de todas las gotas, se suprime la solubilización de la fase dispersa en la fase continua. También se ha sugerido que el uso de surfactantes fuertemente adsorbidos en la interfase agua/componente oleoso (surfactantes poliméricos), que no puedan desorberse fácilmente, consiguen disminuir la velocidad del proceso (Becher 1996; Katsumoto, Ushiki et al. 2000; Izquierdo, Esquena et al. 2002).

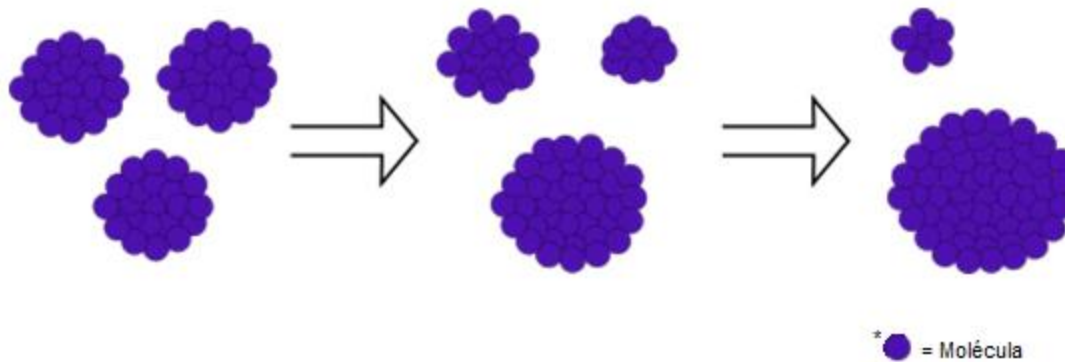


Figura 2.3.- Maduración de Ostwald en descripción gráfica.

2.3 Emulsificantes

Un aspecto fundamental en la formación de nanoemulsiones es el uso de emulsionantes (surfactantes) 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 interfacial entre agua y aceite. La mayoría de los emulsionantes son moléculas anfifílicas, es decir, contienen regiones polares y no polares en la misma molécula (Dickinson 1993).

La estabilidad de las nanoemulsiones es de vital importancia en aplicaciones industriales como se ha mencionado anteriormente. Las características de un emulsionante que permita esta estabilidad son las siguientes:

- Deben reducir la tensión interfacial (Yuan, Gao et al. 2008).
- Deben formar una película no adherente que no se adelgace cuando dos gotas colisionen y no permita la floculación o coalescencia (Kobayashi, Yasuno et al. 2002).
- Debe tener estructura molecular específica con terminación polar para atraer al agua y terminación apolar para atraer el aceite (Schröder and Schubert 1999).
- Debe ser más soluble en la fase continua así que debe adsorberse rápidamente alrededor de las gotas de la nanoemulsión (Walstra 2005)
- Mostrar capacidad para emulsionar el sistema requerido con pequeñas concentraciones de emulsionante (Sonneville-Aubrun, Simonnet et al. 2004).

- Debe ser relativamente económico, debe ser seguro y no tóxico (Tadros, Izquierdo et al. 2004).

Los mecanismos de inestabilidad en una nanoemulsión, son influenciados por la concentración de los emulsionantes en las fases acuosas y en mayor grado, por la concentración del emulsionante liposoluble, la naturaleza y viscosidad de la fase oleosa, la naturaleza y concentración de los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, así como la adsorción de moléculas en las interfaces (Wen and Papadopoulos 2001).

2.3.1 Tipos de emulsificantes.

Un factor importante en el desarrollo de nanoemulsiones, es el tipo de emulsionante, los más comunes son conocidos como surfactantes o tensoactivos (Schröder and Schubert 1999; Kobayashi, Yasuno et al. 2002). Por definición, un surfactante o tensoactivo es una molécula anfifílica que tiene una “cabeza” con un grupo hidrofílico, el cual tiene alta afinidad por el agua y una “cola” con un grupo lipofílico que tiene alta afinidad por el aceite (Krog and Sparso 1990) como se observa en la figura 2.4. 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).

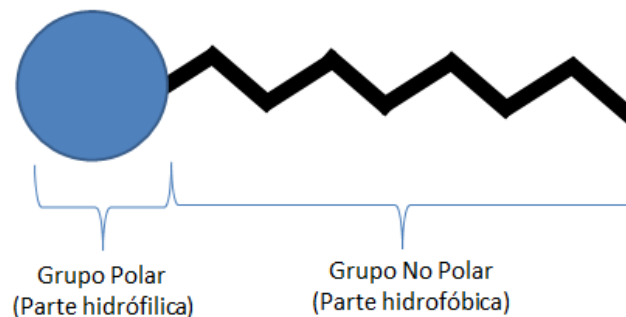


Figura 2.4.- Estructura de un surfactante o tensoactivo.

Los tensoactivos juegan dos funciones principales en la formación de la nanoemulsiones: 1) reducen la tensión interfacial entre el aceite y el agua, esto facilita la distribución de las gotas y 2) estabilizan las gotas contra la coalescencia y/o

agregación (Kobayashi, Yasuno et al. 2002). Existen diferentes tipos de tensoactivos de acuerdo a la naturaleza de su grupo polar.

Estos 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, alcoholes grasos etoxilados, ésteres de sorbitan etoxilados), y zwitteriónicos (cuando presentan tanto un grupo aniónico como un catiónico). 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, Yasuno et al. 2002)

Por otra parte los tensoactivos no iónicos 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).

Para la elaboración de nanoemulsiones aceite-en-agua es importante mencionar que los tensoactivos deben ser capaces de formar gotas con un diámetro menor a 100 nm sin que exista un desequilibrio, y cumplir además con las siguientes características: el diámetro de la cabeza del tensoactivo debe ser dos veces menor que la longitud de la cadena carbonada y deben tener un HLB entre 8 y 17 (Figura 2.5) (Tadros, Izquierdo et al. 2004).

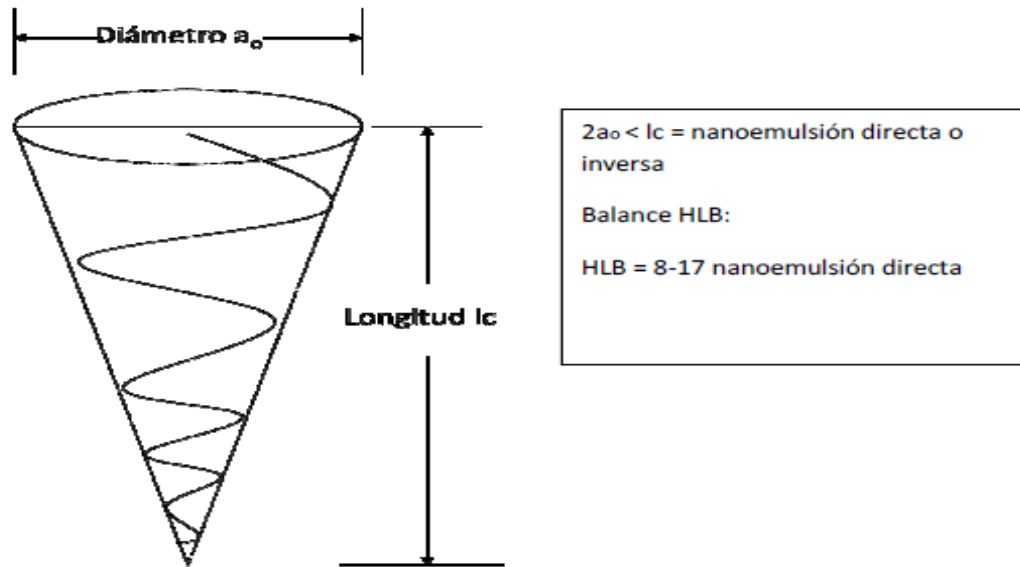


Figura 2.5.- Criterio de selección de un tensoactivo para la formación de nanoemulsiones aceite-en-agua.

2.3.2 Balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

El agente tensoactivo debe estar equilibrado en cuanto a poseer la cantidad o longitud adecuada de grupos hidrosolubles y liposolubles para que se concentre en la interfase y de esta forma haga descender la tensión interfacial. 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 (Becher and Griffin 1970) 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 (Figura 2.6) 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 tensoactivos llamados Spans (consistentes en ésteres del sorbitán), son agentes lipofílicos y, por lo tanto, tienen valores de HLB bajos (de 1.8 a 8.6), mientras que los tensoactivos llamados Tweens, (derivados polioxietilénicos de los Spans, es decir, ésteres de sorbitan etoxilados), son

hidrofílicos y en consecuencia, tienen valores de HLB altos (de 9.6 a 16.7) (Hait and Moulik 2001).

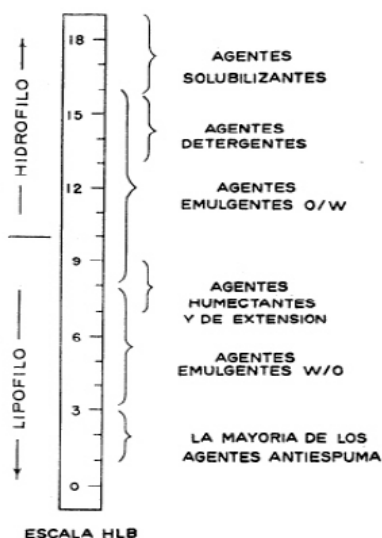


Figura 2.6.- Clasificación de agentes emulsionantes de acuerdo a su HLB. Tomado de Griffin (Becher and Griffin 1970).

A continuación se muestran los valores de algunos agentes emulsionantes importantes para esta investigación.

Tabla 2.1.- HLB de agentes emulsionantes importantes para la investigación.

Sustancia	HLB
Monooleato de sorbitán (Span 80)	4.3
Goma de Mezquite	3.6
Triolato de Sorbitán (Span 85)	1.8
Monolaurato de sorbitán (Span 20)	8.6
Goma arábica	8.0
Lecitina	4.0
Monooleato de sorbitán polioxietilénico (Tween 80)	15
Monolaurato de sorbitán polioxietilénico (Tween 20)	16.7
BRIJ O20	15

Fuente: (Balderrama Ibarra ; Hait and Moulik 2001)

2.3.3 Tween 80 y Span 20

Debido a que este surfactante y co-surfactante fueron los más utilizados durante el trabajo de investigación de esta tesis para la formulación de las nanoemulsiones, a continuación se dará una breve descripción de éstos.

2.3.3.1 Tween 80

También conocido como Polisorbato 80; es un tensioactivo no iónico, derivado del sorbitán polietoxilado y ácido oleico, se utiliza a menudo en aplicaciones de alimentos y productos farmacéuticos. El Polisorbato 80 es un líquido viscoso, amarillo soluble en agua. Los grupos hidrófilos en este compuesto son poliéteres también conocidos como grupos polioxietileno que son polímeros de óxido de etileno. En la nomenclatura de los polisorbatos, la designación numérica siguiente al polisorbato se refiere al grupo lipófilo, en este caso el ácido oleico. La concentración micelar crítica del polisorbato 80 en agua pura se reporta como 0.012 mM.

El Polisorbato 80 se utiliza como un emulsionante en los alimentos, particularmente en los helados, donde se utiliza en una concentración máxima de 0.5% de concentración haciendo la textura del helado más suave, más fácil de manejar, e incrementando su resistencia a la fusión.

En Europa y América las personas consumen aproximadamente 100 mg de polisorbato 80 en los alimentos por día. En general, el polisorbato 80 es seguro, bien tolerado y cuenta con la aprobación por la FDA (ver Anexo A), aunque un pequeño número de personas pueden ser sensibles a esta sustancia o perjudicial para las personas con enfermedad de Crohn (Webacademia 2013)

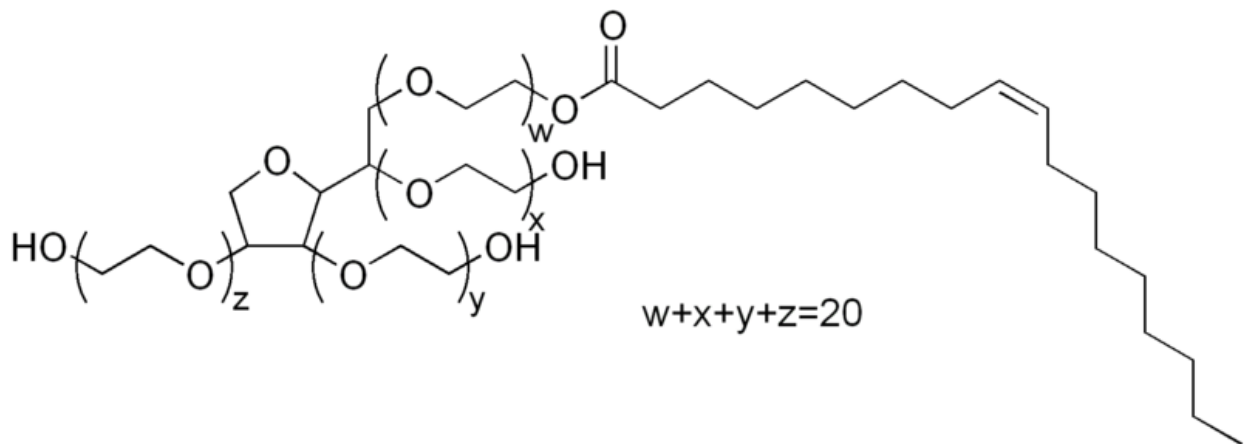


Figura 2.7.- Molécula del Tween 80 (LLC. 2013).

2.3.3.2 Span 20

También conocido como Monolaurato de sorbitán, pertenece a un grupo de sustancias llamadas ésteres de sorbitán los cuales son seguros y ampliamente utilizados como emulsionantes y materias primas para cosméticos.

Es producido a partir del sorbitol y del ácido laúrico, el cual es un ácido graso alifático de origen animal o vegetal, se trata de una mezcla de ésteres parciales del sorbitol y sus anhídridos con ácido láurico comercial comestible. La estructura química del laurato de sorbitán combina un buen perfil medioambiental, sobre todo en términos de biodegradabilidad fácil y sin efectos nocivos para la vida acuática, con las características estructurales requeridas para los usos múltiples. Sus características de presentación son: líquido viscoso y aceitoso de color ámbar, perlas o copos de color entre crema claro y tostado, o sólido ceroso y duro con olor leve.

Actúa como emulsificante y estabilizante en los productos de lavado, productos de limpieza, aerosoles, desinfectantes, aerosoles de control de plagas, ceras, ablandadores de agua, recubrimientos, pinturas, disolventes, decapantes y cosméticos.

Es metabolizado hasta sorbitol y ácido laúrico sin causar ningún efecto colateral. El laurato de sorbitán debido a sus numerosos usos por el público en general y sus

usos industriales. La ingesta diaria admisible es un máximo 25 mg/kg de peso corporal. La sustancia no plantea peligros por sus propiedades físicas o químicas. Se han realizado numerosas pruebas las cuales no mostraron efectos adversos para la salud (CRODA 2010; LLC. 2013). En el Anexo B se puede ver su aprobación por la FDA.

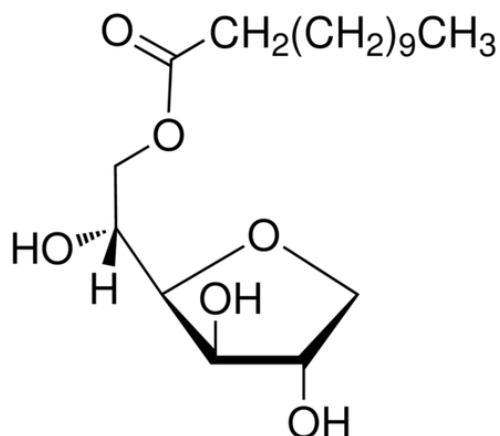


Figura 2.8.- Molécula de Span 20 (LLC. 2013)

2.3.4 Concentración micelar crítica (CMC)

Un tensoactivo se autoensambla formando estructuras típicamente esféricas en solución acuosa cuando su concentración excede un nivel crítico conocido como concentración micelar crítica (CMC)(Myers and Montgomery 1988; Piculell, Thuresson et al. 2001). A estas estructuras de surfactante autoensamblado se les conoce como micelas.

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 se autoensamblan formando micelas, y la concentración de monómeros permanece constante (e igual a la CMC) (Hiemenz and 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 de tensoactivo tienen un promedio bien definido de forma y tamaño bajo ciertas condiciones ambientales (Israelachvili and Wennerström 1996).

Así, cuando el tensoactivo es adicionado a una solución por arriba de la CMC, el número de micelas tiende a incrementar. Hay un cambio abrupto en las propiedades fisicoquímicas de una solución de tensoactivo cuando la CMC se excede, como son la tensión superficial, la conductividad eléctrica, la turbidez y la presión osmótica (Rosen 1978; Hiemenz and Rajagopalan 1997; Holmberg, Jönsson et al. 2003) debido a que las propiedades de las moléculas dispersas como monómeros del tensoactivo 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, hasta llegar a un valor casi constante al sobrepasar la CMC, ya que como se mencionó anteriormente, por arriba de la CMC la concentración del tensoactivo en forma monomérica es constante. La CMC de un tensoactivo depende de la estructura química de la molécula del surfactante tanto como de la composición de la solución y de la permanencia de las condiciones ambientales (Piculell, Thuresson et al. 2001; Holmberg, Jönsson et al. 2003).

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 hidrofiliidad decrece (por el decremento de la longitud de la cabeza con grupos no iónicos).

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

2.4 Gomas

En sus orígenes, el término “goma” era empleado para referirse a los productos de la exudación de algunas plantas y árboles; sin embargo, en la actualidad su uso se ha extendido a un grupo amplio de polisacáridos de alto peso molecular que tienen la capacidad de actuar como espesantes y gelificantes; que además, presentan algunas propiedades funcionales como las de emulsificación, estabilización, etc., que dependen de factores intrínsecos propios de la molécula (peso molecular, grado de ionización, ramificación) y extrínsecos propios del sistema (pH, fuerza iónica, temperatura y concentraciones) (Lease 1967; Shewfelt 1981; Codex 1983; Badui 1999).

Cada goma presenta características físicas y químicas determinadas que no pueden fácilmente ser sustituidas con el uso de otro polisacárido; la combinación de dos o más de estos compuestos genera nuevas propiedades funcionales que no se logran al usar las gomas de manera aislada; éste es el caso de la emulsificación de sistemas aceite/agua, que se logra con mezclas de gomas (Lease 1967; Codex 1983).

2.4.1 Goma de Mezquite

El mezquite (*Prosopis laevigata*) es una leguminosa ampliamente distribuida en las zonas áridas y semiáridas del mundo. En condiciones de estrés, el árbol secreta en su corteza un exudado gomoso vítreo conocido como goma de mezquite. Este polisacárido es un arabinogalactano proteico cuyas propiedades químicas, macromoleculares y funcionales son similares a las de la goma arábiga, producto de múltiples usos industriales particularmente en alimentos, bebidas y farmacia (López-Franco, Goycoolea et al. 2006).

El mezquite, al igual que otros árboles y plantas exuda una goma en lesiones de la corteza y madera de sus troncos y ramas. Es muy frecuente encontrarla en regiones del norte del país, como Sonora donde la secreción se lleva a cabo en primavera. La gomosis se ve afectada por factores ambientales diversos, así como por tratamientos químicos, daños físicos y estrés transpiracional (Gentry 1957). Se sabe que en árboles de acacia, en suelos con humedad adecuada, no hay producción de goma, mientras que en la sequía induce su producción abundante (Whistler and Smart 1953).

La recolección de goma de mezquite se hace de manera manual y se expende en pequeña escala en unas cuantas localidades de la región. Solo existe un pequeño consumo doméstico (como dulces) y no se ha explotado su uso para aplicaciones industriales.

2.4.2 Goma arábica

La goma arábica también es un exudado natural, de una leguminosa del desierto que, posee amplia utilización comercial en todo el mundo. La goma arábica es recolectada manualmente de los árboles de la familia de Acacia.

La goma arábica (GA) es un emulsificante efectivo que posee características como baja viscosidad, buena actividad de superficie y habilidad para formar una película protectora en una emulsión; ésta produce películas con las propiedades de un hidrocoloide y puede formar emulsiones estables con la mayoría de los aceites (Chanamai and McClements 2001) lo que favorece el control del HLB. (Valle-Guadarrama, López-Rivera et al.)

2.4.3 Similitudes y Diferencias entre la Goma arábica y de mezquite.

Estudios realizados por Vernon-Carter et al. (Vernon-Carter, Guzmán et al. 1984; Vernon-Carter, Gómez et al. 1996; Vernon-Carter, Pedroza-Islas et al. 1998), muestran que la goma de mezquite puede sustituir aceptablemente a la goma arábica; además, este polímero se obtiene de un árbol que crece en abundancia en el territorio nacional, por lo que su uso en la industria puede traer beneficios económicos importantes.

Los análisis químicos practicados a la goma de mezquite (*Prosopis laevigata*), indican que ésta es una sal de un polisacárido ácido altamente ramificado, constituido principalmente por residuos de L-arabinosa, D-galactosa, ácido 4-O-metil-D-glucorónico y L-ramnosa (Figura 2.9) (White 1946; Aspinall and Whitehead 1970).

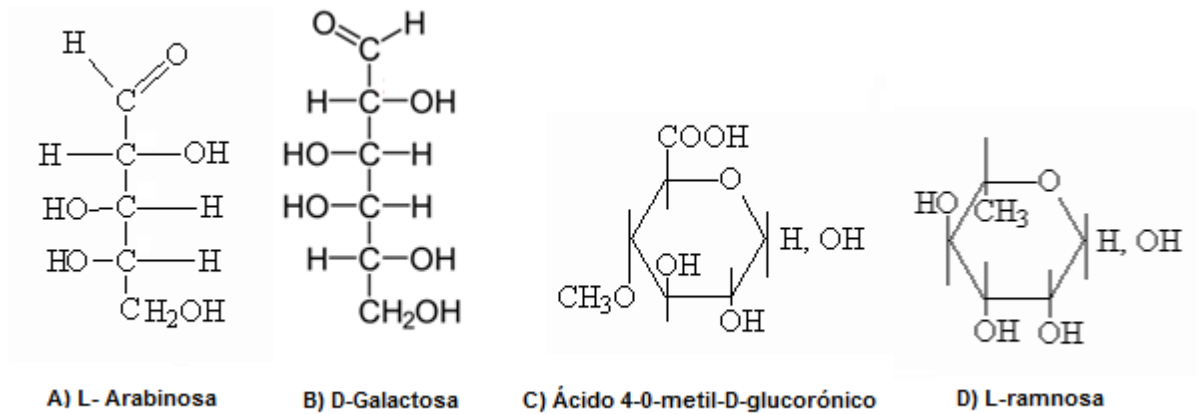


Figura 2.9.- Estructuras de Sacáridos de la Goma de Mezquite: A) L-Arabinosa, B) D-Galactosa, C) Ácido 4-0-metil-D-glucorónico, D) L-ramnosa (Abreu 2008).

Mientras que la goma arábiga (*Acacia senegal*) se encuentra constituida por los mismos grupos que integran a la goma de mezquite, pero en otras relaciones molares (Vernon-Carter, Guzmán et al. 1984; Osman, Williams et al. 1993).

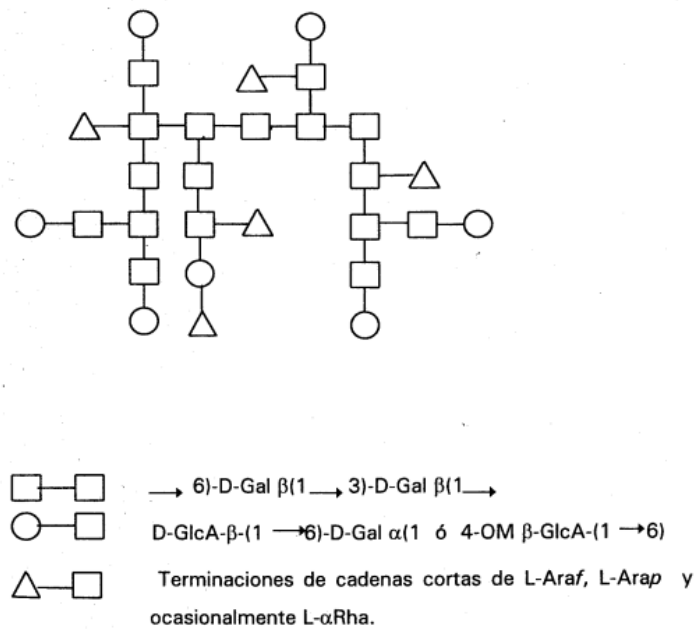


Figura 2.10.- Estructura Primaria de la Goma de Mezquite (Aspinall and Whitehead 1970) Constituida por L-arabinosa, D-galactosa, como principales carbohidratos y trazas de D-glucosa, D-manosa, D-xilosa y ácido glucurónico.

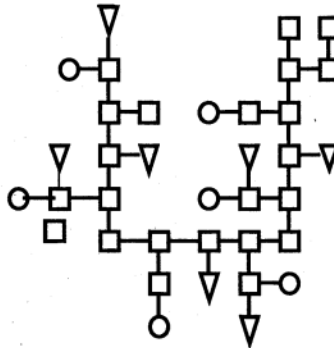
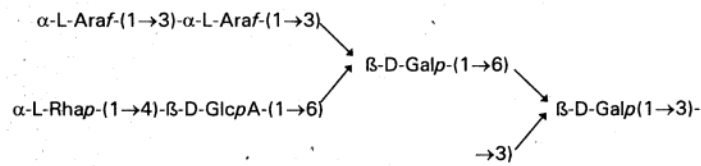


Figura 2.11.- Estructura Primaria de la Goma Arábiga (Osman, Williams et al. 1993).

Ambas gomas tienen una pequeña fracción proteínica (2-7%) asociada covalentemente a la fracción polisacárida (Osman, Williams et al. 1993; Goycoolea, Morris et al. 1995; Islam, Phillips et al. 1997; Vernon-Carter, Beristain et al. 2000), que les confiere alta capacidad emulsificante (Dickinson, Murray et al. 1988; Dickinson and Stainsby 1988; Vernon-Carter, Beristain et al. 2000).

2.4.4 Goma de Nopal

El nopal en México ha sido utilizado desde tiempos precolombinos como: alimento, medicamento e inclusive de manera empírica como agente modificador de las propiedades funcionales de diversos productos, por ejemplo en la preparación de pinturas naturales y shampoos. En las últimas décadas, el uso de polisacáridos en alimentos se ha incrementado significativamente. Esto ha estimulado el descubrimiento y estudio de nuevos hidrocoloides con propiedades funcionales novedosas o con ventajas económicas sobre las ya existentes. Una alternativa prometedora parece ser la goma obtenida a partir del mucílago del nopal (*Opuntia ficus indica*). El mucílago es un carbohidrato complejo. Entre los monómeros contenidos en la cadena se

encuentran: L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-Xilosa y ácido galacturónico. Algunas propiedades de esta goma son: (1) reduce la tensión superficial e interfacial; (2) estabiliza emulsiones del tipo aceite-en-agua; (3) forma gotas pequeñas de aceite; (4) los sistemas a los que se agrega no floculan (Garti 1999).

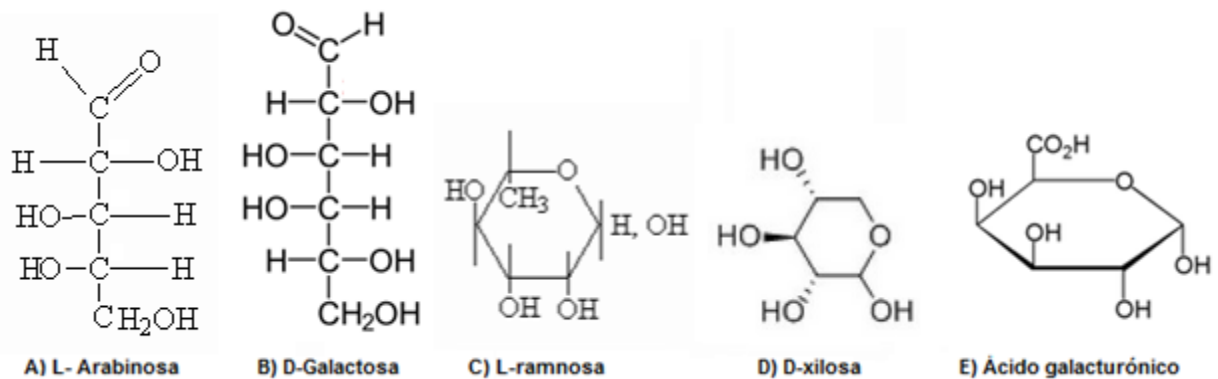


Figura 2.12.- Sacáridos que componen a la goma de nopal (Abreu 2008).

Se sabe que las cactáceas al sufrir un daño mecánico comienzan a exudar un “compuesto mucilaginoso” para sellar y posteriormente reparar este daño. Este mucílago ha llamado la atención, ya que es el responsable de “modificar las propiedades reológicas de los medios acuosos donde interviene”. Actualmente, existen estudios referentes a su composición fisicoquímica, los cuales indican que estos tienen propiedades similares a los exudados gomosos de otras plantas (Sepúlveda 2003).

2.5 Aceites Esenciales Cítricos

La mayoría de las especies vegetales deben su sabor y olor a sustancias químicas que se encuentran presentes en el orden de partes por millón. En la naturaleza, algunas de estas especies evolucionaron produciendo niveles mucho mayores de estas sustancias químicas en comparación con otras (Cerutti M 2004).

Con el descubrimiento de la destilación, se hizo posible separar del material botánico estas sustancias o sus mezclas, dando lugar al nacimiento de los aceites esenciales como producto comercial. En el caso de los cítricos, los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables, que contienen sustancias responsables del aroma de las plantas y frutas cítricas, que son importantes

en la industria cosmética, alimentos y farmacéutica. Estos aceites se clasifican según: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios (Cerutti M 2004).

La mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de los cítricos, está formada por una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que corresponden a compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) y son los que confieren a los aceites el aroma que los caracteriza (Huisa 2010).

En el caso específico del Limón persa (*Citrus Latifolia Tanaka*) de sus componentes del se destaca el ácido cítrico, el cual se encuentra en una proporción de 50grs/L. También posee varios ácidos, como el málico y el fórmico. El limón persa contiene además, hesperidita y pectinas. El árbol del limón, posee aceites esenciales, principalmente compuestos de d-limoneno y felandreno. Dentro de la composición del limón se encuentran varias sales minerales, entre las que se destacan por abundancia o importancia las de potasio, fósforo y magnesio. Por otra parte, el fruto del árbol de limón presenta un alto contenido de agua, fibras, carbohidratos y calorías (Sierra 2002).

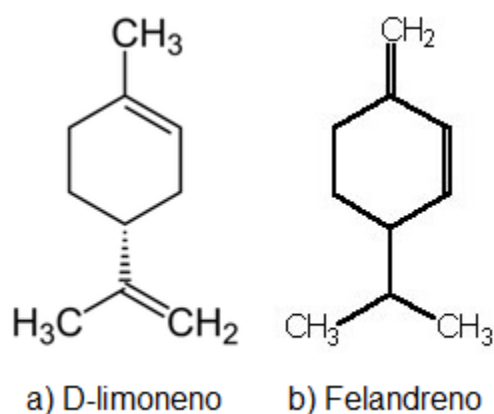


Figura 2.13.- Componentes principales del aceite esencial de limón persa (Ponzi, Masini et al. 1999).

2.6 Estudios Previos

La actividad que involucra la formulación de nanoemulsiones ha sido descrita en varios estudios, pero existen muy pocos que describen el empleo de aceites cítricos combinado con un sistema de homogenización a alta presión, y no existen estudios donde se empleen gomas naturales de mezquite y nopal como agentes emulsionantes para estabilizar dichas emulsiones.

J. Rao en el 2011 realizó un estudio en el cual revisó la fabricación de nanoemulsiones y emulsiones de grado alimenticio, basadas en monopalmitato de sacarosa y aceite de limón; dicho estudio se enfoca en la influencia de la concentración y tipo de surfactante y la relación de mezclado, con el objetivo de poder identificar las condiciones adecuadas para la preparación de nanoemulsiones estables. Para ello realizó diferentes pruebas de tratamientos: simple mezclado, tratamiento térmico y homogenización obteniendo gotas de 105 nm. En este estudio se encontraron varios resultados, concluyendo que el conjunto de los tres procesos es el que genera mejor resultados frente a las caracterizaciones clásicas de las emulsiones (Rao and McClements 2012).

En el 2012, Salvia-Trujillo estudió los efectos de los parámetros de procesamiento (presión y número de ciclos) en la formación de nanoemulsiones microfluidizadas (es decir, pasadas por un homogenizador de alta presión tipo microfluidizador), teniendo en cuenta su tamaño medio de gota y distribución de tamaño, potencial zeta, viscosidad, y el índice de blancura. En este estudio, el promedio del tamaño de gota, viscosidad y blancura de las nanoemulsiones disminuyó al aumentar la presión de procesamiento y el número de ciclos a través de la cámara de interacción del dispositivo microfluidizador. Particularmente, las nanoemulsiones obtenidas a 150 MPa durante 10 ciclos tuvieron un tamaño promedio mínimo de gota de 6 nm utilizando aceite de hierba de limón y como surfactante Tween 80. Concluyendo que la microfluidización es una tecnología potencial que puede ser utilizada para producir nanoemulsiones de aceites esenciales, sin embargo, también se expone la necesidad de mayor información para comprender la influencia de las

condiciones de microfluidización en los aceites esenciales dispersados en nanoemulsiones (Salvia-Trujillo, Rojas-Graü et al. 2013).

Donsí y colaboradores en 2011 y 2012 prepararon nanoemulsiones por homogenización de alta presión y las estabilizaron con diferentes emulsificadores: a) lecitina, b) proteínas de guisantes, c) ésteres de azúcar y d) la combinación de Tween 20 y glicerol monooleato. Adicionalmente, en estos estudios se midió la actividad antimicrobiana proporcionada por las nanoemulsiones preparadas contra las bacterias *Escherichia coli*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Como conclusión se obtuvo que la actividad antimicrobiana fue afectada significativamente por la formulación de la nanoemulsión con fase oleosa de d-limoneno (el tamaño de gota más pequeño tuvieron un mejor resultado de 100 nm – 200 nm) y el diámetro medio de los sistemas de suministro, así como por la clase de microorganismos utilizados (Donsì, Sessa et al. 2010; Donsì, Annunziata et al. 2012).

Las nanoemulsiones están siendo utilizadas cada vez en las industrias de alimentos y bebidas para ciertas aplicaciones debido a sus propiedades físico-químicas y funcionales únicas, situación estudiada por Chen Quian en 2011, estas propiedades son: alta eficiencia de encapsulación, baja turbidez, alta biodisponibilidad, alta estabilidad física. En dicho estudio, se investigó el impacto de la composición del sistema y condiciones de homogeneización en la formación de las nanoemulsiones de aceite de maíz y octadecano en agua, utilizando un homogeneizador de alta presión (Microfluidizer). El diámetro medio de gota disminuyó con el aumento de presión de homogenización y el número de pasos. El diámetro de gota mínimo que se podía producir después de 6 pasos a 14 kbar dependía fuertemente del tipo de emulsionante y de la concentración: dodecilsulfato de sodio (SDS) < Tween 20 < lactoglobulina < caseinato de sodio. Se observó que surfactantes de molécula pequeña (SDS) formaron gotas más pequeñas que las proteínas, esto se atribuyó a su capacidad para adsorberse rápidamente en las superficies de las gotas durante la homogeneización (Qian and McClements 2011).

En el 2012, Li y colaboradores producen de manera sistemática nanoemulsiones de D-limoneno en agua; esta investigación tiene similitudes con la investigación actual

en el aspecto que el D-limoneno es uno de los componentes más importantes en los aceites esenciales cítricos (Li and Chiang 2012). Sin embargo, el método de alta energía empleado en el citado caso es el uso de ultrasonido y además utilizan una combinación de Span 85 y Tween 20 surfactantes que también fueron utilizados durante ésta tesis.

Aunque en algunas de éstas investigaciones las proporciones entre los emulsificantes no son tan similares, los resultados de las caracterizaciones permiten definir un mejor planteamiento para la formulación de las nanoemulsiones. Este es el caso de la investigación de Ghosh (Ghosh, Mukherjee et al. 2013), ya que evalúa diferentes proporciones de Tween 80 y aceite de albahaca cítrica. Como resultado obtuvo que la mejor respuesta de estabilidad y poder antimicrobiano fue cuando el surfactante estaba en una relación en peso 1:4 (Aceite: Surfactante).

Las condiciones iniciales y finales de los procesos de alta energía también son importantes de considerar. La investigación de Mahdi realizada en 2007, describe el proceso de una nanoemulsión en un homogenizador de alta presión y las condiciones de optimización con varios tipos de aceites., de la cual se tomó que la fase acuosa debe dejarse estabilizar 24 horas antes de ser procesada (Mahdi, Yinghe et al. 2007) para obtener mejores resultados.

El método de inversión de fases es un método de baja energía que no se emplea en esta investigación, sin embargo la similitud de los componentes que presenta Ostertag (Ostertag, Weiss et al. 2012) en su investigación, generan una idea de la proporción en las que se pueden manejar los surfactantes (0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.5 en cuanto a la relación de surfactante/aceite) y también para saber que diámetros de gotas se pueden llegar a alcanzar en diferentes tipos de aceites como olivo, sésamo, mineral, canola y naranja.

De acuerdo al estudio de Mao y colaboradores (Mao, O'Kennedy et al. 2012), el emplear aceite de girasol junto con el aceite esencial cítrico puede ser beneficioso, ya que el aceite de girasol permite a que baje la tensión interfacial. Sin embargo, estudios preliminares llevados a cabo en esta tesis no coincidieron con este resultado, por lo

que las formulaciones se centraron en la utilización de únicamente el aceite esencial cítrico como fase oleosa.

Cuando se intentó involucrar buffers y polisorbatos de diferentes clases, Ziani (Ziani, Fang et al. 2012) demostraría en su trabajo que se obtendrían resultados similares con la aplicación de estos o sin éstos, por lo cual en el presente trabajo se decidió prescindir de buffers para mantener la formulación más sencilla.

Es importante comentar que los trabajos previamente comentados han servido como soporte para definir el plan de trabajo a realizar en la presente investigación. La innovación con la que cuenta esta investigación es la formulación, ya que no existen nanoemulsiones que utilicen goma de mezquite en conjunto con aceites esenciales cítricos con actividad antimicrobiana efectiva (sin la presencia de quitosano). Específicamente, el desarrollo de nanoemulsiones con aceite esencial de Limón Persa es un aspecto novedoso ya que no se ha reportado la formulación de nanoemulsiones con este aceite esencial en particular. Se aporta además, el desarrollo del método para la obtención de goma de mezquite utilizando el proceso de liofilización, mientras que el método convencional para secar la goma de mezquite ha sido hasta ahora el método de horneado.

III. Justificación

La protección del medio ambiente se ha convertido en un tema prioritario para los sectores gubernamental e industrial, por ello es importante lograr un aprovechamiento racional de los recursos naturales; el aprovechamiento racional de los materiales naturales puede brindar rendimientos económicos que pueden contribuir a minimizar los gastos que supone la gestión de creación de substitutos químicos. Por lo tanto, es necesaria la realización de estudios que potencien el desarrollo de procesos tecnológicos económicos, eficaces y rentables, que incentiven la utilización de los recursos naturales como una fuente de materias primas adecuadas para la obtención de productos de alto valor agregado.

Actualmente la nanotecnología es ampliamente utilizada en todo tipo de industria para el mejoramiento de las propiedades de los materiales y productos, pero a la vez es necesario poder encontrar materiales más adecuados y ecológicos. Por tanto la combinación de estos temas constituye una parte muy importante en investigaciones para mejora, reforzamiento y desarrollo de materiales “verdes”. En el caso de la ciencia de las emulsiones y nanoemulsiones se busca formulaciones con matrices alternativas que sean biocompatibles, naturales y poco convencionales para mejorar su estabilización, tal es el caso del uso de la goma de mezquite que presenta características similares a la goma arábiga y que actualmente es ampliamente utilizada en una gran variedad de productos existentes en el mercado, mas no como componente de nanoemulsiones.

El uso de nanoemulsiones se ha incrementado en áreas tan diversas como la agricultura, ecología, nutrición, bebidas, medicinas naturales, pigmentación floral, pegamentos entre otros. En la actualidad, las nanoemulsiones son consideradas como una buena opción para la elaboración de productos funcionales. Sin embargo, la funcionalidad de las nanoemulsiones depende en gran medida de su método de preparación, tamaño de gota y su grado de estabilidad, por lo que su formulación resulta fundamental para llegar a un producto estable que muestre resultados favorables para la aplicación en la que se desee emplear. El uso de nanoemulsiones tiene grandes ventajas sobre las emulsiones, debido a que el pequeño tamaño de gota

permite la diversificación de aplicaciones y una ventaja en su vida media al presentar una estabilidad en comparación con las emulsiones.

Por tanto, esta investigación se centra en el desarrollo de nanoemulsiones utilizando como componentes principales aceites esenciales cítricos y goma de mezquite; hasta ahora, no se ha reportado la formulación de nanoemulsiones que empleen estos componentes como aceite y agente emulsionante, respectivamente. Por la abundancia del aceite de Limón Persa y la Goma de Mezquite en nuestro país, se considera una gran área de oportunidad el poder desarrollar nanoemulsiones basadas en éstos componentes. Gracias a las propiedades de los aceites esenciales cítricos, se espera que nanoemulsiones de tamaño pequeño de gota y buena estabilidad cinética, puedan presentar un excelente potencial para aplicaciones como antibacteriales y preservativos para la industria de alimentos, cosmética y farmacia.

IV. Objetivos

4.1 *Objetivo General*

Desarrollar un método para la síntesis de goma de mezquite y formación de nanoemulsiones aceite-en-agua con características fisicoquímicas y estabilidad cinética optimizadas, utilizando aceites esenciales cítricos como fase dispersa y goma de mezquite con algunos tensoactivos como co-emulgentes, por el método de homogenización de alta presión.

4.2 *Objetivos Específicos*

- Analizar las características principales de la materia prima en condiciones preestablecidas en base a literatura para la determinación de sus propiedades.
- Purificar goma de mezquite para ser utilizada como co-emulgente para la estabilización de las nanoemulsiones.
- Establecer las condiciones de proceso óptimas (presión, temperatura, número de pasos, etc) para la formulación de nanoemulsiones con los mejores resultados en tamaño de gota, estabilidad y características fisicoquímicas.
- Establecer las condiciones de composición para la formulación de nanoemulsiones con los mejores resultados en estabilidad y características fisicoquímicas, evaluando el uso de surfactantes secundarios y mezclas de gomas. Comparación con gomas convencionales.
- Determinar los factores que afectan la estabilidad o inestabilidad de las nanoemulsiones.
- Generar nuevo conocimiento de interés para las industrias alimentarias, cosmética y farmacéutica, entre otras.

v. **Hipótesis**

La aplicación de la goma de mezquite en combinación con surfactantes y la homogenización a alta presión permite obtener nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos con igual o mejor estabilidad cinética y control de tamaño de gota que nanoemulsiones formuladas con goma estándar (goma arábica).

VI. Materiales y Métodos

6.1 Materiales

A continuación la tabla 6.1 con el resumen de los materiales y equipos que se utilizaron durante la elaboración de esta investigación.

Tabla 6.1.- Reactivos y Equipos.

Equipos Utilizados para Formulación		Institución
Homogenizador de alta presión	Microfluidizer Serie M-110P Microfluidics	CIATEJ
Pre-homogenizador	Power Gen 500 Fisher Scientific Ultra-Turrax	CIATEJ
Consumibles y Material de Vidrio	Guantes, Cristalería, Agitadores, etc.	CIATEJ/ CIMAV/ Incubadora de Nanotecnología
Equipos Utilizados para Caracterización		
Etapa 1.- Caracterización Materia Prima y Obtención de Goma de Mezquite		
Tensión Interfacial	Tensiómetro de Análisis de Forma de Gota de Dataphysics	CIMAV
Densidad	Densitómetro DMA4500 Marca Anton Paar	CIATEJ
Aldehídos	Titulador automático Titroline Alpha plus (marca SI Analytics)	CIATEJ
Índice de Refracción	Refractómetro RXA170 Marca Anton Paar	CIATEJ
Cromatografía de Gases	7890 ^a Cromatógrafo de Gas con Espectrómetro de Masas Marca Agilent Technology	CIATEJ
Rotación Óptica	Polarímetro Polax 2L Marca Atago	CIATEJ
Viscosidad	Reómetro de TA Instruments ARG2	CIMAV
Liofilizadora	FreeZone Model 7740020 de Labconco	CIMAV
Etapa 2.- Caracterización Formulación		

Tamaño de gota por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.)	CIMAV
Tamaño de gota por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	Nanotracs Wave (Microtracs)	Incubadora de Nanotecnología
Potencial Zeta	Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.)	CIMAV
Control Mínimo Inhibitorio (CMI)	Laboratorio de Microbiología	Incubadora de Nanotecnología
Vida de Anaquel	Cámara de 12 MP Carl Zeiss Tessar 2.8/2.8 AF * La cual desapareció.	CIATEJ/CIMAV
Reactivos utilizados		
Surfactantes	Goma de Mezquite Polvo y Perlas	Donación: GREENCORP / Las Mielles de Sonora
	Goma de Nopal	Donación: GREENCORP / Las Mielles de Sonora
	Goma Arábica	CIMAV
	SPAN 20 - LQ - (AP), Croda México	CIMAV
	SPAN 85 - NV - LQ - (AP), Croda México	CIMAV
	Tween 80-NV-LQ(AP), Croda México	CIMAV
	Tween 20, Croda México	CIMAV
	Lecitina, Alfa Aesar	CIMAV
	Brij O20 - SS - (MH), Croda México	CIMAV
Aceites	Aceite de Girasol	FRUTECH/CIATEJ
	Aceite Esencial Limón Persa	
	Aceite Esencial Toronja Rosa	
	Aceite Esencial Mandarina Verde	
	Limoneno Industrial	

6.2 Métodos

6.2.1 Etapa 1: Caracterización de Materias Primas

La primera etapa de la investigación, consiste en la caracterización de la materia prima utilizada en la formulación de las nanoemulsiones. Para llevarse a cabo dicha etapa, se procedió a analizar las gomas naturales de mezquite y nopal que provenían de una donación hecha por la empresa Green Corp Biorganiks de México S.A. de C.V. y los aceites esenciales cítricos (toronja rosa y limón persa) donados por Frutech International Corporation de México S.A. de C.V. Sin embargo, no fue posible obtener suficiente cantidad de gomas de mezquite y nopal de la empresa Green Corp como para realizar toda la experimentación. Por tanto, se implementó el desarrollo de una metodología para la obtención de goma de mezquite proveniente de perlas de sabia de árboles de mezquite sonorenses, una vez que se obtuvo la goma de mezquite, se procedió a caracterizarla (como se describe en esta sección).

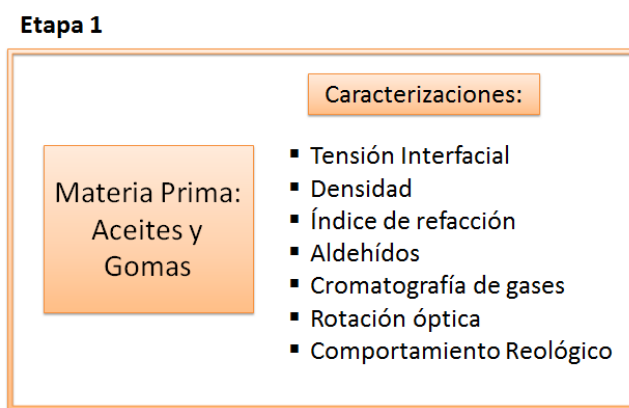


Figura 6.1.- Diagrama de Etapa 1 Original.

6.2.1.1 Gomas

Era necesario establecer las características de las gomas con los que se harían las formulaciones ya que no se recibió ningún tipo de información por parte de Green Corp; las gomas son una parte esencial de la formulación ya que tienen la función de estabilizar el sistema junto con surfactantes comerciales, por lo que requiere

caracterizar dichas gomas. Se consideró importante determinar la viscosidad y densidad de soluciones de goma así como la y tensión interfacial entre fases acuosas de soluciones de goma y los aceites esenciales. Esto es importante tanto para las gomas cedidas por Green Corp como para la goma de mezquite obtenida en el laboratorio. Para ésta última fueron especialmente importantes los ensayos reológicos para poder determinar la concentración óptima de las soluciones a liofilizar.

6.2.1.1.1 Técnicas de caracterización para gomas de Green Corp

6.2.1.1.1.1 Determinación de las propiedades reológicas

Considerando que las gomas exhiben interesantes propiedades como estabilizantes y emulsionantes, es importante su caracterización reológica. Esta propiedad es de vital importancia para valorar su potencial uso industrial. La inseguridad en el suministro, calidad y estabilidad de los precios de las gomas comerciales, ha incentivado la búsqueda de nuevas materias primas renovables capaces de producir gomas naturales con valor añadido y excelentes propiedades funcionales. Para el análisis de las gomas naturales de Green Corp se utilizó el reómetro de TA Instruments ARG2 con una geometría cónica de 60mm y 2° de acero.

Se prepararon dos grupos de viales con muestra. En el primer grupo se prepararon 9 viales (4 gramos cada uno) con agua desionizada y con 0.5%, 5% y 10% porcentaje en peso de las gomas de mezquite, nopal y goma arábica como control.



Figura 6.2.- Primer grupo de viales: la primera línea es goma de mezquite, la línea central es goma de nopal y la línea posterior es goma arábica en los porcentajes de izquierda a derecha de 0.5%, 5% y 10%.

Cada uno de los viales fue agitado por vórtex por 5 minutos para un mezclado eficiente. Este primer grupo de viales fue sujeto a un barrido de esfuerzo con una velocidad de cizalla (1/s) de $4.011E-8$ a 8596 a una temperatura de 25°C para determinar las condiciones de alteración de la estructura, y posteriormente seleccionar la región donde se estudiaría la goma bajo un esfuerzo cortante óptimo.



Figura 6.3.- Reómetro ARG2 en proceso de medición con control de temperatura mediante chaqueta termostatzada.

6.2.1.1.1.2 Medida de la Tensión Interfacial

Las mediciones de tensión interfacial se realizaron con un tensiómetro OCA 15 plus (Dataphysics Instruments). La razón de esta prueba es el descarte de uno o varios medios oleosos. El ensayo consistió en colocar la muestra en una cubeta de cuarzo con un medio donde se hace la prueba de la gota colgante, en este caso los medios en los que se produce la gota son los aceites cítricos (limón persa y toronja rosa) y su respectiva combinación con aceite de girasol (en una relación de 1 parte de aceite esencial: 2 partes de aceite de girasol) dando un total de cuatro medios.

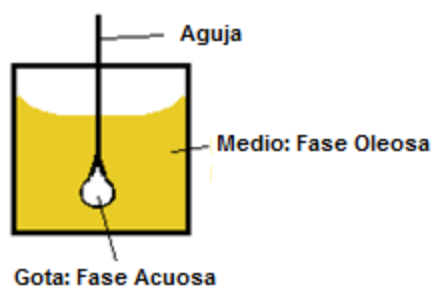


Figura 6.4.- Condición de muestra para medición en Tensiómetro.

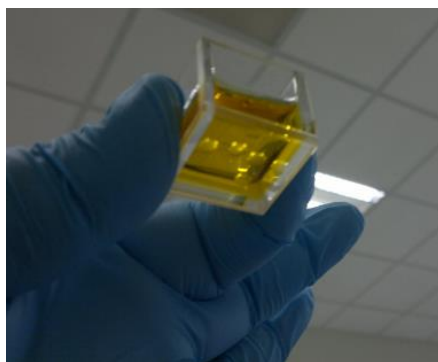


Figura 6.5.- Gotas de Goma en Medio Oleoso.

6.2.1.1.2 Obtención de Goma de Mezquite

Debido a que se encontraron varios inconvenientes con la goma de nopal al ser procesada en el microfluidizador (generaba taponamientos y fugas), y a la falta de suministro de gomas por parte de Green Corp, el proyecto fue redirigido tomando la decisión de trabajar únicamente con la goma de mezquite.

Para ello, se determinó obtener a nivel laboratorio la goma de mezquite. Brevemente, se diseñó un método de acuerdo a lo reportado en literatura (Torres 2002; López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012) para la selección del material, y a lo reportado (Balderrama Ibarra ; Córdova 2004; Rosas A. 2005; Acedo Carrillo 2006) para las etapas de limpieza y obtención.

Paso 1.- Obtención de las perlas de savia del árbol de mezquite sonorense, dichas perlas provienen de la tienda “Las Mielles de Sonora” como un dulce llamado “chukata”.



Figura 6.6.- Perlas de Mezquite.

Paso 2.- Selección de las perlas según la literatura (Torres 2002; López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012) para obtener el material más puro se seleccionan perlas de calidad GMA y GMB, descartándose perlas GMC y desechos.



Figura 6.7.- Perlas de Mezquite calidad GMA y GMB.

Paso 3.- Se procede a moler para disminuir el tamaño de la perlas de mezquite, esto con la intención de que la solubilización y el filtrado sea más rápido.



Figura 6.8.- Perlas reducidas de tamaño por medio de molienda.

Paso 4.- Con ayuda de un mortero se muele hasta obtener polvo blanco fino.



Figura 6.9.- Perlas de mezquite convertidas en polvo fino.

Paso 5.- Se procede a disolver dicho polvo en agua, en concentraciones que se basan en las pruebas de viscosidad que se hicieron al momento de la caracterización y con ayuda de la literatura; se deja reposar 24 horas antes de empezar a filtrar para que la goma se hidrate (Balderrama Ibarra ; Córdova 2004; Rosas A. 2005; Acedo Carrillo 2006).

Paso 6.- Se procede a un filtrado como se muestra en la imagen 6.10 con ayuda de un jet de aire para crear vacío. Se intentaron diferentes maneras de filtrado ya que ésta lleva tres días, sin embargo, esta fue con la que se obtuvo mejores resultados; por tanto es un posible paso a mejorar, por ejemplo, empleando una bomba de vacío para filtrar.



Figura 6.10.- Filtrado de la goma de mezquite para eliminar impurezas.

Paso 7.- Se procede a recuperar todo el material del matraz.



Figura 6.11.- Goma Filtrada y Limpia (Izq.)/Goma con Impureza (Der.)

Paso 8.- Al final se pasa a extraer el agua de la goma de mezquite disuelta ya sea en horno (70°C por 3 días) o por liofilización. Como se observa en la Figura 6.12, la goma secada en horno presenta un color caramelo mientras que la secada por liofilización es de un color muy claro; esto es indicio de degradación de la goma secada en horno.



Figura 6.12.- Goma secada por horno (Izq.) /Goma secada por Liofilización (Der.)

6.2.1.1.3 Determinación de las características térmicas de las gomas (TGA-DTA)

Se emplearon estas técnicas para observar las similitudes y diferencias entre los tipos de gomas obtenidas a nivel laboratorio y las gomas de Green Corp. Con la técnica de análisis DSC se determina la temperatura a la cual se presentan los posibles cambios de fase o descomposición que pueden sufrir las gomas; por otro lado la técnica TGA permitirá conocer contenidos de agua y variaciones sobre la temperatura de degradación de las mismas. La caracterización térmica de las gomas fue realizada en el equipo SDT Q600 TA Instruments, empleando crisoles de alúmina de 70 μL , a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, en un intervalo desde temperatura ambiente hasta 800°C , con un flujo a $100\text{ mL}/\text{min}$ de gas nitrógeno de pureza 5.0 para el análisis de TGA. El equipo está diseñado para el análisis e identificación de composición de materiales por cambios en masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo, en un intervalo de temperatura ambiente hasta 1500°C , pudiendo llevar a cabo estudios simultáneos de DSC.

6.2.1.1.3.1 Evaluación de la composición de las gomas por FT-IR

Para realizar este análisis se utilizó el espectrofotómetro Thermo Nicolet 6700 FT-IR con su accesorio de reflectancia total atenuada (Thermo Scientific), empleando muestras en sólido (polvos) de acuerdo a lo reportado en la literatura (López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012).

6.2.1.2 Aceites Esenciales Cítricos

Las características de los aceites esenciales se obtuvieron llevando a cabo una serie de análisis que estimaron el grado de pureza que presenta un aceite esencial por medio de su composición. La mayoría de estos análisis es de la categoría de análisis fisicoquímicos.

6.2.1.2.1 Técnicas de Caracterización para Aceites Esenciales Cítricos

6.2.1.2.1.1 Determinación de la Densidad e Índice de refracción

Este análisis se llevó a cabo utilizando el densitómetro DMA4500 con módulo de refractómetro RXA170 (Anton Par, lugar de fabricación), las muestras se colocaron en una jeringa de 3ml y lentamente se llenaron ambas cámaras cuidando que no existieran burbujas de aire, a una temperatura de 20°C, la razón de esta prueba fue para obtener los valores de los aceites que se emplearían después en otras caracterizaciones.

6.2.1.2.1.2 Determinación de la Concentración de Aldehídos

La determinación es realizada por el método del clorhidrato de hidroxilamina, es importante evaluar la cantidad de aldehídos en un aceite esencial cítrico porque determina la calidad de éste mismo y si existe alguna impureza en éste. Se utilizó un Titulador automático Titroline Alpha plus de SI Analytics para obtener la concentración de aldehídos de los aceites cítricos de toronja rosa y limón persa. Cuatro gramos de aceite son pesados en un vaso de precipitado, se agregan 50 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina, se agita 1 minuto a 300 rpm, para después dejarse reposar 30 minutos. Posteriormente, se realiza una titulación con KOH metanólico y se registra la cantidad de mL empleados para llegar a un pH de 3. Para poder determinar la cantidad de aldehídos en cada muestra se realizan los siguientes cálculos:

$$\% \text{ de compuestos carbonílicos} = (a \times N \text{ meq} \times 100) / P$$

Dónde:

- a = Volumen de la solución de hidróxido de potasio empleado en la neutralización de la muestra en mL.
- N = Normalidad de la solución de hidróxido de potasio.
- P = Peso de la muestra, en gramos.
- meq = Miliequivalente correspondiente al compuesto carbonílico en el que se expresa el resultado.

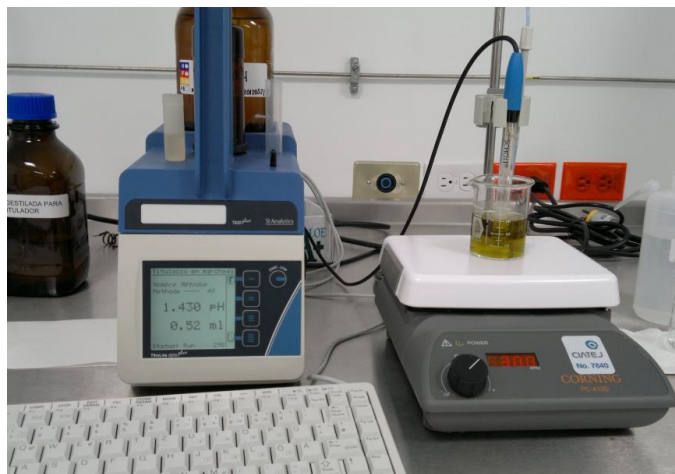


Figura 6.13.- Titulador en proceso de medición de aldehídos.

6.2.1.2.1.3 Determinación del Perfil de volátiles por cromatografía de gases

El análisis se realiza en un Cromatógrafo de Gas modelo 7890^a acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent Technologies). Las condiciones para el análisis se llevan a cabo de acuerdo a un método interno desarrollado por CIATEJ Unidad Noreste. En este caso la calibración de dicho equipo se realiza cada 48 horas y corre a cargo de CIATEJ Unidad Noreste. Se inyectan 2 μ L de cada muestra de aceite. La columna HP-5MS (Agilent Technologies) utiliza Helio como gas acarreador y emplea la librería Wiley.

6.2.1.2.1.4 Medida de la Rotación Óptica

Esta medición se realizó utilizando un polarímetro Polax 2L (Atago). Dependiendo de qué tan obscuro sea el aceite esencial cítrico se selecciona el tubo polarimétrico. Para el aceite esencial de toronja rosa se empleó el tubo de 5mL y para el aceite de limón persa se utiliza el tubo de 2 mL. Se utilizó agua destilada para calibrar el equipo cada día de lectura. Brevemente, la muestra se coloca por un extremo del tubo y este se rellena evitando dejar burbujas, se cierra y se coloca dentro de la cámara del polarímetro y se procede a la lectura del ángulo de rotación de la muestra.



Figura 6.14.- Rotación Óptica en Polax

6.2.1.2.2 Actividad Antibacterial: Concentración Mínima Inhibitoria

Con el objetivo de conocer la sensibilidad de ciertas bacterias frente a los aceites esenciales cítricos, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Ver Anexo C) para *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Brevemente, las cepas puras fueron sembradas en agar soya tripticaseína y llevadas a incubación por 18 horas, posteriormente el cultivo desarrollado fue muestreado con ayuda de un asa y colocado en caldo Mueller Hinton (MH) (fabricante, lugar de fabricación) para ser incubadas por un lapso de 4 a 6 horas más, esta suspensión fue colocada en un colorímetro Lamote, Smart 2, en tubos de 10 mL, y ajustada con caldo MH a una escala de 0.08-0.1 en absorbancia, a una longitud de onda de 620 nm lo que representa 0.5 Mc Farland, esta concentración fue verificada haciendo diluciones decimales para conteo en placa. Todos estos procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad. La homogenización de los medios fue auxiliada con un agitador tipo vórtex.

De estas suspensiones 0.5 McFarland, con ayuda de una micropipeta se colocaron 10 μ l en 9.99 mL de buffer de fosfatos (pH 7.3), haciendo una dilución 1:1000 en este procedimiento, las suspensiones buffer se colocan a 4°C durante el procedimiento y hasta que se incorporan en las placas de micro dilución. Esta placa contiene un total de 96 pozos (8x12) lo que permite utilizar 8 canales para diferentes muestras y 12 pozos para realizar diluciones del antibiótico en ellos, en el procedimiento se utilizan el pozo 1 y 12 como control negativo y positivo respectivamente.

Se prepararon microdiluciones seriadas, iniciando con 100 μ L de aceite esencial cítrico (control negativo) y finalmente la última dilución sin adición de antibiótico (control positivo).

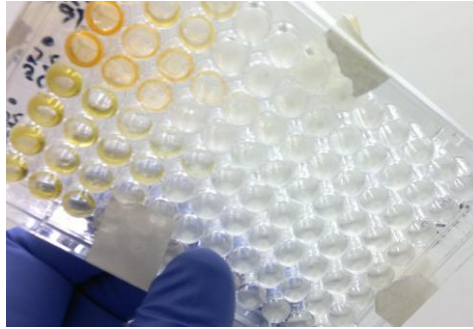


Figura 6.15.- Caja de CMI

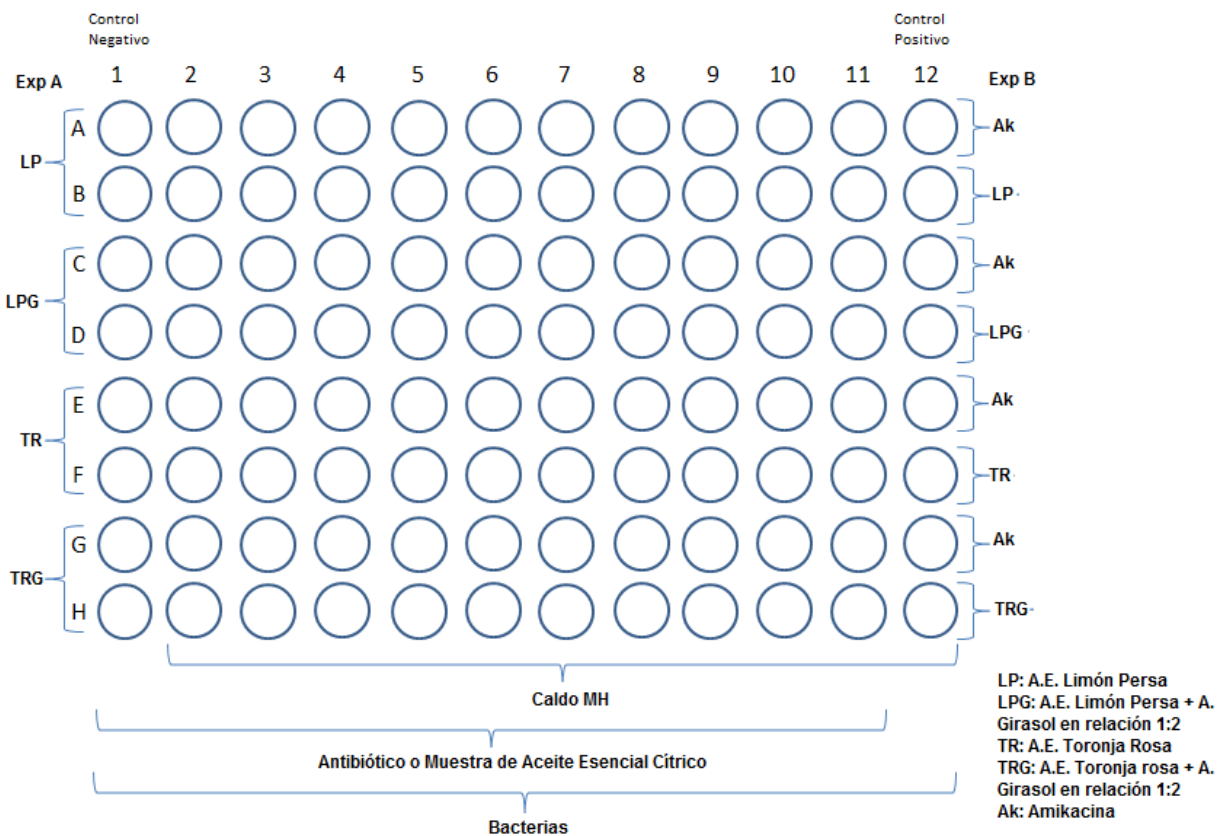


Figura 6.16.- Explicación Gráfica de los experimentos de CMI.

6.2.2 Etapa 2.- Desarrollo de formulaciones de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos.

6.2.2.1 Método para la obtención de nanoemulsiones

Durante el desarrollo de las formulaciones, fue necesario hacer pre-emulsiones antes de realizar el proceso por alta presión, utilizando un homogeneizador (Ultra Turrax Power Gen 500, Fisher Scientific) durante 5 minutos. Posteriormente ésta pre-emulsión fue sometida a la homogeneización por alta presión (Microfluidizer Serie M-110P). Para la obtención de nanoemulsiones se utilizó el homogeneizador de alta presión Microfluidics M-110P (Microfluidics) con geometría en Y.

El equipo consta de un depósito de entrada y es alimentado con una bomba de alta presión a la denominada "Cámara de Interacción" a velocidades de hasta 400m/s y se recoge el producto procesado en un depósito de salida mantenido a temperatura fría para evitar degradación térmica de la nanoemulsión. La exclusiva geometría fija de la cámara de interacción es el corazón de la tecnología de Microfluidizer.



Figura 6.17.- Microfluidizer M-110P de Microfluidics.

En ella el producto se hace pasar por unos microcanales en "Y" o "Z" en los que se produce una extraordinaria velocidad de cizalla, con lo cual las gotas de la emulsión original serán divididas en gotas mucho más pequeñas, obteniendo como resultado un nuevo producto con unas características extremadamente consistentes y reproducibles en cuanto al tamaño de gota.

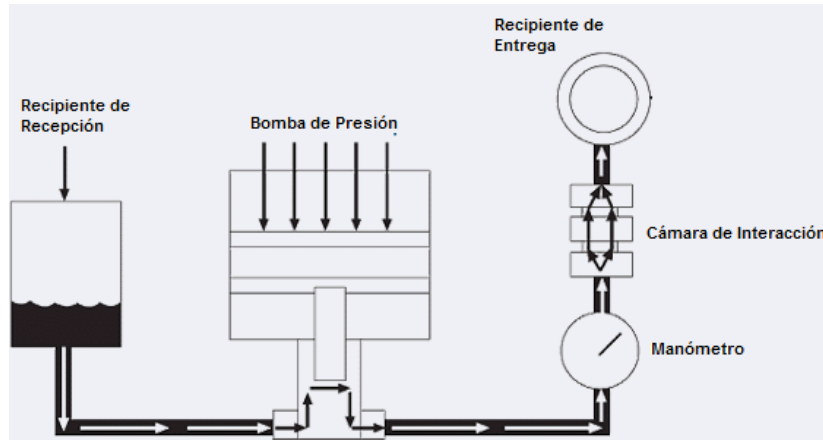


Figura 6.18.- Diagrama de funcionamiento del Microfluidizer.

Se procede a tomar las muestras que serían idealmente de tamaño nanométrico para proceder a etapa de caracterización de nanoemulsiones (Iesmat 2010). En el caso exclusivo de la primera y la segunda ronda los ingredientes se fueron incorporando al agua desionizada mientras era agitada por el ultraturrax, primero se incorporó el aceite y después el surfactante para obtener la preemulsión. Los rangos de presión utilizados fueron de 10000 a 30000 Psi con una temperatura de entrada de la muestra de 25 °C.

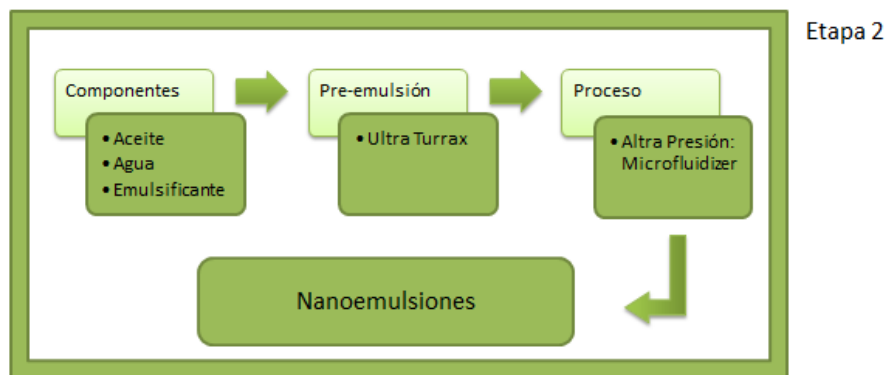


Figura 6.19.- Diagrama de Procesamiento de la Etapa 2: formación de nanoemulsiones.

6.2.2.1.1 Experimentos Exploratorios de la Puesta en Marcha

Tabla 6.2.- Experimentos para la puesta en marcha (todos a 10000 psi).

Exp	Fase Dispersa	Surfactante	Fase Continua	Condiciones	Temp
1	Aceite Esencial Cítrico	Goma	Agua DI	2% Aceite / 0.5% goma / 97.5% agua.	25°C
2	Aceite Esencial Cítrico	Tween	Agua DI	2% Aceite / 0.5% Tween / 97.5% agua.	25°C
3	Aceite Esencial Cítrico	Tween /Goma (1:1)	Agua DI	2% Aceite / 0.5% Tween + goma / 97.5% agua.	25°C
4	Aceite Esencial Cítrico	Lecitina	Agua DI	2% Aceite / 0.5% lecitina / 97.5% agua.	25°C
5	Aceite Esencial Cítrico	Lecitina/Goma (1:1)	Agua DI	2% Aceite / 0.5% lecitina + goma / 97.5% agua.	25°C
6	Aceite Esencial Cítrico + Aceite de Girasol	Goma	Agua DI	6% Aceite / 0.5% goma / 93.5% agua.	25°C
7	Aceite Esencial Cítrico + Aceite de Girasol	Tween	Agua DI	6% Aceite / 0.5% Tween / 93.5% agua.	25°C
8	Aceite Esencial Cítrico + Aceite de Girasol	Tween/Goma (1:1)	Agua DI	6% Aceite / 0.5% Tween + goma / 93.5% agua.	25°C
9	Aceite Esencial Cítrico + Aceite de Girasol	Lecitina	Agua DI	6% Aceite / 0.5% lecitina / 93.5% agua.	25°C
10	Aceite Esencial Cítrico + Aceite de Girasol	Lecitina/Goma (1:1)	Agua DI	6% Aceite / 0.5% lecitina + goma / 93.5% agua.	25°C

Nota: Dichas emulsiones fueron homogenizadas en un Microfluidizer Serie M-110P a diferentes números de pasos (1, 5, 10), tomando muestras de 10ml cada una, con una presión de 10,000 PSI para evaluar estabilidad y tamaño de gota.

6.2.2.1.2 Primera Serie de Experimentos

En esta etapa se generaron los controles para una nueva formulación basada en los resultados de la puesta en marcha. En esta etapa se duplica la cantidad de surfactante para mejorar la estabilidad y prevenir el cremado. Se hicieron controles de goma arábica, tween 80, lecitina y las combinaciones posibles entre éstos como se observa en la tabla 6.3.

Tabla 6.3.- Experimentos de Formulación Primera Serie.

Exp	Fase Oleosa	Surfactante	Fase Acuosa	Condiciones	Temp
GA/LP	Limón Persa	Goma Arábica	Agua DI	2% Aceite /1% Goma Arábica / 97% ADI	25°C
TW80/LP	Limón Persa	Tween 80	Agua DI	2% Aceite /1% Tween 80 / 97% ADI	25°C
LEC/LP	Limón Persa	Lecitina	Agua DI	2% Aceite /1% Lecitina / 97% ADI	25°C
LEC/GA/LP	Limón Persa	Lecitina/ Goma Arábica (1:1)	Agua DI	2% Aceite/ 0.5% Lecitina + 0.5% Goma Arábica/ 97% ADI	25°C
TW80/LEC/LP	Limón Persa	Tween 80/ Lecitina (1:1)	Agua DI	2% Aceite/ 0.5% Tween 80 + 0.5% Lecitina/ 97% ADI	25°C
T80/GA/LP	Limón Persa	Tween 80/ Goma Arábica (1:1)	Agua DI	2% Aceite/ 0.5% Tween 80 + 0.5% Goma arábica/ 97% ADI	25°C

Nota: Dichas emulsiones fueron homogenizadas en un Microfluidizer Serie M-110P a diferentes números de pasos (1, 7, 15), tomando muestras de 10mL cada una, con una presión de 10000 PSI, para poder ser analizadas posteriormente y así se observó la estabilidad y el tamaño de gota.

6.2.2.1.3 Segunda Serie de Experimentos:

De acuerdo a los resultados de la primera y segunda ronda, se precede a realizar modificaciones en el proceso de elaboración. En esta ronda, las gomas y los surfactantes se dejan reposar 12 horas en refrigerador para que se hidraten por completo; además, se incrementa la concentración de aceite a 10% y la de sistema surfactante (surfactante + cosurfactante + goma) se incrementa a 10%. Durante el

desarrollo de la pre-emulsión con el ultraturrax ésta se calienta 40°C por 10 minutos. La temperatura inicial del proceso de alta presión de homogeneización será de 35°C y la temperatura a la salida será de 8-10°C aproximadamente. Finalmente, se tomó la decisión también de utilizar un co-surfactante (Span 20 o Span 85), un surfactante (Tween 20, Tween 80, Lecitina o Brij O20) y la goma (de mezquite).

Tabla 6.4.- Experimentos de Formulación Segunda Ronda.

Exp	Aceite LP	Span 85	Span 20	Tween 80	Tween 20	Lec	BRIJ O20	Goma Mezquite	ADI	PSI
1	10%	-	-	-	-	-	-	10%	80%	10000
2	10%	1%	-	-	-	-	-	9%	80%	10000
3A	10%	1%	-	4%	-	-	-	5%	80%	10000
3B	10%	-	1%	4%	-	-	-	5%	80%	10000
3C	10%	1%	-	-	4%	-	-	5%	80%	10000
3D	10%	-	1%	-	4%	-	-	5%	80%	10000
4	10%	-	1%	-	-	4%	-	5%	80%	10000
5	10%	-	1%	-	-	-	4%	5%	80%	10000
6A	10%	-	-	0.5%	0.5%	4%	-	5%	80%	10000
6B	10%	-	0.5%	0.5%	-	4%	-	5%	80%	10000

Nota: Se tomaron muestras en los pasos 1, 3, 5 y 10, de 10ml cada una.

6.2.2.1.4 Tercera Serie de Experimentos

Una vez que se ha detectado la fórmula que ha presentado las mejores características de traslucidez de una nanoemulsión y además para comprobar si era reproducible se procedió a realizar movimientos en su composición. Se tomaron muestras en los pasos 1, 3, 5 y 10, de 10ml cada una.

Tabla 6.5.- Experimentos de Formulación Tercera Ronda.

Exp	N° de Vueltas	Aceite LP	Span 20	Tween 80	Goma Mezquite	ADI	PSI
Control Alfa	3V	9.86%	1.4456%	4.895%	4.948%	78.85%	10000
Control Beta	1V	9.86%	1.4456%	4.895%	4.948%	78.85%	30000
Control Delta	10V	9.86%	1.4456%	4.895%	4.948%	78.85%	20000
Control Epsilon	3V	10%	1%	4%	5%	80%	20000

6.2.2.1.5 Cuarta Ronda de Experimentos

Como se detalla en la sección de resultados, la mejor fórmula resulta ser Control Delta debido a su calidad de transparencia y tamaño de gota, por lo se preparan los controles de comparación utilizando la goma arábica en lugar de la goma de mezquite, así como también utilizando más mezcla de Span 20 y Tween 80 para sustituir la goma; finalmente, se hace también un control substituyendo la goma de mezquite por más agua.

Tabla 6.6.- Experimentos de Formulación Cuarta Ronda

Exp	Aceite LP	Span 20	Tween 80	Factor Cambiante	ADI	PSI
CTRL DELTA	9.86%	1.4459%	4.89%	Goma de Mezquite: 4.93%	78.86%	20000
CTRL 2	9.86%	1.4459%	4.89%	Goma Arábica: 4.93%	78.86%	20000
CTRL 3	9.86%	1.4459%	4.89%	Exceso de Span 20: 1.12% Exceso de Tween 80: 3.81%	78.86%	20000
CTRL 4	9.86%	1.4459%	4.89%	Se agrega más ADI	83.76%	20000

Nota: Se tomaron muestras en los pasos 1, 3, 5 y 10, de 10ml cada una.

Al final para obtener un comparativo negativo, se tomó la decisión tras una serie de caracterizaciones, que se tomarían las 4 mejores nanoemulsiones contra las 4 peores quedando así la siguiente tabla de comparación para la sección de resultados:

Tabla 6.7.- Las Mejores Vs. Las peores Nanoemulsiones.

Mejores	Peores
CTRL DELTA: 10 Pasos	Experimento 3D: 1 Paso
CTRL 2: 3 Pasos	Experimento 6A: 1 Paso
CTRL 3: 10 Pasos	Experimento 4: 1 Paso
CTRL 4: 5 Pasos	Experimento: 3C: 1 Paso

6.2.3 Etapa 3.- Caracterización de las nanoemulsiones obtenidas para selección de la formulación más óptima.

Para demostrar qué formulación conduce a una optimización del empleo del microfluidizer y gomas naturales en la formación de nanoemulsiones, es necesario determinar el tamaño de gota, el potencial zeta, la estabilidad, la viscosidad y la densidad en función del número de pasos en el microfluidizer y la composición de la nanoemulsión; elementos de la formulación que se lograron obtener en la etapa 2. En la etapa 3 se procede a realizar caracterizaciones a las nanoemulsiones y como valor agregado se realizó también la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en las instalaciones de la Incubadora de Nanotecnología.

6.2.3.1 Técnicas de caracterización para nanoemulsiones

6.2.3.1.1 Tamaño de Gota mediante dispersión dinámica de luz (DLS)

En la ciencia coloidal, la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) ha sido ampliamente utilizada para estudiar la cinética de los procesos de desestabilización y la distribución de tamaño de las partículas, gotas o agregados que se forman (Salicio and Moreno 2005). DLS es una técnica óptica ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios de coloides con partículas de tamaño submicrométrico (Chu, Wang et al. 1991). Básicamente, el instrumental empleado consiste en: 1.- Una fuente de luz láser monocromática que incide sobre una solución por lo general diluida de la muestra a analizar. 2.- Un fotómetro posicionado a un dado ángulo de detección medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra y que colecta la luz dispersada por las partículas. 3.- Un correlador digital que conjuntamente con el software del equipo permiten obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo (Glatter, Hofer et al. 1985). Mediante el análisis de la función de correlación por diferentes algoritmos, es posible obtener la distribución de tamaños de partícula, el tamaño medio y la polidispersidad. Estas mediciones se realizaron con un Zetasizer Nano ZS en CIMAV.

Para realizar la medición, se colocaron 10 mL de agua desionizada en un vial, y se mezclaron con 3 gotas de la nanoemulsión (la cantidad de gotas fue diferente para cada nanoemulsión, dependiendo de la transparencia u opacidad de la misma). Se procede a mezclarse y posteriormente la celda de medición fue llenada con la cantidad necesaria de nanoemulsión diluída.



Figura 6.20.- Muestra preparada para DLS

6.2.3.1.2 Actividad Antibacterial: Concentración Mínima Inhibitoria

Esta prueba se describió previamente en la sección de técnicas de caracterización para aceites esenciales de forma breve y también está disponible en el Anexo C. Esta evaluación fue realizada a partir de la segunda ronda. En este punto se corrieron varios tipos de pruebas de CMI para cada muestra y para cada número de vueltas (pasos) 1V, 7V y 15V (como se ve en la sección de resultados), exclusivamente con la bacteria *Staphylococcus aureus* ya que era la que presentaba mejores resultados; sin embargo, la respuesta fue negativa por lo que se procedió a investigar mediante unas siembras en caja (Anexo D) si existía la presencia de una cepa contaminante. Una vez que se tuvieron las cepas se procedió a usar tinciones de Gram (Anexo E) para identificarlas.

Debido a la contaminación de las nanoemulsiones se procedió a hacer nuevas pruebas de CMI y se decidió esterilizar las muestras, primero en autoclave lo cual desestabilizó la muestra (la nanoemulsión se separó en fases); tras este evento, se hicieron pruebas con luz UV (10min, 40min y 19hrs) como método de esterilización. Con dicho método las nanoemulsiones permanecieron estables y además fueron

esterilizadas satisfactoriamente, por lo cual las pruebas de CMI determinantes se llevaron a cabo utilizando nanoemulsiones esterilizadas mediante luz UV.

vii. Resultados

7.1 Etapa 1: Caracterización de Materia Prima y Purificación de Goma de Mezquite.

La Etapa 1 es muy importante ya que es la base para la experimentación de desarrollo de las nanoemulsiones. Con los resultados obtenidos durante la etapa 1 se tomaron decisiones para el diseño experimental y el desarrollo de las nanoemulsiones, un ejemplo de esto es el incremento de la concentración de las gomas y la selección adecuada tanto de la goma como del aceite cítrico esencial a utilizar en las nanoemulsiones.

7.1.1 Caracterización de las gomas comerciales.

7.1.1.1 Reología Estacional

En la figura 7.1 se muestra el comportamiento reológico de la goma arábica y las gomas de mezquite y nopal proporcionadas por Green Corp, las cuales presentaron un comportamiento de adelgazamiento por cizalla, como resultado del barrido. Cuando se aumentó la velocidad del cizallamiento, la goma comenzó a ceder ante el flujo, lo que resultó en una disminución de la viscosidad del sistema. Esta característica proviene de la viscosidad típica de muchos fluidos no newtonianos (por ejemplo fluidos poliméricos, dispersiones floculadas, coloides), y se puede atribuir a la estructura “reversible” que tienen estos fluidos.

Cuando se produce cizalla en el material, la estructura se rompe, lo que resulta en un comportamiento dependiente del cizallamiento (Logaraj, Bhattacharya et al. 2008). Los datos experimentales de viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento fueron analizados con varias ecuaciones (Casson, Cross, Newton y Carreau, disponibles en el software Data Analysis TA), las cuales describen este tipo de conducta de "viscosidad estructural". El modelo que mejor responde a los datos experimentales en todos los casos fue el modelo reológico de Carreau (Mothe and Rao

1999).

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{[1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^n} \quad (1)$$

Donde η es la viscosidad (Pa*s), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de cizallamiento (s^{-1}), η_0 (Pa*s) es la velocidad de cizallamiento más baja limitante de la viscosidad, η_{∞} (Pa*s) es la velocidad de cizallamiento más alta limitante de la viscosidad, λ (s) es la constante del tiempo relacionado con los tiempos de relajación de las gomas, y n (sin dimensión) es el índice de comportamiento de la ley de potencia. Los valores de los parámetros disponibles por el software Data Analysis del reómetro Rheometer ARG2 de TA Instruments se indican en la tabla 7.1 y sus tendencias son muy difíciles de explicar, esto se debe a que la constitución química de las gomas deben afectar su desempeño. En términos generales, la goma de nopal de Green Corp fue la que presentó una mayor viscosidad, mientras que la goma arábica comercial tuvo un comportamiento por debajo de la goma de mezquite de Green Corp.

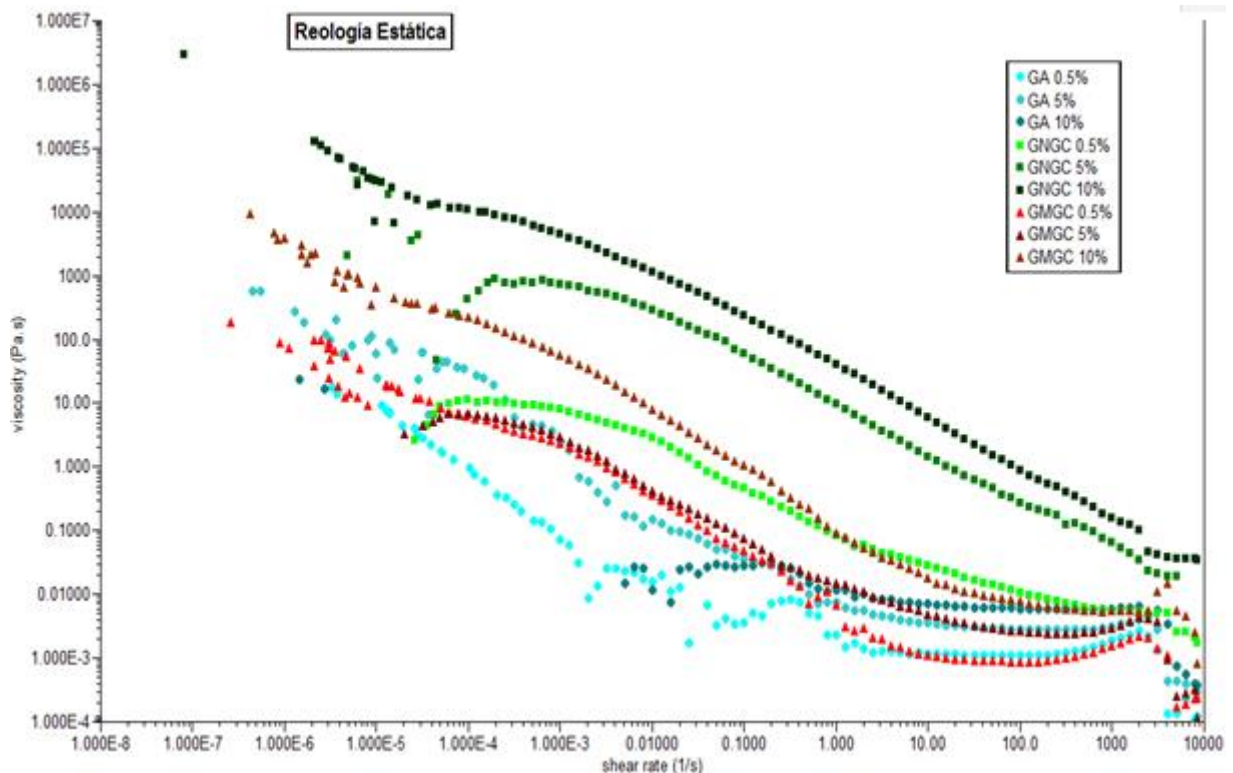


Figura 7.1.- Gráfica de Reología estacional de las Gomas de Green Corp y Goma Arábica.* *Nota: Dónde.- GA: Goma arábica, GNGC: Goma de nopal de Green Corp, GMGC: Goma e mezquite de Green Corp.

Tabla 7.1.- Parámetros Reológicos del modelo Carreau de las gomas de Green Corp y arábica comercial.

Leyenda en Gráfica	Goma	η_0 (Pa*s)	η_∞ (Pa*s)	λ (s)	n
GA 0.5%	Goma Arábica al 0.5%	5.779E5	1.185E-3	8.561E9	0.9732
GA 5%	Goma Arábica al 5%	1.000E35	1.799E-3	1.000E35	0.7801
GA 10%	Goma Arábica al 10%	3001	5.33E-3	1.200E8	0.7922
GNGC 0.5%	Goma de Nopal Green Corp al 0.5%	23130	2.450E-3	3.331E9	0.5594
GNGC 5%	Goma de Nopal Green Corp al 5%	2694	1.578E-8	3746	0.7032
GNGC 10%	Goma de Nopal Green Corp al 10%	1.000E35	9.133E-9	1.000E35	0.6717
GMGC 0.5%	Goma de Mezquite Green Corp al 0.5%	44.09	7.394E-4	81700	0.7831
GMGC 5%	Goma de Mezquite Green Corp al 5%	23.13	1.362E-3	53350	0.6569
GMGC 10%	Goma de Mezquite Green Corp al 10%	864.7	0.01461	32070	0.8642

Para comenzar la discusión, se compara el comportamiento reológico de la goma de nopal de Green Corp con los datos de la literatura, en particular, el trabajo reportado por Medina-Torres y colaboradores (Medina-Torres, Brito-De La Fuente et al. 2000). En la figura 7.2, se muestran datos de dos concentraciones de goma de nopal directamente comparables a las empleadas en este trabajo, 5% y 10%. A una concentración de 5%, la goma de nopal de Green Corp muestra un comportamiento reológico con valores más altos de viscosidad, por lo tanto un flujo menor ya que cede menos a la velocidad de cizalla en comparación con lo reportado por Medina-Torres y colaboradores. Al 10% presenta una viscosidad aún mayor, ya que la goma de nopal de Green Corp muestra una viscosidad superior a los 100 Pa.s, mientras que la reportada por Medina-Torres y colaboradores presenta una viscosidad de 20 Pa.s.

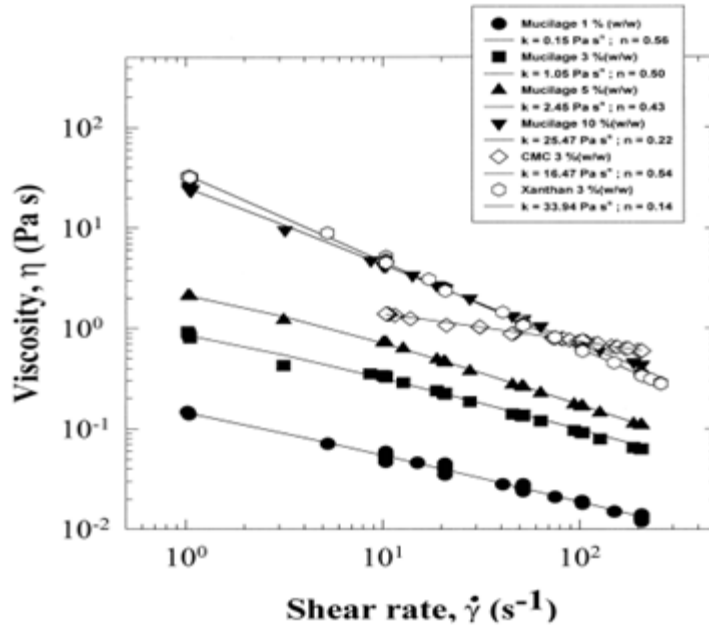


Figura 7.2.- Gráfica de Reología estacional de goma de nopal a 25°C, a diferentes concentraciones. (Medina-Torres, Brito-De La Fuente et al. 2000)

Al analizar el comportamiento reológico de la goma arábica comercial y compararla con la del estudio reportado por Mothé y colaboradores (figura 7.3), se observa que presentan el mismo comportamiento de cedencia ante la velocidad de cizalla (muestras con una concentración del 10%); sin embargo, la goma arábica que se está empleando en esta investigación presenta una menor viscosidad que la reportada en dicho estudio (Mothe and Rao 1999).

La goma de mezquite y la goma arábica comparten mucha similitud estructural (Vernon-Carter, Guzmán et al. 1984; Goycoolea, Morris et al. 1995; Orozco-Villafuerte, Cruz-Sosa et al. 2003) y presentan el mismo comportamiento de cedencia ante la velocidad de cizalla, por lo que se emplea también la figura 7.3 para la comparación con literatura. En este caso el comportamiento reológico de la goma de mezquite de Green Corp es muy similar al de la goma arábica reportada por Mothé (Mothé C.G. 1999).

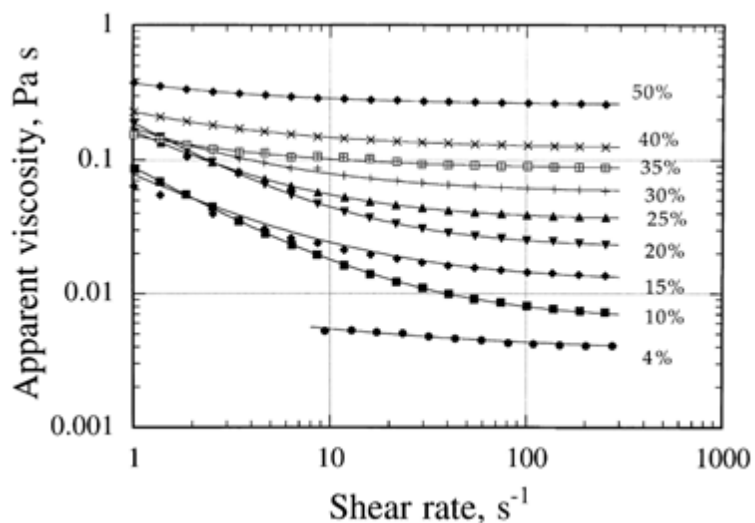


Figura 7.3.- Viscosidad Aparente (η_a)** vs velocidad de cizalla de goma arábica disuelta en agua en un rango de concentraciones de 4-50%. (Mothé C.G. 1999).** Nota: La “Viscosidad Aparente” en un fluido no newtoniano es un sinónimo de Viscosidad “Normal” para un fluido newtoniano.

La motivación para realizar este estudio fue caracterizar las gomas que se encontraban disponibles para realizar la tesis, así como determinar la concentración más adecuada para la formulación de las gomas. De esta manera, se emplearon estos porcentajes para formular las primeras nanoemulsiones en un estudio exploratorio, obteniendo resultados no satisfactorios, con lo cual se decidió aumentar la concentración de las gomas y considerar utilizarlas en conjunto con otros surfactantes. Sin embargo, la cantidad de muestra de goma proporcionada por Green Corp era muy limitada, por tanto se decidió purificar goma de mezquite en nuestro laboratorio, y estos análisis de reología fueron útiles para poder comparar la goma de mezquite obtenida en laboratorio contra la goma de mezquite comercial de Green Corp.

7.1.2 Obtención de goma de mezquite y su caracterización.

Se obtuvieron perlas de mezquite provenientes de Sonora. Se procedió con la purificación de la goma de mezquite, para ello las perlas se molieron en mortero de cerámica hasta obtener un polvo, y se preparó una solución al 20% de dicho polvo, la cual fue filtrada (con el fin de eliminar impurezas como tierra y trozos de madera).

Después se experimentó con varios procesos de secado, específicamente el de horneado y el secado por liofilización. El proceso de secado por horno fue descartado ya que era muy tardado, y además la goma obtenida era de un tono café, indicando una posible degradación de la goma o caramelización. En cuanto al método de liofilización se probaron varias estrategias. Primero se probó con una muestra liofilizada al 20%, denominada GML-1, y se obtuvo una goma con una textura “esponjada” tipo espuma (Figura 7.4-C). Al intentar reproducir este proceso de secado, el proceso fue interrumpido antes de tiempo, provocando que aumentara la concentración de la solución, la cual fue congelada nuevamente para continuar su liofilización. La goma obtenida por este proceso, a la que se le denominó GML-2, tenía forma de hojuelas (Figura 7.4-A), y su textura fue mucho más compacta o densa que la liofilizada al 20% (GML-1). Este resultado sugirió que la textura de la goma depende de la concentración utilizada al momento de liofilizar, lo cual podría repercutir en sus propiedades. Por tanto, se decidió probar liofilizando soluciones de goma de mezquite al 40% (GML-3) y al 50%, aunque para preparar esta última se tuvo que partir de una goma ya liofilizada (GML-1), por lo que se le denominó GMRL (goma de mezquite re-liofilizada).



Figura 7.4.- A) Goma de Mezquite con textura densa (GML-2); B) Goma de Mezquite liofilizada al 40% (GML-3) C) Goma de Mezquite con textura “esponjada” (liofilizada al 20%).

7.1.2.1 Reología Estacional

Se llevó a cabo el estudio reológico de todas las muestras liofilizadas, con el fin de identificar posibles diferencias entre ellas; los resultados se muestran en la Figura

7.5. Se prepararon soluciones de goma en agua a una concentración del 20% (w/v); además en este estudio se incluyó una goma arábica comercial como referencia. Los datos se analizaron con el modelo Carreau (tabla 7.2) utilizando el software Data Analysis de TA Instruments. Para este estudio, se decidió trabajar en un rango de velocidad de cizallamiento entre 0.1 y 1000 s^{-1} , en base a los resultados anteriores.

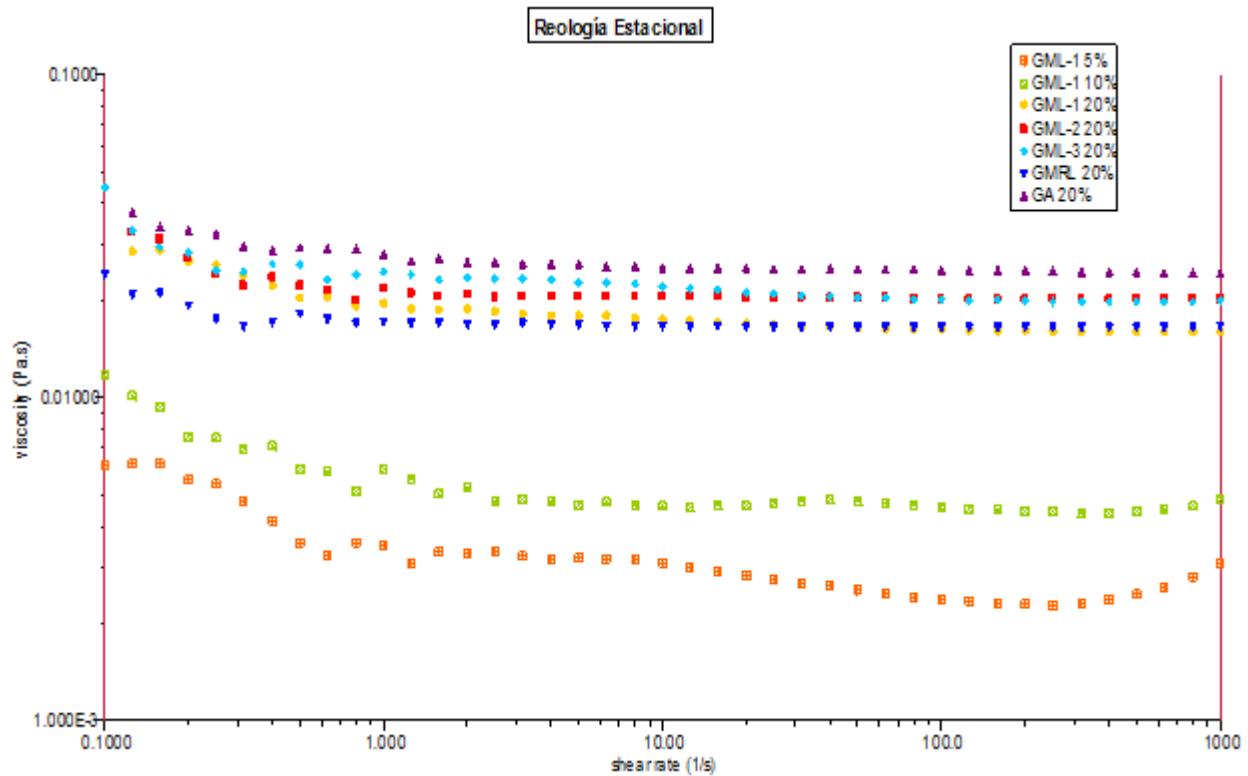


Figura 7.5.- Gráfica de Reología Estacional de las distintas Gomas de mezquite liofilizadas y Goma Arábica al 20%. Dónde: GML-1: Goma de Mezquite liofilizada con una concentración inicial del 20% (textura esponjosa); GML-2: Goma de Mezquite con textura densa (concentración inicial 20%); GML-3: Goma de Mezquite con metodología a una concentración inicial de 40%, GMRL: Goma de Mezquite con una concentración inicial del 50% pero sometida a reiofilización; GA: Goma Arábica.

Tabla 7.2.- Parámetros Reológicos del modelo Carreau de las gomas de mezquite liofilizadas y goma arábica al 20%.

Legenda en Gráfica	Gomas	η_0 (Pa*s)	η_∞ (Pa*s)	λ (s)	n
GML-1 20%	Goma de textura esponjada (liofilizada al 20%)	0.02812	0.01602	6.002	0.6495

GML-2 20%	Goma de Textura Compacta (liofilizada al 20%)	0.03424	0.02046	4.323	2.686
GML-3 20%	Goma de textura compacta (liofilizada al 40%)	0.4312	0.02052	1124	0.6971
GMRL 20%	Goma Refiolizada (al 50%)	1.447	0.01663	276.8	1.597
GA 20%	Goma Árbiga	0.2272	0.02467	636.0	0.6592

En la figura 7.5 se observa que la goma de textura esponjosa (GML-1) presentó una viscosidad más baja que la goma arábica al 20% reportada por Mothé y colaboradores y mostrada en la figura 7.3 (Mothé C.G. 1999). Es decir, cuando se comparan los resultados obtenidos en un rango de velocidad de cizallamiento entre 1 y 300 s⁻¹, la goma arábica de Mothé presenta un decaimiento desde 0.1 hasta aproximadamente 0.02 Pa.s, mientras que la goma GML-1 presenta un valor casi constante, menor de 0.02 Pa.s. En cambio, la goma con textura compacta (GML-2) presenta una ligera mejora en su comportamiento reológico, ya que como se ve en la figura 7.5 su viscosidad alcanza valores entre 0.02 y 0.03 Pa.s. El comportamiento que más se asemeja al de la goma arábica es el de la goma GML-3, es decir, la goma liofilizada a una concentración del 40%. En base a estos resultados, se decidió seleccionar el método de la goma GML-3 para producir suficiente goma de mezquite para los experimentos de formulación de las nanoemulsiones. Aunque las diferencias no son muy pronunciadas, éstas podrían ser atribuidas a posibles entrecruzamientos físicos entre las cadenas de polisacáridos, favorecidos al liofilizar la goma a concentraciones más altas, lo cual es reflejado en la textura más compacta y la viscosidad ligeramente más alta.

7.1.3 Análisis termogravimétrico (TGA/DTA) de las gomas

Se analizaron los diferentes tipos de gomas de mezquite purificadas, las gomas de Green Corp y la goma arábica comercial para comprobar por medio de un análisis termogravimétrico (TGA) si comparten parte de su estructura como se indica en la literatura (M.J. Zohurian 2004; Céline Cozic 2009; López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012). La técnica de TGA fue seleccionada por ser un método de análisis que permite estudiar el patrón de descomposición y la estabilidad térmica. En la tabla 7.3 se muestran los detalles del comportamiento térmico primarios y derivados observados en los termogramas de las diferentes muestras.

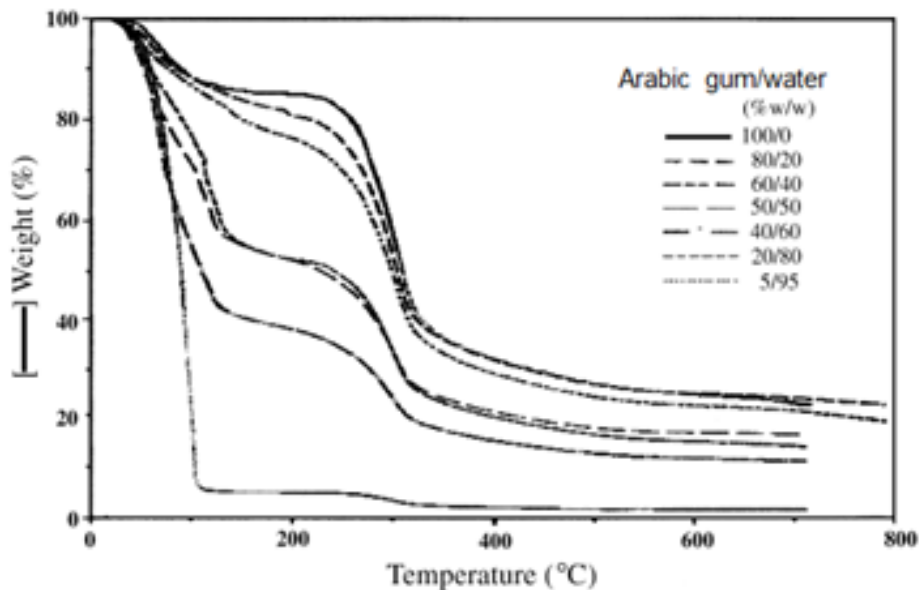


Figura 7.6.- Curva Termogravimétrica de Goma Arábica (C.G. Mothé 2000)

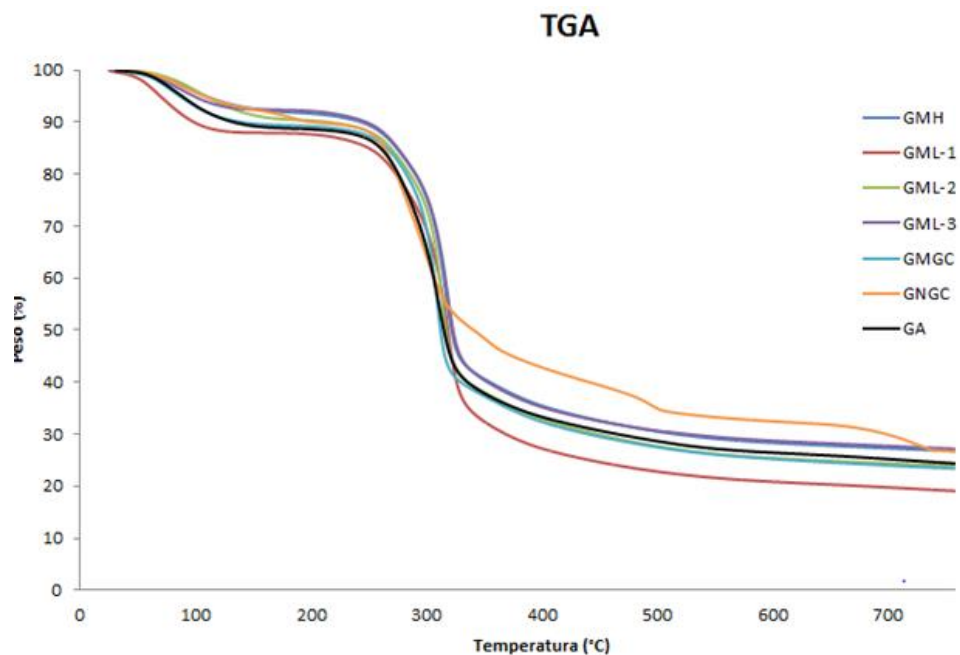


Figura 7.7.- Termograma Primario de las Gomas.

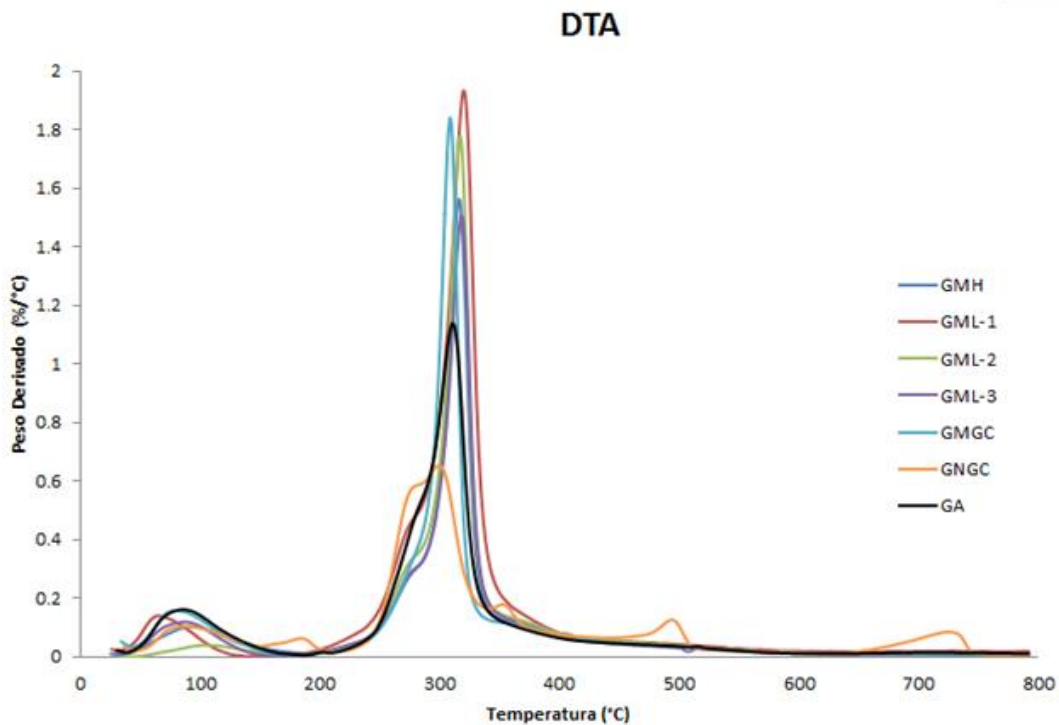


Figura 7.8.- Termograma Derivado de las Gomas.

Al observar los termogramas primarios (Figura 7.7) y derivados (Figura 7.8) se deduce que la descomposición se rige por dos etapas al igual que en la figura 7.6 reportada por Mothé y colaboradores (C.G. Mothé 2000). La primera etapa de pérdida de peso (rango de 60 °C-100 °C) se asume que es debida a la humedad contenida en las muestras (Mothe and Rao 1999; C.G. Mothé 2000; M.J. Zohurian 2004). Después de ello viene la etapa de descomposición más importante, característica de los polisacáridos que componen las gomas (C.G. Mothé 2000; M.J. Zohurian 2004), la cual comienza a partir de los 200°C.

Tabla 7.3.- Detalles del TGA y DTA de las diferentes gomas.

Leyenda en la Gráfica	Goma	Compuesto a que se le atribuye	Rango de Temperatura (°C)
GMH	Goma de Mezquite Horneada	Humedad Polisacáridos	60-100 200-400
GML-1	Goma de Mezquite de Textura Esponjada	Humedad Polisacáridos	60-100 200-400
GML-2	Goma de Mezquite de Textura Compacta	Humedad Polisacáridos	60-100 200-400
GML-3	Goma de Mezquite Pulverizada con Metodología	Humedad Polisacáridos	60-100 200-400
GMGC	Goma de Mezquite de Green Corp	Humedad Polisacáridos	60-100 200-400
GNGC	Goma de Nopal de Green Corp	Humedad Polisacáridos Cenizas	60-100 150-200/250-500 650-750
GA	Goma Arábica	Humedad Polisacáridos	60-100 200-400

Se observan pequeñas diferencias de desplazamiento de los picos correspondientes a la pérdida de humedad en la gráfica de DTA (figura 7.8). No existen diferencias drásticas en la posición del pico de degradación de los polisacáridos. Sin

embargo, se observa que aunque para las gomas liofilizadas la goma de mezquite de procedencia es la misma, la estructura del polvo cambió ligeramente la altura de los picos, esto implica una diferencia de velocidad y porcentaje de degradación. La goma de mezquite de textura esponjosa (GML-1) se degradó en mayor medida, manteniendo al final aproximadamente solo un 20% de su peso, mientras que las demás gomas, mantienen alrededor de un 25-30% de su peso. La goma de mezquite con textura condensada (GML-2) presenta muy poca pérdida a 60-100 °C, lo cual indica menor contenido de agua. La goma de mezquite liofilizada GML-3, la goma arábica (GA), la goma de mezquite de green corp (GMGC), y la goma horneada (GMH) presentaron un comportamiento muy similar entre ellas.

7.1.4 Análisis de espectro de infrarrojo (FT-IR) de las gomas

La figura 7.9 muestra los espectros de infrarrojo de la goma de mezquite (GA) y diferentes tipos de goma de mezquite (referente a las clasificaciones de las perlas mezquite según la tonalidad de la perla natural), de acuerdo a lo reportado en la literatura (López-Franco, Goycoolea et al. 2006; López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012).

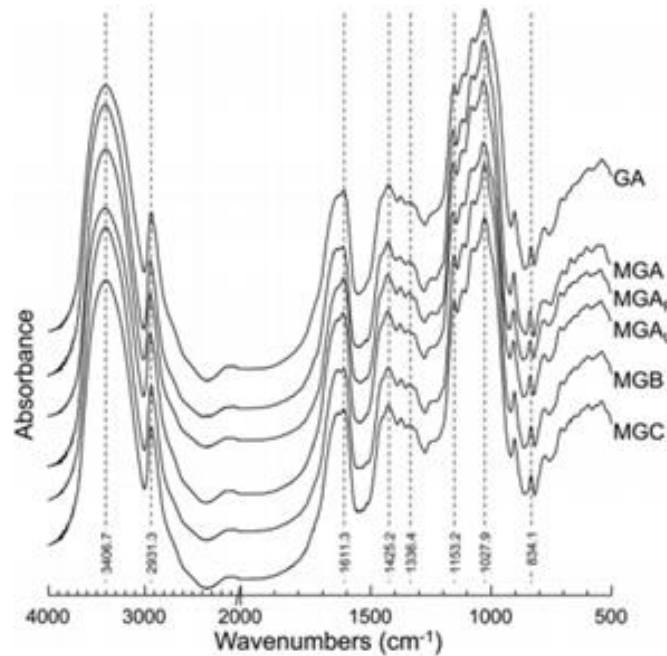


Figura 7.9.- Análisis de FT-IR de la goma arábica, goma de mezquite y sus fracciones reportado en la literatura (López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012).

En la figura 7.10 se muestran los espectros de IR de las diferentes gomas caracterizadas en esta tesis, los cuales son comparables en gran medida con el espectro de IR de la goma arábica (GA) reportada en la literatura. Por tanto se deduce que las diferentes gomas de mezquite esencialmente tienen la misma composición química en cuestión de azúcares, aminoácidos y proteínas. No obstante, la goma de nopal de Green Corp (GNGC) sí presenta algunas diferencias en su espectro de IR con respecto a las otras gomas. En general, se pueden ver absorbancias del grupo OH y CH a 3375 cm^{-1} y 2932 cm^{-1} (similares a lo reportado en la literatura), y una banda centrada entre 1650 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} que puede ser asignada a las amidas primarias. Hay una banda más pequeña alrededor de los 1500 cm^{-1} que es asignada a las amidas secundarias o substitutas. Las bandas de las amidas primarias y secundarias son características de la presencia de enlaces peptídicos y confirman la presencia de la proteína (López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012). También hay una banda en 1400 cm^{-1} que puede ser atribuida a un grupo carboxílico. Las bandas que se encuentran alrededor de 1000 cm^{-1} y 900 cm^{-1} pueden ser atribuidas a los grupos acetal glicosídicos de la piranosa, de acuerdo a la literatura (López-Franco, Goycoolea et al. 2006; López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012).

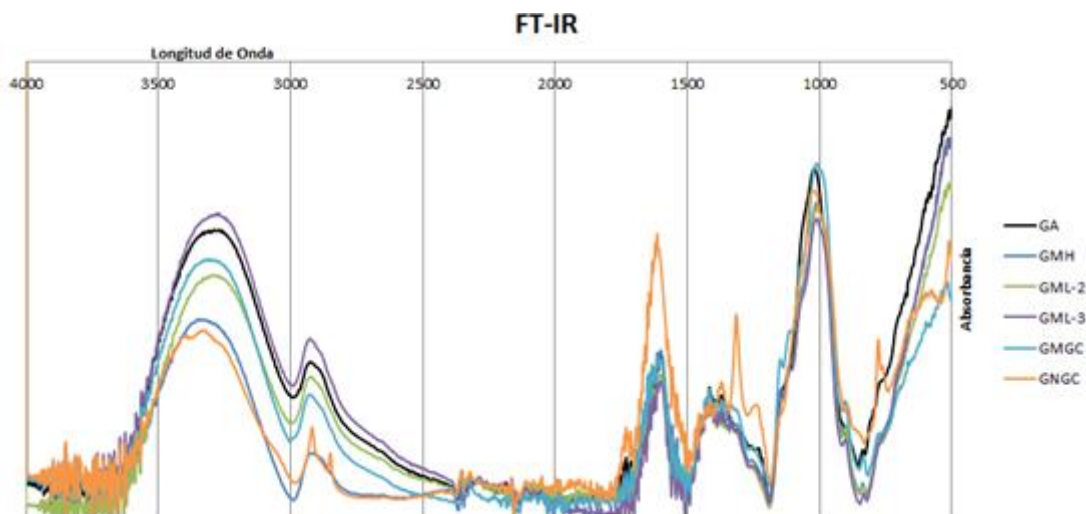


Figura 7.10.- Gráfica de FT-IR de las Gomas.

Se comprobó que la goma arábica y la goma de mezquite presentan una estructura química muy similar, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Vernon-Carter, Guzmán et al. 1984; Goycoolea, Morris et al. 1995; Mothé C.G. 1999; Céline Cozic 2009). Los diferentes tipos de textura de la goma de mezquite no tuvieron ninguna influencia en los resultados de éste análisis (López-Franco, Córdova-Moreno et al. 2012).

7.1.5 Estudios de Tensión Interfacial Agua/Aceite utilizando diferentes gomas.

A la tensión existente en la interface liquido-líquido que resulta al ponerse en contacto dos líquidos inmiscibles se le conoce como tensión interfacial. Su valor es generalmente intermedio entre las tensiones superficiales individuales de los líquidos, pero en ocasiones resulta inferior al de ambas, especialmente cuando se utilizan agentes tensoactivos por ello es que se realiza este estudio.

Si consideramos una interfase como un medio bidimensional, es decir sin espesor, se puede definir físicamente a la “tensión interfacial”(o superficial), como “la fuerza por unidad de longitud necesaria para mantener la estabilidad de una película interfacial”. La reducción de la tensión interfacial se debe a la adsorción del surfactante en la interface de dos líquidos inmiscibles, aumentando la interacción entre las moléculas y reduciendo la tensión interfacial. Cuando ésta reducción alcanza un valor extremadamente bajo, la región interfacial desaparece (hablando de una escala macroscópica) y las dos fases se convierten espontáneamente en una sola fase de microemulsión transparente, aunque a escala nanométrica siguen existiendo dominios acuosos y oleosos, y una interfase entre ellos (Miñaña-Pérez M 1982).

Se realizaron 10 medidas para cada una de las muestras evaluadas, y se reporta el promedio de dichas medidas y la desviación estándar en los siguientes histogramas. Al analizar estos resultados, la goma de nopal presenta una tensión interfacial menor tal como se ve en la literatura (Sáenz and Berger 2006), pero al ser más hidrófoba que la goma de mezquite no se disuelve del todo en el agua (Figura 7.11 A,B), a diferencia de la goma de mezquite, la cual queda perfectamente disuelta (Figura

7.11 C,D). La disolución incompleta puede ser fuente de serios problemas en el homogeneizador, tales como taponeamientos de los microcanales de la cámara de interacción debido a los grumos, por lo que en base a estos estudios se confirma la selección de la goma de mezquite como la más adecuada para la formulación de las nanoemulsiones. Hay poca diferencia entre la tensión interfacial agua/aceite de la goma de mezquite y la goma arábica, lo cual puede ser explicado por su estructura química similar.



Figura 7.11.- A) Gota de Goma de Mezquite con Ambiente de Limón Persa, B) Gota de Goma de Mezquite en Ambiente de Toronja Rosa + Girasol, C) Gota de Goma de Nopal en Ambiente de Limón Persa + Girasol, D) Gota de Goma de Nopal en Ambiente de Toronja Rosa.

Tabla 7.4.- Tensión Interfacial de Goma de Mezquite en los diferentes medios.

Goma de Mezquite Green Corp	Limón persa	Limón Persa + Girasol	Toronja Rosa	Toronja Rosa + Girasol
Tensión Interfacial Promedio (mN/m)	9.89	16.09	10.85	19.12
Desviación estándar	0.29	0.64	0.15	0.33

Tabla 7.5.- Tensión Interfacial de Goma de Nopal en los diferentes medios.

Goma de Nopal Green Corp	Limón persa	Limón Persa + Girasol	Toronja Rosa	Toronja Rosa + Girasol
Tensión Interfacial Promedio (mN/m)	9.30	13.29	11.32	17.27
Desviación estándar	0.33	0.60	0.19	0.45

Tabla 7.6.- Tensión Interfacial de Goma Arábica en los diferentes medios.

Goma Arábica	Limón persa	Limón Persa + Girasol	Toronja Rosa	Toronja Rosa + Girasol
Tensión Interfacial Promedio (mN/m)	8.90	15.38	8.84	17.41
Desviación estándar	0.20	0.08	0.19	0.12

Al contar con diferentes métodos de obtención de la goma de mezquite purificada, se decidió evaluar la influencia de éstos sobre la tensión interfacial. Entre los procesos de secado por horneado y secado por liofilización, la goma horneada presentó una tensión interfacial ligeramente más alta, esto se puede atribuir a la caramelización que existió en el proceso de cocción que dificulta el movimiento de las cadenas de la goma.

Tabla 7.7.- Tensión de Interfacial de Goma de Mezquite liofilizada.

Goma de Mezquite Liofilizada	Limón persa	Limón Persa + Girasol	Toronja Rosa	Toronja Rosa + Girasol
Tensión Interfacial Promedio (mN/m)	9.44	13.79	6.63	18.15
Desviación estándar	0.09	0.21	0.17	0.53

Tabla 7.8.- Tensión Interfacial de Goma de Mezquite Horneada.

Goma de Mezquite Horneada	Limón persa	Limón Persa + Girasol	Toronja Rosa	Toronja Rosa + Girasol
Tensión Interfacial Promedio (mN/m)	9.88	15.72	8.94	17.76
Desviación estándar	0.22	0.15	0.18	0.20

Como conclusiones generales del estudio de tensión interfacial, se observa que la adición de aceite de girasol incrementa en gran medida la tensión interfacial. Además, en general, se observa una menor tensión interfacial cuando se emplea aceite

esencial de limón persa. Por tanto, este estudio nos permite seleccionar al aceite de limón persa como fase oleosa (sin adición de aceite de girasol).

7.1.6 Análisis de los Aceites Esenciales Cítricos

7.1.6.1 Densidad e Índice de Refracción

La densidad e índice de refracción son datos básicos que se emplean para otras técnicas de caracterización como la medición de la tensión interfacial y el tamaño de gota, ya que son datos requeridos en las ecuaciones con las que se calculan dichas propiedades. En el siguiente conjunto de tablas (7.9 a 7.13), se observan los resultados para los aceites puros y sus mezclas.

Tabla 7.9.- Datos de Densidad e Índice de Refracción de Aceite de Toronja Rosa. Determinados a 20.0 °C

Aceite de Toronja Rosa	Resultados
Índice de Refracción	1.4764 n_D
Densidad	0.8541 g/cm ³
Peso Específico	0.85559

Tabla 7.10.- Datos de Densidad e Índice de Refracción del Aceite de Limón Persa. Determinados a 20.0 °C

Aceite de Limón Persa	Resultados
Índice de Refracción	1.4836 n_D
Densidad	0.8750 g/cm ³
Peso Específico	0.8766

Tabla 7.11.- Datos de Densidad e Índice de Refracción del Aceite de Limón Persa con Aceite de Girasol. Determinados a 20 °C.

Limón Persa + Girasol	Resultados
Índice de Refracción	1.4771 n_D
Densidad	0.9035 g/cm ³
Peso Específico	0.9051

Tabla 7.12.- Datos de Densidad e Índice de Refracción del Aceite de Toronja Rosa con Aceite de Girasol. Determinados a 20 °C.

Toronja Rosa + Girasol	Resultados
Índice de Refracción	1.474569 n_D
Densidad	0.89718 g/cm ³
Peso Específico	0.89879

Tabla 7.13.- Datos de Densidad e Índice de Refracción del Aceite Girasol. Determinados a 20 °C.

Aceite de Girasol	Resultados
Índice de Refracción	1.473160 nD
Densidad	0.91716 g/cm ³
Peso Específico	0.91881

7.1.6.2 Concentración de Aldehídos

Los aldehídos son una familia de compuestos orgánicos (con terminación R-CHO), que son indicativos de la calidad de los aceites esenciales: cuanto mayor es la concentración de aldehídos la calidad del aceite es mayor. Completada la reacción descrita en la sección Materiales y Métodos, se valora el HCl liberado el cual se relaciona con el contenido en grupos carboxílicos en la muestra y que se calcula en gramos del aldehído. El resultado verificado bajo las especificaciones técnicas de la empresa FRUTECH se expresa como porcentaje en la tabla 7.14, dando dentro de los rangos (Para limón persa es de 3.5 -7.5% y 0.8-1.5% para toronja rosa):

Tabla 7.14.- Concentración de Aldehídos.

Aceite	% Decan Ph	mL utilizados	% de Aldehídos
Limón Persa	3.8903	9.96	3.67
Toronja Rosa	1.0751	2.75	1.04

Se puede observar que el aceite de Limón Persa presenta una concentración de aldehídos 3 veces mayor al aceite de Toronja Rosa por lo que fue un factor determinante para la selección del aceite de limón persa como fase oleosa.

7.1.6.3 Perfil de Volátiles por Cromatografía de Gases

Se realizó el análisis semicuantitativo del perfil de volátiles por inyección directa en cromatografía en fase gaseosa de los aceites esenciales de limón persa y toronja rosa. Este análisis permite la separación e identificación de los componentes de mezclas complejas como es el caso de estos aceites esenciales, de una manera

práctica, ya que puede ser evaluado directamente, evitando por tanto, toda alteración en la composición del producto original (Díaz, Arrázola et al. 2005).

Los componentes del aceite son separados a través de una columna cromatográfica con condiciones específicas de cada equipo. Dicha columna se encarga de dejar pasar o retener el compuesto, para el caso de los aceites esenciales el equipo es utilizado a una temperatura relativamente alta (aproximadamente 280°C) y esto permite realizar la separación. Un factor importante es el método con el cual se programa al equipo y la librería con la cuenta, en este caso el método es confidencial e interno de CIATEJ Unidad Noreste y la librería es Wiley.

Lo que se puede observar en los cromatogramas, es que los terpenos presentan un tiempo de retención más bajo que los aldehídos. Éste método se emplea para corroborar la concentración de aldehídos (ya que podemos comparar los resultados con la caracterización de concentración de aldehídos por valoración con Decan Ph) y comparar las áreas (bajo los picos del cromatograma), para así producir un reporte en porcentaje, como los que se muestran en las tablas 7.15 y 7.16. El uso de la librería Wiley es muy importante, ya que cada espectro tiene una huella digital, que nos permite identificar a qué componente corresponde cada pico en el cromatograma. Tratar de encontrar dos cromatogramas idénticos en literatura es muy difícil debido a que depende de cada equipo, cada columna, cada método y origen de la muestra. Para el aceite esencial de limón persa se pudieron identificar 35 componentes, mientras que para la toronja rosa se identificaron 22 componentes.

Tabla 7.15.- Porcentaje de Área relativa de los compuestos identificados en el aceite esencial de Limón Persa por comparación con la librería Wiley.

#	Name	Ret Time	Target Response	Response Type	% OF TOTAL
1)	Alfa-Thujene	4.98	1355309	Area	1.554
2)	Alfa-Pineno	5.16	4397976	Area	5.042
3)	camphene	5.50	59238	Area	0.068
4)	Sabinene	6.00	2257871	Area	2.588
5)	Beta-Pineno	6.14	14846590	Area	17.020
6)	Myrcene	6.32	1751138	Area	2.007
7)	Octanal	6.61	4062	Area	0.005
8)	Alfa-Phellandrene	6.77	118505	Area	0.136
9)	3-Carene	6.93	6234	Area	0.007
10)	Alfa-Terpinene	7.10	477590	Area	0.548
11)	D-Limonene	7.53	34418490	Area	39.457
12)	Gamma-Terpinene	8.38	21231134	Area	24.339
13)	Terpinolene	9.35	659005	Area	0.755
14)	Linalool	9.66	142562	Area	0.163
15)	Nonanal	9.82	1828	Area	0.002
16)	Limonene epoxide	11.01	1880	Area	0.002
17)	Beta-Citronellal	11.71	36497	Area	0.042
18)	1-Terpinen-4-ol	12.80	59554	Area	0.068
19)	Alfa-Terpineol	13.33	286001	Area	0.328
20)	Decanal	13.89	22789	Area	0.026
21)	Nerol (cis-geraniol)	14.88	162108	Area	0.186
22)	Neral (cis-citral)	15.48	825393	Area	0.946
23)	Geraniol (trans-geraniol)	16.04	35557	Area	0.041
24)	Geranial (trans-citral)	16.81	1589990	Area	1.823
25)	Perillaldehyde	17.02	9902	Area	0.011
26)	Undecanal	18.47	3383	Area	0.004
27)	Citronellyl acetate	20.61	2221	Area	0.003
28)	Neryl acetate	21.14	1657526	Area	1.900
29)	Geranyl acetate	22.04	217333	Area	0.249
30)	Beta-Caryophyllene	23.93	377448	Area	0.433
31)	Alpha-Humulene	25.65	33445	Area	0.038
32)	Alfa-Santalol	25.87	78188	Area	0.090
33)	Valencene	26.88	19986	Area	0.023
34)	Alpha-Bisabolol	29.06	78892	Area	0.090
35)	Nootkatone	29.06	4881	Area	0.006

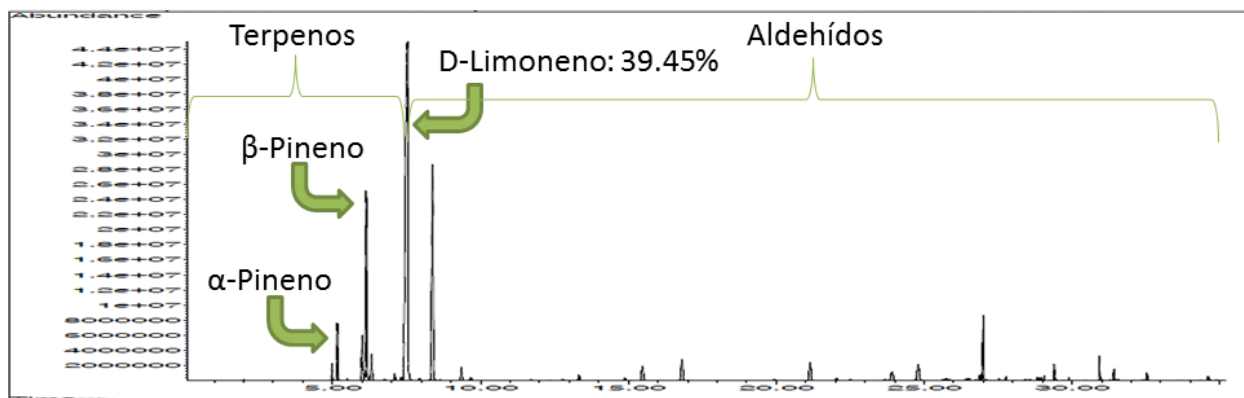


Figura 7.12.- Perfil cromatográfico de la muestra analizada por GC/MS de Aceite Esencial de Limón Persa.

Tabla 7.16.- % de Área relativa de los compuestos identificados en el aceite esencial de Toronja Rosa por comparación con la librería Wiley.

#	Name	Ret Time	Target Response	Response Type	% OF TOTAL
1)	Alfa-Thujene	4.98	5001	Area	0.010
2)	Alfa-Pineno	5.16	1110566	Area	2.213
3)	camphene	5.50	2796	Area	0.006
4)	Sabinene	5.99	261426	Area	0.521
5)	Beta-Pineno	6.12	40231	Area	0.080
6)	Myrcene	6.31	2253859	Area	4.491
7)	Octanal	6.61	181470	Area	0.362
8)	Alfa-Phellandrene	6.77	67463	Area	0.134
9)	3-Carene	6.93	1619	Area	0.003
10)	Alfa-Terpinene	7.09	883	Area	0.002
11)	D-Limonene	7.57	45680118	Area	91.017
12)	Gamma-Terpinene	8.35	20280	Area	0.040
13)	Terpinolene	9.36	5887	Area	0.012
14)	Linalool	9.66	72086	Area	0.144
15)	Nonanal	9.82	16663	Area	0.033
16)	Limonene epoxide	11.01	1848	Area	0.004
17)	Beta-Citronellal	11.70	39660	Area	0.079
18)	1-Terpinen-4-ol	12.80	1959	Area	0.004
19)	Alfa-Terpineol	13.33	237211	Area	0.473
20)	Decanal	13.88	161450	Area	0.322
21)	Cis-geraniol	14.86	2241	Area	0.004
22)	Neral (geranial)	15.48	22494	Area	0.045

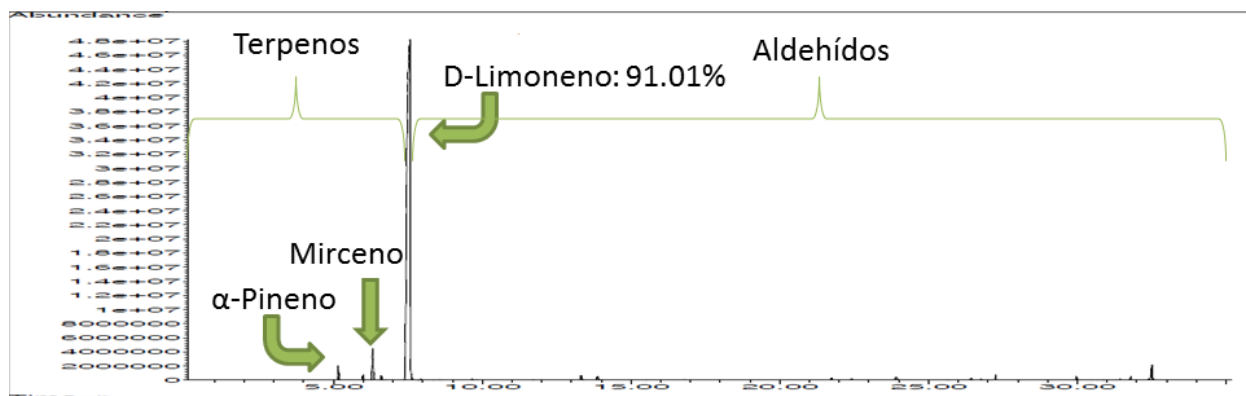


Figura 7.13.- Perfil de cromatográfico de la muestra analizada por GC/MS de Aceite Esencial de Toronja Rosa.

Como se observa en los cromatogramas anteriores el D-limoneno es el principal componente de los aceites esenciales cítricos empleados en esta investigación y es un componente muy utilizado en la inhibición microbiana en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Odds, Brown et al. 2003). Cabe destacar que aunque el aceite de Toronja Rosa presentó un porcentaje mayor de D-limoneno, al realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria, la respuesta de éste aceite no fue muy satisfactoria (como se verá más adelante). El mecanismo detallado de la función antimicrobiana de los aceites esenciales sigue sin ser elucidado, de acuerdo a la literatura (Bautista, Bravo et al. 1999).

7.1.6.4 Rotación Óptica

La polarimetría se utiliza en control de calidad, control de procesos e investigación en la industria farmacéutica, química, aceites esenciales, alimentación y aromas. (Hecht 1998)

En la tabla 7.17 se muestra la rotación óptica de los aceites esenciales cítricos. Tomando como base las especificaciones técnicas de la compañía FRUTECH, ambos aceites se encuentran dentro de los rangos adecuados (Para limón persa de +42 a +51, sin embargo, este lote de aceite esencial cítrico había estado dando una rotación óptica de +25; para toronja rosa +91 a +94). Esto indica que los aceites esenciales cítricos donados son de buena calidad.

Tabla 7.17.- Rotación Óptica de los aceites esenciales de Limón Persa y de Toronja Rosa

Aceite	Rotación Óptica (Grados Angulares)
Limón Persa	25
Toronja Rosa	92.5

7.1.7 Actividad Antibacterial

Es generalmente aceptado que concentraciones alrededor del 5 al 15% de aceite esencial son requeridas para actuar como agentes antimicrobianos en alimentos. Sin embargo, en muchos casos es suficiente con que haya un efecto de disminución del crecimiento microbiano para obtener un producto seguro, lo cual puede ser logrado a concentraciones más bajas (Viuda-Martos, Ruiz Navajas et al. 2008). Debido a que los aceites esenciales tienen una gran variedad de compuestos, no es posible definir un solo mecanismo mediante el cual estos compuestos actúan sobre los microorganismos (Bautista, Bravo et al. 1999). Por lo que al presentarse la oportunidad de realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI) en la Incubadora de Nanotecnología de Nuevo León, se decidió añadir esta caracterización para saber si las nanoemulsiones formuladas presentaban un poder inhibitorio para bacterias comunes, siguiendo las normas M7-A7 y M100-S16 con una prueba control de Amikacina. El primer paso es saber si los aceites esenciales cítricos con los que se va a trabajar tienen desde un inicio el poder inhibitorio de crecimiento de microorganismos.

Para la interpretación de resultados se verifica que los pozos control presenten el comportamiento esperado, posteriormente haciendo una revisión a partir del control positivo se debe buscar el pozo en el que deje de presentarse crecimiento bacteriano, identificado por un depósito blanquecino en forma de botón (aprox. 2mm de diámetro) o bien una turbidez alta de la suspensión. El primer pozo que no presente evidencia de este crecimiento se considera como el punto de CMI, se reporta su concentración como tal.

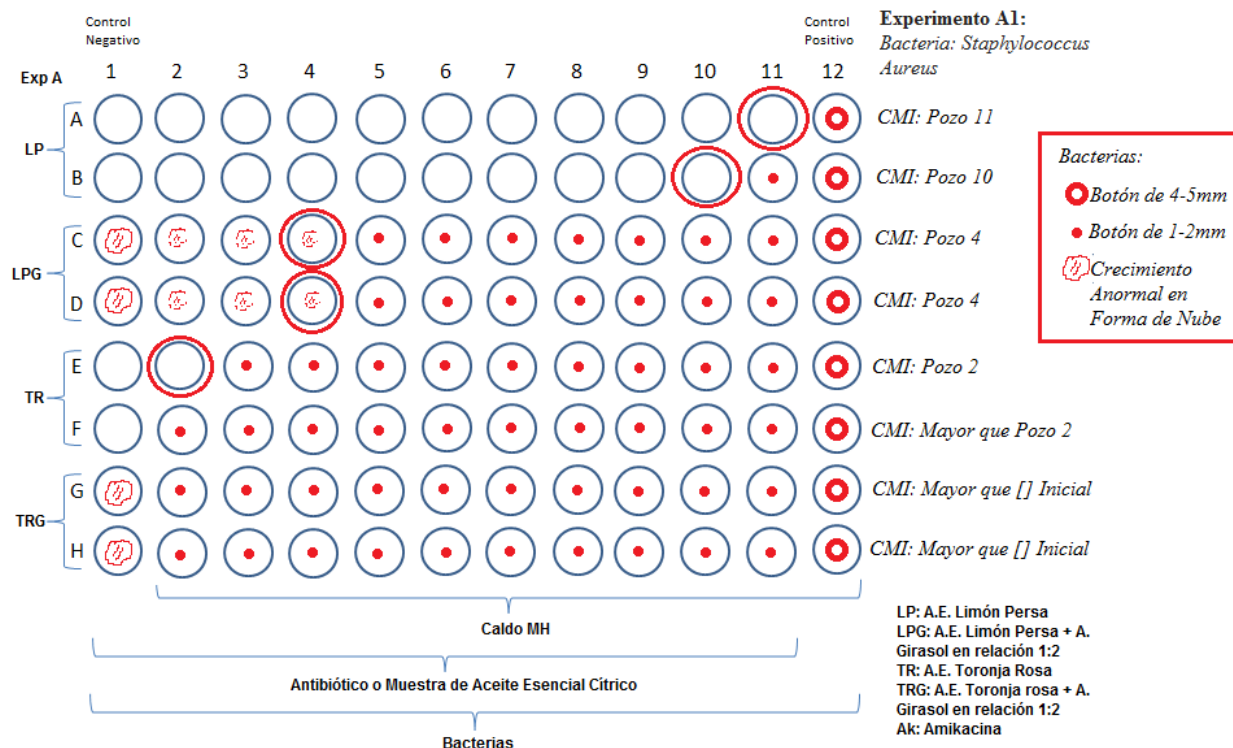


Figura 7.14.- Resultado del Experimento A1: Presencia de Bacterias en Micropozos.

Para el experimento A1 (figura 7.14) se colocaron los aceites esenciales directo en lo micropozos; el aceite esencial de Limón Persa es el que cuenta con un mejor CMI ya que con una concentración mínima de tan solo un promedio de 0.07% (pozo 11 y 10), no existe crecimiento de bacteria *Staphylococcus Aureus*. El segundo mejor inhibidor con una concentración del 6.25% (CMI en pozo 4) es la combinación de aceite esencial de Limón Persa y Aceite de Girasol, esto es atribuido a la presencia del aceite esencial de Limón Persa. Para el caso del aceite esencial de Toronja Rosa, su CMI se encuentra en los primeros pozos y no en todos los casos; dando el peor desempeño el aceite esencial de Toronja Rosa en combinación con aceite girasol ya que no funcionó en ningún micropozo.

El experimento A2 (figura 7.15) es similar al experimento A1, con la diferencia que se utiliza la bacteria *Escherichia coli*. Los resultados del experimento A2, colocan de nuevo al limón persa como el mejor inhibidor de crecimiento de microorganismos, sin embargo para el caso de la bacteria *Escherichia coli* la respuesta ha sido muy pobre

para todos los casos, ya que no la inhibe por completo sino que hacen que el crecimiento de la bacteria se vuelva anormal.

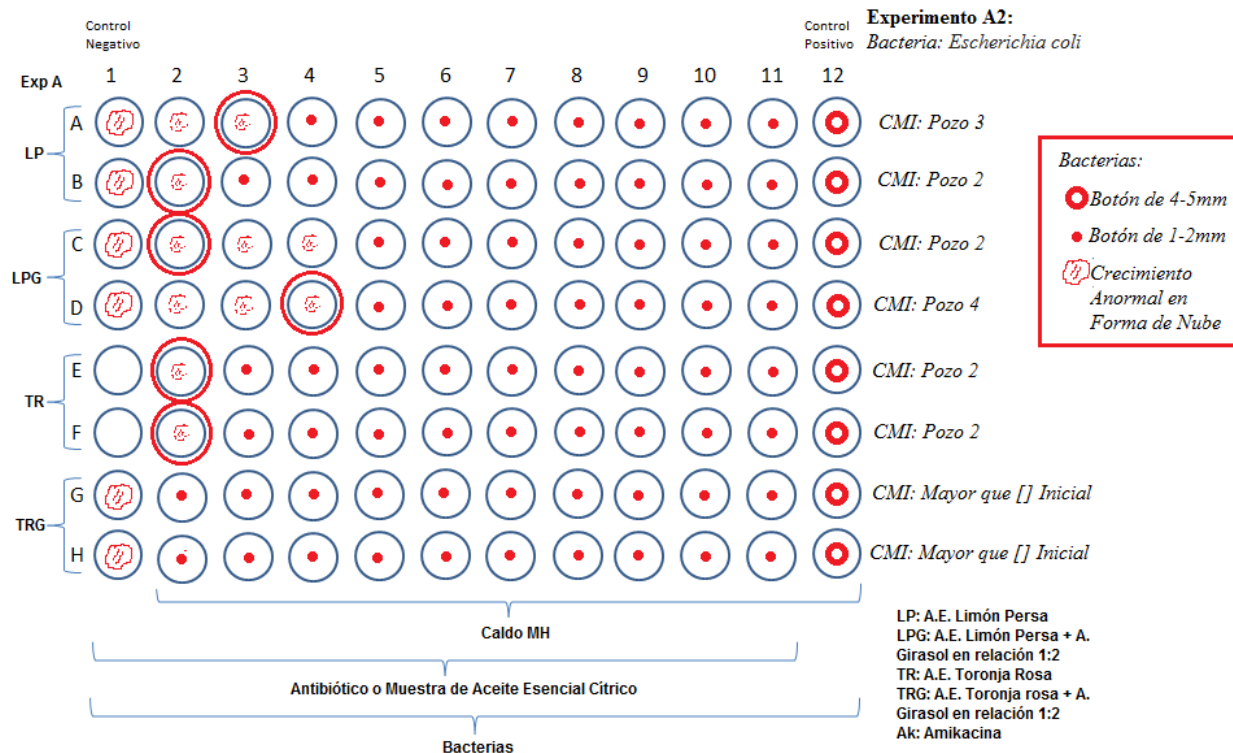


Figura 7.15.- Resultado del Experimento A2: Presencia de Bacterias en Micropozos.

7.2 Etapa 2.- Desarrollo de la metodología general para la formulación de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos.

Esta etapa consiste en el desarrollo de un proceso reproducible para la formulación de las nanoemulsiones. Las diferentes modificaciones que se le hicieron a las formulaciones y al proceso, fueron realizadas en base al resultado de las caracterizaciones de la etapa 1 y las observaciones y caracterizaciones realizadas durante esta etapa 2.

El proceso inicial de preparación de las nanoemulsiones consiste en mezclar los componentes en un matraz Erlenmeyer utilizando agitación magnética en un baño maría a 40 grados por 10 minutos, seguido por agitación mecánica de alta velocidad (8000 rpm) por 5 minutos. Este primer paso nos sirve para disolver lo mejor posible las

gomos y/o surfactantes en la fase acuosa, y así eliminar cualquier posible grumo que pudiera dar lugar a taponeamientos en la cámara de interacción del microfluidizer. Además este paso sirve para formar una pre-emulsión, es decir se comienza a dispersar la fase de aceite como gotas en la fase continua acuosa; sin embargo en este punto, las gotas son de tamaño micrométrico y por tanto son lechosas.

Posteriormente se introduce esta pre-emulsión en el homogeneizador de alta presión (microfluidizer), y se somete a alta presión (las diferentes series de nanoemulsiones se llevaron de 10,000 a 30,000 psi) recolectando muestra cada 1, 3, 5 y 10 vueltas, con el fin de que la cantidad de vueltas no degrade algún componente de las nanoemulsiones (también por ello se pone hielo en el serpentín de salida del equipo). En este proceso a alta presión, el tamaño de gota de la nanoemulsión va disminuyendo conforme aumenta el número de veces que se introduce la nanoemulsión al equipo (número de vueltas), aunque en ocasiones el tamaño de gota vuelve a aumentar al aumentar demasiado el número de vueltas debido a degradaciones de las gomos o surfactantes. Finalmente, se recolecta la muestra de nanoemulsión y se prepara para llevarla a esterilización. En la figura 7.16, se presenta un resumen del proceso.

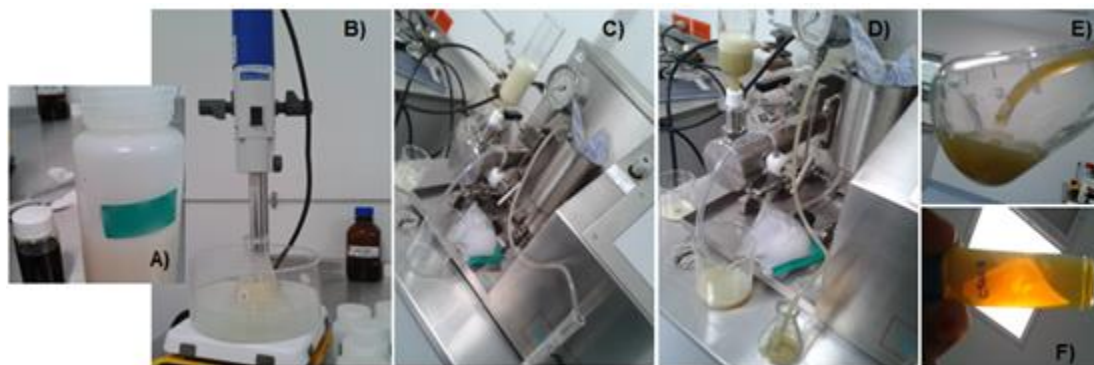


Figura 7.16.- Proceso para la formulación de las nanoemulsiones A) Fase oleosa y acuosa de las nanoemulsiones, B) Preparación de pre-emulsión mediante agitación de alta velocidad C) Acondicionamiento del Homogeneizador, D) Proceso de Alta Presión, E) Recolección de la Muestra, F) Muestra Lista para Esterilización.

Se realizó un primer estudio exploratorio para puesta en marcha del equipo microfluidizer y del método de preparación, así como para verificar el comportamiento de las gomas al introducirlas al equipo microfluidizer. En la tabla 7.18 se muestran las composiciones de las tres primeras pruebas de formulación; se utilizó un 2 % en peso de aceite esencial de Limón Persa y un 0.5 % en peso de agente emulsionante, y un 97.5 % en peso de agua desionizada.

Tabla 7.18.- Nanoemulsiones de estudio exploratorio para puesta en marcha.

Exp	Fase Dispersa	Surfactante	Fase Continua	Condiciones	Temp
A1	Aceite de Limón Persa	de Goma Nopal	de Agua DI	2% Aceite de LP / 0.5% Goma de Nopal / 97.5% agua.	25°C
A2	Aceite de Limón Persa	de Goma Nopal y Lecitina (1:1)	de Agua DI	2% Aceite de LP/ 0.25% Tween + 0.25% Lecitina / 97.5% agua.	25°C
A3	Aceite de Limón Persa	de Goma Arábica	de Agua DI	2% Aceite / 0.5% Goma Arábica / 97.5% agua.	25°C

En la primera prueba (A1 cuya composición se muestra en la Tabla 7.18) se utilizó goma de nopal de Green Corp como agente emulsionante. Sin embargo, el uso de esta goma ocasionó muchos problemas, ya que como se mencionó en la parte de caracterización por tensión interfacial, la goma de nopal presenta un comportamiento hidrófobo y por tanto no se disuelve perfectamente en la fase acuosa, y esto da lugar a taponeamientos en los microcanales de la cámara de interacción del microfluidizer. Por tanto no fue posible obtener una nanoemulsión, ya que no se pudo hacer pasar la pre-emulsión por el microfluidizer.

Se realizó un segundo experimento (A2, composición mostrada en la Tabla 7.18) en el cual se utilizó una mezcla de goma de nopal y lecitina como agentes emulsionantes. En este experimento, tampoco fue posible hacer pasar la pre-emulsión por el microfluidizer debido a taponeamientos. Por estos motivos, estos fueron los únicos experimentos que se llevaron a cabo con la goma de nopal de Green Corp y ésta quedó descartada para futuros experimentos.

Debido a que se contaba con muy poca cantidad de la goma de mezquite de Green Corp, para este estudio exploratorio se decidió proseguir con un experimento utilizando goma arábica como agente emulsionante (experimento A3, Tabla 7.18). Afortunadamente con esta formulación no se presentaron problemas de taponeamiento y se pudo procesar a 10,000 psi en el microfluidizer. Se tomaron muestras a 1, 5 y 10 ciclos (vueltas) en el microfluidizer y se procedió a caracterizar.

La pre-emulsión hecha con ultra-turrax se tornó de un color amarillo claro, y al pasar dicha pre-emulsión por el microfluidizer se esperaba un producto con características de una nanoemulsión, sin embargo, la muestra se tornó lechosa con una ligera tonalidad amarilla; visualmente la muestra no correspondía precisamente con las características de tener un tamaño nanométrico, además mostraba una clara desestabilización (cremación) en cuestión de minutos. Como se observa en la figura 7.17 el tamaño de gota es grande para considerarse una nanoemulsión, y como se observa en cuestión de una hora, la muestra presentó una mayor cantidad de poblaciones de tamaño, además de presentarse un crecimiento del tamaño de gota en comparación con la primera medida realizada.

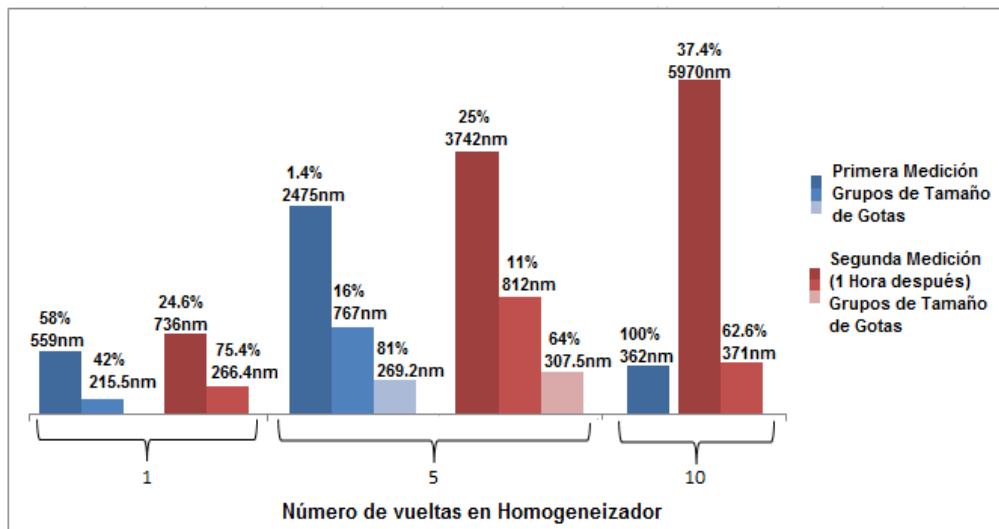


Figura 7.17.- Gráfica de Resultados de Tamaño de Gota* del experimento A3.
 *Nota: Porcentaje de volumen.

Como resultado de este estudio exploratorio, se concluye que no es posible utilizar la goma de nopal de Green Corp por su hidrofobicidad y se descarta para estudios posteriores. Asimismo, se logró la puesta en marcha del método, en especial del acondicionamiento del microfluidizer. Finalmente, se pudo observar que las formulaciones de partida con 0.5% de agente emulsionante no eran adecuadas para la formación de nanoemulsiones, por lo que se decidió variar las composiciones para el siguiente estudio.

7.3 Etapa 3.- Estudio sistemático para el desarrollo y caracterización de nanoemulsiones de aceites esenciales cítricos.

7.3.1 1ª Serie de experimentos

Para la “1ª serie” de experimentos se establecieron las composiciones que se presentan en la tabla 7.19, donde además se generó el control con goma arábica estándar y la incorporación de surfactantes comerciales (Tween 80 y lecitina) como posibles surfactantes a adicionar. Se duplicó la cantidad de agente emulsionante y se cambió el número de vueltas en el homogeneizador microfluidizer para tomar muestra a 1, 7 y 15 vueltas, esperando un incremento en la estabilidad de la nanoemulsión y una disminución del tamaño de gota así como del cremado.

Se elaboraron todos los experimentos de goma arábica, Tween 80, lecitina y sus combinaciones posibles como se indica en la tabla 7.19 de la “1ª serie” de experimentos. Se caracterizaron las muestras de cada nanoemulsión a 1, 7 y 15 vueltas en el microfluidizer. Para cada nanoemulsión, se presenta solamente la caracterización de la muestra con el número de vueltas con mejor comportamiento de distribución de tamaño de gota, las muestras seleccionadas se encuentran descritas en la tabla 7.20.

Tabla 7.19.- Condiciones para las Nanoemulsiones de la 1ª Serie.

Exp	Fase Oleosa	Surfactante	Fase Acuosa	Condiciones	Temp
GA/LP	Limón Persa	Goma Arábiga	Agua DI	2% Aceite /1% Goma Arábiga / 97% ADI	25°C
TW80/LP	Limón Persa	Tween 80	Agua DI	2% Aceite /1% Tween 80 / 97% ADI	25°C
LEC/LP	Limón Persa	Lecitina	Agua DI	2% Aceite /1% Lecitina / 97% ADI	25°C
LEC/GA/LP	Limón Persa	Lecitina/ Goma Arábiga (1:1)	Agua DI	2% Aceite/ 0.5% Lecitina + 0.5% Goma Arábiga/ 97% ADI	25°C
TW80/LEC/LP	Limón Persa	Tween 80/ Lecitina (1:1)	Agua DI	2% Aceite/ 0.5% Tween 80 + 0.5% Lecitina/ 97% ADI	25°C
T80/GA/LP	Limón Persa	Tween 80/Goma Arábiga (1:1)	Agua DI	2% Aceite/ 0.5% Tween 80 + 0.5% Goma arábiga/ 97% ADI	25°C

Tabla 7.20.- Muestras de nanoemulsiones seleccionadas de la 1ª Serie, de acuerdo a su comportamiento de distribución de tamaño de gota a 25°C.

Nombre del Experimento	Composición y Condiciones
Goma Arábiga 15V	2% Aceite / 1% Goma Arábiga / 97% Agua Desionizada (ADI) con 15 Vueltas en Homogeneizador.
Lecitina 1V	2% Aceite /1% Lecitina / 97% ADI con 1 Vuelta en Homogeneizador.
Tween 80 15V	2% Aceite /1% Tween 80 Solo / 97% ADI con 15 Vueltas en Homogeneizador.
Lecitina 50%/Goma Arábiga 50% 7V	2% Aceite/ 0.5% Lecitina + 0.5% Goma Arábiga/ 97% ADI con 7 Vueltas en Homogeneizador.
Tween 80 50%/Goma Arábiga 50% 7V	2% Aceite/ 0.5% Tween 80 + 0.5% Goma Arábiga/ 97% ADI con 7 Vueltas en Homogeneizador.
Tween 80 50%/Lecitina 50% 7V	2% Aceite/ 0.5% Tween 80 + 0.5% Lecitina/ 97% ADI con 7 Vueltas en Homogeneizador.

Para el caso de la muestra Goma Arábica 15 V (figura 7.18), se observa la presencia de varias poblaciones de tamaño de gota de menos de 1 μm , con el paso del tiempo algunos de ellos incrementan a tamaños superiores a los 4 μm , indicando que las gotas de emulsión no son de escala nanométrica ni son estables. Al incrementar el número de vueltas se logró disminuir el tamaño, pero no fue lo suficiente para lograr mejorar el tamaño de gota y la estabilidad.

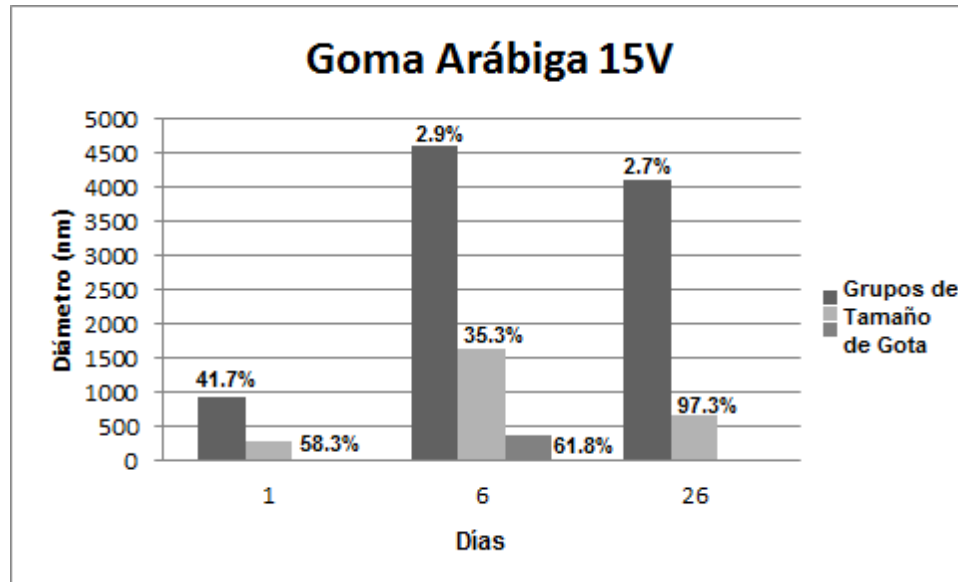


Figura 7.18.- Poblaciones de Tamaños de Gota en Experimento Goma Arábica 15V. *Nota: Porcentaje es en Volumen.

Para el caso de la muestra formulada con Lecitina, se seleccionó la muestra pasada 1 vez por el microfluidizer (Lecitina 1V, figura 7.19) debido a que al aumentar el número de vueltas (7 y 15 V) se observó tanto más poblaciones de tamaño como tamaños más grandes, lo que se le atribuye a la descomposición de la lecitina, además se presentaron taponamientos en el equipo, lo que indica una degradación de este material. La muestra Lecitina 1V presentó una población del 95.7% con tamaño de gota de 200 nm y otra población menor (4.3%) con tamaño aproximado de 3 μm . Por tanto en esta muestra ya se observa una mejora en el tamaño de gota, en el rango esperado para una nanoemulsión.

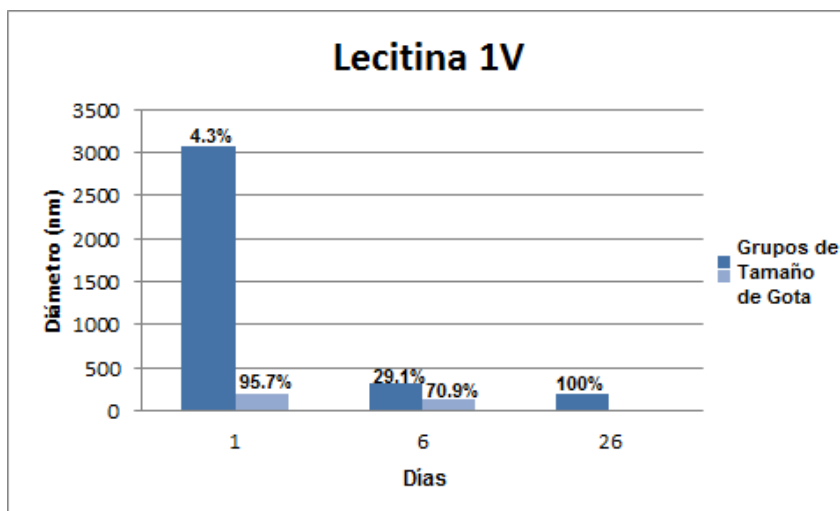


Figura 7.19.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Lecitina 1V. *Nota: Porcentaje es en Volumen.

Con el Tween 80, se esperaba una mejoría en el tamaño de gota debido a la apariencia de la muestra (aspecto translúcido en el fondo del tubo de ensayo) y con el incremento del número de vueltas se notaba mejoría en el aspecto visual. Sí se obtuvo una población de 60.6% de las gotas menores a 100 nm, sin embargo, como se observa en la figura 7.20, también se presentó una población del 39.4% con tamaños de alrededor de 700 nm. Además con el paso del tiempo se iban generando más grupos de tamaño, indicando una estabilización pobre y un claro crecimiento de las gotas.

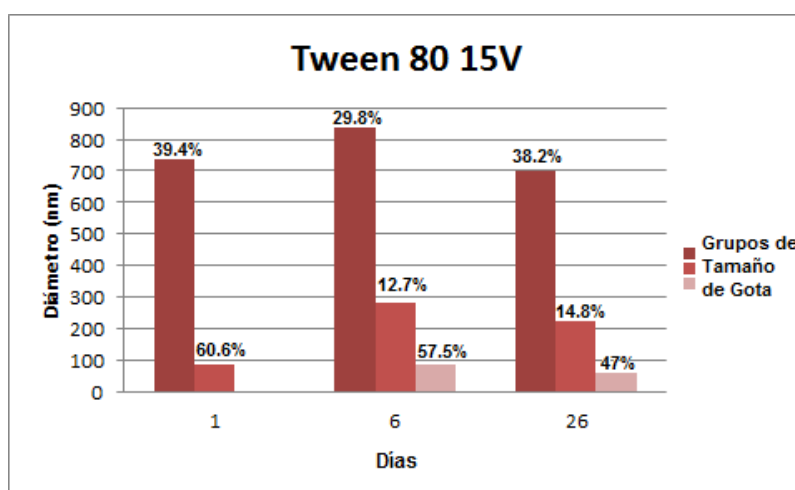


Figura 7.20.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Tween 80 15V. *Nota: Porcentaje es en Volumen.

Al mezclar los emulsificantes se esperaba compensar o balancear entre si las deficiencias que tenían y mejorar las características de las nanoemulsiones. Como se observa en la figura 7.21 al mezclar Lecitina 50% / Goma Arábica 50%, se obtuvieron tamaños de gota muy grandes y al paso del tiempo aumentó el número de poblaciones de tamaño. Aun siendo el número mínimo de vueltas en el homogeneizador la lecitina presentó cierto grado de degradación.

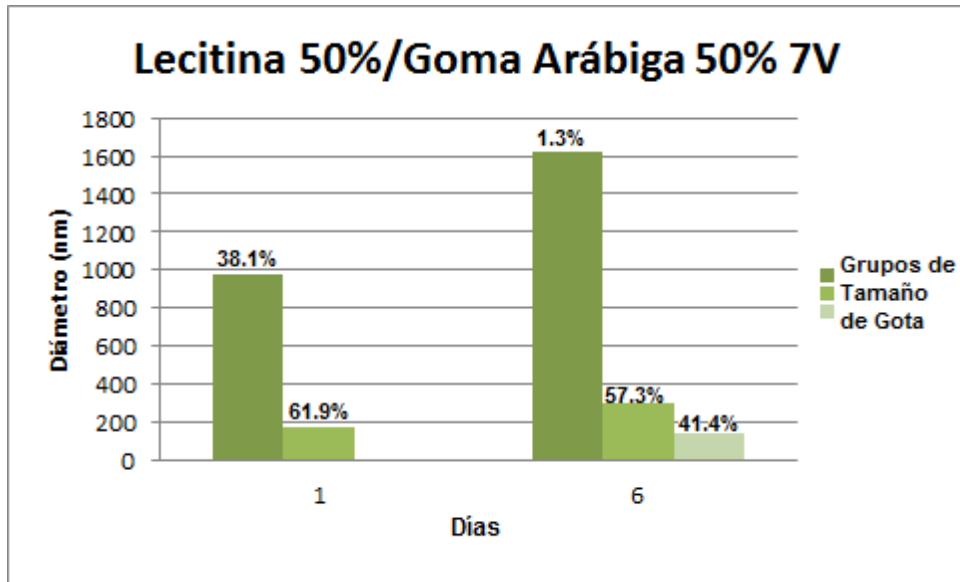


Figura 7.21.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Lecitina 50% / Goma Arábica 50% 7 vueltas en Homogeneizador. *Nota: Porcentaje es en Volumen.

En el caso de la formulación con mezcla Tween 80 50% / Goma Arábica 50% (figura 7.22) se observó que el tamaño de gota si disminuyó al usar la mezcla (con respecto a la muestra en la que se utilizó solamente Goma Arábica), sin embargo se observaron dos poblaciones de tamaño de gota y con el paso del tiempo hubo un incremento en el mismo, indicando una estabilidad baja.

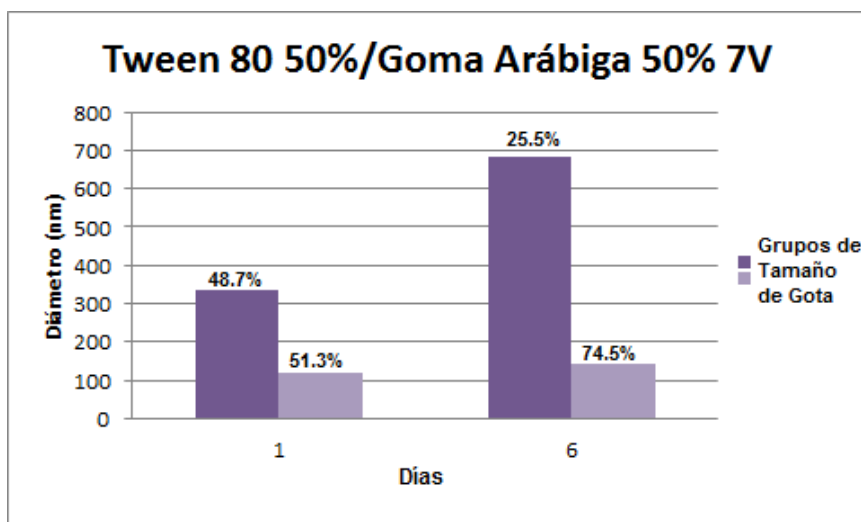


Figura 7.22.- Gráfica de Tamaños de Gota en Experimento Tween 80 50% / Goma Arábica 50% 7 vueltas en Homogeneizador. *Nota: Porcentaje es en Volumen.

La última combinación con la que se experimentó fue con Tween 80 50% / Lecitina 50%; los resultados mostrados en la figura 7.23 es una confirmación de que la lecitina no es un emulsificante adecuado para la obtención de nanoemulsiones de aceite de Limón Persa. Aunque con la presencia del Tween 80 si se logró una reducción del tamaño de gota, la degradación de la lecitina produce que con el paso del tiempo se incremente el tamaño y el número de poblaciones.

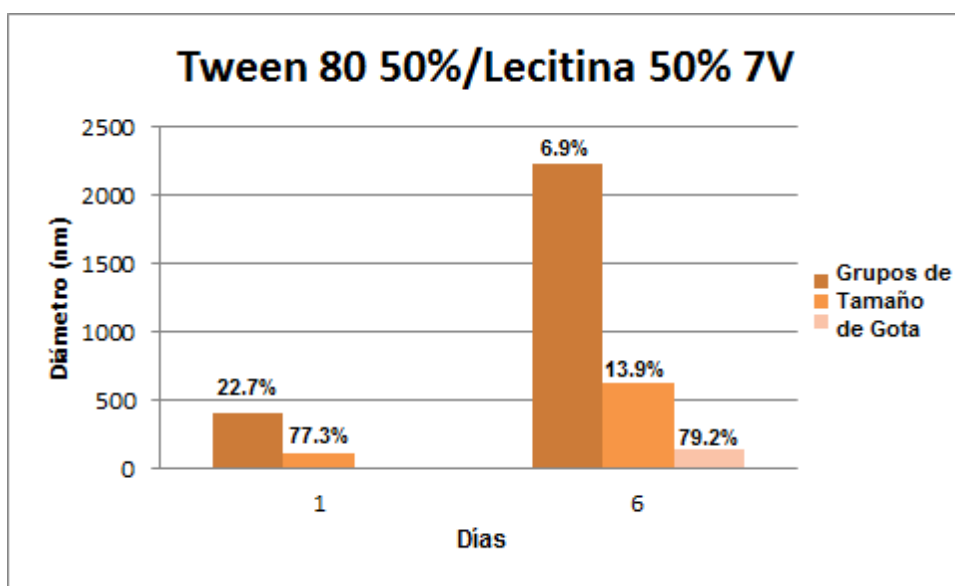


Figura 7.23.- Tamaños de Gota en Experimento Tween 80 50% / Lecitina 50% 7V. *Nota: Porcentaje es en Volumen.

7.3.2 2ª Serie de Experimentos

Tras la respuesta observada en la “1ª serie” de nanoemulsiones, se realizaron nuevos ajustes tanto en la composición como en el proceso de elaboración. Los experimentos de la 2ª serie se diseñaron tomando en cuenta el HLB de los emulsificantes (ajustando las proporciones de los mismos), la degradación de la lecitina; además, se comenzó a emplear la goma de mezquite purificada y liofilizada en nuestro laboratorio. En la composición se procedió a incrementar la presencia del aceite esencial de Limón Persa hasta un 10%, los emulsificantes se utilizaron en un 10% (todos en combinación con goma de mezquite en mayor o menor escala) y el agua comprende el 80% restante.

Los ajustes en el proceso fueron que la fase acuosa se preparaba con 12 horas de anterioridad y se dejaba reposar en refrigeración para que existiera una hidratación de la goma, se mezclaba con el aceite por un lapso de 10 minutos con agitación magnética (a una temperatura menor de 40°C), seguido por agitación de alta velocidad (8000 rpm) en ultraturrax durante 5 minutos. Se colocó hielo en el serpentín de salida para que la nanoemulsión no se calentara.

Se decidió tomar muestras a 1, 3, 5 y 10 vueltas para evitar la degradación de la muestra por una cantidad excesiva de vueltas. Además las mediciones de tamaño de gota se dejaron de hacer utilizando el Nanotrak (Incubadora de Nanotecnología), y en su lugar se realizaron con un Zeta Sizer Nano ZS (CIMAV Mty).

Se elaboraron las nanoemulsiones cuya composición se muestra en la tabla 7.21; se tomaron muestras a 1, 3, 5 y 10 vueltas de cada una y se caracterizaron. En la segunda columna de la tabla 7.21 se muestra el número de vueltas que resultó en la mejor distribución de tamaños y mejor apariencia visual.

Tabla 7.21.- Composición y condiciones (número de vueltas) de las nanoemulsiones estudiadas en la “2ª Serie” de experimentos.

Exp	N° de Vueltas	Span 85	Span 20	Tween 80	Tween 20	Lec	BRIJ 20	Goma Mezquite	HLB de mezcla de surf.
3A	1V	1%	-	4%	-	-	-	5%	7.98
3B	3V	-	1%	4%	-	-	-	5%	8.66
3C	1V	1%	-	-	4%	-	-	5%	8.66
3D	1V	-	1%	-	4%	-	-	5%	9.34
4	1V	-	1%	-	-	4%	-	5%	4.26
5	1V	-	1%	-	-	-	4%	5%	8.66
6A	1V	-	-	0.5%	0.5%	4%	-	5%	4.985

*Nota: Todas las nanoemulsiones se prepararon a 10,000 psi, con 80% de agua desionizada y 10% de aceite de Limón Persa.

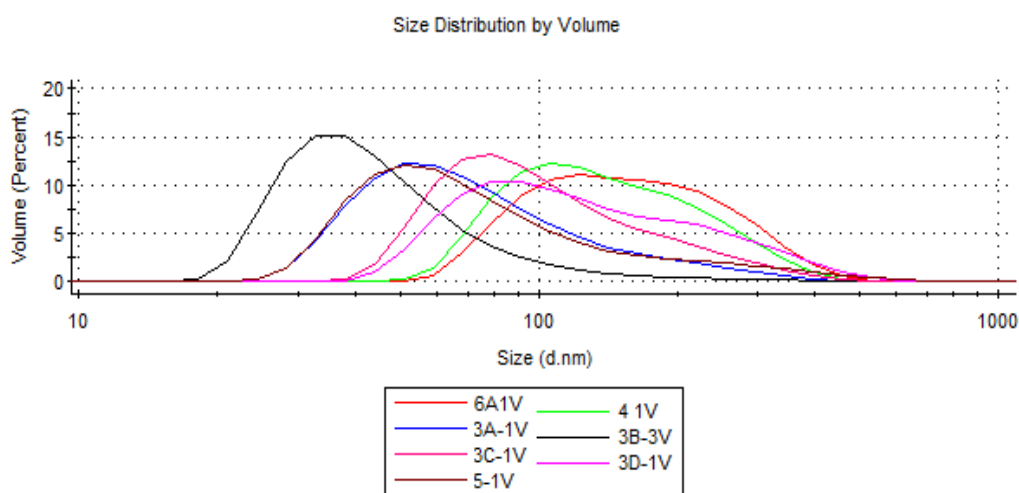


Figura 7.24.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de las Nanoemulsiones de la 2ª Serie

En la figura 7.24 se muestran los resultados de distribución de tamaño de gota por DLS de dichas emulsiones. Se puede observar que en esta serie se experimentos se logró reducir el tamaño de gota, ya que para la mayoría de las formulaciones se obtuvieron tamaños de gota menores a 100 nm. La excepción fueron las nanoemulsiones 4 y 6A las cuales presentaron tamaños de (151 nm y 170.9 nm respectivamente); estas formulaciones fueron las únicas en las que se utilizó lecitina y además la mezcla de surfactantes con los que se formularon presentan el HLB más

bajo (menor a 5). En muchos artículos se ha reportado el uso de lecitina como agente emulsionante para la formación de emulsiones y nanoemulsiones del tipo aceite-en-agua. Sin embargo en el presente estudio, la lecitina no fue un agente emulsionante adecuado para formar nanoemulsiones de aceite de limón persa en agua, y se le atribuye al bajo HLB de la mezcla, y posiblemente a una baja compatibilidad con el aceite de Limón Persa.

Por otro lado, se observa que la nanoemulsión 3B presenta el mejor comportamiento (línea negra) por tener el menor tamaño de gota (48 nm al 99.5% en volumen con un grupo minoritario de 4136 nm e índice de polidispersidad Pdl de 0.254); además presenta la apariencia visual más translúcida de todas las nanoemulsiones preparadas hasta este punto.

Esta nanoemulsión fue formulada con 1% Span 20, 4% Tween 80, y 5% de goma de mezquite (purificada en nuestro laboratorio). Esto puede ser atribuido posiblemente a una mejor compatibilidad entre las cadenas de Tween 80 y Span 20 con las cadenas del aceite de Limón Persa.

Por otro lado cabe destacar que las formulaciones 3C y 5 presentan valores de HLB similares a la nanoemulsión 3B y sin embargo sus tamaños de gota fueron mayores, por tanto se ratifica que la mejora en la nanoemulsión 3B es debido a compatibilidad entre las cadenas de surfactante y las de aceite.

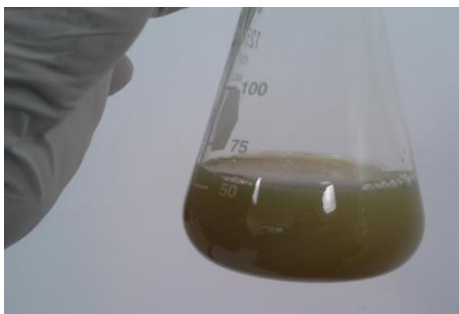


Figura 7.25.- Fotografía de la nanoemulsión 3B recién recolectada del Homogeneizador.

7.3.3 3ª Serie de Experimentos.

Una vez que se encontró que la nanoemulsión 3B resultó en la distribución de tamaños más pequeños y mejor aspecto visual, se diseñó la 3ª serie de experimentos, y se formularon controles de ajuste, tomando como base la composición de 3B que utiliza Span 20, Tween 80 y goma de mezquite como agentes emulsionantes. En dichos controles se modificaron factores como la composición y la presión como se observa en la tabla 7.22. Se tomaron muestras a 1, 3, 5 y 10 ciclos y se caracterizaron (DLS). En la segunda columna de la tabla 7.22 se muestra el número de vueltas que resultó en la mejor distribución de tamaños y mejor apariencia visual.

Tabla 7.22.- Composiciones y condiciones de la tercera serie de experimentos.

Exp	N° de Vueltas	Aceite LP	Span 20	Tween 80	Goma Mezquite	ADI	PSI
Control Alfa	3V	9.86%	1.4456%	4.895%	4.948%	78.85%	10000
Control Beta	1V	9.86%	1.4456%	4.895%	4.948%	78.85%	30000
Control Delta	10V	9.86%	1.4456%	4.895%	4.948%	78.85%	20000
Control Epsilon	3V	10%	1%	4%	5%	80%	20000

Los resultados de caracterización de las nanoemulsiones de la 3ª serie se muestran en la figura 7.26. De éstos experimentos, la nanoemulsión que resultó en el menor tamaño de gota fue Control Delta 10V, con una sola población con un tamaño de 45.74 nm, y un Pdl de 0.07; por tanto se selecciona a este experimento como la mejor formulación, en comparación con las demás nanoemulsiones de esta serie y las series anteriores, que presentan un Pdl mayor y/o presentan la presencia de más poblaciones de tamaño.

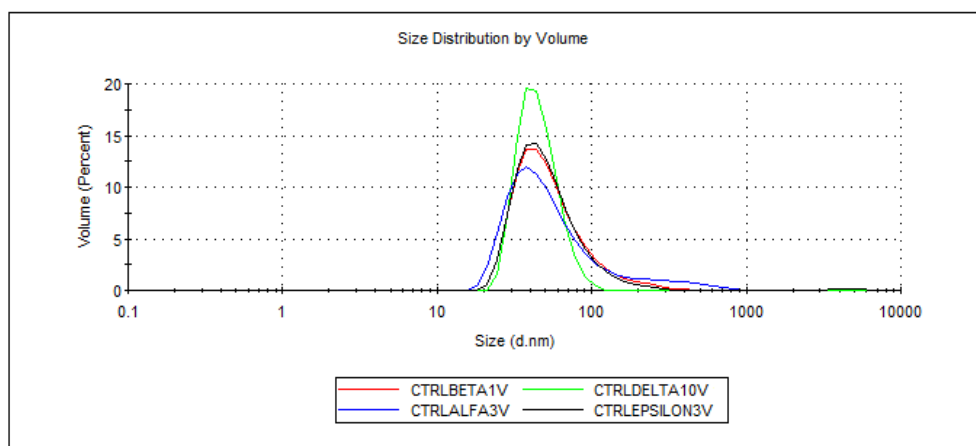


Figura 7.26.- Distribución del Tamaño por Volumen de los Controles de Ajuste para 3B.

7.3.4 4ª Serie de Experimentos.

Una vez definida la mejor formulación, era necesario elaborar nuevos controles para comparación: uno con goma arábica en lugar de goma de mezquite; otro substituyendo la goma de mezquite por surfactantes Tween 80 y Span 20; y finalmente la substitución de la goma por agua. Estos controles se definieron así para saber si la goma de mezquite tendría o no una influencia en el comportamiento y la estabilidad de la nanoemulsión. Se tomaron muestras de estos controles a los 1, 3, 5 y 10 ciclos y se caracterizaron (DLS). En la segunda columna de la tabla 7.23 se muestra el número de vueltas que resultó en la mejor distribución de tamaños y mejor apariencia visual.

Tabla 7.23.- Composiciones y condiciones de la 4ª serie de experimentos.

Exp	Nº de Ciclos	Aceite LP	Span 20	Tween 80	Factor Cambiante	ADI	PSI
CTRL DELTA	10V	9.86%	1.4459%	4.89%	Goma de Mezquite: 4.93%	78.86%	20000
CTRL 2	3V	9.86%	1.4459%	4.89%	Goma Arábica: 4.93%	78.86%	20000
CTRL 3	10V	9.86%	1.4459%	4.89%	Exceso de Span 20: 1.12% Exceso de Tween 80: 3.81%	78.86%	20000
CTRL 4	5V	9.86%	1.4459%	4.89%	Se agrega más ADI	83.76%	20000

Al comparar éstos nuevos controles contra la nanoemulsión Control Delta en la figura 7.28, se observa que Control 3 con 10 vueltas en el homogeneizador presenta un tamaño menor, en este caso una sola población con un tamaño de 19.01 nm, pero presenta un Pdl mayor (0.143). Esto se le atribuye a su composición basada únicamente en surfactantes Tween 80 y Span 20 con HLB elevado; normalmente la nanoemulsión Control Delta comprende un 5% de surfactantes Tween 80 y Span 20, así como un 5% de goma, mientras que Control 3 comprende un 10% de surfactantes Tween 80 y Span 20, aunque no lleva goma. Por otro lado la nanoemulsión Control 4, la cual tampoco lleva goma pero solo lleva 5% de surfactantes Tween 80 / Span 20, también presentó un tamaño de gota de 25.33 nm, menor a Control Delta pero mayor a Control 3.

Con estos experimentos se comprueba que los componentes responsables del pequeño tamaño de gota son los surfactantes Tween 80 y Span 20, lo cual tiene sentido ya que se espera una mayor actividad interfacial de éstos surfactantes y no tanto de la goma. Además al aumentar la concentración de estos surfactantes (Control 3), se aumenta el surfactante disponible para colocarse en la interfase, por tanto se produce una mayor área interfacial y un menor tamaño de gota. Finalmente, se observa que el experimento Control 2 (control que utiliza goma arábica en lugar de goma de mezquite), presenta un tamaño de gota de 46.77 nm, muy parecido al de Control Delta, con lo que se comprueba que la goma de mezquite en efecto presenta un desempeño muy parecido al de la goma arábica en cuanto al tamaño de gota obtenido. Aunque cabe destacar que la nanoemulsión Control Delta (con goma de mezquite), presenta una distribución de tamaños más estrecha que Control 2 (con goma arábica).



Figura 7.27.- Fotografía de Control 3 con 10V.

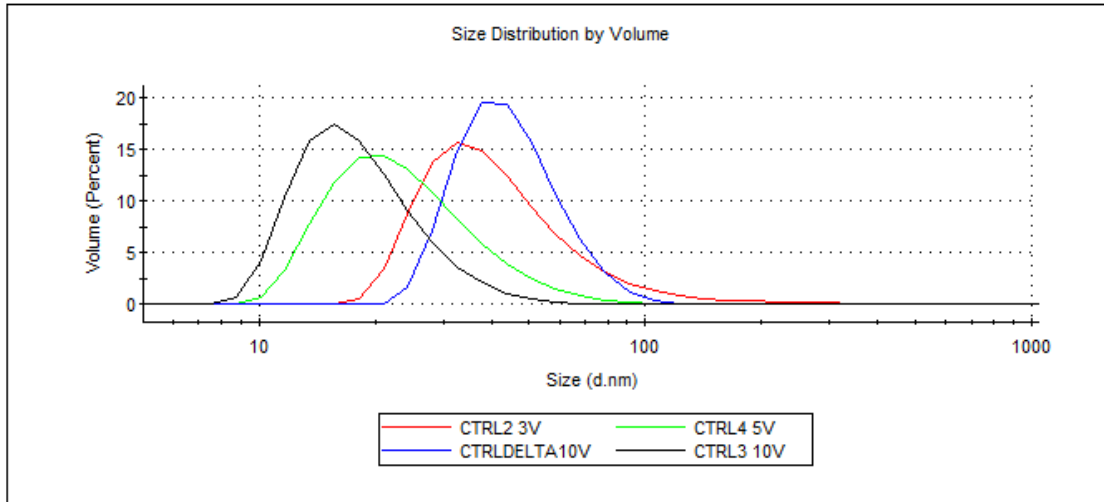


Figura 7.28.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de los Controles de Comparación Positivos.

De los experimentos de las series anteriores se tomaron aquellos que tenían los comportamientos de estabilidad más pobres. Esto fue para evaluar el desempeño de las 4 mejores nanoemulsiones contra las 4 peores a través del tiempo y confirmar que se seleccionaron las nanoemulsiones correctas. Como se ve en la figura 7.29, los tamaños de gota de dichas nanoemulsiones se encuentran alrededor de los 100-200 nm y tienen un Pdl superior a 0.140.

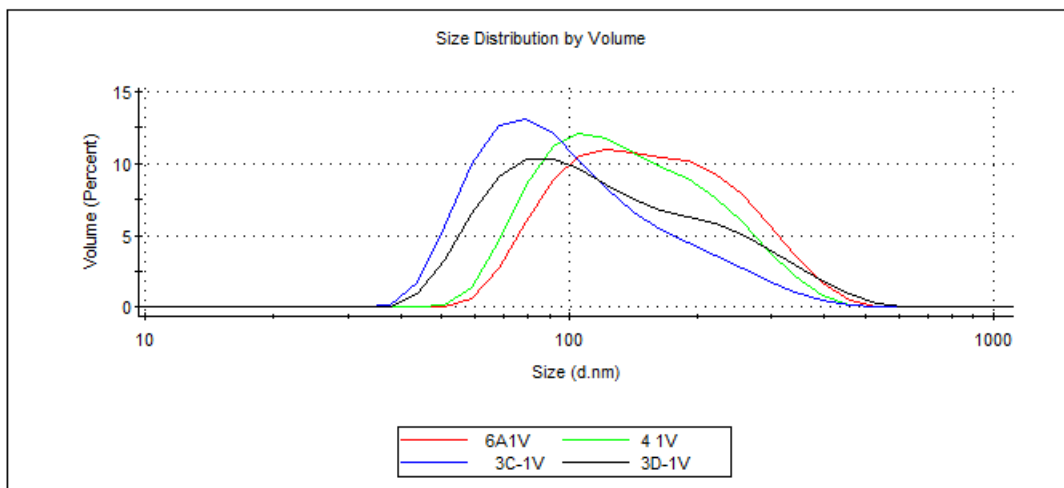


Figura 7.29.- Distribución del Tamaño por Volumen de los Controles de Comparación Negativos.

7.3.5 Seguimientos de tamaño en función del tiempo

Se decidió que se haría la evaluación de la estabilidad en función del tiempo entre las 4 mejores y las 4 peores nanoemulsiones; es decir, se establece un estudio en el cual se mide el tamaño de gota en función del tiempo, para las 4 nanoemulsiones que presentaron el menor tamaño de gota y las 4 nanoemulsiones que presentaron el mayor tamaño de gota. Ya que se pudiera dar el caso de obtener nanoemulsiones con pequeño tamaño de inicio pero que presentaran poca estabilidad, y viceversa, nanoemulsiones con tamaño no tan pequeño pero con mayor estabilidad. Se les hizo un seguimiento para ver si existía un incremento de tamaño de gota o un aumento en la cantidad de poblaciones de tamaño, que indicara inestabilidad para la vida de anaquel o algún otro problema como cremado, sedimentación, floculación, o algún cambio de coloración o aspecto. Todas las muestras fueron refrigeradas a 4°C y estaban forradas en papel aluminio para impedir que el aceite esencial cítrico se oxidara con la presencia de luz.

El primer seguimiento a evaluar es el de la formulación Control Delta la cual representa la mejor formulación que incluye la goma de mezquite. Al observar la figura 7.30, se observa que es estable durante 4 meses. Los Pdl varían entre 0.071 a 0.091. Los tamaños varían de los 41 nm a los 46 nm, por tanto se considera una nanoemulsión muy estable, además de que visualmente su color no cambió (dorado apagado) y solo apareció un leve cremado de 1mm de espesor.

Cabe destacar que la nanoemulsión fue agitada antes de tomar muestra para medición de tamaño de gota, por lo que se comprueba el grado reversible del fenómeno de cremación para esta muestra. Por tanto, cierto porcentaje de las gotas cremó por diferencias de densidad, sin embargo no se presentó coalescencia ya que al redispersar dichas gotas, recuperó el aspecto y el tamaño de gota permaneció constante. Por otro lado el hecho de que no se hayan presentado poblaciones adicionales de mayor tamaño, a diferencia de los otros controles, como se verá más adelante, es indicativo de la estabilización estérica que confiere la goma de mezquite.

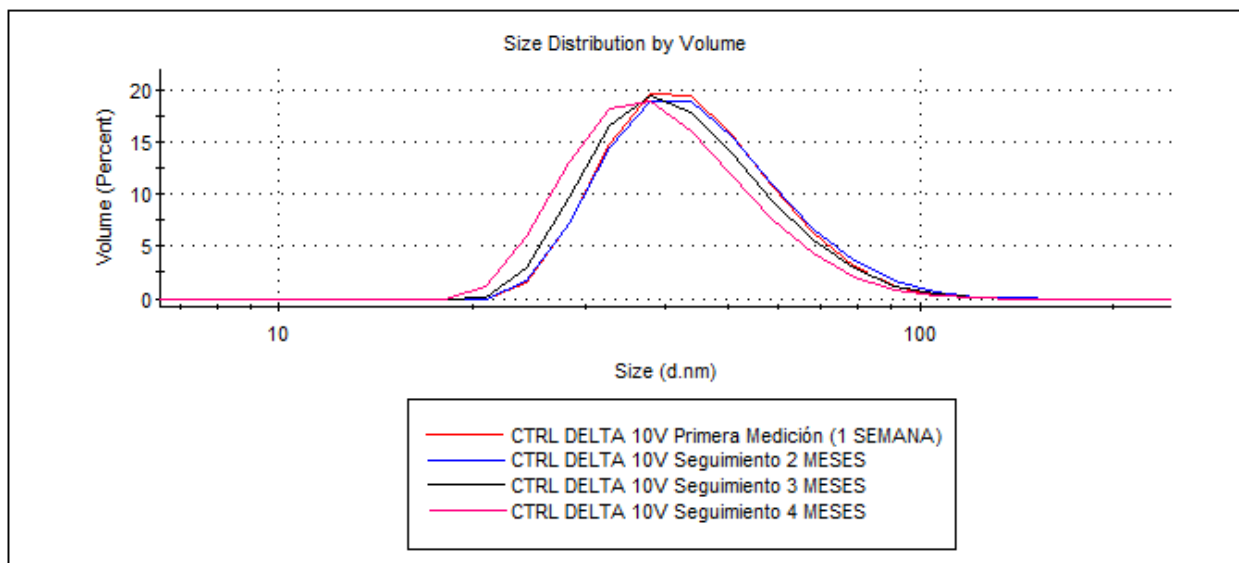


Figura 7.30.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control Delta a 10 Vueltas en Homogeneizador.

El siguiente control que se evaluó es el que incorpora la goma arábica (control 2). Desde las primeras series, se ha visto que las nanoemulsiones que incorporan goma arábica desarrolladas durante esta investigación no presentan un desempeño de estabilidad muy bueno, esto se confirma con lo que podemos observar en la figura 7.31, donde se va teniendo una aparente reducción paulatina del tamaño de gota pero con un incremento del Pdl de 0.115 a 0.247, para al final incrementarse de nueva cuenta en el cuarto mes. La mayor señal de inestabilidad es la presencia de otras poblaciones de tamaño en el rango de $3 \mu\text{m}$ que se da de manera paralela a la aparente reducción del tamaño de gota, lo que se le atribuye al fenómeno de Maduración de Ostwald, el cual uno de los principales mecanismos de inestabilidad en las nanoemulsiones. Con éste experimento se confirma que la goma de mezquite presenta ventajas respecto a la goma arábica en la formulación de las nanoemulsiones de aceite de Limón Persa, en cuanto a que la goma de mezquite confiere una mejor estabilización estérica, mejorando la estabilidad cinética de la nanoemulsión.

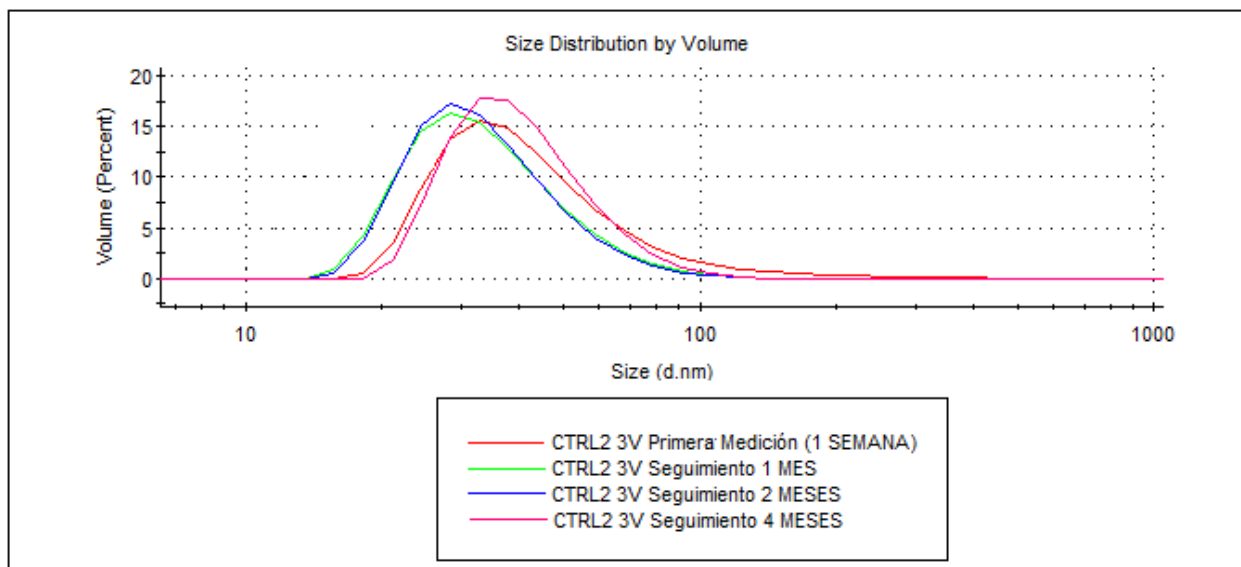


Figura 7.31.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control 2 a 3 Vueltas en Homogeneizador.

En el seguimiento del Control 3 en la figura 7.32 (nanoemulsión con exceso de Tween 80 y Span 20, sin gomas), se observa que parece ser una nanoemulsión muy estable, sin embargo con cada medición va aumentando el tamaño de gota y también se incrementan la cantidad de otras poblaciones de tamaño, el tamaño de éstas y el Pdl. Por ejemplo, a partir del segundo mes, se pasa de tener una sola población de 19.01 nm, a tener la población de 20.7 nm en coexistencia con poblaciones de 467 nm y 5033 nm, lo cual no sucede en control delta en la cual durante el tiempo estudiado se conserva una sola población de tamaños.

La diferencia entre Control Delta y Control 3 es que en la primera se usa 5% de mezcla Tween 80/Span 20 en combinación con 5% de goma de mezquite, mientras que en Control 3 se utilizó 10% de mezcla Tween 80/Span 20 y no se utilizó goma de mezquite. Por tanto, se deduce que en efecto la presencia de la goma de mezquite ayuda a mantener la estabilidad de las nanoemulsiones, proporcionando una estabilización del tipo estérico adicional y además probablemente un ligero aumento en la viscosidad de la fase continua, lo cual es bien sabido que también es benéfico para mejorar la estabilidad de las nanoemulsiones.

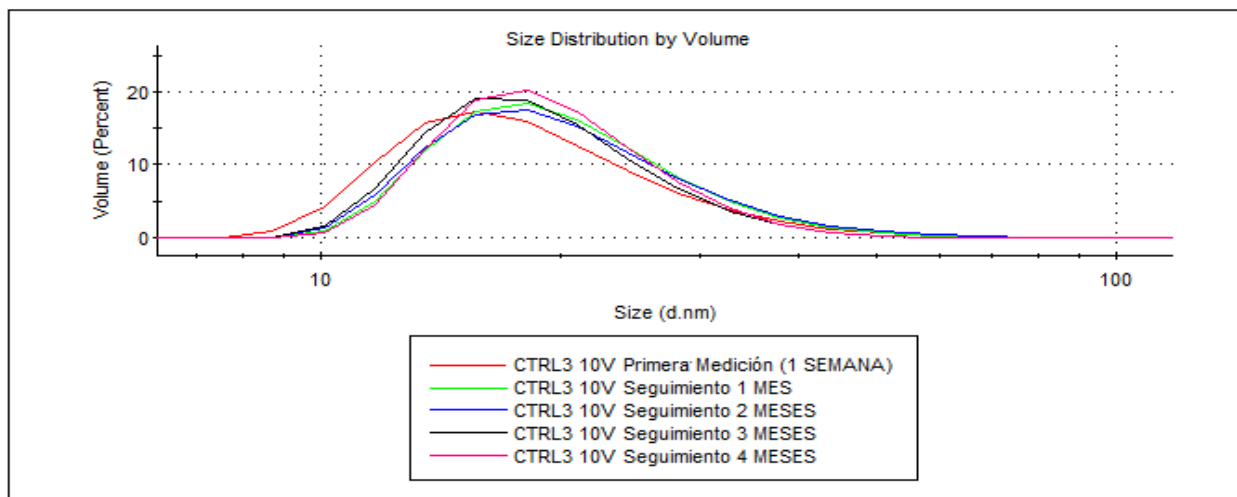


Figura 7.32.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control 3 a 10 Vueltas en Homogeneizador.

La nanoemulsión Control 4 utiliza solamente 5% de la mezcla Tween 80/Span 20, y no utiliza goma, por tanto su contenido de agua aumenta a 85%. Este control se realizó para verificar si existe un efecto de la goma de mezquite tanto en el tamaño de la nanoemulsión como en la estabilidad de la misma. Esto se comprueba en la figura 7.33, donde se ven tanto reducciones como incrementos del tamaño de gota, además de la presencia de poblaciones de tamaño de 2000-4000 nm, esto se la atribuye a que las gotas se están disolviendo y otras gotas las están absorbiendo por lo que parece haber Maduración de Ostwald.

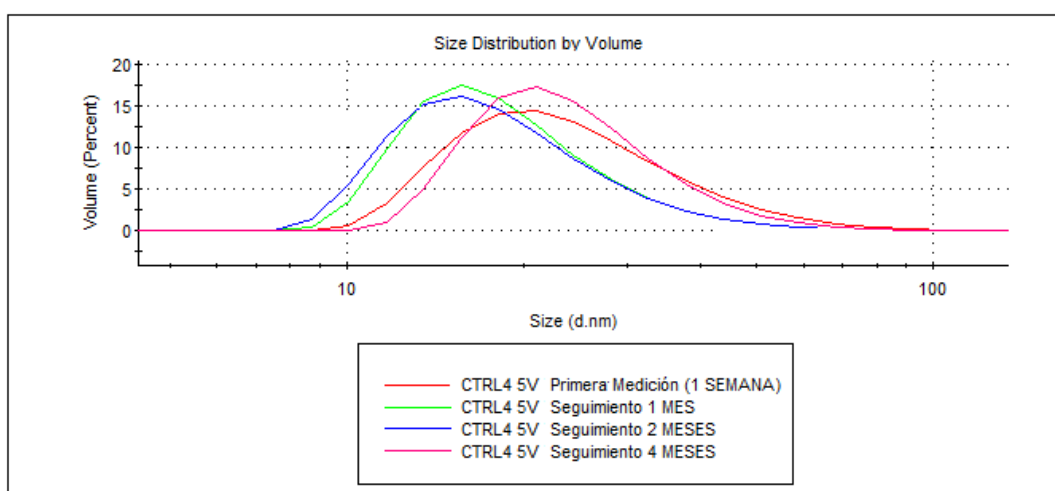


Figura 7.33.- Gráfica de Seguimiento de 4 meses de Control 4 a 5 Vueltas en Homogeneizador.

En general, los experimentos realizados en la 4ª serie de experimentos mostraron claramente que, aunque con en los controles sin goma de mezquite es posible obtener tamaños de goma incluso inferiores que los obtenidos con el experimento Control Delta (con goma de mezquite), la estabilidad y el índice de polidispersidad (Pdl) es mejor en esta última, es decir, la goma de mezquite confiere una estabilidad estérica adicional la cual le proporciona una mejor estabilidad cinética, ya que prácticamente no se presentan un crecimiento del tamaño de gota. Además, se deduce que es posible que el mayor tamaño presentado por la nanoemulsión Control Delta (41 nm) y Control 2, comparado con las nanoemulsiones sin goma (Control 3 y Control 4), pueda deberse a que las cadenas de goma contribuyen al tamaño hidrodinámico de la gota. Se propone una estructura o arreglo de la gota como se muestra en el esquema de la figura 7.34.

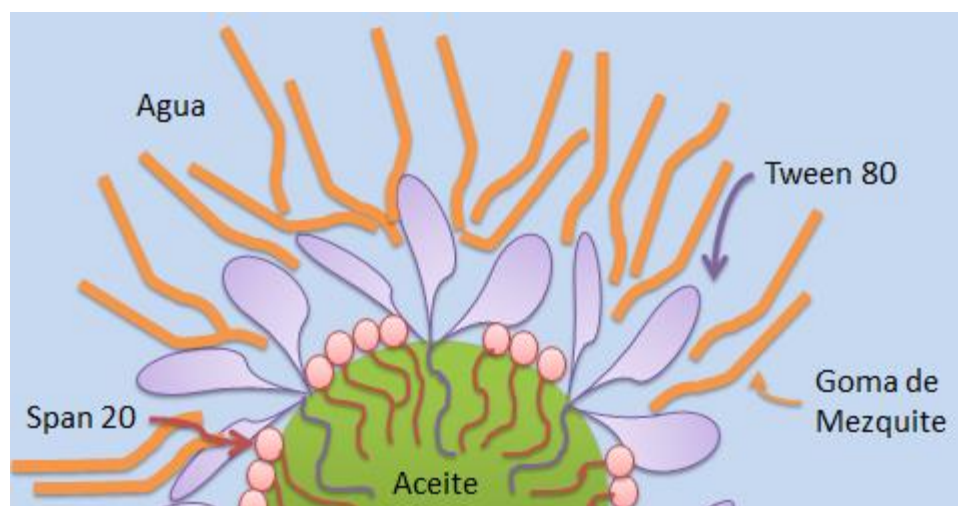


Figura 7.34.- Esquema del arreglo propuesto para la interfase de las gotas de nanoemulsión.

Se realizó también el seguimiento de las nanoemulsiones con mayor tamaño de gota; en la figura 35, se muestran los datos de tamaño de los experimentos 6A, 4, 3D y 3C en función del tiempo. Podemos observar en cada una que su estabilidad resulta ser pobre pues su distribución de tamaños es muy amplia, con varias poblaciones y además el tamaño de gota va creciendo con el tiempo. El Pdl no baja de 0.230, indicando que la polidispersidad es muy grande, es posible que estén ocurriendo varios mecanismos de desestabilización como maduración de Ostwald y coalescencia.

Además visualmente son lechosas, con un cremado entre 2mm y 8mm; incluso el experimento 3D presentó una separación de la fase oleosa y acuosa.

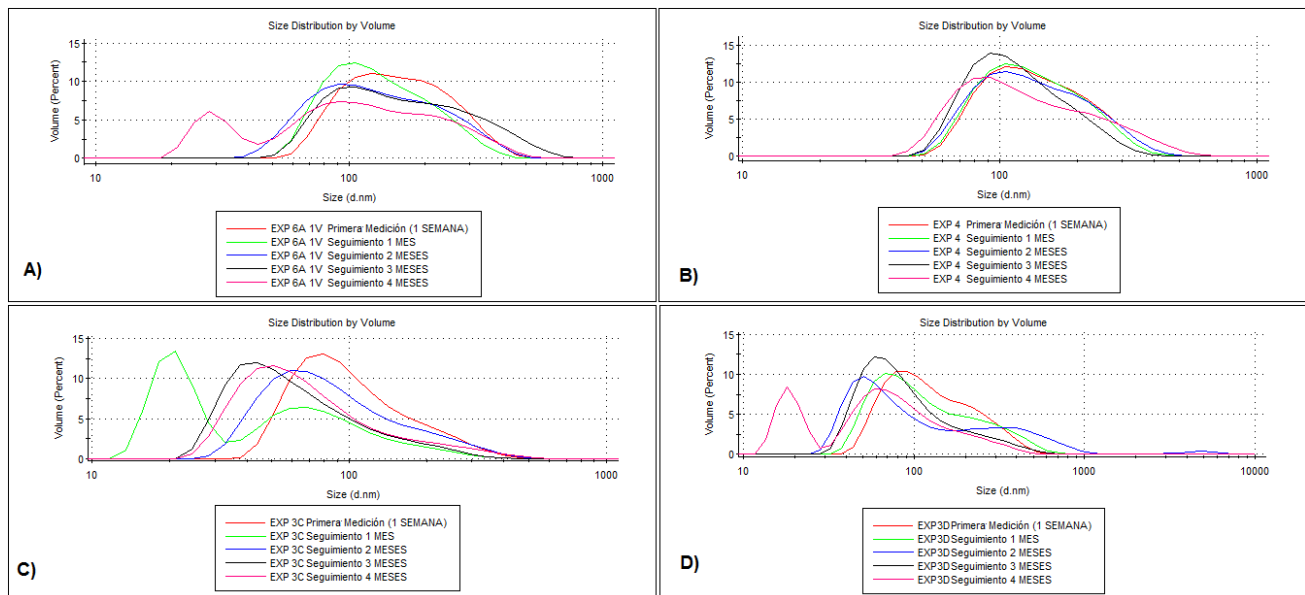


Figura 7.35.- Conjunto de gráficas de seguimiento: A) Seguimiento Experimento 6A; B) Seguimiento Experimento 4; C) Seguimiento Experimento 3C; D) Seguimiento Experimento 3D.

Ya que se identificó la nanoemulsión con el mejor desempeño en cuestión de estabilidad y tamaño de gota (Control Delta), se procedió a realizar dos repeticiones, para asegurar que existe una reproducibilidad. Se le dio seguimiento al tamaño de gota durante un mes y como se observa en la figura 7.36 las repeticiones presentaron los mismos tamaños de gota y polidispersidad, y la misma estabilidad en función del tiempo, por lo que se concluye que el experimento es reproducible.

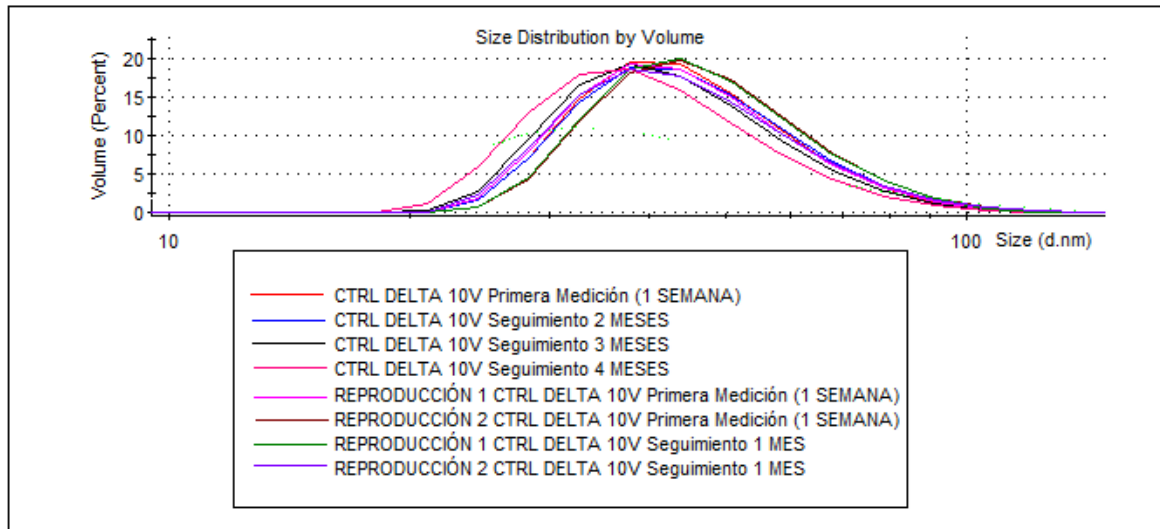


Figura 7.36.- Gráficas de Seguimiento de Control Delta 10V y sus repeticiones.

7.3.6 Actividad Antimicrobiana

A continuación se muestran los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de las nanoemulsiones Control Delta, Control 2, Control 3 y Control 4 (en esta prueba se estudió cada nanoemulsión a 1, 3, 5 y 10 vueltas en el microfluidizer). Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se empleó la metodología descrita en métodos y en los anexos correspondientes utilizando cajas de micropozos (dos filas por cada muestra para asegurar reproducibilidad) como se muestra en las figuras 6.16 y 7.37. Cuando se obtuvieron las mejores formulaciones que mostraron resultados positivos en cuanto a tamaño de gota y estabilidad, se decidió evaluar las propiedades antimicrobianas de las nanoemulsiones de aceite de Limón Persa. En la literatura hay estudios que reportan las propiedades antimicrobianas de otros aceites esenciales cítricos como por ejemplo, de aceite de Limón Citrus, de naranja, de uva, de mandarina, y albahaca cítrica (Viuda-Martos, Ruiz Navajas et al. 2008; Ghosh, Mukherjee et al. 2013). Cabe destacar que no se encontró en la literatura ningún estudio en el que evalúen las propiedades antimicrobianas del aceite de Limón Persa.



Figura 7.37.- Caja de Micropozos para determinación del CMI.

Al realizar los primeros ensayos de actividad antimicrobiana, se observó crecimiento de bacterias, tanto de *Escherichia coli* como de *Staphylococcus aureus* en todos los pozos, incluso en el control negativo (línea donde solamente se coloca nanoemulsión y bacterias, sin caldo de cultivo). Para el caso de Control Delta este crecimiento se observó con ambas bacterias, como se alcanza a apreciar en la figura 7.38. Posiblemente, esto se debió a que la goma al contener azúcares pudo convertirse en alimento o “caldo de cultivo” para dichas bacterias. También pudo haber ocurrido algún tipo de contaminación.

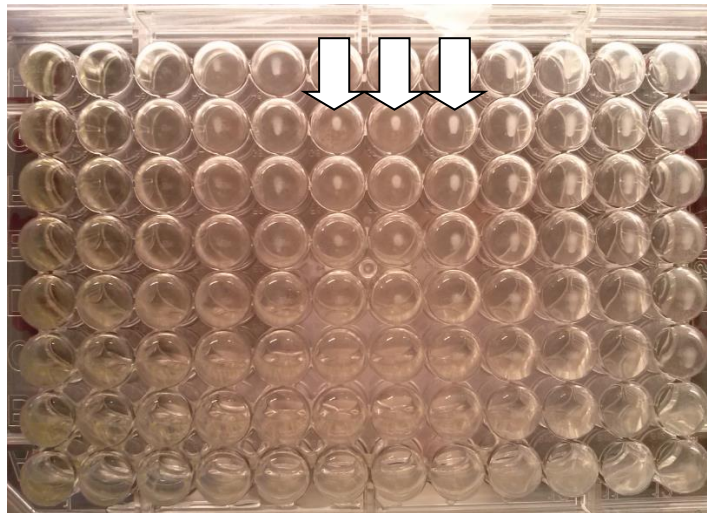


Figura 7.38.- Caja de Micropozos con crecimientos de bacterias.

Se procedió a realizar un frotis de las nanoemulsiones (Anexo E); estas muestras se utilizaron tal cual, es decir, no habían sido inoculadas con ninguna bacteria, para determinar si había otro tipo de bacterias ya existentes en las nanoemulsiones que estuvieron inhibiendo la acción de los aceites esenciales o la estuviera disminuyendo. Como se puede ver en la figura 7.39 y la figura 7.40, se observa la presencia de *Escherichia coli* y *Streptococos*; estas son las bacterias más comunes que interaccionan con el ser humano por lo que la simple manipulación de las nanoemulsiones pudo causar la contaminación.

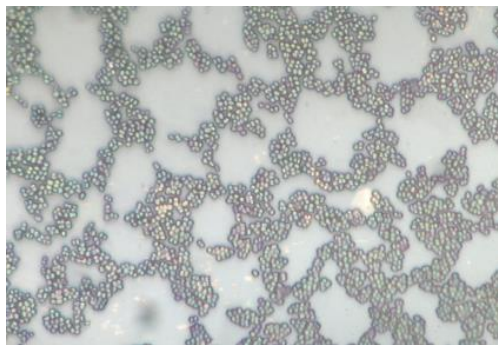


Figura 7.39.- Fotografía de *Streptococos* en nanoemulsión Control Delta.

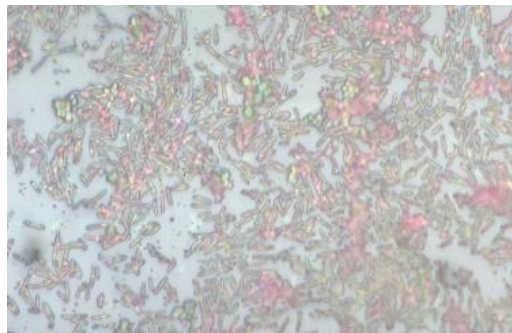


Figura 7.40.- Fotografía de *Escherichia coli* en nanoemulsión Control 2.

Después del descubrimiento de la contaminación, se procedió a buscar diversas metodologías para esterilizar las muestras, primero se intentó utilizar una autoclave (procedimiento de alta temperatura y presión, 121°C y 103 kPa), sin embargo, éste método causó que las nanoemulsiones crecieran en tamaño de gota y el aspecto cambiara de transparentes a lechosas. Se requería una nueva técnica para esterilizar, por lo que se pasó a emplear la técnica de luz UV (Black 1999). En la literatura se

recomendaban tiempos muy variados, por tanto se hicieron tratamientos de 10 minutos, 40 minutos y una noche (19 hrs) como se ve en la figura 7.41, con el fin de definir el tiempo más adecuado de tratamiento. Además, se preparó una nanoemulsión adicional con la misma composición de Control Delta, pero substituyendo el aceite esencial de Limón Persa por d-limoneno industrial, ya que se tenía la idea que este componente podría ser el componente bactericida activo.



Figura 7.41.- Nanoemulsiones para esterilización.

Al hacer comparaciones entre las tablas 7.24 y 7.25, la esterilización por 40 minutos fue la que otorgó mejores resultados, sobre todo para la bacteria *Staphylococcus aureus*. Siendo la nanoemulsión control delta más estable en ambos casos otorgando un CMI del 6.25% para ambas bacterias. Al ver la tabla 7.26 con una esterilización de 10 minutos de la nanoemulsiones más representativas, vemos que el efecto es mucho menor, aumento el CMI al doble o cuádruple sea el caso de la bacteria.

Tabla 7.24.- Resultados de CMI para nanoemulsiones esterilizadas 40 minutos. Bacteria utilizada: *Escherichia coli*. *Nota: cn=Concentración de Nanoemulsión

Nanoemulsión	Número de Vuelta en Homogeneizador	CMI
Limoneno-Control Delta	Todas las Vueltas	25 % cn*
CTRL Delta	Todas las Vueltas	25 % cn
CTRL 2	Todas las Vueltas	25 % cn
CTRL 3	1V, 3V, 5V 10V	6.25 % cn 12.5 % cn
CTRL 4	Todas las Vueltas	6.25 % cn

Tabla 7.25.- Resultados de CMI para nanoemulsiones esterilizadas 40 minutos. Bacteria utilizada: *Staphylococcus aureus*. *Nota: cn=Concentración de Nanoemulsión

Nanoemulsión	Número de Vuelta en Homogeneizador	CMI
Limoneno-Control Delta	Todas las Vueltas	25%cn*
CTRL Delta	Todas las Vueltas	6.25%cn
CTRL 2	1V 3V 5V 10V	1.56%cn 3.12%cn 6.25%cn 12.5%cn
CTRL 3	Todas las Vueltas	6.25%cn
CTRL 4	1V,3V 5V,10V	3.125%cn 6.25%cn

Tabla 7.26.- Resultados de CMI para nanoemulsiones esterilizadas 10 minutos. *Nota: cn=Concentración de Nanoemulsión

Nanoemulsión	Bacteria	CMI
CTRL 3 10V	<i>Escherichia coli</i>	25%
	<i>Staphylococcus A.</i>	12.5%
CTRL Delta 10V	<i>Escherichia coli</i>	25%
	<i>Staphylococcus A.</i>	12.5%

Por tanto, con estos resultados se confirma que las nanoemulsiones de Aceite de Limón Persa desarrolladas en esta tesis presentan un buen efecto antimicrobiano ante *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Considerando que las nanoemulsiones contienen un 10% de aceite de Limón Persa, el CMI de este aceite esencial podría considerarse como del 2.5% para *Escherichia coli* y 0.625% para *Staphylococcus aureus* (tomando en cuenta las muestras Control Delta). Considerando los mejores resultados, tenemos una CMI de 0.625% de Control 3 y Control 4 para *Escherichia coli* y 0.156% de Control 2 para *Staphylococcus aureus*; es de destacar que estas nanoemulsiones (Control 2, 3 y 4) presentaron menores tamaños de gota, por lo que la menor CMI podría ser atribuída a una mayor área interfacial de las nanoemulsiones, optimizando el área de contacto entre el aceite de Limón Persa y las células. Sin embargo debido a la mejor estabilidad de la nanoemulsión Control Delta, se considera como más promisoría. Se podrían realizar ciertos ajustes para mejorar estos resultados, como por ejemplo aumentar la concentración de Tween 80 / Span 20 en Control Delta para disminuir el tamaño, pero manteniendo la presencia de goma de mezquite para preservar la estabilidad estérica conferida por ésta.

Al realizar éstas pruebas de actividad antimicrobiana se observó que cuando las nanoemulsiones se sometían a tratamiento con luz UV, éstas se volvían un poco más transparentes, por lo que se sospechó que la radiación con luz UV provocaba una reducción del tamaño de gota. En las figuras 7.42 y 7.43, observamos el efecto del tratamiento con luz UV sobre las dos nanoemulsiones con mejor comportamiento de estabilidad y tamaño de gota. En el caso de la nanoemulsión Control 3 a 10V no se presentó una reducción importante en el tamaño (de 0.5 a 1 nm), después del tratamiento a diferentes tiempos de exposición, sin embargo, para la nanoemulsión Control Delta si se presentó una reducción de aproximadamente 10 nm después del tratamiento con luz UV.

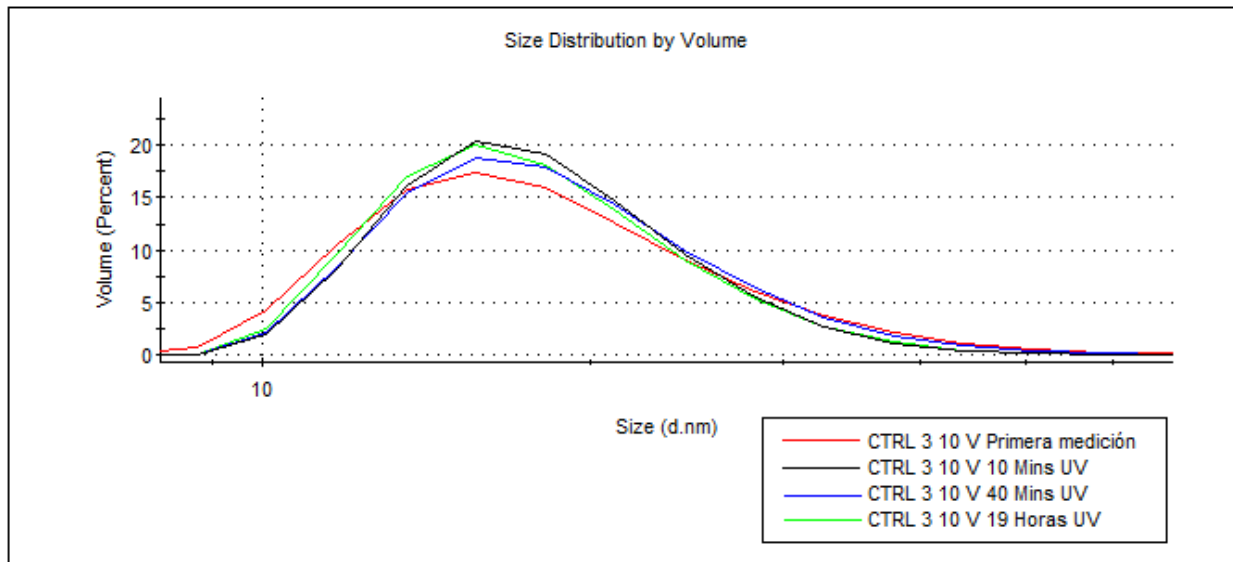


Figura 7.42.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de Control 3 10V con tratamiento de UV.

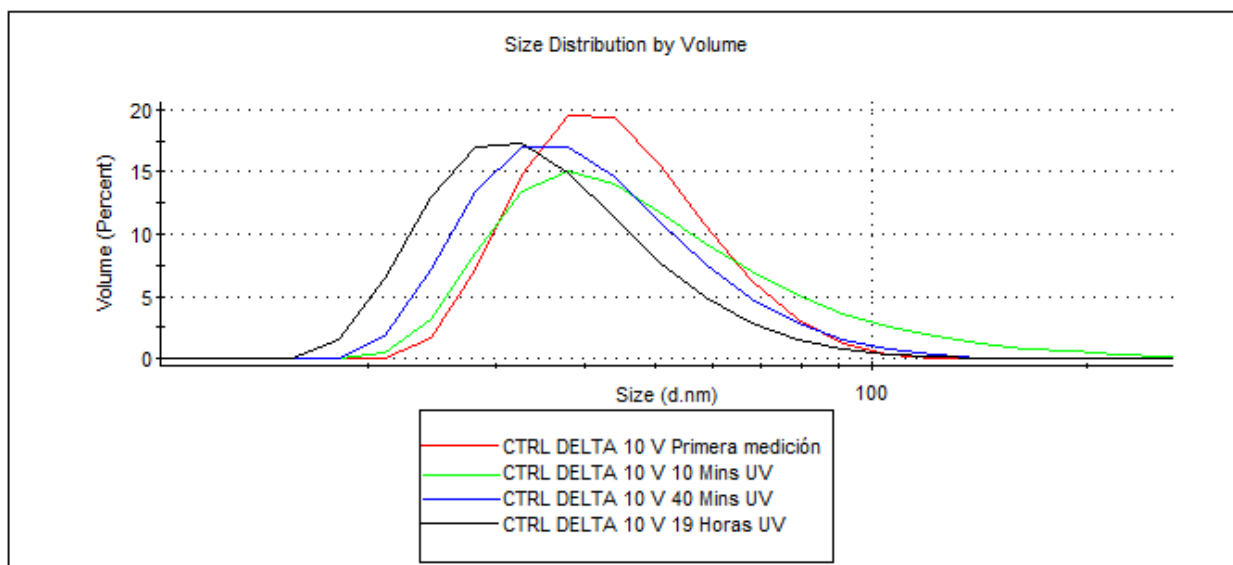


Figura 7.43.- Gráfica de Distribución del Tamaño por Volumen de Control Delta 10V con tratamiento de UV.

Aunque en la literatura se señala que no se conoce cuál de los componentes de los aceites esenciales cítricos es el causante del efecto antimicrobiano, al emplear d-limoneno industrial en lugar del aceite esencial cítrico causo un efecto no deseado

aumentando el CMI en vez de disminuirlo, por lo que se intuye que los aldehídos del limón persa pudieran ser los responsables de este efecto, como se discutió en la parte de la Etapa 1 de esta sección de resultados, donde se observó que el efecto antimicrobiano del aceite de Limón Persa (con menor contenido de Limoneno y mayor contenido de aldehídos), fue superior al del aceite de Toronja Rosa (con mayor contenido de Limoneno y menor contenido de aldehídos).

VIII. Conclusiones

8.1 Conclusiones General

Esta investigación examina la influencia de la composición de la nanoemulsión y las condiciones de homogenización a alta presión en el tamaño de gota y estabilidad. Las nanoemulsiones de un diámetro menor a 100 nm solo se pueden dar a condiciones precisas de presión y número de pasos específicos, además de un emulsificante que tiene que desempeñarse ideal a esas condiciones sin degradarse.

Se utilizaron surfactantes y gomas naturales para producir gotas pequeñas de aceite esencial cítrico de limón persa, que tienen propiedades antimicrobianas lo que permite aplicaciones en las áreas de cosmetología, farmacéutica y alimentos. En este estudio la goma de mezquite se empleó al final como un co-surfactante para mantener la estabilidad de las gotas el aceite de limón persa, esto debido al HLB tan bajo que tiene, no permite por si sola una buena estabilidad.

8.2 Etapa 1

*Los aceites esenciales cítricos otorgados por Frutech son de buena calidad ya que presentan las características reportadas en la literatura para este tipo de aceites.

*La obtención de la goma de mezquite mediante purificación seguida por liofilización en el laboratorio es un proceso en el cual la concentración de la solución sometida a liofilización es un factor crítico que determina la textura y las propiedades reológicas de la misma. La obtención de goma purificada por horneado es factible, sin embargo, requiere de más tiempo, y existe el riesgo de la caramelización.

*La goma de mezquite obtenida en laboratorio es muy parecida a la goma arábica comercial, tanto en su estructura química como en sus características y propiedades, incluyendo el comportamiento reológico.

*El uso de aceite de girasol para diluir al aceite esencial cítrico se descartó en base a los estudios preliminares de tensión interfacial, ya que la tensión interfacial era alta al utilizar el aceite de girasol.

*Los estudios preliminares de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales cítricos de Toronja Rosa y Limón Persa, permitieron seleccionar al éste último gracias a su mejor efecto antimicrobiano. De acuerdo a la caracterización por Cromatografía de Gases, el efecto superior del Aceite de Limón Persa puede atribuirse al mayor contenido de aldehídos, y no al D-limoneno como se reporta normalmente en literatura.

8.3 Etapa 2

*No es posible utilizar la goma de nopal de Green Corp para formular nanoemulsiones aceite-en-agua preparadas por homogenización a alta presión, debido a su hidrofobicidad ya que causa taponeamientos en los microcanales de la cámara de interacción del microfluidizer; se descartó para estudios posteriores.

*Las formulaciones de partida con 0.5% o 1% de agente emulsionante y 2% de aceite esencial de Limón Persa no eran adecuadas para la formación de nanoemulsiones. Esto puede deberse a que con la relación surfactante: aceite de 0.5:2 y 1:2 no hay suficiente surfactante para bajar la tensión interfacial ni crear una gran área interfacial.

8.4 Etapa 3

*Al aumentar la relación surfactante: aceite a 1:1 sí se logró obtener nanoemulsiones con tamaños menores a 200 nm, por tanto con esta relación surfactante: aceite, se cuenta con suficiente surfactante para crear el área interfacial correspondiente a un menor tamaño de gota.

*El usar concentraciones más altas de aceite de Limón Persa (10%, con 10% de agentes emulsionantes), también fue beneficioso para las nanoemulsiones formuladas, ya que esto incrementa la viscosidad de las nanoemulsiones, y lo mismo ocurre al aumentar la concentración de goma; esto también ayudó a la estabilidad. Además, al

incorporar más porcentaje de aceite de Limón Persa, se obtienen nanoemulsiones con mayor concentración de principio activo antimicrobiano, y por tanto más efectivas.

*La obtención de los pequeños tamaños de gota también deben ser atribuidos al aumento de la presión en el microfluidizer de hasta 20,000 y 30,000 PSI.

*La lecitina no fue un agente emulsionante adecuado para formar nanoemulsiones de aceite de Limón Persa en agua. Se atribuye al bajo HLB de la mezcla (4.26), y a una baja compatibilidad de las cadenas de la lecitina con las del aceite de Limón Persa.

*En cambio, con la combinación Tween 80/ Span 20/ Goma de mezquite se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a tamaño (Control Delta, 45.74 nm, Pdl 0.07) y estabilidad (cambio de tamaño despreciable durante 4 meses). Cabe destacar que este resultado es reproducible. El HLB de esta mezcla (8.66) es mayor que el de la lecitina, pero aunque resulta muy parecido al HLB de otras mezclas (Span 85/ Tween 20; Span 20/ Tween 20; Span 20/ Brij 20), el tamaño de gota de las nanoemulsiones formuladas con éstas últimas mezclas fue mayor. Por tanto, se deduce que para la correcta formulación de las nanoemulsiones estudiadas en ésta investigación, además del HLB adecuado, es muy importante que exista una buena compatibilidad entre las cadenas para que puedan lograr el mejor empaquetamiento en la interface de las gotas.

*Además, con el doble de concentración de surfactantes Tween 80 /Span 20 (sin goma de mezquite) se logró obtener una nanoemulsión con tamaño de gota aún más pequeño (19 nm, Pdl 0.143), ya que al existir el doble de moléculas de surfactantes y la misma concentración de aceite, se genera el doble de área interfacial y por tanto menor tamaño de gota.

*Sin embargo, y en base al resultado de seguimiento de la mejor nanoemulsión con goma de mezquite (Control Delta), y los controles sin goma de mezquite (Control 2, 3 y 4), se puede deducir que la goma de mezquite proporciona una estabilización del tipo estérico adicional y además probablemente un ligero aumento en la viscosidad de

la fase continua, lo cual es bien sabido que también es benéfico para mejorar la estabilidad de las nanoemulsiones.

*Las nanoemulsiones que incorporan goma arábica no presentaron un desempeño de estabilidad muy bueno. La mayor señal de inestabilidad es la presencia de otras poblaciones de tamaño con el paso del tiempo que se da de manera paralela a la aparente reducción del tamaño de gota, que se atribuye al fenómeno de Maduración de Ostwald.

*Un tratamiento de UV de 40 minutos aseguró la esterilización de las nanoemulsiones desarrolladas en este estudio. Este tratamiento reduce el tamaño de gota y provoca que el poder antimicrobiano de los aceites esenciales se reactive.

*La goma de mezquite puede ser un sustituto de goma arábica para la formulación de nanoemulsiones con actividad antimicrobiana que contengan aceite esencial cítrico.

IX. Trabajo a Futuro

*Aunque la principal intención de esta investigación fue la de desarrollar nanoemulsiones, el proceso de esterilización por UV presentó resultados interesantes para el efecto antimicrobiano, que sería de gran utilidad estudiar a fondo.

*Optimizar al máximo el proceso de secado de la goma de mezquite, ya sea por horneado o liofilización. Requiere de una investigación más profunda que se dedique exclusivamente la obtención de goma de mezquite purificada en laboratorio. El proceso de elaboración de las nanoemulsiones también podría ser mejorado para obtener tamaños de gota menores a 20 nm, a la vez que se mejora su estabilidad cinética. Esto podría ser factible realizando ajustes en la formulación (concentración de agentes emulsionantes). Este tipo de optimización en la formulación podría mejorar la actividad antimicrobiana.

*Los cromatogramas presentaron resultados interesantes que sugieren que los aldehídos presentes en los aceites esenciales cítricos son los responsables por la acción antimicrobiana. Por lo que se podría hacer una investigación extrayendo los aldehídos e incorporarlos directamente a las nanoemulsiones para verificar si la actividad antimicrobiana aumenta o que resultados nuevos genera.

*Probar la mejor formulación para obtener nanoemulsiones de otros aceites esenciales cítricos, con el fin de validar ésta formulación para otros aceites.

X. Referencias

1. Abreu, L. R. C. (2008). "Hemicelulosas de maderas."
2. Acedo Carrillo, J. I. (2006). Potencial zeta y reología de emulsiones de aceite en agua estabilizadas con goma de mezquite, UNISON.
3. Aspinall, G. and C. Whitehead (1970). "Mesquite gum. I. The 4-O-methylglucuronogalactan core." Canadian Journal of Chemistry 48(24): 3840-3849.
4. Badui, S. (1999). "Química de los alimentos." Editorial Pearson Educación. México: 581-613.
5. Balderrama Ibarra, J. R. Caracterización fisicoquímica y análisis del aprovechamiento de la goma chúcata y galactomana del mezquite (*Prosopis spp.*), como posibles hidrocoloides alimentarios, UNISON.
6. Batchelor, G. (1976). "Brownian diffusion of particles with hydrodynamic interaction." Journal of Fluid Mechanics 74(01): 1-29.
7. Becher, P. (1957). Emulsions: Theory and Practice, Reinhold Publishing Corporation.
8. Becher, P. (1996). The Encyclopedia of Emulsion Technology, MARCEL DEKKER Incorporated.
9. Becher, P. and W. Griffin (1970). "HLB: a Bibliography 1949-1969." Atlas Chemical Industries.
10. Beltran, E. and J. Gutierrez (2007). "Nano-emulsion preparation by low energy methods: studies on optimization and scale-up. ."
11. Bergenstahl, B. (1997). Physicochemical Aspects of an Emulsifier Functionality. Di dalam. GL Hassenhuettl and RW Hartel (ed.). Food Emulsifiers and Their Applications, Chapman and Hall. New York.
12. Binks, B. and P. Fletcher (2001). "Particles adsorbed at the oil-water interface: A theoretical comparison between spheres of uniform wettability and "Janus" particles." Langmuir 17(16): 4708-4710.
13. Black, J. (1999). Microbiology Principles and Exploration, John Wiley & Son, Inc. .
14. C.G. Mothé, M. A. R. (2000). "Thermal behavior of gum arabic in comparison with cashew gum." Thermochimica(Acta 357-358): 9-13.
15. Cerutti M, N. F. (2004) "Introducción a la obtención de aceite esencial de limón." Invenio Vol. 7, pp. 149-155.
16. Chanamai, R. and D. McClements (2001). "Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch." Journal of Food Science 66(3): 457-463.
17. Chander, S., A. Lansdown, et al. (1994). "Effectiveness of combined limonene and 4-hydroxyandrostenedione in the treatment of NMU-induced rat mammary tumours." British journal of cancer 69(5): 879.
18. Chu, B., Z. Wang, et al. (1991). "Dynamic Light Scattering Study." 6832-6838.
19. Codex, N. R. C. C. o. F. C. (1983). Food Chemicals Codex : First- Supplement to the Third Ed: Committee on Food Chemicals Codex, Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press.
20. Córdova, M. (2004). Clasificación y caracterización fisicoquímica de la goma de mezquite (chúcata) cruda y ultrafiltrada, Tesis. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 110 pp.[Links].
21. CRODA (2010) "Spans and Tweens."
22. Díaz, C., G. Arrázola, et al. (2005). "CARACTERIZACION DEL ACEITE ESENCIAL EN LA CORTEZA DEL LIMON SWINGLEA (Swinglea glutinosa) POR CG/EM CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OIL OF SWINGLEA LEMON (Swinglea glutinosa) PEEL FOR GC-ME." ARTICULOS CIENTIFICOS: 22.
23. Dickinson, E. (1992). An Introduction to Food Colloids, Oxford University Press, Incorporated.
24. Dickinson, E. (1993). Emulsion Stability. Food Hydrocolloids. K. Nishinari and E. Doi, Springer US: 387-398.
25. Dickinson, E., B. S. Murray, et al. (1988). "Surface activity and emulsifying behaviour of some *Acacia* gums." Food Hydrocolloids 2(6): 477-490.
26. Dickinson, E. and G. Stainsby (1988). Advances in food emulsions and foams, Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
27. Donsi, F., M. Annunziata, et al. (2012). "Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier." Journal of Biotechnology 159(4): 342-350.
28. Donsi, F., M. Annunziata, et al. (2012). "Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier." Journal of Biotechnology 159(4): 342-350.

29. Donsì, F., M. Sessa, et al. (2010). "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods." *Journal of Biotechnology* 150, Supplement(0): 67.
30. El-Aasser, M. S., C. D. Lack, et al. (1988). "The miniemulsification process — different form of spontaneous emulsification." *Colloids and Surfaces* 29(1): 103-118.
31. Forgiarini, A., J. Esquena, et al. (2000). Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. *Trends in Colloid and Interface Science XIV*. V. Buckin, Springer Berlin Heidelberg. 115: 36-39.
32. Friberg, S. E. and K. Larsson (1997). *Food Emulsions*, Marcel Dekker Incorporated.
33. Friberg, S. E. and K. Larsson (2004). *Food emulsions*. New York [etc.], Dekker.
34. Garti, N. (1999). "Hydrocolloids as emulsifying agents for oil-in-water emulsions." *Journal of Dispersion Science and Technology* 20(1-2): 327-355.
35. Gentry, H. S. (1957). "Gum tragacanth in Iran." *Economic Botany* 11(1): 40-63.
36. Ghosh, V., A. Mukherjee, et al. (2013). "Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity." *Ultrasonics sonochemistry* 20(1): 338-344.
37. Glatter, O., M. Hofer, et al. (1985). "Interpretation of elastic light-scattering data in real space." *Journal of Colloid and Interface Science* 105(2): 577-586.
38. Goycoolea, F., E. Morris, et al. (1995). "Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum arabic." *Carbohydrate Polymers* 27(1): 37-45.
39. Hait, S. K. and S. P. Moulik (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." *Journal of Surfactants and Detergents* 4(3): 303-309.
40. Hiemenz, P. C. and R. Rajagopalan (1997). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, revised and expanded, CRC Press.
41. Higuchi, W. and J. Misra (1962). "Solubilization in nonpolar solvents. Influence of the chain length of solvent on the solubilization of water by dioctyl sodium sulfosuccinate." *Journal of pharmaceutical sciences* 51(5): 455-458.
42. Holmberg, K., B. Jönsson, et al. (2003). *Surfactants and polymers in aqueous solution*, John Wiley & Sons Chichester.
43. Huisa, C. N. (2010) "Caracterización de Aceites Esenciales.", <http://tecnologiadeprocessos.blogspot.mx/2010/2003/caracterizacion-de-aceites-esenciales.html>.
44. Iesmat, S. A. (2010) "Procesadores de alta cizalla - Laboratorio."
45. Islam, A., G. Phillips, et al. (1997). "A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic." *Food Hydrocolloids* 11(4): 493-505.
46. Israelachvili, J. and H. Wennerström (1996). "Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions."
47. Izquierdo, P., J. Esquena, et al. (2002). "Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method." *Langmuir* 18(1): 26-30.
48. Jafari, S. M., Y. He, et al. (2007). "Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques." *Journal of Food Engineering* 82(4): 478-488.
49. Janssen, A., J. Scheffer, et al. (1987). "Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods." *Planta medica* 53(05): 395-398.
50. Karlson, J., A.-K. Borg-Karlson, et al. (1996). "Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action." *Anti-cancer drugs* 7(4): 422-429.
51. Katsumoto, Y., H. Ushiki, et al. (2000). "Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: I. Hard sphere interaction and bound water on miniemulsion droplets." *Journal of Physics: Condensed Matter* 12(3): 249.
52. Katsumoto, Y., H. Ushiki, et al. (2000). "Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: II. Growth mechanism of miniemulsion droplets." *Journal of Physics: Condensed Matter* 12(15): 3569.
53. Kobayashi, I., M. Yasuno, et al. (2002). "Microscopic observation of emulsion droplet formation from a polycarbonate membrane." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 207(1): 185-196.
54. Krog, N. J. and F. V. Sparso (1990). "Food emulsifiers and their chemical and physical properties." *Food emulsions*: 127-180.
55. Lease, J. (1967). "Availability to the Chick of Zinc• Phytate Complexes Isolated from Oil Seed Meals by an in vitro Digestion Method." *The Journal of nutrition* 93(4): 523-532.

56. Lee, G. W. J. and T. F. Tadros (1982). "Formation and stability of emulsions produced by dilution of emulsifiable concentrates. Part I. An investigation of the dispersion on dilution of emulsifiable concentrates containing cationic and non-ionic surfactants." *Colloids and Surfaces* 5(2): 105-115.
57. Li, P.-H. and B.-H. Chiang (2012). "Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology." *Ultrasonics sonochemistry* 19(1): 192-197.
58. Lissant, K. J. (1974). *Emulsions and Emulsion Technology*, M. Dekker.
59. LLC., S.-A. C. (2013). "Span 20." 2013, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s6635?lang=es®ion=MX>.
60. LLC., S.-A. C. (2013). "Tween 80." 2013, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w291706?lang=es®ion=MX>.
61. López-Franco, Y. L., R. E. Córdova-Moreno, et al. (2012). "Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.)." *Food Hydrocolloids* 26(1): 159-166.
62. López-Franco, Y. L., F. M. Goycoolea, et al. (2006). "Goma de mezquite: una alternativa de uso industrial." *Interciencia* 31(3): 183-189.
63. Lowell, G. H., S. Amselem, et al. (1999). Submicron emulsions as vaccine adjuvants, Google Patents.
64. Mahdi, S., J. Yinghe, et al. (2007). "Optimization of nano-emulsions production by microfluidization." 733-741.
65. Mao, L., B. T. O'Kennedy, et al. (2012). "Effect of monoglyceride self-assembled structure on emulsion properties and subsequent flavor release." *Food Research International* 48(1): 233-240.
66. McClements, D. J. (2010). "Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components." *Annual review of food science and technology* 1: 241-269.
67. McClements, D. J. (2012). "Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17(5): 235-245.
68. McClements, D. J. (2012). "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." *Soft Matter* 8(6): 1719-1719.
69. Miller, C. A. "Spontaneous emulsification produced by diffusion. A review." *Colloids and Surfaces* 29(1): 89-102.
70. Miñaña-Pérez M, S. F., Salager JL, Loaiza-Maldonado I. (1982). "Surfactant-oil-water systems near the affinity inversion: I. Relation between equilibrium phase behavior and emulsion type and stability." *J Dispersion Sci Technology*: 3: 279-292.
71. Mothe, C. and M. Rao (1999). "Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending." *Food Hydrocolloids* 13(6): 501-506.
72. Myers, R. H. and D. C. Montgomery (1988). *Response surface methodology*, Taylor & Francis.
73. Okamoto, H., T. Nakajima, et al. (2005). "Simultaneous determination of ingredients in a cold medicine by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 37(3): 517-528.
74. Orozco-Villafuerte, J., F. Cruz-Sosa, et al. (2003). "Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees." *Carbohydrate Polymers* 54(3): 327-333.
75. Osman, M. E., P. A. Williams, et al. (1993). "Characterization of commercial samples of gum arabic." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41(1): 71-77.
76. Ostertag, F., J. Weiss, et al. (2012). "Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion." *Journal of Colloid and Interface Science* 388(1): 95-102.
77. Piculell, L., K. Thuresson, et al. (2001). "Mixed solutions of surfactant and hydrophobically modified polymer." *Polymers for Advanced Technologies* 12(1-2): 44-69.
78. Ponzi, E., O. Masini, et al. (1999). "ISOMERIZACION DE α -PINENO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE HIERRO EN OXIDO DE CIRCONIO SULFATADO." *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 44(3): 271-277.
79. Qian, C. and D. J. McClements (2011). "Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size." *Food Hydrocolloids* 25(5): 1000-1008.
80. Rang, M.-J. and C. A. Miller (1999). "Spontaneous Emulsification of Oils Containing Hydrocarbon, Nonionic Surfactant, and Oleyl Alcohol." *Journal of Colloid and Interface Science* 209(1): 179-192.

81. Rao, J. and D. J. McClements (2011). "Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil." *Food Hydrocolloids* 25(6): 1413-1423.
82. Rao, J. and D. J. McClements (2012). "Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation." *Food Hydrocolloids* 26(1): 268-276.
83. Robert Nicolosi, T. W. (2008). *Compositions and methods for making and using nanoemulsions*. USA. EP20060851414.
84. Rosas A., H.-U. R., Valdez M.A., Goycoolea F.M., Félix-Valenzuela L., Martínez-Robinson K. (2005). "Estabilidad y procesos de gelificación en emulsiones aceite esencial de Naranja-en-Agua estabilizadas con goma de mezquite." *RESUMENES DE TRABAJOS LIBRES: BIOTECNOLOGÍA*
85. Rosen, M. J. (1978). "Adsorption of surface-active agents at interfaces: the electrical double layer." *Surfactants and Interfacial Phenomena, Third Edition*: 34-104.
86. Salager, J. L. (2002). "Surfactantes tipos y usos." Cuaderno FIRP S300-A. Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de los Andes.
87. Salicio, M. M. V. and M. D. M. Moreno (2005). *Coloides e interfases*, Ediciones Universidad de Salamanca.
88. Salvia-Trujillo, L., M. A. Rojas-Graü, et al. (2013). "Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions." *Food Hydrocolloids* 30(1): 401-407.
89. Sarker, D. K. (2005). "Engineering of nanoemulsions for drug delivery." *Current Drug Delivery* 2(4): 297-310.
90. Schröder, V. and H. Schubert (1999). "Production of emulsions using microporous, ceramic membranes." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152(1): 103-109.
91. Sepúlveda, E., Sáenz C., Gómez, C. (2003). "Comportamiento reológico de néctar elaborado con hidrocoloide de nopal: efecto del tratamiento térmico." *Memorias IX Congreso Nacional y VII Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, Zacatecas, México*: 269-272.
92. Sharma, N., M. Bansal, et al. (2010). "Nanoemulsion : A new concept of delivery system." 1(2): 2-6.
93. Shewfelt, R. L. (1981). "Fish muscle lipolysis—a review." *Journal of Food Biochemistry* 5(2): 79-100.
94. Shinoda, K. (1967). "The correlation between the dissolution state of nonionic surfactant and the type of dispersion stabilized with the surfactant." *Journal of Colloid and Interface Science* 24(1): 4-9.
95. Shinoda, K. and H. Saito (1968). "The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant." *Journal of Colloid and Interface Science* 26(1): 70-74.
96. Sierra, P. O., S. (2002). "Manual sobre El Cultivo de Limón Persa (citrus latifolia tanaka) en Guatemala." Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola-IICTA-Guatemala: 12.
97. Solans, C., P. Izquierdo, et al. (2005). "Nano-emulsions." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10(3-4): 102-110.
98. Sonneville-Aubrun, O., J.-T. Simonnet, et al. (2004). "Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products." *Advances in Colloid and Interface Science* 108: 145-149.
99. Suzuki, T., H. Takei, et al. (1989). "Formation of fine three-phase emulsions by the liquid crystal emulsification method with arginine β -branched monoalkyl phosphate." *Journal of Colloid and Interface Science* 129(2): 491-500.
100. Tadros, T., P. Izquierdo, et al. (2004). "Formation and stability of nano-emulsions." *Advances in Colloid and Interface Science* 108: 303-318.
101. Tadros, T. F. (2006). *Applied surfactants*, Wiley. com.
102. Tadros, T. F., B. Vincent, et al. (1983). *Encyclopedia of Emulsion Technology*, vol. 1, Basic Theory, Dekker, New York.
103. Taylor, P. (1995). "Ostwald ripening in emulsions." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 99(2-3): 175-185.
104. Taylor, P. and R. H. Ottewill (1994). "The formation and ageing rates of oil-in-water miniemulsions." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 88(2-3): 303-316.
105. Thomson, W. (1871). "LX. On the equilibrium of vapour at a curved surface of liquid." *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 42(282): 448-452.
106. Torres, A. (2002). "Uso del mezquite como fuente de polisacáridos de alto valor agregado."
107. Valle-Guadarrama, S., O. López-Rivera, et al. "Recubrimiento comestible basado en goma arábica y carboximetilcelulosa para conservar frutas en atmósfera modificada." *Revista Chapingo. Serie horticultura* 14(3): 235-241.

108. Vernon-Carter, E., C. Beristain, et al. (2000). "Mesquite gum (< i> Prosopis</i> gum)." *Developments in Food Science* 41: 217-238.
109. Vernon-Carter, E., R. Guzmán, et al. (1984). "A comparative rheological study between arabic and mesquite gums as emulsifying and microencapsulation agents." *Adv. Rheology* 4: 101-109.
110. Vernon-Carter, E. J., S. A. Gómez, et al. (1996). "Color degradation and coalescence kinetics of aztec marigold Oleoresin-in-Water Emulsions Stabilized by Mesquite or arabic gums and their blends." *Journal of texture studies* 27(6): 625-641.
111. Vernon-Carter, E. J., R. Pedroza-Islas, et al. (1998). "Stability of Capsicum Annuum Oleoresin-in-water emulsions containing Prosopis and Acacia gums." *Journal of texture studies* 29(5): 553-567.
112. Viuda-Martos, M., Y. Ruiz Navajas, et al. (2008). "Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils." *Journal of Food Safety* 28(4): 567-576.
113. Wakerly, M., C. Pouton, et al. (1986). *Phenomena in mixed surfactant systems*. ACS Symposium Series.
114. Walstra, P. (2005). "8 Emulsions." *Fundamentals of interface and colloid science* 5: 1-94.
115. Webacademia, A. (2013) "Polisorbato 80, Otros nombres, Datos, Utilización de los alimentos, El uso médico, Uso de laboratorio, El consumo y los posibles efectos."
116. Wen, L. and K. D. Papadopoulos (2001). "Effects of Osmotic Pressure on Water Transport in W< sub>1</sub>/O/W< sub>2</sub> Emulsions." *Journal of Colloid and Interface Science* 235(2): 398-404.
117. Whistler, R. L. and C. L. Smart (1953). *Polysaccharide chemistry*, Academic press NY.
118. White, E. (1946). "The Constitution of Mesquite Gum. I. The Methanolysis Products of Methylated Mesquite Gum*." *Journal of the American Chemical Society* 68(2): 272-275.
119. Yuan, Y., Y. Gao, et al. (2008). "Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions." *Food Research International* 41(1): 61-68.
120. Ziani, K., Y. Fang, et al. (2012). "Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: vitamin E, vitamin D, and lemon oil." *Food chemistry* 134(2): 1106-1112.

XI. Anexos

11.1 ANEXO A.- Aprobación de la FDA para el Tween 80.

[Code of Federal Regulations]
[Title 21, Volume 3]
[Revised as of April 1, 2013]
[CITE: 21CFR172.840]

TITLE 21--FOOD AND DRUGS
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
SUBCHAPTER B--FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION (CONTINUED)

PART 172 -- FOOD ADDITIVES PERMITTED FOR DIRECT ADDITION TO FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION

Subpart I--Multipurpose Additives

Sec. 172.840 Polysorbate 80.

The food additive polysorbate 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate), which is a mixture of polyoxyethylene ethers of mixed partial oleic acid esters of sorbitol anhydrides and related compounds, may be safely used in food in accordance with the following prescribed conditions:

(a) The food additive is manufactured by reacting oleic acid (usually containing associated fatty acids) with sorbitol to yield a product with a maximum acid number of 7.5 and a maximum water content of 0.5 percent, which is then reacted with ethylene oxide.

(b) The food additive meets the following specifications:

Saponification number 45-55.

Acid number 0-2.

Hydroxyl number 65-80.

Oxyethylene content 65 percent-69.5 percent.

(c) The additive is used or intended for use as follows:

(1) An emulsifier in ice cream, frozen custard, ice milk, fruit sherbet, and nonstandardized frozen desserts, when used alone or in combination with polysorbate 65 whereby the maximum amount of the additives, alone or in combination, does not exceed 0.1 percent of the finished frozen dessert.

(2) In yeast-defoamer formulations whereby the maximum amount of the additive does not exceed 4 percent of the finished yeast defoamer and the maximum amount of the additive in the yeast from such use does not exceed 4 parts per million.

(3) As a solubilizing and dispersing agent in pickles and pickle products, whereby the maximum amount of the additive does not exceed 500 parts per million.

(4) As a solubilizing and dispersing agent in:

(i) Vitamin-mineral preparations containing calcium caseinate in the absence of fat-soluble vitamins, whereby the maximum intake of polysorbate 80 shall not exceed 175 milligrams from the recommended daily dose of the preparations.

(ii) Fat-soluble vitamins in vitamin and vitamin-mineral preparations containing no calcium caseinate, whereby the maximum intake of polysorbate 80 shall not exceed 300 milligrams from the recommended daily dose of the preparations.

(iii) In vitamin-mineral preparations containing both calcium caseinate and fat-soluble vitamins, whereby the maximum intake of polysorbate 80 shall not exceed 475 milligrams from the recommended daily dose of the preparations.

(5) As a surfactant in the production of coarse crystal sodium chloride whereby the maximum amount of the additive in the finished sodium chloride does not exceed 10 parts per million.

(6) In special dietary foods, as an emulsifier for edible fats and oils, with directions for use which provide for the ingestion of not more than 360 milligrams of polysorbate 80 per day.

(7) As a solubilizing and dispersing agent for dill oil in canned spiced green beans, not to exceed 30 parts per million.

(8) As an emulsifier, alone or in combination with polysorbate 60, in shortenings and edible oils intended for use in foods as follows, when standards of identity established under section 401 of the act do not preclude such use:

(i) It is used alone in an amount not to exceed 1 percent of the weight of the finished shortening or oil.

(ii) It is used with polysorbate 60 in any combination providing no more than 1 percent of polysorbate 80 and no more than 1 percent of polysorbate 60, provided that the total combination does not exceed 1 percent of the finished shortening or oil.

(iii) The 1-percent limitation specified in paragraph (c)(8) (i) and (ii) of this section may be exceeded in premix concentrates of shortening or edible oil if the labeling complies with the requirements of paragraph (d) of this section.

(9) As an emulsifier in whipped edible oil topping with or without one or a combination of the following:

(i) Sorbitan monostearate;

(ii) Polysorbate 60;

(iii) Polysorbate 65;

whereby the maximum amount of the additive or additives used does not exceed 0.4 percent of the weight of the finished whipped edible oil topping.

(10) It is used as a wetting agent in scald water for poultry defeathering, followed by potable water rinse. The concentration of the additive in the scald water does not exceed 0.0175 percent.

(11) As a dispersing agent in gelatin desserts and in gelatin dessert mixes, whereby the amount of the additive does not exceed 0.082 percent on a dry-weight basis.

(12) As an adjuvant added to herbicide use and plant-growth regulator use dilutions by a grower or applicator prior to application of such dilutions to the growing crop. Residues resulting from such use are exempt from the requirement of a tolerance. When so used or intended for use, the additive shall be exempt from the requirements of paragraph (d) (1) of this section.

(13) As a defoaming agent in the preparation of the creaming mixture for cottage cheese and lowfat cottage cheese, as identified in 133.128 and 133.131 of this chapter, respectively, whereby the amount of the additive does not exceed .008 percent by weight of the finished products.

(14) As a surfactant and wetting agent for natural and artificial colors for use in barbecue sauce where the level of the additive does not exceed 0.005 percent by weight of the barbecue sauce.

(d) To assure safe use of the additive, in addition to the other information required by the Act:

(1) The label of the additive and any intermediate premixes shall bear:

(i) The name of the additive.

(ii) A statement of the concentration or strength of the additive in any intermediate premixes.

(2) The label or labeling shall bear adequate directions to provide a final product that complies with the limitations prescribed in paragraph (c) of this section.

[42 FR 14491, Mar. 15, 1977, as amended at 43 FR 2871, Jan. 20, 1978; 45 FR 58835, Sept. 5, 1980; 46 FR 8466, Jan. 27, 1981]

11.2 ANEXO B.- Aprobación de la FDA para el Span 20.

[Code of Federal Regulations]
[Title 21, Volume 3]
[Revised as of April 1, 2013]
[CITE: 21CFR178.3400]

TITLE 21--FOOD AND DRUGS
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
SUBCHAPTER B--FOOD FOR HUMAN CONSUMPTION (CONTINUED)

PART 178 -- INDIRECT FOOD ADDITIVES: ADJUVANTS, PRODUCTION AIDS, AND SANITIZERS

Subpart D--Certain Adjuvants and Production Aids

Sec. 178.3400 Emulsifiers and/or surface-active agents.

The substances listed in paragraph (c) of this section may be safely used as emulsifiers and/or surface-active agents in the manufacture of articles or components of articles intended for use in producing, manufacturing, packing,

processing, preparing, treating, packaging, transporting, or holding food, subject to the provisions of this section.

(a) The quantity used shall not exceed the amount reasonably required to accomplish the intended technical effect; and the quantity that may become a component of food as a result of such use shall not be intended to, nor in fact, accomplish any physical or technical effect in the food itself.

(b) The use as an emulsifier and/or surface-active agent in any substance or article that is the subject of a regulation in parts 174, 175, 176, 177, 178 and 179.45 of this chapter conforms with any specifications and limitations prescribed by such regulation for the finished form of the substance or article.

(c) List of substances:

List of substances	Limitations
<p>[alpha]-Alkyl-, [alpha]-alkenyl-, and [alpha]-alkylaryl-<i>omega</i>-hydroxypoly(oxyethylene) mixture consisting of 30 weight pct of [alpha]-(2,4,6-triisobutylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly(oxyethylene) having an average poly(oxyethylene) content of 7 moles and 70 weight pct of a 1:1 weight ratio mixture of [alpha]-(Z)-9-octadecenyl-<i>omega</i>-hydroxypoly(oxyethylene) having an average poly(oxyethylene) content of 18 moles and [alpha]-alkyl(C₁₆-C₁₈)-<i>omega</i>-hydroxypoly(oxyethylene) having an average poly(oxyethylene) content of 18 moles</p>	<p>For use only at levels not to exceed 0.5 pct by weight of coatings complying with 175.320 of this chapter and limited to use as an emulsifier for polyhydric alcohol diesters used as provided in 178.3770(b). The weight of the finished coating shall not exceed 2 milligrams per square inch of food-contact surface.</p>
<p><i>n</i>-Alkylbenzenesulfonic acid (alkyl group consisting of not less than 95 percent C₁₀ to C₁₆) and its ammonium, calcium, magnesium, potassium, and sodium salts</p>	<p>For use only as emulsifiers and/or surface active agents as components of nonfood articles complying with 175.300, 175.320, 175.365, 175.380, 176.170, 176.180, 177.1010, 177.1200, 177.1210, 177.1630, 177.2600, and 177.2800 of this chapter and 178.3120.</p>
<p>Alkyl mono- and disulfonic acids, sodium salts (produced from <i>n</i>-alkanes in the range of C₁₀-C₁₈ with not less than 50 percent C₁₄-C₁₆)</p>	<p>For use only: 1. As provided in 176.170 of this chapter. 2. At levels not to exceed 2 percent by weight of polyvinyl chloride and/or vinyl chloride copolymers complying with 177.1980 of this chapter. 3. As emulsifiers in vinylidene chloride copolymer or homopolymer coatings at levels not to exceed a total of 2.6 percent by weight of coating solids. The finished polymer contacts food only of the Types I, II, III, IV, V, VIA, VIB, VII, VIII, and IX as identified in</p>

	table 1 of 176.170(c) of this chapter, and limited to conditions of use E, F, and G described in table 2 of 176.170 of this chapter.4. As emulsifiers and/or surface-active agents at levels not to exceed 3.0 percent by weight of polystyrene or rubber-modified polystyrene complying with 177.1640(c) of this chapter under conditions of use B through H described in table 2 of 176.170(c) of this chapter.
[alpha]-Alkyl- <i>omega</i> -hydroxypoly(oxyethylene) produced by condensation of 1 mole of C ₁₁ -C ₁₅ straight-chain randomly substituted secondary alcohols with an average of 7-20 moles of ethylene oxide	
<i>alpha</i> Olefin sulfonate [alkyl group is in the range of C ₁₀ -C ₁₈ with not less than 50 percent C ₁₄ -C ₁₆], ammonium, calcium, magnesium, potassium, and sodium salts	For use only:1. In acrylonitrile-butadiene copolymers identified in 177.2600(c)(4)(i) of this chapter.2. At levels not to exceed 1 percent by weight of acrylic coatings complying with 175.300(b)(3)(xx) of this chapter and having a maximum thickness of 0.051 millimeter (0.002 inch). The finished polymers contact food only of the Types V, VIII, and IX as identified in table 1 of 176.170(c) of this chapter.3. At levels not to exceed 2 percent by weight of vinyl chloride copolymer coatings having a maximum thickness of 0.051 millimeter (0.002 inch) and complying with 175.300(b)(3)(xv) of this chapter. The finished polymers contact food only of the Types V, VIII, and IX as identified in table 1 of 176.170(c) of this chapter.4. As provided in 175.105 of this chapter.
<i>Alpha</i> -sulfo- <i>omega</i> -(dodecyloxy)poly(oxyethylene) ammonium salt (CAS Reg. No. 32612-48-9)	For use only as an emulsifier at levels not to exceed 0.3 percent by weight of styrene-butadiene copolymer coatings for paper and paperboard complying with 176.170 of this chapter.
Ammonium salt of epoxidized oleic acid, produced	For use only:1. As a polymerization

<p>from epoxidized oleic acid (predominantly dihydroxystearic and acetoxhydroxystearic acids) meeting the following specifications: Acid number 160-180, saponification number 210-235, iodine number 2-15, and epoxy groups 0-0.4 percent</p>	<p>emulsifier at levels not to exceed 1.5 pct by weight of vinyl chloride polymers used as components of nonfood articles complying with 175.105, 175.300, 176.170, 176.180, and 177.1210 of this chapter. Such vinyl chloride polymers are limited to polyvinyl chloride and/or vinyl chloride copolymers complying with 177.1980 of this chapter.2. As a polymerization emulsifier at levels not to exceed 1.5 pct by weight of vinyl chloride-vinyl acetate copolymers used as components of nonfood articles complying with 175.105, 175.300, 176.170, 176.180, and 177.1210 of this chapter.</p>
<p>Butanedioic acid, sulfo-1,4-di-(C₉-C₁₁alkyl) ester, ammonium salt (also known as butanedioic acid, sulfo-1,4-diisodecyl ester, ammonium salt [CAS Reg. No. 144093-88-9]).</p>	<p>For use as a surface active agent as provided in 175.105, 175.125, 176.170, and 176.180 of this chapter.</p>
<p>[alpha]-Di-<i>sec</i>-butylphenyl-<i>omega</i>-hydroxypoly(oxyethylene) produced by the condensation of 1 mole of di-<i>sec</i>-butylphenol with an average of 4-14 or 30-50 moles of ethylene oxide; if a blend of products is used, the average number of moles of ethylene oxide reacted to produce any product that is a component of the blend shall be in the range 4-14 or 30-50;<i>sec</i>-butyl groups are predominantly (90 percent or more)<i>o</i>-, <i>p</i>-substituents</p>	
<p>Disodium 4-isodecyl sulfosuccinate (CAS Reg. No. 37294-49-8)</p>	<p>For use only as an emulsifier at levels not to exceed 5 percent by weight of polymers intended for use in coatings.</p>
<p>[alpha]-Dodecyl-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) mixture of dihydrogen phosphate and monohydrogen phosphate esters that have an acid number (to pH 5.2) of 103-111 and that are produced by the esterification of the condensation product of 1 mole of <i>n</i>-dodecyl alcohol with 4-4.5 moles of ethylene oxide</p>	
<p>[alpha]-(<i>p</i>-Dodecylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) produced by the condensation of 1 mole of dodecylphenol (dodecyl group is a propylene tetramer isomer) with an average of 4-14 or 30-50 moles of ethylene oxide; if a blend of products is used,</p>	

<p>the average number of moles of ethylene oxide reacted to produce any product that is a component of the blend shall be in the range 4-14 or 30-50</p>	
<p>Naphthalene sulfonic acid-formaldehyde condensate, sodium salt (CAS Reg. No. 9084-06-4)</p>	<p>For use only:1. At levels not to exceed 10 micrograms/in²(0.16 mg/dm²) in vinylidene chloride copolymer or homopolymer coatings applied to films of propylene polymers complying with 177.1520 of this chapter.2. At levels not to exceed 14 micrograms/in²(0.21 mg/dm²) in vinylidene chloride copolymer or homopolymer coatings applied to films of polyethylene phthalate polymers complying with 177.1630 of this chapter.</p>
<p>[alpha]-(<i>p</i>-nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) mixture of dihydrogen phosphate and monohydrogen phosphate esters that have an acid number (to pH 5.2) of 49-59 and that are produced by the esterification of <i>alpha</i>-(<i>p</i>-nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) complying with the identity prescribed in 178.3400(c) and having an average poly(oxyethylene) content of 5.5-6.5 moles</p>	
<p>[alpha]-(<i>p</i>-Nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) mixture of dihydrogen phosphate and monohydrogen phosphate esters that have an acid number (to pH 5.2) of 62-72 and that are produced by the esterification of <i>alpha</i>-(<i>p</i>-nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) complying with the identity prescribed in 178.3400(c) and having an average poly(oxyethylene) content of 9-10 moles</p>	
<p>[alpha]-(<i>p</i>-Nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) mixture of dihydrogen phosphate and monohydrogen phosphate esters that have an acid number (to pH 5.2) of 98-110 and that are produced by the esterification of [alpha]-(<i>p</i>-nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) complying with the identity prescribed in 178.3400(c) and having an average poly(oxyethylene) content of 45-55 moles</p>	
<p>[alpha]-(<i>p</i>-Nonylphenyl)-<i>omega</i>-hydroxypoly (oxyethylene) produced by the condensation of 1 mole of nonylphenol (nonyl group is a propylene trimer isomer) with an average of 4-14 or 30-50 moles of</p>	

ethylene oxide: if a blend of products is used, the average number of moles of ethylene oxide reacted to produce any product that is a component of the blend shall be in the range 4-14 or 30-50	
[alpha]-(<i>p</i> -Nonylphenyl)- <i>omega</i> -hydroxypoly (oxyethylene) sulfate, ammonium or sodium salt: the nonyl group is a propylene trimer isomer and the poly (oxyethylene) content average 4 moles	
Polyethyleneglycol alkyl(C ₁₀ -C ₁₂)ether sulfosuccinate, disodium salt (CAS Reg. No. 68954-91-6)	For use only at levels not to exceed 5 percent by weight of total monomers used in the emulsion polymerization of polyvinyl acetate, acrylic, and vinyl/acrylic polymers intended for use as coatings for paper and paperboard.
Poly[(methylene- <i>p</i> -nonylphenoxy) poly(oxypropylene)(4-12 moles) propanol] of minimum molecular weight 3500	For use in coatings at levels not to exceed 1 mg per square foot of food-contact surface.
Poly(oxypropylene) (45-48 moles) block polymer with poly(oxyethylene). The finished block polymers meet the following specifications: Average molecular weight 11,000-18,000; hydroxyl number 6.2-10.2; cloud point above 100 deg. C. for 10 pct solution	For use only as a surface-active agent at levels not to exceed 0.5 percent by weight of polyolefin film or polyolefin coatings. Such polyolefin film and polyolefin coatings shall have an average thickness not to exceed 0.005 inch and shall be limited to use in contact with foods that have a pH above 5.0 and that contain no more than 8 pct of alcohol.
Polysorbate 20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate) meeting the following specifications: Saponification number 40-50, acid number 0-2, hydroxyl number 60-108, oxyethylene content 70-74 pct	
Polysorbate 40 (polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate) meeting the following specifications: Saponification number 41-52, oxyethylene content 66-70.5 pct	
Polysorbate 60 conforming to the identity prescribed in 172.836 of this chapter	
Polysorbate 65 conforming to the identity prescribed in 172.838 of this chapter	
Polysorbate 80 conforming to the identity prescribed in 172.840 of this chapter	

Polysorbate 85 (polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate) meeting the following specifications: Saponification number 80-95, oxyethylene content 46-50 percent	
Sodium 1,4-dicyclohexyl sulfosuccinate	
Sodium 1,4-dihexyl sulfosuccinate	
Sodium 1,4 diisobutyl sulfosuccinate	
Sodium dioctyl sulfosuccinate	
Sodium 1,4-dipentyl sulfosuccinate	
Sodium 1,4-ditridecyl sulfosuccinate	
Sodium lauryl sulfate	
Sodium monoalkylphenoxybenzenedisulfonate and sodium dialkylphenoxybenzenedisulfonate mixtures containing not less than 70 pct of the monoalkylated product where the alkyl group is C ₈ C ₁₆	
Sorbitan monolaurate meeting the following specifications. Saponification number 153-170; and hydroxyl number 330-360	
Sorbitan monooleate meeting the following specifications: Saponification number 145-160, hydroxyl number 193-210	
Sorbitan monopalmitate meeting the following specifications: Saponification No. 140-150; and hydroxyl No. 275-305	
Sorbitan monostearate conforming to the identity prescribed in 172.842 of this chapter	
Sorbitan trioleate meeting the following specifications: Saponification No. 170-190; and hydroxyl No. 55-70	
Sorbitan tristearate meeting the following specifications: Saponification No. 176-188; and hydroxyl No. 66-80	
Sulfosuccinic acid 4-ester with polyethylene glycol dodecyl ether, disodium salt (CAS Reg. No. 39354-45-5)	For use only at levels not to exceed 5 percent by weight of total monomers used in the emulsion polymerization of polyvinyl acetate, acrylic, and vinyl/acrylic polymers intended for use as coatings for paper and paperboard.
Sulfosuccinic acid 4-ester with polyethylene glycol nonylphenyl ether, disodium salt (alcohol moiety produced by condensation of 1 mole nonylphenol and an average of 9-10 moles of ethylene oxide) (CAS Reg.	For use only at levels not to exceed 5 percent by weight of the total coating monomers used in the emulsion polymerization of polyvinyl acetate

No. 9040-38-4)	and vinyl-acrylate copolymers intended for use as coatings for paper and paperboard.
[alpha]-[em>p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl]omega-hydroxypoly(oxyethylene) produced by the condensation of 1 mole of p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenol with an average of 4-14 or 30-40 moles of ethylene oxide; if a blend of products is used, the average number of moles of ethylene oxide reacted to produce any product that is a component of the blend shall be in the range 4-14 or 30-50	
TetrasodiumN-(1,2-dicarboxyethyl)-N-octadecyl-sulfosuccinate	For use only as a polymerization emulsifier for resins applied to tea-bag material.
[alpha]-Tridecyl-omega-hydroxypoly (oxyethylene) mixture of dihydrogen phosphate and monohydrogen phosphate esters that have an acid number (to pH 5.2) of 75-85 and that are produced by the esterification of the condensation product of one mole of "oxo" process tridecyl alcohol with 5.5-6.5 moles of ethylene oxide	
[alpha]-Tridecyl-omega-hydroxypoly (oxyethyl-ene) mixture of dihydrogen phosphate and monohydrogen phosphate esters that have an acid number (to pH 5.2) of 58-70 and that are produced by the esterification of the condensation product of one mole of "oxo" process tridecyl alcohol with 9-10 moles of ethylene oxide	

(d) The provisions of this section are not applicable to emulsifiers and/or surface-active agents listed in 175.105(c) (5) of this chapter and used in food-packaging adhesives complying with 175.105 of this chapter.

,

[42 FR 14609, Mar. 15, 1977]

Editorial Note:

For Federal Register citations affecting 178.3400, see the List of CFR Sections Affected, which appears in the Finding Aids section of the printed volume and at www.fdsys.gov.

11.3 ANEXO C.- Prueba de CMI

MÉTODOS DE PRUEBA

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

- **Fundamento**

Un agente microbiano inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba.

- **Objetivo**

Determinar el número de organismos viables en el inóculo para asegurar que el número correcto de organismos sea inoculado en cada fuente e identificar los problemas que podrían ocurrir si las variables de la prueba no son controladas adecuadamente.

- **Material necesario**

- Panel de micro dilución (Placa de poliestireno de aproximadamente 96 celdillas).
- Viales de colorímetro de 10 ml
- Colorímetro
- Puntillas para micro-pipeta estériles.
- Micro-pipeta Eppendorf.
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensayo de 18 x 150 ml
- Cajas Petri
- Matraz ErlenMeyer
- Vórtice
- Mechero Bunsen
- Manguera para Mechero

- **Medios y/o muestra a utilizar**

- Caldo Mueller Hinton
- Solución Salina
- Cepa de microorganismo
- Muestra a analizar
- Buffer de Fosfatos

- **Procedimiento**

1. Preparar y esterilizar los medios a utilizar, así como, el material necesario.

Preparación del inóculo

1. Colocar 10 ml de la solución salina esterilizada previamente en un vial de colorímetro correspondiente para cada uno de los microorganismos a utilizar.
2. Calibrar el colorímetro.
3. Tomar una muestra del microorganismo (contenido en placa) con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada previamente a la flama e inocularla en el vial con solución salina correspondiente.

Nota:

- **En caso de no contar con colonias propiamente de placa, se puede utilizar una cepa cultivada en caldo.**

4. Determinar la concentración contenida en el vial con ayuda del colorímetro.

Nota:

- **Ajustar la concentración dentro de la escala 0.08-0.1 en absorbancia a una longitud de onda de 620 nm, o que representa 0.5 Mc Farland equivalentes a 1.5×10^8 UFC/ml**

5. Homogenizar la mezcla.

6. Tomar 10 μ L de la suspensión y colocarlos en 9.99 ml de Buffer de Fosfatos estéril previamente ajustado a un pH de 7.3.

7. Se colocan 100 μ L de la solución con antibiótico en la línea correspondiente como pozo #1.

Nota:

- **Control negativo**

8. Colocar 50 μ L de Caldo Miller Hilton estéril y activo en el rango de líneas correspondientes a los pozos #2 al 12.

9. Con ayuda de una pipeta multicanal, tomar 50 μ L de la solución con antibiótico localizada en el pozo #1 y colocarlos en el pozo #2 realizando homogeneización por pipeteo.

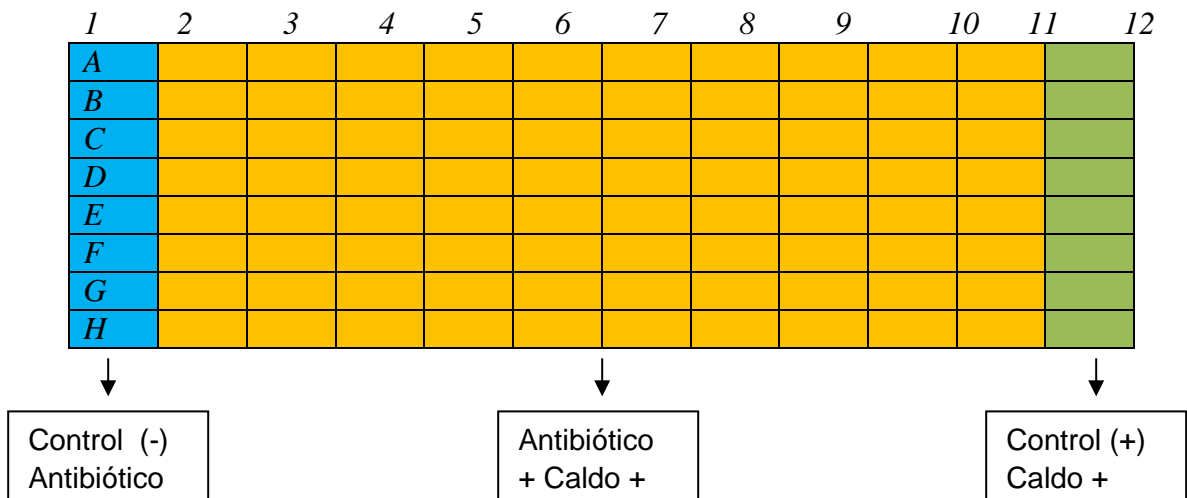
Nota:

- **Así sucesivamente hasta llegar al pozo# 11.**

10. Al homogenizar la suspensión en el pozo 11 se procede a desechar 50 μ l, dejando el ultimo pozo sin presencia de antibiótico (**control positivo**).

11. Se procede con la inoculación, agregando 50 μ l de la suspensión buffer inoculada en todos los pozos.

12. La placa se incuba 18 hrs a 37°C, 90% humedad relativa.



- **Interpretación de resultados**

Se hace una revisión a partir del control positivo con la finalidad de buscar el pozo en el que deje de presentarse crecimiento bacteriano, identificado por un depósito blanquecino en forma de botón (aprox. 2mm de diámetro) o bien una turbidez alta de la suspensión. El primer pozo que no presente evidencia de este crecimiento se considera como el punto de CMI, se reporta su concentración como tal.

- **Precauciones**

Para prevenir que los paneles se deshidraten durante la incubación, tome una de las siguientes medidas:

- ❖ Ponga un sello plástico sobre la placa.
- ❖ Ponga la placa en una funda plástica.
- ❖ Ponga la placa en otro tipo de recipiente.
- ❖ Ponga una tapa plástica o una placa de microdilución vacía encima de la placa.

Incubar las placas que contienen bacterias no fastidiosas en aire ambiental a 35°C por 16-20 horas; **no apile más de cuatro placas.**

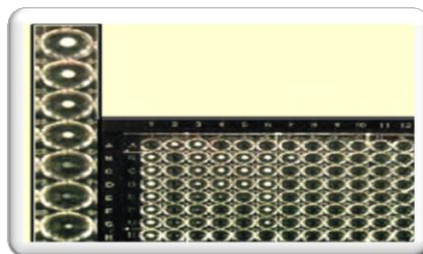
¿Cómo Leer las Placas de CIM?

1. Revise el crecimiento en la celdilla de control positivo. Se debe encontrar turbidez o un punto de crecimiento > 2 mm lo cual indica crecimiento adecuado en el panel de CIM.
2. Revise el pozo de control negativo. Esta debe estar claro, sin turbidez.
3. Lea el punto final CIM como la concentración más baja del agente antimicrobiano que *inhibe completamente* el crecimiento del organismo detectado por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico.

Algunos agentes, particularmente los agentes bacteriostáticos, pueden demostrar una muy ligera opacidad o pequeños puntos de crecimiento (< 2 mm) en varias celdillas sucesivas. A esto se conoce como “arrastre.” Generalmente, este crecimiento incipiente puede ser ignorado a menos que ocurra con lo siguiente:

- Oxacilina o vancomicina cuando se estén analizando estafilococos
- Vancomicina cuando se estén analizando enterococos

CIM con



Control de las variables de la prueba

Las siguientes variables DEBEN ser controladas en la realización de la prueba de microdilución en caldo de CIM:

- Concentración del inóculo
- Determinación del punto final
- Atmósfera de incubación
- Temperatura de incubación.
- Tiempo de incubación
- Composición del medio
- pH del medio

11.4 ANEXO D.- Siembra de Cajas

TÉCNICAS DE SIEMBRA PARA HONGOS Y BACTERIAS

Siembra en cajas de Petri por la técnica de agotamiento, aislamiento o estría cruzada.

Es un buen método para el aislamiento de colonias, mediante esta técnica buscamos obtener colonias separadas a partir de un inóculo.

Procedimiento

1. Homogenizar la muestra.
2. Se toma la caja de petri en la palma de la mano y ligeramente inclinada, mientras que con la mano contraria se manipula el asa bacteriológica previamente esterilizada por flameado directo a la llama.
3. El asa debe ser nuevamente flameada y enfriada en un lateral del agar, después se toma una asada y a continuación se realiza una estría partiendo de la primera y arrastrando los microorganismos presentes en ella hacia el extremo contrario de la superficie del agar.
4. Repetir la estría recordando flamear y enfriar el asa cada vez que culmine una estría y solo tocar el con el asa la estría anterior.
5. Esterilizar el asa antes de descartarla.

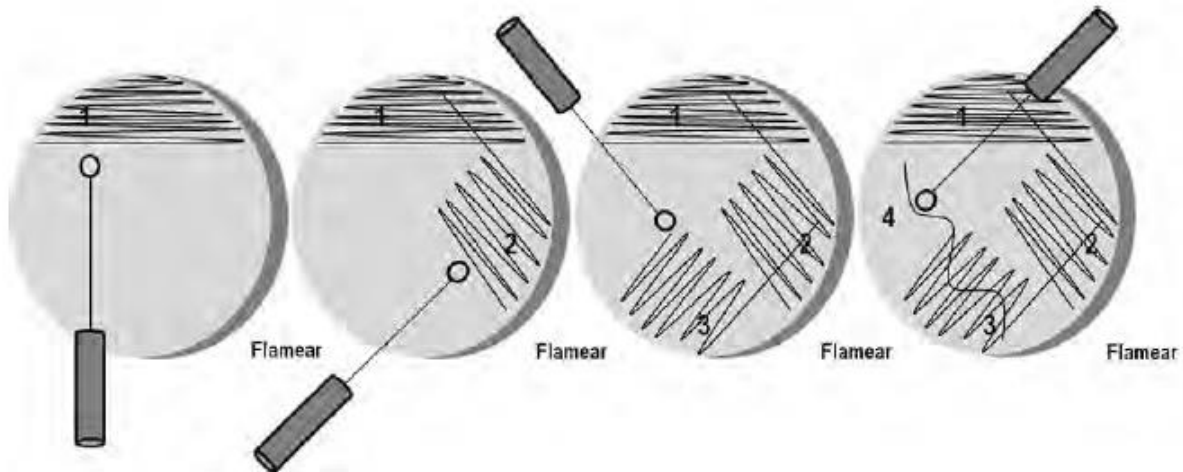


Fig. 1. Pasos para la siembra de bacterias por la técnica de agotamiento (y otros microorganismos emulsionables como las levaduras) (Fuente: Rojas, A.).

11.5 ANEXO E.- Tinciones simples

Tinciones simples y compuestas para bacterias

- **Objetivo**

Los estudiantes desarrollarán las metodologías simples y compuestas aplicadas a las bacterias, reconociendo la funcionalidad y la finalidad de cada una de ellas.

- **Introducción**

Tinciones Diferenciales		Tinciones simples
Emplea dos colorantes: uno de tinción y otro de contraste.		Utiliza un solo colorante.
Separación en grupos	Visualización de estructuras	Para visualización de:
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tinción de Gram ➤ Tinción de ácido-resistente 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tinción de flagelos ➤ Tinción de esporas ➤ Tinción de cápsula ➤ Tinción de gránulos 	Morfología microscópica y arreglos o agrupaciones.

Preparación del frotis bacteriano para tinciones simples o complejas

1. Limpie las láminas con agua, jabón y papel y posteriormente desengrase con alcohol, dejándolo evaporar.

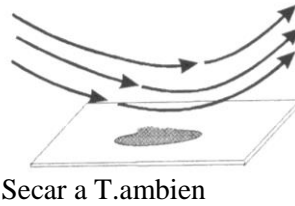
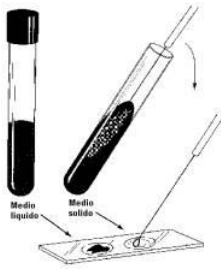
Nota:

- Este paso es esencial ya que la grasa de los dedos no permiten una buena elaboración del frotis e interfieren en la tinción, así como, en la observación.

- Identifique cada lámina con el número o nombre de la muestra
- Extender la muestra sobre la lámina con el asa bacteriológica.

Nota:

- Si es una muestra proveniente de caldo, tomar con el asa dos gotas y extenderlas directamente sobre portaobjetos (lámina).
 - Si es una muestra sólida, colocar previamente una gota de agua estéril o desionizada sobre el portaobjetos y después extender la muestra.
- Dejar que se seque sin flamear
 - Fijar al calor la preparación para evitar la elusión del frotis durante el proceso de tinción. Esto se realiza, pasando el extendido seco dos o tres veces sobre la llama del mechero Bunsen.

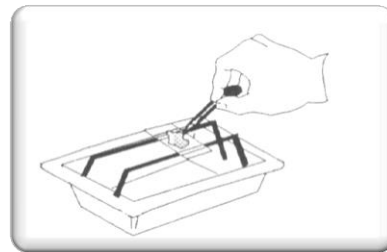


Tinción simple

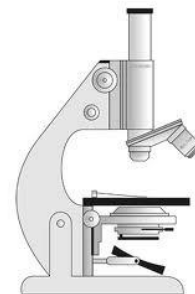
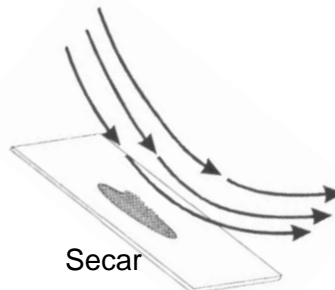
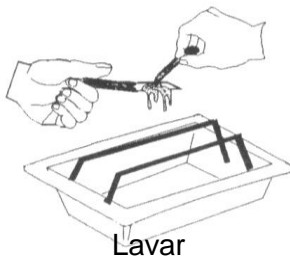
- Una vez preparado el frotis, colocar el portaobjetos sobre las varillas del equipo de tinción.

- Vierta sobre el frotis el colorante.

Colorante	Tiempo
Cristal Violeta	30 – 60 seg
Azul de metileno	1- 2 min
Carbol-fuscina	15-30 seg



- Pasado el tiempo de tinción lavar cuidadosamente la lámina con agua desionizada para retirar el exceso de colorante.
- Deje secar a temperatura ambiente la lámina en posición inclinada.
- Lleve la preparación al microscopio y observe.

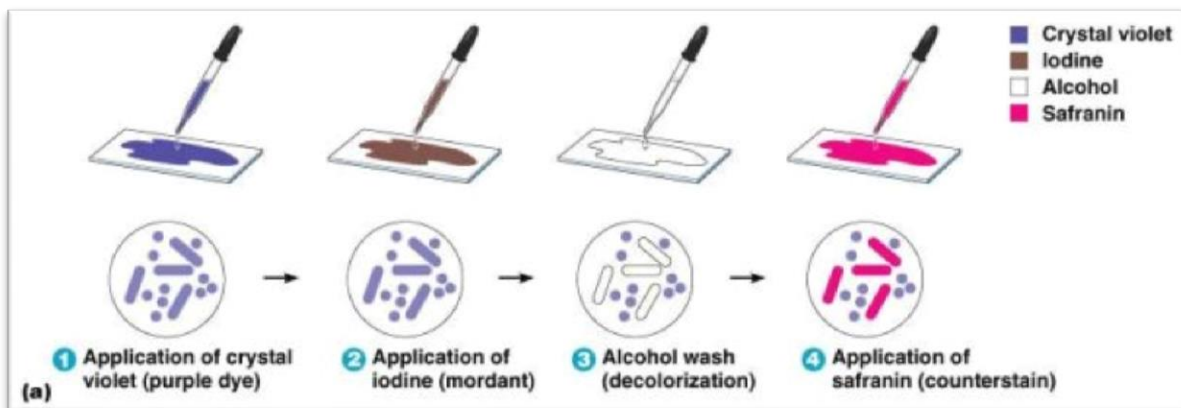


Tinciones Compuestas

Procedimiento para Tinción Gram

- 1- Preparar el frotis de la muestra con la técnica mencionada anteriormente.
- 2- Vierta el colorante **Cristal Violeta** sobre el portaobjetos y déjelo actuar por 1 min.
- 3- Lave con agua desionizada cuidadosamente y retire el exceso.
- 4- Cubra ahora el portaobjetos con **Lugol (Iodo de Gram)** y déjelo actuar por 1 minuto.
- 5- Lave con agua desionizada y retire/escurra el exceso.
- 6- Cubra ahora el portaobjetos con solución decolorante (**Alcohol etílico**) y deje actuar por 30 segundos.
- 7- Lavar con agua desionizada y escurrir el exceso.
- 8- Vierta colorante **Safranina** sobre el portaobjetos, cubra y deje actuar por 30 seg.
- 9- Lavar con agua desionizada el portaobjetos y escurrir el exceso.
- 10- Dejar secar el frotis en posición inclinada a temperatura ambiente.
- 11- Una vez seco, observar al microscopio.

Diagrama de flujo Gram:



Control de variables

- ❖ Lo más crítico del procedimiento es el paso de decoloración, si en este paso no se remueven completamente los complejos CV-I, los organismos Gram negativos aparecerán falsamente como Gram positivos.

- ❖ Preparaciones teñidas con Gram, se realizan con cultivos frescos, es decir hasta 24 horas de cultivo ya que cultivos viejos y especialmente de bacterias Gram positivas, tienden a perder la habilidad para retener el primer colorante apareciendo como “Gram variables”, es decir, algunas púrpura y otras rojas.
- ❖ Un frotis grueso causa decoloración inadecuada.
- ❖ La remoción del frotis durante el secado puede eliminar la muestra de la lámina.
- ❖ El tiempo excesivo de decoloración puede llevar a la observación errónea del color tomado por las bacterias.