



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN QUÍMICA TECNOLÓGICA



**ESTUDIO DE LOS SISTEMAS SURFACTANTE/ACEITE/AGUA EN
DISPERSIONES COLOIDALES CON CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES
PARA ENCAPSULAR COMPUESTOS ACTIVOS PROVENIENTES DE UNA
FUENTE NATURAL CON APLICACIONES COSMÉTICAS**

Autor: Lic. Ruth Desiree Monroy Serrano

Tutor: Dr. Juan Carlos Pereira

*Tesis Doctoral para optar al título
de Doctor en Química Tecnológica*



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN QUÍMICA TECNOLÓGICA



**ESTUDIO DE LOS SISTEMAS SURFACTANTE/ACEITE/AGUA EN
DISPERSIONES COLOIDALES CON CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES
PARA ENCAPSULAR COMPUESTOS ACTIVOS PROVENIENTES DE UNA
FUENTE NATURAL CON APLICACIONES COSMÉTICAS**

Autor: Lic. Ruth Desiree Monroy Serrano

Tutor: Dr. Juan Carlos Pereira

Valencia, agosto 2021

Dr. Juan Carlos Pereira

Profesor Titular del Departamento de Química
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Universidad de Carabobo

Certifica:

Que la ciudadana Lic. Ruth Desiree Monroy Serrano, ha desarrollado bajo mi dirección, el trabajo que lleva por título: ESTUDIO DE LOS SISTEMAS SURFACTANTE/ACEITE/AGUA EN DISPERSIONES COLOIDALES CON CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES PARA ENCAPSULAR COMPUESTOS ACTIVOS PROVENIENTES DE UNA FUENTE NATURAL CON APLICACIONES COSMÉTICAS, expuesto en la presente memoria, para optar al Título de Doctor en Química Tecnológica. Línea de Investigación: Fenómenos Interfaciales, y considero que dicha tesis reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

Juan Carlos Pereira

En la ciudad de Valencia, a los 10 días del mes de agosto de 2021.



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, para examinar la TESIS DOCTORAL presentada por la Lic. RUTH DESIREE MONROY SERRANO, CI: 13.492.295 bajo el título "ESTUDIO DE LOS SISTEMAS SURFACTANTES/ACEITE/AGUA EN DISPERSIONES COLOIDALES CON CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES PARA ENCAPSULAR COMPUESTOS ACTIVOS PROVENIENTES DE UNA FUENTE NATURAL CON APLICACIONES COSMÉTICAS", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de DOCTOR EN QUÍMICA TECNOLÓGICA, dejan constancia de lo siguiente:

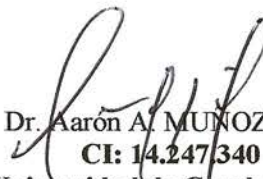
- 1.- Leído, este trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 21 de octubre del 2021 a las 11:00 a.m., para que la autora defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el segundo piso del Edificio del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo, en el Campus Bárbula de Valencia, mediante un resumen oral de su contenido en las modalidades presencial y online, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo.
- 2.- Considerando la contribución en la caracterización y determinación de propiedades de los polifenoles provenientes del cacao venezolano, específicamente del Estado Carabobo. El trabajo realiza aportes en la (-)-epicatequina con miras a ser incorporado en un producto con aplicaciones cosméticas.
- 3.-El trabajo muestra la existencia de la fase hexagonal reversa, como un cristal líquido que forma el Trioleato de sorbitano con 20 moles de polioxietileno (Tween 85), y desde el conocimiento del autor es la primera vez que se reporta en la literatura abierta.
- 4.-Considerando que el trabajo reporta la formación de nanoemulsiones con tamaños de gotas menores que 100 nm, empleando un método de baja energía de esta manera APLICANDO la energía química contenida en los sistemas surfactantes/aceite/agua estudiados.
- 5.- Finalizada la defensa doctoral, el jurado decidió APROBAR el trabajo, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que la información generada contribuye de manera relevante a sentar las bases para estudio de los sistemas

surfactantes/aceite/agua en dispersiones coloidales con características biocompatibles para aplicaciones cosméticas.

En fe de lo cual se levanta el ACTA, a los veintiún días de octubre del año 2021, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo. Actuó como Tutor y Coordinador del jurado Dr. Juan Carlos Pereira Antique.



Dr. Freddy OCANTO
CI: 5.580.398
Universidad de Carabobo



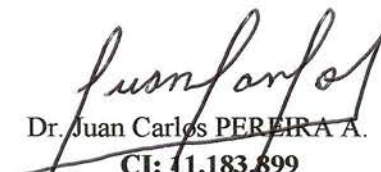
Dr. Aaron A. MUNOZ Morales
CI: 14.247.340
Universidad de Carabobo



Dra. María RODRÍGUEZ
CI: 6.970.861
Universidad Central de Venezuela



Dr. José DELGADO
CI: 12.941.738
Escuela de Minas de Colorado



Dr. Juan Carlos PEREIRA A.
CI: 11.183.899
Universidad de Carabobo
Tutor



Dedicatoria

Dedicado a las mujeres de mi historia, María Josefina, María Joaquina, Rosa Margarita. Mujeres grandiosas, que forjaron en mí un pilar de progreso y evolución.

Y en especial a mi madre María Rafaela, quien inspiró el tema de investigación.

Que sirva de estímulo y ejemplo a Aníbal Alejandro y Victoria Denisse en sus proyectos de vida.

Agradecimientos Académicos

*A la **Universidad de Carabobo**, mi alma mater, la institución que me dio mi formación profesional, siendo parte de mi pasado, mi presente y mi futuro.*

*A la **Facultad Experimental de Ciencias Tecnológicas (FACYT)**, por la apertura del Doctorado en Química Tecnológica y por los esfuerzos realizados, para mantenerlo abierto y en funcionamiento en estos tiempos difíciles.*

*A **mi tutor**, Dr. Juan Carlos Pereira por su apoyo incondicional, su paciencia infinita y las largas horas de discusión científica. Además de su disposición y compromiso con esta investigación. Sin él nada de esto hubiese sido posible.*

*Al **Laboratorio PHD** (Barí Agüero, Luz Rattia, Víctor Pérez, Iván Villanueva, María Eugenia González, Miguel Campos, Verónica Martínez, Lesbia Martínez, Juan Carlos Pereira Jr., Iris Silva, Maidely Santeliz, Douglas Ramos, Yusmary Reyes, Abraham Ascanio). Quiero hacer un agradecimiento especial al personal que conforma el equipo PHD, personas incansables, trabajadoras, luchadoras y de un ánimo incomparable. Mi más profundo agradecimiento a quienes hacen posible que este laboratorio mantenga sus puertas abiertas.*

*Al **Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC)**, por recibirme y permitirme realizar la caracterización de los sistemas ternarios en sus instalaciones. A la Lic. Graciela Nicita por su apoyo y con especial cariño a José Ostos y Vanessa Mignini, quienes dedicaron horas y meses de trabajo, ayudándome a conseguir las mejores imágenes de los cristales líquidos.*

*Al **Dr. Aarón Muñoz**, quien desde el CIMBUC me brindó un inconmensurable apoyo durante el desarrollo de mi investigación.*

*Al **Dr. Jimmy Castillo**, por apoyarme en realizar las mediciones de distribución de diámetro de partícula, en el Laboratorio de Espectroscopia Láser, de la Escuela de Química en la facultad de Ciencias de la UCV.*

Al Lic. Juan José Velázquez, del Laboratorio de Servicios Analíticos de Empresas Alimentos Polar, Planta Salsas y Untables, por su apoyo en gran parte de la caracterización de las muestras de cacao.

Al Dr. Sócrates Acevedo, por ser una fuente de inspiración en el ámbito académico y científico. Por las enriquecedoras discusiones en el área de fenómenos interfaciales.

Al Dr. Jean Louis Salager, por su labor educativa en el mundo de los surfactantes, que ha inspirado a varias generaciones de profesionales, siendo generador de conocimiento en el área de fenómenos interfaciales.

Al Dr. Henry Labrador, quien ha inspirado en mí un sincero sentido de respeto y admiración, por su profundo profesionalismo y entrega en su labor como científico y docente.

A la Dra. Ingrid Velázquez, por su apoyo incondicional, su guía y mentoría tanto en mi trabajo de investigación como en mi formación académica y profesional.

A la Dra. Nancy Salinas, por recibirme en el laboratorio de alimentos, brindarme el espacio para realizar parte de la caracterización de las muestras de cacao y elaboración de las nanoemulsiones. Por su apoyo incondicional e interés en el tema de estudio.

Al Dr. Guillermo Centeno, quien logró convertirse en ese amigo capaz de transformar momentos difíciles en sonrisas. Un apoyo sincero. Nunca nos permitimos renunciar.

A la Lic. Nexi Peraza, por su apoyo, constante colaboración y paciencia en estos años como doctorante.

A la Dra. Miryelis Rojas, por su calor humano y amistad desde el inicio del doctorado.

Al Dr. Luis Puerta, por su colaboración en el estudio del comportamiento y configuración espacial de los surfactantes en las interfases W/O.

Al Dr. Pablo Baricelli, por su apoyo desde el centro de investigaciones químicas de la Facultad de Ingeniería, durante el desarrollo de la parte experimental de este trabajo.

A la Prof. María Rodríguez, por las discusiones y aportes en el tema de emulsiones, en los grupos de estudios del equipo SOW.

Al Ing. Wilmer Moreno, Prof. De la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez Núcleo Canoabo, por el apoyo logístico y enlace con la empresa chocolates Canoabo, para obtener las muestras de cacao.

A Chocolates Valle Canoabo en la Hacienda San Cayetano, por facilitarme las muestras de cacao provenientes de Patanemo, Canoabo y Trincheras, en estado fermentados y secados.

Agradecimientos personales

A la vida, que me ha dado tanto...

A mi Hijo, mi compañero de clases y de largas noches de estudios. Agradezco su comprensión.

A mis padres, por su apoyo e incentivo. Mi motivación.

A mi esposo, por su apoyo y respaldo.

A mi amiga Beatriz A. por creer en mí, ser mi conciencia y forzar mi disciplina.

A mi amiga Nuglenis por su apoyo y colaboración con mi hijo.

A mi hermana, por su apoyo estratégico.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron con mi proyecto.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN QUÍMICA TECNOLÓGICA



ESTUDIO DE LOS SISTEMAS SURFACTANTE/ACEITE/AGUA EN DISPERSIONES
COLOIDALES CON CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES PARA ENCAPSULAR
COMPUESTOS ACTIVOS PROVENIENTES DE UNA FUENTE NATURAL CON
APLICACIONES COSMÉTICAS

Autor: Lic. Ruth Desiree Monroy Serrano

Tutor: Dr. Juan Carlos Pereira

Agosto 2021

RESUMEN

En esta investigación se realizó el análisis del comportamiento de fases de los sistemas surfactante/aceite/agua (SOW Surfactant, Oil, Water por sus siglas en inglés), a través de la construcción de dos sistemas ternarios. Este estudio permitió observar los distintos sistemas coloidales (cristales líquidos lamelares y microemulsiones) que forma el surfactante Tween 85 en combinación con agua, aceite mineral y los alcoholes que actúan como cosurfactantes (sec-butanol/pentanol en el ternario 1 y etanol/propilenglicol en el ternario 2). La caracterización de las estructuras, se realizó empleando la microscopia óptica de luz polarizada. A través de ella se observó la presencia de cristales líquidos lamelares en coexistencia con la fase microemulsión, en pocos sistemas presencia de cristales líquidos hexagonales reversos y en otros casos (a muy altas concentración de surfactante) microemulsiones bicontinuas.

A partir de algunos sistemas seleccionados provenientes de ambos sistemas, se elaboraron nanoemulsiones O/W (aceite en agua por sus siglas en inglés) empleando el método de dilución de microemulsiones/cristales líquidos. A través de la caracterización por dispersión dinámica de luz, se determinó que las nanoemulsiones O/W presentaron una distribución de tamaño de gota entre 11 y 71 nm, mostrando una estabilidad en la mayoría de los casos, superior a los 12 meses.

Se analizó muestras de cacao proveniente de distintas zonas cacaotera en el estado Carabobo (Trincheras, Canoabo y Patanemo), para incorporar los polifenoles extraídos, en una formulación con potencial para aplicación cosmética. Fue seleccionado el cacao Canoabo, el cual fue caracterizado por HPLC, determinando que su contenido de (-)-epicatequina fue de $1.434,4 \pm 0,6$ mg EC/kg en el extracto de polifenoles y a través del análisis por UV visible, se determinó que el contenido de flavonoides resultó de $7.792,2 \pm 0,3$ mg EC/ L. Representando la (-)-epicatequina el 18 % del contenido del total de los flavonoides. Adicionalmente se evidenció que los polifenoles pueden comportarse como anfífilos, debido a que generaron la disminución de tensión superficial del agua en 17,3 unidades de tensión, en relación a una solución acuosa al 1 % v/v de extracto polifenólico. Se realizaron nanoemulsiones O/W/polifenoles, en las cuales se incorporó un extracto de polifenoles de cacao seleccionado. Estas nanoemulsiones presentaron una distribución de tamaño de gota entre 22 y 108 nm, presentando una estabilidad en la mayoría de los casos, superior a los 6 meses.

De estos estudios se obtuvo un producto que puede ser empleado como base cosmética tipo suero. Esta formulación, fase externa agua y elaborada con pocos ingredientes, reduciría la posibilidad de reacciones o rechazo de la piel, además de incompatibilidad con otros ingredientes. Contiene un porcentaje de extracto de cacao de 0,78 % en la formulación, los cuales al ubicarse en la interfase tienen una mayor disponibilidad como ingrediente activo. Adicionalmente, presentó una distribución de tamaño de gota de 25 nm, lo cual aunado a las características mencionadas, lo convierte en un producto base cosmético para realizar el pasaje transdérmico.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN QUÍMICA TECNOLÓGICA



STUDY OF SURFACTANT / OIL / WATER SYSTEMS IN COLLOIDAL
DISPERSIONS WITH BIOCOMPATIBLE CHARACTERISTICS TO
ENCAPSULATE ACTIVE COMPOUNDS FROM A NATURAL SOURCE WITH
COSMETIC APPLICATIONS

Autor: Lic. Ruth Desiree Monroy Serrano

Tutor: Dr. Juan Carlos Pereira

August 2021

ABSTRACT

In this research, the analysis of the phase behavior of the surfactant / oil / water systems (SOW) was carried out, through the construction of two ternary systems. This study allowed us to observe the different colloidal systems (lamellar liquid crystals and microemulsions) formed by the surfactant Tween 85 in combination with water, mineral oil and the alcohols that act as cosurfactants (sec-butanol / pentanol in ternary 1 and ethanol / propylene glycol in ternary 2). The characterization of the structures was carried out using polarized light optical microscopy. Through it, the presence of lamellar liquid crystals in coexistence with the microemulsion phase was observed, in few systems the presence of reversed hexagonal liquid crystals and in other cases (at a very high concentration of surfactant) bicontinuous microemulsions.

From some selected systems from both ternaries, O / W (oil in water) nanoemulsions were made through the microemulsions / liquid crystals dilution method. Through the

characterization by dynamic light scattering, it was determined that the O / W nanoemulsions presented a drop size distribution between 11 and 71 nm, showing a stability in most cases, higher than 12 months.

Cacao samples from different cocoa areas in Carabobo state (Trincheras, Canoabo and Patanemo) were analyzed to incorporate the extracted polyphenols into a formulation with potential for cosmetic application. Canoabo cocoa was selected, which was characterized by HPLC, determining that it's content of (-) - epicatechin is $1.434,4 \pm 0,6$ mg EC/ kg in the polyphenol extract and through UV visible analysis, it was determined that the content of flavonoids was $7.792,2 \pm 0,3$ mg EC/ L. Representing the (-) - epicatechin 18% of the content of the total flavonoids. In addition, it was evidenced that polyphenols can behave as amphiphiles, due to the fact that they generated a decrease in water surface tension by 17.3 tension units, in relation to a 1% v / v aqueous solution of polyphenolic extract.

O / W / polyphenol nanoemulsions were made, in which a selected cocoa polyphenol extract was incorporated. These nanoemulsions had a drop size distribution between 22 and 108 nm, presenting stability in most cases, greater than 6 months.

From these studies, a product was obtained that can be used as a serum-type cosmetic base. This formulation of external phase water, made with few ingredients, which would reduce the possibility of possible reactions or rejection of the skin, in addition to incompatibility with other ingredients. It presented a percentage of cocoa extract of 0.78% in the formulation, which when located in the interface have a greater availability as an active ingredient. Additionally, it had a drop size distribution of 25 nm, which, together with the mentioned characteristics, makes it an ideal cosmetic base product to carry out the transdermal passage.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
FORMULACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	1
OBJETIVOS	5
CAPITULO I. POLIFENOLES EN CACAO.	8
1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	17
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
1.4. CONCLUSIONES	36
1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO II. SISTEMAS TERNARIOS, MICROEMULSIONES Y CRISTALES LÍQUIDOS	43
2.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	44
2.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	70
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
2.4. CONCLUSIONES	136
2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	137
CAPÍTULO III. NANOEMULSIONES	146
3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	147
3.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	164

3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	168
3.4.	CONCLUSIONES	191
3.5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	193
	APENDICE	201

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS .	9
FIGURA 1.2. ESTRUCTURA QUÍMICA BÁSICA Y PATRÓN DE NUMERACIÓN DE LOS FLAVONOIDES	10
FIGURA 1.3. ESTRUCTURA DE LA (+)-CATEQUINA Y (-)-EPICATEQUINA	12
FIGURA 1.4. ESTRUCTURA DE A: 3-O-GALATO DE (-)-EPICATEQUINA (ECG), B: (-)-EPIGALOCATEQUINA (EGC), C: 3-O-GALATO DE (-) - EPIGALOCATEQUINA (EGCG), D: 3-O-GALATO DE (+) - GALOCATEQUINA (GCG).	13
FIGURA 1.5. ESTRUCTURA GENERAL DEL CATIÓN FLAVILIO (AH ⁺) Y NUMERACIÓN DE ÁTOMOS. R PUEDE REPRESENTAR AZÚCARES H, OH, OCH ₃ , -HEXOSA O PENTOSA. TAMBIÉN SE INFORMA LA ESTRUCTURA DE LAS SEIS ANTOCIANIDINAS MÁS COMUNES. LAS LÍNEAS DISCONTINUAS VERDES MUESTRAN LOS PRINCIPALES FRAGMENTOS DE ANCLAJE / COORDINACIÓN.	14
FIGURA 1.6. ESTRUCTURA PROPUESTA PARA LAS PROANTOCIANIDINAS TIPO B Y C	16
FIGURA 1.7. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS CON METANOL DE LOS GRANOS FERMENTADOS Y SECOS DE CACAO EN EQUIPOS SOXHLET.	19
FIGURA 1.8. EXTRACTO METANÓLICO DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE CACAO	20
FIGURA 1.9. EXTRACTO METANÓLICO DE LA MUESTRA DE CACAO CANOABO.	21
FIGURA 1.10. CROMATOGRAMAS DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE CACAO. P2 ES EL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS MUESTRAS DE CACAO PROVENIENTES DE PATANEMO, T2 ES EL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LAS MUESTRAS DE CACAO PROVENIENTES DE TRINCHERAS Y C2	

PROVENIENTE DE CANOABO Y EL BLANCO (DISOLUCIÓN PATRÓN DE (-)-EPICATEQUINA A 100 PPM).....	24
FIGURA 1.11. CROMATOGRAMAS DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES DEL CACAO PROVENIENTE DE CANOABO Y EL BLANCO (DISOLUCIÓN PATRÓN DE (-)-EPICATEQUINA A 100 PPM).	27
FIGURA 1.12. ESPECTRO FTIR DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES DEL CACAO PROVENIENTE DE CANOABO.....	30
FIGURA 1.13. ESPECTRO UV- VISIBLE DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE LOS GRANOS DE CACAO CANOABO.....	33
FIGURA 1.14. FORMACIÓN DE COMPLEJO FLAVONOIDE-AL EN SOLUCIÓN METANÓLICA DE CLORURO DE ALUMINIO.....	34
FIGURA 2.1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA MOLÉCULA DE SURFACTANTE, LA CUAL CONSTA DE UNA PARTE HIDROFÓBICA Y UNA HIDROFÍLICA.....	44
FIGURA 2.2. ALGUNAS DE LAS ESTRUCTURAS FORMADAS POR AUTOENSAMBLAJE DE SURFACTANTES O MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS. A) MICELAS ESFÉRICAS, B) FASE LAMELAR, C) MICELAS CILÍNDRICAS, D) MICELAS REVERSAS, E) ESTRUCTURAS BICONTINUAS, F) VESÍCULAS	46
FIGURA 2.3. CLASIFICACIÓN DE ALGUNOS SISTEMAS ANFIFÍLICOS HOMOGÉNEOS Y HETEROGÉNEOS	47
FIGURA 2.4. ESQUEMA DE LAS ESTRUCTURAS DE AUTOENSAMBLAJE CORRESPONDIENTE A LOS VALORES DE PARÁMETRO CRÍTICO DE EMPAQUE (CPP)	49

FIGURA 2.5. SPAN 20 (MONOLAURO DE SORBITANO), SPAN 80 (MONOOLEATO DE SORBITANO), TWEEN 80 (MONOOLEATO DE SORBITANO CON 20 MOLES DE POLIOXIETILENO) Y TWEEN 85 (TRIOLEATO DE SORBITANO CON 20 MOLES DE POLIOXIETILENO)	51
FIGURA 2.6. LOS ENFOQUES DE UNO Y DOS PASOS PARA LOS ÉSTERES DE SORBITANO A PARTIR DE SORBITOL Y ÁCIDOS GRASOS	52
FIGURA 2.7. DIAGRAMA DE FASE DEL TRIÁNGULO DE GIBBS EN UN SISTEMA DE SURFACTANTE/ ACEITE/ AGUA A TEMPERATURA CONSTANTE. L ₁ : SOLUCIÓN MICELAR, I ₁ : CRISTAL LÍQUIDO CÚBICO DISCONTINUO, H ₁ : CRISTAL LÍQUIDO HEXAGONAL, V ₁ : CRISTAL LÍQUIDO CÚBICO BICONTINUO, O CÚBICO DISCONTINUO REVERSO, O: FASE ACEITE O FASE DE SOLUCIÓN MOLECULARMENTE DISPERSA EN ACEITE.	53
FIGURA 2.8. TEXTURA ÓPTICA TÍPICA DE CRISTALES LÍQUIDOS POR MICROSCOPIA BAJO LUZ POLARIZADA CRUZADA.....	55
FIGURA 2.9. LAS MESOFASES DE LOS CRISTALES LÍQUIDOS LIOTRÓPICOS: A) FASE CÚBICA BICONTINUA PRIMITIVA. B) FASE CÚBICA BICONTINUA DE DOBLE DIAMANTE. C) FASE CÚBICA BICONTINUA GYROID.....	56
FIGURA 2.10. MICROGRAFÍA ÓPTICA DE LA FASE LAMELAR DE UN SISTEMA TWEEN 85 / AGUA	57
FIGURA 2.11. CRUCES DE EXTINCIÓN DE CRISTALES LÍQUIDOS UNIÁXICOS: A) POSITIVOS Y B) NEGATIVOS.....	59
FIGURA 2.12. (A) TEXTURA MOSAICA. MICROSCOPIA CON POLARIZADORES CRUZADOS CON UNA AMPLIACIÓN DE 150X [31]. (B) LÍNEAS OLEOSAS.....	60
FIGURA 2.13. TEXTURA ÓPTICA DE UNA FASE HEXAGONAL TIPO ABANICO	61

FIGURA 2.14. MODELO ESQUEMATIZADO DE UNA EMULSIÓN O/W, ESTABILIZADA CON LA FASE CRISTAL LÍQUIDO CRISTALINO. MODIFICADO DE SUZUKI 61

FIGURA 2.15. MICROGRAFÍAS MICROEMULSIÓN DEL TIPO GOTAS W / O EN EL SISTEMA H₂O / NaCl – OCTANO–C₁₂E₅ T = 36,3 ° C. (A) A TRAVÉS DE LA TÉCNICA IMÁGENES DIRECTAS DE FRACTURA POR CONGELACIÓN (FFDI), SE OBSERVA LA IMAGEN QUE MUESTRA GOTAS DE AGUA BRILLANTES DE UN DIÁMETRO MEDIO $\langle D \rangle = 44 \pm 13$ NM SOBRE UN FONDO ACEITOSO OSCURO. (B) LA IMAGEN DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE FRACTURA POR CONGELACIÓN (FFEM) RESPALDA EL RESULTADO DE FFDI. EL DIÁMETRO MEDIO DE LAS GOTAS DE AGUA ES $\langle D \rangle = 47 \pm 8$ NM..... 63

FIGURA 2.16. MICROGRAFÍAS (AUMENTO DEL INSTRUMENTO 10 000 x) DE UNA MICROEMULSIÓN BICONTINUA DEL SISTEMA TERNARIO H₂O-N-OCTANO-C₁₂E₅. (A) IMAGEN DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE FRACTURA POR CONGELACIÓN (FFEM POR SUS SIGLAS EN INGLÉS) Y (B) MICROGRAFÍA IMÁGENES DIRECTAS DE FRACTURA POR CONGELACIÓN (FFDI POR SUS SIGLAS EN INGLÉS) 65

FIGURA 2.17. COMPORTAMIENTO DE FASE DEL SISTEMA TW80 O TW85-SP80 Ó SP20/SOLUCIÓN DE NaCl 5%/PARAFINA LÍQUIDA, SURFACTANTE =1%, WOR=1, A 25 °C. DONDE, W: SIMBOLIZA UNA FASE ACUOSA (SOLUCIÓN SALINA). W: SIMBOLIZA UNA FASE OLEOSA (ACEITE). WM: SIMBOLIZA UNA FASE ACUOSA DE TIPO SOLUCIÓN MICELAR O MICROEMULSIÓN. OM: SIMBOLIZA UNA FASE OLEOSA DE TIPO SOLUCIÓN MICELAR O MICROEMULSIÓN. CL: SIMBOLIZA UNA FASE (BIRREFRINGENTE) DE TIPO CRISTAL LÍQUIDO PROBABLEMENTE LAMELAR. M: SIMBOLIZA UNA FASE MICROEMULSIÓN BICONTINUA..... 67

FIGURA 2.18. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS ALCOHOLES EMPLEADOS COMO COSURFACTANTES: ETANOL, PROPILENGLICOL, 2-BUTANOL Y 1- PENTANOL..... 71

FIGURA 2.19. MICROSCOPIO DE POLARIZACIÓN MOTIC BA310 POL TRINOCULAR EMPLEADO PARA CARACTERIZAR LOS SISTEMAS SOW, UBICADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS Y BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO (CIMBUC)..... 71

FIGURA 2.20. COMPORTAMIENTO DE FASES DEL SISTEMA SURFACTANTE (S)/ ACEITE (O)/ AGUA (W) DEL BARRIDO DE FORMULACIÓN HLB, CONFORMADOS POR: S (DIFERENTE PROPORCIÓN DE TWEEN 80, TWEEN 85, SPAN 20 Y SPAN 80 ADICIONAL A UNA MEZCLA DE COSURFACTANTES SEC-BUTANOL/PENTANOL), W (SOLUCIÓN ACUOSA DE NA₂CO₃ 1% M/V) Y O (ACEITE MINERAL). 78

FIGURA 2.21. IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400X) DE MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA. (A) TRIFÁSICO DE HLB 10,5 DE COMPOSICIÓN T85-S20-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NA₂CO₃. (B) TRIFÁSICO DE HLB 11,5 DE COMPOSICIÓN T80-T85-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NA₂CO₃. (C) TRIFÁSICO DE HLB 12,0 DE COMPOSICIÓN T80-T85-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NA₂CO₃..... 80

FIGURA 2.22. IMÁGENES A Y B CORRESPONDEN A LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400X) DE LA MUESTRA EXTRAÍDA DE LA ZONA TRIFÁSICA DE HLB 11,0 DE COMPOSICIÓN T85-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NA₂CO₃ CONSIDERADO COMO LA FORMULACIÓN ÓPTIMA. 81

FIGURA 2.23. COMPORTAMIENTO DE FASE DEL SISTEMA SURFACTANTES (S), TWEEN 80/TW85 O SPAN80 / SPAN20, S. BASE AZÚCAR, SOLUCIÓN DE NA₂CO₃ 1%/ACEITE MINERAL (O)/AGUA (W)/ALCOHOLES. 83

FIGURA 2.24. IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400X) DE MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA. (A) TRIFÁSICO DE HLB 9,5 DE COMPOSICIÓN T85-S20-BASE AZÚCAR-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NA₂CO₃. (B) TRIFÁSICO DE HLB 10,0 DE COMPOSICIÓN T85-S20-BASE AZÚCAR-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NA₂CO₃. (C) TRIFÁSICO DE HLB 11,0 DE COMPOSICIÓN T85-BASE AZÚCAR-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) /

ACEITE / H₂O-NACL. (D) TRIFÁSICO DE HLB 11,5 DE COMPOSICIÓN T80-T85-BASE AZÚCAR-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NACL. 85

FIGURA 2. 25. IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400X) DE LA MUESTRA EXTRAÍDA DE LA ZONA TRIFÁSICA DE HLB 10,5 DE COMPOSICIÓN S20-T85-BASE AZÚCAR-(PENTANOL/SEC-BUTANOL) / ACEITE / H₂O-NACL CONSIDERADO COMO LA FORMULACIÓN ÓPTIMA. 86

FIGURA 2.26. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PUNTOS ESTUDIADOS EN EL TERNARIO DE COMPOSICIÓN AGUA/ACEITE/SURFACTANTE-COSURFACTANTE. CONFORMADO POR AGUA (SOLUCIÓN DE CLORURO DE SODIO) /ACEITE MINERAL/TWEEN 85 – (PENTANOL/SEC-BUTANOL). LOS PUNTOS REPRESENTAN LAS COMPOSICIONES ESTUDIADAS..... 89

FIGURA 2.27. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 1 % SURFACTANTE /99 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN. 90

FIGURA 2.28. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 3 % SURFACTANTE /97 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN. 90

FIGURA 2.29. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 5 % SURFACTANTE /95% AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN. 91

FIGURA 2.30. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 7 % SURFACTANTE /93 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30..... 91

FIGURA 2.31. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 10 % SURFACTANTE /90 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN.	93
FIGURA 2.32. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 20 % SURFACTANTE /80 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN.	93
FIGURA 2.33. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 30 % SURFACTANTE /70 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN.	94
FIGURA 3.34. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 40 % SURFACTANTE /60 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30. EL SÍMBOLO ROJO INDICA LA PRESENCIA DE LA FASE MICROEMULSIÓN.	94
FIGURA 2.35. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 50 % SURFACTANTE /50 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30.....	96
FIGURA 2.36. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 60 % SURFACTANTE /40 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30.....	97
FIGURA 2.37. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 70 % SURFACTANTE /30 % AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30.....	97
FIGURA 2.38. REPRESENTACIÓN DE LAS FASES ENCONTRADAS EN EL DIAGRAMA DE COMPOSICIÓN PSEUDO TERNARIO AGUA/ACEITE/SURFACTANTE-COSURFACTANTE. CUADROS	

ROSADOS: 3 FASES. DIAMANTES VERDES: 2 FASES. TRIÁNGULOS AZULES: 1 FASE. EN ESTE DIAGRAMA SE RESUMEN LAS FASES ESTUDIADAS LUEGO DE 3 MESES DE SU FORMULACIÓN A 26 °C Y PRESIÓN ATMOSFÉRICA..... 99

FIGURA 2.39. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS PUNTOS ESTUDIADOS DE COMPOSICIÓN 10 % FASE SURFACTANTE /90 % (W/O). A) SISTEMA (5) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (14) RELACIÓN W/O 40/70, C) SISTEMA (25) RELACIÓN W/O 45/55, D) SISTEMA (36) RELACIÓN W/O 50/50, E) SISTEMA (47) RELACIÓN W/O 55/45, F) SISTEMA (58) RELACIÓN W/O 60/40, G) SISTEMA (69) RELACIÓN W/O 70/30..... 102

FIGURA 2.40. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 20 % FASE SURFACTANTE /80 % (W/O). A) SISTEMA (6) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (15) RELACIÓN W/O 40/70, C) SISTEMA (26) RELACIÓN W/O 45/55, D) SISTEMA (37) RELACIÓN W/O 50/50, E) SISTEMA (48) RELACIÓN W/O 55/45, F) SISTEMA (59) RELACIÓN W/O 60/40, G) SISTEMA (70) RELACIÓN W/O 70/30..... 105

FIGURA 2.41. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 30 % FASE SURFACTANTE /70 % (W/O). A) SISTEMA (7) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (16) RELACIÓN W/O 40/70, C) SISTEMA (27) RELACIÓN W/O 45/55, D) SISTEMA (38) RELACIÓN W/O 50/50, E) SISTEMA (49) RELACIÓN W/O 55/45, F) SISTEMA (60) RELACIÓN W/O 60/40, G) SISTEMA (71) RELACIÓN W/O 70/30..... 107

FIGURA 2.42. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 40 % FASE

SURFACTANTE /60 % (W/O). A) SISTEMA (8) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (17) RELACIÓN W/O 40/70, C) SISTEMA (28) RELACIÓN W/O 45/55, D) SISTEMA (39) RELACIÓN W/O 50/50, E) SISTEMA (50) RELACIÓN W/O 55/45, F) SISTEMA (61) RELACIÓN W/O 60/40, G) SISTEMA (72) RELACIÓN W/O 70/30..... 109

FIGURA 2.43. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE MICROEMULSIÓN DE TODOS LOS PUNTOS ESTUDIADOS DE COMPOSICIÓN 50%, 60% Y 70% FASE SURFACTANTE, PARA TODAS LAS RELACIONES (W/O). CORRESPONDE A LOS SISTEMAS: 9, 18, 19, 20, 29, 30, 31, 40, 41, 42, 51, 52, 53, 62, 63, 64 Y 73. 111

FIGURA 2.44. REPRESENTACIÓN DE LAS DISTINTAS ASOCIACIONES ANFIFÍLICAS ENCONTRADAS EN EL DIAGRAMA DE COMPOSICIÓN PSEUDO TERNARIO AGUA/ACEITE/SURFACTANTE-COSURFACTANTE. CUADROS CELESTES: FASE LAMELAR. DIAMANTES MORADOS: MICROEMULSIÓN O FASE ISOTRÓPICA. CÍRCULOS AMARILLOS: FASE HEXAGONAL REVERSA (H₂). EN ESTE DIAGRAMA SE RESUMEN LAS FASES ESTUDIADAS LUEGO DE 3 MESES DE SU FORMULACIÓN A 26 °C Y PRESIÓN ATMOSFÉRICA. 112

FIGURA 2.45. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS PUNTOS ESTUDIADOS EN EL TERNARIO DE COMPOSICIÓN AGUA/ACEITE/SURFACTANTE-COSURFACTANTE. CONFORMADO POR AGUA (SOLUCIÓN DE CLORURO DE SODIO) /ACEITE MINERAL/TWEEN 85 – (ETANOL/PROPILENGLICOL). LOS PUNTOS REPRESENTAN LAS COMPOSICIONES ESTUDIADAS. 115

FIGURA 2.46. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 20 % SURFACTANTE /80% AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30..... 116

FIGURA 2.47. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 30 % SURFACTANTE /70% AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30..... 117

FIGURA 2.48. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 40 % SURFACTANTE /60% AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30.....	117
FIGURA 2.49. SISTEMAS DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 50 % SURFACTANTE /50% AGUA Y ACEITE. EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 30/70 HASTA 70/30.....	118
FIGURA 2.50. SISTEMA DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 60% SURFACTANTE /40% AGUA Y ACEITE, Y SISTEMA DE COMPOSICIÓN CORRESPONDIENTE A 70% SURFACTANTE /30% AGUA Y ACEITE EL PORCENTAJE DE AGUA Y ACEITE SE ENCUENTRA EN RELACIÓN 50/50...	119
FIGURA 2.51. REPRESENTACIÓN DE LAS FASES ENCONTRADAS EN EL DIAGRAMA DE COMPOSICIÓN PSEUDO TERNARIO AGUA/ACEITE/SURFACTANTE-COSURFACTANTE. DIAMANTES VERDES: 2 FASES. TRIÁNGULOS AZULES: 1 FASE. EN ESTE DIAGRAMA SE RESUMEN LAS FASES ESTUDIADAS LUEGO DE 1 MES DE SU FORMULACIÓN A 26 °C Y PRESIÓN ATMOSFÉRICA.	120
FIGURA 2.52. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 20 % FASE SURFACTANTE /80 % (W/O). A) SISTEMA (6) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (59) RELACIÓN W/O 60/40.	122
FIGURA 2.53. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 30 % FASE SURFACTANTE /70 % (W/O). A) SISTEMA (7) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (16) RELACIÓN W/O 40/70, C) SISTEMA (38) RELACIÓN W/O 50/50, D) SISTEMA (60) RELACIÓN W/O 60/40, E) SISTEMA (71) RELACIÓN W/O 70/30.....	123

FIGURA 2.54. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 40 % FASE SURFACTANTE /60 % (W/O). A) SISTEMA (8) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (17) RELACIÓN W/O 40/70, C) SISTEMA (39) RELACIÓN W/O 50/50, D) SISTEMA (61) RELACIÓN W/O 60/40, E) SISTEMA (72) RELACIÓN W/O 70/30..... 125

FIGURA 2.55. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 50 % FASE SURFACTANTE /50 % (W/O). A) SISTEMA (9) RELACIÓN W/O 30/70, B) SISTEMA (18) RELACIÓN W/O 40/60, C) SISTEMA (40) RELACIÓN W/O 50/50, D) SISTEMA (62) RELACIÓN W/O 60/40, E) SISTEMA (73) RELACIÓN W/O 70/30..... 127

FIGURA 2.56. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA, DE LA MUESTRA EXTRAÍDA DE LA MICROEMULSIÓN. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 60 % FASE SURFACTANTE /40 % (W/O). A) SISTEMA (41) RELACIÓN W/O 50/50 (400 X), B) SISTEMA (41) RELACIÓN W/O 50/50 (100 X). 129

FIGURA 2.57. IMAGEN DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA, DE LA MUESTRA EXTRAÍDA DE LA MICROEMULSIÓN DEL SISTEMA (42) RELACIÓN W/O 50/50 (400 X). EL PUNTO ESTUDIADO ES DE COMPOSICIÓN 70 % FASE SURFACTANTE /30 % (W/O)..... 130

FIGURA 2.58. REPRESENTACIÓN DE LAS DISTINTAS ASOCIACIONES ANFIFÍLICAS ENCONTRADAS EN EL DIAGRAMA DE COMPOSICIÓN PSEUDO TERNARIO AGUA/ACEITE/SURFACTANTE-COSURFACTANTE (ETANOL/PROPILENGLICOL). CUADROS CELESTES: FASE LAMELAR. DIAMANTES MORADOS: MICROEMULSIÓN O FASE ISOTRÓPICA. CÍRCULOS AMARILLOS: FASE HEXAGONAL REVERSA (H₂). EN ESTE DIAGRAMA SE RESUMEN LAS FASES ESTUDIADAS LUEGO DE 1 MES DE SU FORMULACIÓN A 26 °C Y PRESIÓN ATMOSFÉRICA. 131

FIGURA 2.59. ESTRUCTURA DEL SURFACTANTE NO IÓNICO TRIOLEATO DE POLIOXIETILENO (20) SORBITANO (TWEEN 85), DERIVADO DE LA ETOXILACIÓN DEL TRIOLEATO DE SORBITANO (SPAN 85) Y SU REPRESENTACIÓN GRÁFICA, DONDE LA FRACCIÓN MORADA REPRESENTA LA PARTE HIDROFÍLICA DEL SURFACTANTE Y LA FRACCIÓN AZUL REPRESENTA LA PARTE LIPOFÍLICA.	133
FIGURA 2.60. ESQUEMA PROPUESTO DE LA ORGANIZACIÓN MOLECULAR SIMÉTRICA A LA RADIACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS LAMELARES Y LAS PROPIEDADES ÓPTICAS CORRESPONDIENTES. LOS CÍRCULOS DENOTAN LOS GRUPOS DE CABEZA DE ANFÍFILOS Y LAS LÍNEAS LAS CADENAS DE ACILO. MODIFICADO DE HALLER.....	134
FIGURA 2.61. ESQUEMA PROPUESTO DE LA ORGANIZACIÓN MOLECULAR DEL TWEEN 85 EN UNA INTERFASE AGUA/ACEITE. LOS CÍRCULOS DENOTAN LOS GRUPOS DE CABEZA DE ANFÍFILOS Y LAS LÍNEAS LAS CADENAS DE ACILO. LAS CABEZAS DE SURFACTANTES SE REPRESENTAN EN MORADO Y LA DE LOS COSURFACTANTES EN AMARILLO. EN COLOR MARRÓN LA FASE ACEITE.	135
FIGURA 3.1. PROCESO DE DESARROLLO COSMÉTICO Y CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS RELACIONADAS.....	150
FIGURA 3.2. IMAGEN DE UNA MICROEMULSIÓN Y UNA NANOEMULSIÓN, AMBAS CONSTITUIDAS POR UN SURFACTANTE NO IÓNICO, COSURFACTANTES, AGUA Y ACEITE MINERAL, FORMULADAS PARA USO COSMÉTICO.....	154
FIGURA 3.3. ESQUEMA DEL ESTRATO CÓRNEO (SC) DE LA EPIDERMIS	159
FIGURA 3.4. ENSAMBLES SUPRAMOLECULARES FORMADOS POR COLÁGENOS	161
FIGURA 3.5. EQUIPO DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ	166

FIGURA 3.6. DIAGRAMA DEL PROCESO DE DILUCIÓN DE LAS FASES MICROEMULSIÓN/CRISTAL LÍQUIDO, HASTA LA ZONA BIFÁSICA PARA LA ELABORACIÓN DE LAS NANOEMULSIONES. .. 169

FIGURA 3.7. NANOEMULSIONES ELABORADAS POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN DE MICROEMULSIONES/ CRISTALES LÍQUIDOS. A) NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 8 40% SURF (30 W/70O) DILUIDO CON AGUA. B) NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 8, DILUIDO CON AGUA Y LA ADICIÓN DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES..... 170

FIGURA 3.8. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 39 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 171

FIGURA 3.9. NANOEMULSIONES ELABORADAS POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN DE MICROEMULSIONES/ CRISTALES LÍQUIDOS. A) NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 70 (20% SURF / 80% W/O) DILUIDO CON AGUA. B) NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 70, DILUIDO CON AGUA Y LA ADICIÓN DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES..... 175

FIGURA 3.10. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 70 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 176

FIGURA 3.11. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MECANISMO PROPUESTO PARA LA AUTOEMULSIONACIÓN POR DILUCIÓN DE UNA MICROEMULSIÓN O / W: POR DILUCIÓN CON AGUA, EL COSURFACTANTE DIFUNDE DE LA INTERFASE ACEITE / AGUA A LA FASE ACUOSA. 182

FIGURA 3.12. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FORMACIÓN DE NANOEMULSIONES POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN DE UNA ESTRUCTURA DE CURVATURA CERO. 183

FIGURA 3.13. SUPERFICIE CÓNICA DE ENERGÍA MINIMIZADA DE LA ESTRUCTURA DE LA CATEQUINA (A) Y GALATO DE EPIGALOCATEQUINA (B)	186
FIGURA 3.14. NANOEMULSIONES ELABORADAS POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN DE MICROEMULSIONES/ CRISTALES LÍQUIDOS. A) NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 37 (20% SURF / 50% W/O) DILUIDO CON AGUA Y LA ADICIÓN DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES. B) PRODUCTO FORMULADO PROVENIENTE DEL SISTEMA 37.	187
FIGURA 3.15. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 37 DEL TERNARIO 2, ELABORADO COMO PRODUCTO COSMÉTICO.....	188
FIGURA 3.16. VARIACIÓN TÍPICA DE LA VISCOSIDAD DE UNA EMULSIÓN O / W FRENTE A LA CANTIDAD DE FASE INTERNA ^[63]	189
FIGURA A1. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE (-)-EPICATEQUINA EN EXTRACTO DE CACAO	201
FIGURA A2. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES EN EXTRACTO DE CACAO CANOABO	205
FIGURA A3. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 6 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W.....	207
FIGURA A4. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 7 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES.....	208

FIGURA A5. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 8 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 208

FIGURA A6. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 9 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 209

FIGURA A7. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 37 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 209

FIGURA A8. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 38 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 210

FIGURA A9. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 40 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 211

FIGURA A10. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 41 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 212

FIGURA A11. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 42 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 212

FIGURA A12. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 70 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 213

FIGURA A13. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 71 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 214

FIGURA A14. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 72 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 214

FIGURA A14. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 73 DEL TERNARIO 1. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 215

FIGURA A16. GRÁFICA DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LA NANOEMULSIÓN PROVENIENTE DEL SISTEMA 6 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W..... 216

FIGURA A17. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 7 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 216

FIGURA A18. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 8 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 217

FIGURA A19. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 9 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 217

FIGURA A20. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 37 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 218

FIGURA A21. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 38 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 219

FIGURA A22. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 39 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 220

FIGURA A23. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 40 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 220

FIGURA A24. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 41 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 221

FIGURA A25. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 42 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 222

FIGURA A26. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 71 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 223

FIGURA A27. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 72 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 223

FIGURA A28. GRÁFICAS DE LA CURVA DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GOTA PARA LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DEL SISTEMA 73 DEL TERNARIO 2. CURVA AZUL: NANOEMULSIÓN O/W, CURVA NARANJA: NANOEMULSIÓN O/W/POLIFENOLES..... 224

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.1. CONCENTRACIÓN DE (-)-EPICATEQUINA EN UN VOLUMEN UN EXTRACTO ALCOHÓLICO DE 10 ML, DETERMINADO POR HPLC A LAS MUESTRAS DE CACAO DE LAS 3 ZONAS CARABOBEÑAS.....	25
TABLA 1.2. CONCENTRACIÓN DE (-)-EPICATEQUINA EN UN VOLUMEN UN EXTRACTO ALCOHÓLICO, DETERMINADO POR HPLC A LAS MUESTRAS DE CACAO DE LA ZONA DE CANOABO.....	27
TABLA 2.1. IDENTIFICACIÓN DE CADA TUBO POR COMPOSICIÓN EN MASA DE LOS COMPONENTES ANFIFÍLICOS, Y LA RELACIÓN AGUA Y ACEITE, PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL DIAGRAMA DE FASES TERNARIO 1.....	75
TABLA 2.2. IDENTIFICACIÓN DE CADA TUBO POR COMPOSICIÓN EN MASA DE LOS COMPONENTES ANFIFÍLICOS, Y LA RELACIÓN AGUA Y ACEITE, PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL DIAGRAMA DE FASES TERNARIO 2.....	76
TABLA 2.3. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA DE LOS PUNTOS ESTUDIADOS DE COMPOSICIÓN 10 % FASE SURFACTANTE /90 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 5, 14, 25, 36, 47, 58 Y 69.....	102
TABLA 2.4. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA DE LOS PUNTOS ESTUDIADOS DE COMPOSICIÓN 20 % FASE SURFACTANTE /80 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 6, 15, 26, 37, 48, 59 Y 70.....	105

TABLA 2.5. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 30 % FASE SURFACTANTE /30 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 7, 16, 27, 38, 49, 60 Y 71. 108

TABLA 2.6. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA TRIFÁSICA Y DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 40 % FASE SURFACTANTE /60 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 8, 17, 28, 39, 50, 61 Y 72. 110

TABLA 2.7. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS PUNTOS ESTUDIADOS DE COMPOSICIÓN 20 % FASE SURFACTANTE /80 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 6 Y 59. 122

TABLA 2.8. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 30 % FASE SURFACTANTE /70 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 7, 16, 38, 60 Y 71. 123

TABLA 2.9. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 40 % FASE SURFACTANTE /60 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 7, 16, 38, 60 Y 71. 126

TABLA 2.10. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS DE LA ZONA MICROEMULSIÓN DE

LOS SISTEMAS BIFÁSICOS. LOS PUNTOS ESTUDIADOS SON DE COMPOSICIÓN 50 % FASE SURFACTANTE /50 % (W/O). CORRESPONDIENTE A LOS SISTEMAS: 9, 18, 40, 63 Y 73. 128

TABLA 2.11. RESULTADOS DE LAS FASES OBTENIDAS DEL ANÁLISIS DE LA MICROSCOPÍA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (400 X), DE LA MUESTRA EXTRAÍDA DE LA MICROEMULSIÓN DEL SISTEMA ESTUDIADO DE COMPOSICIÓN 60 % FASE SURFACTANTE /40 % (W/O). CORRESPONDIENTE AL SISTEMA 41. 129

TABLA 3.1. LAS MUESTRAS EMPLEADAS PARA EVALUAR LA FORMACIÓN DE NANOEMULSIONES, PROVENIENTES DE LAS MICROEMULSIONES ESTUDIADAS EN LOS TERNARIOS 1 Y 2. EN LAS MICROEMULSIONES (ME) ESTUDIADAS HAY PRESENTE FASES LAMELARES (LA) Y HEXAGONAL (H₂). 165

TABLA 3.2. DIÁMETRO DE TAMAÑOS DE GOTAS DE LAS NANOEMULSIONES FORMADAS POR DILUCIÓN DE DETERMINADOS SISTEMAS PROVENIENTES DEL TERNARIO 1 Y LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DE LOS MISMOS SISTEMAS MÁS LA ADICIÓN DE LOS POLIFENOLES, EMPLEANDO DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ. 172

TABLA 3.3. DIÁMETRO DE TAMAÑOS DE GOTAS DE LAS NANOEMULSIONES FORMADAS POR DILUCIÓN DE DETERMINADOS SISTEMAS PROVENIENTES DEL TERNARIO 2 Y LAS NANOEMULSIONES PROVENIENTES DE LOS MISMOS SISTEMAS MÁS LA ADICIÓN DE LOS POLIFENOLES, EMPLEANDO DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ. 177

INTRODUCCIÓN

FORMULACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En la actualidad, la ciencia y la tecnología enfrenta desafíos por la gran demanda de la sociedad, debido al cambio en las preferencias de los consumidores por productos de alta calidad y bajo impacto ambiental. Estos desafíos conllevan al desarrollo de formulaciones inteligentes, las cuales pueden modular sus propiedades frente a ciertos estímulos. Para lograr este propósito la industria cosmética emplea moléculas como los surfactantes.

Los surfactantes son moléculas orgánicas que al ser disueltas a baja concentración tienen la capacidad de adsorberse en las diferentes interfases debido a su carácter anfifílico. Estas son capaces de formar monocapas y, lo más importante, estructuras de autoensamblaje (como, por ejemplo, micelas y vesículas entre otras) en el seno del líquido, alterando así significativamente las propiedades fisicoquímicas de esas interfases ^[1].

Debido a este comportamiento de fase y la diversidad en estructuras coloidales que pueden formar. Los surfactantes se encuentran presentes en una gran variedad de productos de la industria química, como los aceites de motor, los productos farmacéuticos, los detergentes, pinturas, colorantes, los lodos utilizados en la perforación de pozos petroleros, agroquímicos, fibras, plásticos y cosméticos ^[2,3].

Una de las propiedades de los surfactantes es la formación de emulsiones a partir de dos fases líquidas inmiscibles, típicamente aceite y agua. Las emulsiones son una clase de sistemas dispersos que consisten en gotas de un líquido (fase dispersa) dispersadas en otro líquido (fase continua), generalmente aceite en agua (O / W,) o agua en aceite (W / O) debido a un agente emulsionante (surfactante) ^[4]. Siendo el tamaño de gota formado y la distribución de tamaños de las mismas, un parámetro de caracterización para las emulsiones ^[5]. Por otra parte, en las últimas décadas, ha crecido el interés en la formulación y aplicación de las nanoemulsiones, debido a sus atributos específicos tales como alta estabilidad, apariencia traslúcida y propiedades de administración de fármacos y cosméticos ^[6].

La ciencia de los cosméticos abarca desde los estudios y elaboración de la formulación, la aplicación en la piel, hasta la interacción final con los lípidos del estrato córneo en la piel, que en sí mismos tienen la forma de una asociación anfifílica [6]. Para lo cual, se han empleado diferentes vías de administración que incluyen la transdérmica y la tópica [7].

La absorción percutánea de ingredientes cosméticos, como cremas hidratantes o agentes antioxidantes, es baja debido a la función de barrera en la piel que ejerce el estrato córneo. Con el fin de aumentar la penetración de activos a través de la piel, se han desarrollado y propuesto, diversas estrategias para superar la función de barrera del estrato córneo [8].

Entre estas estrategias se tienen las nanoemulsiones, la cuales tienen ventajas sobre las microemulsiones, debido a que, para su formación, es requerida una menor concentración de surfactantes. Además, las nanoemulsiones son sistemas que pueden presentar tamaños de gotas en un intervalo de 20 a 500 nm [9]. Este pequeño diámetro de gota, facilita aumentar la cantidad de compuesto activo que logra el pasaje transdérmico en la piel. Asegurando un contacto más cercano con el estrato córneo cuyos espacios intercelulares se encuentran entre 180-200 nm [10].

En los últimos años, ha habido un interés creciente por los efectos beneficiosos de algunas sustancias fenólicas, provenientes de especias y hierbas de uso común, para prevenir diversas afecciones patológicas relacionadas con la edad.

El cacao es una rica fuente de compuestos polifenólicos con una gran cantidad de flavonoides específicamente flavanoles, también conocidos como flavan-3-oles. Estos antioxidantes protegen la piel del deterioro de la estructura dérmica y el envejecimiento prematuro de la piel [11]. Favorecen también, la producción de factores de crecimiento, como colágeno y elastina.

El envejecimiento de la piel es un proceso complejo que involucra causas intrínsecas y exógenas. El envejecimiento intrínseco de la piel es inevitable, pero el envejecimiento exógeno es causado por entornos dañinos y puede evitarse, al menos parcialmente. El daño fotooxidativo causado por la luz solar ultravioleta es la

causa principal del envejecimiento extrínseco de la piel, un fenómeno conocido como fotoenvejecimiento, el cual es capaz de activar la inflamación, acelerar el envejecimiento fisiológico y determinar una típica degeneración dérmica/epidérmica [11].

El propósito de esta investigación es la elaboración de una emulsión empleando un método de baja energía, partiendo de la formulación de una microemulsión. Esto, con la finalidad de obtener un producto con características nanométricas, para lograr realizar el pasaje transdérmico de los componentes activos biocompatibles con la piel.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las nanoemulsiones obtenidas a partir de microemulsiones y/o cristales líquidos, se han desarrollado como vehículos adecuados para ingredientes activos cosméticos debido a las numerosas ventajas sobre las formulaciones existentes [9], como la baja cantidad de surfactante que utiliza, estabilidad frente a sedimentación, ausencia de toxicidad y/o características irritantes (debida a la baja cantidad de surfactantes), baja viscosidad, buena apariencia. En el campo cosmético, el tipo de nanoemulsión aceite/agua (O/W) se ha estudiado más que el agua/aceite (W/O), y los métodos de preparación de alta energía son los más reportados en la literatura [12].

Las nanoemulsiones son sistemas particularmente útiles para cosméticos, porque el pequeño tamaño de gota asegura un contacto más estrecho con el estrato córneo de la epidermis, aumentando la cantidad de compuesto activo que alcanza el sitio de acción deseado. Además, de mejorar la penetración de la capa de la piel y la eficacia del producto [13].

Debido a las características antes mencionadas se busca generar un aporte en relación a la formulación de nanoemulsiones a partir de microemulsiones y/o cristales líquidos biocompatibles.

Esta tecnología de formulación puede ofrecer productos únicos con grandes perspectivas comerciales en un mercado cosmético global muy competitivo y lucrativo.

La inclusión de los polifenoles presentes en el cacao (*Theobroma cacao*), como ingrediente activo dentro de las formulaciones cosméticas, proporciona beneficios adicionales. Es bien sabido que estos polifenoles, son compuestos que promueven la salud de la piel, y tienen un efecto preventivo contra diversas enfermedades crónicas por su alto efecto antioxidante. Adicionalmente, se ha reportado que la influencia de este tipo de polifenoles mejora la elasticidad y tono de la piel ^[14].

Además, este ingrediente activo con propiedades antioxidantes, es un producto proveniente de un fruto ampliamente cosechado en el país. Esto representaría una buena alternativa ante los costos de los productos antioxidantes importados, que son empleados en los cosméticos y productos de cuidado personal.

La industria cosmética en Latinoamérica ha crecido a escala mundial, comportándose de manera anti cíclica, ya que sus ventas mejoran, incluso, con las crisis económicas ^[16].

Según el portal *Euromonitor Internacional*, los productos de belleza y cuidado personal a nivel mundial disminuyeron un 3,3% en 2020, por debajo del 1,9% en 2019. Sin embargo, se espera que, al concluir la primera mitad de 2021, ocurra un repunte del 3,3% en 2021 de manera constante ^[17].

En la actualidad, en Latinoamérica, los consumidores buscan productos de mayor calidad, en un momento de crisis y desaceleración económica. Impulsando a los consumidores a buscar alternativas para acceder a productos de calidad a precios accesibles ^[17].

En general, la belleza y el cuidado personal han demostrado que es relativamente más resistente que otros bienes de consumo de bienes de consumo no esenciales. Dada la importancia económica de los cosméticos es necesario enfilar la investigación, a la innovación y desarrollo nacional de productos de belleza y cuidado personal, partiendo de nuevas tecnologías que sirvan de base para el mejoramiento de los productos nacionales. Además, una ruta de desarrollo que nos

lleve a la manufactura de productos cosméticos con materia prima desarrollada en el país.

Esta investigación tiene como finalidad realizar el estudio de los sistemas Surfactantes/Aceite/Agua (S/O/W) para la formulación de un producto tipo emulsión como sistema de liberación cosmética, empleando como ingrediente activo productos de fuente natural, presentes en los granos del cacao. Esta formulación será incluida en un producto final base para la piel.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Formular los sistemas surfactantes/aceite/agua en dispersiones coloidales con características biocompatibles para encapsular polifenoles provenientes de cacao venezolano con aplicaciones cosméticas.

Objetivos Específicos

1. Extraer y caracterizar los compuestos polifenólicos de los granos de cacao proveniente de diferentes zonas del estado Carabobo. Para ser incorporados como componentes en una formulación con aplicaciones cosméticas, aquel que presente mayor contenido de (-)-epicatequinas.
2. Analizar el comportamiento de fase de los sistemas surfactante/aceite/agua para comprender las propiedades interfaciales de los componentes empleados en el presente estudio.
3. Formular los sistemas surfactantes/aceite/agua para incorporar los compuestos polifenólicos extraído de la fuente natural con características biocompatibles.
4. Elaborar un producto tipo emulsión en base a la formulación bajo estudio mediante un método de baja energía.

BIBLIOGRAFIA

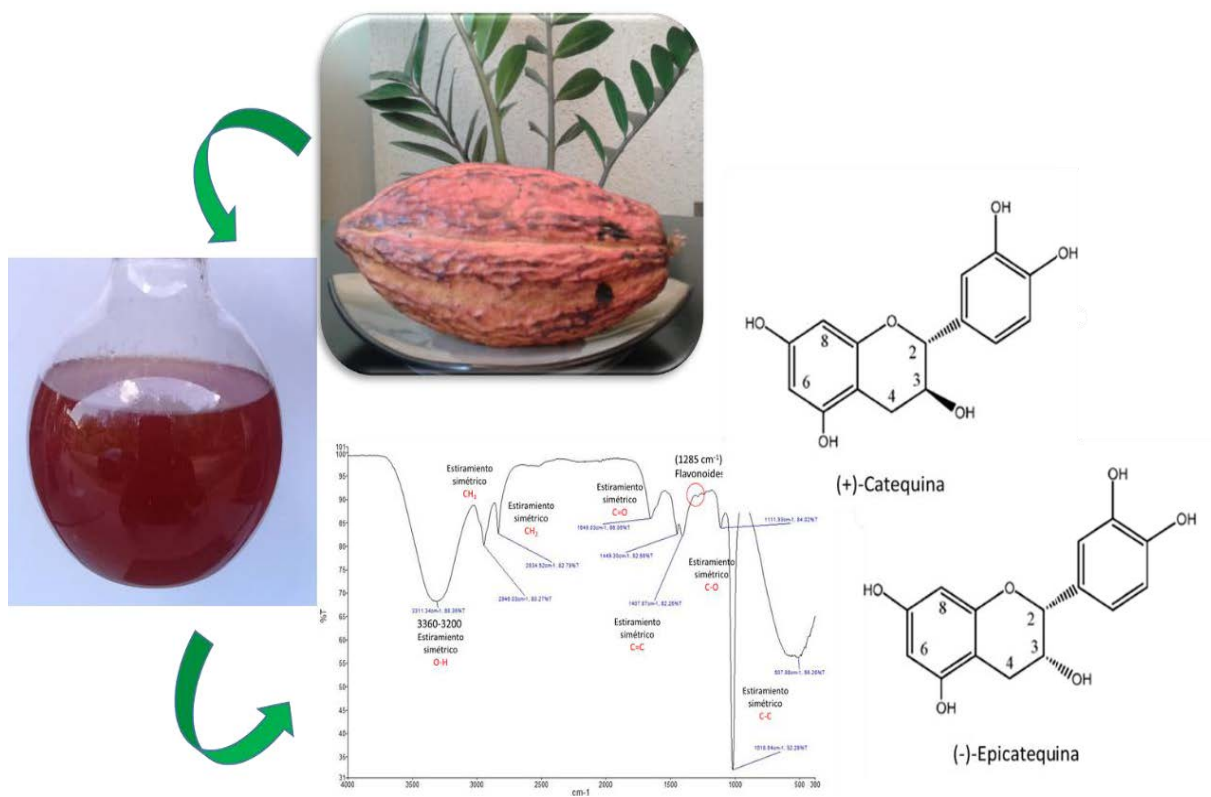
1. Eastoe J. Colloid Science: Principles, Methods and Applications. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; Chapter 4. 2004.
2. Tadros T. (ed.): The Surfactants, Academic Press, London, 1984.
3. Rosen M. Surfactants and Interfacial Phenomena. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; Chapter I. 2004.
4. Tadros T., Vincent B. Encyclopedia of Emulsion Technology, P. Becher (ed.): Marcel Dekker. 1983.
5. Reyes P., Di scipio S. Caracterización físico-química de emulsiones de aceite de maíz en agua. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.* 27: 56-69, 2012.
6. Friberg S. Micelles, Microemulsions liquid crystals, and the structure of stratum corneum lipids. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 41: 155-171, 1990.
7. Mackay R. Properties of high emulsifier content O/W microemulsions. In: Robb ID (ed). *Microemulsions*, New York: Springer. 207-219, 1982.
8. Boonme P. Aplicaciones de microemulsiones en cosmética. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6: 223–228, 2007.
9. Solans C., García- Celma M.J. Microemulsions and Nanoemulsions for Cosmetic. Applications. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Chapter 29: 507–518, 2017.
10. Kong M., Chen X., Kweon D., Park H. Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. *Carbohydrate polymers journal*, 86: 837-843, 2011.
11. Scapagnini G., Davinelli S., Di Renzo L. Cocoa Bioactive Compounds: Significance and Potential for the Maintenance of Skin Health. *Nutrients*. 6: 3202-3213, 2014.
12. Yukuyama M., Ghisleni D., Pinto T., Bou-Chacra N. Nanoemulsions: process selection and application in cosmetic-a review. *International Journal of Cosmetic Science*. 38: 13-24, 2015.

13. Morganti P. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 3: 5-13, 2010.
14. Gasser P., Lati E., Peno-Mazzarino L., Bouzoud D., Allegaert, L., Bernaert H. Cocoa polyphenols and their influence on parameters involved in ex vivo skin restructuring. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008; 30: 339-345.
15. Mitsui T. "New Cosmetic Science". Editorial Elsevier. First edition. 1997.
16. Navarro María Eugenia. Cifras de la Industria Cosmética Latinoamericana por. <https://entorno-empresarial.com/cifras-de-la-industria-cosmetica-latinoamericana/>
17. <https://blog.euromonitor.com/world-market-for-beauty-and-personal-care-2/>

CAPITULO I. POLIFENOLES EN CACAO.

Este capítulo muestra los resultados de la extracción de los compuestos polifenólicos de los granos de cacao provenientes del estado Carabobo, para cumplir con el objetivo específico 1.

EXTRAER LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE LOS GRANOS DE CACAO PROVENIENTES DEL ESTADO CARABOBO PARA SER INCORPORADOS COMO COMPONENTES EN UNA FORMULACIÓN CON APLICACIONES COSMÉTICAS.



1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Los polifenoles

Los polifenoles son compuestos de baja masa molecular (200-400g/mol) que se encuentran en plantas, frutas, vegetales, granos y cereales. Se producen como metabolitos secundarios, que sirven para proteger a la planta del bombardeo de patógenos y radiación ultravioleta (UV). Ante una amenaza externa, la planta activa una de las vías de síntesis produciendo las estructuras polifenólicas ^[1].

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse según su estructura química, se clasifican principalmente en fenoles simples y polifenoles. Los fenoles simples incluyen los ácidos fenólicos y cumarinas, mientras que los polifenoles incluyen flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos ^[2]. La clasificación de los compuestos fenólicos es representada en la Figura 1.1.

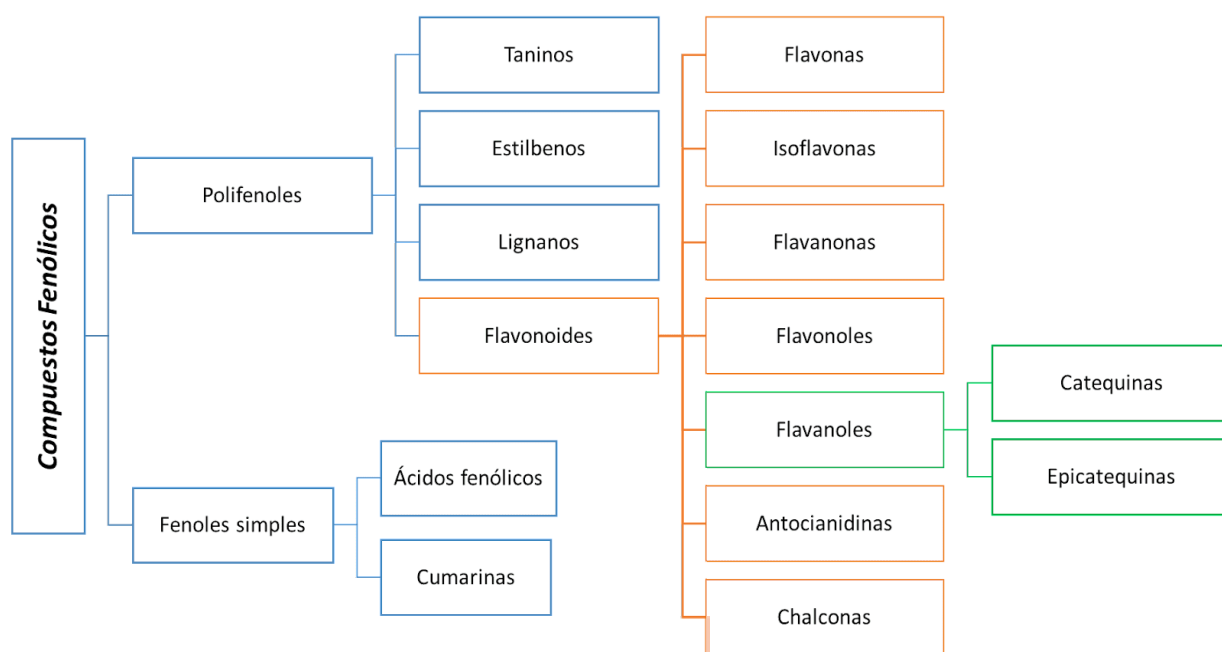


Figura 1.1. Clasificación de compuestos fenólicos ^[2].

1.1.2. Los flavonoides

Representan el grupo de fenoles vegetales más común y ampliamente distribuido. Están muy extendidos en el reino vegetal, con la excepción de algas y hongos. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano ($C_6-C_3-C_6'$), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) unidos a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se enumeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B ^[3].

Los flavonoides se pueden clasificar en varias subclases: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianidinas y chalconas ^[2]. La Figura 1.2. Representa la estructura básica y el sistema utilizado para la numeración de carbono del núcleo flavonoide ^[4].

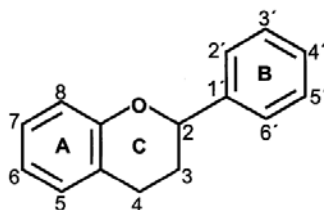


Figura 1.2. Estructura química básica y patrón de numeración de los flavonoides ^[4].

La estructura polifenólica de flavonoides, por ejemplo, resulta ideal para la actividad secuestrante de radicales libres, además han demostrado ser varias veces más eficaces como antioxidantes que por ejemplo las vitaminas E y C ^[5], empleados convencionalmente como los más potentes antioxidantes naturales. Y, en el cacao se ha demostrado que el contenido de polifenoles y potencial antioxidante es superior a muchas fuentes naturales ^[6].

1.1.3. El cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta de reproducción preferentemente alógama, con número cromosómico $2n = 20$ ^[7], de la familia Malvaceae, cultivada en las regiones tropicales del mundo y de cuyos frutos se obtienen almendras que son empleadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. ^[6]

El cacao contiene cerca de 300 compuestos volátiles incluyendo ésteres, hidrocarbó lactonas, monocarbonilos, pirroles y otros más. Se ha dicho que los componentes importantes de sabor son ésteres alifáticos, carbonilos aromáticos insaturados, dicetopiperazinas, piperazinas y teobromina. El cacao también contiene cerca de 18 % de proteínas (8% digestibles), grasas (manteca de cacao), aminas y alcaloides incluyendo teobromina (0,5 a 2,7%), cafeína (0,25 a 1,43%), tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicotínico y aminoácidos libres, taninos, fosfolípidos, etc. [8]. Además de ser una fuente extremadamente rica de muchos minerales esenciales, como magnesio, cobre, potasio y hierro [9].

La manteca de cacao contiene predominantemente triglicéridos de ácidos grasos consistentes de ácidos oleico (37,3%), esteárico (34,4%), y palmítico (26,2%). Más de un 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. Llega a comprender hasta el 56% del peso seco de la almendra y su composición, evaluada como la relación ácidos grasos saturados: insaturados (promedio de 1:0,60) permite obtener una grasa sólida a 25 °C, con punto de fusión entre 33 – 37 °C [8, 10].

Polifenoles del cacao

Las semillas de cacao son una rica fuente de polifenoles (aproximadamente el 15% del peso del grano seco) similares al vino, el té o las verduras. Se almacenan en las llamadas células polifenólicas, un tipo de células de los cotiledones. Estos compuestos confieren sensaciones astringentes y amargas y contribuyen significativamente a los sabores verdes y afrutados de los licores de cacao [11].

Hay 3 grupos principales de polifenoles en el cacao, dos pertenecen al grupo flavonoides: **catequinas** (flavan-3-oles) y **antocianinas** (antocianidinas) y uno, pertenece al grupo de los taninos: las **proantocianidinas** (taninos condensados). Los monómeros representan del 5% al 10% del total de los polifenoles del cacao y los polímeros del 90% del total de los polifenoles del cacao [11].

Las **catequinas** conforman aproximadamente del 29% al 38% del total de polifenoles, están representadas por (-)-epicatequina (hasta el 35% del total de

polifenoles, es decir, cerca del 98% del total de catequinas), (+) - catequina, (+) – galocatequina y (-)-epigalocatequina [12].

Las catequinas pueden estar presentes como monómeros de catequinas, como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados) [3].

Las catequinas, contienen un esqueleto de benzopirano con un grupo fenilo unido a la posición 2 y un grupo hidroxilo a la posición 3 [13]. Las (-)-epicatequina y catequina que se encuentran en el cacao, son principalmente (+) - catequina (C) y (-)-epicatequina (EC). Sus estructuras se encuentran representadas en la Figura 1.3.

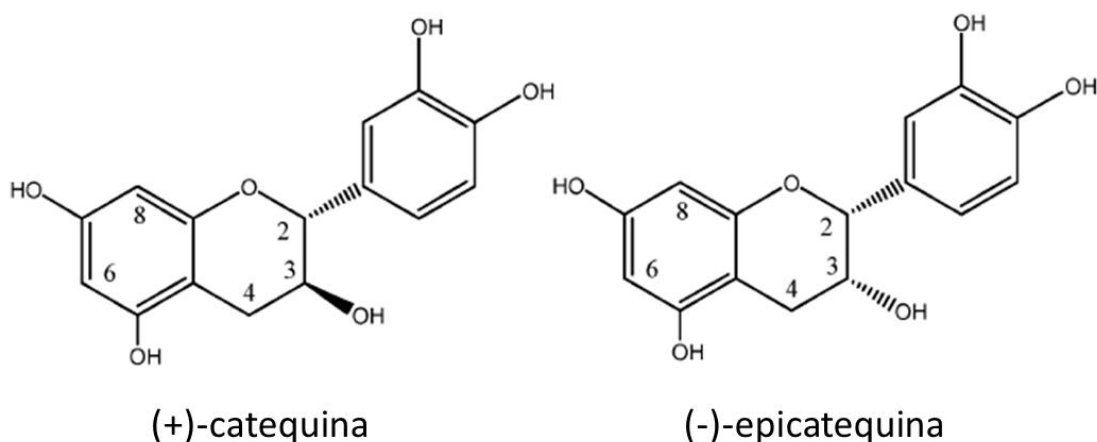


Figura 1.3. Estructura de la (+)-catequina y (-)-epicatequina [14].

Además de las catequinas, la subclase flavan-3-oles también incluye los ésteres de galato de catequinas (Figura 1.4), estos incluyen 3-O-galato de (-) – epigalocatequina (EGCG), 3-O-galato de (-) - epicatequina (ECG), (-) - epigalocatequina (EGC), 3-O- galato de (+) - galocatequina (GCG), y (+) - galocatequina (GC) [15, 16].

Generalmente es aceptado que las excelentes propiedades antioxidantes de estos flavonoides, se deben a la presencia de grupos hidroxilo de catecol en el anillo B.

Los mecanismos antioxidantes de los flavonoides pueden incluir efectos sinérgicos. La estereoquímica de estas moléculas es importante, ya que tiene influencia sobre su reactividad y sus propiedades fisicoquímicas. La actividad antioxidante de los flavonoides generalmente aumenta con un aumento en el número de grupos hidroxilo y una disminución en la glicosilación ^[17].

La (-)-epicatequina y el galato de epicatequina, respectivamente con una estructura de difenol vecina en el anillo B y un anillo C saturado, exhiben los efectos antioxidantes más potentes ^[18].

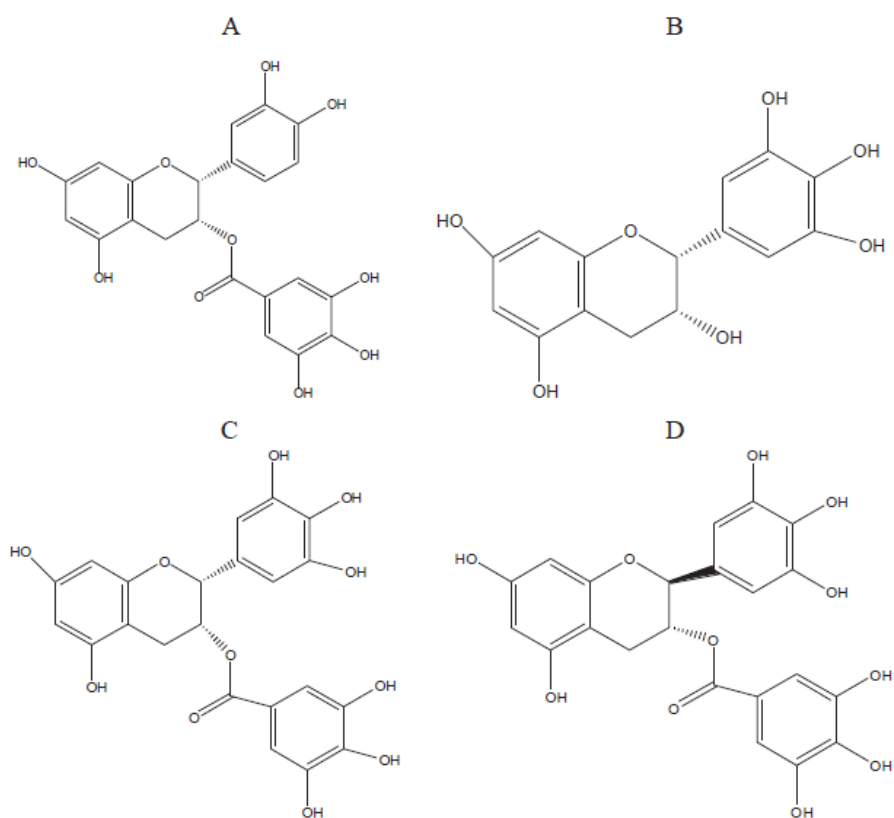


Figura 1.4. Estructura de A: 3-O-galato de (-)-epicatequina (ECG), B: (-)-epigallocatequina (EGC), C: 3-O-galato de (-) - epigallocatequina (EGCG), D: 3-O-galato de (+) - gallocatequina (GCG) ^[16].

Las **antocianinas** son glucósidos de antocianidinas, están compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Está basada en la estructura básica del cromóforo 2-fenil-benzopirilio ^[19, 20] (Figura 1.5).

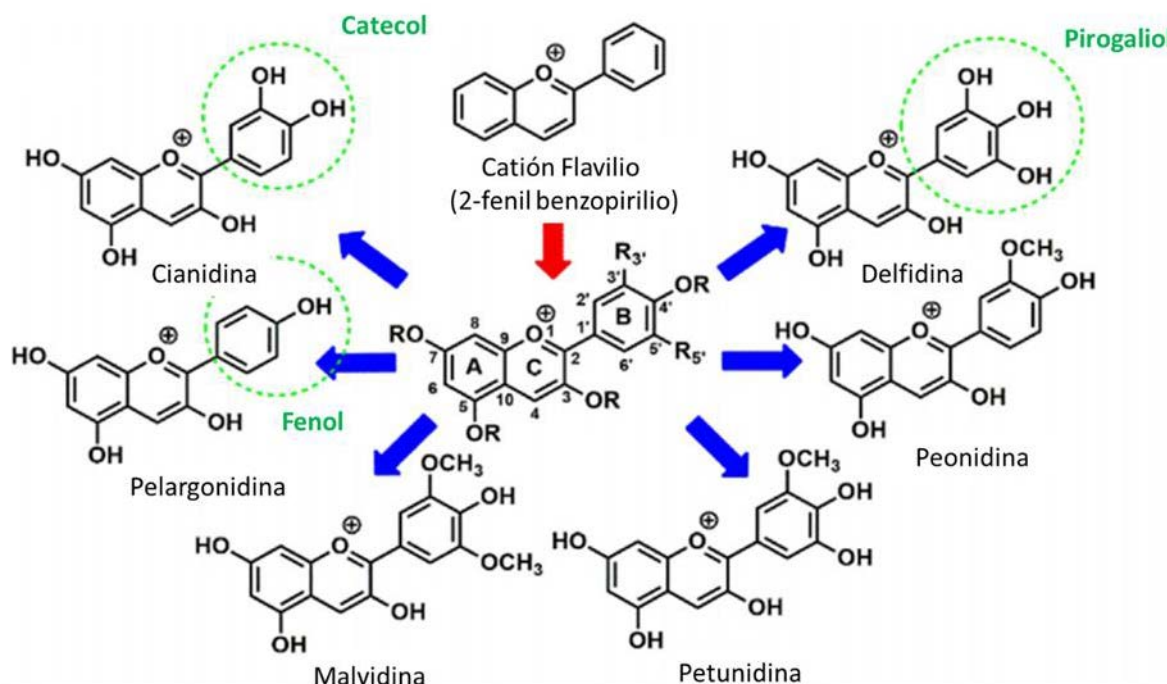


Figura 1.5. Estructura general del catión flavilio (AH⁺) y numeración de átomos. R puede representar azúcares H, OH, OCH₃, -hexosa o pentosa. También se informa la estructura de las seis antocianidinas más comunes. Las líneas discontinuas verdes muestran los principales fragmentos de anclaje / coordinación. Modificado de Sinopoli y col ^[19].

En el cacao la fracción de **antocianina**, representa aproximadamente el 4% de los polifenoles totales) ^[11]. El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los

sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa ^[20].

Las **proantocianidinas** (aproximadamente del 58% al 65% del total de polifenoles) contenidas en las semillas de cacao están representadas por dímeros, trímeros u oligómeros de flavan-3,4-dioles unidos por enlaces $4 \rightarrow 8$ o $4 \rightarrow 6$ ^[21, 22].

Las proantocianidinas poliméricas y oligoméricas, llamadas también taninos condensados, consisten en una unidad de flavanilo electrofílico, generada a partir de un flavan-4-ol o un flavan-3,4-diol, flavan-3-ol y acoplada a una unidad de flavanilo nucleófilo, a menudo un flavan-3-ol ^[14, 15, 23].

Las proantocianidinas más estudiadas se basan en los flavan-3-oles (+) - catequina y (-)-epicatequina. Otros flavan-3-oles importantes son (+) - galocatequina, (-) - epigalocatequina, y (-) - galato de epigalocatequina ^[23].

Predominan los dímeros a hexámeros, pero se pueden encontrar polímeros con 18 unidades monoméricas en los productos de cacao. Las proantocianidinas más importantes son las procianidinas B1, B2, B3, B4, B5, C1 y D ^[24]. Estas estructuras son observadas en la Figura 1.6.

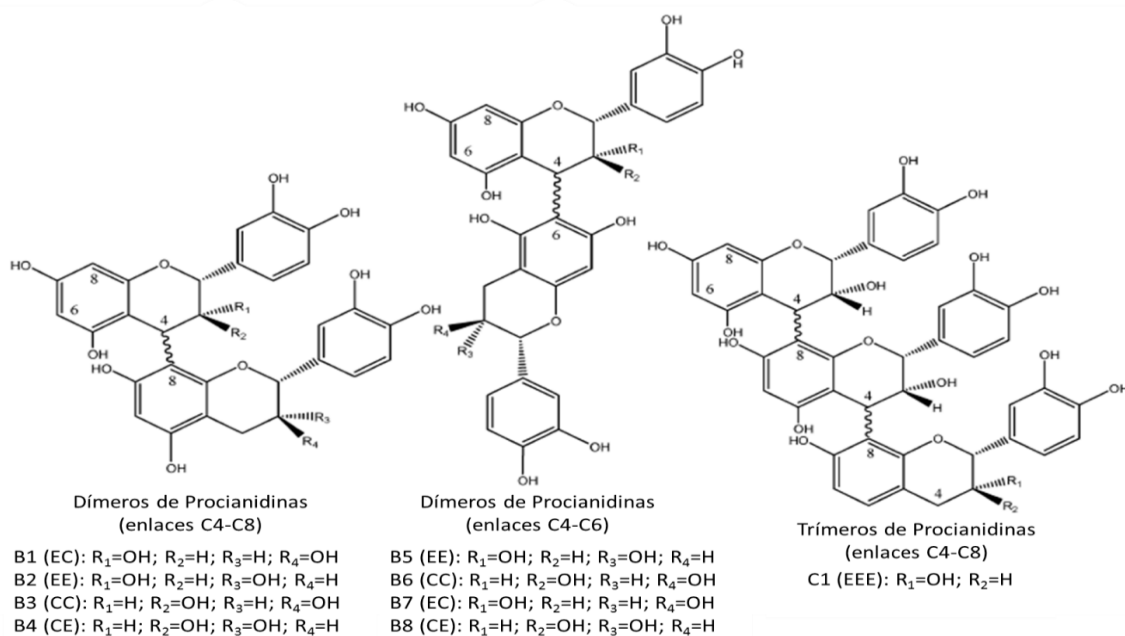


Figura 1.6. Estructura propuesta para las proantocianidinas tipo B y C [14, 23].

Las proantocianidinas están presentes en las plantas como mezclas complejas de polímeros con un grado medio de polimerización entre 4 y 11, normalmente en asociación con los flavan-3-oles que la componen [23].

La proantocianidina oligomérica se asocia con una serie de actividades biológicas, la mayoría de las cuales se atribuyen a sus capacidades antioxidantes. Presentan actividad antifúngica y antibacteriana [23]. Una de las características resaltantes de estas proantocianidinas, es que pueden exhibir actividad antioxidante a través de la inhibición de enzimas prooxidativas [25, 26].

1.1.4. Factores que afectan la composición de polifenoles en el cacao

El contenido y la composición de los polifenoles varían mucho dependiendo de varios factores: genotipo, origen, grado de madurez y procesamiento del grano [27] y el ambiente donde se desarrollan los árboles, dado por las condiciones edafo-climáticas [6].

Se ha demostrado que la cantidad y composición de compuestos polifenólicos (también de metil xantinas) varía con la altitud a la que se encuentran las plantaciones debido posiblemente al diferencial de radiación UV-B, la cual influye de manera directa en la biosíntesis de polifenoles [28].

Otros factores, atribuibles son el manejo pre y post cosecha, los cuales son prácticas culturales de manejo de la plantación, que en las plantaciones de América reviste de importancia. Desde el tratamiento para atacar las plagas y enfermedades que aquejan a este cultivo (moniliasis, mancha negra, hormigas, ardillas), pasando por el proceso de fertilización (sintética u orgánica). El momento de cosecha, tiempo transcurrido entre la cosecha, el almacenamiento, el procesamiento de la mazorca, y posteriormente, el procesamiento post cosecha principalmente la fermentación, el secado y tostado de las almendras [6, 9].

Durante el proceso de fermentación se puede reducir hasta un 20% el contenido de polifenoles totales [6]. Sin embargo, el comportamiento de los polifenoles puede no ser uniforme durante la fermentación. Aunque el nivel de polifenoles generalmente disminuye, se reportan casos en los que su concentración no cambió o incluso aumentó. Este último aspecto puede ser consecuencia de la formación de proantocianidas como resultado de reacciones de polimerización [27]. Se ha sugerido que la reducción del contenido de polifenoles durante la fermentación puede verse influenciada por peculiaridades genéticas, como las características anatómicas de los granos [29].

El proceso del tostado, afecta dramáticamente el nivel y la composición de los polifenoles [30]. Los polifenoles son estructuras moleculares termolábiles, y las altas temperaturas y el tostado prolongado provocan una reducción del contenido de polifenoles totales. Las altas temperaturas pueden inducir la epimerización de (-)-epicatequina (el principal flavanol presente en los granos de cacao sin tostar) a (-)-catequina y (+)-catequina a (+)-epicatequina [31].

1.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

1.2.1. Materiales, reactivos y equipos

1.2.1.1. Materiales

Los granos de cacao utilizados en el presente trabajo provienen de la zona cacaotera de Patanemo, Canoabo y Trincheras, pertenecientes al estado Carabobo. Las muestras fueron adquiridas en la Hacienda cacaotera San Cayetano, ubicada en Canoabo, donde funciona la fábrica de chocolates Valle de Canoabo.

Los granos de cacao estudiados son provenientes de mazorcas en estado de madurez de los árboles de las plantaciones de las zonas carabobeñas mencionadas. Estos granos fueron sometidos al proceso de fermentación y secado, de acuerdo a las prácticas tradicionales de la hacienda.

1.2.1.2. Reactivos

(-)-Epicatequina Sigma Aldrich, $\geq 98\%$ (HPLC), Acetonitrilo UV grado HPLC, Burdick & Jackson; Metanol grado HPLC, Merck; Ácido Fórmico 98%, Merck.

1.2.1.3. Equipos

- *Espectrofotómetro UV-Vis SpectronicTM HeliosTM Gamma.* Espectrofotómetro UV-Vis de escaneo de un solo haz. Intervalo de longitud de onda 190-1100 nm, posee ancho de banda fijo de 2 nm y cambiador de celda de 7 posiciones. Control local o software para PC MS Windows VISION.
- *Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier FTIR Frontier Perkin Elmer.* Equipo que permite la identificación de grupos funcionales de materiales orgánicos e inorgánicos, y determinadas estructuras de muestras sólidas y líquidas por transmisión espectroscópica de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), en el Intervalo espectral comprendido entre 400 y 4.000 cm^{-1} .
- *Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) con detector de arreglo de Diodos, modelo 235C, Perkin Elmer.* Columna analítica Prevail Carbohydrate ES de dimensiones (250 mm x 4,6 mm) con relleno de un tamaño de partícula de 5 μm . Bomba HPLC Alltech, modelo 626, con un

intervalo de presión de trabajo de 0 a 6000 psi y un intervalo de flujo de 0 a 12 mL/min.

- *Mini procesador de alimentos pica todo marca Black&Decker* eléctrico con función de pulso, modelo HC306b.

1.2.2. Extracción de compuestos fenólicos en granos de cacao de las tres zonas cacaoteras

La extracción de los compuestos fenolicos se realizó a partir del cacao fermentado y seco. El mismo fue molido para facilitar la extracción de los compuestos fenólicos [32], empleando un mini procesador de alimentos pica todo. Los granos de cacao molido con un tamaño de partícula entre 0,5 mm y 4,0 mm (substrato) provenientes de cada región, fueron empleados para la extracción de los compuestos fenólicos. El proceso consistió en pesar una determinada masa de cacao molido ($10,0000 \pm 0,0001$) g y se colocó en un equipo Soxhlet, durante 5 h empleando como solvente metanol (hasta que el solvente condensado sobre el sustrato se observó incoloro) [33]. Tal como se observan en la Figura 1.7.



Figura 1.7. Extracción de los compuestos fenólicos con metanol de los granos fermentados y secos de cacao en equipos Soxhlet.

Los extractos obtenidos (Figura 1.8) fueron rotaevaporados para obtener los extractos concentrados hasta un volumen de 10 mL. Luego fueron centrifugados para eliminar los sólidos remanentes durante 15 minutos a 3.000 rpm, y el sobrenadante de cada extracto fue conservado en envases color ámbar y en refrigeración hasta su caracterización.



Figura 1.8. Extracto metanólico de las diferentes muestras de cacao

1.2.3. Extracción de compuestos fenólicos en granos de cacao de la zona cacaotera de Canoabo

Una vez seleccionado el cacao proveniente de Canoabo para incorporar a la formulación cosmética, se realiza una nueva extracción para obtener mayor contenido del extracto de este cacao específicamente y realizar su caracterización. Se realizó el mismo proceso de extracción anteriormente descrito para las otras tres muestras de cacao. En este caso se empleó una masa de cacao Canoabo molido de $47,5871 \pm 0,0001$ g. El extracto obtenido (Figura 1.9) fue rotaevaporado, centrifugado durante 15 minutos a 3.000 rpm y el sobrenadante fue rotaevaporado nuevamente hasta sequedad, para obtener la masa del extracto alcohólico de cacao. El extracto fue nuevamente disuelto, se adicionó metanol hasta obtener un extracto de polifenoles concentrado en un volumen de 10 mL. Luego fue conservado en refrigeración hasta la determinación del contenido de (-)-epicatequina.



Figura 1.9. Extracto metanólico de la muestra de cacao Canoabo.

1.2.4. Determinación del contenido de (-)-epicatequina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación del contenido de catequina, específicamente la (-)-Epicatequina del extracto metanólico, se empleó la técnica de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) de acuerdo con el método descrito por Arlorio et al., con algunas modificaciones ^[34].

Las condiciones cromatográficas empleadas en esta investigación fueron las siguientes: Fase móvil: Acetonitrilo - solución acuosa de ácido fórmico 0,2% (80-20). Flujo: 1 mL/min. Volumen de inyección: 20 µL. Longitud de onda: 280 nm.

El contenido de (-)-epicatequina para cada muestra de cacao, fue determinado mediante una curva de calibración de área versus concentración, elaborada con el patrón de (-)-epicatequina (EC). Fueron inyectadas las muestras de los diferentes extractos metanólicos de los diferentes cacaos. A través de los valores de área obtenidos para cada elución y la curva de calibración, se determinó la concentración de (-)-epicatequina para cada extracto alcohólico.

1.2.5. Caracterización del extracto alcohólico proveniente del cacao Canoabo por Infrarrojo

Espectrometría FTIR: El espectro se realizó en el extracto metanólico, del cacao de origen de la región de Canoabo, empleando un espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier FTIR, modelo: Frontier Perkin Elmer.

1.2.6. Caracterización del extracto alcohólico proveniente del cacao Canoabo por Espectrofotometría UV-visible

Para obtener el perfil UV Vis de los flavonoides presentes en la muestra, se obtuvo una dilución adecuada del extracto para su lectura en el Spectronic Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, desde 190 a 1.100 nm de longitud de onda, usando como blanco metanol.

1.2.7. Determinación de flavonoides en el extracto alcohólico proveniente del cacao Canoabo

500 μ L de muestra fueron mezclados con 150 μ L de nitrito de sodio (NaNO_2 al 5 % (p/v)), 150 μ L de cloruro de aluminio (AlCl_3 10 % (p/v)), 1000 μ L de hidróxido de sodio (NaOH a 1 M) y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 10 mL. Se prepararon cinco patrones de concentración de 2,5 a 20 μ g/mL, a partir de una solución patrón madre de un patrón de (-)-epicatequina (EC). Se leyó la absorbancia a 510 nm. De acuerdo con el método descrito por Scotti y col ^[35].

1.2.8. Determinación de la tensión superficial de una solución acuosa de extracto polifenólico de cacao

Se determinó la tensión superficial de una solución al 1 % v/v de extracto polifenólico de cacao en agua, empleando el método de Du Noüy ^[36]. La medida se realiza sumergiendo el anillo de platino-ridio en la solución a analizar, luego se lo hace ascender lentamente, desprendiéndose el líquido del anillo y volviendo a su posición original.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1. Determinación del contenido de catequina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares son considerados compuestos polares, como las moléculas del grupo catequinas, por lo que son moderadamente solubles en solventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona^[34].

En la etapa del aislamiento y purificación es muy importante la identificación de los flavonoides presentes en el extracto. Para ello se pueden utilizar diferentes técnicas cromatográficas, como la cromatografía de papel (CP), la cromatografía de capa fina (CCF) y especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)^[32].

La identificación de los picos de HPLC de las (-)-epicatequinas en los tres extractos de cacao, fueron realizadas en base a la comparación con los cromatogramas a 280 nm del patrón de (-)-epicatequina, corridos bajo las condiciones especificadas anteriormente. Los cromatogramas se observan en Figura 1.10.

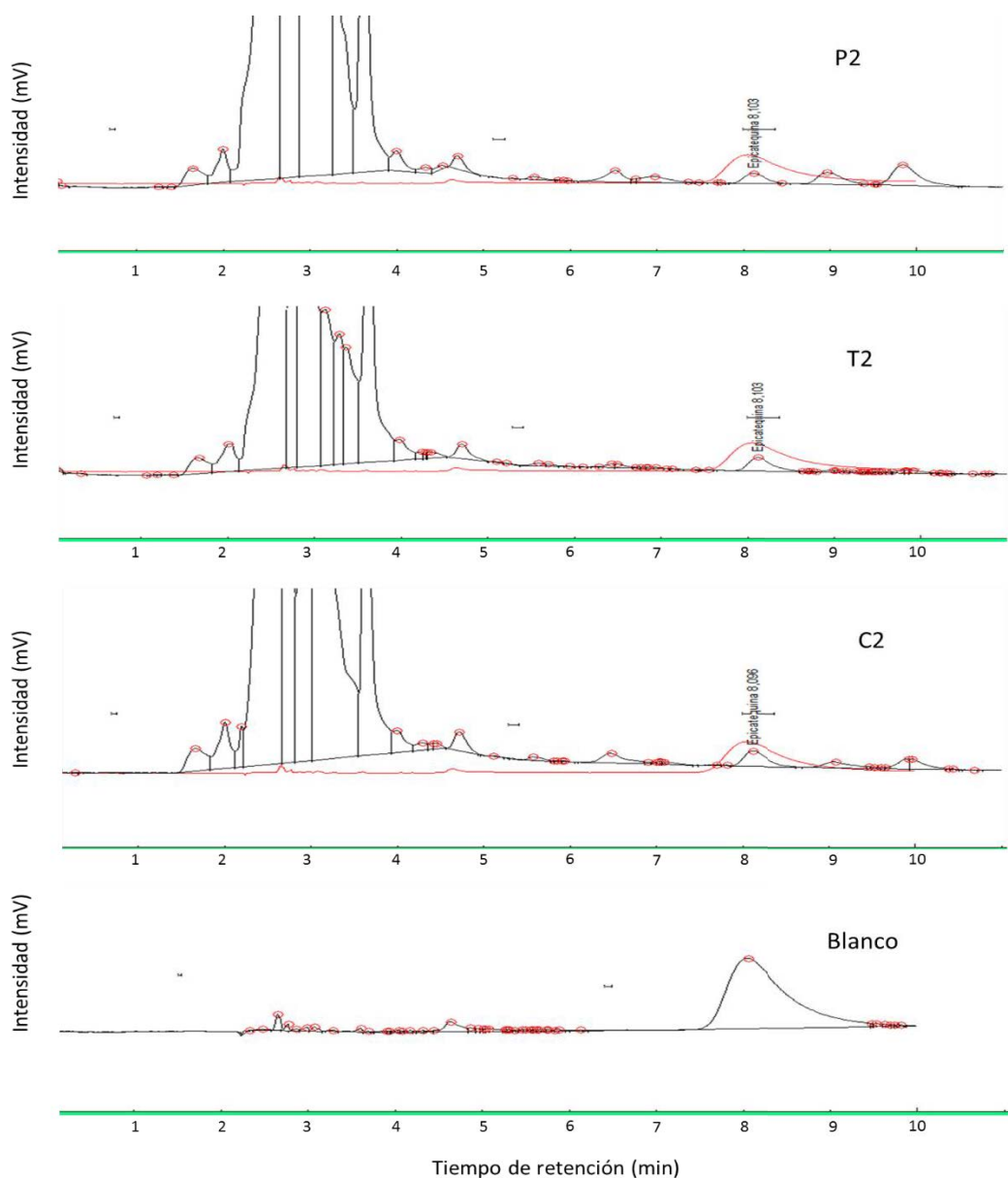


Figura 1.10. Cromatogramas de los extractos alcohólicos de cacao. P2 es el extracto alcohólico de las muestras de cacao provenientes de Patanemo, T2 es el extracto alcohólico de las muestras de cacao provenientes de Trincheras y C2 proveniente de Canoabo y el blanco (disolución patrón de (-)-epicatequina a 100 ppm).

En los tres cromatogramas de los extractos alcohólicos de cacao, se identificó el pico correspondiente a la (-)-epicatequina, comparando todos los picos de cada cromatograma, con el obtenido para el blanco. Dicho blanco consiste en una disolución del patrón de (-)-epicatequina a 100 ppm (Figura 1.10). El blanco mostró un tiempo de retención entre 7,956 min y 8,106 min. Se realizaron 3 corridas de elución para cada muestra y se corrió con su blanco para cada una. Identificando los picos de (-)-epicatequina a un tiempo de elución entre 7,916 min y 8,113 min en los extractos analizados.

A través de los valores de área obtenidos para cada elución y la curva de calibración construida con el patrón de (-)-epicatequina a diferentes concentraciones (10, 20, 50 y 100 ppm), se determinó la concentración de (-)-epicatequina para cada extracto metanólico. Los resultados de las concentraciones de (-)-epicatequina para cada muestra de cacao se observan en la Tabla 1.1. En la Tabla se reporta la cantidad de (-)-epicatequina en mg presente en cada extracto alcohólico y el porcentaje de (-)-epicatequina presente en la masa de cacao molido de cada muestra. Los cálculos típicos se encuentran reportados en el capítulo 1 del apéndice.

Tabla 1.1. Concentración de (-)-epicatequina en un volumen un extracto alcohólico de 10 mL, determinado por HPLC a las muestras de cacao de las 3 zonas carabobeñas.

Zona cacaotera	Canoabo	Trinchera	Patanemo
Concentración de EC (mg EC/kg $\pm$ 0,3)	211,3	205,8	152,6
Cantidad de EC (mg $\pm$ 0,01)	2,01	1,96	1,45
Porcentaje de EC en la muestra de cacao (m/m)	0,02	0,02	0,01

De las tres muestras de cacao analizadas, se determinó que la muestra obtenida de los granos de cacao procedentes de la región Patanemo y trincheras, presentaron menor concentración de epicatequina que la muestras de Canoabo. Por lo tanto, se descartó el empleo de las muestras provenientes de Trincheras y Patanemo, en la formulación final a elaborar.

Una vez determinada la precedencia del cacao a emplear en la formulación, se procedió a realizar una nueva extracción de los compuestos polifenólicos, de una mayor cantidad de muestra de cacao Canoabo.

Para la determinación del contenido de (-)-epicatequina, del nuevo extracto de polifenoles, se empleó nuevamente la técnica de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) descrita anteriormente, en la cual se obtuvo 10 mL de un extracto metanólico.

La identificación de los picos de HPLC de las (-)-epicatequinas, fue realizada en base a la comparación con el cromatograma a 280 nm del patrón de (-)-epicatequina, corridos bajo las condiciones especificadas anteriormente. Los cromatogramas se observan en Figura 1.11.

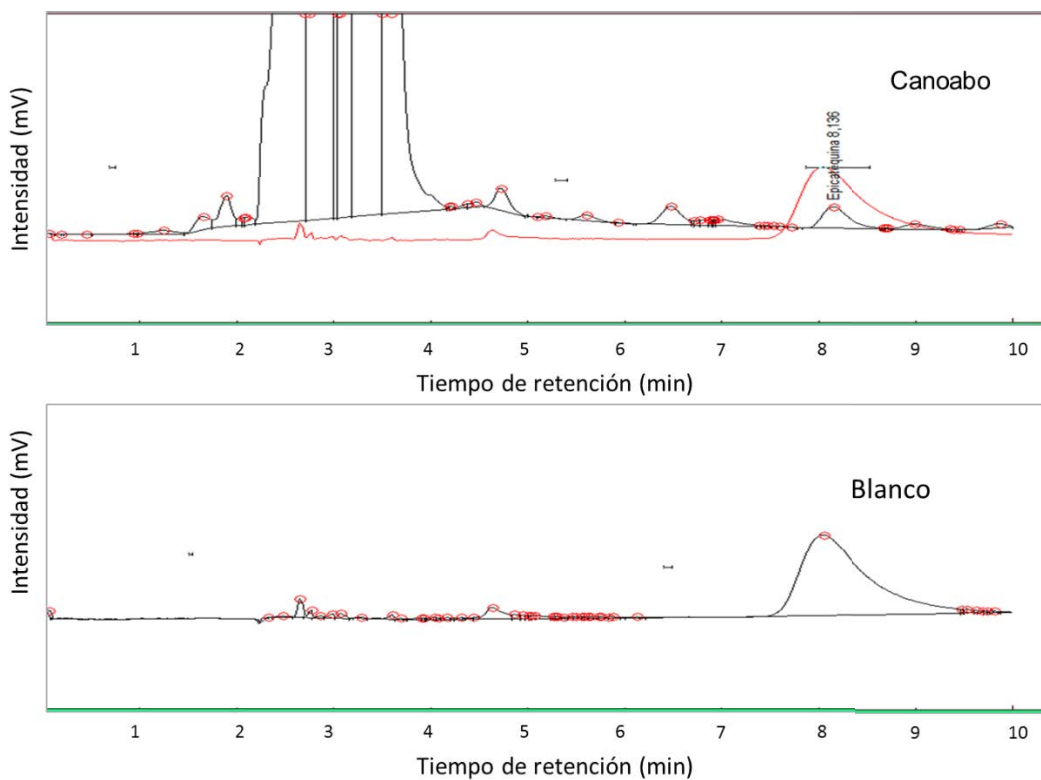


Figura 1.11. Cromatogramas del extracto de polifenoles del cacao proveniente de Canoabo y el blanco (disolución patrón de (-)-epicatequina a 100 ppm).

Esta muestra presentó una concentración de catequinas de $1.434,4 \pm 0,6$ mg/kg. En la Tabla 1.2 se reporta la cantidad de (-)-epicatequina en mg presente en extracto polifenólico y el porcentaje de monómeros de (-)-epicatequina presente en la masa de cacao molido.

Tabla 1.2. Concentración de (-)-epicatequina en un volumen un extracto alcohólico, determinado por HPLC a las muestras de cacao de la zona de Canoabo.

Contenido de (-)-epicatequina (EC)	Cacao Canoabo
Concentración de EC (mg EC/kg $\pm$ 0,6)	1.434,4
Concentración de EC (mg EC/g $\pm$ 0,02)	1,43
Cantidad de EC (mg $\pm$ 0,3)	13,6
Porcentaje de EC en la muestra de cacao (m/m)	0,3

Los granos de cacao no fermentados son ricos en polifenoles, aproximadamente el 35% del contenido total de polifenoles corresponde a (-)-epicatequina, una de las dos clases principales de polifenoles, siendo la otra las antocianinas ^[11, 12, 37]. De las etapas de beneficio del cacao (fermentado y secado), la fermentación es la que mayor impacto genera en la variación del contenido de polifenoles totales ^[38]. Durante la fermentación, los polifenoles experimentan una variedad de reacciones: la (-)-epicatequina presenta un proceso de oxidación y polimerización formando taninos complejos, lo que conlleva a una reducción de la concentración de (-)-epicatequina a aproximadamente 2-3 mg / g de granos de cacao fermentados ^[37]. Otros estudios, como de Payne y colaboradores ^[39], determinaron que el contenido de (-)-epicatequina en distintas muestras de cacao fermentado presentaron un intervalo de 0,78 – 1,69 mg/g de cacao fermentado.

Por tal motivo es lógico encontrar valores de (-)-epicatequina en las muestras de cacao fermentadas y secadas, más bajos de los reportados por la literatura para granos no fermentados. Adicionalmente, el contenido y la composición de los polifenoles varían mucho dependiendo del genotipo, origen, grado de madurez ^[27] y el ambiente donde se desarrollan los árboles ^[6].

Según Zapata ^[40] en el análisis a unas muestras de cacao colombiano, el contenido de (-)-epicatequina de los granos de cacao sometidos al proceso de fermentación varía en un intervalo de 3,14 y 10,20 mg/g en granos sin fermentar, y 0,26 y 3,90 mg/g en granos fermentados. En el caso del cacao Canoabo, el contenido de (-)-epicatequina en granos fermentados y secados es de $1,43 \pm 0,02$ mg EC/g. Esto indica que los valores obtenidos, no se alejan de los reportados en cuanto a la disponibilidad de (-)-epicatequina en granos de cacao fermentados y secados.

A través de la cuantificación de (-)-epicatequina por HPLC, se garantiza la presencia de esta molécula en el extracto alcohólico a incorporar en la formulación. La cromatografía líquida de alta resolución, como técnica cuantitativa puede ser usada para la separación, determinación cuantitativa e identificación de flavonoides. Esta técnica muestra niveles de resolución y sensibilidad mucho mayor que la cromatografía de papel o de capa fina, adicionalmente es empleada para comprobar la homogeneidad de las muestras aisladas por otras técnicas ^[32].

Esta es una de las principales moléculas responsables del efecto positivo a la piel de los polifenoles del cacao, como se mencionó en la introducción.

1.3.2. Caracterización del extracto alcohólico por espectroscopia de Infrarrojo

El espectro observado en la Figura 1.12, corresponde al extracto alcohólico de los granos de cacao Canoabo a temperatura ambiente. La caracterización por FT-IR se realizó empleando un equipo Frontier Perkin Elmer en la región de 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} .

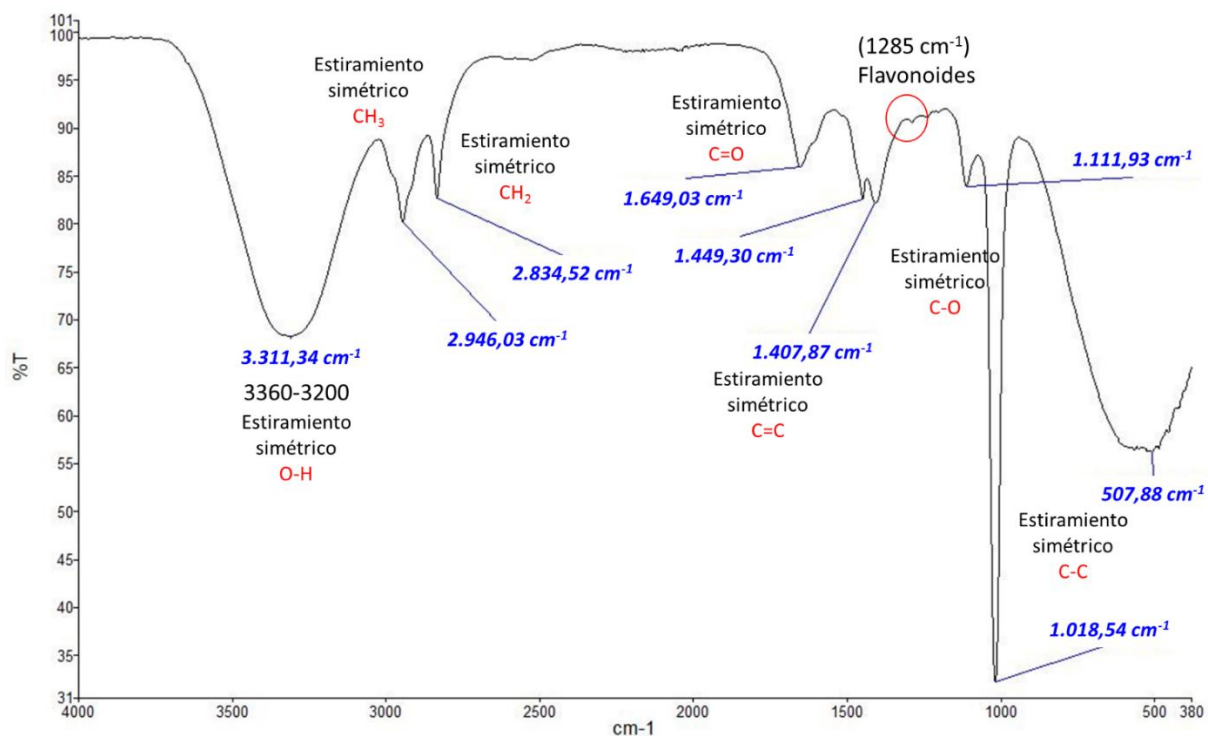


Figura 1.12. Espectro FTIR del extracto de polifenoles del cacao proveniente de Canoabo.

Como se mencionó anteriormente, los granos de cacao poseen una gran diversidad de compuestos [8-10]. En el extracto metanólico puede haber la presencia de diversos compuestos que poseen un gran número de grupos hidroxilos o azúcares, como los distintos compuestos del grupo de los flavonoides, además de las moléculas del grupo catequinas (como la (-)-epicatequina identificada por HPLC) [33].

En las moléculas pertenecientes al grupo flavonoides, están presentes los siguientes grupos funcionales más resaltantes: doble enlace carbono - carbono aromático, cetonas, enlace carbono – carbono. Además de que presentan sustituciones de grupos hidroxilos –OH [4, 14, 23, 41, 42].

Por lo tanto, al tratarse de una mezcla de diversos compuestos fenólicos, el espectro IR fue empleado para inferir la presencia de los grupos funcionales característicos de los flavonoides. En la elucidación de este espectro, se enfocó la atención especialmente en los flavan-3-oles o grupo de las catequinas, ya que 2 de los 3

grupos de polifenoles más importantes presentes en el grano de cacao, están conformados por los flaván -3-oles, en monómeros o en oligómeros y polímeros.

En la región de vibración de extensión X-H (4.000 cm^{-1} - 2.500 cm^{-1}), vibraciones de extensión de enlaces C-H características se identificaron en el presente estudio a 3.311 cm^{-1} y 2.834 cm^{-1} , las cuales podrían identificar una gran variedad de grupos funcionales ^[43].

Banda $3.311,34\text{ cm}^{-1}$: La banda de 3.500 a 3.200 cm^{-1} está relacionada con la vibración de estiramiento de grupos O-H. De 3.400 a 3.200 cm^{-1} aparecen los puentes de hidrógeno poliméricos posiblemente causados en gran medida por los grupos OH del metanol. En esta zona puede estar la señal de estiramiento H-O-H ($3.600\sim 3.100$). En esta amplia banda también se puede encontrar la señal solapada de los OH de los compuestos fenólicos ^[43-46].

Banda $2.946,03\text{ cm}^{-1}$ y $2.834,52\text{ cm}^{-1}$:

En la región de $2.800 \sim 3.000\text{ cm}^{-1}$ hay presente 2 bandas, una a $2.946,03\text{ cm}^{-1}$ y $2.834,52\text{ cm}^{-1}$. Esta es la región que indica la posible presencia de los grupos CH_3 y/o CH_2 . Estos grupos presentan una señal reflejo en la zona entre $1.475 \sim 1.445\text{ cm}^{-1}$, como se puede ver en el espectro es la banda a $1.449,3\text{ cm}^{-1}$, la cual está relacionada con la presencia del grupo CH_3 y CH_2 ^[45].

Estas bandas pueden estar indicando la presencia del grupo CH_3 , proveniente del metanol usado como solvente.

Además, si la banda obtenida en la zona entre $1.475 \sim 1.445\text{ cm}^{-1}$, se acerca al valor 1450 cm^{-1} (como lo es en este caso), puede indicar también, la presencia de grupos $-\text{CH}_2-$ presentes en ciclo alcanos ^[45], estructuras comunes en las moléculas del tipo flavan-3-ol.

Banda $1.649,03\text{ cm}^{-1}$:

En la región de $1.765 \sim 1.540\text{ cm}^{-1}$ hay presente 1 banda a $1.649,03\text{ cm}^{-1}$. Esta es la región que indica la posible presencia de los grupos carbonilos correspondiente a las cetonas. En este intervalo la señal obtenida podría ser originada al estiramiento del carbonilo ^[45].

Este grupo presenta una señal reflejo en la zona 1.100 cm^{-1} . Como se puede ver en el espectro es la banda a $1.111,93\text{ cm}^{-1}$, la cual está relacionada con la torsión del grupo carbonilo [45].

Banda $1.449,30\text{ cm}^{-1}$: La banda está relacionada a la señal de los estiramientos C-C y C-O [43-46].

Banda $1.407,87\text{ cm}^{-1}$: Se identifica una señal atribuible a polifenoles [42-46]. En particular, el pico alrededor de 1.285 cm^{-1} indica un rasgo característico de los taninos a base de flavonoides. Este pico se asignó a la vibración etérea de estiramiento C-C, que surge de la estructura de anillo derivada de pirano de esta clase de taninos. Este pico se encuentra generalmente en los espectros de las catequinas y procianidinas [43-47].

La presencia de los flavonoides podría estar también sugerida por la señal obtenida en el pico intenso a $1.018,54\text{ cm}^{-1}$, de interacciones C-C/C-O. Estas señales son solo complementarias, pues los estiramientos C-C, C-N y C-O caen en la misma región [45].

A través del análisis al espectro Infrarrojo se puede inferir, la presencia de los grupos funcionales característicos de los compuestos tipo flavonoides en el extracto alcohólico.

1.3.3. Caracterización cualitativa del extracto alcohólico por espectrofotometría UV-visible

Se determinó el espectro de absorción del extracto alcohólico, entre 190 y 1.100 nm de longitud de onda, usando como blanco metanol. Se obtuvo absorbancia en determinadas longitudes de ondas. El espectro es observado en la Figura 1.13.

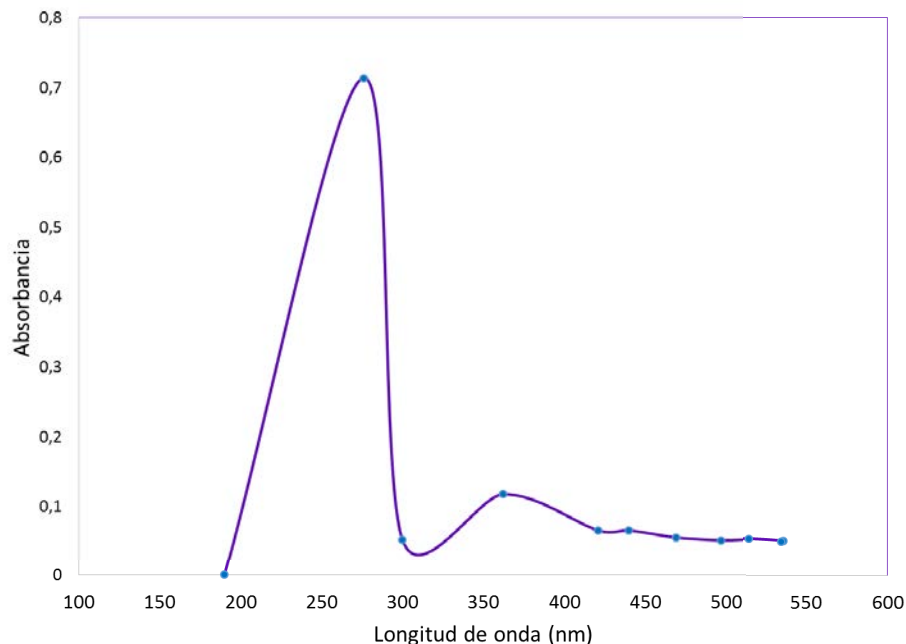


Figura 1.13. Espectro UV- Visible del extracto alcohólico de los granos de cacao Canoabo.

Todos los fenoles absorben la radiación en la región UV, para los flavonoides, el espectro típicamente consta de dos máximos de absorción en los intervalos de 240 a 285 nm (banda II) y 300 a 550 nm (banda I) ^[48].

Las posiciones precisas y las intensidades relativas de estas bandas proporcionan información valiosa sobre la naturaleza del flavonoide y su patrón de oxigenación. Según Robards y colaboradores ^[48], los flavonoides como los 6 y 8 hidroxiflavonol y auronas se caracterizan por una banda que se extiende hacia la región visible con máximos de onda larga de 380 a 430 nm, mientras que las antocianinas absorben en la región visible, generalmente a longitudes de onda 265-275 nm y superiores a 465-560 nm. También indica que las catequinas, se caracterizan por una banda con máximos de onda de 280 nm ^[48].

Si comparamos los valores de los picos obtenidos en el espectro, con los valores reportados por Robards y colaboradores ^[48], el pico obtenido a 280nm coincide con el intervalo reportado para las flavan-3-oles o grupo de catequinas. Y el pico

observado en el intervalo 350 a 380 nm podría sugerir la presencia del grupo de las chalconas, ya que estos últimos muestran una fuerte absorción a este intervalo ^[49]. No se evidencia en este extracto la presencia de otro tipo de flavonoides en estado monomérico.

Aunque no se evidencia la presencia de un pico claro en la zona de la banda I para antocianinas, en el espectro se observa que para la zona de la banda II si encuentra un pico. Por ellos se presume que pueda ser representativo de antocianinas. El cual podría estar solapado con el pico que indica la presencia de catequinas.

1.3.4. Determinación del contenido de flavonoides en el extracto alcohólico por espectrofotometría UV-visible

La determinación del contenido de flavonoides, se basa la formación de complejos estables, que forma el catión de aluminio con flavonoides en metanol (Figura 1.14). Este complejo produce un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Por lo que el análisis espectrofotométrico se realiza a 510 nm. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que se encuentran presente en los tejidos vegetales ^[50].

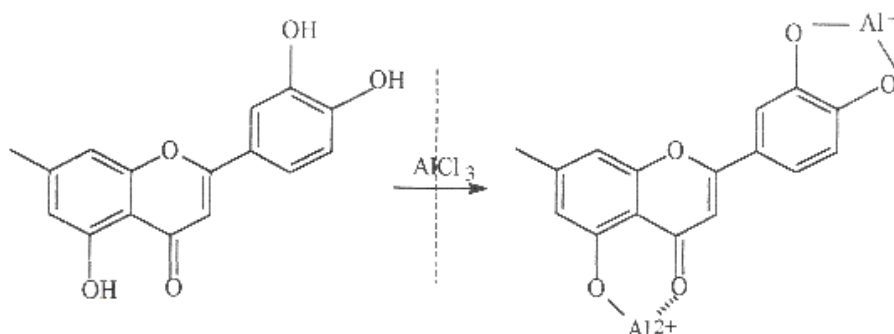


Figura 1.14. Formación de complejo Flavonoide-Al en solución metanólica de cloruro de aluminio ^[50].

El contenido de flavonoides determinado fue de $7.792,2 \pm 0,3$ mg EC/L ($8,20 \pm 0,03$ mg EC/g) en el extracto concentrado.

Según un estudio realizado por Avedaño y col. ^[51] en el cual se determinó, que el contenido de flavonoides en granos de cacao secados y no fermentados, en genotipos de cuatro especies de Theobroma de distintos orígenes de cacao mexicano, varía entre 1,61 a 30,35 mg/g. Otro estudio realizado por Sotero y col. ^[52], en el cual analizaron semillas de cacao peruano, reportaron el contenido de flavonoides de 538,60 mg/100 g (5,39 mg/g).

Comparando el resultado obtenido con los reportados por Avedaño y col. ^[51] y Sotero y col. ^[52], se observa que el contenido de flavonoides para el cacao Canoabo, se encuentra dentro del promedio, entre las muestras analizadas de los estudios reportados. Incluso, siendo mayor al reportado para la muestra del cacao peruano. El contenido de (-)-epicatequina, se encuentra presente en un 18 % m/m en el contenido total de flavonoides (ver apéndice del capítulo 1), lo que corresponde a un alto contenido, ya que en granos sin fermentar ni secar, el contenido de catequinas representa aproximadamente el 35 % del contenido de flavonoides ^[11].

1.3.5. Determinación de la tensión superficial de una solución acuosa de extracto polifenólico de cacao

Las medidas de tensión superficial de la solución acuosa del extracto metanólico al 1 % v/v dio un valor de 55,5 dinas/cm. Este valor fue comparado con la tensión superficial del agua (72,8 dinas/cm) y una solución acuosa de metanol al 1 % v/v (71,8 dinas/cm). El resultado evidencia que las especies presentes en el extracto polifenólicos, disminuyen de manera significativa la tensión superficial, tal como lo sugiere Reitzer ^[53], señalando que los compuestos polifenólicos presentan actividad interfacial.

El extracto de cacao será incorporado como ingrediente activo en una formulación del tipo nanoemulsión, a una concentración determinada para lograr el efecto requerido de los polifenoles.

1.4. CONCLUSIONES

- ✓ A través de la cuantificación de (-)-epicatequina por HPLC, se garantiza la presencia de esta molécula en el extracto alcohólico a incorporar en la formulación.
- ✓ De las 3 muestras de cacao analizadas, se determinó que la muestra obtenida de los granos de cacao procedentes de la región Canoabo, presenta mayor contenido de (-)-epicatequina que las otras dos muestras de cacao.
- ✓ El extracto alcohólico del cacao **Canoabo** en una segunda extracción, tiene una concentración de (-)-epicatequina de 1.434,4 mg EC/kg en el extracto concentrado de 10 mL, proveniente de una masa de $47,5871 \pm 0,0001$ g.
- ✓ Se determinó que la concentración de flavonoides es igual a $7.792,2 \pm 0,3$ mg EC/L ($8,20 \pm 0,03$ mg EC/g) en el extracto concentrado del cacao Canoabo.
- ✓ El análisis al espectro Infrarrojo señala la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides en el extracto alcohólico.
- ✓ El contenido de (-)-epicatequina, se encuentra presente en un 18 % m/m en el contenido total de flavonoides, el cual se encuentra en una concentración de 7.800 mg/L en 10 mL del extracto concentrado.
- ✓ Adicionalmente, empleando la espectroscopia de infrarrojo y UV-Visible, se puede determinar la presencia de flavonoides, sugiriendo la presencia de otras posibles especies además del grupo flavan-3-ol o catequinas.
- ✓ Los polifenoles pueden comportarse como anfífilos, esto se evidencia en los resultados reportados, donde se presenta una disminución de tensión superficial del agua en 17,3 unidades de tensión, en relación a una solución acuosa al 1 % v/v de extracto polifenólico.
- ✓ Con los resultados obtenidos se garantiza que el extracto contenido en la formulación, contiene polifenoles y se garantiza la presencia de monómeros de (-)-epicatequina.

1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferrer J., Austin M., Stewart C., and Noel J. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 356-370, 2008.
2. Soto M., Falqué E., & Domínguez H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*, 2: 259-276, 2015.
3. Quiñones M., Miguel M., y Aleixandre A., Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27:76-89, 2012.
4. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333, 1998.
5. Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159, 1997.
6. Vázquez-Ovando A. Ovando-Medina I. Adriano-Anaya L. Betancur-Ancona D. Salvador-Figueroa, M. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66: 239-254, 2016.
7. Dantas L., Guerra M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. *Genetics and Molecular Biology*, 3: 94-98, 2010.
8. Kalvatchev Z., Garzaro D., Guerra F. *Theobroma Cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria*, 4: 23-25, 1998.
9. Scapagnini G., Davinelli S., Di Renzo L., De Lorenzo A., Olarte H., Micali G., Gonzalez S. Cocoa Bioactive Compounds: Significance and Potential for the Maintenance of Skin Health. *Nutrients*, 6: 3202-3213, 2014.
10. Liendo R., Padilla F., Quintana A. Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50: 200-205, 2000.

11. Aprotosoia A., Luca S., Miron A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 73-91, 2015.
12. Khan N., Nicod N. Biomarkers of cocoa consumption. In: Paoletti R, Poli A, Conti A, Visioli F, editors. *Chocolate and health*. Milan/Dordrecht/Heidelberg/London/New York: Springer-Verlag. 33-41, 2012.
13. Brglez E., Knez M., Skerget M., Knez Z., & Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21, 901, 2016.
14. Weber H., Hodges A., Guthrie J., O'Brien B., Robaugh D., Clark A., & Smith C. Comparison of Proanthocyanidins in Commercial Antioxidants: Grape Seed and Pine Bark Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 148–156, 2007.
15. Braicu C., Ladomery M., Chedea, V., Irimie A., & Berindan-Neagoe I. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*, 141, 3282-3289, 2013.
16. Miao M., Jiang H., Jiang B., Li Y., Cui S., & Zhang T. Structure elucidation of catechins for modulation of starch digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 57: 188–193, 2014.
17. Yao L., Jiang Y., Shi J., Tomas-Barberan F., Datta N., Singanusong R., & Chen S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59: 113-122, 2004.
18. Salah N., Miller N. J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G. P., & Rice-Evans C. A. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322: 339–346, 1995.
19. Sinopoli A., Calogero G., & Bartolotta A. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 297, 124898, 2019.

20. Garzón G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36, 2008.
21. Nazarrudin R., Seng L., Hassan O., Said M. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24:87-94, 2006.
22. Niemanak N., Rohsius C., Elwers S., Ndoumou D., Lieberei R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 612–619, 2006.
23. Cos P., Bruyne T., Hermans N., Apers S., Berghe D., & Vlietinck A. Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1345–1359, 2004.
24. Andújar I., Recio M., Giner R., Ríos J. Cocoa Polyphenols and Their Potential Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012:1–23, 2012.
25. Schewe T., Sadik C., Klotz L., Yoshimoto T., Kühn H. Sies H. Polyphenols of Cocoa: Inhibition of Mammalian 15-Lipoxygenase. *Biological Chemistry*, 382: 1687-1696, 2001.
26. Moini H.; Guo Q.; Packer L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 132, 1825, 2002.
27. Rusconi M., Conti A. *Theobroma cacao* L., the food of the gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*, 61: 5–13, 2010.
28. Carrillo L., Londoño J., Gil A. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60: 273-280, 2014.
29. Trognitz B., Cros E., Assemet S., Davrieux F., Forestier-Chiron N., Ayestas E., Kuant A., Scheldeman X., Hermann M. Diversity of cacao trees in Waslala, Nicaragua: associations between genotype spectra, product quality and yield potential. *Plos One*, 8:e54079, 2013.

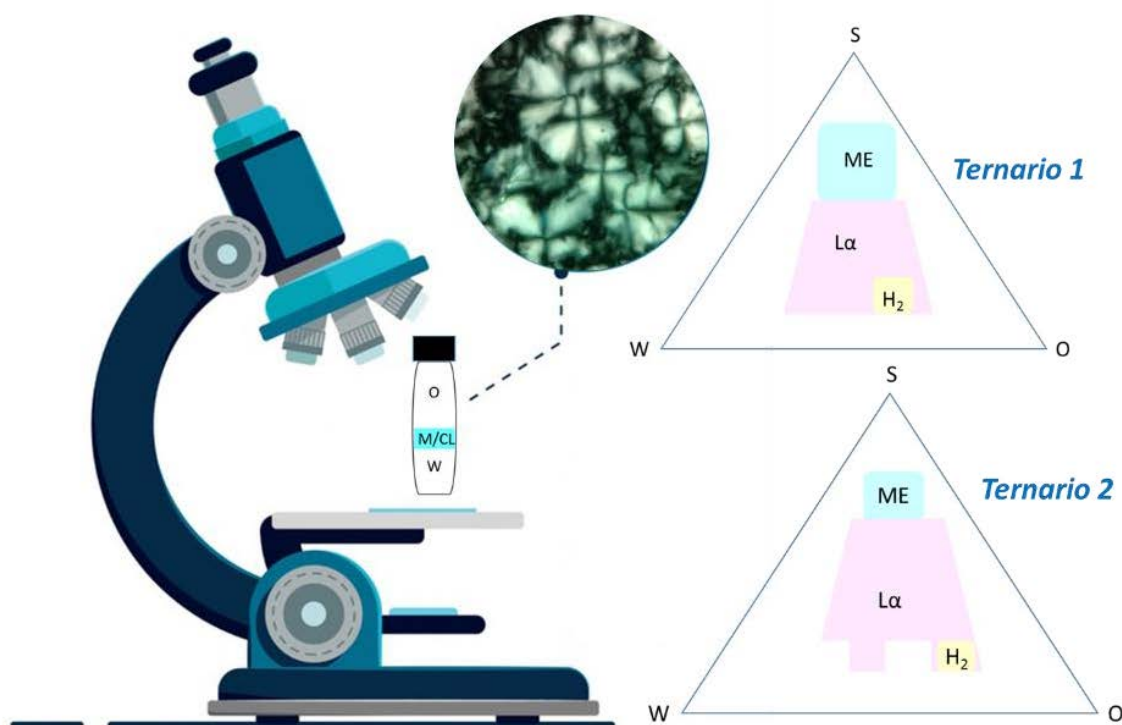
30. Kothe L., Zimmermann B., Galensa R. Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chemistry*, 141: 3656–3663, 2013.
31. Hurst W., Krake S., Bergmeier S., Payne M., Miller K., Stuart D. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chemistry Central Journal*, 5: 53, 2011.
32. Cartaya O.; Reynaldo I. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22: 5-14, 2001.
33. Arlorio M., Bottini C., Travaglia F., Locatelli M., Bordiga M., Coisson J., Tessitore L. Protective Activity of Theobroma cacao L. Phenolic Extract on AML12 and MLP29 Liver Cells by Preventing Apoptosis and Inducing Autophagy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10612–10618, 2009.
34. Arlorio M., Locatelli M., Travaglia F., Coisson J., Grosso E. D., Minassi A., Martelli A. Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (Theobroma cacao L.). *Food Chemistry*, 106, 967–975, 2008.
35. Scotti E., Velásquez I., Ojeda L., Pacheco F., Noguera-Machado F. Characterization and incorporation of an extract of passion fruit seeds (Passiflora edulis) in a hydrogel, *Revista Ingeniería UC*, 27: 273-281, 2020.
36. Velásquez, I., Muñoz, A., and Pereira, J. C. Tuning Interfacial Activity of Polymeric Resin–Surfactant/n-Alcohol Solution Interactions. *Journal of Surfactants and Detergents*, 19: 1025–1032, 2016.
37. Richelle M., Huynh-Ba T., Tavazzi I., Mooser V., Enslen M., & Offord E. A. Antioxidant Capacity and Epicatechin Bioavailability of Polyphenolic-Rich Beverages (Cocoa and Teas). *Caffeinated Beverages*, 102–110, 2000.
38. Pallares A., Estupiñán A., Mauren R., Perea J., López G., López L. Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, 29: 7-21, 2016.

39. Payne, M. J., Hurst, W. J., Miller, K. B., Rank, C., & Stuart, D. A. (2010). Impact of Fermentation, Drying, Roasting, and Dutch Processing on Epicatechin and Catechin Content of Cacao Beans and Cocoa Ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10518–10527.
40. Zapata S., Tamayo A. Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 18: 391- 404, 2013.
41. Shahidi F., & Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18: 820–897, 2015.
42. Ramírez M., Barajas L., Pérez C., Sáenz A., Silva S., Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [Internet]. 43:7-14, 2012
43. Domínguez-Pérez L., Lagunes-Gálvez L., Barajas-Fernández J., Olán-Acosta M., García-Alamilla R., García-Alamilla P. Caracterización vibracional de grupos funcionales en granos de cacao durante el tostado usando espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier. *Acta universitaria*, 29, 2019.
44. R. M. da S. M., McGuinness, G. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria*, 21: 767–779, 2016.
45. Rojo Callejas F. Tablas de Espectroscopía Infrarroja. Departamento de fisicoquímica, Facultad de química. Universidad Nacional autónoma de mexico. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_34338.pdf
22/07/2020
46. Castañeda-Pérez E., Osorio-Revilla G., Gallardo-Velázquez T. Proal-Najera J. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12: 193-204, 2013.
47. Edelman A., Lendl B. Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin–Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 124: 14741–14747, 2002.

48. Robards K., & Antolovich M. *Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids A Review. The Analyst*, 12: 11R–34R, 1997.
49. Pietta P. and Mauri P. Flavonoids and Other Polyphenols, Analysis of Flavonoids in Medicinal Plants edited by Lester Packer. METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 335. ACADEMIC PRESS 2001.
50. Marcucci M. C, Woisky R. G, Salatino A y Facultad de Farmacia de la Universidad Bandeirante. Uso de Cloruro de aluminio en la medición de flavonoides en muestras de propoleo, San Paulo, Brasil. <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm> Revisado 22/10/2021.
51. Avendaño C., Campos E., López C., Martínez M., Caballero J., Báez Alonso, M., Ariza Flores, R., & Cadena Iñiguez, J. (2021). Actividad antioxidante en genotipos de Theobroma spp. (Malvaceae) en México. Revista de Biología Tropical, 69, 507-523. DOI 10.15517/rbt.v69i2.41626
52. Sotero V., Maco M., Vela J., Merino C., Dávila E., García D. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia. Sterculiaceae Sterculiaceae. Revista de la Sociedad Química del Perú. 77 (1) 2011.
53. Reitzer F., Allais M., Ball V. and Meyer F. Polyphenols at interfaces. Advances in Colloid and Interface Science, 257:31-41, 2018.

CAPÍTULO II. SISTEMAS TERNARIOS, MICROEMULSIONES Y CRISTALES LÍQUIDOS

Este capítulo muestra los resultados de la formulación, análisis y caracterización de sistemas surfactantes/aceite/ agua en dos diagramas ternarios, para el cumplimiento del objetivo 2. *ANALIZAR EL COMPORTAMIENTO DE FASE DE SISTEMAS SURFACTANTE/ACEITE/AGUA PARA COMPRENDER LAS PROPIEDADES INTERFACIALES DE LOS COMPONENTES EMPLEADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.*



2.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.1. Los surfactantes

Un surfactante (nombre proveniente de la contracción del termino en inglés "surface-active agent", agente tensoactivo) tienen una estructura molecular característica que consiste en un grupo que tiene muy poca atracción por el disolvente, conocido como un grupo liofóbico, junto con un grupo que tiene una fuerte atracción para el disolvente, llamado grupo liofílico. Esto es conocido como una estructura anfipática ^[1] (Figura 2.1).

Cuando un surfactante está presente a baja concentración en un sistema, tiene la propiedad de adsorberse sobre las superficies o interfases del sistema, alterando significativamente las propiedades físicas de esas interfases (la energía libre superficial o interfacial de esas superficies) El termino interfase indica un límite entre dos fases inmiscibles, el termino superficie denota la interfaz donde una fase es gas, generalmente aire. La energía libre interfacial es la mínima cantidad de trabajo requerida para crear esa interfase ^[1].

Cuando una molécula con estructura anfipática es disuelta en un disolvente, el grupo liofóbico puede distorsionar la estructura del disolvente, incrementando la energía libre del sistema. Cuando eso ocurre, el sistema responde de alguna manera para minimizar el contacto entre el grupo liofóbico y el solvente ^[1].

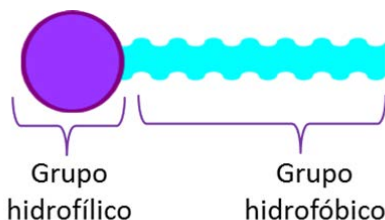


Figura 2.1. Representación esquemática de una molécula de surfactante, la cual consta de una parte hidrofóbica y una hidrofílica. Modificado de Krister Holmberg y col ^[2].

En el caso de un surfactante disuelto en solución acuosa, el grupo liofóbico (hidrofóbico) distorsiona la estructura del agua (por el rompimiento de los enlaces

de hidrógeno entre las moléculas de agua y estructurándolas nuevamente en la proximidad de los grupos hidrofóbicos). Como resultado de esta distorsión, algunas moléculas de surfactantes son expelidas a la interfase del sistema, con sus grupos hidrofóbicos orientados a minimizar el contacto con las moléculas del agua ^[1].

La superficie del agua se cubre con una sola capa de moléculas de surfactantes con sus grupos hidrofóbicos orientados predominantemente hacia el aire. Esta migración del surfactante a la interfase, es ocasionada por el efecto hidrofóbico, que genera el rechazo del agua hacia la cola hidrofóbica del surfactante. Esta disminución en la disimilitud de las dos fases que se ponen en contacto en la superficie, resulta en una disminución de la tensión superficial del agua. Por otro lado, la presencia del grupo liofílico (hidrofílico) impide que el surfactante sea expulsado completamente del disolvente como una fase separada, ya que requiere la deshidratación del grupo hidrófilo ^[1].

La estructura anfipática del surfactante provoca, no solo la concentración de éstos en la superficie y la disminución de la tensión superficial del agua, sino también la orientación de la molécula en la superficie con su grupo hidrofílico en la fase acuosa y su grupo hidrofóbico orientado lejos de los grupos hidrofílicos ^[1].

Además del fenómeno de adsorción interfacial, esto da como resultado otra propiedad característica de los sistemas tensoactivos, la tendencia a formar agregados. Esta tendencia a formar agregados también es consecuencia del efecto hidrofóbico y de las interacciones hidrofóbicas ^[1, 2].

2.1.2. Diferentes asociaciones de sistemas anfífilos

El autoensamblaje de los surfactantes lleva a la formación de una serie de diferentes estructuras, como micelas esféricas, micelas, cilíndricas, discos, gusano, estructuras bicontinuas, fases lamelares y vesículas. Algunos de los sistemas anfífilos más importantes se muestran en la Figura 2.2.

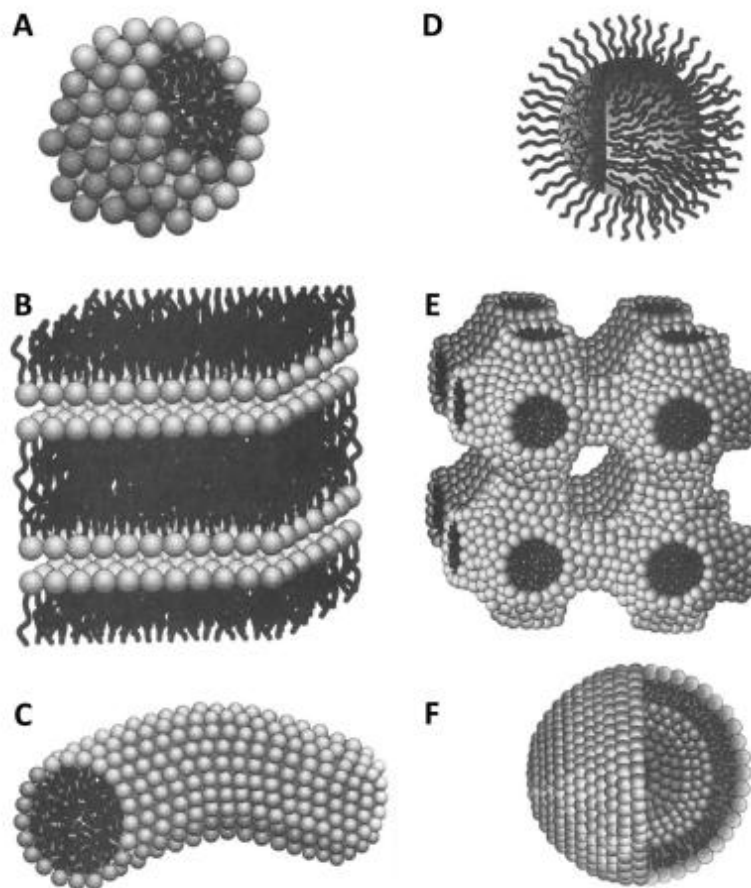


Figura 2.2. Algunas de las estructuras formadas por autoensamblaje de surfactantes o moléculas anfifílicas. a) Micelas esféricas, b) fase lamelar, c) Micelas cilíndricas, d) Micelas reversas, e) Estructuras bicontinuas, f) Vesículas [2].

Los sistemas que contienen anfífilos, son clasificados en sistemas homogéneos y heterogéneos. Los sistemas homogéneos o fases simples son clasificados en fases sólidas, soluciones isotrópicas y fases cristales líquidos. En el caso de los sistemas heterogéneos, se presentan distintos sistemas con dos o más fases, como las emulsiones y dispersiones [2,3] (Figura 2.3).

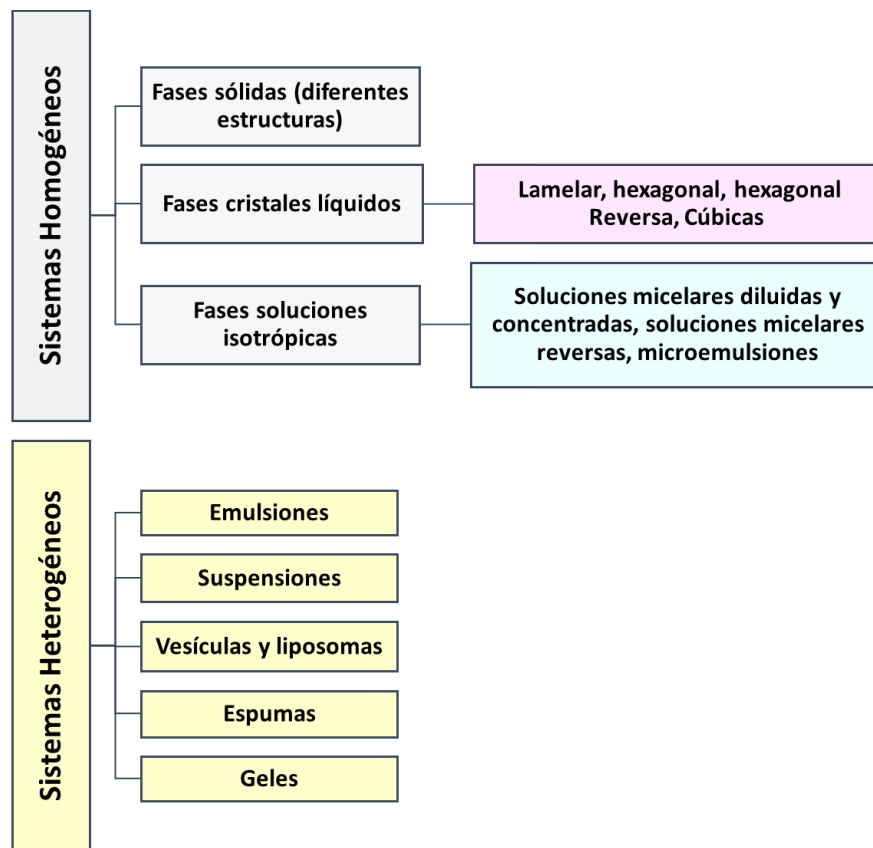


Figura 2.3. Clasificación de algunos sistemas anfifílicos homogéneos y heterogéneos [2].

Las emulsiones, son sistemas dispersos formados por dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales se encuentra dispersada en forma de pequeñas gotas que son estabilizadas por un surfactante, a veces calificado de emulsionante. Existen diversos tipos de emulsiones: emulsiones simples de tipo agua-en-aceite (W/O) o aceite-en-agua (O/W), emulsiones múltiples O/W/O o W/O/W), nanoemulsiones simples (W/O u O/W), y microemulsiones, siendo estos últimos sistemas monofásicos a pesar de su nombre [4].

Una característica importante que diferencia los sistemas homogéneos, es orden molecular que presentan. Las estructuras cristalinas presentan un ordenamiento molecular de largo y corto alcance, las soluciones isotrópicas presentan un

desorden molecular de largo y corto alcance, mientras los cristales líquidos presentan un desorden a corto alcance y un ordenamiento a largo alcance [2].

Dependiendo de la estructura molecular del tensoactivo, la asociación molecular tiene lugar por encima de una concentración bien definida, la concentración micelar crítica (CMC). A esta concentración tiene lugar la micelización o agregación de los surfactantes. En la CMC, la interfase tiene una cobertura (casi) máxima y para minimizar más energía libre, las moléculas comienzan a agregarse en el seno del líquido. Por encima de la CMC, el sistema consta entonces de una capa monomolecular adsorbida, monómeros libres y tensoactivos micelizados en el seno del líquido, encontrándose estos tres estados en equilibrio. Por debajo de la CMC, la adsorción es un equilibrio dinámico con moléculas de tensoactivo que llegan y salen de la superficie de forma permanente [5-7].

Las micelas, suelen ser grupos de 50 a 200 moléculas de tensoactivo, esto se denomina número de agregación, cuyo tamaño y forma se rigen por consideraciones geométricas y energéticas [5].

En el agua, la agregación resulta del efecto hidrofóbico, es decir, del rechazo del agua hacia la parte no polar del surfactante. El empaque de las cadenas hidrocarbonadas resulta de la minimización del contacto de estas con el agua. Básicamente las estructuras formadas son un balance entre su parte polar y no polar del surfactante, es decir su balance hidrofílico lipofílico (HLB por sus siglas en inglés) [2].

La asociación de estructuras refleja la forma de la molécula constituyente y se predice por el valor numérico del parámetro de empaquetamiento crítico (CCP, por sus siglas en inglés). El CCP es denotado como la relación entre el volumen de la sección transversal de la cadena hidrocarbonada del surfactante y el volumen del grupo polar (v/a). Esta relación da la caracterización geométrica de un surfactante. Donde a indica el área de la sección transversal del grupo hidrófilo, l es la longitud extendida de la cadena hidrofóbica, y v es el volumen del grupo hidrofóbico [8, 9].

El CPP es un parámetro no dimensional y es útil para la estimación de estructuras de asociación de los surfactantes. Una molécula anfifílica al tener un CPP alrededor de 1, forma agregados moleculares en forma de placa de curvatura cero. Si el CPP es menor que 1, se forman agregados moleculares que forman una curvatura convexa hacia la fase acuosa. Los agregados esféricos se forman a valores de CPP menores que $1/3$, mientras que los agregados en forma de varilla se forman a valores de CPP entre $1/2$ y $1/3$. Por otro lado, los agregados invertidos que orientan sus cadenas hidrófobas hacia el exterior se forman con valores de CPP mayores que 1. Aunque el CPP no es una garantía perfecta para la formación de cierta estructura de asociación, es útil para comprender la relación entre el carácter geométrico de una molécula anfifílica y la estructura asociativa ^[8,9] (Figura 2.4).

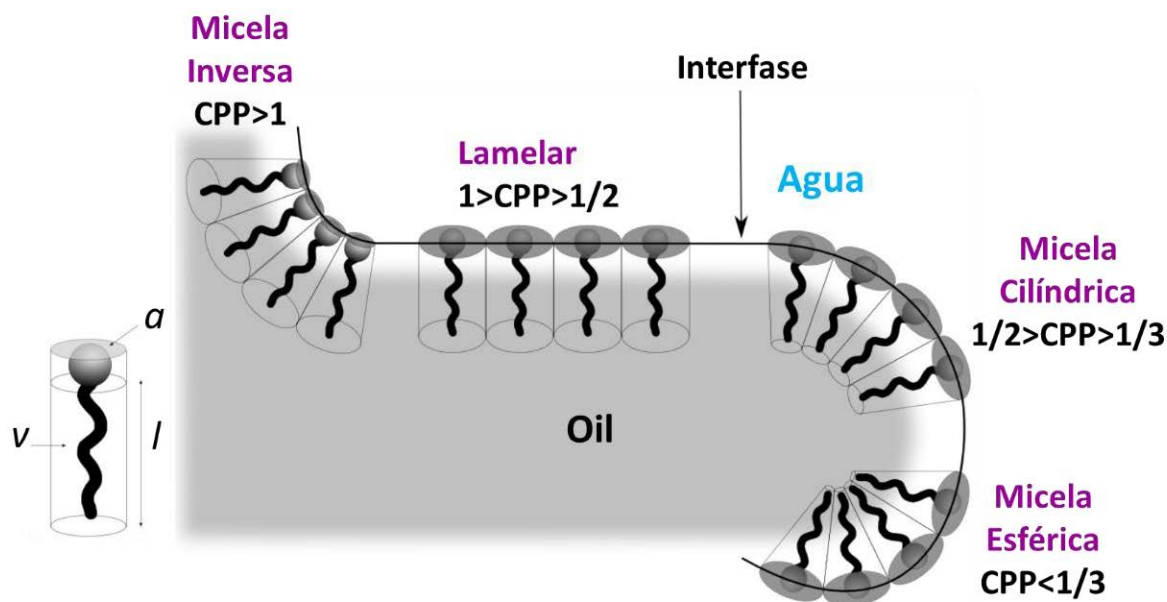


Figura 2.4. Esquema de las estructuras de autoensamblaje correspondiente a los valores de parámetro crítico de empaque (CPP) Modificado de Rajabalaya R. ^[10]

Clasificación de los surfactantes

Comúnmente se utiliza una clasificación simple de tensoactivos basada en la naturaleza del grupo hidrófilo. Se pueden distinguir tres clases principales, iónicos, no iónicos y anfóteros. Los iónicos (aniónicos y los catiónicos), se disocian en agua en dos especies de carga opuesta (el ion tensoactivo y su contraión). Los no iónicos, que incluyen una parte altamente polar (no cargado), como polioxietileno (-OCH₂CH₂O-), o bien grupos poliol. Los zwitteriónicos (o anfóteros), que combinan tanto un grupo positivo como uno negativo sobre una misma estructura ^[5].

2.1.3. Los surfactantes no iónicos

Estos surfactantes son compatibles con todos los otros tipos de surfactantes. Generalmente disponible como material 100% activo libre de electrolitos. Puede hacerse resistente al agua dura, cationes metálicos polivalentes, electrolitos a alta concentración. Son solubles en agua y solventes orgánicos, incluidos los hidrocarburos ^[1].

La mayoría de los no iónicos tiene como cabeza polar grupos poliéter que consisten en oxietileno, los cuales provienen de la polimerización del óxido de etileno. En un surfactante las unidades de oxietileno pueden ir de 4 a 40. Ejemplo de surfactantes con grupo polar basados en polihidroxil (poliol) son los esteres de sucralosa, esteres de sorbitano, alquil glucósidos y esteres de poliglicerol. Estos surfactantes poliol, también pueden ser etoxilados, como por ejemplo los esteres de ácidos grasos de sorbitano (conocidos bajo el nombre del comercio Atlas como Span) y el correspondiente producto etoxilado conocido como Tween ^[2].

Los métodos de elaboración de nanoemulsiones por baja energía, se basan casi exclusivamente en el uso de surfactantes para los cuales la cabeza polar es una cadena de poli etilenglicol (PEG y tensoactivos PEGilados), que son una forma particular de surfactante no iónico. Se ha utilizado en los métodos de emulsión espontánea, pero su comportamiento global y su papel en estos procesos de emulsión siguen un mecanismo universal ^[11]. Por tal motivo el estudio del

sistema de fases ternario es realizado empleando surfactantes no iónicos del tipo etoxilados.

Algunos de los de tensoactivos no iónicos ejemplos representativos son, Tween 80, Tween 85, Span 80 y Span 20 (observado en la Figura 2.5). Tienen un alto grado de compatibilidad con otros ingredientes, buena estabilidad química y baja toxicidad [12]. Específicamente, el Trioleato de sorbitano con 20 moles de polioxietileno (Tween 85) es empleado en nanoemulsiones cosméticas y farmacéuticas [13,14].

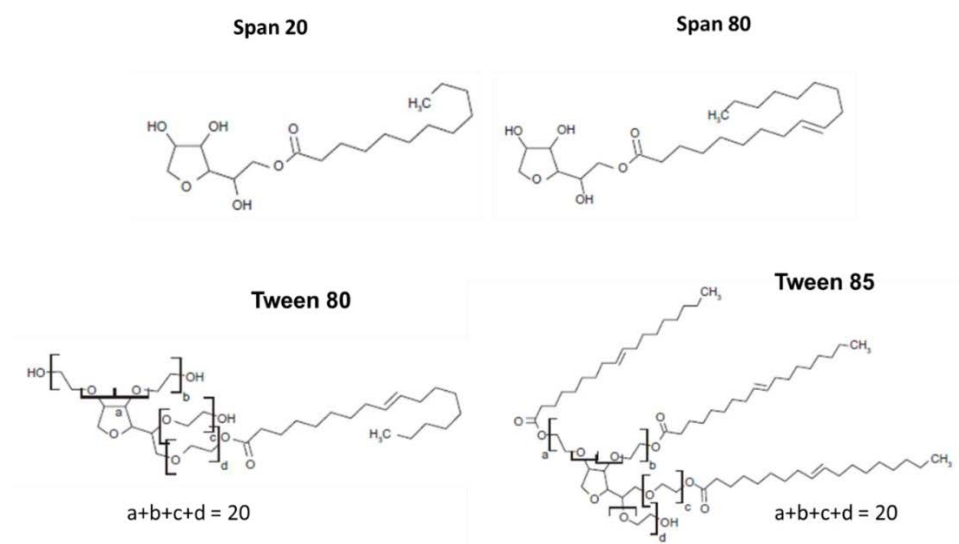


Figura 2.5. Span 20 (Monolaurato de sorbitano), Span 80 (Monooleato de sorbitano), Tween 80 (monooleato de sorbitano con 20 moles de polioxietileno) y Tween 85 (Trioleato de sorbitano con 20 moles de polioxietileno) [12].

Este tipo de surfactantes no iónicos, se derivan de materias primas renovables, empleando como grupo hidrófobo ácidos grasos y como grupos hidrofílicos, se emplean carbohidratos como la glucosa [15].

Partiendo de un carbohidrato como la glucosa, la cual es hidrogenada catalíticamente para generar el sorbitol. Luego de un proceso de deshidratación al que es sometido el sorbitol, se obtiene una mezcla de polioles a base de furano, conocido como sorbitano. El isómero predominante es el 1, 4 – sorbitano [15].

Luego, el sorbitano se acila en un proceso que puede ser realizado en uno o dos pasos (como se ilustra en la Figura 2.6), con un ácido graso en presencia de una base y calor, para dar ésteres de sorbitano de diversos grados de sustitución dependiendo de la estequiometría.

Estos esteres de sorbitano conocidos como Span, pueden ser etoxilados a través de sus grupos hidroxilos disponibles, para obtener los surfactantes de la serie Tween. En el caso particular del Tween 85, es el resultado de la polietoxilación del Span 85 ^[15].

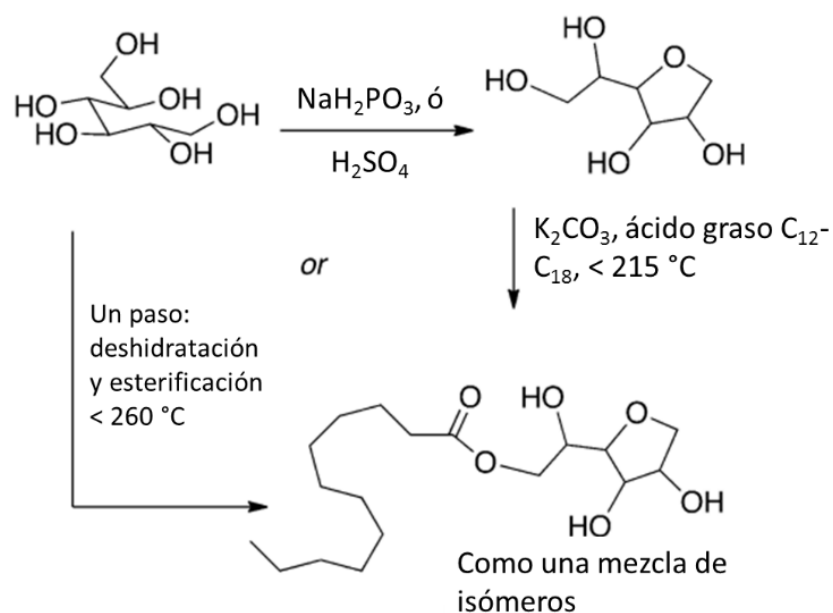


Figura 2.6. Los enfoques de uno y dos pasos para los ésteres de sorbitano a partir de sorbitol y ácidos grasos ^[15].

Diagramas de fases ternarios

Los diagramas de fase, muestran los fenómenos de autoensamblaje como función de la composición, temperatura, presión, etc. y proporcionan información sobre el estado de disolución de los tensoactivos y las transiciones de fases bajo ciertas condiciones específicas ^[16].

El triángulo de Gibbs, se usa comúnmente para representar el comportamiento de una fase a una temperatura constante. Un diagrama de fase del triángulo de Gibbs, en un sistema de SOW a temperatura constante, se puede representar de la siguiente manera, como se observa en la Figura 2.7. Los vértices representan tres componentes puros, lo que significa que la concentración de cada componente disminuye a medida que se aleja de cada vértice. El diagrama de fase se complica cuando el número de componentes aumenta, en este caso se representan bajo relación de mezclas de componentes, a temperatura y presión constante [16].

Los diagramas de fases, definen las condiciones experimentales para la estabilidad de ciertos sistemas, y permiten el mapeo de las fronteras de las fases. Por lo tanto, representan una herramienta esencial para la formulación correcta de productos ya conocidos o de lo contrario, forman el punto de partida para el diseño de nuevas formulaciones [16].

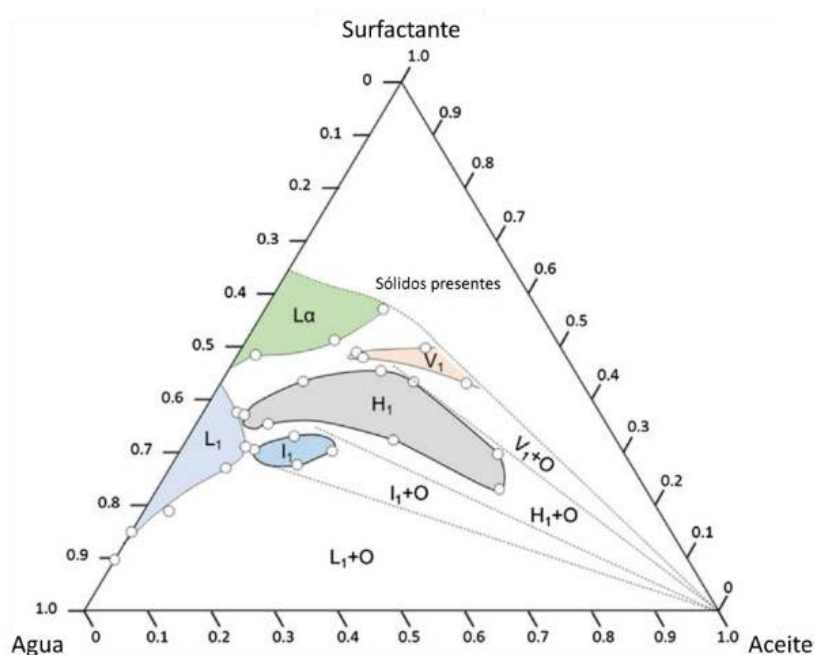


Figura 2.7. Diagrama de fase del triángulo de Gibbs en un sistema de surfactante/ aceite/ agua a temperatura constante. L₁: solución micelar, I₁: cristal líquido cúbico discontinuo, H₁: cristal líquido hexagonal, V₁: cristal líquido cubico bicontinuo, o cúbico discontinuo reverso, O: fase aceite o fase de solución molecularmente dispersa en aceite. Modificado de Yamashita y col. [17].

Cristales líquidos

Los cristales líquidos o estructuras mesomórficas (*proveniente del latín meso= entre y morph= forma*), constituyen el cuarto estado de agregación de la materia, comparten con los líquidos su fluidez y con los sólidos cristalinos el orden de largo alcance ^[18].

Para el IUPAC, un estado mesomórfico es un estado de la materia en el cual, el grado de orden molecular es intermedio entre el perfectamente ordenado en tres dimensiones (y de largo alcance en cuanto a orientación y posición) que se encuentra en los sólidos cristalinos y la ausencia de un orden de largo alcance que se encuentra en los líquidos isotrópicos, gases y sólidos amorfos ^[18].

Los cristales líquidos se clasifican de acuerdo a su composición en dos grandes grupos: termotrópicos y liotrópicos. Los cristales líquidos termotrópicos se forman por el calentamiento de ciertos sólidos, a una temperatura característica para cada sustancia. La temperatura genera una desestructuración en la cual desaparece el orden a nivel molecular y el sistema presenta las características de un líquido ordinario ^[18].

Por otra parte, los cristales líquidos liotrópicos, se presentan en un cierto intervalo de temperatura, cuando algunas sustancias se dispersan en un líquido. Para una temperatura fija, este tipo de cristal líquido aparece en un intervalo de concentración. Los sistemas liotrópicos más comunes, están constituidos por dispersiones de tensoactivos en el agua. También pueden formar parte de las fases liotrópicas otras sustancias anfífilas, tales como ácidos grasos y esteroides, además de aminas y alcoholes de cadena larga, cuyas moléculas se mantienen unidas a la del tensoactivo por fuerzas intermoleculares de Van der Waals y uniones de puente de hidrógeno ^[18]. Las fases liotrópicas o mesofases de los cristales líquidos son la lamelar, la hexagonal normal e inversa y las cúbicas ^[18].

La formación y la estructura de un cristal líquido se relacionan con la concentración y el balance lipofílico-hidrofílico, además del factor geométrico de las moléculas anfífilas que lo conforman ^[19].

Estas estructuras cristalinas líquidas se estiman a partir de texturas ópticas (TO) utilizando microscopía bajo luz polarizada cruzada (Figura 2.8) ^[19].

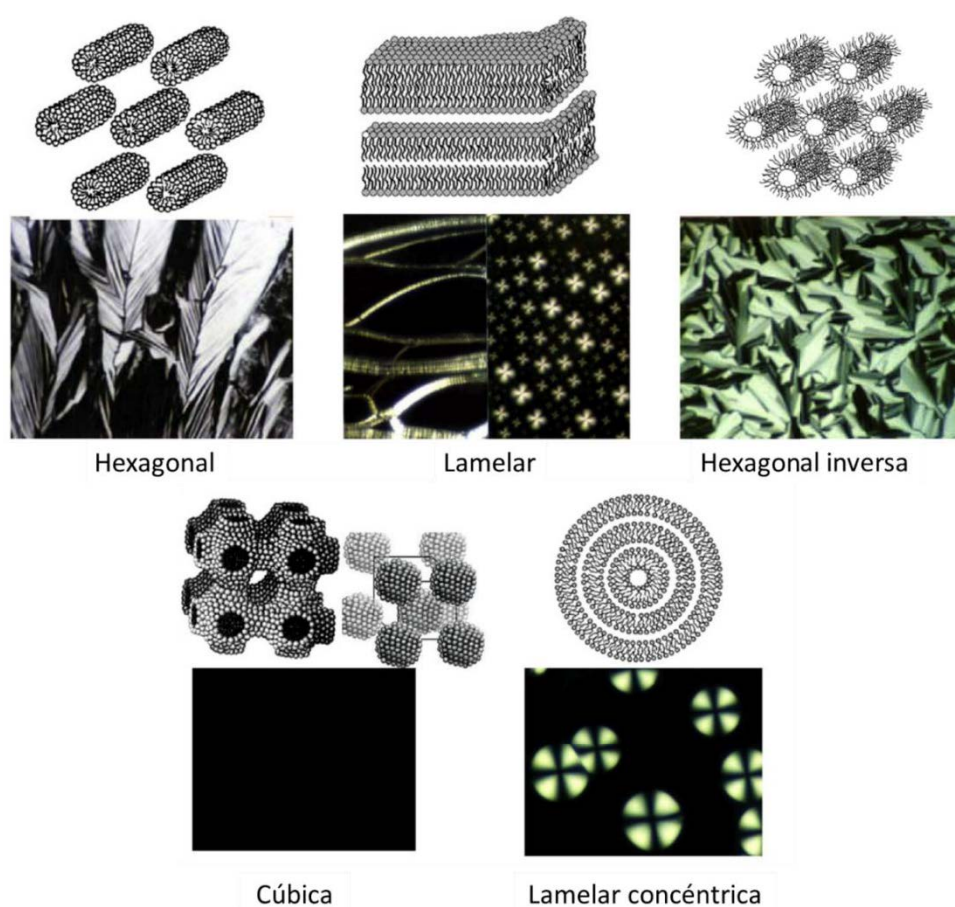


Figura 2.8. Textura óptica típica de cristales líquidos por microscopía bajo luz polarizada cruzada ^[19].

Fase lamelar

La fase lamelar formada en agua, consiste en una estructura donde las moléculas anfifílicas forman una bicapa con las cabezas hidrofílicas como capas externas y las colas hidrófobas como capa interna. Las bicapas lipídicas están dispuestas linealmente con canales de agua alternados. Sin embargo, si el disolvente es orgánico, la orientación de las capas se invierte ^[20, 21].

2.1.3.1. Fase Hexagonal

Consta de siete micelas en forma de varilla, dispuestas en una red tridimensional hexagonal, es decir, en cilindros. Normalmente, la fase hexagonal se obtiene con agua como solvente, mientras que un solvente orgánico produciría la forma inversa, conocida como la fase hexagonal inversa [22].

2.1.3.2. Fase cubica

La fase cúbica tiene dos tipos, cúbica bicontinua y discontinua (fase micelar cúbica). La bicapa lipídica en la fase cúbica bicontinua está dispuesta en un patrón de infinitas superficies periódicas mínimas. Esta se divide además en fases primitivas ($Im3m$), diamante doble ($Pn3m$) y giroides ($Ia3d$) [23].

La fase cúbica discontinua, consiste en las micelas dispuestas en una red cúbica, que puede ser una cúbica centrada en la cara (fcc) o una cúbica centrada en el cuerpo (bcc). Figura 2.9. De forma similar a las fases lamelares y hexagonales, existen formas inversas de las fases cúbicas bicontinua y discontinua [23].

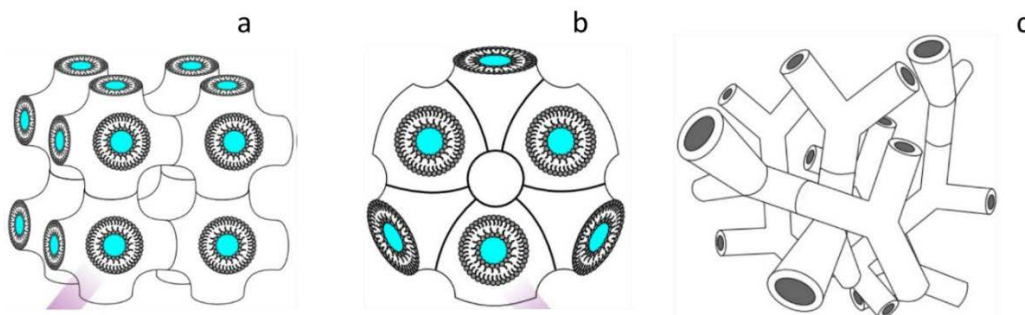


Figura 2.9. Las mesofases de los cristales líquidos liotrópicos: a) fase cúbica bicontinua primitiva. b) fase cúbica bicontinua de doble diamante. c) fase cúbica bicontinua gyroid [23].

Los cristales líquidos presentan una alta capacidad para disolver tanto fármacos hidrosolubles, como liposolubles. Esto que hace que los cristales líquidos resulten potencialmente adecuados como sistemas de liberación controlada de principios activos, alojándose los fármacos liposolubles entre las cadenas hidrocarbonadas y

los fármacos hidrosolubles en la zona polar ^[24]. El surfactante Tween 85, es ampliamente usado en la industria cosmética y farmacéutica, no sólo por no ser toxico, sino, por la tendencia que tiene de formar cristales líquidos lamelares (Figura 2.10). Las estructuras lamelares muestran la mayor similitud con las membranas lipídicas intercelulares, por lo tanto, los lamelares se utilizan para la administración transdérmica de fármacos o ingredientes bioactivos ^[25].

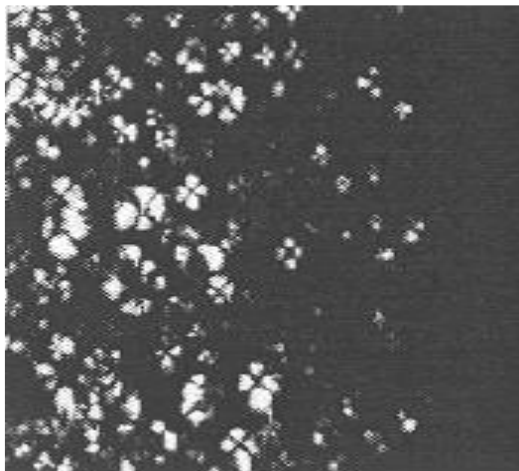


Figura 2.10. Micrografía óptica de la fase lamelar de un sistema Tween 85 / agua ^[25].

2.1.4. Microscopía óptica de luz polarizada

En el fenómeno de birrefringencia o doble refracción: un rayo de luz incidente, se divide en otros dos que están polarizados perpendicularmente entre sí. Si el rayo de luz incide paralelamente a una cierta línea, el eje óptico, ocurre una refracción sencilla y no doble. Los cuerpos que tienen un solo eje óptico, se denominan uniáxicos o uniaxiales, mientras que los biáxicos o biaxiales, son los que poseen dos ejes ópticos. En los cuerpos uniáxicos positivos, el índice de refracción es máximo en la dirección del eje óptico, mientras que en los negativos es mínimo ^[26, 27].

El fenómeno de la doble refracción es responsable de la imagen al microscopio polarizante (de luz polarizada), a la que se denomina textura óptica. Esta se observa al cruzar los polarizadores. La textura óptica se debe a la orientación superficial de los directores en los límites de la muestra y a los defectos en su estructura cristalina [28].

El uso de luz polarizada y la visualización de las muestras a través de polarizadores cruzados, proporciona una imagen negra para las fases isotrópicas, mientras que las anisotrópicas proporcionan una imagen brillante. Los patrones en un microscopio óptico de polarización son claramente diferentes para diferentes fases anisotrópicas y, por lo tanto, pueden usarse para identificar las fases [3].

Según Rosevear [29], un tipo de textura que presenta la fase lamelar, son las cónicas focales, que constituyen una consecuencia de fuerzas que impiden la formación de una disposición uniaxial. Así, por ejemplo, son favorecidas por la curvatura de la superficie de las gotas. Bajo estas circunstancias, las capas de la fase lamelar se curvan y dan una familia de superficies tales que minimizan la tensión a que se ve sometida la estructura lamelar curvada.

Las texturas cónicas focales se dividen, según Rosevear [29], en texturas debidas al tipo de unidades y texturas compuestas. A las primeras, este autor las dividió en unidades positivas, negativas y con forma de abanico (fanlike units). Las unidades positivas y negativas son las que dan cruces de extinción que corresponden, respectivamente, a estructuras uniáxicas positivas y negativas (Figura 2.11).

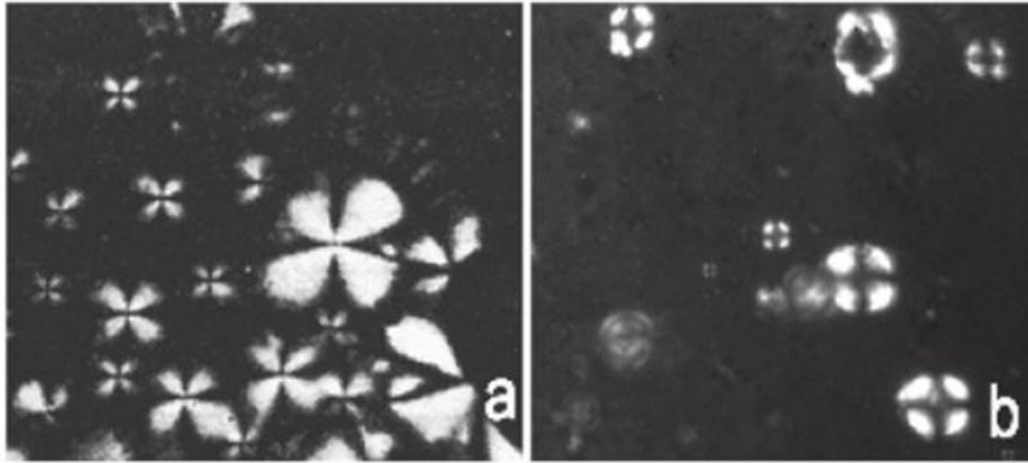


Figura 2.11. Cruces de extinción de cristales líquidos uniáxicos: a) positivos y b) negativos ^[18].

Rosevear ^[29], incluyó dentro de las texturas compuestas a los mosaicos (retículos de unidades positivas y negativas), líneas oleosas (oily streaks), bordes birrefringentes, terrazas, con forma de abanico y batonnets.

Las texturas mosaico (Figura 2.12 a) representa el máximo grado de desorden a nivel microscópico de la fase lamelar. Las líneas oleosas (Figura 2.12 b), denominadas así por su aspecto, constituyen la categoría más común de defectos estructurales en las fases lamelares. Las líneas oleosas son cadenas de pequeños grupos cónico focales ^[30].

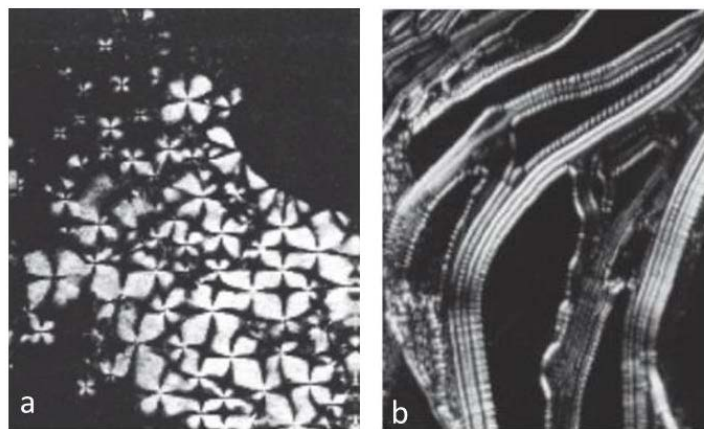


Figura 2.12. (a) Textura mosaica. Microscopía con polarizadores cruzados con una ampliación de 150x [31]. (b) Líneas oleosas ^[18].

Las terrazas, denominadas también terrazas de Grandjean, se forman en los bordes de las gotas, en los que adoptan una forma escalonada o en terrazas ^[30].

Los bâtonnets (pequeños bastones) son cuerpos birrefringentes alargados, raramente cilíndricos, de superficies curvas y simétricas alrededor de sus ejes longitudinales que se encuentran asociados con una precipitación rápida. Con frecuencia se presentan altamente ornamentados y su aspecto recuerda a las patas talladas de los muebles antiguos ^[30].

Las texturas cónicas focales, tanto positivas como negativas, las texturas mosaico y las oleosas, sirven de referencia para identificar la presencia de cristales líquidos lamelares en los sistemas estudiados.

Las principales texturas compuestas que se observan en la fase hexagonal son las líneas oleosas, la textura con forma de abanico y la textura angular. Además, el medio puede asumir texturas no geométricas, por ejemplo, mientras que un lamelar nunca es menos geométrico que un mosaico fino. Las texturas angulares hexagonales (observadas en la figura 2.8) y en forma de abanico (Figura 2.13) del medio, se basan en la disposición de los agregados moleculares cilíndricos. La textura con forma de abanico es la más comúnmente asociada con la fase hexagonal. El límite entre dos áreas con forma de abanico es una discontinuidad nítida. En la fase hexagonal, los brazos de extinción son rectos desde el centro hasta su límite exterior ^[18].



Figura 2.13. Textura óptica de una fase Hexagonal tipo abanico ^[32].

Los cristales líquidos, también pueden encontrarse estabilizando gotas de emulsiones. Como lo sugiere y esquematiza Suzuki ^[19] en la Figura 2.14. Pueden presentarse casos de una emulsión de gota secundaria, en la cual ocurre la formación de un conjunto molecular que rodea las gotas de emulsión, las cuales son estabilizadas y retenidas por un cristal líquido. Esta propiedad de la emulsión ofrece una excelente estabilidad frente a la coalescencia.

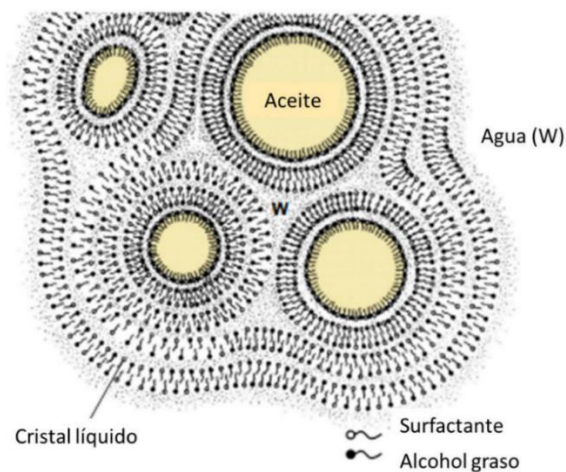


Figura 2.14. Modelo esquematizado de una emulsión O/W, estabilizada con la fase cristal líquido cristalino. Modificado de Suzuki ^[19].

2.1.5. Microemulsiones

Como se mencionó anteriormente, los surfactantes forman una gran variedad de microestructuras, cuando el proceso de autoensamblaje tiene lugar en presencia de agua y aceite, el surfactante puede ayudar a solubilizar los dos líquidos que de otro modo serían inmiscibles. Algunas de las fases obtenidas en tal sistema ternario se denominan microemulsiones ^[4].

Las microemulsiones son mezclas macroscópicamente isotrópicas, termodinámicamente estables de dos líquidos inmiscibles (es decir agua y aceite) estabilizados por moléculas tensoactivas con propiedades hidrofílicas-lipofílicas apropiadas ^[33]. Su estabilidad termodinámica y su nanoestructura son dos características importantes que las distinguen de las emulsiones ordinarias, las cuales son termodinámicamente inestables. Las microemulsiones presentan un alto grado de dinamismo con respecto a su estructura interna ^[3, 34].

Son macroscópicamente homogéneos pero heterogéneos a nivel microscópico, ya que una monocapa tensoactiva separa los dominios de agua y aceite ^[34].

Las microemulsiones se pueden formar por mezclas de surfactante, aceite y agua solamente, pero en muchos casos es necesaria la presencia de un cosurfactante, el cual puede ser un alcohol de cadena media ^[3, 34].

En cuanto a la estructura de las microemulsiones, dependen de la concentración de agua y aceite, además de la concentración de tensoactivos ^[34].

Dos microestructuras típicas son las globulares o gotas, donde los dominios de agua y aceite son usualmente en forma de glóbulos. Para sistemas que presentan baja concentración de aceite (micelas hinchadas), tenemos microemulsiones de aceite en agua, es decir, gotas de aceite en agua (o / w). Este sistema es definido por Winsor ^[35]. Como una microemulsión tipo I, donde la relación entre la energía de interacción por unidad de área interfacial entre el surfactante y el aceite, y la energía de interacción por unidad de área interfacial entre el surfactante y el agua, es menor a uno ($R < 1$). Indicando que hay un dominio de las interacciones hidrofílicas,

favoreciendo la formación de una estructura tipo micelas. Estos sistemas presentan un exceso de fase aceite coexistiendo con la microemulsión ^[36].

Para sistemas de baja concentración de agua (micelas hinchadas inversas) tenemos microemulsiones de agua en aceite, es decir, gotas de agua en aceite (w / o). Este sistema es definido por Winsor ^[35] como una microemulsión tipo II, donde la relación entre la energía de interacción por unidad de área interfacial entre el surfactante y el aceite, y la energía de interacción por unidad de área interfacial entre el surfactante y el agua, es mayor a uno ($R > 1$). Indicando que hay un dominio de las interacciones lipofílicas, favoreciendo la formación de una estructura tipo micelas invertidas. Estos sistemas presentan un exceso de fase acuosa coexistiendo con la microemulsión ^[36]. En la Figura 2.15, se pueden observar micrografías de microemulsión del tipo gotas.

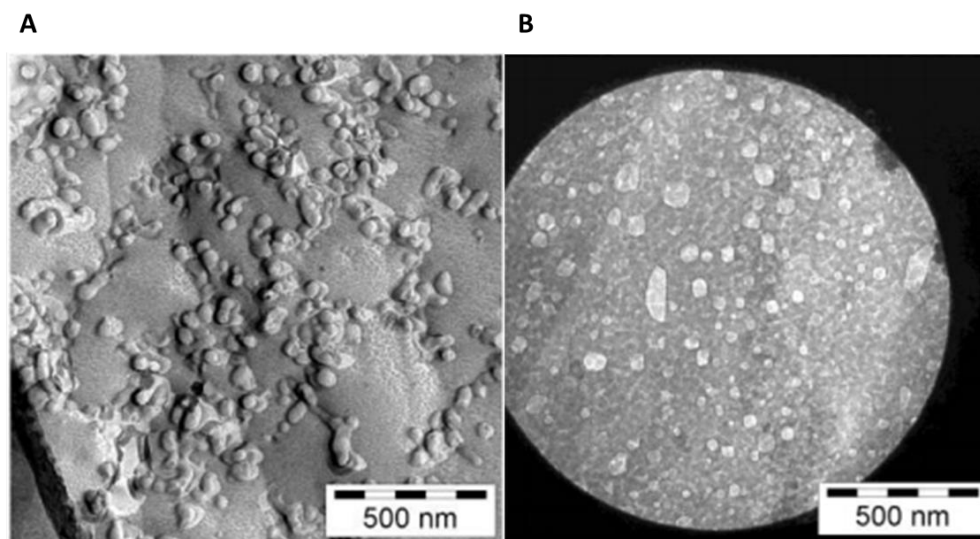


Figura 2.15. Micrografías microemulsión del tipo gotas w / o en el sistema $\text{H}_2\text{O} / \text{NaCl} - \text{octano} - \text{C}_{12}\text{E}_5$ $T = 36,3^\circ \text{C}$. (a) A través de la técnica Imágenes directas de fractura por congelación (FFDI), se observa la imagen que muestra gotas de agua brillantes de un diámetro medio $\langle d \rangle = 44 \pm 13 \text{ nm}$ sobre un fondo aceitoso oscuro. (b) La imagen de microscopía electrónica de fractura por congelación (FFEM) respalda el resultado de FFDI. El diámetro medio de las gotas de agua es $\langle d \rangle = 47 \pm 8 \text{ nm}$ ^[37].

En un sistema monofásico que contiene cantidades similares de aceite y agua, la estructura puede ser alternativamente micelas normales hinchadas en agua o micelas inversas hinchadas en aceite, con micelas casi tocándose en ambos casos debido a la restricción de volumen. Este tipo de sistema SOW monofásico se conoce como microemulsión Winsor tipo IV. También, puede ser definido como tipo IV, si el sistema contiene una microemulsión pura, sin la coexistencia de fases de aceite o agua libre, todos los componentes del sistema se solubilizan mutuamente [36].

El comportamiento de la fase de tipo I y tipo II pueden considerarse como un tipo IV en el que el tensoactivo no es capaz de solubilizar todo el aceite o agua, presente en el sistema y, por lo tanto, algo de exceso de aceite o agua es expulsado. Estos dos casos están relacionados con la presencia de un tipo específico de micela, es decir, con una curvatura específica [36].

Cuando las concentraciones de agua y aceite son comparables, la microemulsión se convierte en una red interconectada de dominios de agua y aceite, conocida como una microemulsión bicontinua [38]. Estas fases bicontinuas, consisten en capas extendidas de tensoactivo, que separan los dominios de aceite y agua de manera que sean continuas, y por lo tanto tienen una microestructura fascinante similar a una "esponja" [36]. Este sistema es definido por Winsor [35] como una microemulsión tipo III, cuando se presentan en un trifásico, es decir una fase media que coexiste con un exceso de fase acuosa y fase oleosa.

La relación entre la energía de interacción por unidad de área interfacial entre el surfactante y el aceite, y la energía de interacción por unidad de área interfacial entre el surfactante y el agua, es igual a uno ($R=1$). Indicando que equilibra la atracción del surfactante tanto por el agua como por el aceite [36].

Como se observa en la Figura 2.16, la imagen de una microemulsión bicontinua a través de microscopía electrónica de barrido por congelación-fractura, se muestran capas continuas, que forman una red similar a una esponja tridimensional conectada de forma múltiple.

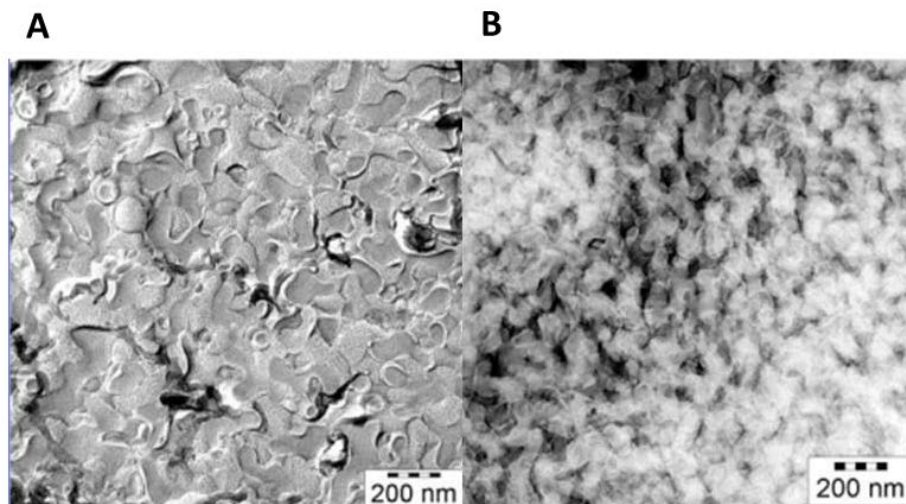


Figura 2.16. Micrografías de una microemulsión bicontinua del sistema ternario H_2O - n -octano- C_{12}E_5 . (a) Imagen de microscopía electrónica de fractura por congelación (FFEM por sus siglas en ingles) y (b) micrografía imágenes directas de fractura por congelación (FFDI por sus siglas en inglés) ^[37].

En las microemulsiones, las películas interfaciales ordenadas topológicamente están formadas por las moléculas de tensoactivo que son forzadas a entrar en la interfaz microscópica agua / aceite debido a su anfifilicidad. La naturaleza y las propiedades de estas películas interfaciales microscópicas son esenciales para las microemulsiones en su conjunto y, en particular, para la característica más interesante de las microemulsiones, es decir, su estructura ^[34].

Se considera que el parámetro principal que determina la microestructura de la microemulsión, es la curvatura media de la película interfacial anfifílica ^[34]. Por definición, las curvaturas son positivas si la película anfifílica tiende a encerrar aceite (o / w-microemulsiones) y negativas si tiende a encerrar agua (w / o-microemulsiones). Los que la curvatura de la película anfifílica depende de distintos parámetros, como son la temperatura, la composición de la película anfifílica, la salinidad, etc. ^[34].

2.1.6. Barridos de formulación y el balance lipofílico hidrofílico

El balance lipofílico hidrofílico (HLB), es una característica definida del tensoactivo, sirve como guía para la clasificación y selección de emulsionantes. Se ha correlacionado con varias propiedades del sistema, como la CMC. La escala HLB se calibra de 1 (ácido oleico) a 20 (oleato de potasio), con una regla de escala lineal sobre una base de porcentaje (%) en peso. A los tensoactivos que se comportan como una mezcla específica de ácido oleico / oleato de potasio se les asigna el valor HLB correspondiente de la mezcla [39, 40].

El Barrido de formulación HLB, es un método de caracterización que se basa en la consecución de una formulación óptima empleando la regla lineal de las mezclas [40].

Una formulación denominada óptima, se forma bajo condiciones muy específicas presenta la ocurrencia de varios fenómenos: tensión interfacial ultra baja, hasta 10^{-4} dinas/cm, comportamiento trifásico (una microemulsión en una fase media, que coexiste con un exceso de fase acuosa y fase oleosa, es decir, Winsor III), máxima solubilización de aceite y agua por el tensoactivo /mezcla de alcoholes. Estas condiciones específicas, se presentan siempre que la afinidad del tensoactivo por la fase acuosa, equilibre exactamente su afinidad por la fase oleosa. Y con unas variables de formulación bien definidas, es decir, tipo de tensoactivo, tipo y concentración de alcohol, tipo y concentración de electrolito, tipo de aceite y temperatura [40].

La elaboración del barrido de formulación HLB, se lleva a cabo fácilmente y produce una precisión equivalente a 0,1 unidades HLB. La caracterización se puede realizar con uno o dos tensoactivos básicos, y el parámetro de tensoactivo resultante, que puede expresarse como HLB, es independiente de las otras condiciones, es decir, tipo de aceite, tipo y concentración de alcohol, tipo y concentración de electrolito y temperatura [40].

La Figura 2.17 ilustra el aspecto de los tubos de un barrido a temperatura de 25 °C, en el cual se ubica la formulación óptima en HLB=11,16.

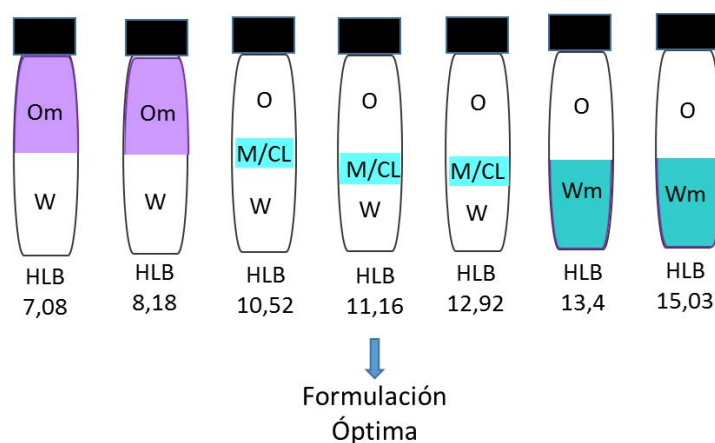


Figura 2.17. Comportamiento de fase del sistema Tw80 o Tw85-Sp80 ó Sp20/solución de NaCl 5%/parafina líquida, surfactante =1%. WOR=1, a 25 °C. Donde, W: simboliza una fase acuosa (solución salina). W: simboliza una fase oleosa (aceite). Wm: simboliza una fase acuosa de tipo solución micelar o microemulsión. Om: simboliza una fase oleosa de tipo solución micelar o microemulsión. CL: simboliza una fase (birrefringente) de tipo cristal líquido probablemente lamelar. M: simboliza una fase microemulsión bicontinua. Modificado de Fernandez y col. [4].

Shinoda [41], desarrolló un sistema de temperatura de inversión de fase (PIT) para seleccionar un emulsionante y compararlo con el sistema de valores HLB. El valor HLB de un tensoactivo no iónico cambia con la temperatura y se produce la inversión de un tipo de emulsión en el que estas dos propiedades simplemente se equilibran [39].

2.1.7. Formulación de microemulsiones

La formulación se relaciona esencialmente con el contenido de los sistemas y generalmente no con la forma en que se logra si se consideran sistemas termodinámicamente estables. Un sistema de microemulsión contiene una fase oleosa orgánica (O), una fase acuosa (W) y un tensoactivo (S) a una temperatura (T) y presión (p) dadas. Pero es necesario considerar que el agua siempre contiene electrolitos. Además, los aceites y casi todos los tensoactivos comerciales son mezclas. En la mayoría de los casos, se añade un cotensoactivo, por ejemplo, un alcohol, entre otras funciones, para reducir la rigidez de la capa de tensoactivo y así prevenir la formación de mesofases gelatinosas ^[36].

Aparte de la naturaleza de cada uno de los componentes de la SOW, también influyen en las propiedades T y p, a veces en gran medida. Por otro lado, es probable que la cantidad relativa de las diferentes sustancias presentes en el sistema también cambie las propiedades y, a menudo, se las denomina variables de composición, se expresan como fracción, porcentaje o proporción en peso o volumen ^[36].

El manejo preciso de la formulación es extremadamente útil no solo para hacer microemulsiones y ajustar sus propiedades, como su capacidad de solubilización, o para lograr una tensión interfacial baja para facilitar la emulsión o mejorar la recuperación de aceite. Se ha demostrado que la formulación también está directamente relacionada con las propiedades de la emulsión, como su tipo, estabilidad, viscosidad, tamaño de gota y con la eficiencia del protocolo de emulsión ^[36].

Un criterio de formulación generalizado, es la desviación hidrofílica-lipofílica (HLD), un número adimensional que expresa la diferencia de afinidad del tensoactivo por las fases oleosa y acuosa, tomando como referencia la formulación óptima. El HLD es función de todas las variables de formulación (características del tensoactivo, tipo y concentración de cosurfactante, temperatura, naturaleza del aceite, salinidad). Desde el punto de vista fisicoquímico, tiene una base sólida, ya que representa el cambio en el potencial químico estándar cuando una molécula de surfactante se

transfiere del aceite al agua en las condiciones de los experimentos. ($\Delta\mu^*_{o \rightarrow w}$), un valor que se puede obtener mediante la medición del coeficiente de reparto K del surfactante entre aceite y agua [36, 42].

$$HLD = \ln K / K_{ref} \quad (2.1)$$

$$\ln K = \ln C^o / \ln C^w = \Delta\mu^*_{o \rightarrow w} / RT \quad (2.2)$$

En estas ecuaciones, C^o y C^w son las concentraciones de tensoactivo en las fases de aceite y agua respectivamente (en ausencia de formación de micelas), y K_{ref} es el valor del coeficiente de reparto de tensoactivo en la formulación óptima, para el trifásico [42].

Para los tensoactivos no iónicos, como los alcoholes grasos etoxilados en equilibrio con una fase acuosa y un alcano lineal, la determinación experimental del coeficiente de reparto en diferentes sistemas ha llevado a la siguiente relación [42].

$$HLD = \alpha - EON + b \times S - k \times ACN - m \times A + cT\Delta T \quad (2.3)$$

En esta expresión, α depende de la estructura química del grupo lipofílico del tensoactivo, EON es el número de óxido de etileno, es decir, el número de grupos de óxido de etileno por molécula, S representa la salinidad (en% en peso en la fase acuosa), ACN es número de carbonos del alcano lineal, m es una constante que depende de la naturaleza del alcohol, A es la concentración de alcohol con respecto al volumen total del sistema, ΔT es la desviación de temperatura de la referencia ambiente (generalmente 25 ° C), b es una constante que depende del electrolito, y cT depende ligeramente de la temperatura y el grado de etoxilación [42].

La expresión HLD es una herramienta útil para comparar cuantitativamente la influencia relativa de los diferentes factores de formulación, para establecer una escala experimental para la clasificación de aceites, tensoactivos y alcoholes, y para formular microemulsiones y emulsiones con propiedades dadas [42].

2.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.2.1. Reactivos y equipos

2.2.1.1. Reactivos

- Aceite mineral de densidad a 15 °C, kg/L de 0,865.
- Surfactantes: Surfactante tipo no iónico esteres de sorbitano etoxilados: Trioleato de sorbitano con 20 moles de óxido de etileno (Tween 85), HLB = 11, y monooleato de sorbitano con 20 moles de óxido de etileno (Tween 80), HLB = 15.
- Surfactantes no iónicos derivados del éster de sorbitano: Monolaurato de sorbitano (Span 20), HLB = 8,6 y monooleato de sorbitano (Span 80), HLB = 4,3. Todos adquiridos de CRODA.
- Cloruro de sodio (NaCl): Porcentaje de pureza $\geq 99,5$ %, adquirido de J.T. Baker.
- Sec-butanol: (2-Butanol) Porcentaje de pureza $\geq 99,0$ %, adquirido de Merk.
- Pentanol: (1-pentanol) Porcentaje de pureza $\geq 99,5$ %, adquirido de CARLO ERBA.
- Etanol: Porcentaje de pureza grado HPLC, adquirido de J.T. Baker
- Propilenglicol: Porcentaje de pureza $\geq 99,5$ %, adquirido de Sigma-Aldrich.
- Agua bidestilada.

Todos los reactivos fueron utilizados como fueron recibidos.

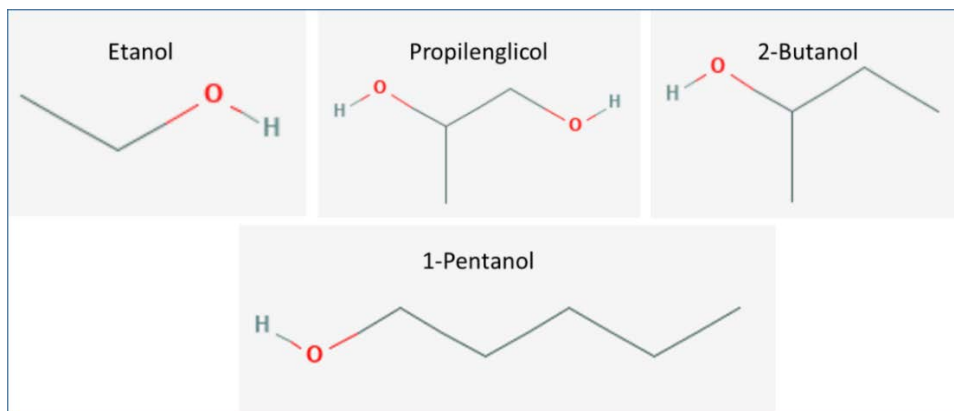


Figura 2.18. Estructura general de los alcoholes empleados como cosurfactantes: etanol, propilenglicol, 2-butanol y 1- pentanol [43-46].

Equipos

- Microscopio de Polarización MOTIC BA310 POL trinocular tipo Siedentopf, inclinado 30 °, y giratorio 360 °. Analizador rotatorio 360°, lente de Bertrand 0,5 X y ranura para laminas compensadoras. Revolver cuádruple inverso, con 3 e centrables. Objetivos Color Corrected Infinity Optical System 4X/0,10 (WD 15,9 mm), 10X/0,25 (WD 17,4 mm), 40X/0,65/S (WD 0,5 mm) y 60X/0,8/S (WD 0,35 mm). Sistemas de enfoque macro y micrométrico con ajuste de tensión. Condensador abatible acromático A. N. 0,990/0,13 con diafragma iris y polarizador rotatorio. Iluminación Koehler halógena cuarzo 6V/30W con control de intensidad [47].



Figura 2.19. Microscopio de Polarización MOTIC BA310 POL trinocular empleado para caracterizar los sistemas SOW, ubicado en el Centro de Investigaciones Médicas y Biológicas de la Universidad de Carabobo (CIMBUC).

2.2.2. Barridos de formulación HLB:

Se realizó un barrido de formulación, donde la variable de formulación empleada en el estudio fue el HLB de una mezcla de surfactantes. Para ello, se preparó un barrido de referencia, para evaluar en qué proporción de surfactantes se obtiene la formulación óptima, con microemulsiones y cristales líquidos.

En cada tubo de formulación, los sistemas surfactantes/agua/aceite contienen una relación agua: aceite 1:1. Cada fase contiene un volumen de 5 mL, para obtener un volumen total de 10 mL en cada tubo analizado. Cada formulación se realizó a una salinidad de 1% masa/volumen (g/mL) de NaCl. En cada tubo se colocó una relación distinta de los 4 surfactantes para así obtener diferentes valores de HLB, que van desde 4,3 hasta 15,0. La concentración de surfactante o mezcla de surfactantes es de 3% masa/volumen (g/mL), lo que permite obtener un aumento del volumen de la fase microemulsión. Como cosurfactante se emplea una mezcla de los alcoholes sec-butanol/pentanol en una relación de 2:1. Este protocolo ha sido modificado del empleado por Pereira ^[48].

Los tubos se prepararon agregando los componentes en el siguiente orden: a) surfactante de alto HLB Tween 80 o Tween 85, b) agua y solución de cloruro de sodio, c) surfactante de bajo HLB Span 20 o Span 80, d) aceite y e) la mezcla de alcoholes. Los tubos se mezclaron suavemente bajo agitación de balanceo manual, dos veces.

Los tubos se dejaron en reposo durante un mínimo de 24 horas, tiempo en que ha ocurrido la separación completa de las fases. Una vez separadas las fases, se verifica la presencia de surfactantes en cada fase de los tubos formulados, mediante el efecto Tyndall ^[1, 49]. A través de este fenómeno físico, que causa que las partículas coloidales en una disolución sean visibles al dispersar la luz, se determina la presencia de alto contenido de surfactante al observar la trayectoria de un láser que se hace pasar por la muestra.

Se determinó el tubo con la formulación óptima, del conjunto de formulaciones en la cual se presentó un sistema trifásico. Fue caracterizada empleando la microscopía óptica de luz polarizada.

2.2.3. Barrido HLB Para la caracterización de dos surfactantes comerciales

Una vez caracterizado el barrido de HLB de referencia, se procedió a realizar dos barridos HLB para la caracterización de dos surfactantes comerciales, con la finalidad de evaluar su posible uso en la construcción del sistema ternario SOW.

Una vez obtenido el HLB de referencia se retira una proporción del 20% masa/volumen (m/v) de la mezcla surfactante, la cual es sustituida por la muestra problema de HLB desconocido. Finalmente se selecciona el sistema óptimo, el cual fue caracterizado empleando la microscopía óptica de luz polarizada. El HLB se calculó según la regla de las mezclas ^[40].

$$HLB_{problema} = \frac{HLB_{ref} - \frac{HLB^*}{0,8}}{0,2} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

2.2.4. Construcción del diagrama de fases ternario SOW

Para la construcción del sistema de fases ternario SOW, se agruparon los componentes por categorías (polar, no polar y anfifílico).

La fase polar o acuosa (W) está compuesta por agua destilada y cloruro de sodio a una concentración de 10% masa/ volumen (m/v). La fase no polar o aceite (O), conformada por aceite mineral. La fase anfífila o surfactante (S) está compuesta por Tween 85 más los cosurfactantes. Se establece una relación 2:1 en masa de Surfactante: Cosurfactante, como lo estableció Kupper ^[53] y colaboradores

Se elaboraron dos sistemas de fases ternarios SOW, manteniendo la fase oleosa y la fase acuosa con los mismos constituyentes. En la fase anfífila se empleó Tween 85 para ambos ternarios, variando sólo el cosurfactante empleado, pero manteniendo constante la misma proporción Surfactante: Cosurfactante en ambos casos.

En el diagrama ternario 1, se empleó como cosurfactante la mezcla de alcoholes sec-butanol/ pentanol, en una relación 2:1 en masa. Esta relación es la misma que

se empleó en el barrido HLB, realizado para determinar el surfactante que se emplearía para la construcción del ternario.

En el diagrama ternario 2, se empleó como cosurfactante la mezcla propilenglicol/etanol en una relación 1:1. Esta es la relación empleada por Kupper^[50] en su estudio de microemulsiones cosméticas, empleando esta mezcla de cosurfactantes.

2.2.4.1. Ternario 1

Para la construcción del diagrama de fases, se fijaron diferentes porcentajes de la fase anfifílica, y en función a ello se estableció la composición de los demás componentes. Esto, debido a que se desea analizar, el tipo de estructura o asociaciones coloidales que se forman, con determinado porcentaje de fase anfifílica, a determinadas relaciones W/O.

Los porcentajes de fase anfífila fueron establecidos de la siguiente manera: 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 % en masa. La fase anfífila o surfactante más el cosurfactante.

Para cada uno de los puntos, el porcentaje restante se estableció para el agua y aceite, para una sumatoria del 100 % de las tres fases. Las relaciones en peso de agua/aceite para cada porcentaje de fase anfifílica establecida se variaron de 30/70 a 70/30, específicamente (30/70, 40/60, 45/55, 50/50, 55/45, 60/40 y 70/30).

Por ejemplo, para el tubo 24 (reportado en la Tabla) correspondiente al sistema 4, se estableció en 7% de fase anfifílica. Por lo tanto, el 93% restante corresponde a la sumatoria de la cantidad de agua y aceite. Esa cantidad total de agua y aceite dentro del 93 %, se encuentra en una relación másica 45/55, es decir, 45% de agua y 55% de aceite.

La composición de cada tubo se observa en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Identificación de cada tubo por composición en masa de los componentes anfifílicos, y la relación agua y aceite, para la construcción del diagrama de fases ternario 1.

	<i>Identificación de cada tubo por composición</i>						
	Relación Agua / aceite (W/O)						
Porcentaje en masa Surfactante /(Agua y aceite)	30/70	40/60	45/55	50/50	55/45	60/40	70/30
1% surf / 99% W/O	1	10	21	32	43	54	65
3% surf / 97% W/O	2	11	22	33	44	55	66
5% surf / 95% W/O	3	12	23	34	45	56	67
7% surf / 93% W/O	4	13	24	35	46	57	68
10% surf / 90% W/O	5	14	25	36	47	58	69
20% surf / 80% W/O	6	15	26	37	48	59	70
30% surf / 70% W/O	7	16	27	38	49	60	71
40% surf / 60% W/O	8	17	28	39	50	61	72
50% surf / 50% W/O	9	18	29	40	51	62	73
60% surf / 40% W/O		19	30	41	52	63	
70% surf / 30% W/O		20	31	42	53	64	

Todos los componentes fueron pesados y sellados. Se aplicaron 100 golpes de agitación manualmente. Todos los sistemas se almacenaron en un baño de agua a una temperatura de 26 °C durante 3 meses, el cual fue el tiempo requerido para que todos los sistemas alcanzaran el equilibrio.

2.2.4.2. Ternario 2

Tal como se realizó en el ternario 1, se fijaron diferentes porcentajes de la fase anfifílica, y en función a ello se estableció la composición de los demás componentes. En este caso, se escogieron determinados puntos para evaluar, como se observa en la Tabla 2.2. Los puntos estudiados se determinaron una vez obtenidos los resultados del ternario 1.

Tabla 2.2. Identificación de cada tubo por composición en masa de los componentes anfifílicos, y la relación agua y aceite, para la construcción del diagrama de fases ternario 2.

	<i>Identificación de cada tubo por composición</i>				
	Relación Agua / aceite (W/O)				
Porcentaje en masa Surfactante /(Agua y aceite)	30/70	40/60	50/50	60/40	70/30
7% surf / 93% W/O			35		
10% surf / 90% W/O			36		
20% surf / 80% W/O	6	15	37	59	70
30% surf / 70% W/O	7	16	38	60	71
40% surf / 60% W/O	8	17	39	61	72
50% surf / 50% W/O	9	18	40	62	73
60% surf / 40% W/O			41		
70% surf / 30% W/O			42		

2.2.5. Caracterización de las fases obtenidas

2.2.5.1. Caracterización visual

Esta caracterización se realizó de manera visual, haciendo un seguimiento durante tres meses, de los cambios de fases que se pudieron haber presentado en algunos tubos que conforman el diagrama de fases SOW. Esta observación se realizó hasta alcanzar el equilibrio o hasta no observar ningún cambio en el tiempo, con la finalidad de observar el tipo y cantidad de fases formadas.

2.2.5.2. Caracterización por microscopía

Las muestras estudiadas fueron observadas empleando un microscopio de polarización MOTIC BA310 POL trinocular, con la finalidad de identificar la presencia de fases anisotrópicas, que presentan birrefringencia (cristales líquidos

lamelares y hexagonales). Y diferenciarlas de las fases isotrópicas, que no presentan birrefringencia (microemulsiones).

Para la observación de cada muestra, se toma una pequeña porción de líquido con una pipeta Pasteur y se coloca una o dos gotas sobre un porta objetos.

Estos cristales líquidos mencionados, muestran un patrón característico al ser colocados bajo polarizadores cruzados, proporcionando una imagen brillante.

Las imágenes fueron tomadas directamente del microscopio, empleando una cámara de 8 megapíxeles. Para cada muestra se realizó la captura de 5 a 10 imágenes.

El ternario 1 fue elaborado empleando Tween 85, sec-butanol y pentanol en la fase anfífila. Cloruro de sodio a una concentración de 10 % m/v, como fase acuosa o polar. Aceite mineral como fase oleosa. El ternario 2 fue elaborado de la misma manera y empleando la misma proporción de los reactivos, variando solamente los cosurfactantes empleados. En este caso se empleó como cosurfactante etanol y propilenglicol.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Barrido de HLB de referencia

Para el estudio del barrido de formulación HLB de referencia, se realizó una serie de formulaciones a distintos valores de HLB, partiendo de HLB = 4,0 hasta HLB = 15,0. Se emplearon mezclas de surfactantes no iónicos (Tween 85, Tween 80, Span 20 y Span80).

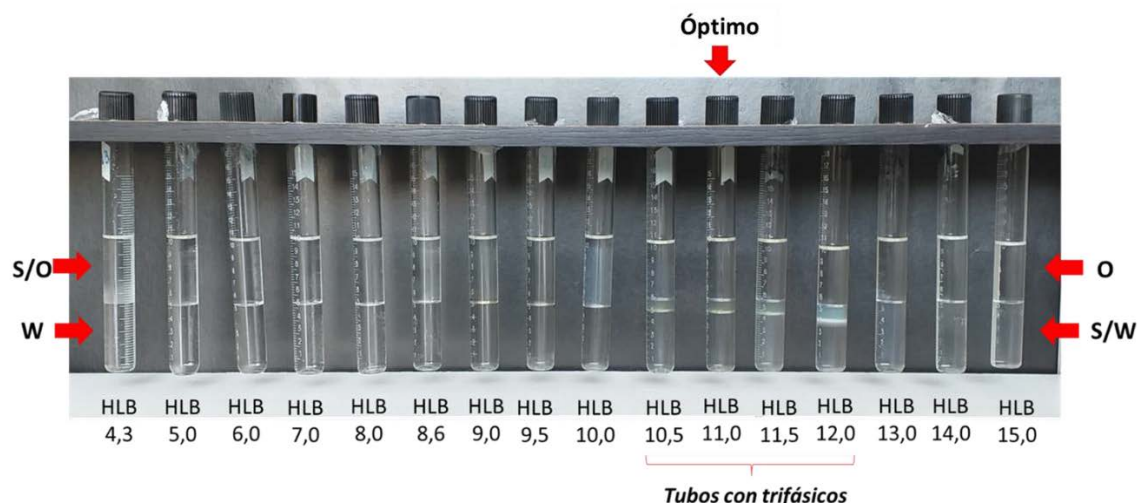


Figura 2.20. Comportamiento de fases del sistema Surfactante (S)/ Aceite (O)/ Agua (W) del barrido de formulación HLB, conformados por: S (Diferente proporción de Tween 80, Tween 85, Span 20 y Span 80 adicional a una mezcla de cosurfactantes sec-butanol/pentanol), W (solución acuosa de NaCl 1% m/v) y O (aceite mineral).

La Figura 2.20, ilustra el aspecto de los tubos del barrido de referencia a una temperatura de 29 °C (temperatura ambiente del laboratorio).

El comportamiento de fase de los sistemas surfactante/agua/aceite se determina por el desplazamiento del surfactante en el sistema, lo cual se observa a través del efecto Tyndall, empleando la difracción de luz láser para detectar micelas, normalmente la fase en donde se encuentra el surfactante es turbia. En el caso de los cristales líquidos, los mismos se pueden detectar por su birrefringencia que se pone en evidencia mediante una observación con luz polarizada ^[4].

En los sistemas de HLB con valores de 4,0 a 10,0, el comportamiento de fases exhibido muestra la formación de dos fases, una fase oleosa y otra acuosa. La fase oleosa, siendo la que se encuentra en la parte superior del tubo, es donde se encuentra la mayor concentración de surfactantes, por lo tanto, puede contener micelas inversas. La fase acuosa se encuentra en la parte inferior del tubo. Estos sistemas parecen presentar un comportamiento de fase correspondiente a Winsor

II, en el cual una fase oleosa micelar está en equilibrio con una fase acuosa en exceso [35, 36].

En los sistemas con HLB desde 13,0 a 15,0 el comportamiento de fases exhibido muestra la presencia de dos fases, una fase oleosa y otra acuosa. La fase acuosa, siendo la que se encuentra en la parte inferior del tubo, es rica en surfactantes, por lo tanto, puede contener micelas normales. La fase oleosa se encuentra en la parte superior del tubo. Estos sistemas parecen presentar un comportamiento de fase correspondiente a Winsor I, en el cual una fase acuosa micelar está en equilibrio con una fase aceite en exceso [35, 36].

En los sistemas con HLB desde 10,5 a 12,0 el comportamiento de fases exhibido muestra la presencia de tres fases (comportamiento trifásico), en el cual una microemulsión en una fase media, está en equilibrio con las fases de agua y aceite en exceso. En esta fase se presenta la máxima solubilización de aceite y agua por el tensoactivo /mezcla de alcoholes [40]. El comportamiento exhibido por estos sistemas fue definido por Winsor como comportamiento de fase tipo III. De acuerdo a los estudios de Winsor, la formulación que presenta el trifásico, posee una curvatura interfacial nula, lo cual se corresponde con una microemulsión bicontinua si hay bastante desorden geométrico o térmico. En caso contrario, en una estructura de tipo cristal líquido lamelar, sería otra alternativa para satisfacer la condición de curvatura nula [4]. Dependiendo de la cantidad de surfactante contenida en el sistema, pueden formarse las dos estructuras en forma independiente o simultáneamente, en cuyo caso existen entonces cuatro fases en un sistema Winsor III, es decir, una microemulsión, un cristal líquido y las fases acuosas y oleosas en exceso [4].

En la Figura 2.20, se observa la formulación óptima señalada en el tubo de HLB = 11. Se tomó como formulación optima, aquella que presentó volúmenes iguales de fase acuosa y fase oleosa, lo que corresponde a igual solubilización de agua y aceite en la microemulsión dentro del intervalo de sistemas trifásicos [51].

2.3.2. Caracterización de los trifásicos del barrido de referencia por microscopía de luz polarizada

Las fases intermedias, obtenidas en los sistemas trifásicos en el barrido de referencia, fueron observadas y analizadas a través de la microscopía óptica de luz polarizada, con la finalidad de investigar la presencia de fases anisotrópicas (cristales líquidos) y fases isotrópicas (microemulsiones). Las microscopías de los sistemas trifásicos se observan en la Figura 2.21 y 2.22.

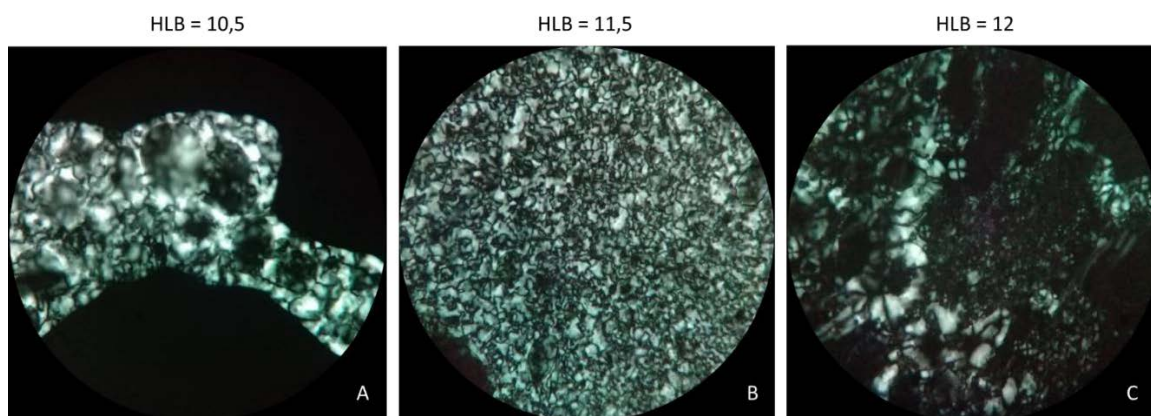


Figura 2.21. Imágenes de microscopía óptica de luz polarizada (400x) de muestras extraídas de la zona trifásica. (A) Trifásico de HLB 10,5 de composición T85-S20-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl. (B) Trifásico de HLB 11,5 de composición T80-T85-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl. (C) Trifásico de HLB 12,0 de composición T80-T85-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl.

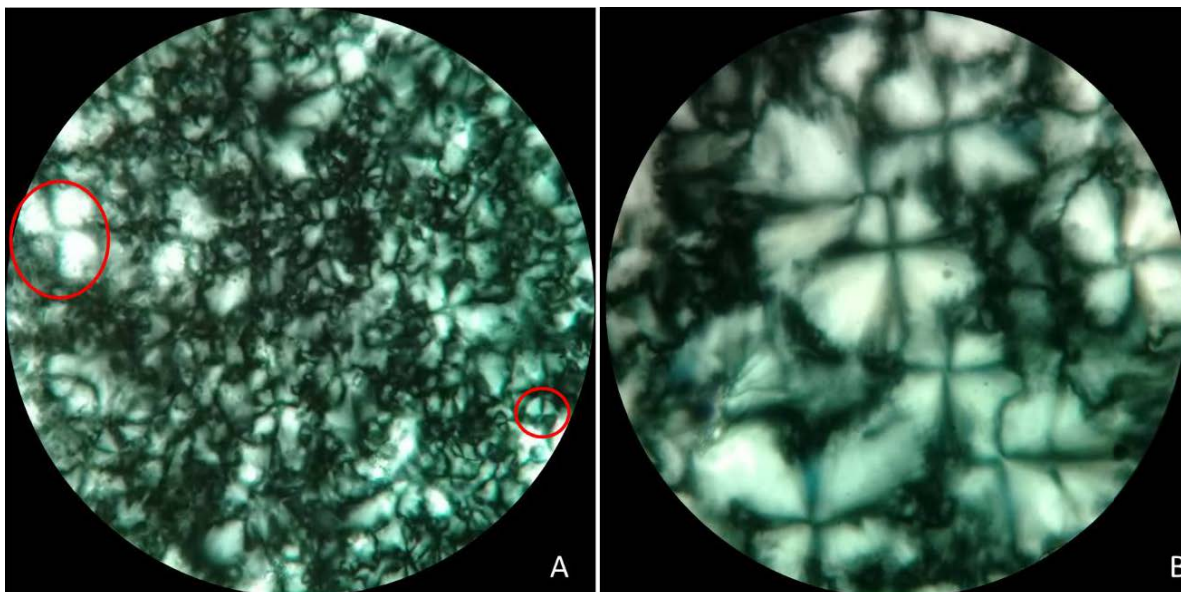


Figura 2.22. Imágenes A y B corresponden a la microscopía óptica de luz polarizada (400x) de la muestra extraída de la zona trifásica de HLB 11,0 de composición T85- (Pentanol/Sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl considerado como la formulación óptima.

En las imágenes de la Figura 2.21 y 2.22, se observan patrones que presentan el fenómeno de birrefringencia o doble refracción, indicando que hay presente cuerpos anisotrópicos interactuando con la luz polarizada, evidenciando la presencia de cristales líquidos [18 19].

De las texturas ópticas observadas, se puede inferir que en los sistemas trifásicos obtenidos hay presencia de cristales líquidos lamelares.

En los trifásicos del tubo de HLB 10,5 (Figura 2.21 A) y HLB 11,5 (Figura 2.21 B) se observan texturas ópticas no geométricas y texturas ópticas tipo mosaico características de un sistema lamelar [18, 31]. Estas estructuras anisotrópicas se observan en una fase continua dentro de la fase isotrópica. La Figura 2.21 C, (correspondiente al trifásico del Tubo de HLB 12,0), se caracteriza por presentar una textura de tipo Grandjean, con presencia de cruces de extinción de estructuras uniaxiales positivas (cónico focales positivas). Esta textura es característica de

cristales líquidos laminares, evidenciada por la formación de la cruz de malta [18, 19, 52].

En la Figura 2.22 se observan dos micrografías correspondientes a la muestra del trifásico del tubo de HLB 11,0 (formulación óptima). En la Figura 2.21 A se observan características de un sistema lamelar. Se observan texturas ópticas lamelares, evidenciada por la formación de la cruz de malta, (en círculos rojo), texturas ópticas no geométricas las cuales sean posiblemente lamelares tipo mosaico [18, 31].

En la Figura 2.21 B se observan la característica textura cónica focal de fase hexagonal cuando se observa bajo el polarizador cruzado. Esta textura es conocida como tipo abanico [18, 32, 53-55].

Estas imágenes sugieren la coexistencia de dos fases cristales líquidos en el sistema óptimo, de composición T85-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl. Además, se evidencia que estos cristales líquidos, pueden formarse a bajas concentraciones de surfactante, como en este caso, a una concentración de 3 % de surfactante.

Es importante resaltar que estas muestras se tratan de sistemas dinámicos, a pesar de estar en equilibrio, no son sistemas estacionarios, por lo que rápidamente no se observan con claridad las fases anisotrópicas en el microscopio. También es necesario señalar que estas fases cristales líquidos se encuentran en una microemulsión.

Se puede observar que, dependiendo la composición de cada sistema, varía la cantidad y de textura de cristales líquidos formados. Aunque en todos los casos se evidencia la presencia de cristales líquidos lamelares, la formulación óptima conformada sólo por el surfactante T85, presenta la formación de cristales líquidos hexagonales.

2.3.3. Determinación del HLB para un surfactante base azúcar comercial

El surfactante base azúcar comercial, es un surfactante no iónico empleado para productos cosméticos, especiales para pieles sensibles. Es sintetizado de la

reacción de la N-metilglucamina con aceite de coco refinado, desodorizado y blanqueado.

Este surfactante es analizado como posible tensoactivo a ser incorporado en la formulación cosmética. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos, es compatible en su estructura molecular con los surfactantes Span y Tween.

A continuación, se muestra en la Figura 2.23 el barrido con el surfactante a determinar el HLB.

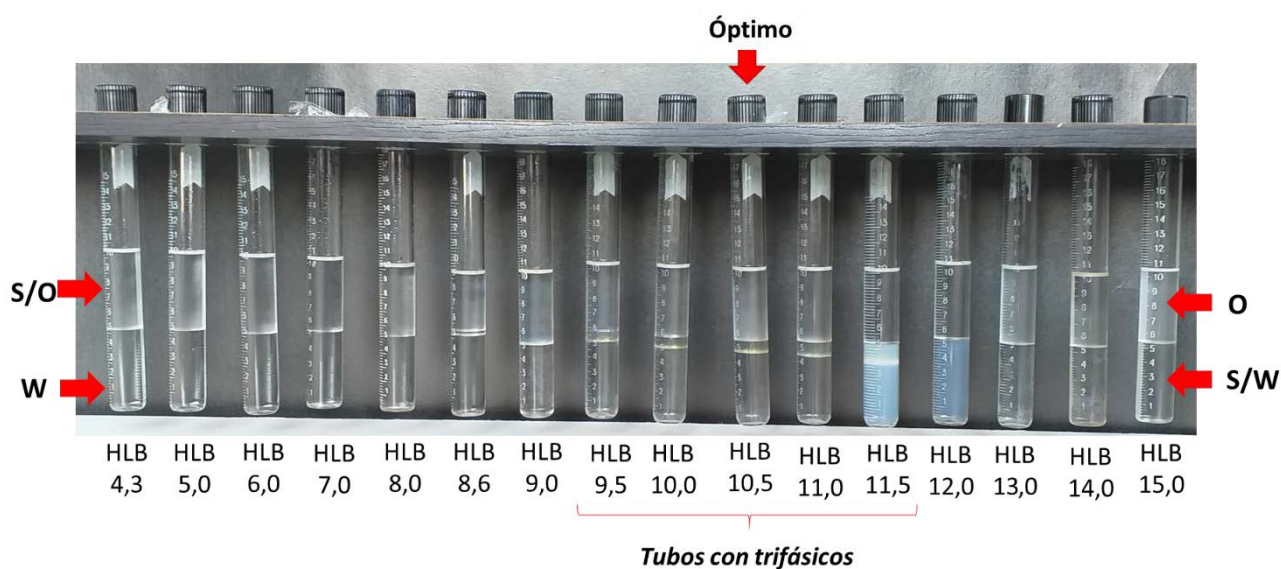


Figura 2.23. Comportamiento de fase del sistema Surfactantes (S), Tween 80/Tw85 o Span80 / Span20, S. base azúcar, solución de NaCl 1%/aceite mineral (O)/agua (W)/alcoholes.

En los sistemas con HLB desde 4.3 a 9.0 el comportamiento de fase exhibido muestra como una separación de dos fases. Una, la fase oleosa, siendo la fase que se encuentra en la parte superior del tubo. Estos sistemas presentan un comportamiento de fase correspondiente a Winsor II, en el cual una fase oleosa micelar está en equilibrio con una fase acuosa en exceso [35, 36].

En los sistemas con HLB desde 12.0 a 15.0 el comportamiento de fase exhibido muestra la presencia de dos fases. Una fase acuosa rica en anfífilos que puede contener micelas normales. La otra fase, corresponde al aceite. Estos sistemas

presentan un comportamiento de fase correspondiente a Winsor I, en el cual una fase acuosa micelar está en equilibrio con una fase oleosa en exceso [35, 36].

En los sistemas con HLB desde 9.5 a 11.5 el comportamiento de fase exhibido muestra la presencia de tres fases, en el cual una microemulsión está en equilibrio con las fases de agua y aceite en exceso. Estos sistemas corresponden a un comportamiento de fase Winsor tipo III, como se discutió en el barrido anterior. En este caso el óptimo corresponde al tubo de HLB 10,5.

El HLB del Surfactante comercial azucarado fue 10,6. Este fue calculado basado en la regla de las mezclas, usando la siguiente ecuación (2.4) [40].

$$HLB_{problema} = \frac{HLB_{ref} - \frac{HLB^*}{0,8}}{0,2}$$

Donde, HLB_{ref} es el HLB del óptimo obtenido en el barrido de referencia, HLB^* es el HLB del óptimo en el barrido donde se incluye la muestra de surfactante problema, 0.2 es la fracción del surfactante problema en el tubo y 0.8 es la fracción total del resto de los surfactantes empleados en el barrido.

Este valor de HLB del surfactante problema indica, que se trata de un surfactante que entre sus características presenta tendencia hidrofílica, forma dispersiones traslucidas o claras y puede funcionar como emulsionante O/W.

2.3.4. Caracterización de los sistemas trifásicos del surfactante base azucar por microscopía de luz polarizada

Las fases intermedias, obtenidas en los sistemas trifásicos en el barrido de referencia, fueron observadas y analizadas a través de la microscopía óptica de luz polarizada, con la finalidad de investigar la presencia de fases anisotrópicas (cristales líquidos) y fases isotrópicas (microemulsiones). Las micrografías de los sistemas trifásicos se observan en las Figuras 2.24 y 2.25.

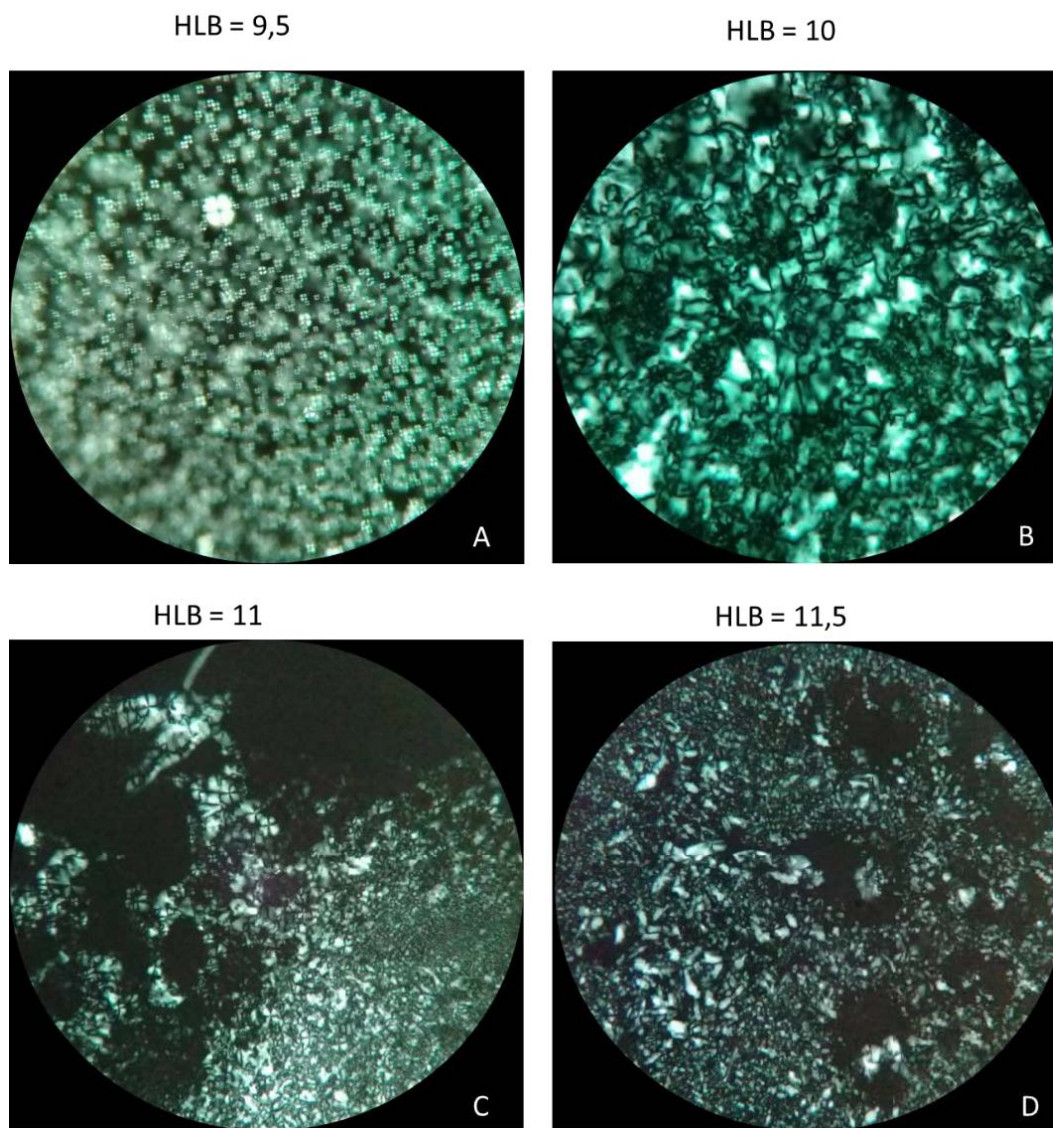


Figura 2.24. Imágenes de microscopía óptica de luz polarizada (400x) de muestras extraídas de la zona trifásica. (A) Trifásico de HLB 9,5 de composición T85-S20-base azúcar-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl. (B) Trifásico de HLB 10,0 de composición T85-S20-base azúcar-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl. (C) Trifásico de HLB 11,0 de composición T85-Base azúcar-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl. (D) Trifásico de HLB 11,5 de composición T80-T85-Base azúcar-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl.

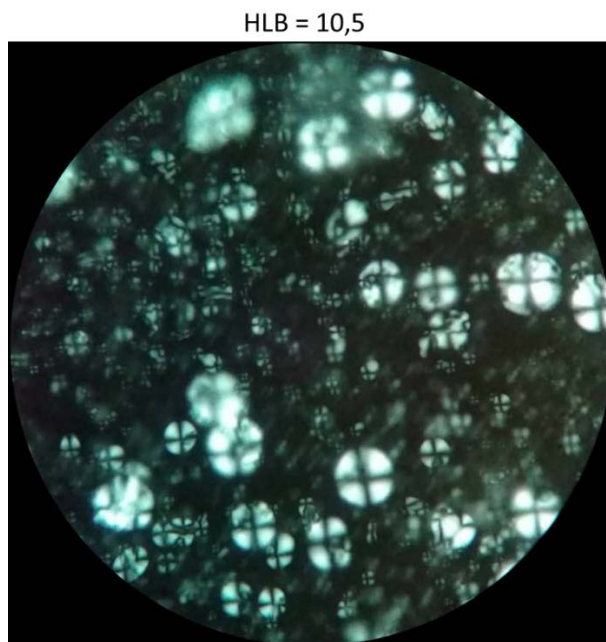


Figura 2. 25. Imágenes de microscopía óptica de luz polarizada (400x) de la muestra extraída de la zona trifásica de HLB 10,5 de composición S20-T85-base azúcar (pentanol/sec-butanol) / Aceite / H₂O-NaCl considerado como la formulación óptima.

En las imágenes de la Figura 2.24 y 2.25, se observan patrones que presentan el fenómeno de birrefringencia, indicando la presencia de cristales líquidos. De las texturas ópticas observadas, se puede inferir que en los sistemas trifásicos obtenidos hay presencia de cristales líquidos lamelares ^[18 19].

- **En los Trifásico del Tubo de HLB 9,5 (Figura 2.24 A) y del tubo de HLB 10,5 (Figura 2.25),** se observan texturas ópticas lamelares, evidenciada por la formación de la cruz de malta. Estas cruces de malta corresponden a esferulitas formadas por gotas cerradas que contienen pilas de bicapas similares a los liposomas multilaminares. Se observan estas estructuras en forma dispersa y de distintos tamaños, que corresponden específicamente a un patrón de texturas cónicas focales de unidades negativas, las cuales dan

cruces de extinción que corresponden, a estructuras uniáxicas negativas. Estas estructuras podrían tratarse, de una gota de una de las fases, las cuales son estabilizadas y retenidas por un cristal líquido [18, 19, 52, 56, 57]. Estas características indican un ordenamiento tipo lamelar.

- **En el Trifásico del Tubo de HLB 11,0 (Figura 2.24 B)**, se observan texturas ópticas lamelares, evidenciadas por la formación de la cruz de malta. Estos cristales líquidos corresponden puntualmente a las texturas cónicas focales de unidades positivas y negativas, observándose en determinadas regiones la textura tipo mosaico [18, 19, 55, 58,59].
- **En los Trifásico del Tubo de HLB 10,0 (Figura 2.24 B), del tubo de HLB 11,0 (Figura 2.24 C), y HLB 11,5 (Figura 2.24 D)**, se observan texturas ópticas lamelares, evidenciadas por la formación de la cruz de malta. También, se observan texturas ópticas no geométricas y texturas ópticas tipo mosaico características de un sistema lamelar [18, 31]. Estas estructuras se encuentran presente en distintos tamaños y en gran cantidad.

Estos resultados indican la tendencia de estos surfactantes en formar cristales líquidos lamelares en los sistemas trifásicos obtenidos y en cantidad apreciable en cada uno de los sistemas. Aunque pueda variar el tipo de textura óptica, todos están relacionados con un ordenamiento lamelar de los surfactantes.

En algunos casos, los sistemas acuosos de mezclas de tensoactivos pueden proporcionar un mejor rendimiento que los sistemas de un solo tensoactivo. Esto es debido al sinergismo que se deriva de interacciones moleculares, que ocurre entre diferentes moléculas de tensoactivo en los agregados y, por lo tanto, podría aprovecharse en muchas aplicaciones [60, 61]. A pesar de tener en cuenta estas posibles ventajas de trabajar con mezclas de surfactantes, se decidió realizar el estudio de los sistemas ternario SOW, empleando un solo surfactante, el Tween 85, acompañado con una mezcla de cosurfactantes. Para el presente trabajo es útil el estudiar un solo surfactante para ayudar a las posibles interpretaciones de su comportamiento y propiedades evaluadas.

Se evidenció, que en la formulación de HLB 11,0 del barrido de referencia, conformada sólo por el Tween 85 como surfactante, la muestra trifásica analizada, presentó la formación de cristales líquidos, tanto lamelares como hexagonales. Adicionalmente, permitiría un mejor análisis del sistema ternario, si se considera un solo surfactante que una mezcla, ya que también se debe considerar la acción de la mezcla de cosurfactante en la formulación. Adicionalmente, esta formulación de $HLB = 11$ (T85-(pentanol/sec-butanol) / Aceite / $H_2O-NaCl$), es la formulación óptima. Esto le confiere ciertas características positivas anteriormente mencionadas, que indica es la composición adecuada como punto de partida, para realizar el análisis del sistema SOW. En esta formulación también se evidencia la sinergia entre todos los componentes en el óptimo para formar cristales líquidos.

2.3.5. Ternario 1

Una vez seleccionado el surfactante para la construcción del sistema ternario, se establecieron los puntos a evaluar. A continuación, en la Figura 2. 26 se observan las composiciones estudiadas representadas en el diagrama ternario (estos puntos están detallados en la metodología), elaborado empleando en la fase surfactante Tween 85 más la mezcla de cosurfactantes (pentanol/sec-butanol), como fase acuosa una solución de cloruro de sodio y en la fase aceite, se empleó aceite mineral.

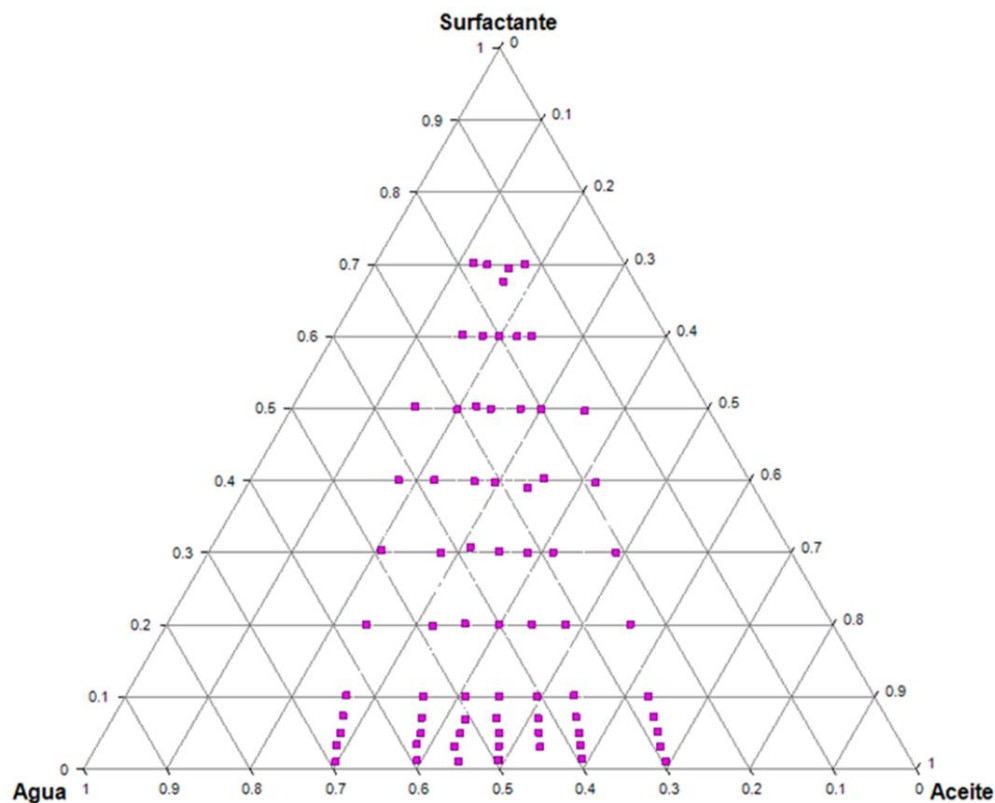


Figura 2.26. Representación gráfica de los puntos estudiados en el ternario de composición agua/aceite/surfactante-cosurfactante. Conformado por agua (solución de cloruro de sodio) /aceite mineral/Tween 85 – (pentanol/sec-butanol). Los puntos representan las composiciones estudiadas.

2.3.5.1. Caracterización del comportamiento de fases

Luego de transcurridos 3 meses de la elaboración de cada sistema, se procedió a evaluar de manera visual las fases presentes en cada tubo formulado, con la finalidad de observar el tipo y cantidad de fases formadas, tal como se observa en las siguientes Figuras:

➤ Sistemas de composición 1 % de surfactante a 7 % surfactante

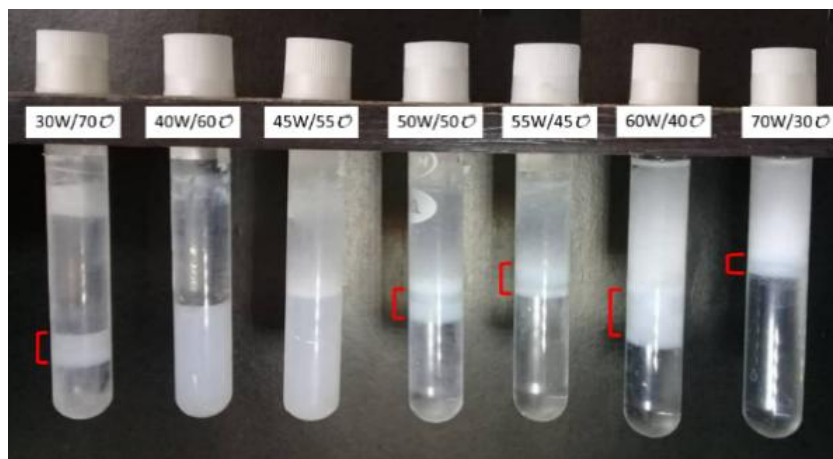


Figura 2.27. Sistemas de composición correspondiente a 1 % surfactante /99 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

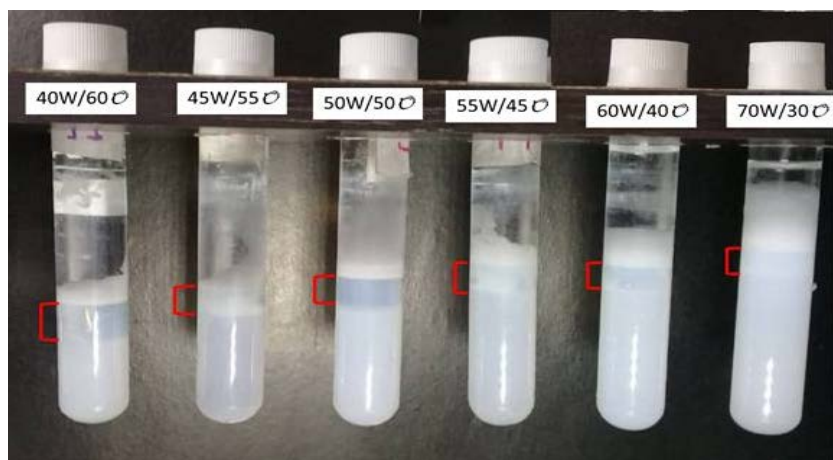


Figura 2.28. Sistemas de composición correspondiente a 3 % surfactante /97 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

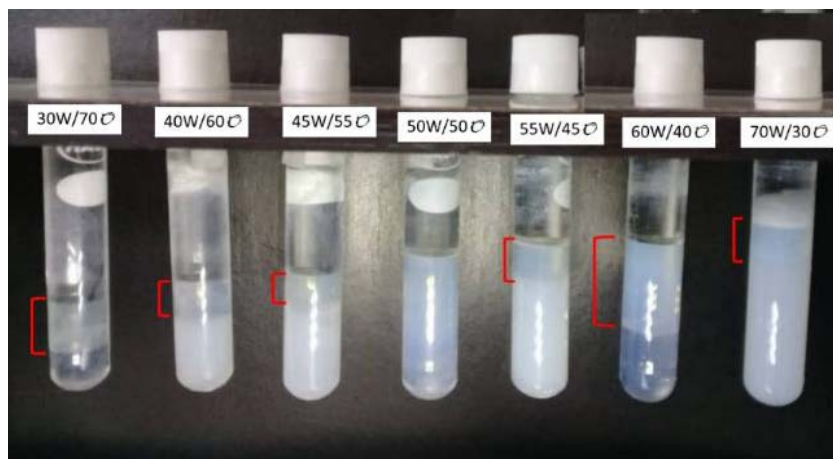


Figura 2.29. Sistemas de composición correspondiente a 5 % surfactante /95% agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

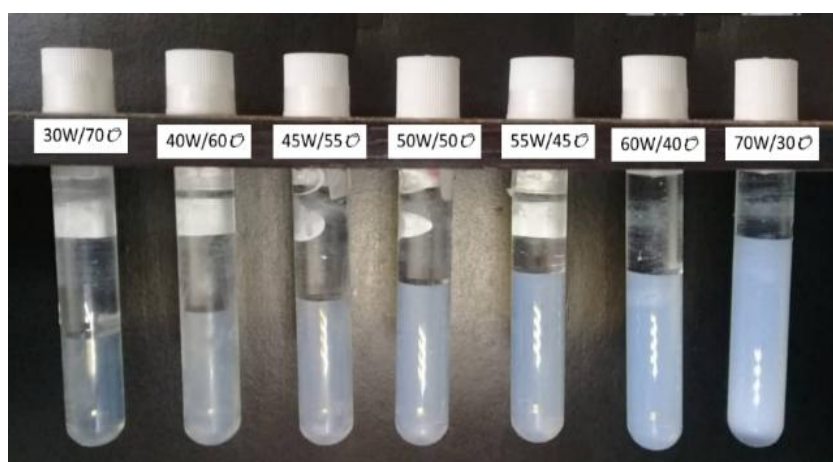


Figura 2.30. Sistemas de composición correspondiente a 7 % surfactante /93 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

En las Figuras 2.27, 2.28, 2.29 y 2.30, se observaron sistemas de 2 y 3 fases. Los sistemas que exhibieron la presencia de 3 fases, pueden ser descritas como, una

fase rica en anfífilos (se encuentran señaladas por corchetes de color rojo), y dos fases en exceso, que son esencialmente fase acuosa y aceite.

Esta fase rica en anfífilos, llamada también fase "intermedia" porque su densidad intermedia, hace que aparezca entre las fases de aceite y agua en un tubo de ensayo. En la mayoría de los casos obedece a la definición propuesta para una microemulsión bicontinua o un cristal líquido, debido a que la fase intermedia está en equilibrio con ambas fases en exceso, no se puede diluir ni con agua ni con aceite, por lo que no es continua ni con agua ni con aceite [62, 63]. Este tipo de comportamiento exhibido por estos sistemas fue definido por Winsor como comportamiento de fase Winsor tipo III [35].

Se observa como el volumen de la fase intermedia, fue aumentando con el incremento de la concentración de surfactante en los sistemas. Esto es lo esperado ya que las estructuras de asociación de los surfactantes son las responsables de la solubilización de agua y aceite en estos sistemas.

En los sistemas que mostraron la presencia de dos fases, contienen una fase acuosa, que se encuentra en la parte inferior del tubo. Esta fase acuosa rica en anfífilos puede contener micelas normales, esto debido a que el surfactante empleado tiene un HLB de 11, el cual presenta mayor afinidad por la fase acuosa. Como se observa en la Figura 2.30, correspondiente al sistema 7% fase surfactante.

La otra fase, corresponde al aceite. Estos sistemas parecen presentar un comportamiento de fase correspondiente a Winsor I, en el cual una fase acuosa micelar está en equilibrio con una fase oleosa en exceso. [35].

Estos sistemas, de baja concentración de surfactante, 1, 3, 5 y 7 % requirieron un tiempo superior a los dos meses para alcanzar el equilibrio, o al menos hasta no observar cambios evidentes en los sistemas a presión y temperatura constante.

➤ **Sistemas de composición 10 % de surfactante a 40 % surfactante**

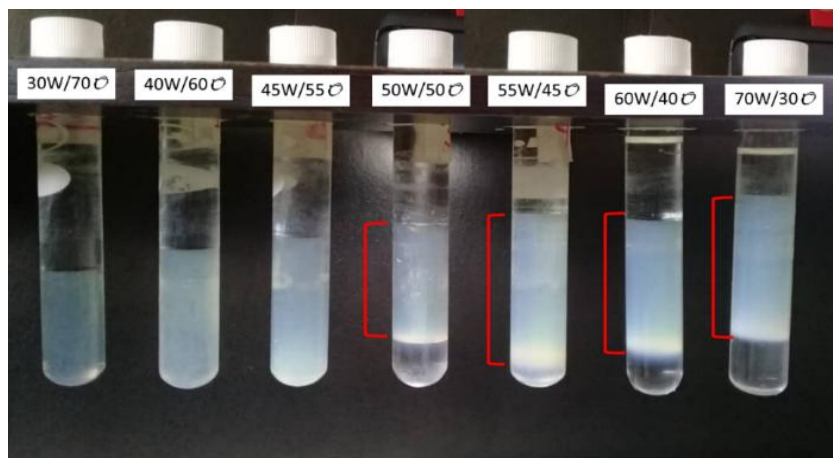


Figura 2.31. Sistemas de composición correspondiente a 10 % surfactante /90 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

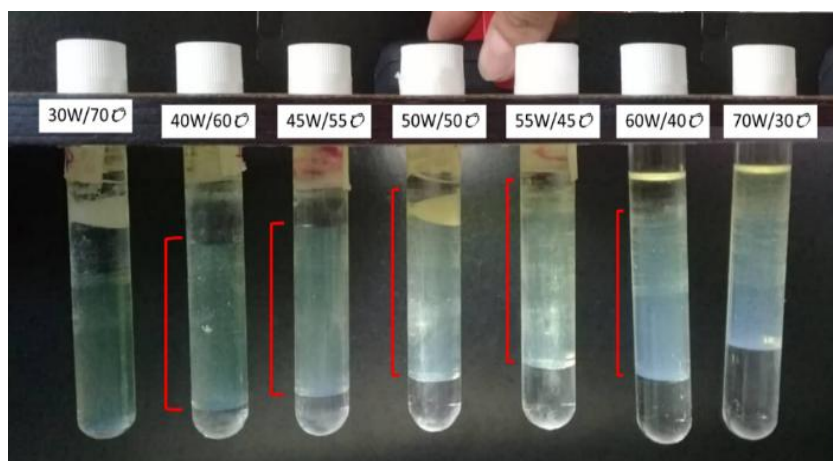


Figura 2.32. Sistemas de composición correspondiente a 20 % surfactante /80 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

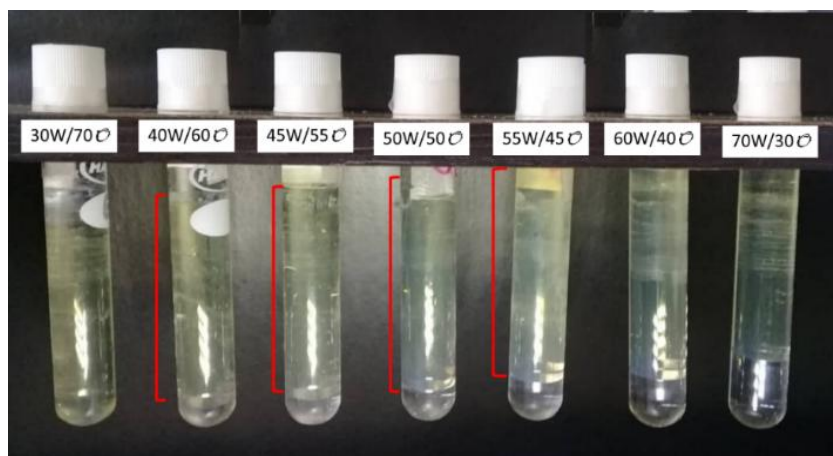


Figura 2.33. Sistemas de composición correspondiente a 30 % surfactante /70 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

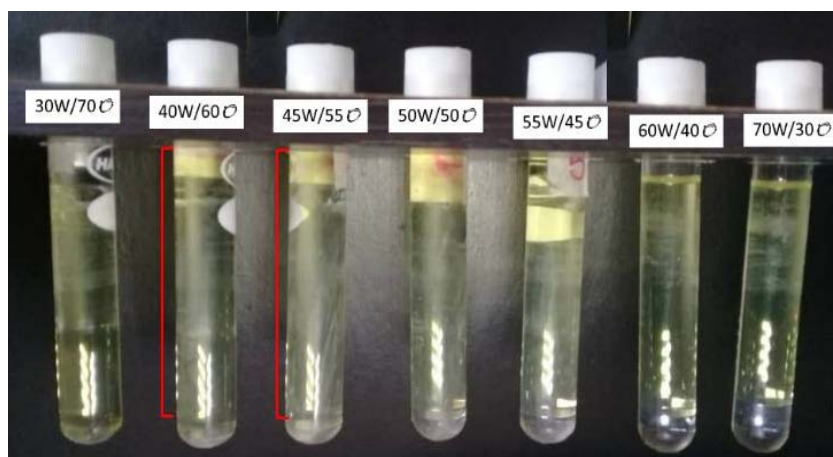


Figura 3.34. Sistemas de composición correspondiente a 40 % surfactante /60 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30. El símbolo rojo indica la presencia de la fase microemulsión.

En las Figuras 2.31, 2.32, 2.33 y 2.34, correspondiente a los sistemas de composición 10, 20, 30 y 40 % surfactante, de forma general se observó sistemas

de 3 y 2 fases. Los sistemas que exhibieron la presencia de 3 fases (se encuentran señalados por corchetes de color rojo), en el cual una microemulsión está en equilibrio con las fases de agua y aceite en exceso. Como se mencionó para los sistemas anteriores, se trata de un sistema de comportamiento de fase Winsor tipo III. En este caso el contenido de la zona trifásica es superior a las otras fases presentes.

Las formulaciones que presentan el trifásico, poseen una curvatura interfacial nula, es decir una $R = 1$, esto sugiere que se trata de una microemulsión bicontinua, o cristal líquido lamelar ^[4].

En la batería correspondiente a los sistemas de composición 10 % surfactante, el cual se observa en la Figura 2.31, los tubos que mostraron la presencia de dos fases, la fase acuosa rica en anfífilos y la otra fase, corresponde al aceite. Estos sistemas parecen presentar un comportamiento de fase correspondiente a Winsor I, en el cual una fase acuosa micelar está en equilibrio con una fase oleosa en exceso ^[34]. A medida que aumenta el contenido de tensoactivo, (en este sistema el contenido de anfífilos se encuentra al 10% en masa) y la cantidad de aceite solubilizado, la fase acuosa rica en anfífilos puede contener micelas extremadamente hinchadas, una microemulsión O / W o, una microemulsión percolada en la que las islas de aceite se tocan entre sí ^[36].

El sistema de concentración de surfactante 10 % requirió un tiempo superior a las 2 semanas para alcanzar el equilibrio, o al menos hasta no observar cambios evidentes en este sistema.

A partir de los sistemas de composición 20% surfactante, el aumento del contenido de surfactante cambió las características de los sistemas trifásicos (Figuras 2.32, 2.33 y 2.34) y las otras fases presentes. En este caso, se trata de sistemas trifásicos cristalinos y traslucidos de color amarillo, presentan un comportamiento fluido y su alta capacidad de solubilización de las otras dos fases. Se trata de sistemas que se formaron y estabilizaron en un tiempo inferior a 4 días y se mantuvieron estables sin cambiar su apariencia durante los 3 meses de observación en el baño de agua

a 26 °C. Estas características mostradas corresponden a la de una microemulsión. [63].

En los sistemas de composición 30, 40 y 50 % surfactante, para la relación 30/70 agua y aceite, las fases acuosas, o fases inferiores en los sistemas de 2 fases, mostraron las mismas características de los sistemas trifásicos indicando en este caso que no se trata de micelas normales, sino de microemulsiones coexistiendo con una fase aceite en exceso. En el caso contrario, los tubos que contienen la relación 70/30 agua y aceite, hay presente una microemulsión coexistiendo con una fase acuosa en exceso.

➤ **Sistemas de composición 50 % de surfactante a 70 % surfactante**

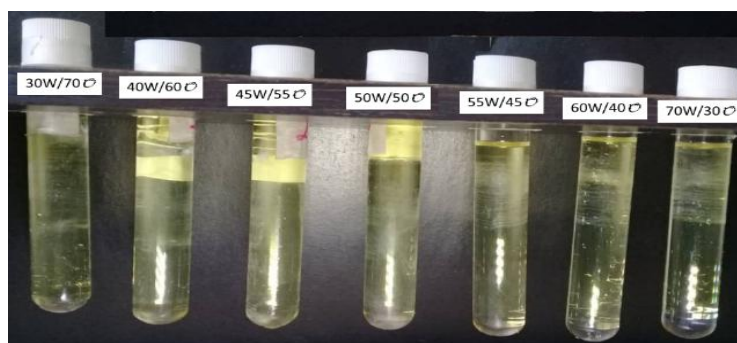


Figura 2.35. Sistemas de composición correspondiente a 50 % surfactante /50 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

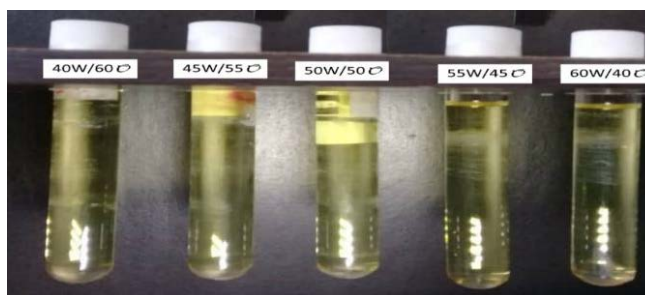


Figura 2.36. Sistemas de composición correspondiente a 60 % surfactante /40 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

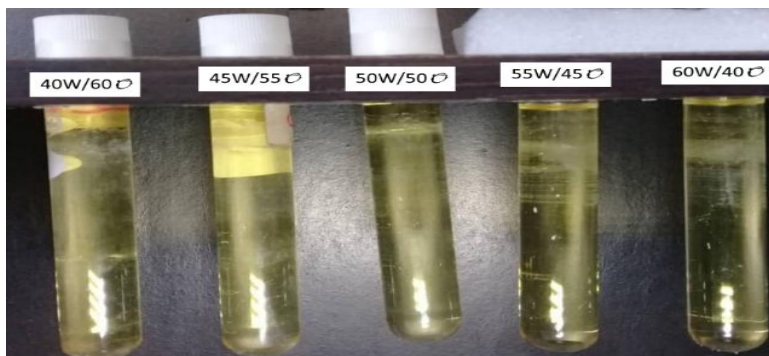


Figura 2.37. Sistemas de composición correspondiente a 70 % surfactante /30 % agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

En las Figuras 2.35, 2.36 y 2.37, correspondiente a los sistemas de composición 50, 60 y 70 se observan sistemas de 2 y 1 fases.

En los 3 sistemas, los tubos que contenían dos fases, en su mayoría está conformado por una fase cristalina y traslúcida de color amarillo, fluida y de alta capacidad de solubilización de las otras dos fases. Estas características corresponden a la de una microemulsión ^[63]. La fase microemulsión se observó coexistiendo con una fase no solubilizada, la cual se encuentra en poca cantidad.

En algunos casos estas fases no solubilizadas en la microemulsión, se encontraban en la parte inferior de la microemulsión (fase acosa) y en otros tubos se presentó en la parte superior (fase aceite).

Estos sistemas estabilizaron en un tiempo inferior a 4 días y se mantuvieron estables sin cambiar su apariencia durante los 3 meses de observación en el baño de agua a 26 °C.

En estos sistemas, algunos tubos se obtuvieron sólo una fase, con las características que lo definen como microemulsión, solubilizando todos los componentes presentes en una sola fase translúcida y homogénea. Definidos como Winsor IV ^[36].

En la Figura 2.38, se observa la representación gráfica de las fases encontradas en el Diagrama de composición ternario Agua/Aceite/Surfactante-cosurfactante. Conformado por Agua/aceite mineral/Tween 85 – (pentanol/sec-butanol). Cuadros rosados: 3 fases. Diamantes verdes: 2 fases. Triángulos azules: 1 fase. En este diagrama se resumen las fases estudiadas luego de 3 meses de su formulación a 26 °C y presión atmosférica.

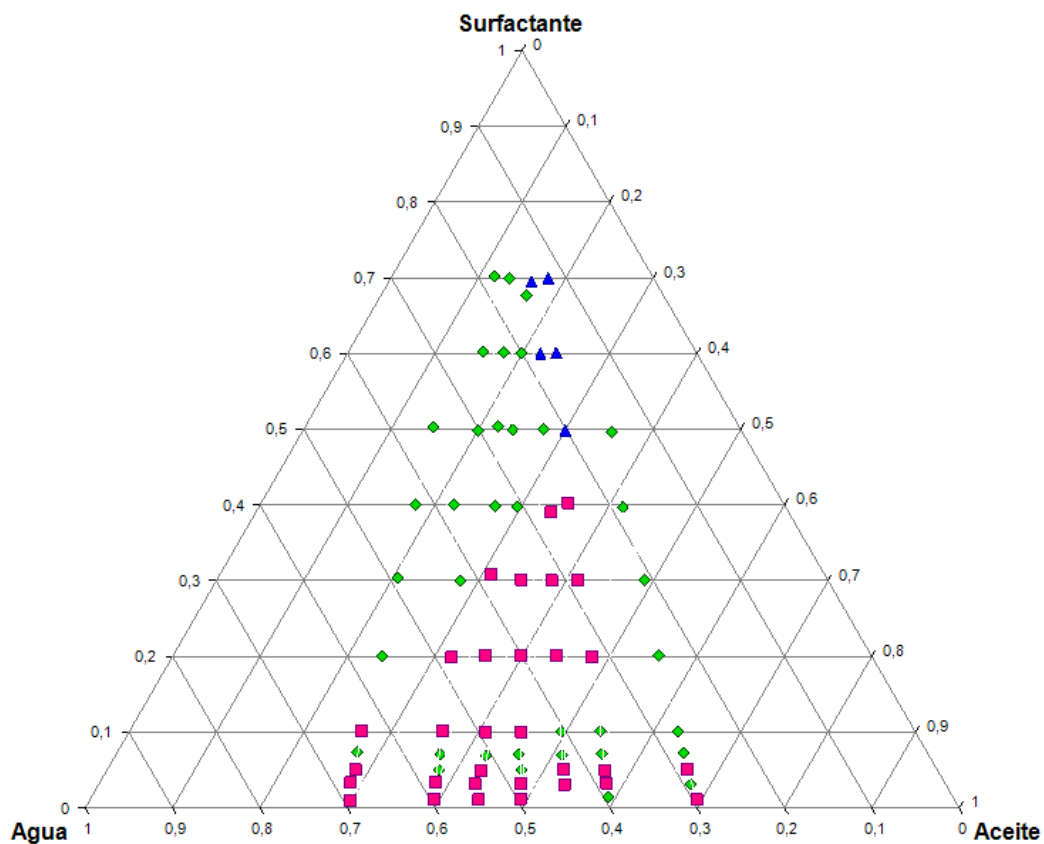


Figura 2.38. Representación de las fases encontradas en el Diagrama de composición pseudo ternario Agua/Aceite/Surfactante-cosurfactante. Cuadros rosados: 3 fases. Diamantes verdes: 2 fases. Triángulos azules: 1 fase. En este diagrama se resumen las fases estudiadas luego de 3 meses de su formulación a 26 °C y presión atmosférica.

2.3.5.2. Análisis del comportamiento de fases

Entre 1 y 5 % de surfactante se obtienen sistemas trifásicos. Estos sistemas trifásicos presentan un volumen reducido debido a la baja cantidad de la fase surfactante. Sin embargo, a pesar de la baja cantidad de surfactante, estas concentraciones de fase surfactante se forman microemulsiones y posiblemente cristales líquidos, como se observó en las fotos de la microscopía óptica, de los barridos de HLB (Figuras 2.21, 2.22, 2.24 y 2.25). Como lo reporta Rapalli 2020 ^[64], se pueden formar los cristales líquidos a bajas concentraciones de surfactantes.

A 7 % se presenta una zona bifásica debido a la relativa baja concentración de surfactante. Debido a la naturaleza hidrofílica del Tween 85 las micelas presentes en la fase acuosa, aumentan en cantidad. En estas condiciones las micelas pueden solubilizar más aceite en su interior, lo que hace que incremente su tamaño. Este fenómeno se conoce como micelas hinchadas y es el responsable del color observado en la fase acuosa.

A partir de 10 % de surfactante, nuevamente se obtienen sistemas con trifásicos en la región donde la relación agua/aceite va de 70 W/30 O a 50 W/50 O. Estos sistemas trifásicos presentan un volumen mayor a medida que se aumenta la concentración de surfactante.

A partir de 20 % se favorece la formación de sistemas trifásicos en las zonas en donde la relación de agua y aceite es similar, entre 60 W/40 O a 40 W/60 O. Sin embargo, a medida que se aumente la concentración de surfactante a 30 y 40%, los sistemas trifásicos aparecen en una zona de relación equitativa W/O, y muestran una tendencia hacia donde la proporción de fase aceite es mayor.

A partir de 20 % se observa que en los extremos de los puntos estudiados en el ternario se comienzan a presentar sistemas bifásicos, los cuales se presentan en mayor número de sistemas, a medida que se aumenta la cantidad de surfactante. Esto puede ser debido al aumento de una de las fases agua o aceite, lo que favorece la formación de una microemulsión O/W o W/O, desfavoreciendo la formación de los sistemas trifásicos.

A medida que se aumenta la concentración de surfactante aumenta la fase microemulsión. Obteniéndose un volumen reducido de la fase en exceso. En caso de una microemulsión hacia la zona rica en agua, se presenta en la parte superior del tubo un exceso de fase aceite cada vez más reducida, hasta obtener en algunos casos, sistemas monofásicos, es decir, sistemas en el cual existe una microemulsión en la cual se ha incorporado todo el contenido de agua y aceite en la misma. Estos casos se refieren a sistemas Winsor IV, los cuales podrían ser microemulsiones bicontinuas o fases esponjas. Estos sistemas se obtuvieron en zonas cercanas a una relación de agua y aceite similares, en zonas relación W/O (50/50 y 45/55), a 50, 60 y 70 % de fase surfactante.

2.3.5.3. Caracterización por microscopía óptica de luz polarizada del ternario

1

Las fases intermedias, obtenidas en los sistemas trifásicos en el ternario, fueron observadas y analizadas a través de la microscopía óptica de luz polarizada, con la finalidad de investigar la presencia de fases anisotrópicas (cristales líquidos) y fases isotrópicas (microemulsiones). Las microscopías de los sistemas trifásicos se observan en la Figura 2.39.

Fueron analizadas las muestras de composición a partir de 10 % de surfactante, debido a que, a concentración de surfactantes inferior, requieren un tiempo superior a una semana para alcanzar el equilibrio.

A medida que aumenta el porcentaje de la fase surfactante, menor tiempo es requerido para alcanzar su equilibrio.

➤ **Sistemas de composición 10 % de surfactante**

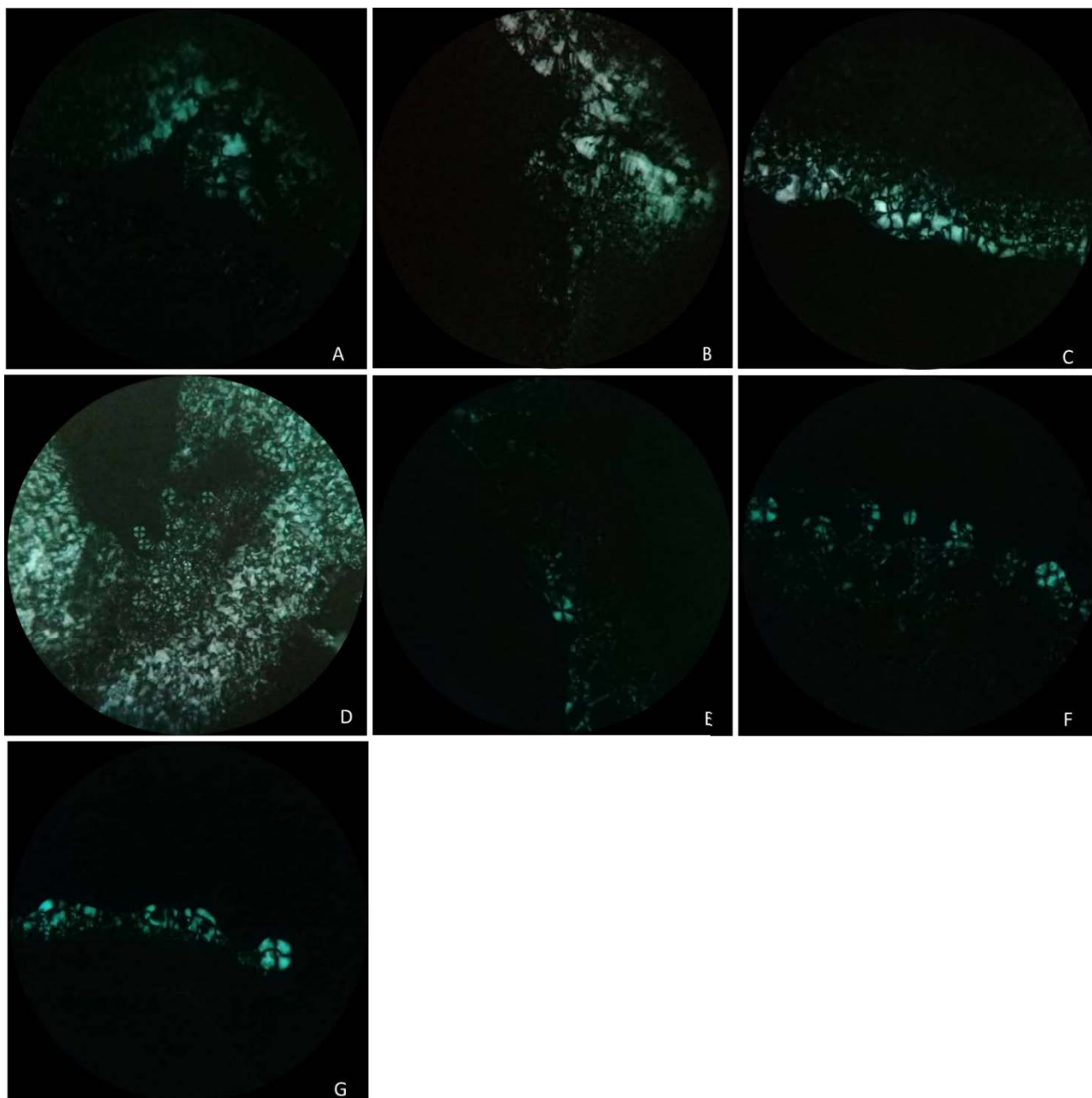


Figura 2.39. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los puntos estudiados de composición 10 % fase surfactante /90 % (W/O). a) Sistema (5) relación W/O 30/70, b) Sistema (14) relación W/O 40/70, c) Sistema (25) relación W/O 45/55, d) Sistema (36) relación W/O 50/50, e) Sistema (47) relación W/O 55/45, f) Sistema (58) relación W/O 60/40, g) Sistema (69) relación W/O 70/30.

Tabla 2.3. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica de los puntos estudiados de composición 10 % fase surfactante /90 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 5, 14, 25, 36, 47, 58 y 69.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
10%	30/70	5	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas + texturas no geométricas [18, 65].
	40/60	14	Lamelar (L α)/Hexagonal (H $_2$)	TO Lamelar cónico focal positiva + TO no geometrica estriado, posible hexagonal [18, 31, 52, 65].
	45/55	25	Lamelar (L α)/Hexagonal (H $_2$)	TO Lamelar cónico focal positiva + TO hexagonal abanico [18, 19, 52, 65].
	50/50	36	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas + texturas no geométricas (posible tipo mosaico) [18, 65].
	55/45	47	Lamelar (L α)	TO tipo Grandjean, con presencia de estructuras conico focales. Esta textura es característica de cristales líquidos laminares, evidenciada por la formación de la cruz de malta. [18, 19, 52].
	60/40	58	Lamelar (L α)	
	70/30	69	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas + texturas no geométricas (posible tipo mosaico) [18, 65].

➤ **Sistemas de composición 20 % de surfactante**

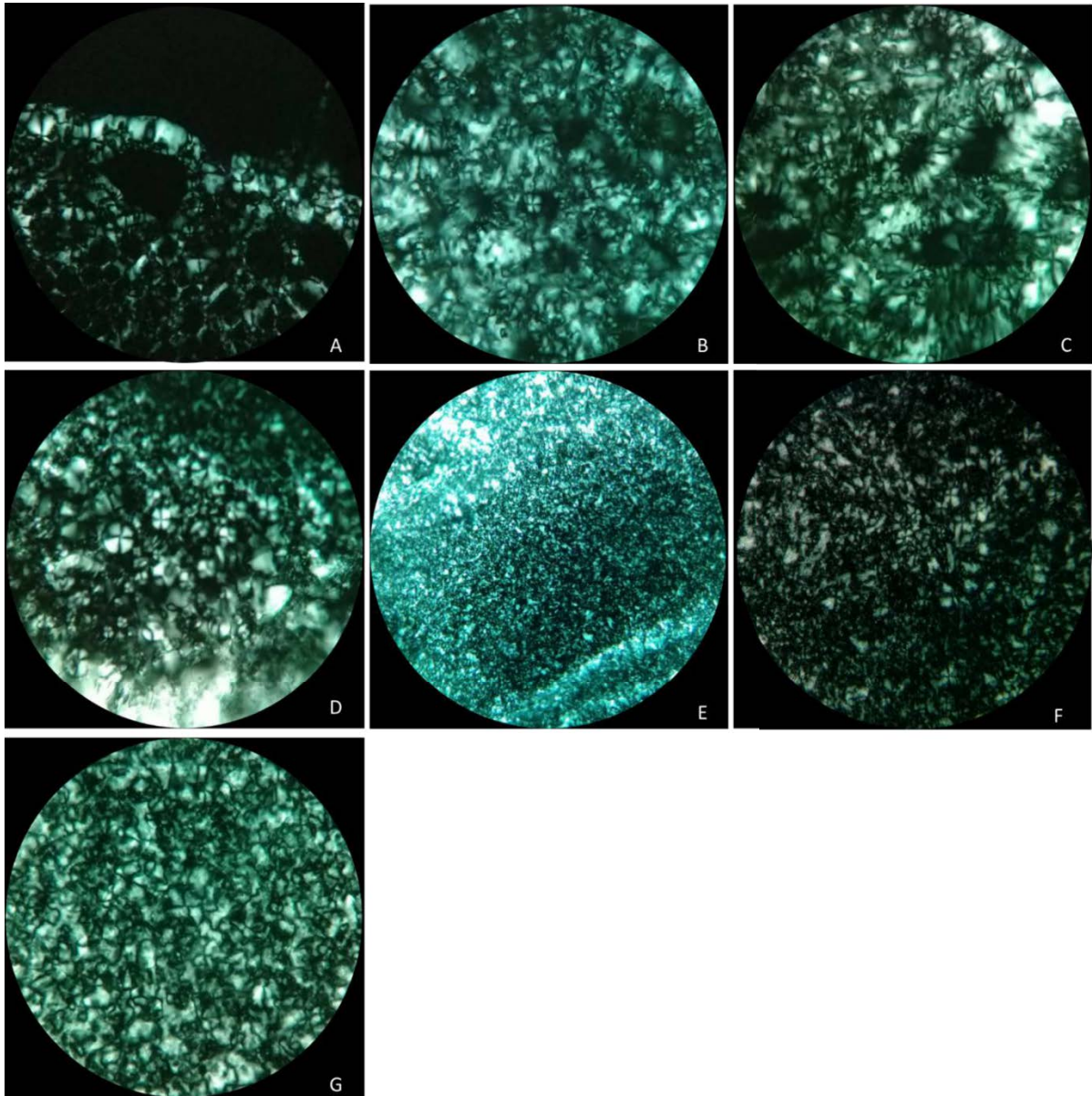


Figura 2.40. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 20 % fase surfactante /80 % (W/O). a) Sistema (6) relación W/O 30/70, b) Sistema (15) relación W/O 40/70, c) Sistema (26) relación W/O 45/55, d) Sistema (37) relación W/O 50/50, e) Sistema (48) relación W/O 55/45, f) Sistema (59) relación W/O 60/40, g) Sistema (70) relación W/O 70/30

Tabla 2.4. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica de los puntos estudiados de composición 20 % fase surfactante /80 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 6, 15, 26, 37, 48, 59 y 70.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
20%	30/70	6	Lamelar ($L\alpha$)	TO tipo Grandjean, con presencia de estructuras conico focales. Esta textura es característica de cristales líquidos laminares, evidenciada por la formación de la cruz de malta. [18, 19, 52].
	40/60	15	Lamelar ($L\alpha$)/ Hexagonal (H_2)	TO Lamelar cónico focal positiva + TO hexagonal reverso tipo abanico [18, 19, 52, 66].
	45/55	26		
	50/50	37	Lamelar ($L\alpha$)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas (Posibles gotas estabilizadas por cristales líquidos Lamelares [18, 19, 52, 56, 57].
	55/45	48	Lamelar ($L\alpha$)	TO lamelar tipo mosaico [18, 19, 31, 58, 65, 67].
	60/40	59	Lamelar ($L\alpha$)	
	70/30	70	Lamelar ($L\alpha$)	

➤ **Sistemas de composición 30 % de surfactante**

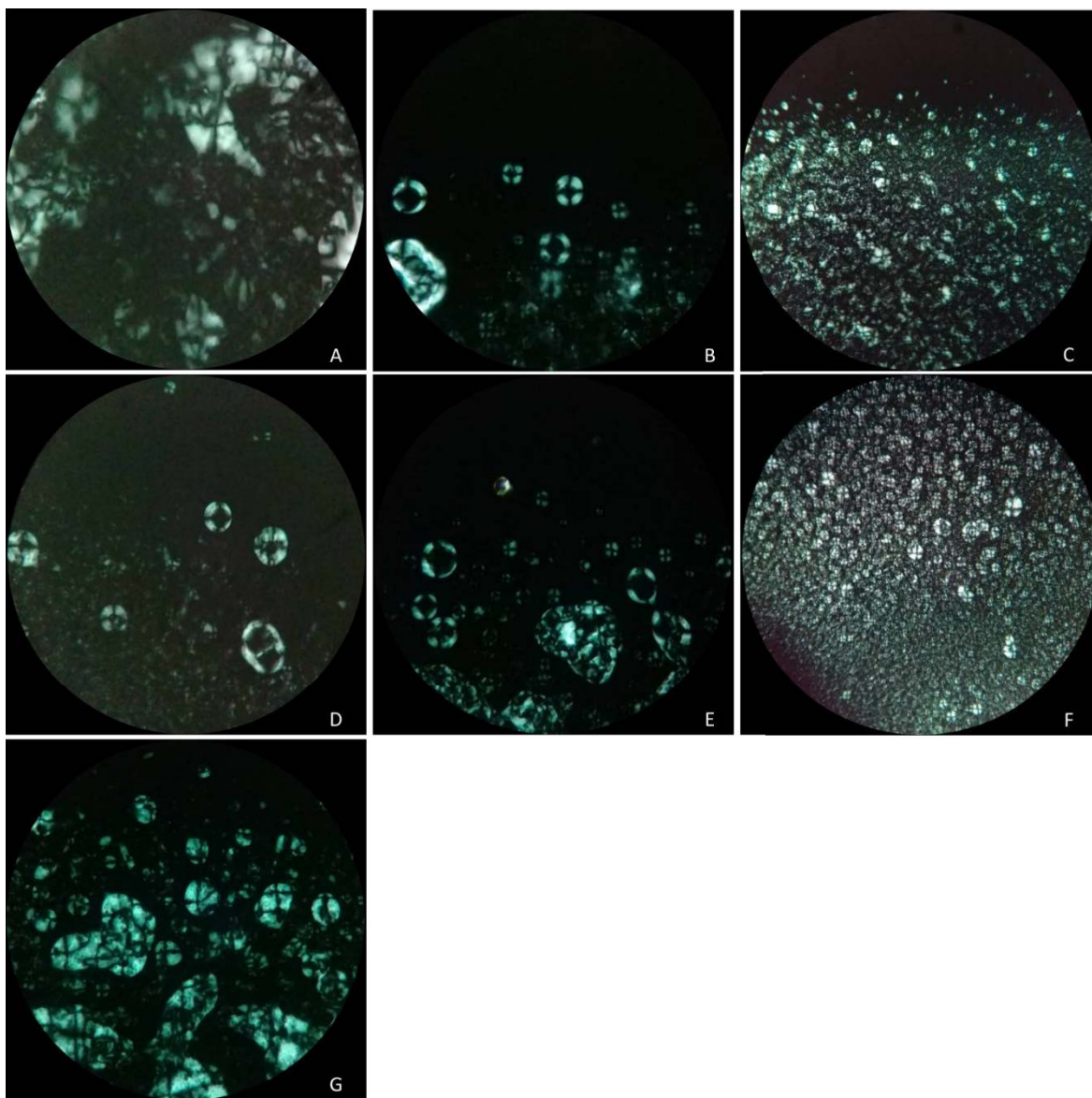


Figura 2.41. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 30 % fase surfactante /70 % (W/O). a) Sistema (7) relación W/O 30/70, b) Sistema (16) relación W/O 40/70, c) Sistema (27) relación W/O 45/55, d) Sistema (38) relación W/O 50/50, e) Sistema (49) relación W/O 55/45, f) Sistema (60) relación W/O 60/40, g) Sistema (71) relación W/O 70/30.

Tabla 2.5. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 30 % fase surfactante /30 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 7, 16, 27, 38, 49, 60 y 71.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
30%	30/70	7	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas + texturas no geométricas (posible tipo mosaico) [18, 31, 65, 66].
	40/60	16	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales negativas (Posibles gotas estabilizadas por cristales líquidos Lamelares [18, 19, 52, 56, 57].
	45/55	27	Lamelar (L α)	
	50/50	38	Lamelar (L α)	
	55/45	49	Lamelar (L α)	
	60/40	60	Lamelar (L α)	
	70/30	71	Lamelar (L α)	

➤ **Sistemas de composición 40 % surfactante**

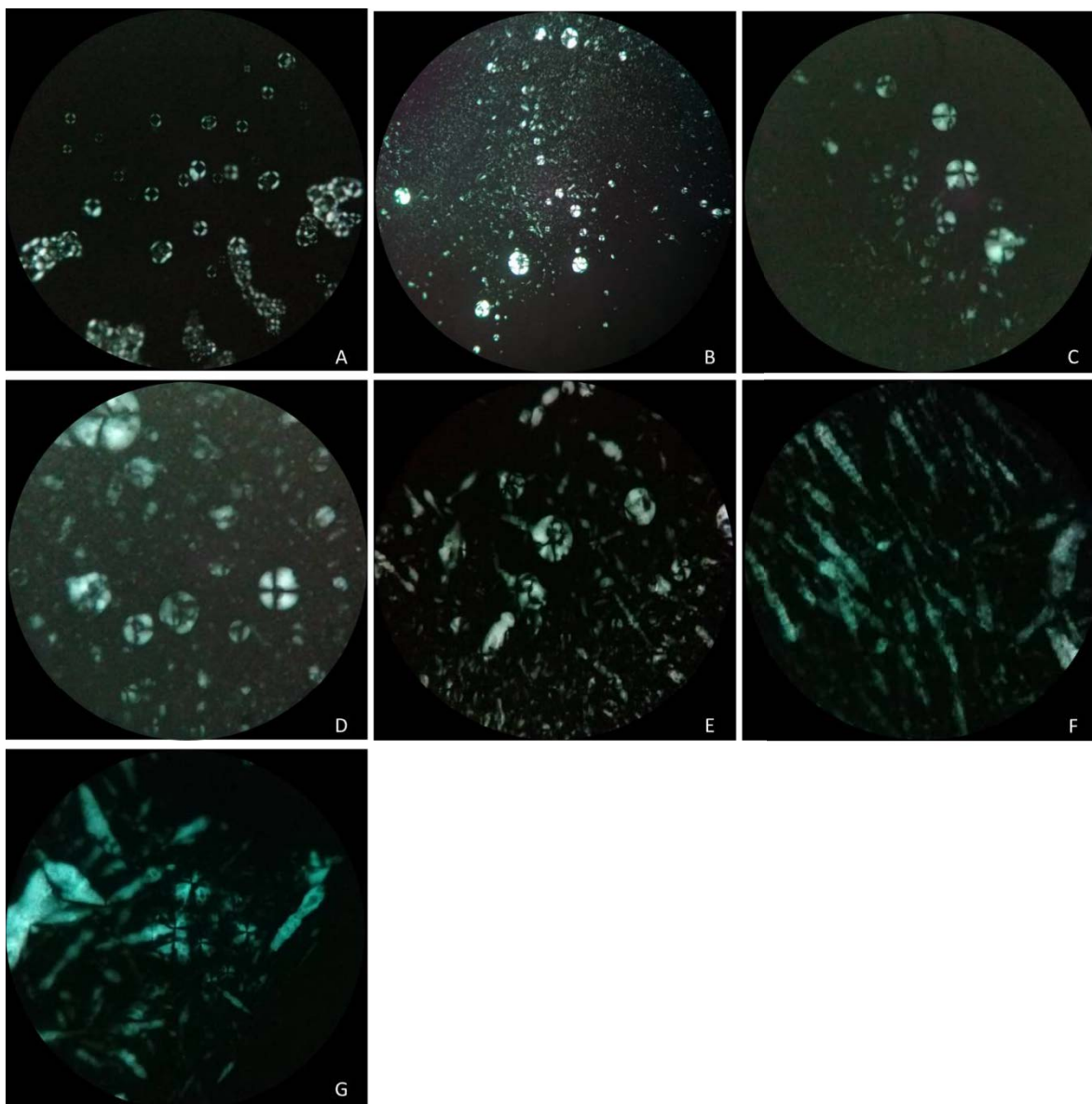


Figura 2.42. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 40 % fase surfactante /60 % (W/O). a) Sistema (8) relación W/O 30/70, b) Sistema (17) relación W/O 40/70, c) Sistema (28) relación W/O 45/55, d) Sistema (39) relación W/O 50/50, e) Sistema (50) relación W/O 55/45, f) Sistema (61) relación W/O 60/40, g) Sistema (72) relación W/O 70/30.

Tabla 2.6. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 40 % fase surfactante /60 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 8, 17, 28, 39, 50, 61 y 72.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
40%	30/70	8	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales negativas (Posibles gotas estabilizadas por cristales líquidos Lamelares) [18, 19, 52, 56, 57].
	40/60	17	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales negativas (Posibles gotas estabilizadas por cristales líquidos Lamelares)/ Presencia de bâtonnets lamelares [18, 19, 52, 56, 57].
	45/55	28	Lamelar (L α)	
	50/50	39	Lamelar (L α)	
	55/45	50	Lamelar (L α)	
	60/40	61	Lamelar (L α)	
	70/30	72	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas (Posibles gotas estabilizadas por cristales líquidos Lamelares)/ Presencia de bastones lamelares [18, 19, 52, 56, 57].

➤ **Sistemas de composición 50, 60 y 70 % surfactante**

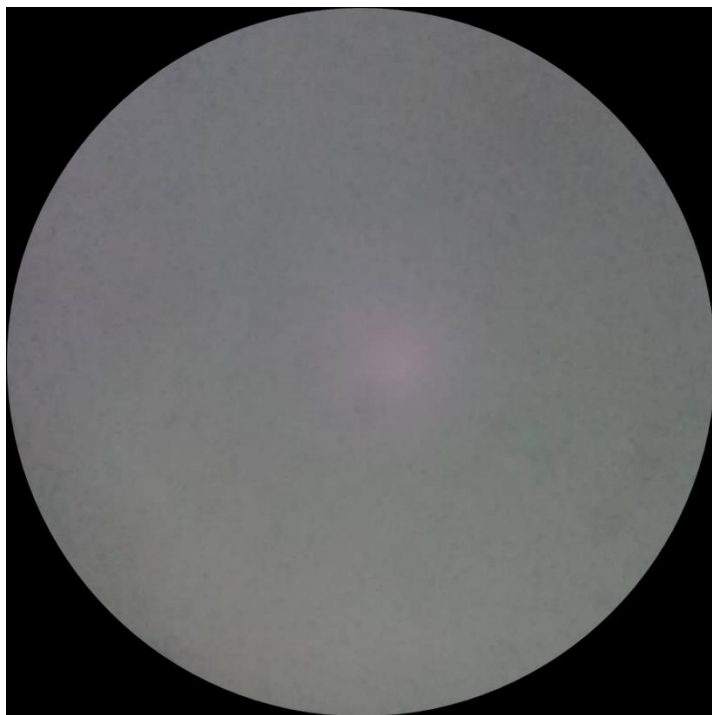


Figura 2.43. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de microemulsión de todos los puntos estudiados de composición 50%, 60% y 70% fase surfactante, para todas las relaciones (W/O). Corresponde a los sistemas: 9, 18, 19, 20, 29, 30, 31, 40, 41, 42, 51, 52, 53, 62, 63, 64 y 73.

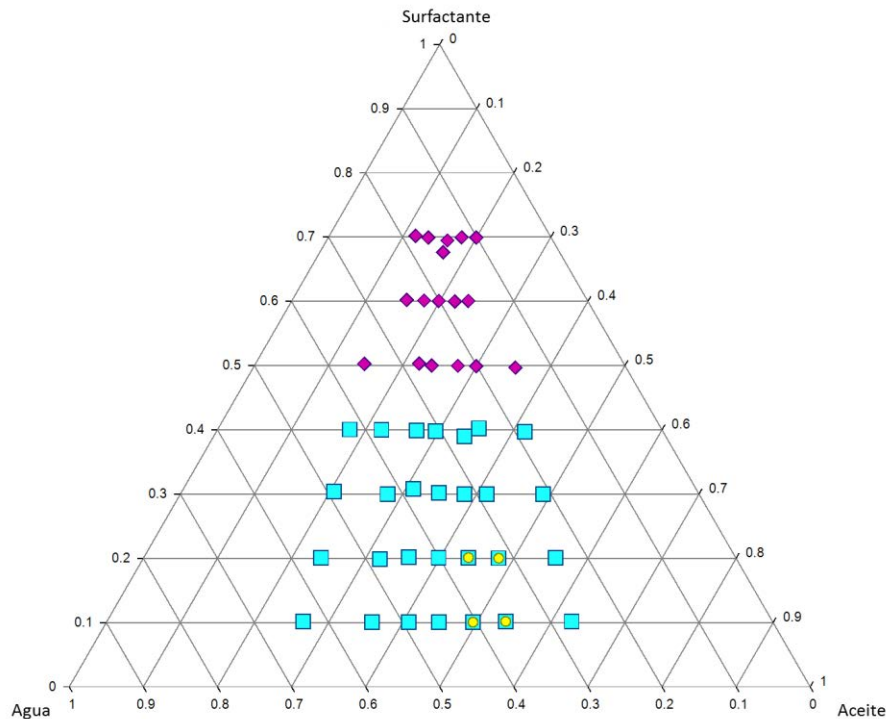


Figura 2.44. Representación de las distintas asociaciones anfífilas encontradas en el Diagrama de composición pseudo ternario Agua/Aceite/Surfactante-cosurfactante. Cuadros celestes: Fase lamelar. Diamantes morados: Microemulsión o fase isotrópica. Círculos amarillos: Fase hexagonal inversa (H_2). En este diagrama se resumen las fases estudiadas luego de 3 meses de su formulación a 26 °C y presión atmosférica.

2.3.5.4. Análisis del diagrama de fases

Entre 10 y 40% de concentración de fase surfactante, independientemente de la relación agua y aceite, se evidenció la presencia cristales líquidos lamelares en todos los sistemas. Aunque sean caracterizados con texturas ópticas específicas y distintas, todas corresponden a un ordenamiento del tipo lamelar. Lo que evidencia la tendencia del surfactante Tween 85 (en sinergia con los cosurfactantes) a la formación de este tipo de agregados en un amplio margen de concentraciones.

Aunque no fueron caracterizados por microscopía óptica de luz polarizada los sistemas entre 1 y 7% de concentración de surfactante, queda evidenciado a través

de los barridos de HLB, que también se forman cristales líquidos con esta composición a bajas concentraciones de surfactante. Sin embargo, a la concentración de 3% de surfactante, se observan texturas ópticas tanto lamelares como hexagonales.

Los resultados de la microscopía óptica polarizada, sugiere que a 10% y a 20% de fase surfactante, hay presencia de cristales hexagonales coexistiendo con la fase lamelar. Las texturas ópticas características de los cristales hexagonales, se presentan en una proporción 40 W/60 O y 45 W/55 O en ambas concentraciones de surfactante, indicando que podría tratarse de cristales hexagonales reversos (H_2), debido a que se localizan en una zona con mayor cantidad de aceite que de agua. A concentración de fase surfactante entre 50 y 70%, independientemente de la relación agua y aceite, no se observaron estructuras birrefringentes a través de la microscopía óptica de luz polarizada, indicando la presencia únicamente de fases isotrópicas. En esta zona podríamos tener simplemente microemulsiones bicontinua o fases tipo esponja, debido a que ambos tipos de asociaciones anfífilas no presentan anisotropía.

Estas suposiciones pueden ser respaldadas por las características físicas de las muestras, ya que presentan apariencia traslúcida y cristalina y un gran volumen de la fase microemulsión. Además de alto contenido de surfactante.

Para las muestras que presentaron 2 fases, se trata de un comportamiento del tipo Winsor I o II y en el caso de los sistemas que presentaron 1 sola fase, se trata de microemulsiones tipo Winsor IV. Con posible coexistencia con otras fases anisotrópicas.

2.3.6. Ternario 2

Una vez evaluado el 1er ternario, procedió a realizar un segundo ternario variando los cosurfactantes empleados. Esta vez, empleando moléculas comúnmente usadas en las formulaciones cosméticas, como lo es el propilenglicol y el etanol. El propilenglicol es comúnmente usado como emoliente y lo emplea Kupper ^[50], en

combinación con el etanol como cosurfactante para la formulación de microemulsiones cosméticas usadas como sistemas de liberación.

Se establecieron los puntos a evaluar a partir de los resultados en el ternario 1. Se escogieron menos puntos a estudiar, pero los necesarios para evaluar el efecto de los cosurfactantes en la formación de las diferentes asociaciones de los sistemas anfifílicos y la sinergia con el Tween 85 para la formación de cristales líquidos.

A continuación, en la Figura 2.45 se observan las composiciones estudiadas representadas en el diagrama ternario (estos puntos están detallados en la metodología), elaborado empleando en la fase surfactante Tween 85 más la mezcla de cosurfactantes (etanol/propilenglicol), manteniendo como fase acuosa una solución de cloruro de sodio y en la fase aceite, el aceite mineral.

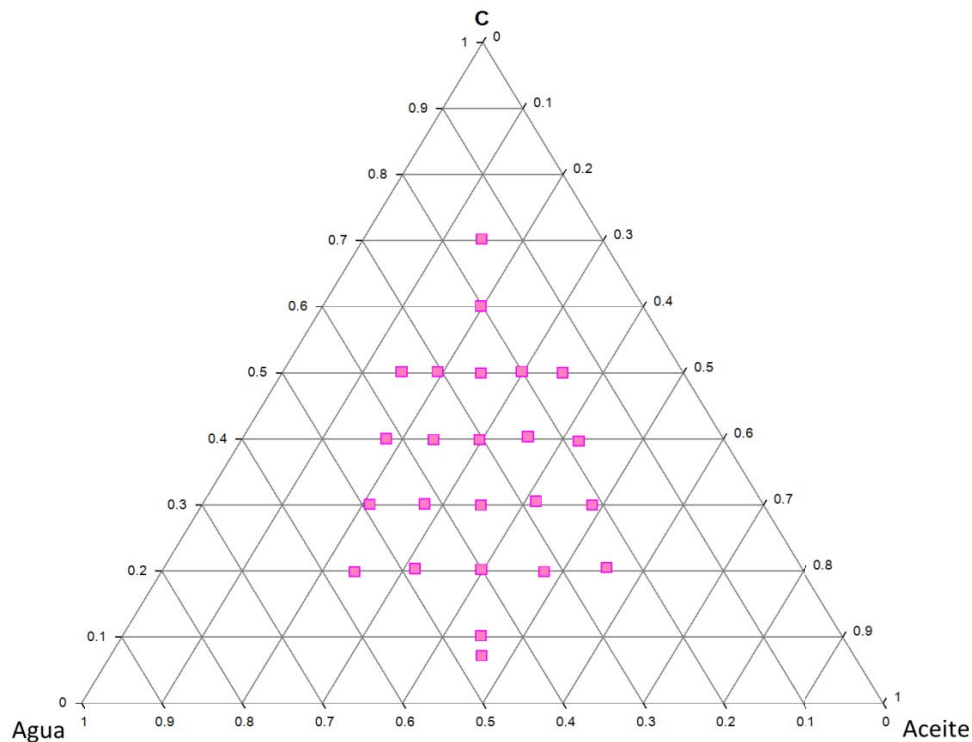


Figura 2.45. Representación gráfica de los puntos estudiados en el ternario de composición agua/aceite/surfactante-cosurfactante. Conformado por agua (solución de cloruro de sodio) /aceite mineral/Tween 85 – (etanol/propilenglicol). Los puntos representan las composiciones estudiadas.

En este caso se construyó el ternario 2 a partir de una composición de 20 % fase surfactante, debido a que a partir de esta composición el tiempo en el cual las fases alcanzan el equilibrio es muy corto, puede ser menor a 5 días.

2.3.6.1. Caracterización del comportamiento de fases

Luego de transcurrido un mes de la elaboración de cada sistema, se procedió a evaluar de manera visual las fases presentes en cada tubo formulado, con la finalidad de observar el tipo y cantidad de fases formadas, tal como se observa en las siguientes Figuras.

➤ Sistemas de composición 20 % de surfactante

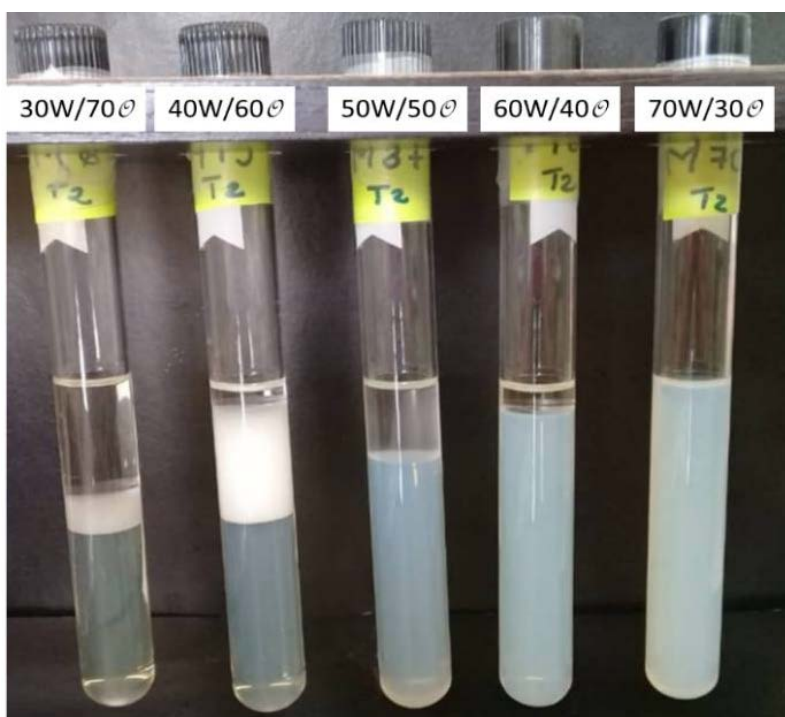


Figura 2.46. Sistemas de composición correspondiente a 20 % surfactante /80% agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

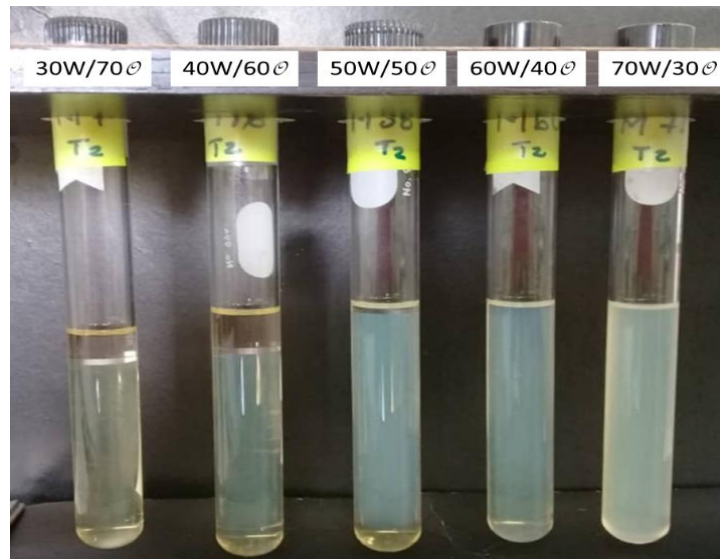


Figura 2.47. Sistemas de composición correspondiente a 30 % surfactante /70% agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

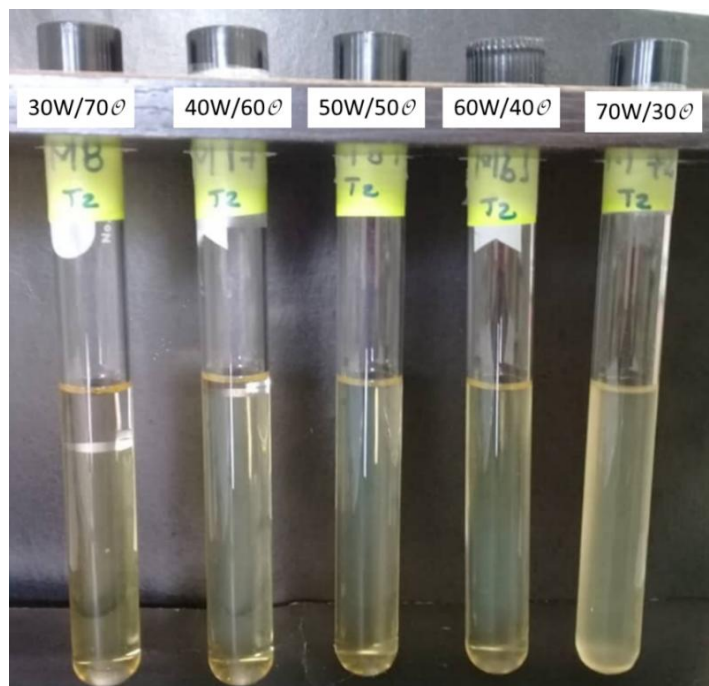


Figura 2.48. Sistemas de composición correspondiente a 40 % surfactante /60% agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

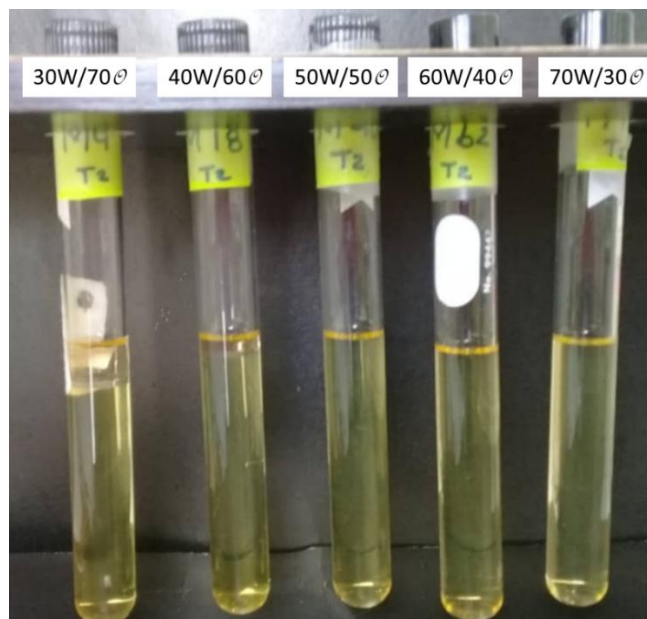


Figura 2.49. Sistemas de composición correspondiente a 50 % surfactante /50% agua y aceite. El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 30/70 hasta 70/30.

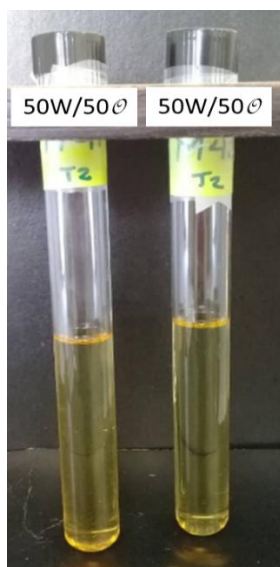


Figura 2.50. Sistema de composición correspondiente a 60% surfactante /40% agua y aceite, y sistema de composición correspondiente a 70% surfactante /30% agua y aceite El porcentaje de agua y aceite se encuentra en relación 50/50.

Los sistemas bifásicos obtenidos corresponden a microemulsiones Winsor II. Para sistemas de baja concentración de agua (micelas hinchadas inversas) tenemos microemulsiones de agua en aceite. En estos sistemas hay un dominio de las interacciones lipofílicas, favoreciendo la formación de una estructura tipo micelas invertidas. Estos sistemas presentan un exceso de fase acuosa coexistiendo con la microemulsión ^[36].

En algunos tubos se obtuvo sólo una fase, con las características que lo definen como microemulsión, solubilizando todos los componentes presentes en una sola fase translúcida y homogénea. Definidos como Winsor IV ^[36].

Los sistemas monofásicos que contiene cantidades similares de aceite y agua, la estructura puede ser alternativamente micelas normales hinchadas en agua o micelas inversas hinchadas en aceite, sin la coexistencia de fases de aceite o agua libre, todos los componentes del sistema se solubilizan mutuamente ^[35]. Estos dos casos están relacionados con la presencia de un tipo específico de micela, es decir, con una curvatura específica ^[36].

A medida que se aumenta la concentración de la fase surfactante y las concentraciones de agua y aceite son comparables, este tipo de sistema SOW monofásico podría ser una red interconectada de dominios de agua y aceite, conocida como una microemulsión bicontinua ^[38].

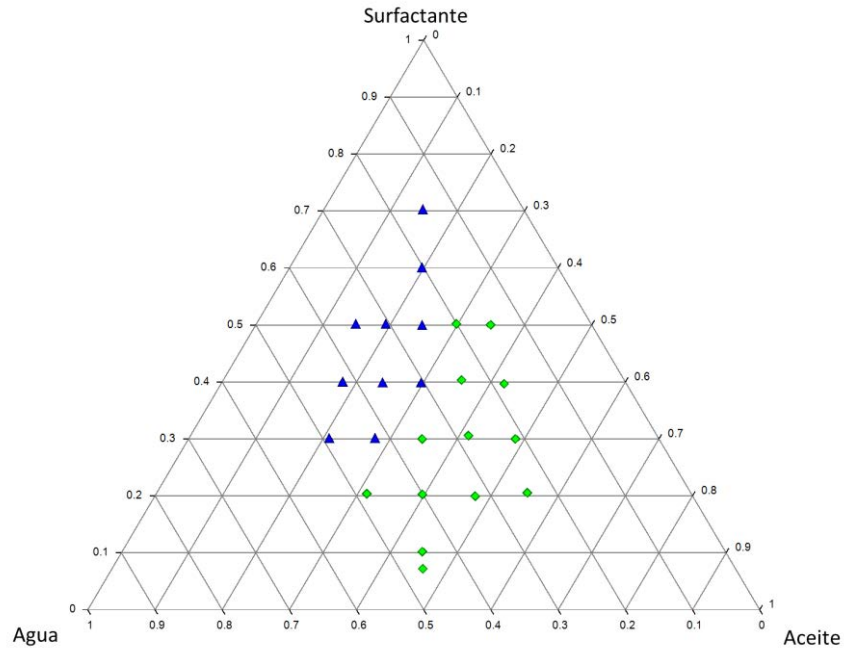


Figura 2.51. Representación de las fases encontradas en el Diagrama de composición pseudo ternario Agua/Aceite/Surfactante-cosurfactante. Diamantes verdes: 2 fases. Triángulos azules: 1 fase. En este diagrama se resumen las fases estudiadas luego de 1 mes de su formulación a 26 °C y presión atmosférica.

2.3.6.2. Análisis del comportamiento de fases

Se realizaron dos sistemas adicionales a los reportados en las imágenes, son los sistemas a 7 y 10 %. Estos sistemas se prepararon con la finalidad de haya la zona de sistemas trifásicos, pero hasta estas concentraciones no fue hallada.

Entre 20 % y 50 % de fase surfactante se presentan sistemas bifásicos, básicamente microemulsiones con un excedente de aceite. Estos sistemas se obtuvieron en zonas cercanas a una relación de agua y aceite similares, en zonas relación W/O (50/50 y 45/55), y en la región de mayor contenido de fase aceite. Debido a la alta concentración de fase surfactante, y por ser una zona de mayor contenido de fase aceite, se puede inferir que se forman microemulsiones en donde se ha incorporado todo el contenido de agua a la microemulsión y una parte importante de la fase aceite, quedando un exceso de la misma.

Mientras que a medida que, si observamos la zona de mayor proporción de fase acuosa, los sistemas resultantes son sistemas monofásicos. Esta diferencia puede ser debido a las moléculas empleadas como cosurfactantes, las cuales pueden presentar mayor contenido de grupos hidrofílicos, aumentando las interacciones de la fase surfactante con la fase acuosa, permitiendo una mayor incorporación de esta fase a la microemulsión.

A concentraciones superiores a 50 %, se estudiaron 2 puntos de composición fase surfactante 60 y 70 %, a una relación W/O 1:1. En ambos casos se obtuvo sistemas monofásicos debido al alto contenido de fase surfactante. Este alto contenido de fase surfactante en la microemulsión. Adicionalmente, el contenido de agua y aceite es comparablemente menos que a bajas concentraciones de fase surfactante.

2.3.6.3. Caracterización por microscopía óptica del ternario 2

➤ Sistemas de composición 20 % de surfactante

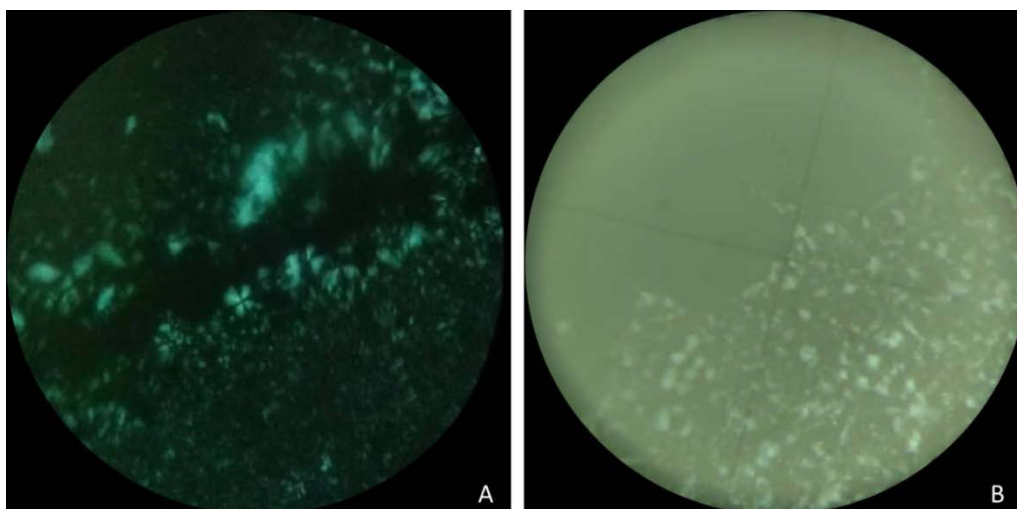


Figura 2.52. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 20 % fase surfactante /80 % (W/O). a) Sistema (6) relación W/O 30/70, b) Sistema (59) relación W/O 60/40.

Tabla 2.7. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los puntos estudiados de composición 20 % fase surfactante /80 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 6 y 59.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
20%	30/70	6	Lamelar (L α)/ Hexagonal (H $_2$)	TO lamelar cónicas focales positivas + texturas no geométricas (posible tipo mosaico) [18, 52, 58, 57].
	40/60	15	-	No se observó birrefringencia
	50/50	37	-	
	60/40	59	Lamelar (L α)	Textura óptica lamelar tipo cónicas focales negativas y texturas no geométricas que presentan birrefringencia [18].
	70/30	70	-	No se observó birrefringencia

Sistemas de composición 30 % de surfactante

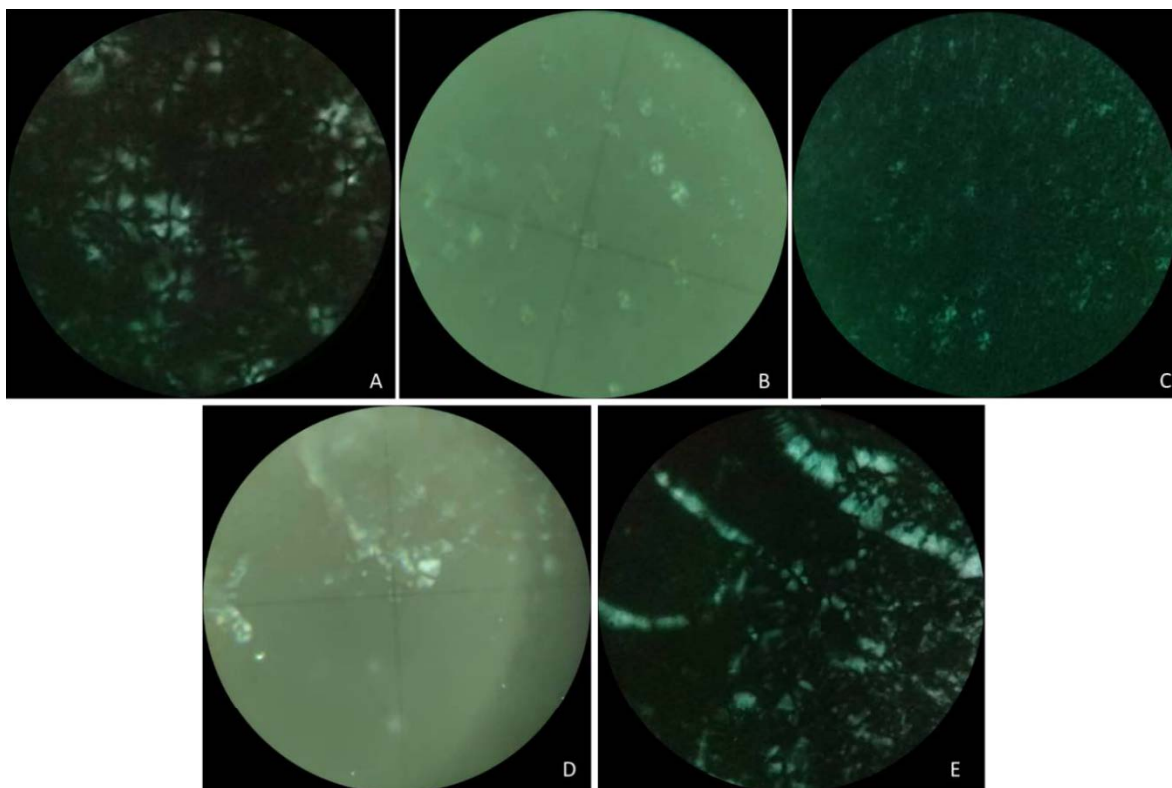


Figura 2.53. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 30 % fase surfactante /70 % (W/O). a) Sistema (7) relación W/O 30/70, b) Sistema (16) relación W/O 40/70, c) Sistema (38) relación W/O 50/50, d) Sistema (60) relación W/O 60/40, e) Sistema (71) relación W/O 70/30.

Tabla 2.8. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 30 % fase surfactante /70 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 7, 16, 38, 60 y 71.

% de Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
30%	30/70	7	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas, tipo mosaico [18, 19, 52, 58].
	40/60	16	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas, tipo mosaico + cónicas focales negativas dispersas (posibles gotas de emulsiones)[18, 19, 52, 56 - 58].
	50/50	38	Lamelar (L α)	
	60/40	60	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales negativas (posible tipo mosaico) + cónicas focales negativas dispersas (posibles gotas de emulsiones)[18, 19, 52, 56-58].
	70/30	71	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales negativas (posible tipo mosaico) + cónicas focales negativas dispersas (posibles gotas de emulsiones) + TO de líneas oleosas [18, 19, 52, 56-58, 67].

➤ **Sistemas de composición 40 % de surfactante**

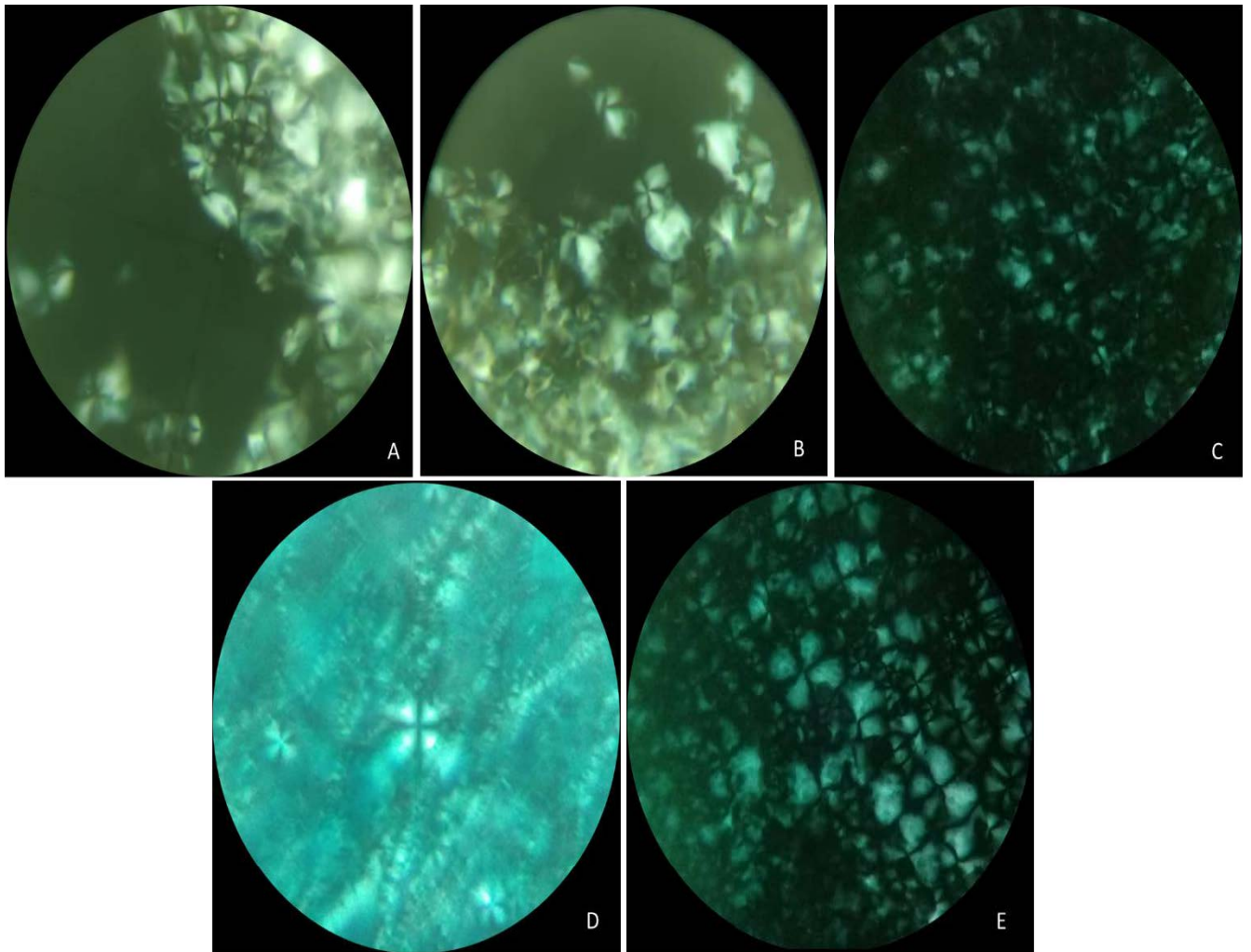


Figura 2.54. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 40 % fase surfactante /60 % (W/O). a) Sistema (8) relación W/O 30/70, b) Sistema (17) relación W/O 40/70, c) Sistema (39) relación W/O 50/50, d) Sistema (61) relación W/O 60/40, e) Sistema (72) relación W/O 70/30.

Tabla 2.9. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 40 % fase surfactante /60 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 7, 16, 38, 60 y 71.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
40%	30/70	8	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas, tipo mosaico y figuras no geometricas birrefringentes [18, 19, 52, 58, 66, 58].
	40/60	17	Lamelar (L α)	
	50/50	39	Lamelar (L α)	
	60/40	61	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas + TO de lineas oleosas [18, 19, 25, 52, 56-58, 67, 68].
	70/30	72	Lamelar (L α)	TO lamelar cónicas focales positivas y negativas, tipo mosaico [18, 19, 52, 58, 66, 68].

➤ **Sistemas de composición 50 % de surfactante**

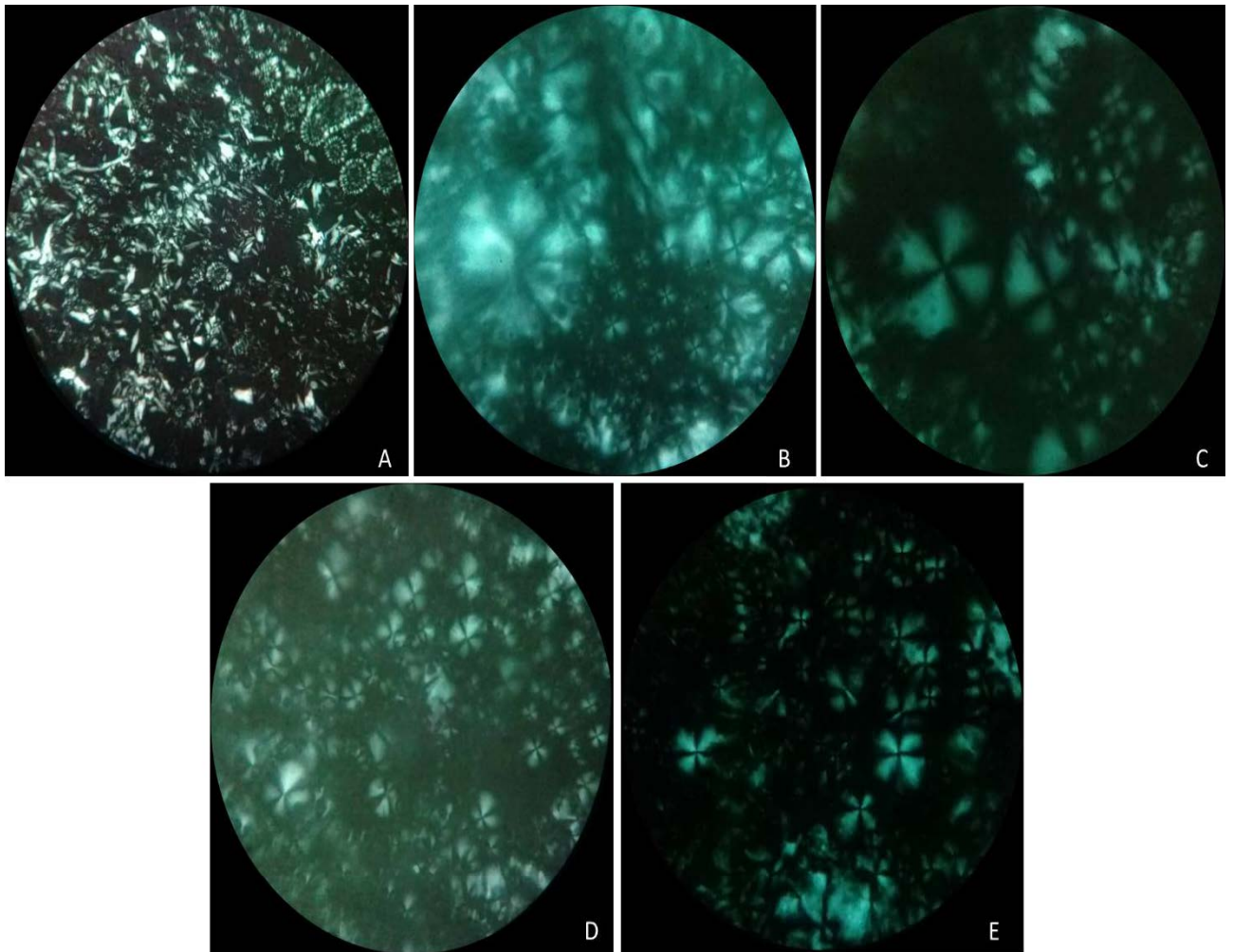


Figura 2.55. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona trifásica y de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 50 % fase surfactante /50 % (W/O). a) Sistema (9) relación W/O 30/70, b) Sistema (18) relación W/O 40/60, c) Sistema (40) relación W/O 50/50, d) Sistema (62) relación W/O 60/40, e) Sistema (73) relación W/O 70/30.

Tabla 2.10. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de las muestras extraídas de la zona microemulsión de los sistemas bifásicos. Los puntos estudiados son de composición 50 % fase surfactante /50 % (W/O). Correspondiente a los sistemas: 9, 18, 40, 63 y 73.

% de Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
50%	30/70	9	Lamelar ($L\alpha$)	TO Lamelares conicas focales positivas y negativas, posible presencia de bâtonnets lamelares y se agregados superiores de texturas birrefringentes. [18, 19, 52, 58].
	40/60	18	Lamelar ($L\alpha$)	TO Lamelares conicas focales positivas, evidenciada por la cruz de malta [18, 19, 55, 58, 66,68].
	50/50	40	Lamelar ($L\alpha$)	
	60/40	62	Lamelar ($L\alpha$)	
	70/30	73	Lamelar ($L\alpha$)	

➤ **Sistemas de composición 60 % de surfactante**

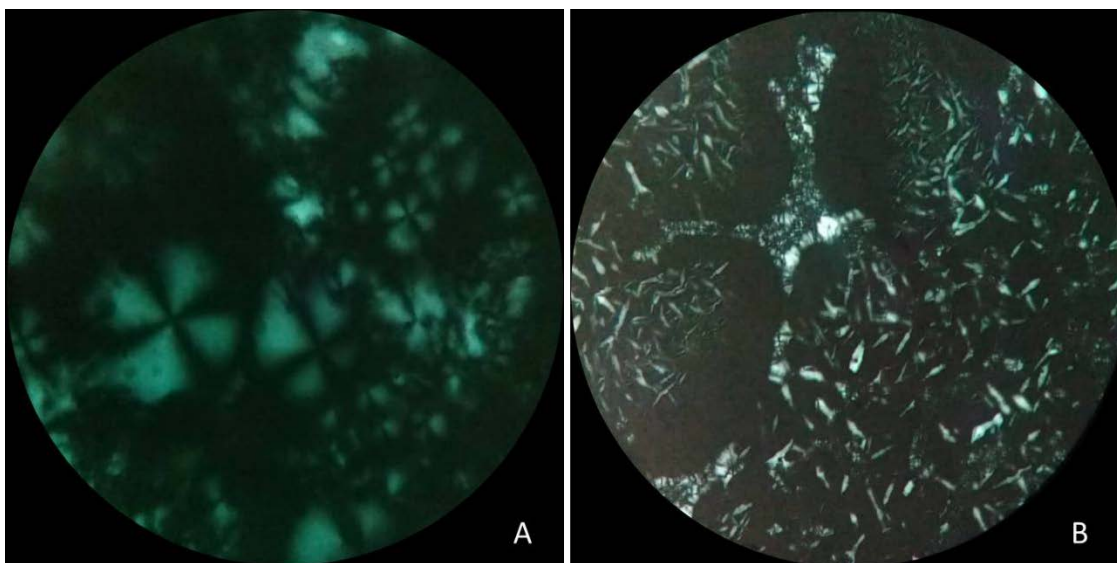


Figura 2.56. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada, de la muestra extraída de la microemulsión. Los puntos estudiados son de composición 60 % fase surfactante /40 % (W/O). a) Sistema (41) relación W/O 50/50 (400 x), b) Sistema (41) relación W/O 50/50 (100 x).

Tabla 2.11. Resultados de las fases obtenidas del análisis de la microscopía óptica de luz polarizada (400 x), de la muestra extraída de la microemulsión del sistema estudiado de composición 60 % fase surfactante /40 % (W/O). Correspondiente al sistema 41.

% de Fase Surfactante	Relación agua/aceite (W/O)	Sistema	Fases identificadas	Características
60%	50/50	41	Lamelar ($L\alpha$)	TO Lamelares conicas focales positivas y negativas (zonas mosaico), presencia de bâtonnets lamelares y se observan agregados superiores de texturas birrefringentes. [18, 19, 55, 60].

➤ **Sistemas de composición 70 % de surfactante**

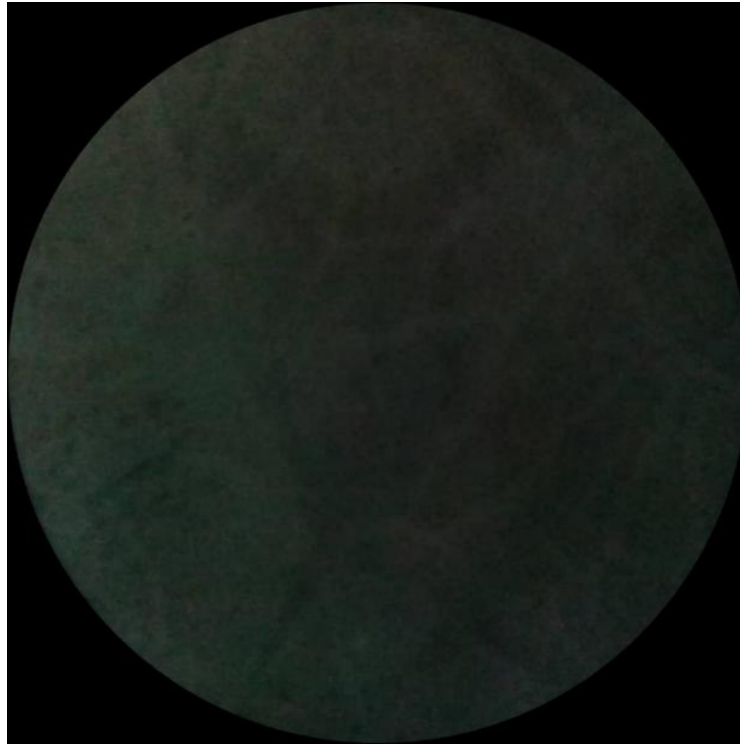


Figura 2.57. Imagen de la microscopía óptica de luz polarizada, de la muestra extraída de la microemulsión del sistema (42) relación W/O 50/50 (400 x). El punto estudiado es de composición 70 % fase surfactante /30 % (W/O).

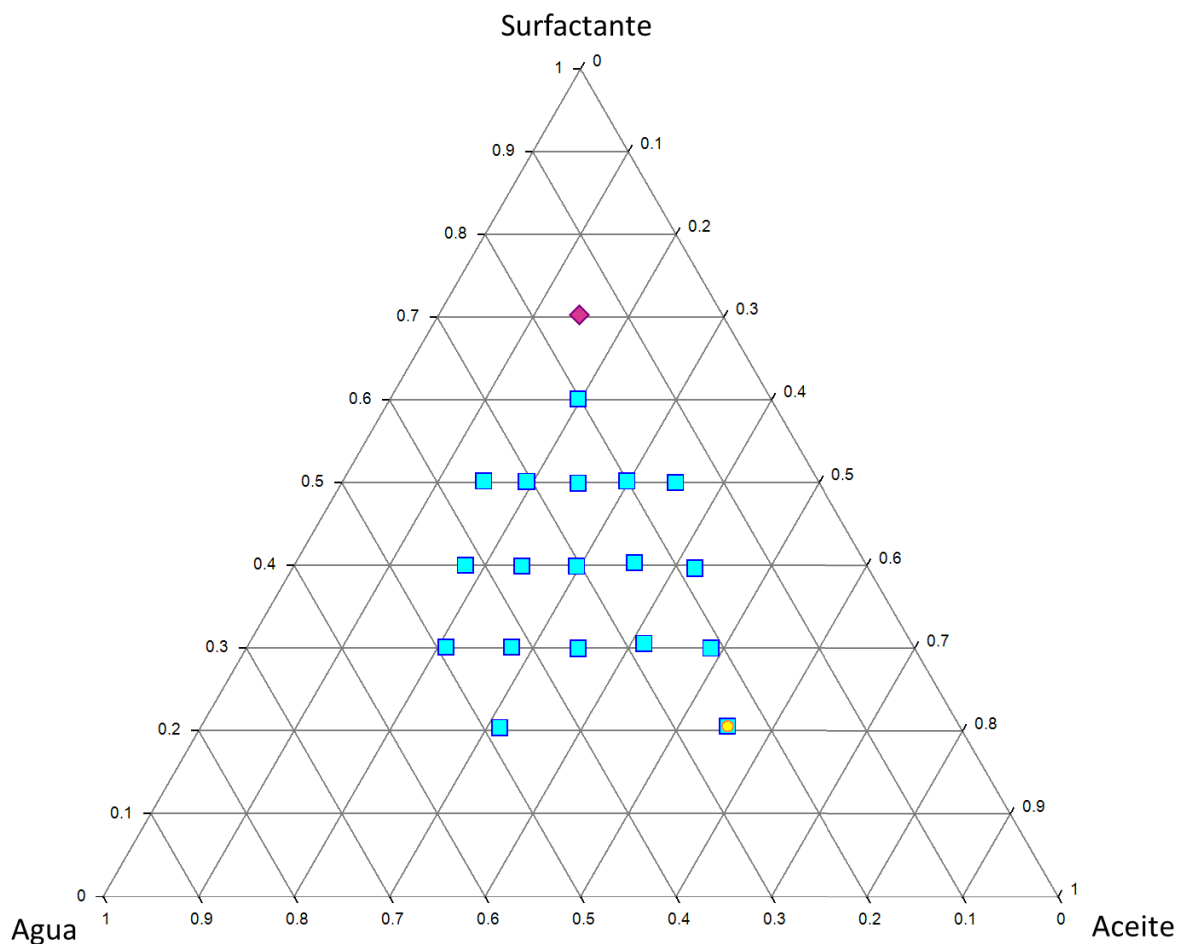


Figura 2.58. Representación de las distintas asociaciones anfífilas encontradas en el Diagrama de composición pseudo ternario Agua/Aceite/Surfactante-cosurfactante (etanol/propilenglicol). Cuadros celestes: Fase lamelar. Diamantes morados: Microemulsión o fase isotrópica. Círculos amarillos: Fase hexagonal reversa (H_2). En este diagrama se resumen las fases estudiadas luego de 1 mes de su formulación a 26 °C y presión atmosférica.

2.3.6.4. Análisis del diagrama de fases

Se evidencia claramente el efecto del cambio de cosurfactante en las asociaciones anfífilas formadas. Se evidencia el predominio de la formación de cristales líquidos

lamelares en las microemulsiones. Solo a 70 % de fase surfactante se presenta una microemulsión sin la presencia de cristales líquidos.

Entre 20 y 60% la concentración de fase surfactante, independientemente de la relación agua y aceite, se evidenció la presencia cristales líquidos lamelares en todos los sistemas. Aunque sean caracterizados con texturas ópticas específicas y distintas, todas corresponden a un ordenamiento del tipo lamelar. Lo que evidencia la tendencia del surfactante Tween 85 (en sinergia con los cosurfactantes) a la formación de este tipo de agregados.

Tal como en el ternario 1, con los cosurfactantes pentanol y sec-butanol, Los resultados de la microscopía óptica polarizada, sugiere que a 20% de fase surfactante, hay presencia de cristales hexagonales coexistiendo con la fase lamelar. En este caso, el ordenamiento hexagonal se presenta a una proporción 30W/70 O, indicando que podría tratarse de cristales hexagonales reversos (H_2), debido a que se localizan en una zona con mayor cantidad de aceite que de agua.

A concentración de fase surfactante 70%, en una relación agua y aceite 1:1, no se observaron figuras birrefringentes a través de la microscopía óptica de luz polarizada, indicando la presencia únicamente de fases isotrópicas. En esta zona podríamos tener simplemente microemulsiones o microemulsiones coexistiendo con cristales líquidos tipo esponja, debido a que ambos tipos de asociaciones anfifílicas no presentan anisotropía.

Estas suposiciones son respaldadas por las características físicas de las muestras, ya que presentan apariencia traslúcida y cristalina y un gran volumen de la fase microemulsión.

2.3.7. Tween 85 y su tendencia a formar cristales líquidos lamelares

El surfactante no iónico trioleato de polioxietileno (20) sorbitano (Tween 85), es derivado de la etoxilación del Trioleato de sorbitano (Span 85), partiendo del sorbitol y ácido oleico, a través de un proceso descrito en la sección 2.1.4. Con base a la

molécula mostrada en la Figura 2.5, se propone la siguiente conformación para el Tween 85 (Figura 2.59).

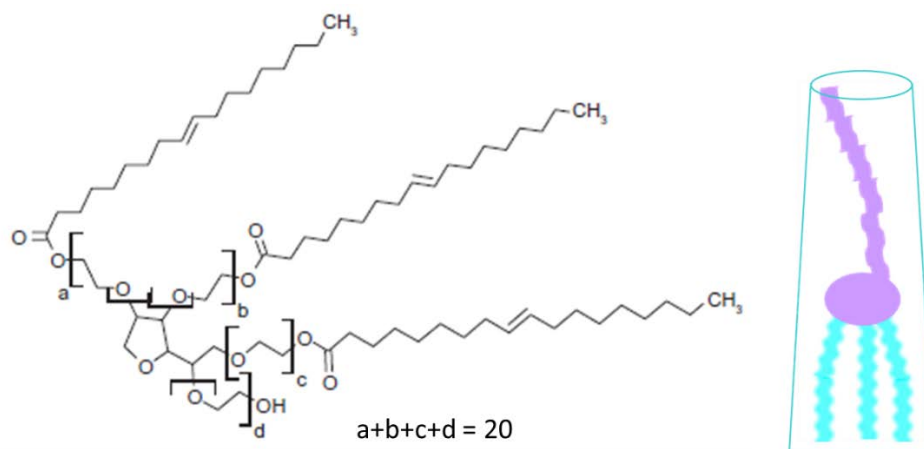


Figura 2.59. Estructura del surfactante no iónico trioleato de polioxietileno (20) sorbitano (Tween 85), derivado de la etoxilación del trioleato de sorbitano (Span 85) y su representación gráfica, donde la fracción morada representa la parte hidrofílica del surfactante y la fracción azul representa la parte lipofílica.

Teniendo en cuenta que la formación de cristales líquidos liotrópicos es impulsada por interacciones hidrofóbicas junto con fuerzas intermoleculares débiles, y que la geometría de la interfase que separa los dominios hidrófobo e hidrófilo está relacionada con la arquitectura supramolecular dirigida por el tipo y la forma del tensoactivo ^[69]. Adicionalmente, según lo descrito por Haller ^[70], quien señala que una característica destacada de la apariencia óptica de polarización de las estructuras lamelares es la presencia de una cruz de polarización, una figura de interferencia conoscópica. Y que tales características sugieren la formación cristales circulares simétricos. Por lo tanto, la anisotropía observada de las estructuras lamelares analizadas en el presente objetivo, la aparición de una cruz de malta en su mayoría regular, puede servir como base para argumentar que el surfactante Tween 85, forma estructuras lamelares de orden supramolecular esferocristalino líquido y predominantemente simétrico. Como se sugiere en la Figura 2.60

reportada por Haller para un surfactante, cuya estructura presenta un cabeza hidrofílica y dos colas hidrofóbicas ^[70].

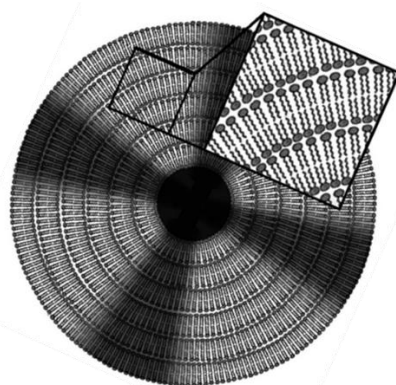


Figura 2.60. Esquema propuesto de la organización molecular simétrica a la radiación de las estructuras lamelares y las propiedades ópticas correspondientes. Los círculos denotan los grupos de cabeza de anfífilos y las líneas las cadenas de acilo. Modificado de Haller ^[70].

Pero, para el caso particular del surfactante Tween 85, se puede sugerir que en la interfase agua/ aceite, puede tener una disposición espacial que le permita formar una conformación de un cilindro. El cual podría tener un valor numérico del parámetro de empaquetamiento crítico (CCP) de aproximadamente 1. Lo cual le permitiría formar estructuras lamelares y dependiendo del ambiente fisicoquímico y su relación agua/aceite. El aceite mineral que constituye la fase aceite, está constituido por hidrocarburos saturados de cadena lineal y algunos ramificados. La cadena de 18 átomos de carbono en las colas del surfactante, potencia su capacidad de autoensamblaje y además de interacción con otras cadenas lipofílicas. En las condiciones fisicoquímicas del presente estudio, la interacción entre las colas oleicas del surfactante y las del aceite permite lograr la conformación lamelar reportada y que predomina en la mayor parte del diagrama ternario. Las fuerzas intermoleculares predominantes son las de Van der Waals, las cuales aumentan con el incremento del peso molecular. En relación a la parte polar se orientan hacia la fase acuosa, y las interacciones dominantes son los puentes de

hidrógeno entre los oxígenos del surfactante (en mayor proporción los grupos etoxilados) y el agua.

También, el tween 85 puede formar estructuras hexagonales inversas (H_2), las cuales corresponden con una estructura tipo cono invertido con un PCC >1 , Figura 2.61. Sin embargo, fueron pocas las zonas donde se evidenciaron estas estructuras.

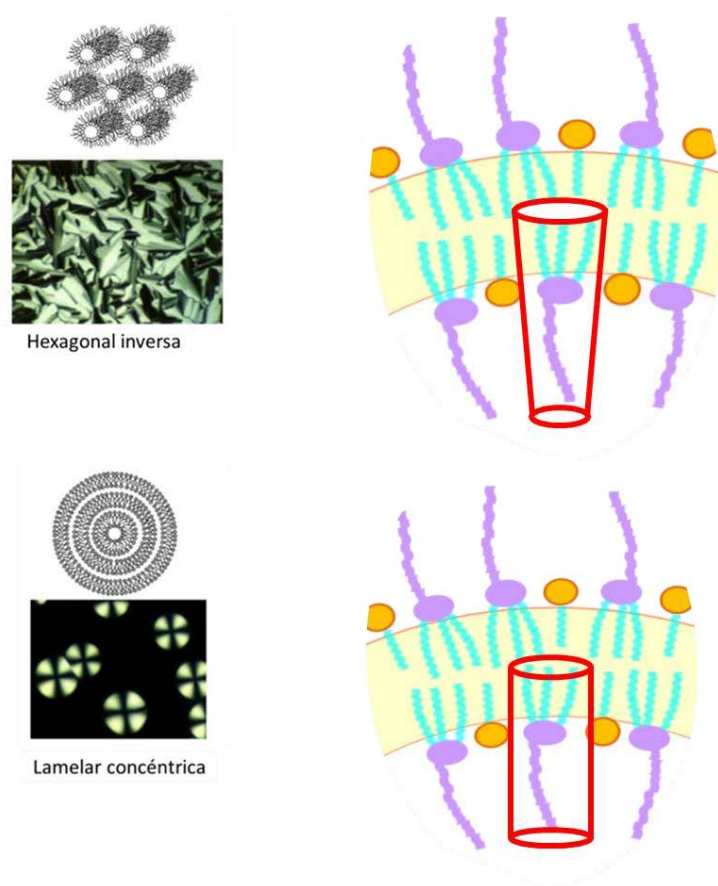


Figura 2.61. Esquema propuesto de la organización molecular del Tween 85 en una interfase agua/aceite. Los círculos denotan los grupos de cabeza de anfífilos y las líneas las cadenas de acilo. Las cabezas de surfactantes se representan en morado y la de los cosurfactantes en amarillo. En color marrón la fase aceite.

Es necesario tener en cuenta que cuando se desea formular una emulsión a partir de una microemulsión, la presencia de cristales líquidos de tipo lamelar garantiza la

obtención de emulsiones estables de baja polidispersidad y de tamaño de gota pequeño ^[71]. Esto es debido a que en un sistema que se acerca al comportamiento de la fase Winsor III, en la denominada formulación óptima, la tensión interfacial disminuye, lo que permite la generación de gotas más pequeñas al agitar. Por otro lado, la tasa de coalescencia aumenta, favoreciendo así la formación de gotas más grandes. Los dos efectos opuestos no alteran el tamaño de la gota de la misma manera y dan como resultado un tamaño de gota mínimo ^[1, 72].

Es por ello que se empleó determinados sistemas analizados en el presente objetivo, como punto de partida, para elaborar emulsiones con un tamaño de gota nanométrico.

2.4. CONCLUSIONES

- ✓ En el sistema ternario 1, entre 10 y 40% de concentración de fase surfactante, independientemente de la relación agua y aceite, se evidenció la presencia cristales líquidos lamelares en todos los sistemas.
- ✓ Evidenciando la tendencia del surfactante Tween 85 (en sinergia con los cosurfactantes) a la formación de este tipo de agregados en un amplio margen de concentraciones.
- ✓ Entre 10% y a 20% de fase surfactante, hay presencia de cristales hexagonales reversos (H₂). Se encuentran coexistiendo con la fase lamelar.
- ✓ A concentración de fase surfactante entre 50 y 70%, independientemente de la relación agua y aceite, no se observaron estructuras birrefringentes, indicando la presencia únicamente de fases isotrópicas, como microemulsiones bicontinua o fases tipo esponja.
- ✓ En el sistema ternario 2, se evidencia el efecto del cambio de surfactante en las asociaciones anfifílicas formadas.
- ✓ También se evidencia el predominio de la formación de cristales líquidos lamelares en las microemulsiones.
- ✓ Solo a 70 % de fase surfactante se presenta una microemulsión sin la presencia de cristales líquidos. A esta concentración se presentan fases anisotrópicas.

- ✓ En el ternario 2, entre 20 y 60% de la concentración de fase surfactante, independientemente de la relación agua y aceite, se evidenció la presencia cristales líquidos lamelares en todos los sistemas.
- ✓ En el ternario 2, se observa que a 20% de fase surfactante, hay presencia de cristales hexagonales coexistiendo con la fase lamelar. El ordenamiento hexagonal se presenta a una proporción 30W/70 O, indicando que podría tratarse de cristales hexagonales reversos (H₂).
- ✓ Se puede sugerir que Tween 85 en la interfase agua/ aceite, puede tener una disposición espacial de conformación de un cilindro, Lo cual le permitiría formar estructuras lamelares. Y dependiendo del ambiente fisicoquímico y su relación agua/aceite, también, puede formar estructuras hexagonales inversas (H₂), las cuales corresponden con una estructura tipo cono invertido con un PCC >1.

2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rosen M. Surfactants and Phenomena. 3rd ed. New jersey: John Wiley and Sons, Inc.; Chapter I. 2004
2. Holmberg K., Jonsson B., Kronberg B., Lindman B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. John Wiley & Sns, Ltd. 2002.
3. Hellweg T., Scattering Techniques to Study the Microstructure of Microemulsions. From Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives. Edited by Cosima Stubenrauch. Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-16782-6. Chapter 2. John Wiley & Sons, Ltd. 2009 pag 48-83. 2009.
4. Fernandez C., Villarreal A., Forgiarini A., Rodríguez J., Brunetto R., Salager J. L. Analysis of the phase behavior of surfactant-oil-water systems as a method of characterization of oils used in dermocosmetic formulation. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 49: 9-14, 2007.

5. Eastoe J. Colloid Science: Principles, Methods and Applications. 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc. Chapter 4. 2004.
6. Guo C., Wang J., Cao F., Lee R., Zhai G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*, 15: 1032-1040, 2010.
7. Nagarajan R., Ruckenstein E. Critical micelle concentration: a transition point for micellar size distribution. *Journal of Colloid and Interface Science*, 60: 221-231, 1977.
8. Israelachvili JN, Mitchell DJ, Ninham B. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 2:1525-1568,1976.
9. Israelachvili JN. The science and applications of emulsions e an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91:1-8, 1994.
10. Rajabalaya R., Nuh Musa M., Kifli N., David S. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. *Drug Design, Development and Therapy*, 11: 393–406, 2017.
11. Anton N., Akram S., and Vandamme T., “Transitional Nanoemulsification Methods”, in *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*, S. Jafari and D. McClements, 2018, 1st ed., academic Press, 2018, ch. 4, Chapter 4. Edited by: Seid Mahdi Jafari and David Julian McClements, 77-110, 2018.
12. Mahdi E., Sattar M., Sakeena M., Abdulkarim M., Noor A. y Abdullah G. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. *Drug Design, Development and Therapy*, 311, 2011.
13. Yang Z., Wang W., Wang G., and Tai X., “Optimization of low-energy Pickering nanoemulsion stabilized with montmorillonite and nonionic surfactants,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 124098, 2019.

14. Zadymova N., Tao M., and Poteshnova M. "Tween 85 Oil-in-Water Nanoemulsions with Incorporated Chlorhexidine Base," *Colloid Journal*, 80: 158–166, 2018.
15. Foley P., Kermanshahi pour A., Beach E. y Zimmerman J. Derivación y síntesis de tensoactivos renovables. *Chemical Society Reviews journal*, 41: 1499-1518, 2012.
16. Miyake M., y Yamashita Y. Theoretical Principles and Applications, chapter Molecular Structure and Phase Behavior of Surfactants. *Cosmetic Science and Technology*, 389-414, 2017.
17. Yamashita Y., Sato T., Nagasawa T., Kubota Y., Musashi M., Kawamura K., Koyama M., Sakamoto K., Yamaguchi Y. Shear-response Emulsion Prepared through Discontinuous Cubic Liquid Crystal. *Chemistry Letters*, 42:433-435, 2013.
18. Pasquali R., Bregni C., Serrao R. Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 37: 38-53. 2006.
19. Suzuki T. Formation and the characterization of lipotropic liquid crystal and gels. Physicochemical aspects and formulations. Chapter 3. 519-537.
20. Lusiana N., Muller-Goymann C. Preparation, characterization, and in vitro permeation study of terbinafine HCl in poloxamer 407-based thermogelling formulation for topical application. *AAPS PharmSciTech*, 12: 496–506, 2011
21. Lindblom G., Larsson K., Johansson L., Fontell K., Forsen, S. The cubic phase of monoglyceride-water systems. Arguments for a structure based upon lamellar bilayer units. *Journal of the American Chemical Society*, 101: 5465–5470, 1979.
22. Figueirdo A., Salinas, S. The Physics of a Lyotropic Liquid Crystals. *Oxford University Press*, 2005.
23. Rajabalaya R., Nuh Musa M., Kifli N., David, S. Oral and transdermal drug delivery systems: role of lipid-based lyotropic liquid crystals. *Drug Design, Development and Therapy*, 11: 393–406, 2017.

24. Quirino-Barreda C., Gazga-Urioste C., Juárez- Sandoval J., Faustino-Vega A.; Noguez-Méndez N., Macín-Cabrera S. Cristales líquidos liotrópicos. Nanoestructuras biomiméticas para uso tópico medicinal. *Mundo Nano*, 10 :7-25, 2017.
25. Sagar G., Arunagirinathan M., and Bellare J. Self-assembled surfactant nano-structures important in drug delivery: A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 133-159, 2007.
26. Phillips W. Mineral Optics: Principles and Techniques, W. H. Freeman and Company, United States, 1st edition, 1971.
27. Hurlbut C. Manual de Mineralogía de Dana, Reverté, Barcelona, 1980.
28. Barón M. Definitions of basic terms relating to low-molar-mass and polymer liquid crystals (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, 73: 845–895, 2001.
29. Rosevear F. The microscopy of the liquid crystalline neat and middle phases of soaps and synthetic detergents. *The Journal of the American Oil Chemists Society*, 31: 628-639, 1954.
30. Mayer W. Molecular Structure and the Properties of Liquid Crystals, Academic Press, Inc., London-New York, 1964
31. Rosevear F. Liquid crystals: The mesomorphic phases of surfactant compositions. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 19: 581-594, 1968.
32. Ohno T., Nonoshita S., Akiyama A., Kohri M., Taniguchi T. y Kishikawa K. Un enfoque seleccionable para películas de polímero de polaridad fija y controlable por polaridad con estructuras de columnas hexagonales. *Materiales Cartas*, 272, 127863, 2020.
33. Danielsson I. Lindman B. The definition of a microemulsion. *Colloids and Surfaces*, 3: 391–392, 1981.
34. Sottmann T. and Stubenrauch C. Phase Behaviour, Interfacial Tension and Microstructure of Microemulsions. From Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives. Edited by Cosima Stubenrauch. ©

- 2009 Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-16782-6. Chapter 1. John Wiley & Sons, Ltd. 2009 pag 1-47.
35. Winsor PA. Procesos de hidrotropía, solubilización y emulsificación relacionados. *Revista de la Sociedad Química, Transacciones de Faraday*, 44: 376–398, 1948.
36. Salager J., Antón R, Forgiarini A., and Márquez L. Formulation of Microemulsions From Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives. Edited by Cosima Stubenrauch. © 2009 Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-405-16782-6. Chapter 3. John Wiley & Sons, Ltd. 2009 pag 84-121.
37. Belkoura L., Stubenrauch C., Strey R. Freeze Fracture Direct Imaging: Un nuevo método de Freeze Fracture para la preparación de muestras en microscopía electrónica de criotransmisión, 20:4391–4399, 2004.
38. Laradji M., Guo H., Grant M., Zuckermann M. Ternary systems containing surfactants. *Advances in chemical physics*. 89, 1995.
39. Pasquali C., Sacco N. y Bregni C. The Studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty Years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009), *Latin American Journal of Pharmacy*, 28: 313-7, 2009.
40. Salager J., Antón R. Caracterización físico-química de un surfactante un método rápido y preciso. *Revista de ciencia y tecnología de la dispersión*, 4: 253-273, 1983.
41. Shinoda K. "The comparison between the PIT system and the HLB-value system to emulsifier selection". Proceedings of the 5th International Congress of Surface Activity. 2: 275-83, 1969.
42. Nardello V., Chailloux N., Poprawski J., Salager J., Aubry J. El concepto HLB como herramienta para la caracterización de aceites hidrocarburos cosméticos, 52: 602–609, 2003.
43. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID6568, 2-Butanol" PubChem,

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Butanol>. Accessed 11 April, 2021.
44. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6276, 1-Pentanol" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Pentanol>. Accessed 11 April, 2021.
45. Centro Nacional de Información Biotecnológica. "Resumen de compuestos de PubChem para CID 702, etanol" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>. Consultado el 11 de abril de 2021.
46. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 1030, Propylene glycol" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylene-glycol>. Accessed 11 April, 2021.
47. <https://pdf.medicalexpo.es/pdf/motic-europe/ba310-pol-series-booklet/69458-107149.html> Fecha de revisión 15 de enero 2020
48. Pereira J., Fenómenos de ruptura e inversión de emulsiones: aspectos físicoquímicos y cinéticos. Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes. 2009.
49. Kerker M. *Clásicos y classicistas de la ciencia de los coloides y la interfaz: 6. John Tyndall*, 119: 602–604, 1987.
50. Kupper S. Klosowska-Chomiczewska I. and Szumala P. Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 175, 347-354, 2017.
51. Salager J., Morgan J., Schechter R., Wade W., Vásquez, E. Formulación óptima de sistemas de surfactante / agua / aceite para una mínima tensión interfacial o comportamiento de fase. *Revista de la Sociedad de Ingenieros de Petróleo*, 19: 107-115, 1979.
52. Chávez G., Parra I., Luzardo M., Bravo B., & Márquez N. Caracterización de cristales líquidos por microscopía óptica en sistemas surfactante polietoxilado-alcano-agua. *Química Nova*, 36: 1343–1347, 2013.

53. Selivanova N., Gubaidulina A., Galyametdinov Y. Caracterización de la microestructura de cristal líquido liotrópico hexagonal: efectos de las moléculas de vitamina E. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 620: 126570, 2021.
54. Li Q., Wang J., Lei N., Yan M., Chen X. and Yue X. Phase behaviours of a cationic surfactant in deep eutectic solvents: from micelles to lyotropic liquid crystals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20:12175–12181, 2018.
55. Khiew P., Radiman S., Huang N. Ahamd M. Síntesis y caracterización de nanopartículas de sulfuro de cobre en cristal líquido liotrópico de fase hexagonal. *Journal of Crystal Growth*, 268: 227-237, 2004.
56. Caritá A., Resende de Azevedo, J., Vinícius Buri M., Bolzinger M., Chevalier Y., Riske K. y Ricci Leonardi G. Estabilización de vitamina C en emulsiones de estructuras cristalinas líquidas. *Revista Internacional de Farmacia*, 120092, 2020.
57. Friberg S. Fases cristalinas líquidas en emulsiones. *Journal of Colloid and Interface Science*, 37: 291-295, 1971.
58. Chen L., Ge L., Fan L. y Guo R. Microestructura y propiedades tribológicas de cristales líquidos laminares formados por líquidos iónicos como cotensoactivos. *Langmuir*, 2019.
59. Selivanova N., Konov A, Romanova K., Gubaidullin A., y Galyametdinov Y. Cristales líquidos lamelares Lyotrópicos que contienen La: comportamiento de fase, propiedades térmicas y estructurales. *Materia blanda*, 11: 7809–7816, 2015.
60. Rosen M. y Gu B. Sinergismo en mezclas binarias de tensoactivos. 6. Eficiencia de reducción de la tensión interfacial en la interfaz líquida / sólido hidrofóbico. *Colloids and surfaces*, 23: 119-135, 1987.
61. Huibers P. y Shah D. Evidencia de sinergismo en mezclas de tensoactivos no iónicos: mejora de la solubilización en microemulsiones de agua en aceite. *Langmuir*, 13: 5762–5765, 1997.
62. Scriven S. Equilibrium bicontinuous structure. *Nature*, 263: 123-125, 1976.

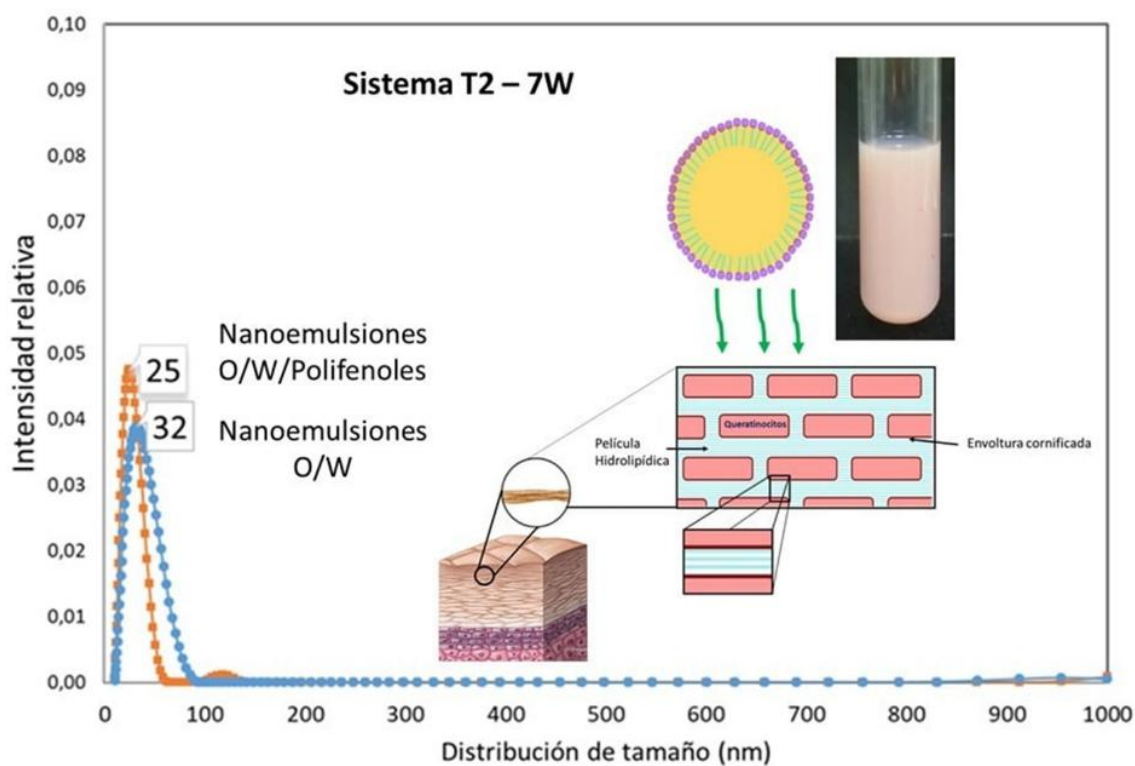
63. Salager J. Microemulsions. In: G. Broze, Handbook of Detergents - Part A: Properties, G. Broze, editors, Surfactant Science Series, 82, 253-302, 1999. Marcel Dekker New York.
64. Rapalli V., Waghule T., Hans N., Mahmood A., Gorantla S., Dubey S. y Singhvi G. Conocimientos de los cristales líquidos liotrópicos en la administración de fármacos tópicos para abordar diversos trastornos de la piel. *Journal of Molecular Liquids*, 113771, 2020.
65. Cordobes F., Muñoz J., and GALLEGOS C..Linear Viscoelasticity of the Direct Hexagonal Liquid Crystalline Phase for a Heptane/Nonionic Surfactant/Water System. *Journal of colloid and interface science*, 187: 401–417, 1997.
66. Zheng M., Wang Z., Liu F., Mi Q. y Wu J. Estudio de la microestructura y propiedad reológica del cristal líquido liotrópico de aceite de pescado. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 385: 47–54, 2011.
67. Makai M., Csányi E., Németh Z., Pálinkás J. y Erős I. Estructura y liberación de fármacos de cristales líquidos laminares que contienen glicerol. *International Journal of Pharmacy*, 256: 95-107, 2003.
68. Dai T., Ge L. y Guo R. Microestructura de cristal líquido laminar en sistema Tween 85 / [Bmim] PF6 / H₂O y aplicaciones como síntesis y lubricación de nanopartículas de Ag. *Journal of Materials Research*, 24: 333–341, 2009.
69. D'Errico G. y Paduano L. Capítulo 12. RMN de cristales líquidos y soluciones micelares. Resonancia magnética nuclear, *The Royal Society of Chemistry* 43: 457–494, 2014.
70. Haller T., Cerrada A., Pfaller K., Braubach P. y Felder E. La microscopía de luz polarizada revela cambios fisiológicos e inducidos por fármacos en el ensamblaje de la membrana del surfactante en neumocitos alveolares tipo II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860: 1152-1161, 2018.

71. Tolosa L., Forgiarini A., Moreno P. y Salager J. (). Efectos combinados de la formulación y la agitación sobre el tamaño de la gota de la emulsión en las proximidades del comportamiento trifásico de los sistemas de agua con aceite y surfactante. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45: 3810–3814, 2006.
72. Calvo D., Ruiz J., y Valiente M. Phase equilibria of mixtures of surfactants and viscoelastic properties of the liquid crystal phases. *Fluid Phase Equilibria*, 425: 358–364, 2016.

CAPÍTULO III. NANOEMULSIONES

Este capítulo muestra los resultados de la elaboración y caracterización de nanoemulsiones a partir de microemulsiones, para ser empleadas como base para productos cosméticos, para el cumplimiento de los objetivos 3 y 4. *FORMULAR LOS SISTEMAS SURFACTANTE/ACEITE/AGUA PARA INCORPORAR LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EXTRAÍDO DE LA FUENTE NATURAL CON CARACTERÍSTICAS BIOCOMPATIBLES.*

Y ELABORAR UN PRODUCTO TIPO EMULSIÓN EN BASE A LA FORMULACIÓN BAJO ESTUDIO MEDIANTE UN MÉTODO DE BAJA ENERGÍA.



3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.1. Los cosméticos

Los cosméticos son cada vez más importantes en la vida cotidiana, se usan regularmente por un número creciente de personas y se consumen cantidades muy grandes cada año. Históricamente el propósito más obvio de los cosméticos, es la protección del cuerpo contra los elementos de la naturaleza, como el calor y la luz solar ^[1].

Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (Ley FD&C) ^[2] define los productos cosméticos, como los artículos destinados a ser frotados, vertidos, rociados, introducidos o aplicados al cuerpo humano para limpiar, embellecer, promover el atractivo o alterar la apariencia. Por ejemplo, humectantes para la piel, perfumes, barras de labios, esmaltes de uñas, preparaciones de maquillaje facial y para ojos, champús limpiadores, ondas permanentes, tintes para el cabello y desodorantes, así como cualquier sustancia destinada a ser utilizada como componente del producto cosmético ^[2].

Los cosméticos (incluidos los cosmeceúticos) se pueden clasificar según su uso y área de aplicación: cosméticos para el cuidado de la piel, cosméticos de maquillaje, cosméticos para el cuerpo, cosméticos para el cuidado del cabello, cosméticos orales y fragancias ^[1].

3.1.2. Productos cosmeceúticos

En la industria cosmética, también se incluyen los productos cosmeceúticos, denominados así, por el Dr. Albert M. Kligman en una conferencia en 1984. Empleó ese término para describir una clase de productos con acción intermedia entre productos cosméticos y productos farmacéuticos. Por lo tanto, los cosmeceúticos no son una clase restringida al adorno, sino como productos tópicos que promueven cambios estructurales y / o funcionales en la piel, las membranas mucosas y sus uniones sin reclamo terapéutico, pero con posible acción preventiva ^[2, 3].

Los organismos gubernamentales que regulan los productos cosméticos en los Estados Unidos (Ley FD&C), Europa (Directiva del Consejo de la UE), Japón (Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar), y Brasil (ANVISA, Agencia Nacional de

Vigilancia Sanitaria) no reconocen estos nuevos términos, ni tampoco la Cooperación Internacional en Regulación de Cosméticos (ICCR), un grupo internacional que incluye reguladores de las industrias cosmética de Estados Unidos, Unión Europea, Japón, Canadá y Brasil [2].

Si bien el objetivo de este grupo es intentar proponer reglas que regulen la cosmética entre países para minimizar las barreras al comercio internacional y asegurar la protección del consumidor global, el reconocimiento de estas nomenclaturas aún está lejos de ser un consenso, ya que la clasificación de cosméticos y medicamentos de un país a otro también varía según el producto.

3.1.3. Humectantes

Los humectantes brindan beneficios funcionales para la piel, como hacerla suave y tersa, aumentar la hidratación y mejorar las características ópticas de la piel, sin embargo, los humectantes también funcionan como vehículos para llevar los ingredientes a la piel. Estos ingredientes pueden ser vitaminas, antioxidantes botánicos, péptidos, agentes aclaradores de la piel, antiinflamatorios botánicos o exfoliantes [4].

La humectación es el proceso de devolver los lípidos intercelulares que fueron eliminados por error en el proceso de limpieza, debido a que los limpiadores no pueden distinguir entre el sebo y los lípidos intercelulares. Por lo tanto, los humectantes se desarrollaron para devolver los lípidos a la superficie de la piel después de la limpieza [4].

Generalmente, los productos humectantes deben satisfacer 4 necesidades básicas: promover una piel tersa y suave, aumentar la hidratación de la piel, mejorar la apariencia y posiblemente entregar ingredientes a la superficie de la piel [4].

3.1.3.1. Formulaciones humectantes

Existe una enorme diversidad en la formulación de humectantes. Entre los principales humectantes oclusivos empleados están los hidrocarburos como el aceite mineral, alcoholes polihídricos (polioles) como el propilenglicol y el

butilenglicol, aceites vegetales como el aceite de semilla de uva y aceite de aguacate ^[4].

Las formulaciones humectantes más comunes son:

- Las cremas y lociones son emulsiones que contienen ingredientes hidrofílicos e hidrofóbicos. Las cremas generalmente tienen una viscosidad más alta y forman películas gruesas, mientras que las lociones forman películas más delgadas y tienen una viscosidad más baja.
- Los ungüentos son preparaciones semisólidas anhidras compuestas por grasas, ceras, aceites animales y vegetales e hidrocarburos. Son impermeables.
- El suero es una formulación a base de agua o aceite que se aplica sobre la piel recién lavada. El suero proporciona beneficios mínimos de hidratación, pero se usa para aplicar un agente activo a la piel debajo de una crema hidratante. La formulación del suero no es necesariamente una emulsión, pero podría serla. Por lo general, el suero tiene pocos ingredientes diseñado para optimizar la disponibilidad del agente activo, que puede ser vitamina, factor de crecimiento, extracto botánico, etc.
- Los geles son una formulación de consistencia espesa hasta que se frota en la piel, luego es fluida. Deja una película no grasosa y son formulados a base de polímeros acrílicos, gomas y espesantes derivados de celulosa.
- Los aerosoles forman una película a partir de gotas, pero la aplicación de la película es ineficiente y discontinua ^[4].

3.1.4. Proceso de desarrollo de la cosmética.

La Figura 3.1 muestra el diagrama del desarrollo de fabricación de un producto cosmético, desde la investigación: básica y de fabricación, y además, la producción basada en los planes de comercialización. En el desarrollo de la cosmética, las semillas de la investigación básica y aplicada deben ser la base para el desarrollo de un producto ^[1].

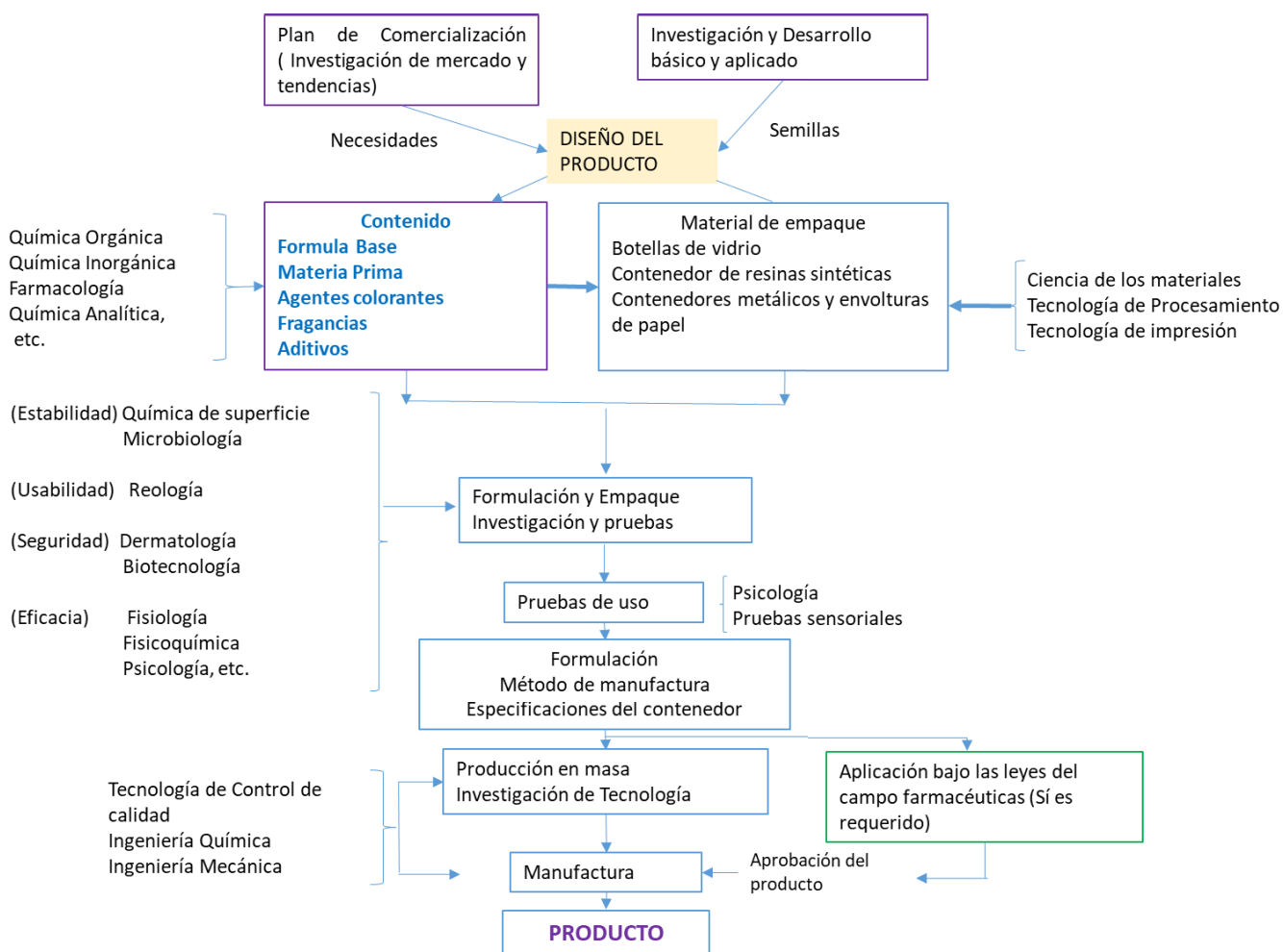


Figura 3.1. Proceso de desarrollo cosmético y ciencias y tecnologías relacionadas [1].

3.1.5. Cosméticos y nanociencia.

Existen cosméticos en el mercado que actúan de forma más amplia y eficaz que las funciones de embellecimiento y mantenimiento de buenas condiciones de la piel. Este es el resultado de importantes avances tecnológicos en el desarrollo de estos productos. Una de esas tecnologías proviene de la nanociencia, es decir, el estudio de materiales cuyas dimensiones son del orden nanométrico ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$).

El uso de materiales a nanoescala permitió el desarrollo de productos cosméticos de mejor calidad, con diferentes propiedades y mejor desempeño debido al pequeño tamaño de sus partículas [2].

3.1.6. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones (gotas de tamaño submicrométrico), también referidas como mini emulsiones ^[5, 6], son sistemas atractivos para uso en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria y otras, debido a sus propiedades tales como su baja cantidad de surfactante, falta de toxicidad o características irritantes, baja viscosidad, buena apariencia y versatilidad de formulación como espumas, cremas, líquidos y aerosoles.

Las nanoemulsiones son una clase de emulsiones con un tamaño de gota entre 20 y 500 nm ^[7]. Sus gotas están estabilizadas por surfactantes. Sus propiedades dependen no solo de las condiciones termodinámicas, sino también de los métodos de preparación y el orden de adición de los componentes ^[8, 9]. Los diferentes intervalos de tamaño para las nanoemulsiones encontradas en la literatura, se establecen, generalmente, según criterios basados en propiedades ópticas, ya que no hay un cambio drástico en las propiedades fisicoquímicas cuando el tamaño de las gotas de la emulsión disminuye de micrómetros a la escala de nanómetros ^[10].

3.1.6.1. Estabilidad de las nanoemulsiones

Las emulsiones en general, incluyendo las nanoemulsiones, presentan inestabilidad termodinámica debido al hecho de que la energía libre ΔG_f asociada con su formación es mayor que cero. Este cambio de energía libre se debe principalmente al aumento del contacto entre los dos líquidos inmiscibles: $\Delta G_f = \Delta A\gamma$, donde ΔA es el incremento del área interfacial y γ es la tensión interfacial. Por lo tanto, el área interfacial tiene una tendencia a disminuir espontáneamente, favoreciendo así la floculación y coalescencia de las gotas. Por otro lado, una vez formadas, las nanoemulsiones tienden a tener muy buena estabilidad cinética, porque su pequeño tamaño de gota reduce la tasa de separación gravitacional y la agregación de gotas ^[11].

Aunque las nanoemulsiones son estables a la sedimentación o la formación de crema (el movimiento browniano supera la gravedad debido al tamaño pequeño),

pueden experimentar floculación, coalescencia y / o maduración de Ostwald, este último es el principal proceso de descomposición de las nanoemulsiones^[12,13].

La maduración de Ostwald consiste en la difusión de moléculas de la fase dispersa desde pequeñas a grandes gotas, a través de la fase continua, como consecuencia de sus diferentes presiones de Laplace. Sin embargo, con la selección apropiada de componentes del sistema, composición y método de preparación, se puede lograr nanoemulsiones con alta estabilidad cinética. Las nanoemulsiones, al ser emulsiones (sistemas termodinámicamente inestables), requieren un aporte de energía para su formación, que puede ser externa (métodos de dispersión o de alta energía) o interna (métodos de condensación o de baja energía)^[14].

3.1.6.2. Diferencia entre nanoemulsión y microemulsión

Cuando se habla sobre nanoemulsión, es importante aclarar una confusión que a menudo se puede presentar entre lo que son las nanoemulsiones y microemulsiones^[11].

Tanto las microemulsiones como las nanoemulsiones, son sistemas coloidales que resultan de la dispersión de dos líquidos inmiscibles, y el sistema disperso formado presenta gotas finas con tamaños por debajo de 100 y 200 nm respectivamente^[15, 16]. Pero ambas poseen el mismo aspecto macroscópico (transparente o translúcido)^[17] (Figura 3.2). En algunos casos, la estructura y morfología de las microemulsiones puede ser muy cercana a las nanoemulsiones, es decir, cuando se trata de microemulsiones aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O) en forma de micelas esféricas hinchadas, como las describió Schulman y col^[18].

Schulman y colaboradores^[18] también encontraron que las principales características de las microemulsiones en comparación con las soluciones micelares no sólo eran la hinchazón excesiva y la baja curvatura (asociada con la baja tensión), sino también la presencia de una estructura de interconexión entre las gotas. Al intentar diluir estos sistemas, encontraron que la estructura de la microemulsión se ve ampliamente afectada, perdiendo así sus características originales, mientras que en las nanoemulsiones no hay una afectación en el tamaño de las gotas, ni en la distribución del tamaño de las gotas^[19-21].

Una diferencia importante entre las microemulsiones y las nanoemulsiones, es su estabilidad termodinámica. Como casi todos los sistemas emulsionados, existen en un estado termodinámico metaestable, en lugar de en el estado con la energía libre más baja. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de las gotas (que reduce la separación gravitacional y la agregación de las gotas), el proceso principal que induce su desestabilización es la maduración de Ostwald. Este factor da como resultado la estabilidad de las nanoemulsiones durante meses e incluso más si los aditivos específicos (inhibidores de la maduración) ralentizan la transferencia de aceite entre gotas. Por otro lado, las microemulsiones son sistemas estables desde un punto de vista termodinámico. Se forman como resultado del equilibrio entre aceite, agua y tensioactivos, es decir, se mezclan todas las fases de manera homogénea, sea cual sea el orden de introducción, y la mezcla se sella y se pone a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio ^[11].

Ambos sistemas poseen distinta cantidad de tensioactivo. Generalmente las microemulsiones poseen un contenido de surfactante superior al 20%, lo que permite su formación espontánea ^[17], mientras que las nanoemulsiones están constituidas por una menor cantidad de tensioactivos (entre el 3% y el 10%) ^[22].

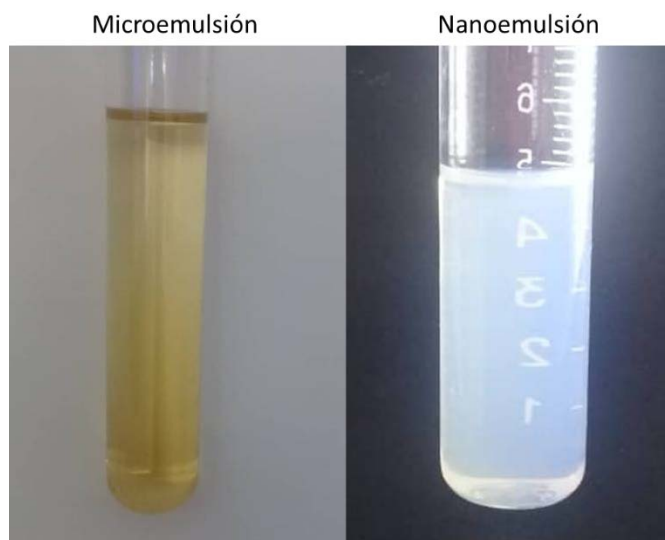


Figura 3.2. Imagen de una microemulsión y una nanoemulsión, ambas constituidas por un surfactante no iónico, cosurfactantes, agua y aceite mineral, formuladas para uso cosmético.

Fabricación de nanoemulsiones por métodos de baja energía

Los métodos de emulsión de baja energía, hacen uso de la energía química interna del sistema, a menudo son más eficientes energéticamente ya que solo se necesita agitación simple, y generalmente permiten producir un tamaño de gota más pequeño que los métodos de alta energía ^[23]. Sin embargo, dependiendo del sistema y las variables de composición, se pueden lograr tamaños de gota similares por ambos tipos de métodos ^[24].

3.1.6.3. Formación de nanoemulsión por métodos de autoemulsión

La emulsión se crea como resultado de una mezcla de dos líquidos a temperatura ambiente. Uno es una fase acuosa pura, el otro es una mezcla de aceite, surfactante y un solvente miscible en agua. El método de autoemulsión o emulsión espontánea hace uso de la energía química liberada debido a un proceso de dilución con la fase continua, sin que se produzca ninguna transición de fase (sin cambio en la curvatura espontánea del tensoactivo) en el sistema durante la emulsión ^[10, 25].

La emulsión espontánea se produce por diferentes mecanismos que parecen verse afectados por la composición del sistema, las características fisicoquímicas y el protocolo de emulsión (es decir, la forma en que se añaden los componentes y cómo se modifican las propiedades termodinámicas del sistema). En primer lugar, se propusieron tres posibles mecanismos principales: dos de ellos implicaban la rotura mecánica de la interfase debida, en un caso, a la intensidad de la turbulencia interfacial y, en el otro como inestabilidad mecánica de las interfaces de baja tensión. El tercer mecanismo fue llamado "difusión y varado" y es completamente diferente de los dos anteriores porque involucra una inestabilidad química en lugar de mecánica ^[26]. La idea básica en este caso es que las regiones de sobresaturación local son producidas por el proceso de difusión y las gotitas de emulsión se forman debido a la transformación de fase en estas

regiones. La sobresaturación cerca de una interfaz también puede promover su ruptura por un mecanismo de inestabilidad química distinto, pero estrechamente relacionado [26].

Por lo tanto, al diluir una microemulsión o una mezcla de disolvente, tensoactivo y / o cosurfactante, se produce la difusión de los componentes miscibles en agua, desde la fase orgánica, hacia la fase acuosa, lo que induce una gran turbulencia en la interfase agua / aceite, lo que resulta en un aumento dramático del área interfacial, dando lugar al estado de emulsión metaestable, haciendo que se formen gotas nanoescaladas (nanoemulsiones O / W) [10, 27].

Según el tipo de nanopartícula requerida, la formulación también puede incluir componentes adicionales tales como tensoactivos, monómeros, polímeros, macromoléculas y / u otros ingredientes activos. Aunque estas adiciones pueden causar una ligera interferencia con el proceso, los mecanismos a nivel general permanecerán sin cambios [25, 27].

Las nanoemulsiones también se pueden formar mediante la dilución de agregados tensoactivos distintos de las microemulsiones. De hecho, la formación de nanoemulsiones O / W por dilución directa a partir de una fase cristalina líquida cúbica con estructura (Pm3n), en sistemas mixtos de tensoactivos no iónicos / iónicos [24, 28]. Estas fases cristalinas Pm3n, es un tipo de estructura micelar basada en agregados micelares discretos [29]. Vale la pena señalar que no se produce ningún cambio en la curvatura espontánea del tensoactivo durante la etapa de dilución [10].

Durante la dilución, las micelas que se empaquetaron en la red cúbica se separan, interrumpiendo la estructura cúbica, y al mismo tiempo una parte del tensoactivo que estabilizaba la interfase puede migrar a la fase acuosa en el seno del líquido, desestabilizando una parte de la interfase, dando pie a la formación de las gotas finales de nanoemulsión [10].

3.1.6.4. *Formación de nanoemulsión por métodos de inversión de fases.* **Método de composición de inversión de fase (PIC)**

Estos métodos hacen uso de la energía química liberada por las transiciones de fase durante el proceso de emulsión. Estas transiciones de fase a menudo, implican la inversión de la curvatura de la película de surfactante de positiva a negativa o viceversa. Se ha demostrado que las transiciones de estructuras que tienen una película de surfactante con una curvatura cero, (como la fase cristal líquido lamelar o microemulsión bicontinua) juegan un papel importante en la formación de las nanoemulsiones [30, 31].

El procedimiento para obtener nanoemulsiones por el método PIC consiste en agregar progresivamente uno de los componentes (agua o aceite) sobre una mezcla de los otros dos componentes (surfactante de aceite o surfactante de agua, respectivamente [32, 33].

3.1.7. Nanoemulsiones en cosméticos

Las nanoemulsiones son un sistema prometedor para el uso cosmético debido a varias ventajas sobre otras tecnologías (como emulsiones, liposomas y microemulsiones, espumas, geles, dispersiones, etc.), incluida la facilidad de fabricación, tamaños de partículas controlables, alta estabilidad cinética y niveles de tensoactivos relativamente bajos [34-36]. La eficacia de los productos cosméticos depende de sus propiedades de textura y de su capacidad para transportar ingredientes activos y funcionales. Los componentes lipofílicos, hidrofílicos y anfifílicos se pueden incorporar fácilmente en las nanoemulsiones porque contienen aceite, agua y regiones interfaciales de gran área [37].

Son sistemas particularmente atractivos para su aplicación en cuidado personal y cosméticos como, así como en el cuidado de la salud debido a las siguientes ventajas [38]:

- El pequeño tamaño de gota también evita cualquier floculación de las gotas y esto permite que el sistema permanezca disperso sin separación de las fases.

- Las nanoemulsiones son adecuadas para la administración eficiente de ingredientes activos a través de la piel. La gran superficie del sistema de emulsión permite una rápida penetración de los activos.
- La naturaleza transparente del sistema, su fluidez (a concentraciones razonables de aceite), así como la ausencia de espesantes, pueden darles un carácter estético agradable y sensación en la piel.
- El pequeño tamaño de las gotas les permite depositarse uniformemente sobre sustratos, la humectación, la dispersión y la penetración también pueden mejorarse debido a la baja tensión superficial de todo el sistema y la baja tensión interfacial de las gotas de aceite en agua (O / W).
- Las nanoemulsiones pueden ser empleadas en la encapsulación de fragancias, a ser incorporadas en productos de cuidado personal, para su posterior liberación durante la aplicación del producto utilizado. Esto también podría aplicarse en la formulación de perfumes sin alcohol.

Estas características mencionadas, tamaño de gota extremadamente pequeño, baja cantidad de surfactante, baja toxicidad y viscosidad, las hacen atractivas y una excelente opción para aumentar la efectividad dérmica y transdérmica, debido a la transferencia rápida de principios activos a través de la piel, de los ingredientes activos utilizados en la industria cosmética y cosmeceútica.

3.1.8. Caracterización de nanoemulsiones por dispersión dinámica de luz

En relación con los métodos de caracterización de las nanoemulsiones, varios estudios en la literatura utilizan dispersión dinámica de luz (DLS), para comprobar el tamaño de las partículas ^[39].

La dispersión dinámica de luz (DLS), también conocida como espectroscopia de correlación de fotones (PCS), es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño y la distribución de tamaño de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido, típicamente en la región submicrométrica.

La dispersión de luz se debe a fluctuaciones locales en la constante dieléctrica del medio. El hecho de que las partículas en suspensión usualmente tengan índices de refracción diferentes a aquel del solvente, hace que la luz sea dispersada principalmente por estas últimas. Las partículas están en un constante movimiento llamado “movimiento Browniano”. Como resultado de esto, en un experimento de dispersión, varía tanto la relación de fase de la luz dispersada, por diferentes partículas que se mueven al azar, como el número de partículas en el volumen de dispersión. Ambos efectos producen una fluctuación de la intensidad de luz dispersada. Debido a que el movimiento Browniano o la difusión de partículas en suspensión es la causa de las fluctuaciones, se puede obtener información acerca del proceso de difusión a partir de un análisis de la intensidad y distribución de las fluctuaciones en términos de una función de correlación. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein ^[39].

3.1.10. La piel, su estructura y función.

La piel es una capa protectora ubicada en la parte más externa del cuerpo. Uno de los objetivos de los cosméticos es mantener una piel sana y hermosa. Por lo tanto, comprender la piel es esencial para el desarrollo de mejores cosméticos y es uno de los temas más importantes de la ciencia cosmética ^[40].

La piel rodea nuestro cuerpo y no es una simple membrana ni una capa, tiene una estructura compuesta que consiste en varios componentes complejos bien organizados para desempeñar funciones fundamentales. A continuación, se describen, la estructura y la función de la piel en función de cada uno de estos componentes funcionales, y se discuten puntos importantes en la comprensión de la relación entre la piel y los cosméticos ^[40].

Cuando consideramos la piel en su totalidad, pueden ser identificados tres diferentes tejidos superpuestos: La epidermis: la capa más externa en contacto con el ambiente. La dermis: debajo de la epidermis, es el componente estructural de la piel y los órganos subyacentes. La hipodermis: inmediatamente debajo de la dermis,

compuesto de una capa de células adiposas y que representa un "cojín" de grasa entre la piel y los órganos debajo de ella [41].

La aplicación cosmética se produce principalmente en la superficie de la piel y, por tanto, la eficacia clínica del producto se basa a menudo en la difusión de las sustancias activas a través de la capa de la epidermis. La principal barrera para la penetración de sustancias a través de la piel es el estrato córneo, la capa más externa de la epidermis, que está en contacto directo con el medio ambiente [3].

Partiendo de la capa más externa de la piel, el estrato córneo (SC) de la epidermis está formado por un conjunto de células queratinizadas y anucleadas dispuestas planas unas contra otras. Estas células se recogen en 10 - 20 capas de células rodeadas de material lipídico extracelular (Figura 3.3). Esto confiere a la superficie cutánea una importante característica estructural y organizativa, así como una propiedad hidrofóbica, siendo estos los factores clave para su función protectora y, también, para el control selectivo de la permeabilidad cutánea. Debido a estas características, algunas sustancias apenas penetran a través de la piel por difusión pasiva en cantidades suficientes para alcanzar niveles terapéuticos [2, 40, 42].

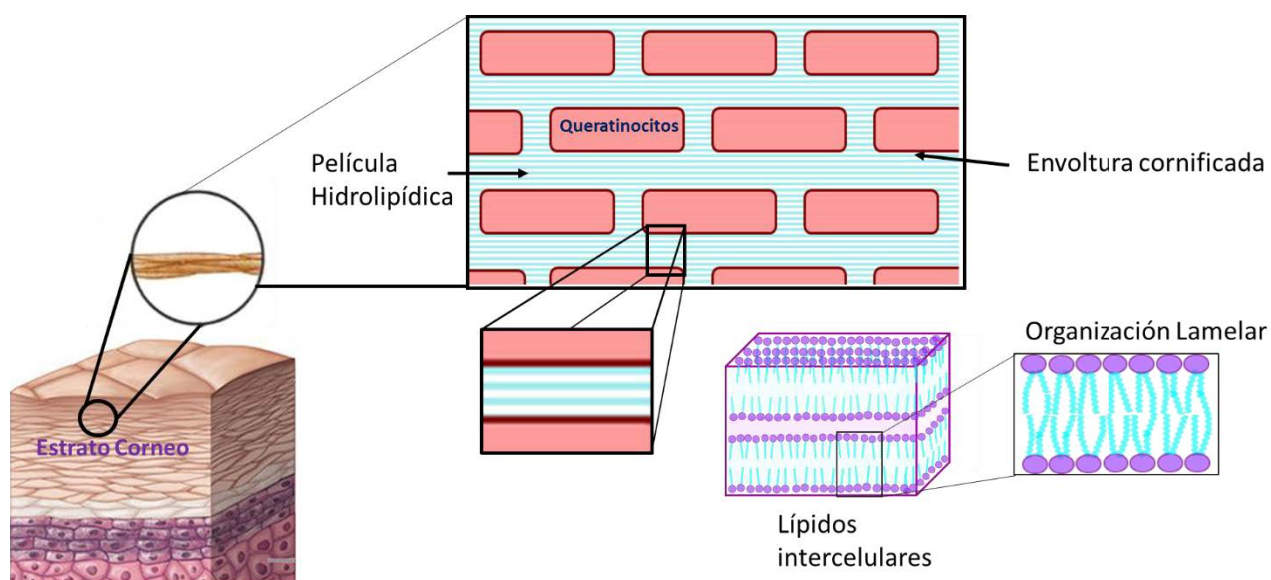


Figura 3.3. Esquema del estrato córneo (SC) de la epidermis

Hay varias vías posibles para que las moléculas penetren a través de la barrera cutánea y, en general, se consideran tres vías principales. En primer lugar, la vía intercelular más conocida se produce por difusión molecular a través de capas de lípidos entre la interfase de los corneocitos. En segundo lugar, la vía folicular con su densa red de capilares sanguíneos también actúa como un "reservorio" del componente activo. En tercer lugar, la vía transcelular que implica el transporte molecular directamente a través de los corneocitos y las capas de lípidos [37, 42, 43].

Debido a estas características, algunas sustancias apenas penetran a través de la piel por difusión pasiva en cantidades suficientes para alcanzar niveles terapéuticos. En este contexto, la nanotecnología es fundamental en el desarrollo de estrategias que permitirían una mayor penetración de activos por vía transepidérmica, como las nanoemulsiones [2].

En la Dermis, las células más abundantes son los fibroblastos. Estas células son el sitio de producción de los otros componentes dérmicos: tanto las fibras de la dermis como la sustancia fundamental. La mayor parte de la dermis está ocupada por matrices extracelulares. Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular están integradas en cuatro tipos: (1) sistema colágeno (2) sistema elástico (3) proteoglicanos (4) glicoproteínas multifuncionales. Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás [40, 41, 44].

El colágeno, que consiste principalmente en colágenos tipo I y tipo III. Los colágenos consisten en proteínas fibrosas que forman una estructura de triple hélice con tres moléculas de colágeno reticuladas intermolecularmente [40, 41].

El colágeno tipo I y el tipo III, presentes en la dermis de la piel, presentan una estructura de fibrillas con bandas. Estos colágenos se caracterizan por su capacidad de ensamblarse en agregados supramoleculares altamente orientados con una infraestructura característica, la típica matriz de fibrillas escalonada en cuartos con diámetros entre 25 y 400 nm. El colágeno tipo IV, $[\alpha 1 (IV)]_2 \alpha 2(IV)$, $\alpha 1 - \alpha 6$ presenta un dominio globular, formando una red ramificada. El colágeno tipo IV es el

componente estructural más importante de las membranas basales [45, 46]. Ver Figura 3.4

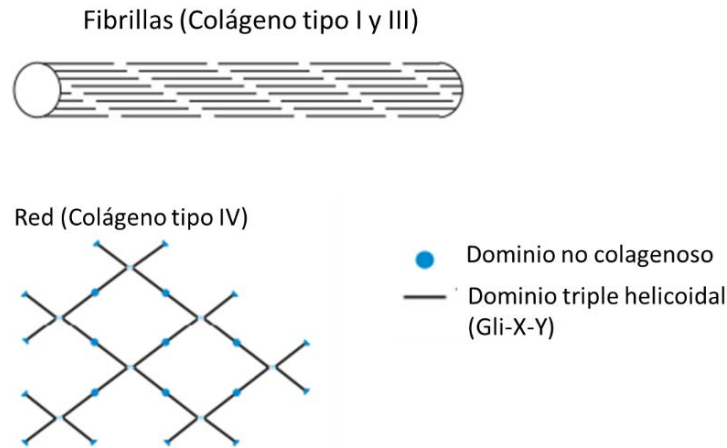


Figura 3.4. Ensamblajes supramoleculares formados por colágenos [47].

Otro componente importante de la dermis es la elastina, que consiste en fibra elástica, que exhibe propiedades no muy diferentes a las de un resorte. Las fibras elásticas, junto con las fibras de colágeno, construyen una arquitectura de red en la dermis y proporcionan propiedades físicas para la recuperación tras la deformación de la piel [40].

Los espacios intermedios entre estas estructuras de proteínas están ocupados por la sustancia fundamental de la dermis, el cual es el componente "cementante", un grupo de diferentes componentes que se combinan para comprimir la estructura de la dermis. Está formado por sustancias como ácidos mucopolisacáridos (glicosaminoglicanos, químicamente clasificable como azúcares complejos), ácido hialurónico y sulfato de condroitina. Su principal característica es la capacidad de unir numerosas moléculas de agua, produciendo así un gel amorfo que cumple dos funciones esenciales: permitiendo que los nutrientes y el oxígeno entren en los tejidos y protejan la estructura dérmica [41].

El rendimiento en la síntesis de los componentes extracelulares disminuye gradualmente con la edad, lo que produce un adelgazamiento de la piel, una menor

elasticidad y una mayor alteración, ya que la flacidez acompaña la disminución del rendimiento de los músculos ^[40].

3.1.11. Capacidad antioxidante de los polifenoles del cacao y su influencia en la piel

Se ha demostrado que los polifenoles presentes en el cacao, actúan como antioxidantes fuertes, con el potencial de inhibir la peroxidación lipídica y para interceptar y neutralizar eficazmente las especies reactivas de oxígeno (ERO o por sus siglas en inglés ROS). En este sentido, se ha demostrado que los flavanoles de cacao pueden ser más potente que otros polifenoles, y varias veces más eficaces como antioxidantes que, la vitamina E y C, empleados convencionalmente como los más potentes antioxidantes naturales ^[48, 49].

Se ha estudiado la influencia de los polifenoles del cacao en la estructura de la piel, mediante la aplicación tópica de polifenoles de cacao, demostrando que exhiben un efecto positivo en la morfología general de la piel, indicadores de la elasticidad y el tono de la piel, a saber, los glicosaminoglicanos y el colágeno I, III y IV. Los polifenoles del cacao inducen un ligero aumento en el espesor epidérmico, así como un aumento en la densidad del colágeno en la dermis papilar ^[50].

El grupo de las catequinas ha despertado interés en el área cosmética y la salud de la piel ^[50-55]. Madhan y colaboradores ^[56, 57], en un trabajo realizado para estudiar la estabilidad del colágeno tipo I utilizando catequina, demostraron que la catequina estabiliza el colágeno contra el ataque de la enzima colagenasa. Además, la estabilidad de las fibras de colágeno tratadas con catequina es buena incluso después de ser sometidas a un tratamiento con un desestabilizador estructural secundario, como la urea. Adicionalmente se observó que la estructura nativa del colágeno no se ve alterada en el tratamiento con catequina. Los estudios experimentales y computacionales indican que las principales fuerzas involucradas en la estabilización del colágeno por la catequina, es debido la participación del enlace de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas.

Algunos estudios, también informaron que la catequina tenía un efecto significativo de fotoprotección de la piel contra el estrés oxidativo mediado por los rayos UV, el melanoma, el carcinoma basocelular y las quemaduras solares [55, 58].

3.1.12. Los polifenoles y su biodisponibilidad

Los flavonoides son compuestos altamente lipofílicos y, por lo tanto, difíciles de absorber por vía oral. Estas moléculas exhiben un efecto positivo en la morfología general de la piel, indicadores de la elasticidad y el tono de la piel y actúa beneficiosamente en los tipos de colágeno que se encuentran en la piel. Además de ejercer un efecto significativo de fotoprotección de la piel contra el estrés oxidativo mediado por los rayos UV [50, 54].

Numerosos factores pueden afectar el contenido de polifenoles en alimentos diarios o extractos de plantas. Las condiciones ambientales como la luz, la temperatura o el oxígeno, el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Calentamiento, acidificación, luz y oxígeno) o las reacciones del tracto digestivo (pH ácido, enzimas, presencia de otros nutrientes) son los parámetros principales que podrían producir una disminución en la concentración de polifenoles y provocando una pérdida parcial o incluso total de su bioactividad. Estos factores limitan su disponibilidad para la administración oral en humanos, lo que plantea serios desafíos para la carga de estos compuestos en productos nutracéuticos [59].

Específicamente la catequina posee una vida media corta ($t_1 / 2$, 1.25 h), después de la administración oral, y una biodisponibilidad oral en menos del 5%. Además, la captación intestinal es pobre. Por lo tanto, la aplicación tópica de catequina debería ofrecer beneficios sobre los efectos fotoprotectores de la piel y la mejora de la biodisponibilidad, incluido el potenciador químico utilizado, el liposoma, nanoemulsión o formulación de características específicas para mejorar la administración de compuestos activos para la piel [54].

El sistema de administración transdérmica de medicamentos es un método mucho menos invasivo, más cómodo y conveniente para la administración de medicamentos o ingredientes activos. Sin embargo, el compuesto terapéutico solo puede actuar cuando impregna al menos la capa más externa (estrato córneo) de

la piel, y su eficacia de aplicación tópica a menudo se ve obstaculizada, porque el transporte es lento debido a la resistencia del estrato córneo de la piel ^[60].

En esta investigación se propone, la formulación de una emulsión que contenga polifenoles provenientes del cacao, específicamente (-)-epicatequina (EC) pertenecientes al grupo de los flavonoides. Esta formulación debe poseer gotas de tamaño nanométricos para favorecer el pasaje transdérmico a través del estrato corneo, con la finalidad de hacer llegar los polifenoles a la dermis cutánea y potenciar el efecto positivo en la morfología general de la piel. Debido a que este sistema de administración de compuestos activos es un método mucho menos invasivo, más cómodo y conveniente para la administración de medicamentos o ingredientes activos.

3.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Las fases microemulsiones de determinados sistemas del ternario uno y ternario dos, fueron seleccionados para formar nanoemulsiones a partir de ellos, a través de un método de dilución reportado por Solé ^[61].

3.2.1. Materiales, reactivos y equipos

3.2.1.1. Materiales

Las muestras empleadas para evaluar la formación de nanoemulsiones, fueron las microemulsiones estudiadas en los ternarios 1 y 2. Los sistemas estudiados son reportados en la Tabla 3.1. Los sistemas analizados en el ternario 1 están compuestos por: solución salina de cloruro de sodio al 10 %, aceite mineral, surfactante Tween 85 y los cosurfactantes sec-butanol y 1-pentanol. Los sistemas analizados en el ternario 2 están compuestos por los mismos reactivos, variando sólo los cosurfactantes, en este caso etanol y propilenglicol.

Tabla 3.1. Las muestras empleadas para evaluar la formación de nanoemulsiones, provenientes de las microemulsiones estudiadas en los ternarios 1 y 2. En las microemulsiones (ME) estudiadas hay presente fases lamelares ($L\alpha$) y hexagonal (H_2).

<i>Muestras provenientes de los Sistemas estudiados en el Ternario 1</i>		<i>Fases presentes en las muestras microemulsión</i>	<i>Muestras provenientes de los Sistemas estudiados en el Ternario 2</i>		<i>Fases presentes en las muestras microemulsión</i>
<i>Sistema</i>	<i>Composición</i>		<i>Sistema</i>	<i>Composición</i>	
6	20% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ /ME	6	20% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ / H_2 /ME
7	30% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ /ME	7	30% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ /ME
8	40% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ /ME	8	40% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ /ME
9	50% surf (30 W/70O)	ME	9	50% surf (30 W/70O)	$L\alpha$ /B/ME
37	20% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /ME	37	20% surf (50 W/50O)	ME
38	30% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /ME	38	30% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /ME
39	40% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /ME	39	40% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /ME
40	50% surf (50 W/50O)	ME	40	50% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /ME
41	60% surf (50 W/50O)	ME	41	60% surf (50 W/50O)	$L\alpha$ /B/ME
42	70% surf (50 W/50O)	ME	42	70% surf (50 W/50O)	ME
70	20% surf (70 W/30O)	$L\alpha$ /ME	70	20% surf (70 W/30O)	ME
71	30% surf (70 W/30O)	$L\alpha$ /ME	71	30% surf (70 W/30O)	$L\alpha$ /ME
72	40% surf (70 W/30O)	$L\alpha$ /ME	72	40% surf (70 W/30O)	$L\alpha$ /ME
73	50% surf (70 W/30O)	ME	73	50% surf (70 W/30O)	$L\alpha$ /ME

3.2.1.2. Reactivos

- Agua bidestilada
- Extracto de polifenoles, obtenidos en el cumplimiento del objetivo

1.

3.2.1.3. Equipos

- **pH-metro:** pH meter Digimed DM-23
- **Conductímetro:** Conductivity meter Digimed DM-31
- **Equipo de Dispersión Dinámica de Luz:** La distribución de tamaño de las partículas se midió con un equipo construido en el Laboratorio de Espectroscopia Láser, la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de

la Universidad central de Venezuela, basado en la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) (Figura 3.5).

El equipo desarrollado para las medidas de dispersión de luz consta de un láser de He-Ne de 635 nm, dos polarizadores para atenuar el haz del láser, una lente para enfocar el haz sobre la muestra. El haz entra a la cámara que contiene la celda por medio de un orificio o rendija, la luz hace contacto con la solución y se dispersa, el fotomultiplicador está colocado a un ángulo variable respecto a la luz incidente que la convierte en corriente eléctrica. La corriente de salida es convertida en voltaje, para luego pasar por la interfaz de adquisición de datos y llega al computador. Obteniéndose los datos de distribución y diámetro de partículas en nanómetros ^[39].



Figura 3.5. Equipo de Dispersión Dinámica de Luz

Formación de nanoemulsiones O/W

Las nanoemulsiones fueron preparadas a partir de las microemulsiones de los sistemas estudiados, por dilución con agua. La cantidad de agua adicionada fue la necesaria para llevar la concentración de surfactante a 7% m/v en cada nanoemulsión, la cual es la concentración donde se obtiene la zona de emulsiones en el ternario 1. La cantidad de microemulsión necesaria para elaborar una

nanoemulsión de un volumen 5 mL fue determinada empleando la ecuación de dilución 2.1

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \quad \text{ec. 2.1}$$

Donde C1 es la concentración de la formulación concentrada (microemulsión), V1 es el volumen de la formulación concentrada (microemulsión), C2 es la formulación diluida y V2 es volumen de la formulación diluida.

A la cantidad determinada de microemulsión, se le añadió la cantidad de agua necesaria para alcanzar un volumen total de 5 mL.

La adición del agua se realizó en un solo paso, descargando el contenido determinado de agua a través de una pipeta graduada, sobre la microemulsión. Una vez adicionada la cantidad de agua en el tubo que contiene la microemulsión, fue tapado e invertido el tubo 2 veces, de manera suave para facilitar el proceso de mezclado y dilución de la microemulsión. Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura constante de 26 °C.

3.2.2. Formación de nanoemulsiones O/W con extracto de polifenoles

Las nanoemulsiones fueron preparadas por dilución de las microemulsiones con agua y la adición del extracto de polifenoles.

Sobre la microemulsión se adicionó una cantidad de extracto de polifenoles, para lograr una concentración entre 0,75 y 0,78 % m/v en cada formulación (0,18 mL de extracto de polifenoles para 0,78 %). La cantidad de agua adicionada fue la necesaria para llevar la concentración de surfactante a 7% m/v en cada nanoemulsión, y un volumen final de 5 mL.

La adición del agua y el extracto polifenólico se realizó en un solo paso, descargando el contenido determinado a través de una pipeta, sobre la microemulsión. Una vez adicionada la cantidad de agua y extracto de polifenoles en el tubo que contiene la microemulsión, fue tapado e invertido el tubo 2 veces, de manera suave para facilitar el proceso de mezclado y dilución de la microemulsión. Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura constante de 26 °C.

De la misma manera, siguiendo el método de baja energía fue elaborado el producto basado en la formulación seleccionada.

3.2.3. Medición de distribución de tamaño de gotas

La distribución de tamaño de gotas en las nanoemulsiones, fueron medidas luego de 24 horas de su elaboración. Las muestras fueron colocadas directamente en el equipo de DLS, sin ningún tratamiento adicional. Estas mediciones se realizaron a una temperatura de 25 °C.

3.2.4. Medición de pH al producto

Se realizó empleando un pHmetro, colocando el electrodo en una cantidad mínima de muestra.

3.2.5. Medición de conductividad al producto

La conductividad del producto, se determinó empleando un conductímetro.

3.2.6. Determinación de la morfología de la emulsión

Se colocó una gota de la nanoemulsión en un medio acuoso, para observar si la fase externa se disolvería o no en la fase acuosa.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Elaboración de nanoemulsiones a partir de sistemas microemulsiones/cristales líquidos provenientes de los ternarios 1

Se realizó la elaboración de nanoemulsiones partiendo de distintos sistemas formulados en el ternario 1 (mostrados en la Tabla 3.1). Estos sistemas poseen concentraciones de surfactante entre 20 y 70% y a distintas relaciones agua y aceite, los cuales están conformados por microemulsiones y cristales líquidos (en su gran mayoría lamelares), coexistiendo ambas fases en algunos casos y en otros, sólo se determinó la formación de microemulsiones.

Estos sistemas fueron diluidos con agua hasta obtener una concentración de 7 % fase surfactante, independientemente de la concentración de la microemulsión de origen. Esto, debido a que en el sistema ternario analizado inicialmente, el ternario 1, se obtuvo una región bifásica, es decir, formación de sistemas bifásicos, en el cual con los componentes empleados se favorece la formación de emulsiones, como lo indica la Figura 3.6.

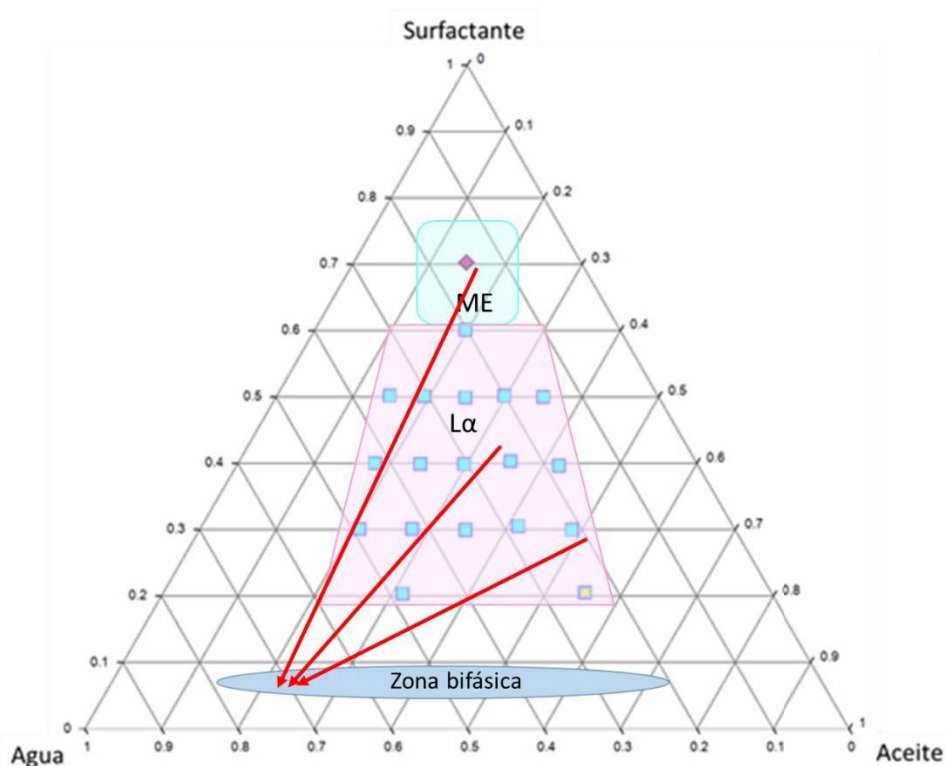


Figura 3.6. Diagrama del proceso de dilución de las fases microemulsión/cristal líquido, hasta la zona bifásica para la elaboración de las nanoemulsiones.

Las emulsiones obtenidas, mostraron una apariencia traslúcida características de las nanoemulsiones, como se observa en la Figura 3.7 a, se puede ver unas letras impresas en una hoja colocada detrás del tubo de la nanoemulsión, evidenciando la transparencia de dicha emulsión.

La elaboración de nanoemulsiones con la incorporación de los polifenoles, se realizó igualmente partiendo de distintos sistemas formulados en el ternario 1 (mostrados en la Tabla 3.1). Sistemas conformados por microemulsiones y cristales líquidos. Empleando la misma metodología de dilución, estos sistemas fueron diluidos con agua hasta obtener una concentración de 7 %, además de la adición de extracto polifenólico. Las emulsiones obtenidas, mostraron una apariencia traslúcida de color naranja/ladrillo, como se observa en la Figura 3.7 b.

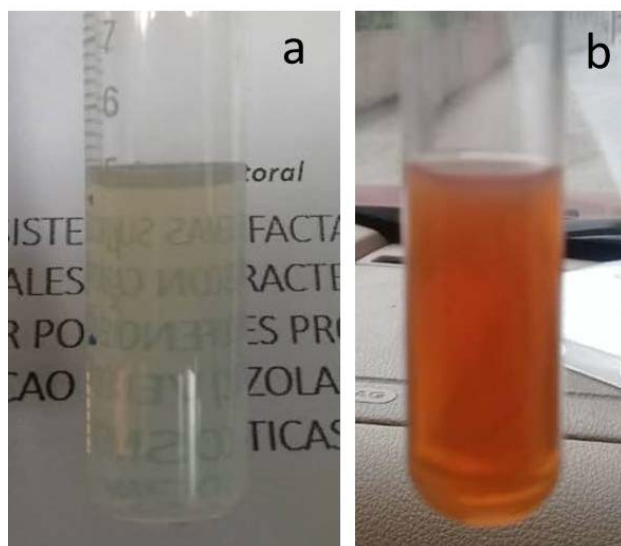


Figura 3.7. Nanoemulsiones elaboradas por el método de dilución de microemulsiones/ cristales líquidos. a) Nanoemulsión proveniente del sistema 8 40% surf (30 W/70O) diluido con agua. b) nanoemulsión proveniente del sistema 8, diluido con agua y la adición del extracto de polifenoles.

Las emulsiones provenientes de los sistemas del ternario 1 fueron caracterizadas, determinando la distribución del tamaño de gota a través de la técnica de dispersión dinámica de luz.

3.3.2. Distribución de tamaño de gotas

La mayoría de las nanoemulsiones contienen una gran cantidad de gotas esféricas que varían de tamaño en un cierto intervalo y, por lo tanto, sus dimensiones pueden describirse mediante una distribución del tamaño de partículas (DTP), también

llamada distribución de tamaño de gotas, que representa la fracción de gotas dentro de una gama de tamaños discretos [62].

En el caso de las nanoemulsiones elaboradas por métodos de baja energía, la DTP depende la temperatura, velocidades de agitación, tasas de adición, proporción de surfactante-aceite-agua y tipo de surfactante.

En la Figura 3.8 se observan las gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 39 del ternario 1, en azul la curva de la nanoemulsión O/W y en naranja la curva de la nanoemulsión O/W/Polifenoles. Las gráficas de distribución de tamaños de gotas de los demás sistemas proveniente del ternario 1 son mostradas en el apéndice de este capítulo.

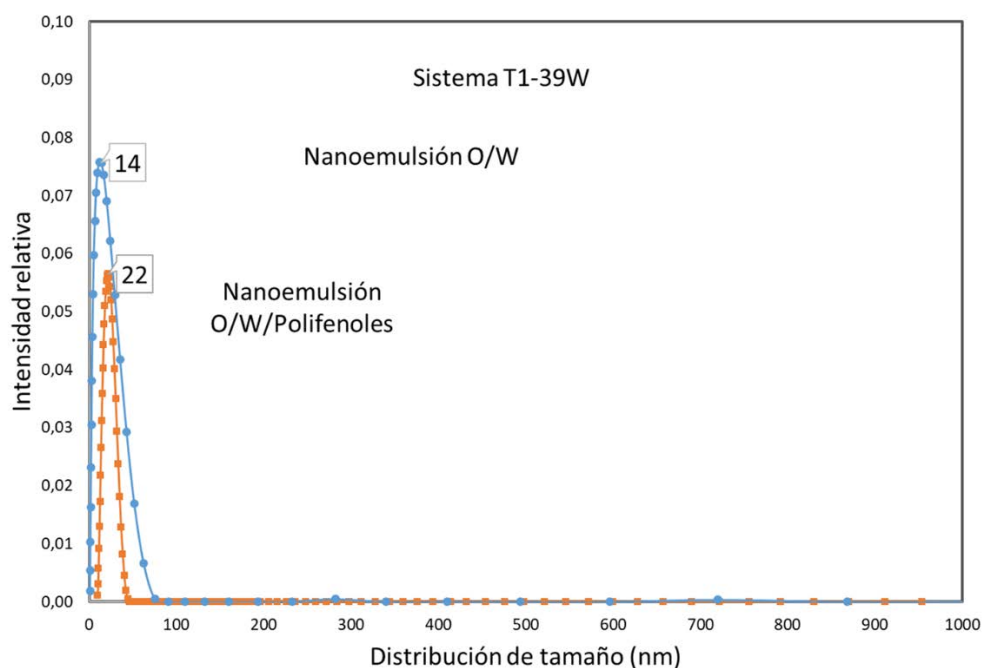


Figura 3.8. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 39 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

Los valores de diámetro de gota obtenidos por la dispersión dinámica de luz, son reportados en la Tabla 3.2. Estos valores corresponden al valor de la moda,

obtenido del máximo de la curva construida con los datos arrojados por el equipo, es decir, el valor obtenido de diámetro de gota que se presentó con mayor frecuencia ^[63].

Tabla 3.2. Diámetro de tamaños de gotas de las nanoemulsiones formadas por dilución de determinados sistemas provenientes del ternario 1 y las nanoemulsiones provenientes de los mismos sistemas más la adición de los polifenoles, empleando dispersión dinámica de luz.

<i>Sistema</i>	<i>Fases presentes en las muestras microemulsión</i>	<i>Diámetro de gotas de nanoemulsiones O/W(nm)</i>	<i>Diámetro de gotas de nanoemulsiones O/W/Polifenoles(nm)</i>
6	L α /ME	11	-
7	Lα /ME	14	46
8	Lα /ME	29	22
9	ME	17	-
37	L α /ME	27	-
38	L α /ME	14	-
39	Lα /ME	14	22
40	ME	20	-
41	ME	14	-
42	ME	14	-
70	L α /ME	14	-
71	Lα /ME	14	34
72	Lα /ME	14	40
73	ME	14	-

Los resultados obtenidos evidencian que, en todos los sistemas estudiados se obtuvo tamaños de gotas característicos de nanoemulsiones, tanto para las O/W como para las O/W/Polifenoles. En todos los casos, las nanoemulsiones, presentan valores de diámetro de gotas por debajo de 50 nm.

No se observa una relación directa entre la fase presente en la microemulsión y el tamaño de gota obtenido. En ambos casos, tanto en microemulsiones coexistiendo con cristales líquidos, como en sistemas que sólo presentaron evidencia de microemulsión, se obtuvo valores de distribución de tamaño de partículas menores a 50 nm.

En el caso de las nanoemulsiones O/W/Polifenoles, se presentan valores de diámetro de gotas más grande a los provenientes del mismo sistema, pero sin la incorporación de los polifenoles.

Sabiendo que en las nanoemulsiones O / W, las gotas consisten en un núcleo de material hidrofóbico rodeado por una capa de materiales tensoactivos, el radio efectivo de las gotas dentro de una nanoemulsión depende de la dimensión del núcleo hidrófobo y la capa tensoactiva. Por lo tanto, el grosor de la capa puede aumentarse mediante la adsorción de materiales sobre las superficies de las gotas [62]. En este caso, la incorporación de materiales con actividad interfacial como los flavanoles [64]. Estas moléculas poseen grupos hidroxilos hidrofílicos y zonas hidrofóbicas, porque pueden adsorberse en las interfases de la gota, además de presentar posibles interacciones tipo puente de hidrógeno con la cadena etoxilada del surfactante Tween 85, y/o con las moléculas de alcoholes ubicadas en la interfase. Estas interacciones podrían verse más favorecidas que las interacciones con el agua para mantenerse en la fase acuosa, debido a que la molécula se vería afectada por el efecto hidrofóbico que ejercería el agua sobre las moléculas de los flavanoles. Es por ello que estas moléculas estarían ubicadas en las interfases de la gota, formando parte de la capa tensoactiva que recubre el núcleo lipofílico. Es por ello que podría verse aumentado los valores del tamaño de gotas de las nanoemulsiones O/W/Polifenoles.

Las nanoemulsiones O/W mostraron una estabilidad en el tiempo superior a los 12 meses, tiempo en el cual no se observó separación de las fases o proceso de cremado. Viéndose afectadas las nanoemulsiones sólo por un aumento de temperatura, sin embargo, al volver a su temperatura inicial, y luego de la incorporación de las fases, se vuelve a obtener las nanoemulsiones con la misma apariencia translúcida, indicando que mantienen un tamaño de gota a escala nanométrica. Esto sugiere que se trata de sistemas reversibles.

A pesar de obtenerse tamaños de gotas muy pequeños en las nanoemulsiones O/W y la estabilidad mostrada en el tiempo, la mayoría de las nanoemulsiones O/W/Polifenoles, no mostraron una buena estabilidad en el tiempo (inferior a 24 horas). Por lo tanto, no fue posible realizar la medición de dichas emulsiones, reflejando en los resultados, las nanoemulsiones con polifenoles que presentaron una estabilidad superior a los 3 meses.

3.3.3. Elaboración de nanoemulsiones a partir de sistemas microemulsiones/cristales líquidos provenientes del ternario 2

Se realizó la elaboración de nanoemulsiones partiendo de distintos sistemas formulados en el ternario 2 (mostrados en la Tabla 3.1). Estos sistemas poseen concentraciones de surfactante entre 20 y 70% y a distintas relaciones agua y aceite, tal como en el ternario 1.

Se realizó el mismo procedimiento de dilución a las muestras al aplicado para los sistemas provenientes del ternario 1.

Las emulsiones obtenidas, mostraron una apariencia traslúcida características de las nanoemulsiones, como se observa en la Figura 3.9 a, se puede ver unas letras impresas en una hoja colocada detrás del tubo de la nanoemulsión, evidenciando la transparencia de dicha emulsión.

La elaboración de nanoemulsiones con la incorporación de los polifenoles, se realizó igualmente partiendo de distintos sistemas formulados en el ternario 2 (mostrados en la Tabla 3.1). Sistemas conformados por microemulsiones y cristales líquidos.

Empleando la misma metodología de dilución a las muestras provenientes del ternario 1 y adición del extracto de polifenoles.

Las emulsiones obtenidas, mostraron una apariencia poco traslúcida de color rosado, como se observa en la Figura 3.9 b.



Figura 3.9. Nanoemulsiones elaboradas por el método de dilución de microemulsiones/ cristales líquidos. a) Nanoemulsión proveniente del sistema 70 (20% surf / 80% W/O) diluido con agua. b) nanoemulsión proveniente del sistema 70, diluido con agua y la adición del extracto de polifenoles.

Las emulsiones provenientes de los sistemas del ternario 2 fueron caracterizadas, determinando la distribución del tamaño de gota a través de la técnica de dispersión dinámica de luz.

3.3.4. Distribución de tamaño de gotas

En la Figura 3.10 se observan las gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 70 del ternario 2, en azul la curva de la nanoemulsión O/W y en naranja la curva de la nanoemulsión O/W/Polifenoles. Las gráficas de distribución de tamaños de gotas de los demás sistemas proveniente del ternario 2 son mostradas en el apéndice de este capítulo.

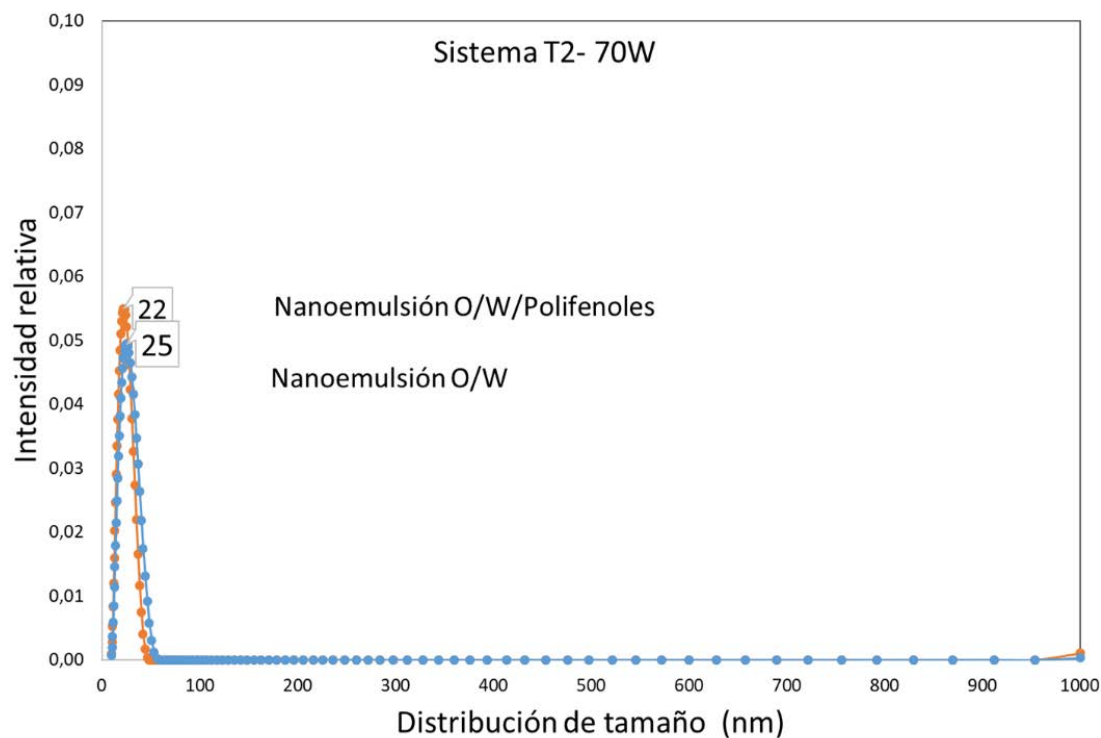


Figura 3.10. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 70 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

Los resultados obtenidos evidencian que, en todos los sistemas estudiados se obtuvo tamaños de gotas característicos de nanoemulsiones. Los resultados para las nanoemulsiones proveniente de los sistemas del ternario 2 son reportados en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Diámetro de tamaños de gotas de las nanoemulsiones formadas por dilución de determinaros sistemas provenientes del ternario 2 y las nanoemulsiones provenientes de los mismos sistemas más la adición de los polifenoles, empleando dispersión dinámica de luz.

Sistema	Fases presentes en las muestras microemulsión	Diámetro de gotas de nanoemulsiones O/W(nm)	Diámetro de gotas de nanoemulsiones O/W/Polifenoles (nm)
6	L α / H ₂ /ME	27	-
7	L α /ME	32	25
8	L α /ME	49	32
9	L α /B/ME	22	34
37	ME	24	24
38	L α /ME	34	29
39	L α /ME	46	42
40	L α /ME	29	37
41	L α /B/ME	28	68
42	ME	39	108
70	ME	25	22
71	L α /ME	53	23
72	L α /ME	71	32
73	L α /ME	32	80

Los valores de diámetro de gota reportados en la Tabla 3.3 corresponden al valor de la moda, obtenido del máximo de la curva construida con los datos arrojados por el equipo de dispersión dinámica de luz.

Los tamaños de gotas obtenidos por el método de dilución de microemulsiones/cristales líquidos, son valores que en su mayoría se encuentran por debajo de 100 nm, indicando que las nanoemulsiones formuladas O/W/Polifenoles, tienen el tamaño requerido para lograr el pasaje transdérmico.

Esto favorece la incorporación del componente bioactivos a través de la barrera de la epidermis en la piel.

3.3.5. Apariencia de las nanoemulsiones

La mayoría de las nanoemulsiones O/W, presentaron una apariencia translúcida (como se observa en la Figuras 3.7 y 3.9), mientras que la mayoría de las nanoemulsiones O/W/Polifenoles, aunque mostraron (en la mayoría de los casos) una apariencia traslúcida, por ser coloreadas resultó menos sencillo apreciarlas. Estas características macroscópicas, están directamente relacionada con el tamaño de las gotas y el contenido de fase aceite que contiene, o de compuestos activos que sean coloreados, como en este caso los polifenoles. Estos resultados coinciden con los valores señalados en la literatura, donde relacionan el tamaño de gota con la apariencia de la nanoemulsión ^[62]. Las nanoemulsiones pueden ser claras o translúcidas, al poseer diámetro de gotas menores a 50nm y pueden verse turbias en un intervalo de 50nm a 200nm.

3.3.6. Comparación entre los tamaños de gotas obtenidos en sistemas provenientes de ambos ternarios

En este caso, las nanoemulsiones elaboradas a partir de sistemas de microemulsiones/cristales líquidos que poseen cosurfactantes diferentes a los empleados en los sistemas del ternario 1, presentaron resultados distintos. Los valores de distribución de diámetro de gota en las emulsiones O/W, resultaron ser un poco más elevados entre 22 y 71 nm, mientras que en las nanoemulsiones provenientes de los sistemas que poseen sec-butanol/pentanol presentaron un diámetro de gota entre 11 y 29 nm.

Según un estudio realizado por Wooster y colaboradores ^[65], la presencia de alcoholes en las nanoemulsiones favorece la disminución de los tamaños de gota de valores de 120 nm a 50 nm. Esta tendencia se evidencia en las nanoemulsiones elaboradas a partir de los sistemas de ambos ternarios. Pero, la variación de alcoholes empleados también puede tener un efecto en la distribución de los tamaños de gotas.

En el caso de las nanoemulsiones que poseen como cosurfactante la mezcla de etanol/ propilenglicol (ternario 2), poseen un grupo oxidrilo adicional a la mezcla sec-butanol/pentanol (ternario 1). Teniendo en cuenta, que los grupos oxidrilos presentan una tendencia a asociarse con los grupos polioxietileno de la cabeza del surfactante Tween 85, la presencia de un grupo oxidrilo adicional en el entorno de solvatación de los grupos POE de cabeza del surfactante, conduce a una posible deshidratación de las cadenas de POE. Y a medida que el grupo de cabeza de POE se deshidrata más, tiende a doblar la interfaz hacia la fase acuosa, es decir, una curvatura espontánea menos positiva ^[65]. Esto se vería traducido en un diámetro de gotas un poco más grande.

De la misma manera que las nanoemulsiones O/W obtenidas a partir de los sistemas del ternario 1, las emulsiones obtenidas de los sistemas del ternario 2, mostraron una estabilidad en el tiempo superior a los 12 meses, tiempo en el cual no se observó separación de las fases o proceso de cremado. Viéndose afectadas las nanoemulsiones sólo por un aumento de temperatura, pero de manera reversible, al volver a su temperatura original, y luego de la incorporación de las fases, se vuelve a obtener las nanoemulsiones con la misma apariencia translúcida, indicando que mantienen un tamaño de gota a escala nanométrica.

En este caso, empleando las microemulsiones provenientes del sistema ternario 2, se obtuvieron nanoemulsiones O/W/Polifenoles estables en el tiempo (superior a los 6 meses). Estas a pesar de tener una apariencia poco translúcida, más parecida a las macroemulsiones, se obtuvieron tamaños de gotas pequeños, característicos de las nanoemulsiones. Este resultado diferente a las nanoemulsiones O/W/Polifenoles provenientes del ternario 1, puede ser debida a la diferencia de los cosurfactantes. Podría deberse a que a pesar de ser muy afines al agua el etanol y el propilenglicol, las moléculas que no se trasladaron al agua debido al proceso de dilución, favorecieron la estabilización de las interfases de las gotas de nanoemulsiones. Adicionalmente, debido a su estructura, y la presencia de dos grupos hidroxilos, favorece también la interacción no solo con el surfactante, sino con las moléculas

de flavonoides como la catequina, que poseen grupos hidroxilos en varias partes de su estructura debido a la formación de puentes de hidrógeno.

En este caso se presentaron sistema, en los cuales las nanoemulsiones O/W/Polifenoles presentaron menor distribución de tamaño de gota que las nanoemulsiones O/W. Esta tendencia se presentó en las nanoemulsiones elaboradas a partir de sistemas microemulsión con concentraciones de fase surfactante menor a 50%, independientemente de la relación agua/aceite. Esto es para las nanoemulsiones proveniente de los sistemas 6, 7, 8, 37, 38, 39, 70, 71 y 72. En estos casos, estos resultados pueden ser debido a la acción de los cosurfactantes etanol y propilenglicol. Estos cosurfactantes presentan en su estructura grupos oxidrilos que presentan interacción con la cabeza etoxilada del surfactante y con las moléculas de los flavanoles. A pesar de estar incorporando las moléculas de flavanoles en la interfase de la gota, lo cual debería generar un ligero aumento del tamaño de la misma, se genera una disminución de la distribución de tamaño de partícula. Esto podría deberse a que los cosurfactantes suman a la interfase tres grupos oxidrilos, haciendo mayor la interacción entre flavanoles, Tween 85 y alcoholes, generando un mejor empaque en la capa de tensoactivos de la interfase que recubre la gota de la emulsión.

Las nanoemulsiones con tamaños de gotas más pequeños presentan mayor estabilidad y resistencia a la floculación y coalescencia ^[62].

3.3.7. Curvas de distribución de tamaño de gota

Los resultados de la medición por dispersión dinámica de luz, arrojaron diferentes tipos de distribución que se encuentran en las emulsiones: unimodal de forma estrecha o muy polidispersa, y bimodales que resultan de una mezcla de dos emulsiones ^[63].

La forma de distribución y sus cambios son información útil sobre el proceso de formación de la emulsión o su evolución. Por ejemplo, la presencia de dos modalidades (nanoemulsiones provenientes de los sistemas del ternario 1: 8, 9, 40, 41, 73 y la 7 cargada con polifenoles), una indicando un diámetro de gotas menores a 100 nm y la otra alrededor de los 600 y 800 nm. Las segundas curvas presentes, de baja

intensidad, puede ser originada por un proceso de crecimiento de gotas las gotas debido a la floculación y coalescencia de las gotas pequeñas para formar gotas más grandes. Este fenómeno podría reflejarse en la formación de dos distribuciones de tamaños de gotas diferentes.

En el caso de las nanoemulsiones provenientes de los sistemas del ternario 2, las gráficas resultantes de la medición de dispersión dinámica de luz, arrojaron curvas de tipo bimodal, fueron las nanoemulsiones de los sistemas 8, 39, 40, 41, 42, 71 y 73. En estos casos la segunda curva se presentó con una intensidad muy baja, a una distribución de tamaño de gota alrededor de los 800 a 1000nm. Las segundas curvas presentes, de baja intensidad, pueden ser debido a un proceso de crecimiento de las gotas debido a la floculación y coalescencia de las gotas pequeñas para formar gotas más grandes.

Estos mismos sistemas cargados con polifenoles, no mostraron la presencia de una segunda curva, es decir, arrojaron una curva unimodal, pudiendo esto ser debido a la presencia de los flavanoles en las interfases de las gotas, favoreciendo la estabilidad de la gota. Las curvas de las nanoemulsiones cargadas con polifenoles, en su mayoría fueron unimodal de baja polidispersidad. Las gráficas construidas de los resultados de las mediciones de las nanoemulsiones, por dispersión dinámica de luz se muestran en el apéndice de este capítulo.

3.3.8. Mecanismo de formación de nanoemulsiones

La formación de nanoemulsiones por dilución de microemulsiones y/o cristales líquidos pudo ocurrir a través de tres vías. La primera por medio de la autoemulsión, como lo sugiere Solé ^[61], la cual es debida a la difusión del alcohol en la interfase de las gotas O/W, hacia el agua tras el proceso de dilución. Como consecuencia, la microemulsión, ahora es termodinámicamente inestable, ya que la concentración de tensoactivo no es lo suficientemente alta, como para mantener la tensión interfacial muy baja requerida ($\gamma < 10^{-2} \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$) para la estabilidad termodinámica, convirtiéndose en una nanoemulsión (Figura 3.11) ^[61]. Esto pudo ocurrir en los sistemas 70, 71 y 72 del ternario 1 y los sistemas 70, 71, 72 y 73 del

ternario 2, las cuales son microemulsiones formuladas con una relación de agua superior a la de aceite, tratándose de emulsiones O/W.

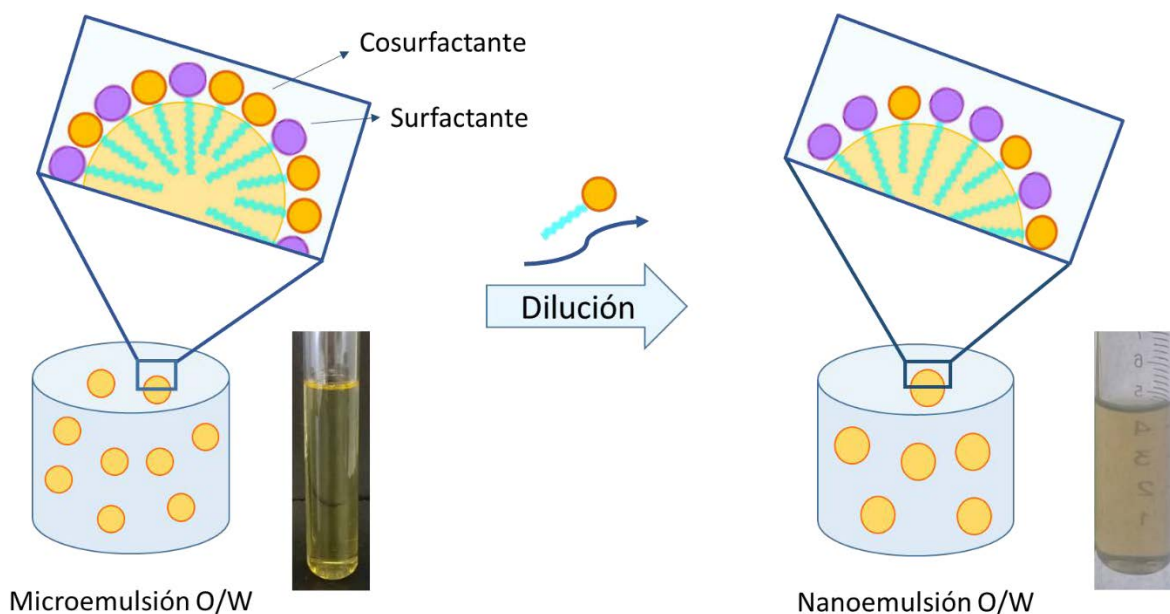


Figura 3.11. Representación esquemática del mecanismo propuesto para la autoemulsión por dilución de una microemulsión O / W: por dilución con agua, el cosurfactante difunde de la interfase aceite / agua a la fase acuosa. Modificado de Solans ^[10].

Otro mecanismo posible es a través de la inversión de fase por cambio en la composición del sistema. En el cual, el sistema inicial, es una microemulsión de agua en aceite W/O, cuando se agrega agua progresivamente para formar una nanoemulsión O / W, a medida que aumenta la fracción de volumen de agua, el grado de hidratación de las cadenas de óxido de etileno del surfactante etoxilado Tween 85, también va aumentando progresivamente. Por lo tanto, la curvatura espontánea del tensoactivo cambia a cero, convirtiéndose en una estructura del tipo lamelar o bicontinua, como es sugerido por Solé ^[10, 61]. Así, con la continua adición de agua, superando la composición de aceite, ocurre la desestabilización del sistema lamelar, generando nuevamente la formación de una curvatura, en este

caso para formar gotas de aceite en agua, debido a que el agua se encuentra en una proporción mayor.

Esto pudo ocurrir en los sistemas 6, 7, 8 y 9 de los ternarios 1 y 2, las cuales son microemulsiones formuladas con una relación de aceite superior a la del agua, tratándose de emulsiones W/O.

Adicionalmente, la formación de gotas de aceite en agua, puede ocurrir a partir de sistemas lamelares o bicontinuos, sin que ocurra una inversión de fase. Esto es debido a que, en la mayoría de los sistemas, están presentes estructuras lamelares, bien sea por la formación de los cristales líquidos (en sistemas entre 20 y 50 % surfactante), como por la formación de microemulsiones bicontinuas en los sistemas de composición superior al 50% surfactante, en ambos sistemas ternarios estudiados. Esto se representa en la Figura 3.12.

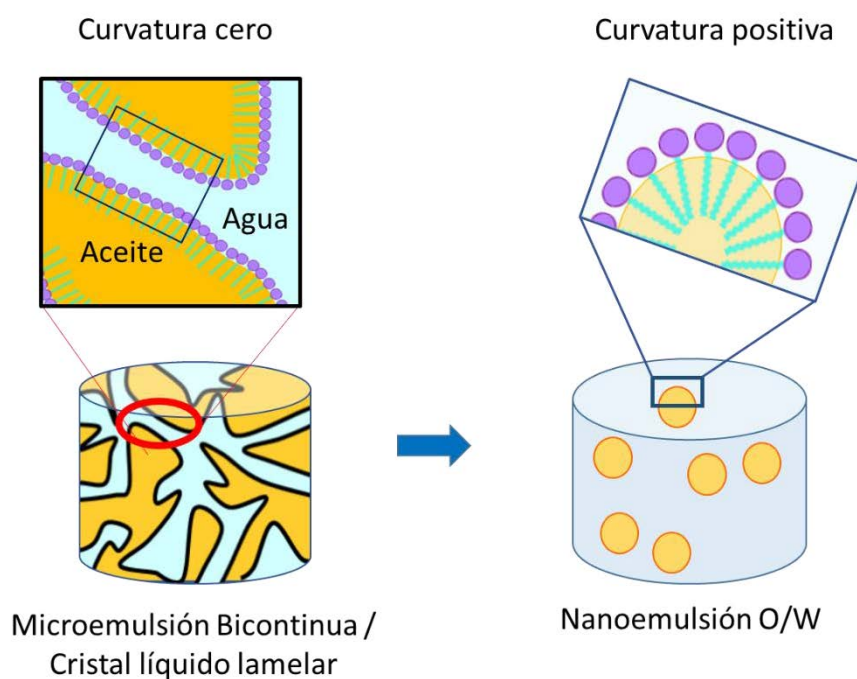


Figura 3.12. Representación esquemática de la formación de nanoemulsiones por el método de dilución de una estructura de curvatura cero. Basado en el modelo de Solans ^[10].

Los tamaños de gotas obtenidos a partir de los sistemas microemulsiones/cristales líquidos estudiados de los dos ternarios, sugieren que se puede obtener nanoemulsiones, con una distribución de tamaño de gota con un intervalo entre 20 y 100 nm, independientemente de la composición de la microemulsión.

3.3.9. Polifenoles en las interfases

La aplicación comercial potencialmente importante de las nanoemulsiones es encapsular agentes bioactivos, no sólo hidrófobos o hidrófilos, sino también anfífilos, como en el caso de los polifenoles, específicamente de las moléculas tipo catequinas ^[37]. Esas moléculas encapsuladas pueden localizarse principalmente dentro de la capa de estabilización externa (capa enriquecida con bioactivo), es decir, la interfase o capa tensoactiva de la gota, con implicaciones significativas en su comportamiento en el producto.

La incorporación del extracto de polifenoles se realizó de manera completa en la formulación, no se observó separación de fases excedentes. Los polifenoles, particularmente las moléculas tipo catequinas, tienen actividad interfacial, como lo indica Reitzer ^[64]. Por lo tanto, se sugiere que gran parte de los polifenoles pueden estar estabilizando las gotas de las nanoemulsiones, por ubicarse en las interfases de las gotas, mejorando o favoreciendo la estabilidad de dichas emulsiones.

Los polifenoles pueden comportarse como anfífilos, según su estructura o pueden modificar el balance hidrofílico / hidrofóbico de las moléculas con las que interactúan. Esto se evidencia en los resultados reportados en el capítulo 1. Donde se presenta una disminución de tensión superficial del agua en 17,3 unidades de tensión, en relación a una solución acuosa al 1 % v/v de extracto polifenólico.

En la Figura 3.13 se observa la estructura de la catequina y galato de epigallocatequina, modeladas computacionalmente para obtener el diseño de una estructura de energía minimizada, resultando una superficie cónica ^[56, 57]. Las partes rojas, indican los lugares donde se encuentran los átomos de oxígeno y las partes blancas, donde se encuentran los átomos de hidrógeno. Estos puntos

representan, la parte hidrofílica de la molécula, y la parte disponible para formar puentes de hidrógeno con otras estructuras. Específicamente, la catequina posee cinco grupos funcionales OH, estos pueden actuar como donantes / aceptores de enlaces de hidrógeno con diferentes moléculas, como, por ejemplo, en el caso de las macroestructura del colágeno [57]. En esta interacción, se forman complejos entre triple hélice de colágeno y la catequina a través de enlaces de hidrógeno (mediante los grupos hidroxilo, el grupo carboxilo, el grupo amino y el grupo amida de la cadena lateral de los aminoácidos (considerados los potenciales sitios de interacción para la formación de enlaces de hidrógeno)).

De la misma manera, se sugiere que estos grupos funcionales de la catequina, formen enlaces de hidrógeno en la interfase, con las moléculas de surfactante y cosurfactante. En el caso del surfactante Tween 85, los potenciales sitios de interacción para la formación de enlaces de hidrógeno, serían los grupos de óxido de etileno en la cabeza del surfactante. Y en caso de los cosurfactantes, serían los grupos OH de los alcoholes etanol y propilenglicol.

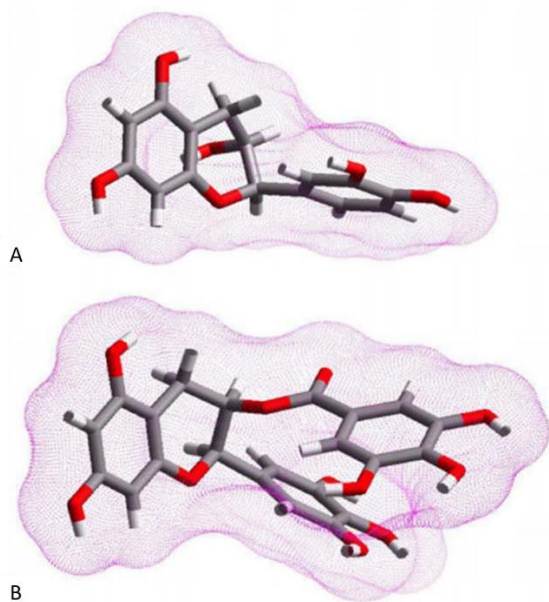


Figura 3.13. Superficie cónica de energía minimizada de la estructura de la catequina (A) y galato de epigallocatequina (B) [56, 57].

Además, Se ha demostrado que las propiedades biológicas de los polifenoles se conservan en su mayoría tras su inmovilización en las interfases. Por lo tanto, pueden ser empleados en biomateriales que liberan polifenoles en el área circundante que les permite difundirse en los tejidos [64].

3.3.10. Formulación de un producto cosmético

Debido a los resultados favorables obtenidos en la formación de nanoemulsiones O/W/Polifenoles, con los sistemas provenientes del ternario 2, se procedió a elaborar el producto cosmético, partiendo de un sistema compuesto de surfactante Tween 85, aceite mineral, empleando como cosurfactantes etanol y propilenglicol, que además de cosurfactante, el propilenglicol tiene funciones emolientes.

Fue seleccionado el sistema 37 del ternario 2, debido a su bajo tamaño de gotas, 24 nm, tanto en nanoemulsiones O/W como en nanoemulsiones O/W/polifenoles, además de que se trata de una microemulsión de bajo contenido de surfactante (20 %) (Figura 3.14).

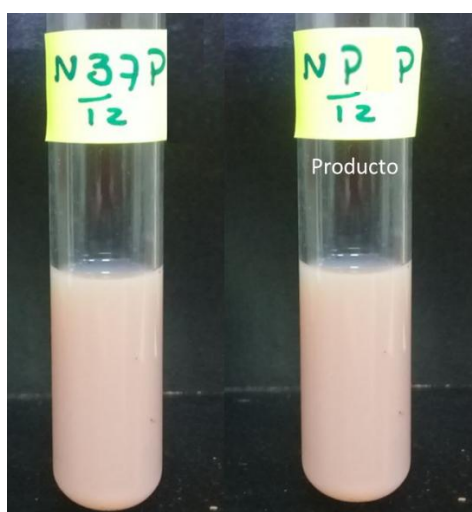


Figura 3.14. Nanoemulsiones elaboradas por el método de dilución de microemulsiones/ cristales líquidos. a) Nanoemulsión proveniente del sistema 37 (20% surf / 50% W/O) diluido con agua y la adición del extracto de polifenoles. b) Producto formulado proveniente del sistema 37.

3.3.11. Caracterización del producto nanoemulsión

- **Medición de distribución de tamaño de gotas**

El producto formulado, elaborado a través de la dilución de la microemulsión, presentó una distribución de tamaño de gota de baja polidispersidad en una curva unimodal, donde la moda resultó ser de 25 nm. (Figura3.15).

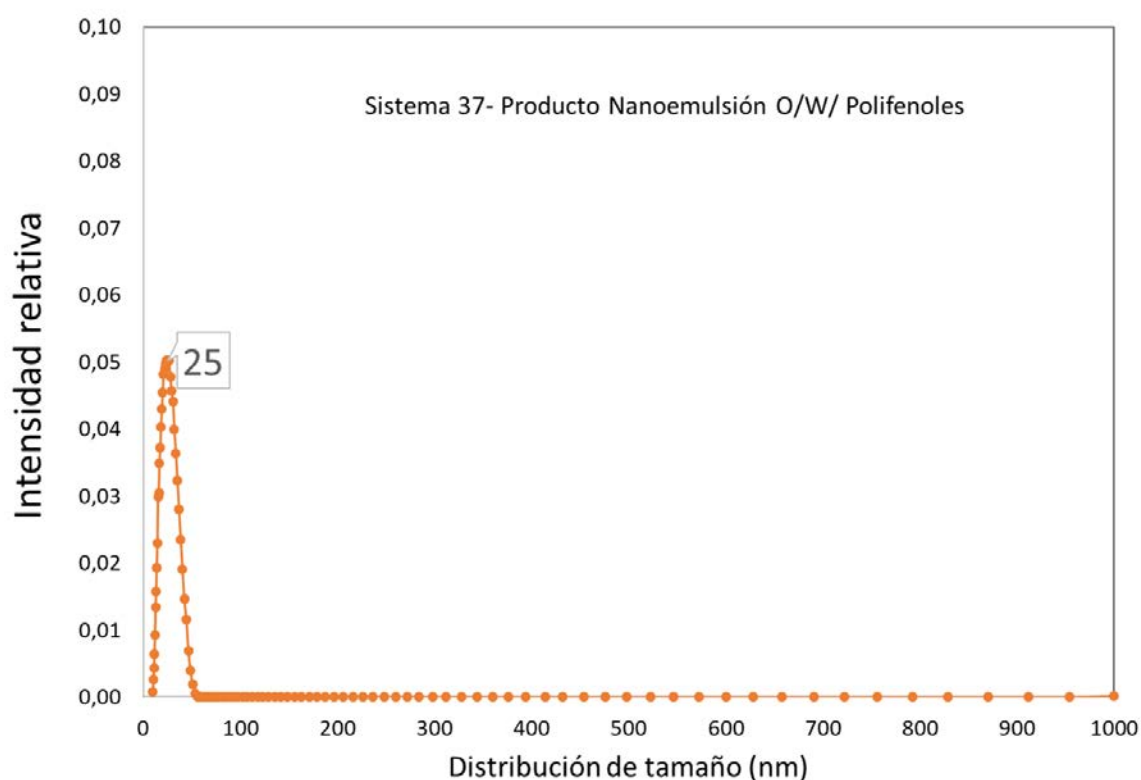


Figura 3.15. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 37 del ternario 2, elaborado como producto cosmético.

Este bajo valor de tamaños de gota, podría favorecer el pasaje transdérmico de los polifenoles ubicados en la interfase de la gota. Así, podría lograrse la acción de los polifenoles en la dermis, donde se encuentran los tipos de colágeno que se ven favorecidos por la acción de los flavonoides del cacao. Ocurriendo el pasaje transdérmico a través de las diferentes vías posibles para que las moléculas penetren a través de la barrera cutánea.

- **Viscosidad del producto**

La segunda influencia, y a menudo la más importante, se debe a la presencia de fase interna. Si la fracción de la fase interna es menor a 0,02, se trata de una emulsión diluida y el comportamiento de las gotas internas es diferente. En este caso, la fracción de fase interna en la emulsión es de 0,14, por lo tanto, no puede considerarse diluida. Sin embargo, según la gráfica 3.16, analizada de Salager ^[63] en la cual indica la variación típica de la viscosidad de una emulsión O / W frente a la cantidad de fase interna, la viscosidad relativa de la emulsión debe tener un valor por debajo de 2.

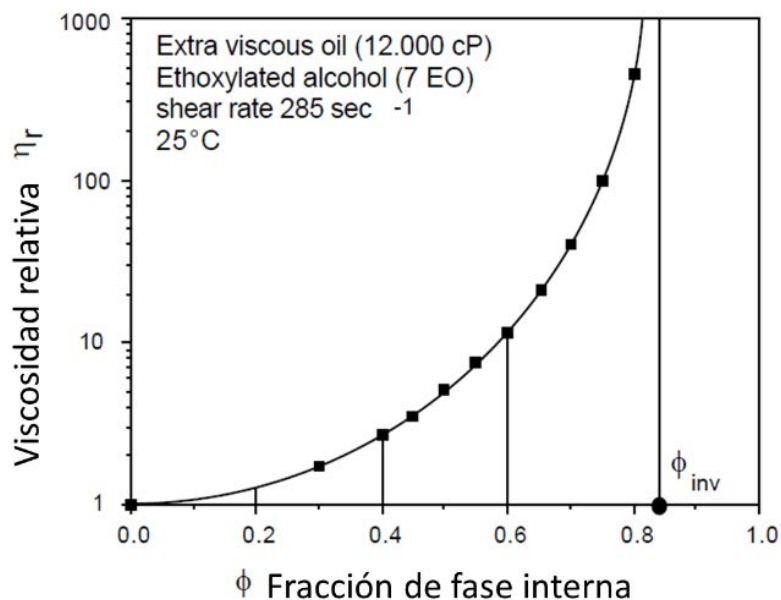


Figura 3.16. Variación típica de la viscosidad de una emulsión O / W frente a la cantidad de fase interna [63].

Es por ello que, al tratarse una emulsión de bajo contenido interno de fase oleosa, la viscosidad no debería presentar valores elevados.

- **Medición de pH al producto**

Además de la distribución de tamaño de gota, a esta formulación se le determinó el pH, resultando ser de 5 a 27 °C. Este pH es favorable, ya que la piel tiene un intervalo de pH 4 a 6 [42].

- **Morfología de la nanoemulsión**

Se determinó el tipo de la emulsión, esto es esencialmente equivalente para determinar la fase externa de la emulsión. La gota de la emulsión se colocó sobre agua y se observó de inmediato su rápida dispersión en el medio. Indicando que su fase externa está conformada por la fase acuosa, es decir, es una emulsión del tipo aceite en agua (O / W).

- **Medición de conductividad al producto**

La fracción de volumen de fase dispersa de una nanoemulsión se puede determinar midiendo su conductividad eléctrica, debido a las diferencias en la conductividad eléctrica de agua y aceite ^[66]. La nanoemulsión se puede medir usando una simple celda de conductividad, ya que esta técnica se puede usar con emulsiones ópticamente opacas sin la necesidad de ninguna preparación de muestra.

El resultado fue de 2,66 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 27, 3 °C (temperatura ambiente en el laboratorio). Este resultado es coherente, ya que se está midiendo la conductividad de la fase externa de la emulsión, la cual es agua con una cantidad disuelta de cloruro de sodio proveniente de la microemulsión empleada para elaborar la nanoemulsión.

- **Características del producto**

Debido a las características del producto, pocos ingredientes, fase externa agua, ligero y poco viscoso puede ser considerado un producto tipo suero, ya que presenta características de fácil absorción a la piel y componentes bioactivos.

Además de poseer el propilenglicol, el cual tiene la acción emoliente, es decir, suaviza y aumenta el grado de humedad en la piel, siendo ampliamente empleado en formulaciones humectantes. También puede verse como colaborador de formulación para reducir el tamaño de las gotas y la transparencia del producto-fórmula durante el proceso de homogeneización ^[37].

La incorporación del extracto polifenólico como ingrediente bioactivo, favorece la formulación, ya que adicionalmente a todas las propiedades antioxidantes mencionadas, es bien sabido que los polifenoles del cacao, presentan actividad antibacteriana de amplio espectro (Gram + y Gram - bacterias), así como propiedades antivirales ^[67] y anti fúngicas ^[68] Pudiéndose evitar la incorporación de conservantes en proporciones importantes.

Los agentes antimicrobianos comúnmente empleados, tienen como función prevenir la actividad microbiana, inhibiendo y destruyendo a los gérmenes, microbios y bacterias que deterioran o alteran la fase acuosa. El máximo permisible en

productos cosméticos es de 0,4 % ^[69]. Este producto podría ser sustituido por los polifenoles, los cuales se encuentran en la formulación en una concentración de 0,78 % v/v.

Adicionalmente, en una nanoemulsión aumenta la estabilidad de almacenamiento de catequinas fácilmente degradables y la encapsulación de moléculas bioactivas también contribuye a su permeación, mejorando significativamente los mecanismos de transporte pasivo a través de las membranas celulares ^[70].

El producto formulado posee diversas ventajas, a continuación, se mencionan algunas de ellas:

- ✓ Al disminuir la cantidad de ingredientes en la formulación se ve reflejado en los costos de la producción de manera positiva.
- ✓ Hay una mayor disponibilidad del ingrediente activo.
- ✓ Debido a que es un producto formulado para hacer pasaje transdérmico, una menor cantidad de ingredientes evitaría posibles reacciones o rechazo de la piel.
- ✓ Reduce la posibilidad de incompatibilidad con otros ingredientes.
- ✓ Es un producto base, sobre el cual se puede reformular, adicionando algún ingrediente adicional para obtener distintas aplicaciones.
- ✓ Al ser formulado con un solo tipo de surfactante (Tween 85) me permite modular las diferentes asociaciones anfífilas con adición de otro tipo de surfactante, con el cual exista compatibilidad. Esto permitiría variar el HLB de la formulación y con ello generar estructuras o asociación con una curvatura diferente.

3.4. CONCLUSIONES

- ✓ Se obtienen nanoemulsiones O/W y O/W/Polifenoles a través de la dilución de microemulsiones y/o cristales líquidos lamelares, conformados por Tween 85/Aceite mineral/Agua-NaCl/**etanol-propilenglicol** y Tween 85/Aceite mineral/Agua-NaCl/**sec-butanol/pentanol**.

- ✓ Los valores de distribución de diámetro de gotas, en las nanoemulsiones elaboradas a partir de microemulsiones/cristales líquidos conformadas por Tween 85/Aceite mineral/Agua-NaCl/**etanol-propilenglicol**, resultaron en un intervalo entre 22 y 71 nm, mientras que en las nanoemulsiones provenientes de los sistemas: Tween 85/Aceite mineral/Agua-NaCl/**sec-butanol/pentanol** presentaron un diámetro de gota entre 11 y 29 nm.
- ✓ Las nanoemulsiones O/W obtenidas de los sistemas ternario 1 y 2, mostraron una estabilidad en el tiempo superior a los 12 meses, tiempo en el cual no se observó separación de las fases o proceso de cremado. Viéndose afectadas las nanoemulsiones sólo por un aumento de temperatura, pero de manera reversible.
- ✓ Las nanoemulsiones O/W/Polifenoles obtenidas de los sistemas ternario 1 y 2, mostraron una estabilidad en el tiempo superior a los 6 meses. Estas a pesar de tener una apariencia poco translúcida, se obtuvieron tamaños de gotas pequeños, característicos de las nanoemulsiones.
- ✓ Los cosurfactantes empleados en las microemulsiones/cristales líquidos, afectan los tamaños de gotas de las nanoemulsiones O/W/Polifenoles, elaboradas por dilución de ME/cristales líquidos.
- ✓ Las nanoemulsiones O/W formuladas a través de microemulsiones/cristales líquidos, son una excelente forma de encapsular compuestos para distintas aplicaciones, donde se requiera transportar un compuesto activo a través de gotas de diámetros nanométricos.
- ✓ Se elaboró una nanoemulsión O/W/Polifenoles, como posible producto cosmético, con características similares a un producto tipo suero, con un diámetro de gota de 25 nm como moda, empleando pocos ingredientes.
- ✓ Las nanoemulsiones O/W/Polifenoles obtenidas independientes de su sistema de origen, podrían favorecer el pasaje transdérmico de los polifenoles ubicados en la interfase de la gota, a través de la barrera cutánea.

- ✓ Se sugiere que las moléculas de polifenoles, debido a su estructura anfipática y su actividad interfacial, sean incorporadas en la nanoemulsión, en la interfase de las gotas.
- ✓ Se sugiere que los grupos OH de la catequina, formen enlaces de hidrógeno en la interfase, con las moléculas de surfactante Tween 85, y los cosurfactante, A través de los grupos de óxido de etileno en la cabeza del surfactante, Y los grupos OH de los cosurfactantes.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mitsui T. "New Cosmetic Science". Editorial Elsevier. Primera edición. 1997 Introducción. Pag 3 -9. ISBN 978-0-444-82654-1.
2. Chiari-Andréo B., Almeida-Cincotto M., Taniguchi C., Chiavacci L., and Isaac V. "Nanoparticles for cosmetic use and its application," in *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, A. M. Grumezescu, 2019, 1st ed., Elsevier, 2019, ch. 5, pp. 113–146.
3. Lintner K., Mas-Chamberlin C., Mondon P., Peschard O., and Lamy L. "Cosmeceuticals and active ingredients," *Clinics in Dermatology*, 27: 461–468, 2009.
4. Draelos, ZD. La ciencia detrás del cuidado de la piel: humectantes. *Revista de dermatología cosmética*, 17: 138-144, 2018.
5. El-Aasser M., Lack C., Choi Y., Min T., Vanderhoff J., and Fowkes F. "Interfacial aspects of miniemulsions and miniemulsion polymers," *Colloids and Surfaces*, vol. 12, pp. 79–97, 1984.
6. D. Qi, Z. Cao, and U. Ziener, "Recent advances in the preparation of hybrid nanoparticles in miniemulsions," *Advances in Colloid and Interface Science*, 211: 47–62, 2014.

7. Manickam S., Sivakumar K., and Heng Pang C. "Investigations on the Generation of Oil-in-Water (O/W) Nanoemulsions through the Combination of Ultrasound and Microchannel," *Ultrasonics Sonochemistry*, 105258, 2020.
8. Forster T., Surfactants in cosmetics, in: M. Rieger, L. Rhein (Eds.), *Surfactant Science Series*, vol. 68, Marcel Dekker, New York, 1997, pp. 105–125. ISBN0824798058, 9780824798055.
9. Esquena J., Solans C. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 110: 235–239, 1998.
10. Solans C., Solé I. "Nano-emulsions: Formation by low-energy methods," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17: 246-254, 2012.
11. Anton N., Akram S., and Vandamme T. "Transitional Nanoemulsification Methods", in *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*, S. Jafari and D. McClements, 2018, 1st ed., academic Press, 2018, ch. 4, Chapter 4. Edited by: Seid Mahdi Jafari and David Julian McClements, pp. 77-110, 2018.
12. Taylor P. and Ottewill R. H. "The formation and ageing rates of oil-in-water miniemulsions," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 88: 303–316, 1994.
13. Taylor P. "Ostwald ripening in emulsions," *Advances in Colloid and Interface Science*, 75: 107–163, 1998.
14. Solans C., García- Celma M.J. "Microemulsiones y nano emulsiones para aplicaciones cosméticas," in *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*, K. Sakamoto, R. Lochhead, H. Maibach and Y. Yamashita, 2017, 1st ed., Elsevier, 2017, ch 29: 507–518, 2017.
15. Maphosa Y, Jideani VA. Factors affecting the stability of emulsions stabilised by biopolymers. In *Science and Technology Behind Nanoemulsions*, S. Karakus, 2018, 1st ed., London: Intech Open, ch. 5: 65-81, 2018.
16. Lopes L. "Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions," *Pharmaceutics*, 6: 52–77, 2014.

17. Faria-Silva A., Costa A., Ascenso A., Ribeiro H., Marto J., Gonçalves L., and Simões S. "Nanoemulsions for cosmetic products," in *Nanocosmetics Fundamentals, Applications and Toxicity*, A. Nanda, S. Nanda, T. Nguyen, S. Rajendran and Y. Slimani, 2020, 1st ed., Elsevier, ch. 4: 59–77, 2020.
18. Schulman J., Stoeckenius W., and Prince L. "Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy," *The Journal of Physical Chemistry*, 63: 1677–1680, 1959.
19. Anton N., and Vandamme T., "Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences," *Pharmaceutical Research*, 28: 978-85, 2011.
20. Nastiti C., Ponto T., Abd E., Grice J., Benson H., and Roberts M. "Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery," *Pharmaceutics*, 9: 1-25, 2017.
21. Broze G., "Handbook of Detergents - Part A: Properties," *Surfactant Science Series* vol. 82, ch. 8, pp. 253-302, Marcel Dekker, New York ,1999. ISBN:0-8247-1417-2.
22. Bouchemal K., Briançon S., Perrier E., and Fessi H. "Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization," *International Journal of Pharmaceutics*, 280: 241–251, 2004.
23. Solè I., Maestro A., González C., Solans C., Gutiérrez J. "Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system," *Langmuir*, 22: 326-332, 2006.
24. Yang Y., Marshall-Breton C., Leser M., Sher A., and McClements D., "Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods," *Food Hydrocolloids*, 29: 398-406, 2012.
25. Anton N., and Vandamme T., "The universality of low-energy nano-emulsification," *International Journal of Pharmaceutics*, 377: 142–147, 2009.
26. López-Montilla J., Herrera-Morales P., Pandey S., and Shah D., "Spontaneous Emulsification: Mechanisms, Physicochemical Aspects,

- Modeling, and Applications,” *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23: 219-268, 2002. DOI: 10.1080/01932690208984202.
27. Miller C. “Spontaneous Emulsification Produced by Diffusion — A Review,” *Colloids and Surfaces*, 29: 89–102, 1988.
 28. Solè I., Maestro A., González C., Solans C., and Gutiérrez J. “Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method,” *Journal of Colloid and Interface Science*, 327: 433–439, 2008.
 29. Pasquali R., Bregni C., Serrao C., “Rosa Características e identificación de los cristales líquidos liotrópicos,” *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37: 38-53, 2006.
 30. Morales D., Gutiérrez J., García-Celma M., and Solans Y., “A Study of the Relation between Bicontinuous Microemulsions and Oil/Water Nanoemulsion Formation,” *Langmuir*, 19: 7196–7200, 2003.
 31. A. Forgiarini, J. Esquena, C. González, and C. Solans, “Formation of Nanoemulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature,” *Langmuir*, 17: 2076–2083, 2001.
 32. Machado A., Lundberg D., Ribeiro A., Veiga F., Lindman B., Miguel M., and Olsson U., “Preparation of Calcium Alginate Nanoparticles Using Water-in-Oil (W/O) Nanoemulsions,” *Langmuir*, 28: 4131–4141, 2012.
 33. Sadurní N., Solans C., Azemar N., and García-Celma M., “Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26: 438–445, 2005.
 34. Ribeiro R., Barreto S., Ostrosky E., Da Rocha-Filho P., Veríssimo L., and Ferrari M., “Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficusindica* (L.) mill extract as moisturizing agent,” *Molecules*, 20: 2492–2509, 2015.
 35. Silva F., Ricci-Junior E., and Mansur C., “Nanoemulsions containing octyl methoxycinnamate and solid particles of TiO₂: preparation, characterization

- and in vitro evaluation of the solar protection factor,” *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39:1378–1388, 2013.
36. Samson S., Basri M., Masoumi H., Malek E., and Karjiban R. An artificial neural network based analysis of factors controlling particle size in a virgin coconut oil-based nanoemulsion system containing copper peptide, *Plos One*, 11:1-15, 2016.
 37. Sonnevile-Aubrun O., Yukuyama M., and Pizzino A., “Application of Nanoemulsions in Cosmetics”, in *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*, S. Jafari and D. McClements, 2018, 1st ed., Academic Press, ch. 14: 345-375, 2018.
 38. Tadros T. “Applied Surfactants: Principles and Applications” Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005. ISBN: 3-527-30629-3.
 39. Caballero V., Castillo J., Ranaudo M., Gutiérrez H., Estudio de la cinética de agregación de asfaltenos de crudos Furrial y cerro negro mediante dispersión de luz. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.*, 28: 49-55, 2013.
 40. Hirao T. *Cosmetic Science and Technology. Theoretical Principles and Applications— Structure and Function of Skin From a Cosmetic Aspect.*, 40: 673–683, 2017.
 41. Celleno L. *Nutritional Cosmetics: Beauty from Within: Structure and Function of the Skin.* Aaron Tabor and Robert M. Blair (eds.), © 2009; 1: 1-45 William Andrew Inc.
 42. Machado A., Lopes P., Raffier C., Haridass I., Roberts M., Grice J., and Leite-Silva V., “Skin Penetration,” in *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*, K. Sakamoto, R. Lochhead, H. Maibach and Y. Yamashita, 1st ed., ch 46: 741–755, 2017.
 43. Morrow D., McCarron P., Woolfson A., Donnelly R.. Innovative strategies for enhancing topical and transdermal drug delivery. *The Open Drug Delivery Journal*, 1: 36–59, 2007.

44. Silvera Arenas, Luz Alba; Barrios de Zurbarán, Carmen La matriz extracelular: El ecosistema de la célula Salud Uninorte, 16: 9-18, 2002.
45. Meisenberg G. y Simons W. Principios de Bioquímica médica. 4ta edición. 2018. Elsevier.
46. Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55: 1531–1546, 2003.
47. Ricard-Blum S. The Collagen Family. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3: a004978–a004978, 2010.
48. Scapagnini G., Davinelli S., Di Renzo L., De Lorenzo A., Olarte H., Micali G., Gonzalez S. Cocoa Bioactive Compounds: Significance and Potential for the Maintenance of Skin Health. *Nutrients*, 6: 3202–3213, 2014.
49. Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159, 1997.
50. Gasser P., Lati E., Peno-Mazzarino L., Bouzoud D., Allegaert L., & Bernaert H. Cocoa polyphenols and their influence on parameters involved in vivo skin restructuring. *International Journal of Cosmetic Science*, 30: 339–345, 2008.
51. Soto M., Falqué E., & Domínguez H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*, 2: 259–276, 2015.
52. Menaa F., Menaa A., & Tréton J. Polyphenols in Human Health and Disease. Polyphenols against Skin Aging, 819–830, 2014.
53. Nakano E., Kamei D., Murase R., Taki I., Karasawa K., Fukuhara K., & Iwai S. Anti-inflammatory effects of new catechin derivatives in a hapten-induced mouse contact dermatitis model. *European Journal of Pharmacology*, 845:40-47, 2018.
54. Lin Y.-H., Tsai M.-J., Fang Y.-P., Fu Y.-S., Huang Y.-B., & Wu P.-C. Microemulsion formulation design and evaluation for hydrophobic compound: Catechin topical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 121–128, 2018.

55. Harwansh R., Mukherjee P., Kar A., Bahadur S., Al-Dhabi N., & Duraipandiyan V. Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 160:318–329, 2016.
56. Madhan B., Krishnamoorthy G., Rao J., Nair B. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41:16–22, 2007.
57. Madhan B., Subramanian V., Raghava Rao J., Balachandran Unni Nair T. Ramasami. *Estabilización del colágeno mediante polifenol vegetal: papel de la catequina*, 37: 0–53, 2005.
58. Levin C., Maibach H. Exploration of "alternative" and "natural" drugs in dermatology, *Archives of dermatology*, 138: 207-211, 2002.
59. Pimentel-Moral S., Teixeira M., Fernandes A., Arráez-Román D., Martínez-Férez A., Segura-Carretero A., y Souto E. Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 260: 85-94, 2018.
60. Dantas L., Guerra M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. *Genetics and Molecular Biology*, 3: 94-98, 2010.
61. Solè I., Solans C., Maestro A., González C., and Gutiérrez J., "Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions," *Journal of Colloid and Interface Science*, 376:133–139, 2012.
62. Zhang Z., & McClements D. J. Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance. *Nanoemulsions*, 21–49, 2018.
63. Salager J., Emulsion Properties and Related Know-how to Attain Them. Chapter 3. Pharmaceutical Emulsions and Suspensions edited by Françoise Nielloud Gilberte Marti-Mestres. MARCEL DEKKER, INC. NEW YORK. Pp 73-125. 2000.
64. Reitzer F., Allais M., Ball V. and Meyer F. *Polifenoles en las interfaces*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 257:31-41, 2018.

65. Wooster T., Labbett D., Sanguansri P. y Andrews H. Impact of microemulsion inspired approaches on the formation and destabilisation mechanisms of triglyceride nanoemulsions. *Soft Matter*, 12:1425-1435, 2016.
66. Clausse D., Dielectric properties of emulsions and related systems. In: Becher, P. (Ed.), *Encyclopedia of Emulsion Technology: Vol. 1. Basic Theory*. Marcel Dekker, New York. 1983.
67. Liu S, Chen R, Hagedorn CH. Tannic Acid Inhibits Hepatitis C Virus Entry into Huh7.5 Cells. *PLoS ONE*; 10: e0131358, 2015.
68. Park J, Choi S, Moon H, Seo H, Kim J, Hong S-P, et al. Antimicrobial spray nanocoating of supramolecular Fe(III)-tannic acid metal-organic coordination complex: applications to shoe insoles and fruits. *Scientific Reports*, 7: art.6980, 2017.
69. Mujica V., Delgado M., Ramírez M., Velásquez I., Pérez C., Rodríguez-Corella M. Formulación de un producto cosmético con propiedades antiarrugas a partir del aceite de semilla de merey (*Anacardium Occidentale* L) *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela*, 25:2010
70. Donsì F. Capítulo 11. Aplicaciones de nanoemulsiones en alimentos. *Nanoemulsiones*, 349–377, 2018.

APENDICE

CAPITULO 1

Calculo de la desviación estándar para los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración empleada en el HPLC (concentración de (-)-epicatequina vs área), para la determinación de concentración de (-)-epicatequina en las muestras analizadas. Empleando el método de mínimos cuadrados

EC: (-)-epicatequina

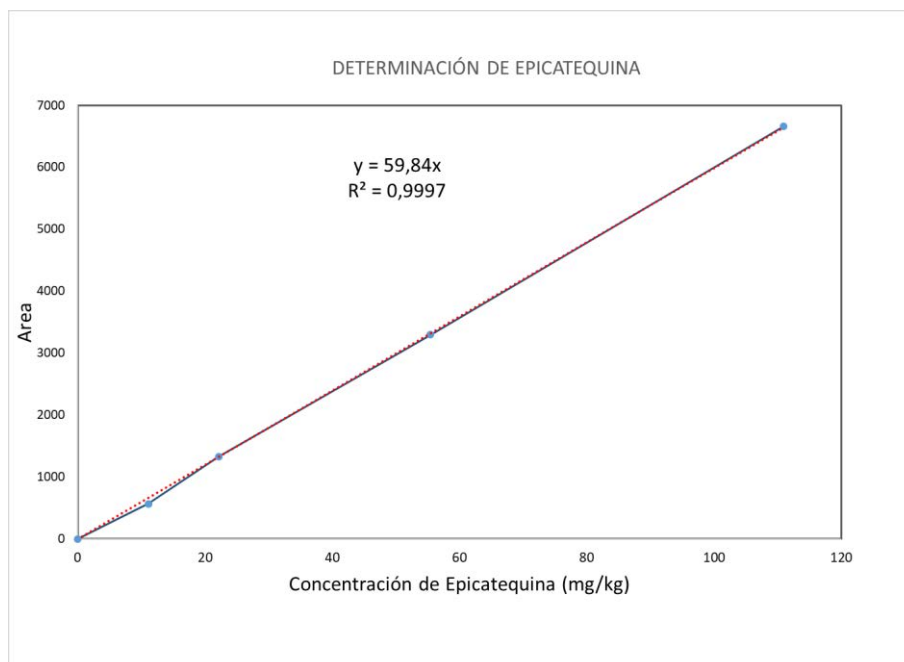


Figura A1. Curva de calibración para la determinación de (-)-epicatequina en extracto de cacao

$$S_{xx} = \sum xi^2 - \frac{\sum i^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum yi^2 - \frac{\sum yi^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum xiyi - \frac{\sum xi \sum yi}{N}$$

Siendo N el número de puntos utilizados.

La pendiente m se obtiene a partir de, $m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$

Desviación estándar alrededor de la regresión, S_r :

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N - 2}}$$

Finalmente, la desviación estándar para los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración

$$S_c = \frac{S_r}{m} \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 S_{xx}}}$$

Para la concentración de la muestra del extracto del cacao Canoabo

$$S_c = \frac{40,0133}{60,3180} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{5} + \frac{(1264,6508 - 2369,8142)^2}{(60,3180)^2 * 8018,8241}}$$

$$S_c = 0,6$$

Determinación del contenido de (-)-epicatequina en el extracto alcohólico para el cacao de las diferentes zonas en la 1era extracción

➤ Canoabo

Concentración: $211,3 \pm 0,6$ mg/kg

Densidad del extracto: $0,950 \pm 0,004$ g/mL

Volumen del extracto: $10,000 \pm 0,025$ mL

$$\frac{211,3 \text{ mg}}{\text{kg}} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} \times \frac{0,950 \text{ g}}{\text{mL}} \times 10,00 \text{ mL} = 2,0074 \text{ mg}$$

Desviación estándar

$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2}$$

$$\frac{S_y}{2,0074 \text{ mg}} = \sqrt{\left(\frac{0,6}{211,3}\right)^2 + \left(\frac{0,004}{0,950}\right)^2 + \left(\frac{0,025}{10,000}\right)^2} \quad S_y = 0,01 \text{ mg}$$

Determinación del contenido de (-)-epicatequina en el extracto alcohólico para el cacao Canoabo en la 2da extracción

El contenido de (-)-epicatequina en 10 mL del extracto alcohólico, de concentración **1.434,4 ± 0,6 mg EC/kg**, proveniente de una masa de 47,5871 ± 0,0001 g del cacao **Canoabo** en una segunda extracción es **13,6 ± 0,3 mg de EC**

Determinación del porcentaje en masa de (-)-epicatequina en la masa de cada una de las muestras de cacao

$$\% \text{ de EC} = \frac{\text{masa de EC g}}{\text{masa de cacao g}} * 100$$

Determinación del contenido de (-)-epicatequina en la muestra de cacao

Masa de (-)-epicatequina en el extracto: 13,6 mg

Masa de cacao: 47,5871 ± 0,0001g

$$\text{Contenido de EC} = \frac{\text{masa de EC g}}{\text{masa de cacao g}}$$

Contenido de EC = 0,3 ± 0,2 mg EC/g cacao

Determinación del porcentaje en masa de (-)-epicatequina en la masa del extracto de polifenoles del cacao Canoabo

Masa del extracto polifenólico, sin solvente: 3,4802 g

Masa de (-)-epicatequina en el extracto: 13,6 mg

$$\% \text{ de EC} = \frac{\text{masa de EC g}}{\text{masa de extracto g}} * 100$$

% de EC = 0,4%

Determinación del porcentaje en masa de polifenoles extraídos de cacao Canoabo

Canoabo (2da extracción): proveniente de una masa de $47,5871 \pm 0,0001$ g del cacao **Canoabo**

Masa del extracto polifenólico (EP), sin solvente: $3,4802 \pm 0,0001$ g

Masa de cacao: $47,5871 \pm 0,0001$ g

$$\% \text{ de Polifenoles} = \frac{\text{masa de EP g}}{\text{masa de extracto g}} * 100$$

$$\% \text{ de Polifenoles} = 7,31 \text{ g/g} \pm 0,03 \%$$

Determinación del porcentaje de polifenoles extraídos de cacao Canoabo en un volumen de extracción de 10 mL

$$\% \text{ de Polifenoles} = 21 \text{ g/mL} \pm 2 \%$$

Calculo de la desviación estándar para los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración empleada en el UV visible (concentración de (-)-epicatequina vs absorbancia), para la determinación de concentración de (-)-epicatequina en las muestras analizadas. Empleando el método de mínimos cuadrados, tal como se realizó con la curva de calibración para HPLC.

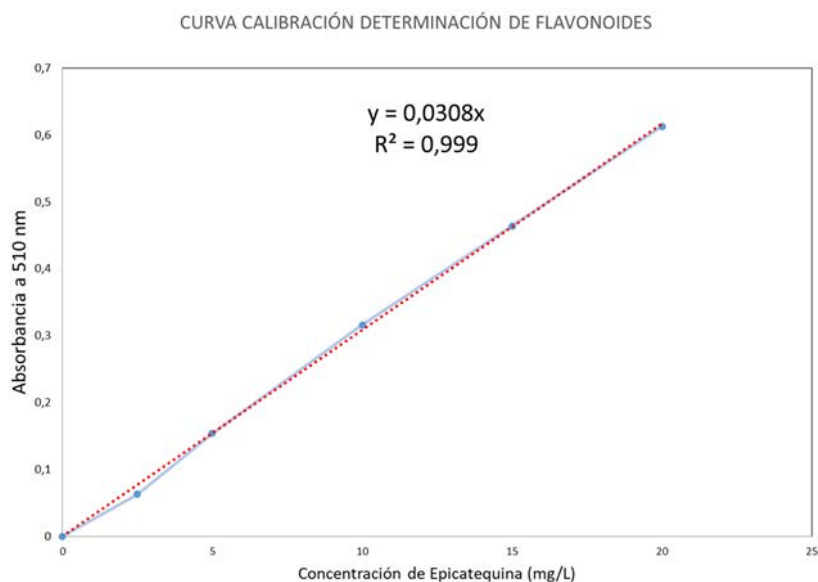


Figura A2. Curva de calibración para la determinación de flavonoides en extracto de cacao Canoabo

Para la concentración de la muestra del extracto del cacao Canoabo

$$Sc = 0,3$$

Por lo tanto, el contenido de flavonoides para la muestra de Canoabo es $7.792,2 \pm 0,3$ mg/L.

Determinación del porcentaje en masa de flavonoides extraídos de cacao Canoabo

En 10 mL hay $77,9 \pm 0,2$ mg de flavonoides del cacao **Canoabo**

Masa del extracto polifenólico (EP), sin solvente: $3,4802 \pm 0,0001$ g

$$\% \text{ de Flavonoides} = \frac{\text{masa de Flavonoides g}}{\text{masa de extracto g}} * 100$$

$$\% \text{ de Flavonoides} = 2 \% \text{ g/g}$$

APENDICE CAPITULO 3

Cantidad de extracto polifenólico (EP) necesaria para la elaboración de nanoemulsiones (NE) O/W/Polifenoles.

$$\% \text{ de Polifenoles} = 21 \text{ g/mL} \pm 2 \% \text{ en } 10 \text{ mL de extracto}$$

V de extracto polifenólico (EP) necesario para elaborar 5 mL de una nanoemulsión de 0,78 % de extracto polifenólico, partiendo de un extracto con una concentración de $21\% \pm 2\%$ polifenoles.

$$V = 0,18 \pm 0,02 \text{ mL}$$

Graficas construidas a partir de los valores obtenidos del equipo de dispersión dinámica de luz.

Nanoemulsiones O/W y O/W/Polifenoles, provenientes de los sistemas del ternario 1

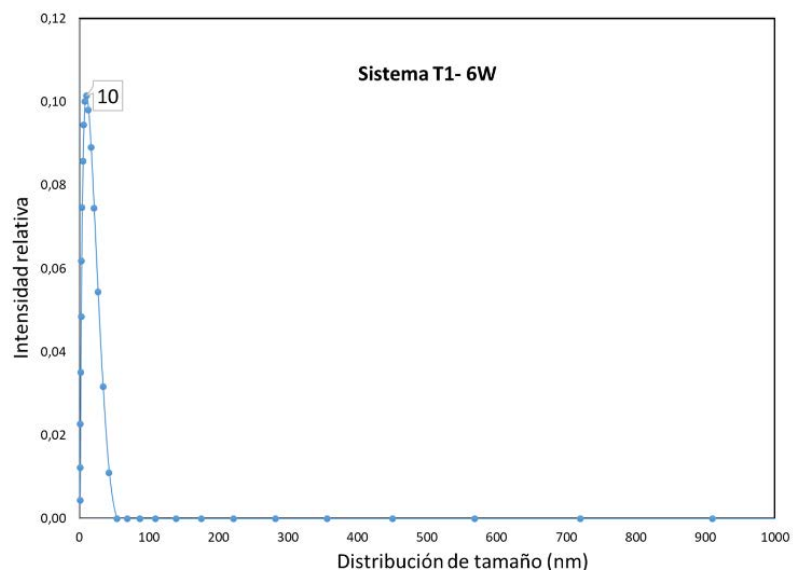


Figura A3. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 6 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

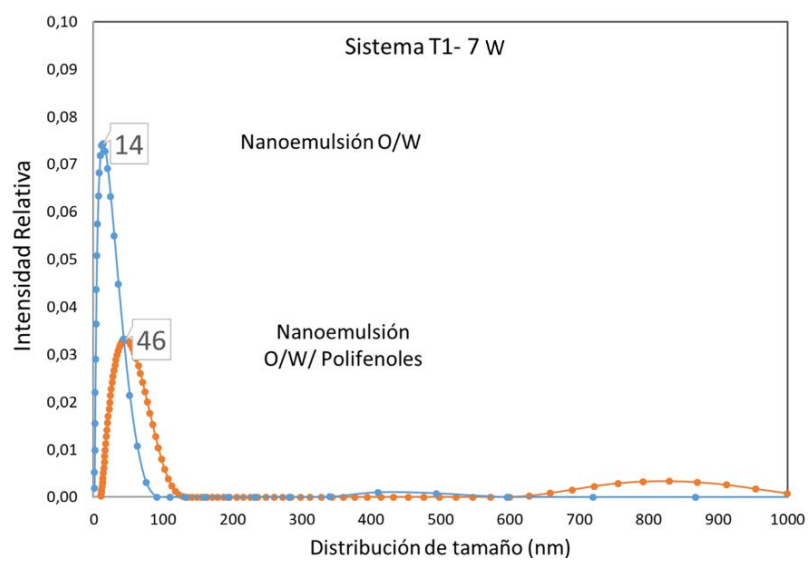


Figura A4. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 7 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

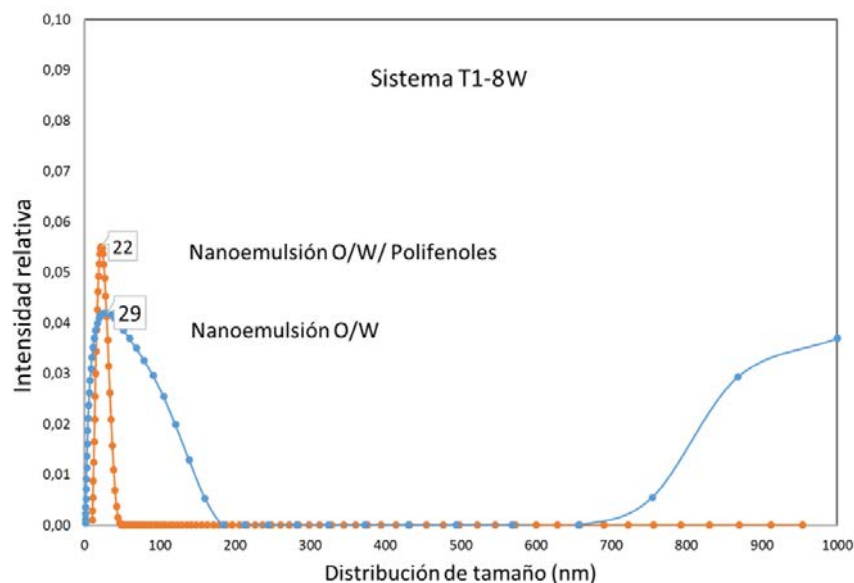


Figura A5. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 8 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

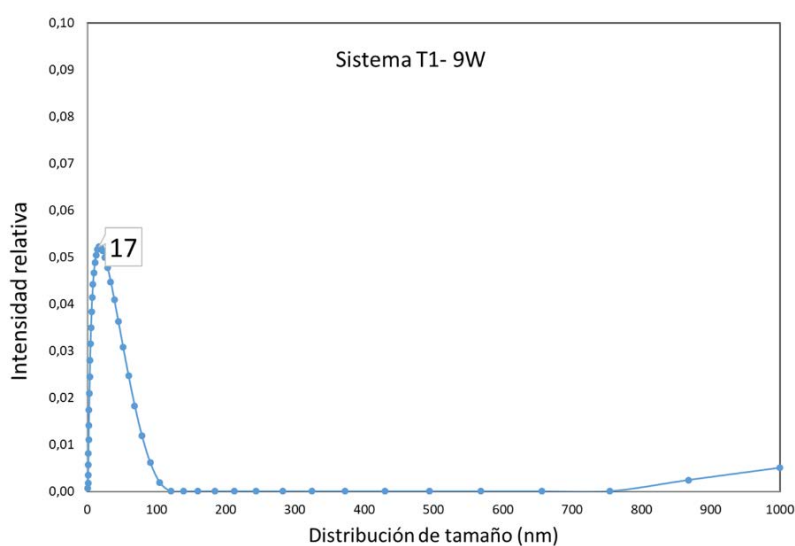


Figura A6. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 9 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

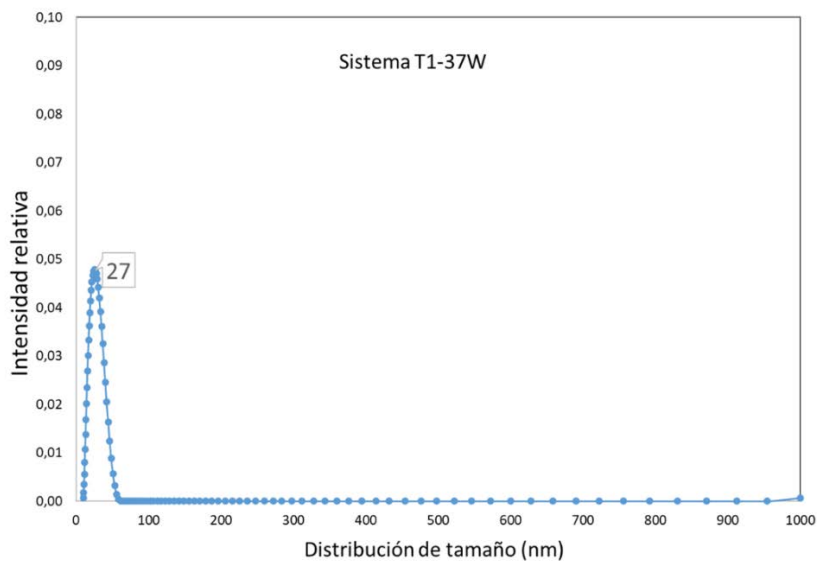


Figura A7. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 37 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

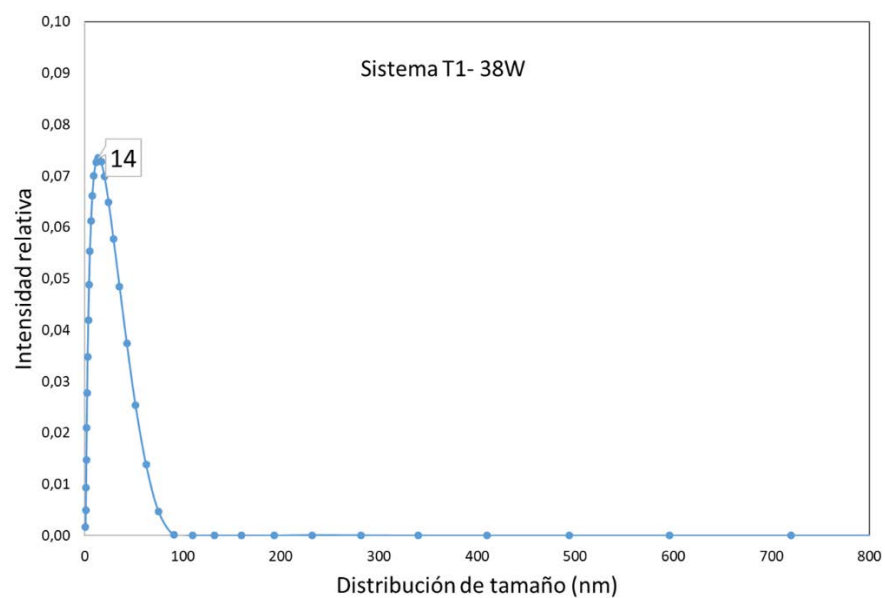


Figura A8. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 38 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

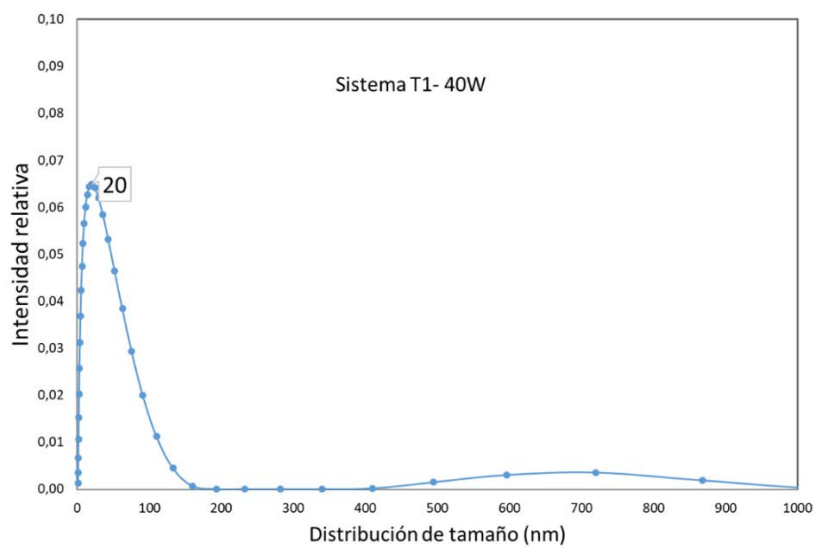


Figura A9. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 40 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

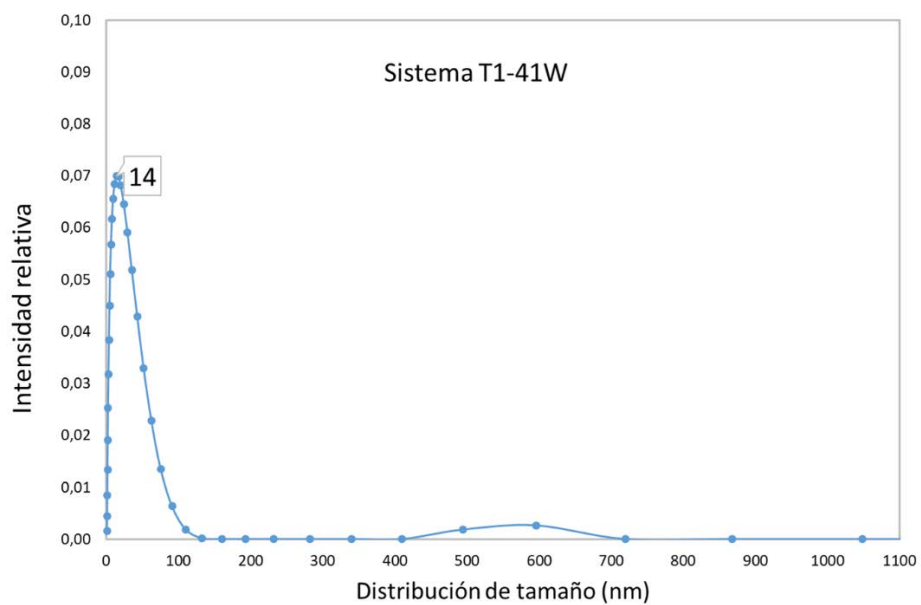


Figura A10. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 41 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

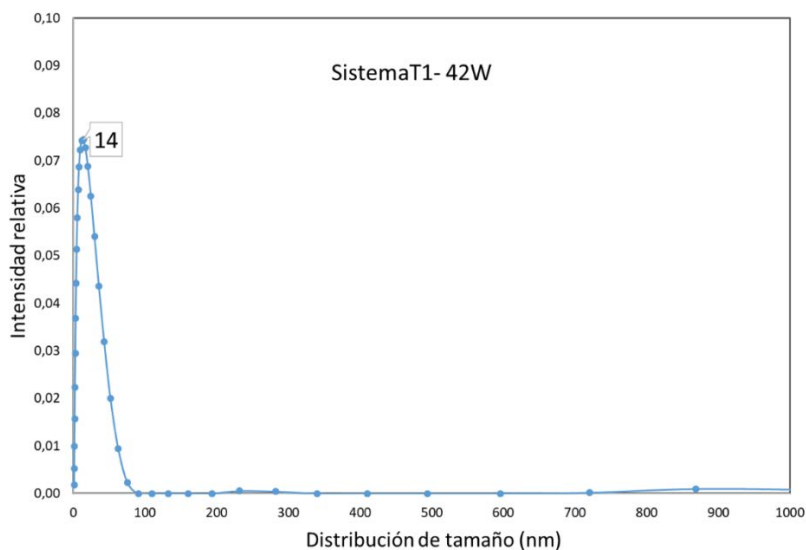


Figura A11. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 42 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

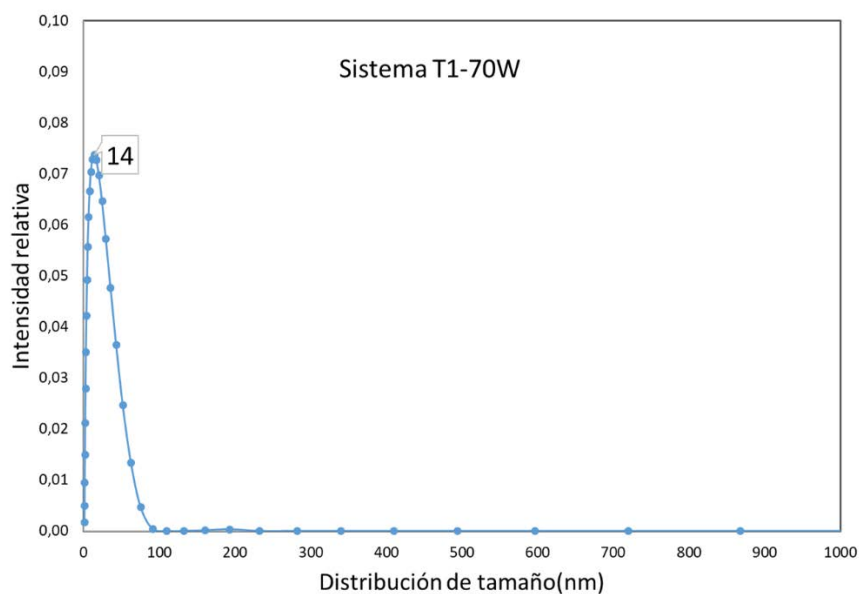


Figura A12. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 70 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

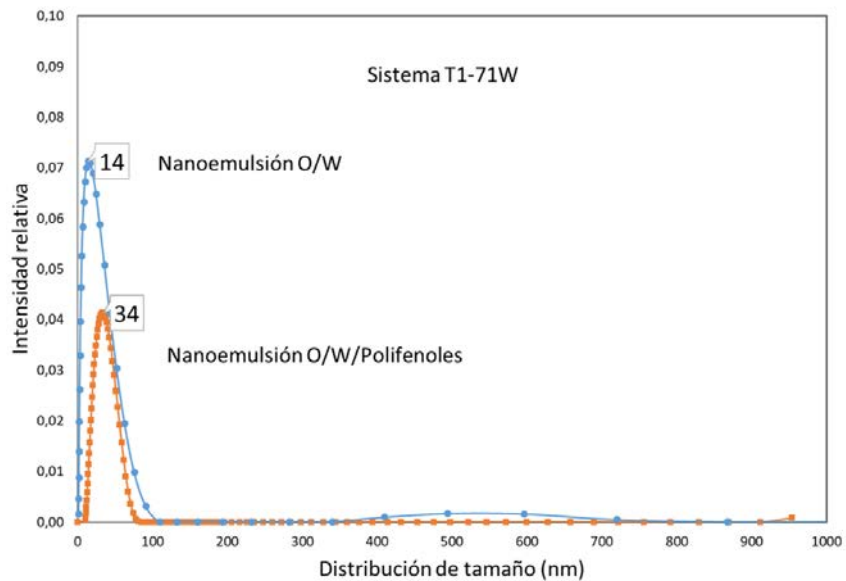


Figura A13. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 71 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

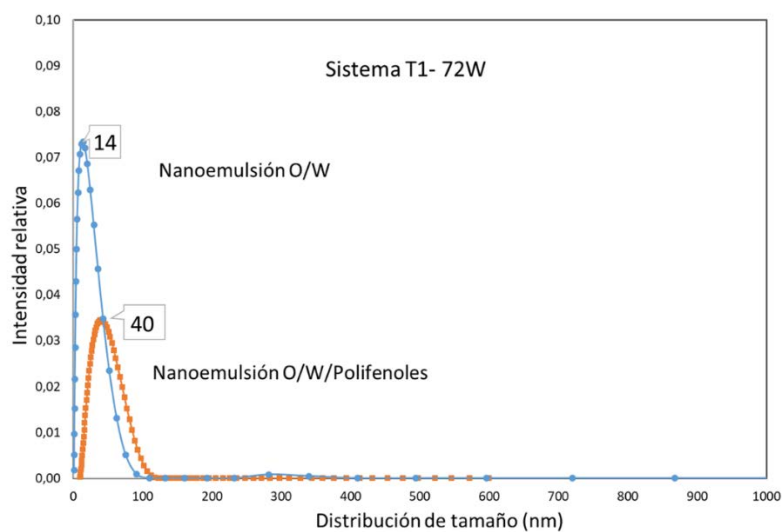


Figura A14. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 72 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

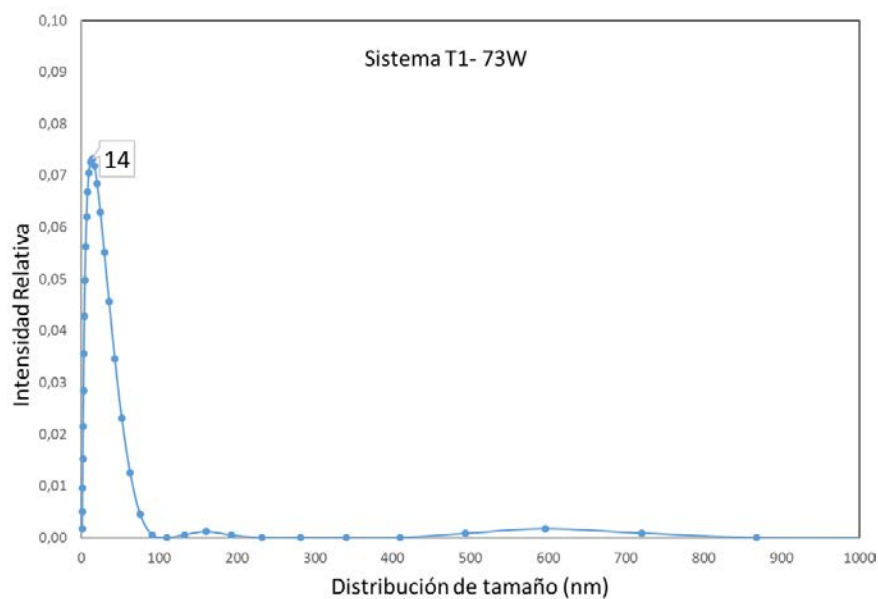


Figura A14. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 73 del ternario 1. Curva azul: nanoemulsión O/W.

Nanoemulsiones O/W y O/W/Polifenoles, provenientes de los sistemas del ternario 2

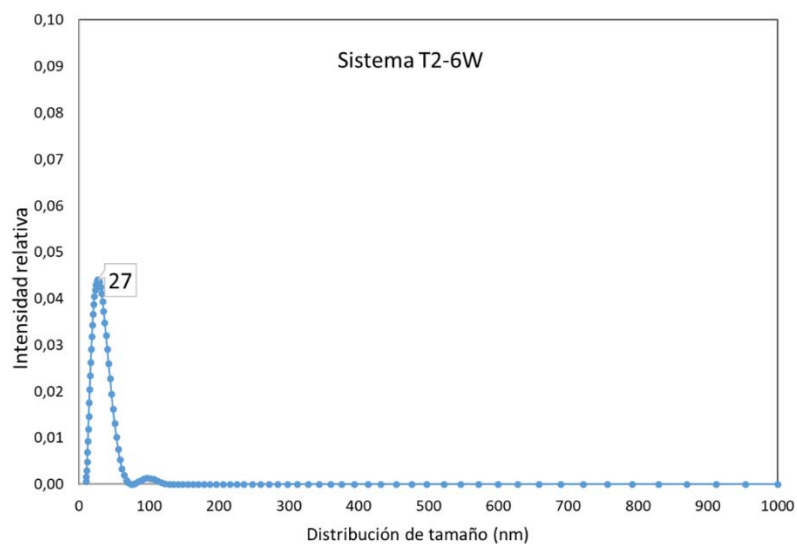


Figura A16. Gráfica de la curva de distribución de tamaño de gota para la nanoemulsión proveniente del sistema 6 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W.

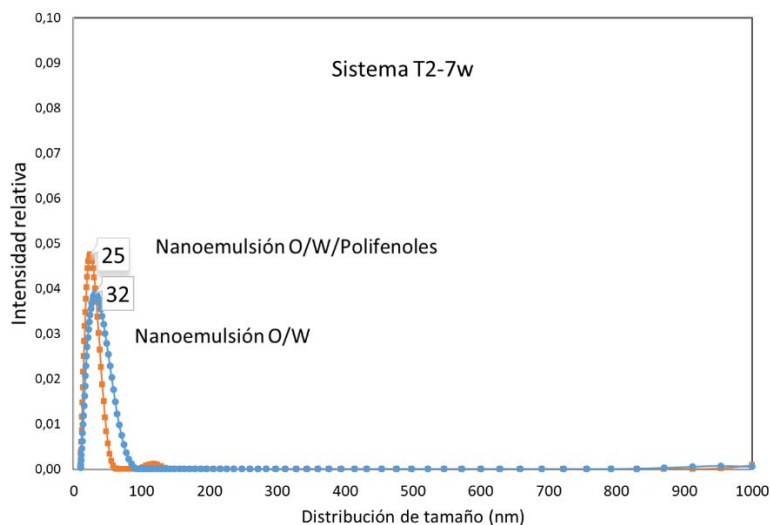


Figura A17. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 7 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

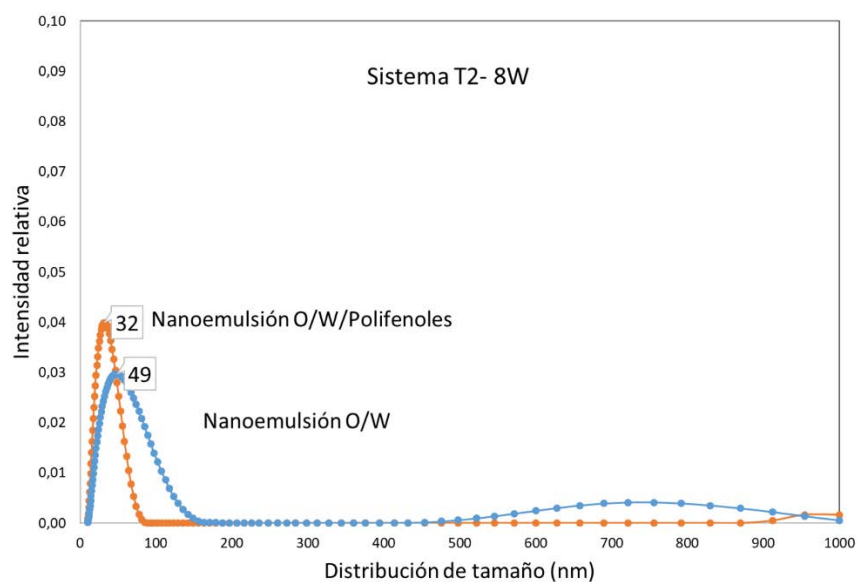


Figura A18. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 8 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

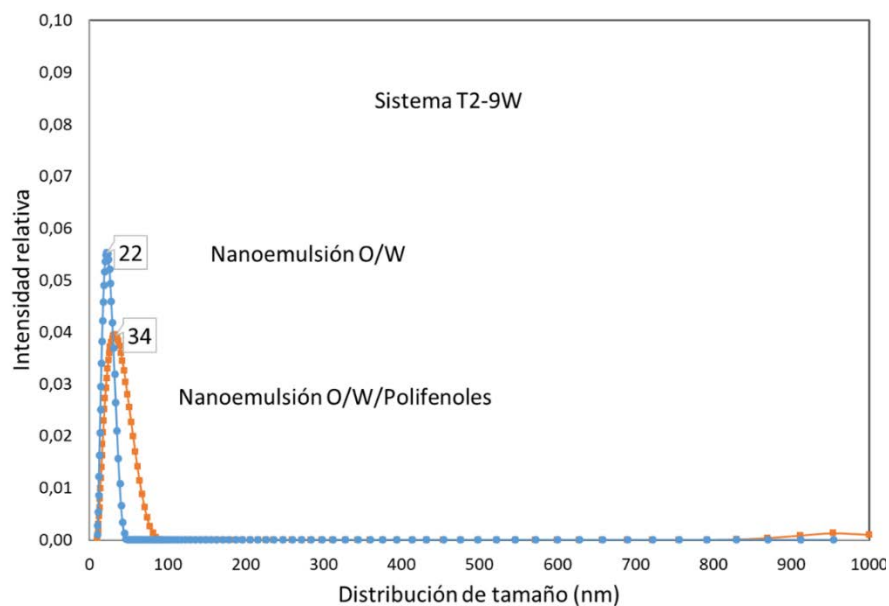


Figura A19. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 9 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

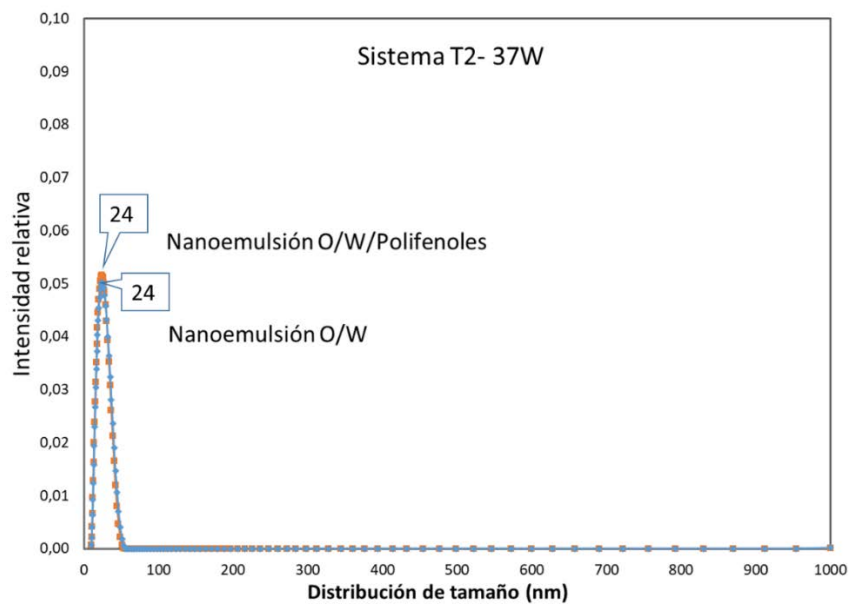


Figura A20. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 37 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

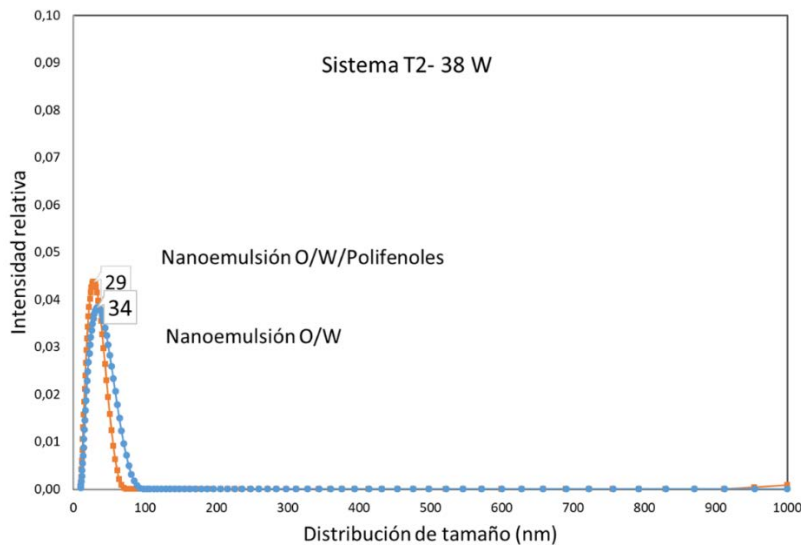


Figura A21. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 38 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

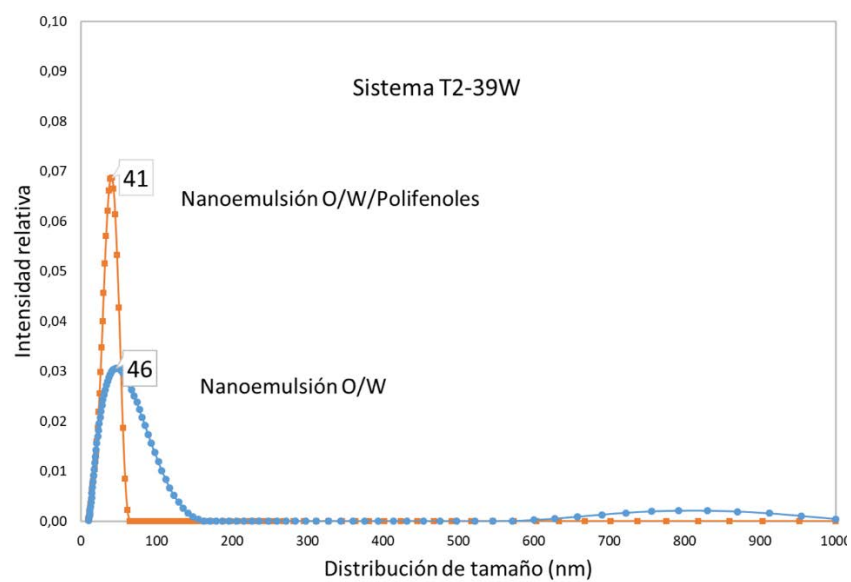


Figura A22. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 39 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

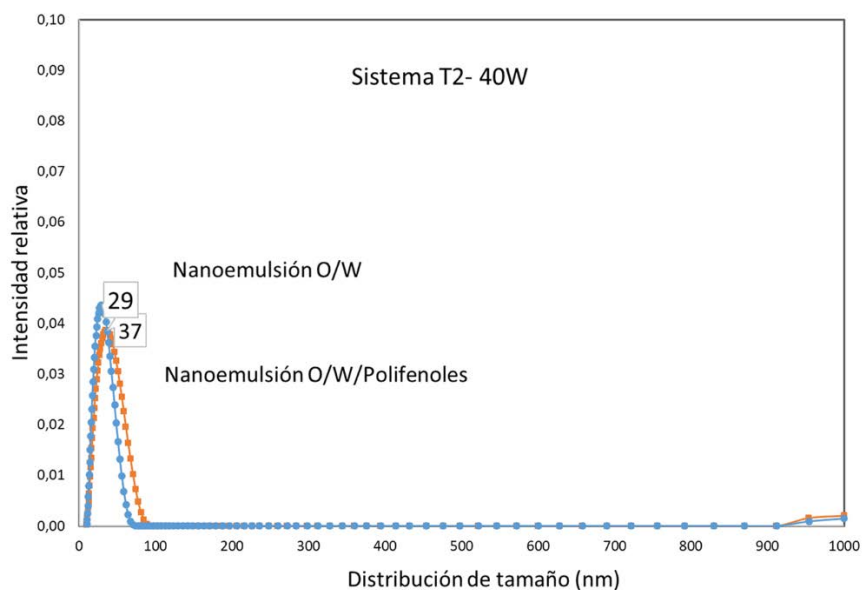


Figura A23. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 40 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

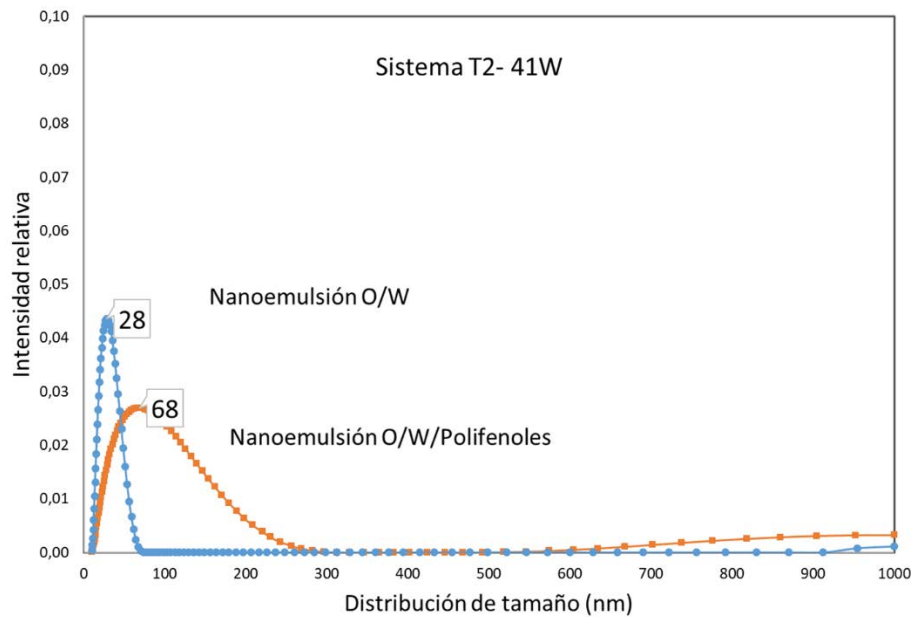


Figura A24. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 41 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

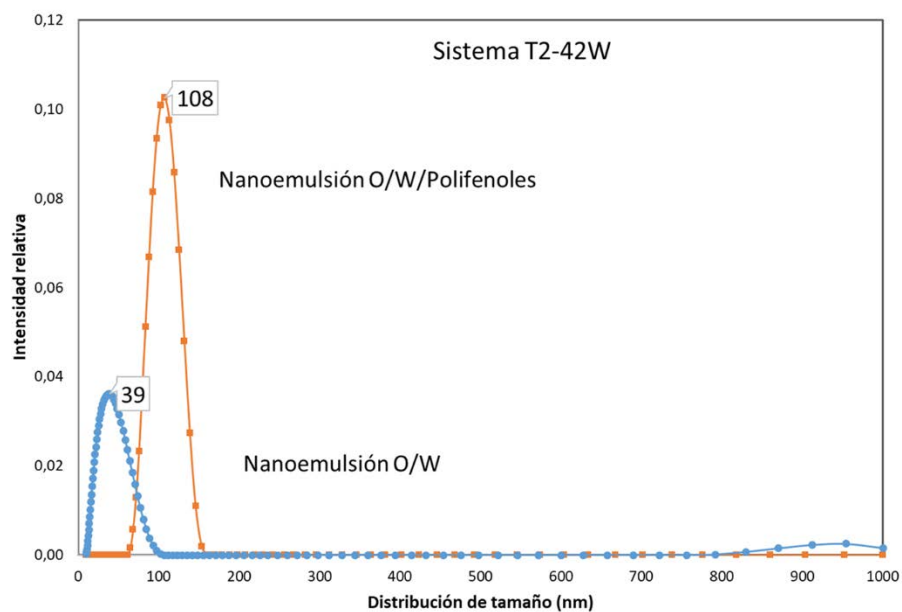


Figura A25. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 42 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

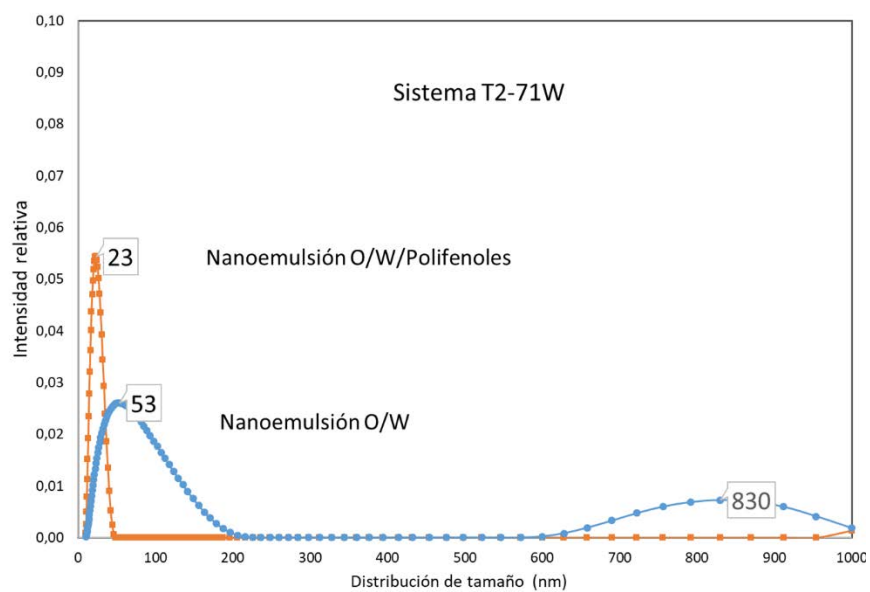


Figura A26. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 71 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

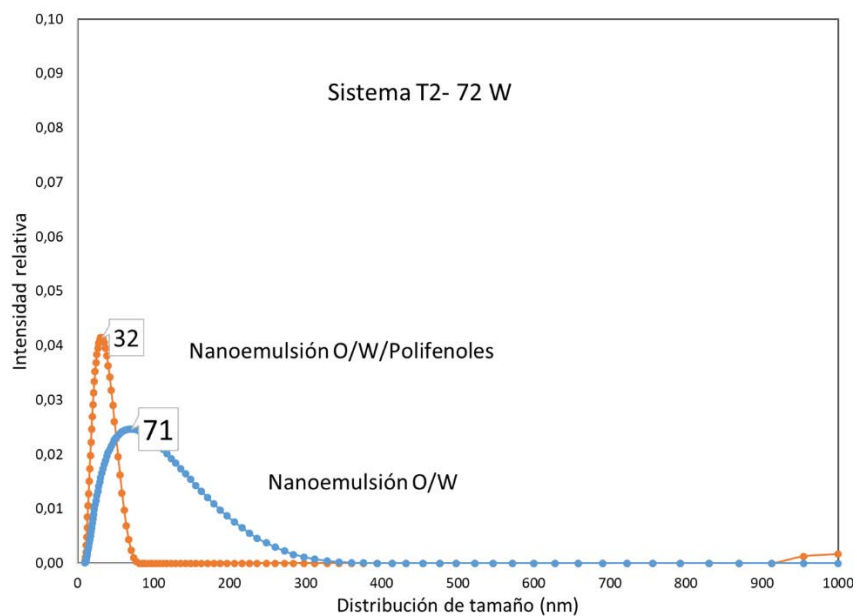


Figura A27. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 72 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.

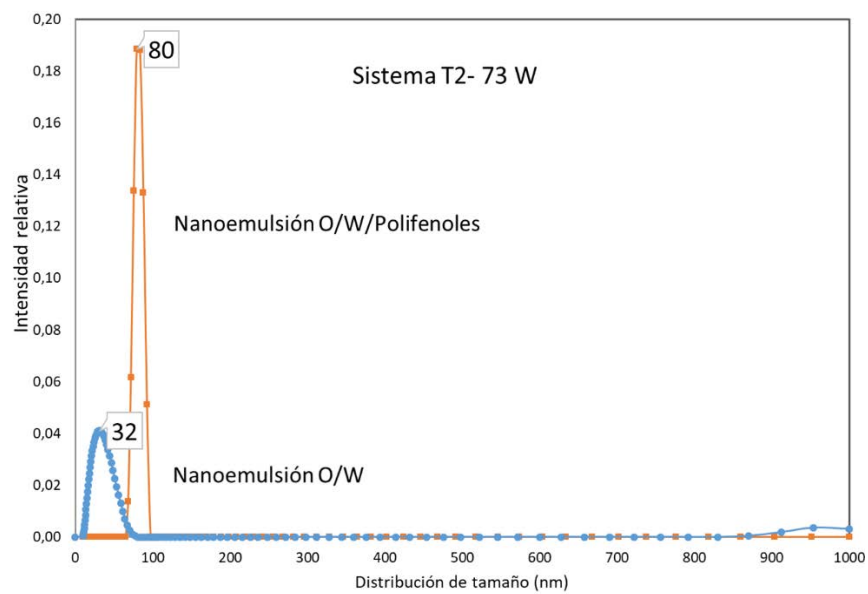


Figura A28. Gráficas de la curva de distribución de tamaño de gota para las nanoemulsiones provenientes del sistema 73 del ternario 2. Curva azul: nanoemulsión O/W, curva naranja: nanoemulsión O/W/Polifenoles.