

**ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE ANTOCIANINAS Y OTROS COMPUESTOS
FENÓLICOS DE MAÍZ MORADO DESDE EL INTERIOR DE UNA EMULSIÓN
DOBLE $W_1/O/W_2$ Y DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN**

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
Estudios con reconocimiento de validez oficial por
decreto presidencial del 3 de abril de 1981



**“ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE ANTOCIANINAS Y OTROS
COMPUESTOS FENÓLICOS DE MAÍZ MORADO DESDE EL
INTERIOR DE UNA EMULSIÓN DOBLE $W_1/O/W_2$
Y DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN”**

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta
I.Q. KAREN SHAINDEL ESTRADA ARIAS

Director
Dr. Jesús Alberto Quezada Gallo

Lectores
Dra. Ruth Pedroza Islas
Mta. Dora Luz Villagómez Zavala
Dr. Martín Rivera Toledo
Mto. Marco Polo Carballo Sánchez

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
HIPÓTESIS	7
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	8
1.1. ESTADO DEL ARTE	8
1.2. EMULSIONES SIMPLES Y DOBLES	9
1.2.1. Propiedades de las emulsiones	12
1.2.2. Mecanismos de inestabilidad	14
1.2.3. Transferencia de masa	17
1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y ANTOCIANINAS	19
1.3.1. Capacidad Antioxidante	20
1.3.2. Color y antocianinas	22
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
2.1. MATERIALES	25
2.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.	25
2.2.1 Método de extracción	25
2.2.2. Caracterización del extracto	26
2.3. FORMULACIÓN DE LAS EMULSIONES DOBLES	28
2.4. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE COMPUESTOS.....	30
2.5. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE GLOBAL DE DIFUSIÓN	30
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32

3.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	32
3.2. FORMULACIÓN DE LAS EMULSIONES DOBLES	37
3.3. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE COMPUESTOS.....	43
3.4. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN	49
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
APÉNDICES	64

Apéndice 1. Curvas patrón utilizadas en el análisis de extracción para la determinación de Fenoles Totales y capacidad antioxidante por el método FRAP. 64

Apéndice 2. Desarrollo de las ecuaciones para el modelado de la segunda ley de Fick. 66

Apéndice 3. Código utilizado para la determinación de coeficiente de difusión a partir de la primera ley de Fick..... 69

Apéndice 4. Código utilizado para la determinación de coeficiente de difusión a partir de la segunda ley de Fick. 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de las emulsiones dobles de acuerdo a la distribución y tamaño de gota interna.	9
Figura 1.2. Representación esquemática del procedimiento de emulsificación a dos pasos.	11
Figura 1.3. Representación esquemática de una emulsión monodispersa y polidispersa.	13
Figura 1.4. Mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples.	15
Figura 1.5. Representación esquemática de los mecanismos de inestabilidad de emulsiones dobles: coalescencia de las gotas externas (A), coalescencia de las gotas internas (B), coalescencia de las gotas internas con la interfase externa (C) y contracción (D) o hinchazón (E) de las gotas internas.	16
Figura 1.7. Estructura química de las principales antocianinas.	21
Figura 1.8. Representación esférica de los índices L^* , a^* y b^*	22
Figura 1.9. Ángulo de tono de tres soluciones variando de rojo ($h = 18^\circ$), anaranjado ($h = 38^\circ$) a púrpura ($h = 342^\circ$).	23
Figura 1.10. Relación del ángulo de tono y valor croma.	24
Figura 2.1. Medición del volumen de cremado en las emulsiones dobles.	29
Figura 3.1. Contenido de Antocianinas Totales y Fenoles Totales de los extractos del maíz morado de las pruebas de extracción.	34
Figura 3.2. Porcentaje de inhibición del reactivo DPPH de los extractos del maíz morado de las pruebas de extracción.	35
Figura 3.4. Variación en el diámetro $D(4,3)$ de las emulsiones dobles con W1: agua destilada.	39
Figura 3.5. Variación en el porcentaje de cremado de las emulsiones dobles con W1: agua destilada.	40
Figura 3.7. Variación en el porcentaje de cremado de las emulsiones dobles con W_1 : extracto de maíz morado.	42
Figura 3.8. Emulsión doble con W_1 : extracto de maíz morado, con 12.5% WPI a 600 rpm.	43

Figura 3.10. Incremento del factor C^* en la simulación de liberación extracto. ...	46
Figura 3.11. Liberación del extracto de maíz morado en la emulsión doble.	47
Figura 3.12. Distribución del tamaño de partícula y $D(4,3)$ (μm) de las emulsiones dobles en tres intervalos de tiempo.	48
Figura 3.13. Variación de la absorbancia del extracto en las fases acuosa y oleosa del sistema bifásico para la determinación del coeficiente de reparto.	50
Figura 3.14. Ajuste del modelo a los datos experimentales de la cinética de liberación en los primeros 9 días de análisis.	52
Figura A1. Curva patrón utilizada para la determinación de Fenoles Totales.	64
Figura A2. Curva patrón utilizada para la determinación de capacidad antioxidante con el método FRAP.	65

INTRODUCCIÓN

Las emulsiones múltiples agua/aceite/agua ($W_1/O/W_2$) son dispersiones complejas de glóbulos de aceite en una fase acuosa continua, en las que dichos glóbulos de aceite, a su vez, contienen diminutas gotas de agua (Benichou, et al., 2004). Pueden ser utilizadas para formar una microestructura de varios compartimientos que es capaz de estabilizar materiales activos en su interior protegiéndolos de condiciones ambientales adversas y pueden servir como sistemas de liberación de nutrientes (Dickinson, 2011), esto es crucial para controlar la difusión o la migración de la materia entre las fases acuosa interna y externa de la emulsión (Li, et al., 2011).

Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ han sido investigadas en el área de alimentos incluyendo la encapsulación de vitaminas/minerales (Benichou, et al., 2007; Bonnet, et al., 2009; O'Regan & Mulvihill, 2010); liberación de aroma y sabor (Malone, et al., 2003). También se ha buscado controlar sus características de estabilidad y liberación (Benichou, et al., 2004; Cornec, et al., 1998; Li, et al., 2011; Sapei, et al., 2012) .

En este trabajo se incorporó extracto de maíz morado, conteniendo antocianinas y otros compuestos fenólicos, en la fase acuosa interna de una emulsión doble $W_1/O/W_2$ estable en cuanto al mínimo porcentaje de formación de cremado y tamaño de partícula constante, la emulsión se formuló variando la velocidad de homogeneización secundaria y la concentración de la proteína de suero lácteo en la fase continua. Se midió la concentración del extracto a lo largo de 35 días y a partir de estos datos se determinó el coeficiente de difusión que ajustó mejor los valores del modelado de la primera y segunda ley de Fick a los valores experimentales de la cinética de liberación de antocianinas.

OBJETIVO GENERAL

Determinación del coeficiente de difusión a partir de la cinética de liberación de extracto de maíz morado contenido en la fase acuosa interna de una emulsión doble $W_1/O/W_2$.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selección del solvente, pH y método de extracción más eficientes para la extracción de antocianinas y otros compuestos fenólicos del maíz morado.
- Determinación de la velocidad de homogeneización secundaria y la concentración de proteína de suero lácteo en la fase continua que logre mayor estabilidad en una emulsión doble $W_1/O/W_2$.
- Determinación de la cinética de liberación del extracto de maíz morado en la emulsión doble.
- Determinación del coeficiente de difusión del extracto de maíz morado en la emulsión doble $W_1/O/W_2$ mediante el ajuste de los datos obtenidos en el modelado de la primera y segunda ley de Fick a los datos experimentales de la cinética de liberación.

HIPÓTESIS

Es posible formular una emulsión doble del tipo $W_1/O/W_2$ con liberación controlada de extracto de maíz morado cuya difusión a través de la membrana oleosa puede ser descrita por la primera y segunda ley de Fick.

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. ESTADO DEL ARTE

El interés de la aplicación de emulsiones dobles en el encapsulamiento de materiales activos como hormonas (Cole y Whateley, 1997), esteroides (Laugel, et al., 1998) y anticépticos (Tedajo, et al., 2005). Como resultado se formularon exitosamente emulsiones W/O/W aplicadas en la industria farmacéutica (Cole y Whateley, 1997, Laugel, et al., 1998, Hino, et al., 2000) y cosmética (Laugel, et al., 1998). Estas aplicaciones se deben a la capacidad de las emulsiones de atrapar compuestos hidrofílicos en el interior y a la protección contra la degradación de las sustancias encapsuladas (Tedajo, et al., 2005), en la industria alimenticia se ha encapsulado NaCl (Sapei, et al., 2012), vitaminas (Benichou, et al., 2004) y probióticos para protegerlos contra los jugos gástricos (Shima, et al., 2006). Otra de las razones por las que se considera a las emulsiones dobles W/O/W es la formulación de productos bajos en grasa (Dickinson, 2011).

La aplicación de las emulsiones múltiples se ve limitada por su inestabilidad termodinámica, especialmente a la fuerte tendencia de las gotas a coalescer (Florence y Whitehill 1985, Bonnet, et al., 2009), para mejorar la estabilidad y las características de liberación se han utilizado estabilizantes estéricos (Garti, Aserin y Cohen, 1994), complejos proteina-polisacárido en la fase continua (Benichou, Aserin y Garti, 2007), etc.

Las investigaciones más recientes se han enfocado al análisis y control de la liberación de NaCl (Sapei, et al., 2012) y otros compuestos (Bonnet, et al., 2009; Jiménez-Alvarado, et al., 2009).

1.2. EMULSIONES SIMPLES Y DOBLES

Una emulsión es un sistema que contiene dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales está dispersa en la otra, estas pueden ser agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W) (McClements, 2005). Las emulsiones múltiples más simples, a veces llamadas emulsiones dobles, son en realidad sistemas ternarios, teniendo estructuras agua-aceite-agua ($W_1/O/W_2$) o aceite-agua-aceite ($O_1/W/O_2$), en las que las gotas dispersas contienen a su vez gotas más pequeñas (Rosano, et al., 1998).

Las emulsiones dobles se clasifican como tipo A, B y C de acuerdo a la distribución y tamaño de la gota presentes dentro de la emulsión (ver Figura 1.1), las emulsiones de tipo A contienen una sola gota grande dentro de la fase interna, mientras que las del tipo B contienen algunas gotas en la fase interna y las del tipo C contienen una gran cantidad de gotas (Becher, 2001).

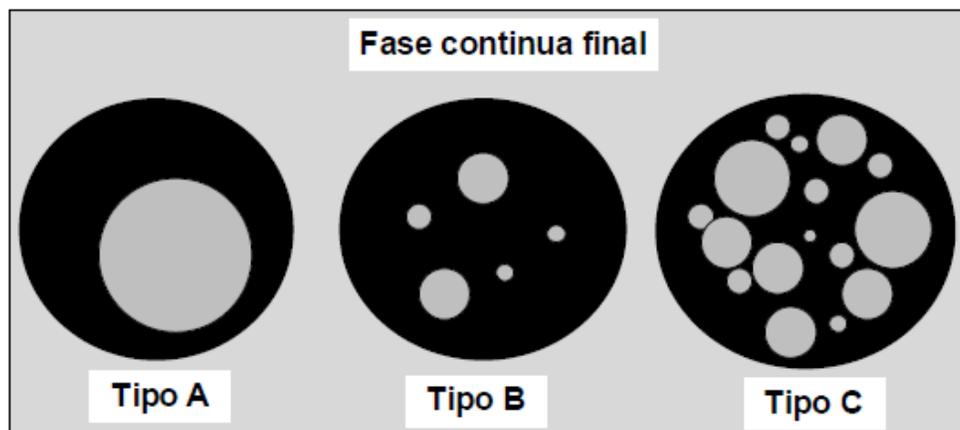


Figura 1.1. Clasificación de las emulsiones dobles de acuerdo a la distribución y tamaño de gota interna.

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles separados en una emulsión es conocido como homogeneización (McClements, 2005). Es posible formar una

emulsion homogeneizando aceite y agua puros, pero las dos fases usualmente se separan rápidamente, ya que el contacto entre las gotas de agua y aceite es termodinámicamente desfavorable. Para estabilizarlas se requieren agentes con acción de disminución de la tensión interfacial llamados tensoactivos o emulsificantes (Israelachvili, 1992). El término emulsificante es usado para referirse a aquellas moléculas que consisten de una cabeza hidrofílica, que tiene una alta afinidad por el agua, adjunta a una cola lipofílica, la cual tiene alta afinidad por el aceite (Myers, 1988). Idealmente, los emulsificantes tienden a absorberse rápidamente en la interfase de la emulsión durante la homogeneización, formando una capa protectora que previene que las gotas se acerquen unas a otras hasta agregarse (McClements, 2005).

La naturaleza anfótera de los emulsificantes puede ser expresada en términos de una escala empírica que comúnmente se denomina balance hidrofílico-lipofílico (HLB) (Griffin, 1946). El valor HLB puede variar en función del tipo de electrolito, temperatura y tipo de aceite (Aveyard, et al., 1986). Las emulsiones dobles contienen ambos tipos de emulsiones simples (W/O y O/W) y requieren que al menos dos emulsificantes estén presentes en el sistema, uno que tenga bajo valor de HLB para estabilizar la emulsión primaria (W/O), y otro de alto valor de HLB para estabilizar la emulsión secundaria (O/W) (Florence & Whitehill, 1985), la cantidad óptima de emulsificantes necesita ser determinada durante la formulación.

Las emulsiones dobles generalmente se preparan usando un método de emulsificación a dos pasos, procedimiento que se muestra en la Figura 1.2 (Opawale & Burgess, 1998).

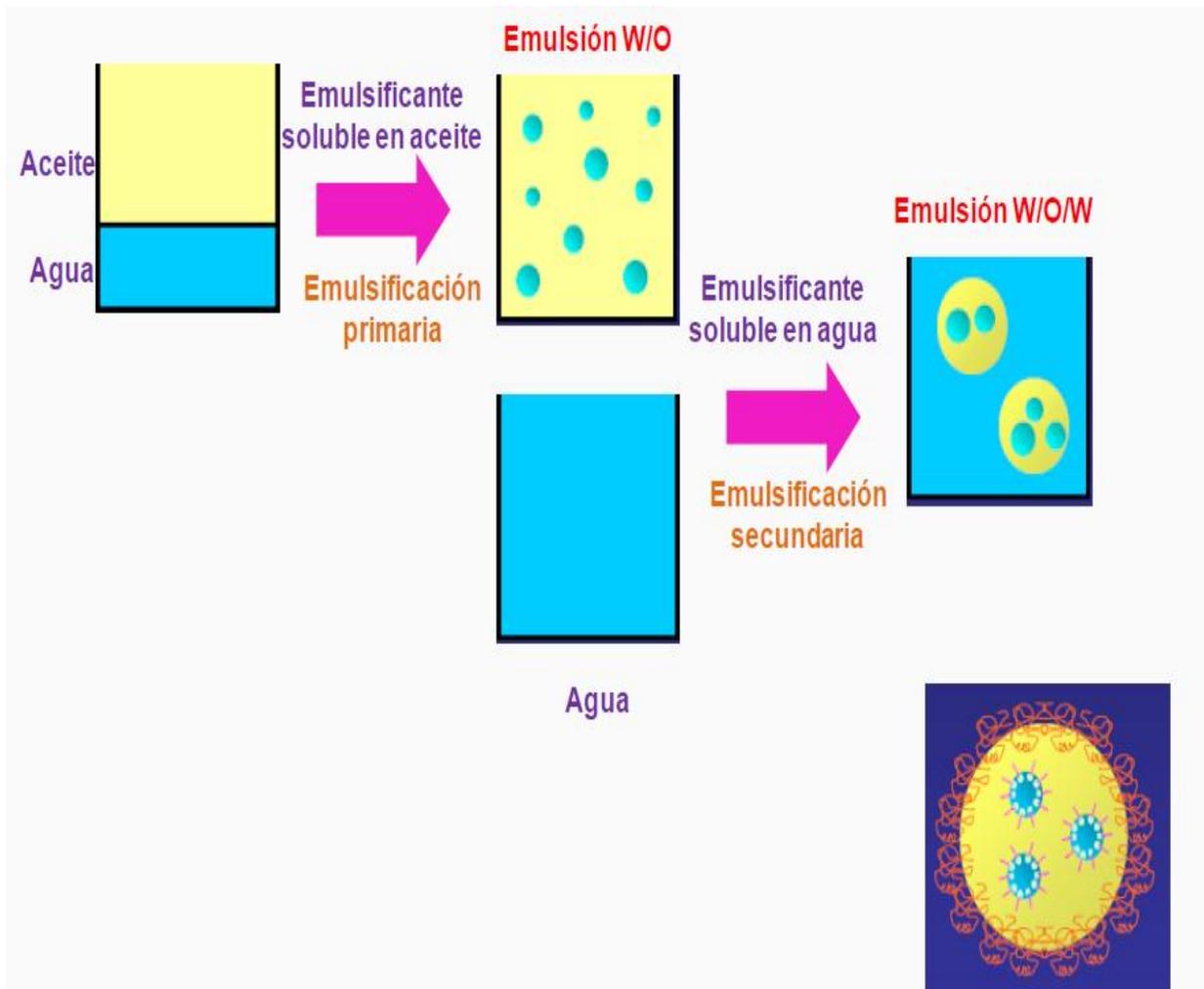


Figura 1.2. Representación esquemática del procedimiento de emulsificación a dos pasos.

Las emulsiones dobles tienen un número potencial de aplicaciones en diferentes campos como son: tratamiento de aguas residuales (Goldblatt, et al., 2006), industria farmacéutica (Zheng, et al., 1993), alimenticia (Dickinson, 2008), etc. porque ofrecen una diversidad de posibilidades para la liberación, retención, eliminación y/o protección de sustancias químicas atrapadas en el interior de los glóbulos de la emulsión (Martin, et al., 1993).

1.2.1. Propiedades de las emulsiones

Fracción volumen de la fase dispersa. La concentración de las gotas dispersas es usualmente descrita en términos de la fracción volumen de la fase dispersa (Φ), la que es igual al volumen de las gotas (V_D) dividido entre el volumen total de la emulsión (V_E): $\Phi = V_D/V_E$. A veces es más conveniente expresar la concentración de las gotas en términos de la fracción masa de la fase dispersa (Φ_m), que es igual al peso de las gotas dispersas (m_D) dividido entre la masa total de la emulsión (m_E): $\Phi_m = m_D/m_E$ (McClements, 2005).

Distribución de tamaño de partícula. Si todas las gotas en la emulsión son del mismo tamaño, se dice que la emulsión es monodispersa, pero si existe una amplia gama de tamaños de gota, entonces se dice que la emulsión es polidispersa como se muestra en la Figura 1.3 (McClements, 2005). El número de gotas en una emulsión es muy grande, y se considera que el tamaño de las gotas varía de forma continua desde un valor mínimo hasta un valor máximo (Walstra, 2003). Un método común para expresar el diámetro medio de partícula de una emulsión polidispersa es el D(4,3) que es el promedio de la relación volumen/área de la gota de todos los tamaños de gota (McClements, 2005).

Propiedades interfaciales. La interfase de las gotas consiste en una región estrecha (usualmente de espesor de pocos micrómetros) que rodea cada gota en la emulsión y contiene una mezcla de agua, aceite y emulsificantes (Hunter, 1989). La interfase juega el papel más importante determinando las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la emulsión. La composición y estructura de la región interfacial se determina por el tipo y concentración de los emulsificantes presentes en el sistema antes de la formación de la emulsión, así como por los eventos que ocurren durante y después de la formación, por ejemplo, el desplazamiento y la adsorción competitiva (McClements, 2005).

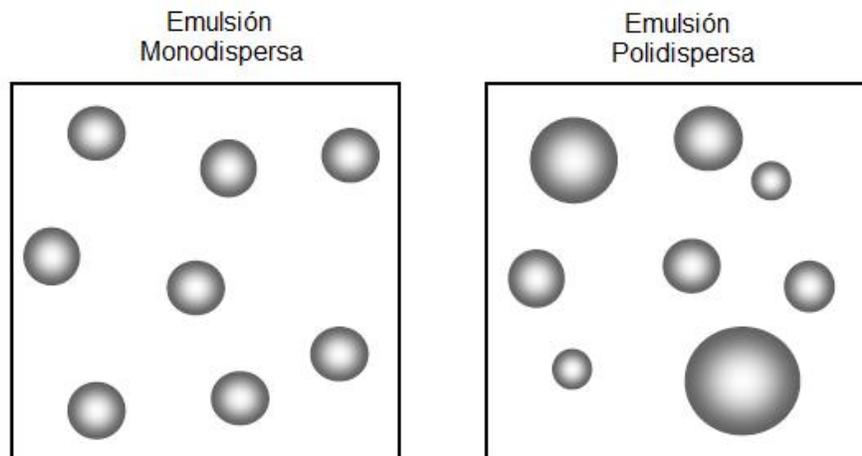


Figura 1.3. Representación esquemática de una emulsión monodispersa y polidispersa.

Carga de la gota. La mayoría de las propiedades de una emulsión están gobernadas por la magnitud y signo de la carga eléctrica de las gotas. El origen de esta carga está dado normalmente por la absorción de moléculas de emulsificante que son ionizables. La carga eléctrica de la gota puede ser caracterizada de diferentes formas, como la densidad de la carga superficial (σ) que es la carga eléctrica por unidad de área; el potencial eléctrico de superficie (ψ) y el potencial zeta (ζ) que es el potencial efectivo de una gota suspendida en un medio. Las interacciones electrostáticas entre las gotas de la emulsión y otras especies cargadas, como biopolímeros, vitaminas, antioxidantes, saborizantes, etc., pueden tener implicaciones en la calidad de la emulsión (McClements, 2005).

Interacciones entre las gotas. Hay diferentes tipos de interacciones que pueden operar en las emulsiones, estas interacciones varían en su signo (atractivas o repulsivas), magnitud (fuerte o débil) y rango (larga o corta). Cuando las fuerzas de atracción predominan, las gotas tienden a asociarse unas con otras, pero cuando las fuerzas de repulsión predominan las gotas tienden a estar separadas. La interacción entre gotas en la emulsión puede llevar a cambios en la estabilidad, reología, apariencia y sabor de la emulsión (McClements, 2005).

1.2.2. Mecanismos de inestabilidad

Aún después de su formación, las gotas en una emulsión se encuentran en constante movimiento y frecuentemente chocan unas con otras debido al movimiento Browniano, gravedad y otras fuerzas mecánicas. El movimiento continuo de las moléculas causa que las propiedades de la emulsión evolucionen con el tiempo y generen por lo tanto varios mecanismos de desestabilización. Hay una variedad de mecanismos fisicoquímicos que son responsables de la alteración de las propiedades de una emulsión y es necesario establecer cuál de estos mecanismos es importante en un sistema en particular (McClements, 2005).

Los mecanismos de inestabilidad más comunes se muestran en la Figura 1.4. El *cremado* y la *sedimentación* son formas de separación por gravedad. El cremado describe la elevación de las gotas debido a su baja densidad comparada con la densidad de la fase continua mientras que la sedimentación describe lo contrario, concentración de las gotas en la parte inferior debido a su alta densidad comparada con la densidad de la fase continua. La *floculación* y la *coalescencia* son fenómenos de agregación. La floculación ocurre cuando dos o más gotas se juntan para formar un agregado en el que cada gota conserva su integridad individual, mientras que la coalescencia es el proceso en el que dos o más gotas se fusionan formando una gota más grande, cuando el fenómeno de coalescencia perdura, eventualmente se puede formar una capa de aceite en la parte superior de la emulsión que se conoce como *separación de fases* (McClements, 2005).

La desestabilización de las emulsiones dobles puede llevar a diferentes caminos de rompimiento dependiendo de su composición y microestructura. Los mecanismos de inestabilidad más comunes en emulsiones dobles se muestran en la Figura 1.5.

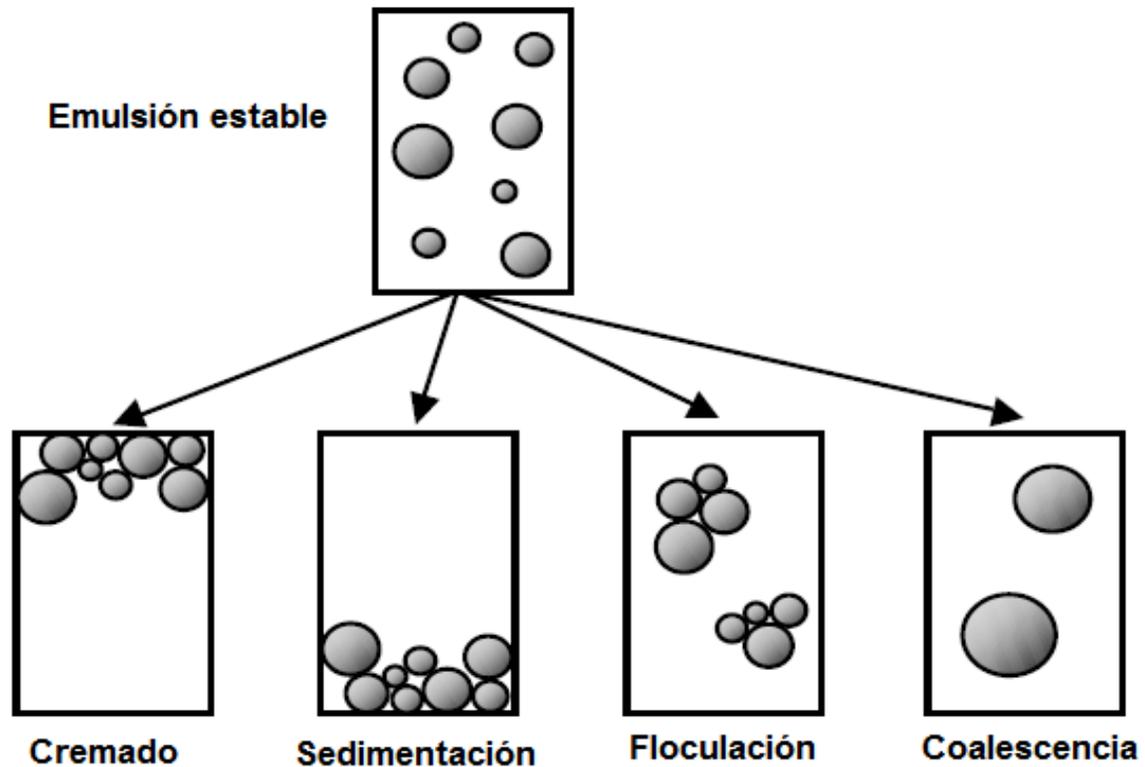


Figura 1.4. Mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples.

El mecanismo A implica coalescencia de las gotas externas y es análogo a la coalescencia normal en una emulsión simple, afecta únicamente la interfase externa y se refleja como crecimiento de las gotas externas. El mecanismo B es la coalescencia de las gotas internas sin generar cambios en la interfase ni tamaño de la gota externa. El mecanismo C es la coalescencia de las gotas internas con la interfase externa, generando transferencia de masa de la fase interna hacia la externa. La contracción o hinchamiento de las gotas internas derivado del intercambio difusivo de material entre la fase interna y la externa a través de la película líquida que se encuentra en el medio se representan en el mecanismo D y E respectivamente (Dickinson, 2011).

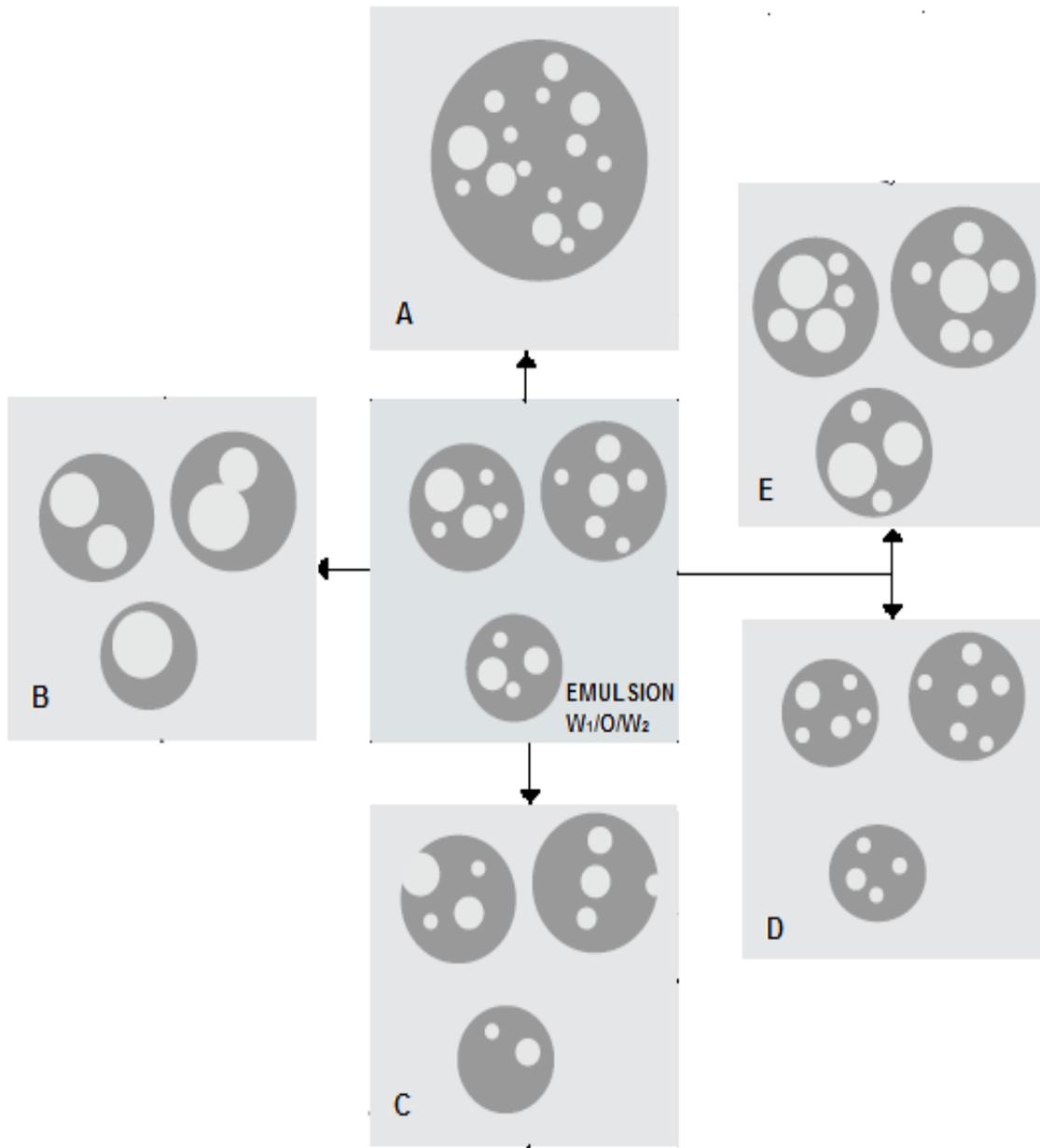


Figura 1.5. Representación esquemática de los mecanismos de inestabilidad de emulsiones dobles: coalescencia de las gotas externas (A), coalescencia de las gotas internas (B), coalescencia de las gotas internas con la interfase externa (C) y contracción (D) o hinchazón (E) de las gotas internas.

1.2.3. Transferencia de masa

Las emulsiones dobles del tipo $W_1/O/W_2$, no están vacías, generalmente se encuentra materia activa disuelta en la fase acuosa interna (Garti, et al., 1998), pueden utilizarse para el encapsulamiento y control de la liberación de ingredientes bioactivos. Sin embargo, este tipo de emulsiones son difíciles de preparar y controlar, los ingredientes bioactivos tienden a migrar a la fase acuosa externa debido al gradiente de presión osmótica, pasando a través de la fase oleosa. La primera ley de Fick describe el flujo de partículas en el proceso de difusión $J = -D \frac{dC}{dx}$. El flujo de masa a través de la membrana (fase oleosa) puede ser expresado de la siguiente manera (ver Figura 1.6):

$$J = DA \frac{C_{mi} - C_{me}}{\delta} = \frac{DAK}{\delta} (C_i - C_e) \quad (1)$$

Donde J denota el flujo de masa difundido en el tiempo. D es el coeficiente de difusión. A es el área superficial de la gota interna. C es la concentración del compuesto en cada fase, δ es el espesor de la membrana, los subíndices i , e y m se refieren a la fase interna y externa y membrana. K es el coeficiente de reparto del soluto en la interfase en relación a su fase acuosa y oleosa (Kim & Shah, 1990).

$$K = \frac{C_{mi}}{C_i} = \frac{C_{me}}{C_e} \quad (2)$$

La primera ley de Fick no considera el hecho de que el gradiente de concentración y la concentración en un punto determinado disminuye cuando el tiempo aumenta, aspecto importante en el proceso de difusión. Digamos que un flujo J_1 de partículas con un gradiente de concentración específico que entra por una sección de la esfera es diferente a un flujo J_2 de partículas que salen de la misma sección.

De la ley de la conservación de las masas, la diferencia entre los flujos J_1 y J_2 debe resultar en un cambio en la concentración de partículas dentro de la sección de la esfera. Esta es la segunda ley de Fick que dice que el cambio en la concentración de partículas con el tiempo es igual al cambio en el flujo de difusión local: $\frac{\partial C_t}{\partial t} = \frac{\partial J}{\partial r}$. Expresada para coordenadas esféricas:

$$\frac{\partial C_t}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D \frac{\partial C_t}{\partial r} \right) \quad (3)$$

Donde C_t es la concentración de compuesto en la fase continua, r es el radio de la gota externa y D es el coeficiente de difusión.

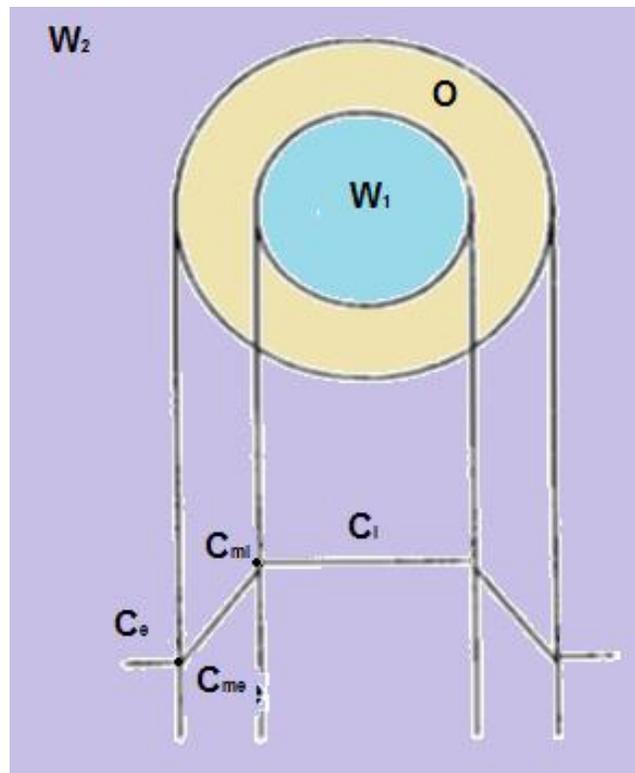


Figura 1.6. Representación esquemática de una emulsión doble W/O/W.

En investigaciones donde se analiza la liberación de NaCl desde el interior de una emulsión doble (Sapei, et al., 2012) y el hinchamiento de una emulsión gel (Thakur, 2012) se ha utilizado el modelo de volumen libre de Fujita (Fujita, 1952):

$$D = D_{eq} e^{\left(-\beta\left(1-\frac{C_t}{C_{eq}}\right)\right)} \quad (4)$$

Donde D_{eq} es el coeficiente de difusión en una emulsión doble en equilibrio, β es la relación entre las difusividades inicial y de equilibrio y C_{eq} es la concentración del compuesto en la fase continua de la emulsión en equilibrio.

1.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y ANTOCIANINAS

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas englobando más de 8000 compuestos distintos, son efectivos donadores de sus hidrógenos. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilo y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural.

Como antioxidantes los polifenoles, en especial los flavonoides, pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Martínez, et al., 2002; Scalbert, et al., 2005). Las antocianinas son flavonoides de origen vegetal que se caracterizan por tener un esqueleto carbonado del tipo C6-C3-C6, son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua en la naturaleza; contribuyen al atractivo color naranja, rojo, morado, violeta y azul de frutas, vegetales y flores (Jing & Giusti, 2005).

Se han identificado en forma natural más de 540 pigmentos antocianídicos (Anderson & Francis, 2004), aunque en la naturaleza hay 17 antocianidinas, seis

de ellas son las más diseminadas y las que comúnmente contribuyen en la coloración de la mayoría de las plantas y frutas: pelargonidina (Pg), cianidina (Cy), delphinidina (Df), peonidina (Pn), petunidina (Pt) y malvinidina (Mv) (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001)(ver Figura 1.7).

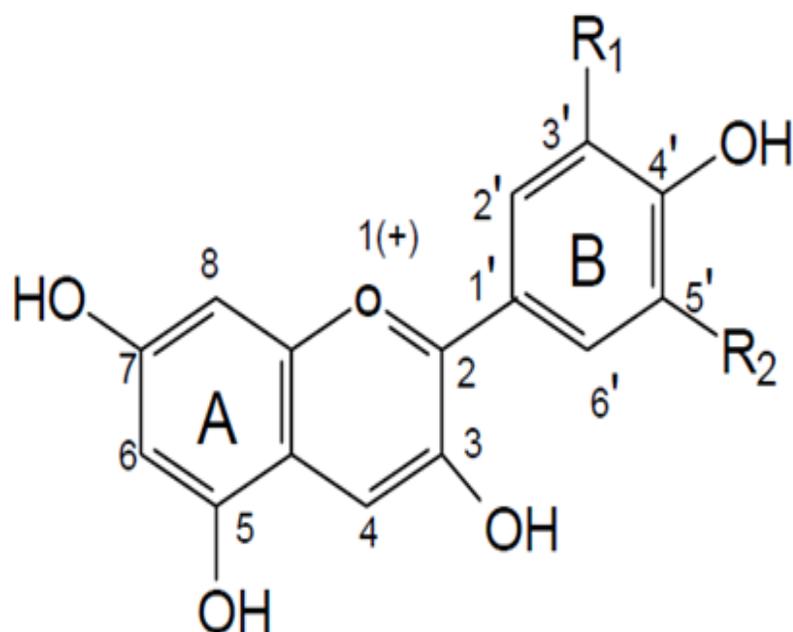
La presencia de antocianinas en las variedades pigmentadas del maíz, lo hace un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales. Por ello el estudio de los pigmentos del maíz morado ha despertado gran interés. El maíz morado es una variedad pigmentada del *Zea mays L.*, cuyos granos y coronta presentan color morado. Estudios han demostrado que las antocianinas provenientes del maíz morado inhiben la mutación celular, reducen mediante inducción química la carcinogénesis colorectal (Aoki, et al., 2004), y contribuyen a la prevención de la obesidad y la diabetes (Tsuda, et al., 2003).

1.3.1. Capacidad Antioxidante

Existe consenso en que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Bravo, 1998; Decker, 1997; Harborne, 1989). Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante ya sea *in vitro* o *in vivo* (Antolovich, et al., 2002). Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, la pérdida del color ocurre de forma proporcional a la concentración (Arena, et al., 2001; Moyer, et al., 2002).

Alternativamente diversos métodos como son el ABTS (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), DMPD (dimethyl-p-phenyldiamine), DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide) y FRAP (ferric reducing antioxidant power), son utilizados para determinar la capacidad antioxidante, los más usados son en DPPH y ABTS debido a su confiabilidad (Arnous, et al., 2002; Giusti & Wrolstad, 2001; Kim, et al., 2002; Re, et al., 1999;

Arnao, 2000; Antolovich, et al., 2002; Montoya, et al., 2003; Prior, et al., 1998; Prior & Cao, 1999)



Aglicona	Substitución		λ_{\max} (nm) espectro visible
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura 1.7. Estructura química de las principales antocianinas.

1.3.2. Color y antocianinas

Para investigar la calidad de color de manera sistemática es necesario medir el color objetivamente. Existen ya instrumentos especializados en la medición de color; su robustez, estabilidad, sensibilidad y facilidad de uso son factores en los que se ha tenido mucho avance en los últimos años (Wrolstad, et al., 2005).

La teoría de cromaticidad describe la forma en que tres luces separadas, roja, verde y azul, pueden igualar cualquier color visible (Ford & Roberts, 1998). Cuando los índices de color son derivados de mediciones con la escala CIE $L^*a^*b^*$ los instrumentos miden L^* , a^* y b^* . L^* marca la luminosidad. Valores positivos de a^* son la dirección del rojo y valores negativos dan la dirección del complemento verde. Valores positivos de b^* son el vector para el amarillo y negativos el azul (ver Figura 1.8).

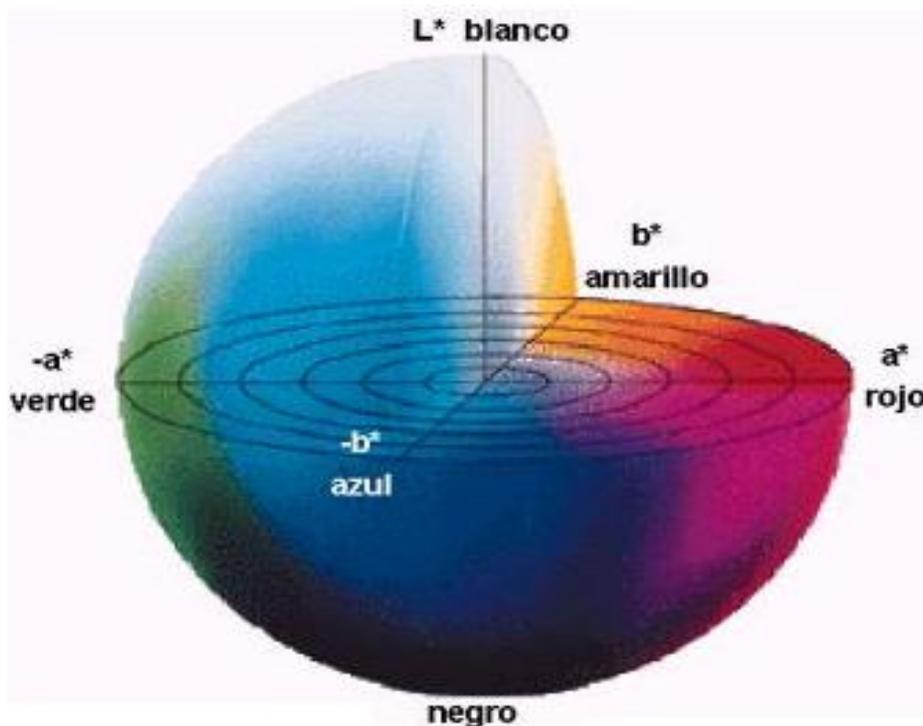


Figura 1.8. Representación esférica de los índices L^* , a^* y b^* .

Es una equivocación común utilizar a^* como medida del incremento de enrojecimiento o verdor de la muestra, así como b^* como el incremento de la intensidad de los colores amarillo y azul, por lo que es importante mencionar que muestras con idéntico valor a^* pueden exhibir colores que van desde el púrpura, rojo o naranja, en la Figura 1.9 se grafican tres muestras con valores idénticos de a^* y diferente valor b^* (Wrolstad, et al., 2005). Existen factores que relacionan a^* y b^* y que permiten el seguimiento adecuado de cambios de color en la muestra (Wrolstad, et al., 2005). El ángulo de tono h_{ab} y el valor croma C^* :

$$h_{ab} = \arctan \frac{b^*}{a^*} \quad (5)$$

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (6)$$

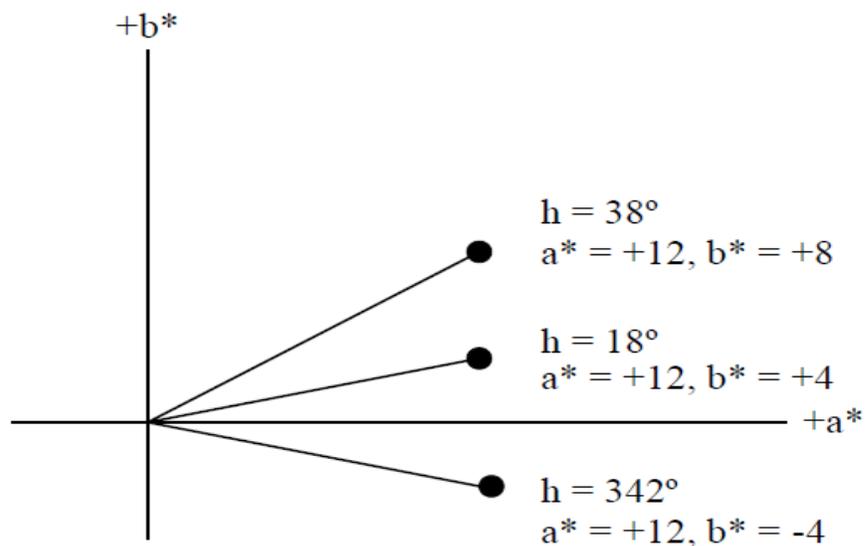


Figura 1.9. Ángulo de tono de tres soluciones variando de rojo ($h = 18^\circ$), naranjado ($h = 38^\circ$) a púrpura ($h = 342^\circ$).

El ángulo de tono permite distinguir a que familias de colores pertenece la muestra, un ángulo de tono de 0° representa una muestra rosa, de 90° una muestra amarilla, de 180° una muestra verde y de 270° una muestra azul. El valor croma se refiere a la intensidad o saturación del tono, por ejemplo, diluciones de

una muestra azul que van desde un azul más claro a uno más oscuro mostrarán el mismo ángulo de tono pero incrementarán su valor cromático. En la figura 1.10 se muestra la representación de esta relación (Wrolstad, et al., 2005).

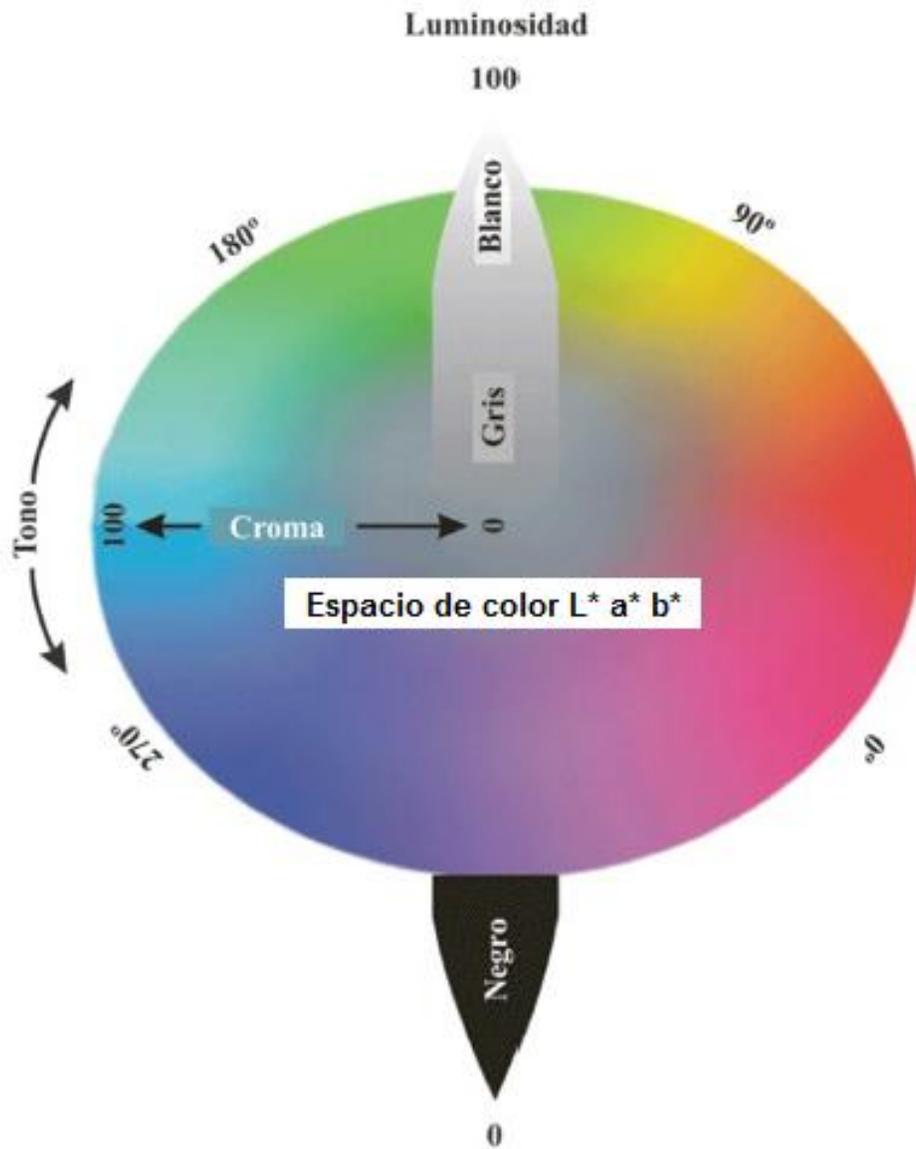


Figura 1.10. Relación del ángulo de tono y valor cromático.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES

Los solventes utilizados fueron metanol (MeOH, 99.8%, PQF) de Reactivos y Productos Químicos S.A. de C.V., México; y agua destilada. El ácido clorhídrico (HCl, 36.5-38%) y el acetato de sodio anhidro (CH₃COONa, 100%), fueron obtenidos de Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V., Estado de México, México. El ácido gálico (C₇H₆O₅), carbonato de sodio (CNa₂O₃, 99%), TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) y DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydracyl) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, USA. El ácido acético (C₂H₄O₂, 99.8%), fue obtenido de Productos Químicos Monterrey, S.A. de C.V. Monterrey, México.

El aceite vegetal puro de canola (Great Value, 99.005% aceite puro de canola, 0.005% TBHQ) fue obtenido de Nueva Wal-Mart de México, S. de R.L. de C.V. (Ciudad de México, México). El emulsificante soluble en agua (Panodan SDK, ésteres de monoglicéridos y diglicéridos de ácido diacetil tartárico) y el emulsificante soluble en aceite (Grindsted PGPR 90, ésteres de poliglicerol y ácidos grasos de poliricinato) obtenidos de Danisco México, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). La proteína aislada de suero lácteo (WPI; Bipro®) conteniendo 90% de proteína en base seca fue obtenida de Davisco Food International Inc. (Le Suer, MN, Estados Unidos).

2.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.

2.2.1 Método de extracción

Método por maceración. Se agregaron 5 g de maíz morado *Zea mays L.* molido (molino Poittemill modelo BLX/FPX), con tamaño de partícula resultante de 80 a 600 µm, a 100 mL del solvente previamente acidificado con HCl concentrado a pH 1, 2 y 3 (potenciómetro Conductronic modelo pH 120), y se mantuvo en agitación

por 50 minutos a 20°C. Los análisis se realizaron con ambos solventes: agua y metanol. El extracto se filtró tres veces con papel Whatman No.1, 4 y 43 (Whatman Schleicher & Schuell) y por último con una membrana de 0.22 micras (marca Millipore tipo Sterile MILLEX-HA Filter Unit).

Método por ultrasonido. Se agregaron 5 g de maíz molido a 100 mL del solvente (agua y metanol) previamente acidificado con HCl a pH 1, 2 y 3, y se colocó en el equipo de ultrasonido (Ultrasonic LC 30H de 50/60Hz) por 50 minutos a 40°C (Ya-Qin, et al., 2008). El extracto se filtró tres veces con papel Whatman No.1, 4 y 43 y por último con una membrana de 0.22 micras.

Se eliminó el solvente de los extractos obtenidos con metanol utilizando un rotavapor al vacío (Rotary Evaporator Hahn Shin HS-2001NS, Indonesia) a 40°C con arrastre de nitrógeno durante 2 horas. los compuestos obtenidos se recuperaron con agua destilada en la misma proporción del solvente evaporado.

2.2.2. Caracterización del extracto

Medición de Antocianinas Totales. Se utilizaron dos sistemas tampón para disolver los extractos de antocianinas: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1 (0.025 M) y ácido acético/acetato de sodio de pH 4.5 (0.4 M). A 0.3 mL de muestra se añadieron 2.7 mL de la correspondiente solución tampón y se midió la absorbancia a 510 y 700 nm (espectrofotómetro UV-Visible Varian serie Cary 50). Se calculó la absorbancia total a partir de:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 1} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH 4.5} \quad (7)$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se expresa en cianidina 3-glucósido.

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/100 g de maíz)} = \frac{A * PM * 100}{l * \epsilon} \quad (8)$$

Donde A es la absorbancia total. El PM el peso molecular (449.2 g/gmol), la ϵ es la absortividad molar (26900 cm⁻¹mol⁻¹), ambas de la cianidiana 3-glucósido y l es la longitud de paso de luz de la celda (1 cm) (Kuskoski, et al., 2005).

Medición de Fenoles Totales. El método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau (Singleton, et al., 1999) para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL de las muestras y se mezclaron con 2.4 mL de agua desionizada, 2 mL de una solución de carbonato de sodio al 2% (Na₂CO₃), y 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteau. Después de mantenerlos a temperatura ambiente por 60 minutos, se midió la absorbancia a 750 nm. El antioxidante de referencia (ácido gálico) se utilizó para obtener una curva patrón a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/100g de maíz en agua.

Capacidad antioxidante por el método FRAP (Tung-Sheng, et al., 2010). El reactivo FRAP fue preparado mezclando un buffer de acetato (246.1 mg de acetato de sodio en 10 mL de 10% (v/v) de ácido acético), solución de TPTZ (31.23 mg de TPTZ y 0.044 mL de HCl al 37% en 10 mL de agua destilada) y solución de FeCl₃ (54.06 mg de FeCl₃.6H₂O en 10 mL de agua destilada) en una relación de 10:1:1. El reactivo de FRAP (0.5 mL), agua destilada (0.05 mL) y 0.016 mL de la muestra se mezclaron en tubo de ensayo y fueron mantenidos a temperatura ambiente durante 4 minutos para después medir absorbancia a 594 nm. Los resultados se expresan en capacidad antioxidante equivalente al ácido gálico (CAEAG) (mg/100 g de maíz). El antioxidante de referencia (ácido gálico) se

utilizó para obtener una curva patrón a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/100g de maíz en agua.

Capacidad Antioxidante por el método DPPH (Kim, et al., 2002). A 3.9 mL del radical DPPH 50 μ M en metanol se le añadió 0.1 mL de la muestra, la mezcla se homogenizó cuidadosamente, y se mantuvo en oscuridad durante 60 min y se midió la absorbancia a 517 nm. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición (%I), se obtiene a partir de:

$$\%I = \frac{A_0 - A_m}{A_0} * 100 \quad (9)$$

Donde A_0 es la absorbancia antes de agregar la muestra y A_m es la absorbancia después de agregar la muestra. La concentración de DPPH en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibración. El antioxidante de referencia (ácido gálico) se utilizó para obtener una curva patrón a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/100g de maíz en agua.

2.3. FORMULACIÓN DE LAS EMULSIONES DOBLES

Las emulsiones dobles se prepararon utilizando el procedimiento de emulsificación a dos pasos. Se mezclaron 40 g de aceite vegetal, 6 g de emulsificante Grindsted PGPR 90 y 4 g de Panodan (relación total de emulsificantes ELS:EHS del 10% p/p en relación 6:4) (Jiménez-Alvarado, et al., 2009) a 20°C durante 24 horas. Se añadieron lentamente 50 mL de extracto a la mezcla de emulsificantes y aceite vegetal, homogeneizando a 4000 rpm durante la agregación, la velocidad se eleva a 7600 rpm durante 15 minutos (Murillo-Martínez, et al., 2010), esto se llevó a cabo en el homogeneizador Ultra Turrax (modelo T50 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania), formando así la emulsión primaria.

La emulsión secundaria se preparó agregando 20 mL de la emulsión primaria a 50 mL de solución de WPI (12.5, 15 y 17.5% p/p) homogeneizando a 360 y 600 rpm, durante 10 minutos en un homogeneizador de hélice (modelo RW 20.n, IKA Labortechnik, Malasia).

La estabilidad de las emulsiones múltiples se determinó monitoreando el tamaño de partícula a través del tiempo, durante un tiempo total de 220 horas, esto se llevó a cabo en el analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, Reino Unido). En paralelo, se colocaron muestras de la emulsión doble en probetas de 25 mL con el propósito de registrar el volumen de cremado observado (ver figura 2.1), esto en los mismos intervalos de tiempo en los que se determinó el tamaño de partícula, siendo el porcentaje de cremado:

$$\% \text{ Cremado} = \frac{\text{mL de cremado}}{25 \text{ mL totales}} * 100 \quad (10)$$

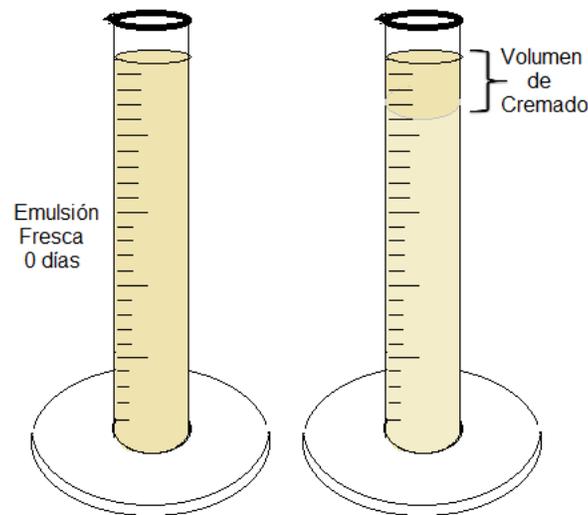


Figura 2.1. Medición del volumen de cremado en las emulsiones dobles.

2.4. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE COMPUESTOS

Las muestras se agitaron moderadamente y se midió el color a una alícuota de 5 mL (colorímetro CR400, Quality Control) utilizando la escala CIEL*a*b*. Este análisis se repitió durante 35 días. La fracción de extracto liberada se obtuvo usando una curva patrón en la que se simuló la liberación agregando 10, 20, 30 y 40 μL de extracto a la fase acuosa externa de una emulsión doble. Todas las emulsiones dobles se mantuvieron en almacenamiento a 4°C desde su preparación.

2.5. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE GLOBAL DE DIFUSIÓN

La determinación del coeficiente de difusión se llevó a cabo mediante el modelado de las ecuaciones (1 y (3. Se empleó la rutina ode15s (método de Gear para la integración numérica) en un algoritmo en Matlab (versión R2007b) que permitió resolver un sistema resultante de ecuaciones diferenciales ordinarias con valores iniciales. La ecuación diferencial parcial de la segunda ley de Fick (ecuación 3) fue previamente discretizada en la variable de la posición.

El coeficiente de reparto, necesario para el modelado de la primera ley de Fick, se obtuvo mediante la ecuación (2, para conocer las concentraciones en la fase interna e interfase se colocaron sistemas bifásicos en celdas de cristal en las que en la parte inferior se encontraba el extracto disuelto en agua y en la parte superior la mezcla de aceite con emulsificantes, se midió la absorbancia del extracto tanto en la fase acuosa (510 nm) como en la oleosa (524 nm) durante 6 horas.

En el modelado de la segunda ley de Fick se consideró la difusividad dependiente de la concentración (ecuación 4) y el efecto convectivo en la segunda condición de frontera, en la adimensionalización del sistema surge la relación de transferencia de masa por convección y la dada por difusión, el parámetro que relaciona estos

fenómenos es el número de *Sherwood*, Sh , (Welty, et al., 2004), el desarrollo de las ecuaciones se muestran en el Apéndice 2.

$$Sh = \frac{k_c R_{eq}}{D_{eq}} \quad (11)$$

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la caracterización de los extractos fueron expresados como media de tres repeticiones \pm la desviación estándar. Las correlaciones de los datos fueron obtenidas con Microsoft Office Excel en la opción de coeficiente estadístico de correlación. El análisis estadístico que se realizó fue un análisis de varianza (ANOVA) con tres factores (método de extracción, pH y solvente), considerando $P = 0.05$, utilizando el programa Design Expert DX6.

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

La Tabla 1 resume los resultados del análisis estadístico para la determinación del método, solvente y pH de extracción de antocianinas del maíz morado. El contenido de fenoles totales muestra significancia con los factores solvente y pH. En la Figura 3.1 se muestran las concentraciones de antocianinas totales (AT) y fenoles totales (FT), siendo los de mayor contenido (AT: 20.2167 ± 0.269 y FT: 127.3409 ± 3.2043 mg/100 g de maíz) los obtenidos con el método de ultrasonido y metanol a pH 2. Los valores reportados en este trabajo concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones: AT = 20.373 a 23.666 mg/100g (Gorriti G., et al., 2009; Mora-Rochin, et al., 2010).

Los resultados del análisis de capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y FRAP se muestran en las Figuras 3.2 y 3.3 respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico, el %I muestra significancia con los factores método de extracción, solvente, pH y la interacción solvente-pH obteniendo el valor máximo (91.8019 ± 0.8486) con el método ultrasonido y metanol a pH 2. En el caso de la reducción férrica (método FRAP) las variables significativas fueron el método de extracción, solvente y pH, obteniendo la mayor capacidad antioxidante (75.6364 ± 4.4378) con el método ultrasonido y metanol a pH 1. Por lo anterior, en análisis posteriores las extracciones se realizaron utilizando el método ultrasonido con metanol a pH 2.

Tabla 1. ANOVA de los factores e interacciones del análisis de extracción.

Fuente de Variabilidad	Respuesta	SC	GL	MC	F	Pr > F
Método de extracción	AT	3.5884	1	3.5884	0.2434	0.6706
	FT	1.3625	1	1.3625	0.0502	0.8436
	DPPH	166.8892	1	166.8892	49.5529	0.0196
	FRAP	388.7727	1	388.7727	21.4764	0.0435
Solvente	AT	58.5224	1	58.5224	3.9703	0.1845
	FT	1002.342	1	1002.3418	36.9112	0.026
	DPPH	2107.752	1	2107.7518	625.8352	0.0016
	FRAP	2665.851	1	2765.8507	152.7897	0.0065
pH	AT	13202976	2	66.1488	4.4877	0.1822
	FT	2020.472	2	1010.236	37.2019	0.0262
	DPPH	6036.794	2	3018.3968	896.2246	0.0011
	FRAP	1807.221	2	903.6105	49.9168	0.0196
Método-Solvente	AT	44.6581	1	44.6581	3.0297	0.2239
	FT	113.5961	1	113.5961	4.1832	0.1775
	DPPH	39.9507	1	39.9507	11.8622	0.0749
	FRAP	272.7677	1	272.7677	15.0681	0.0604
Método-pH	AT	0.2041	2	0.102	0.0069	0.9931
	FT	15.4449	2	7.7248	0.2844	0.7786
	DPPH	19.7419	2	9.871	2.9309	0.2544
	FRAP	17.6407	2	8.8203	0.4872	0.6724
Solvente-pH	AT	2.1629	2	1.0814	0.0734	0.9316
	FT	371.4497	2	185.7248	6.8393	0.1276
	DPPH	1041.647	2	520.8235	154.6433	0.0064
	FRAP	139.9885	2	69.9943	3.8666	0.2055

SC: Suma de Cuadrados; GL: Grados de Libertad; MC: Media Cuadrática; Pr: Probabilidad.

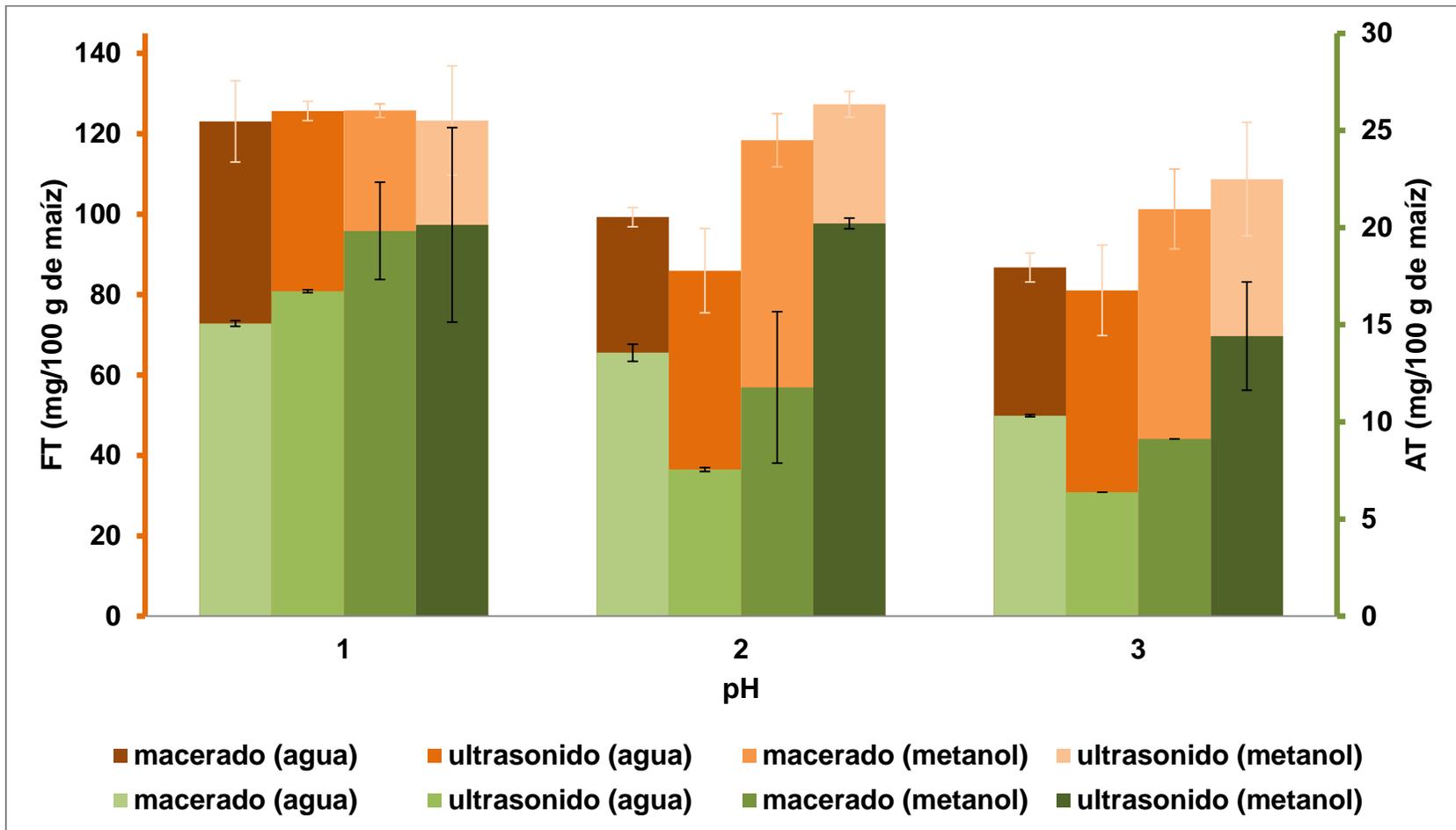


Figura 3.1. Contenido de Antocianinas Totales y Fenoles Totales de los extractos del maíz morado de las pruebas de extracción.

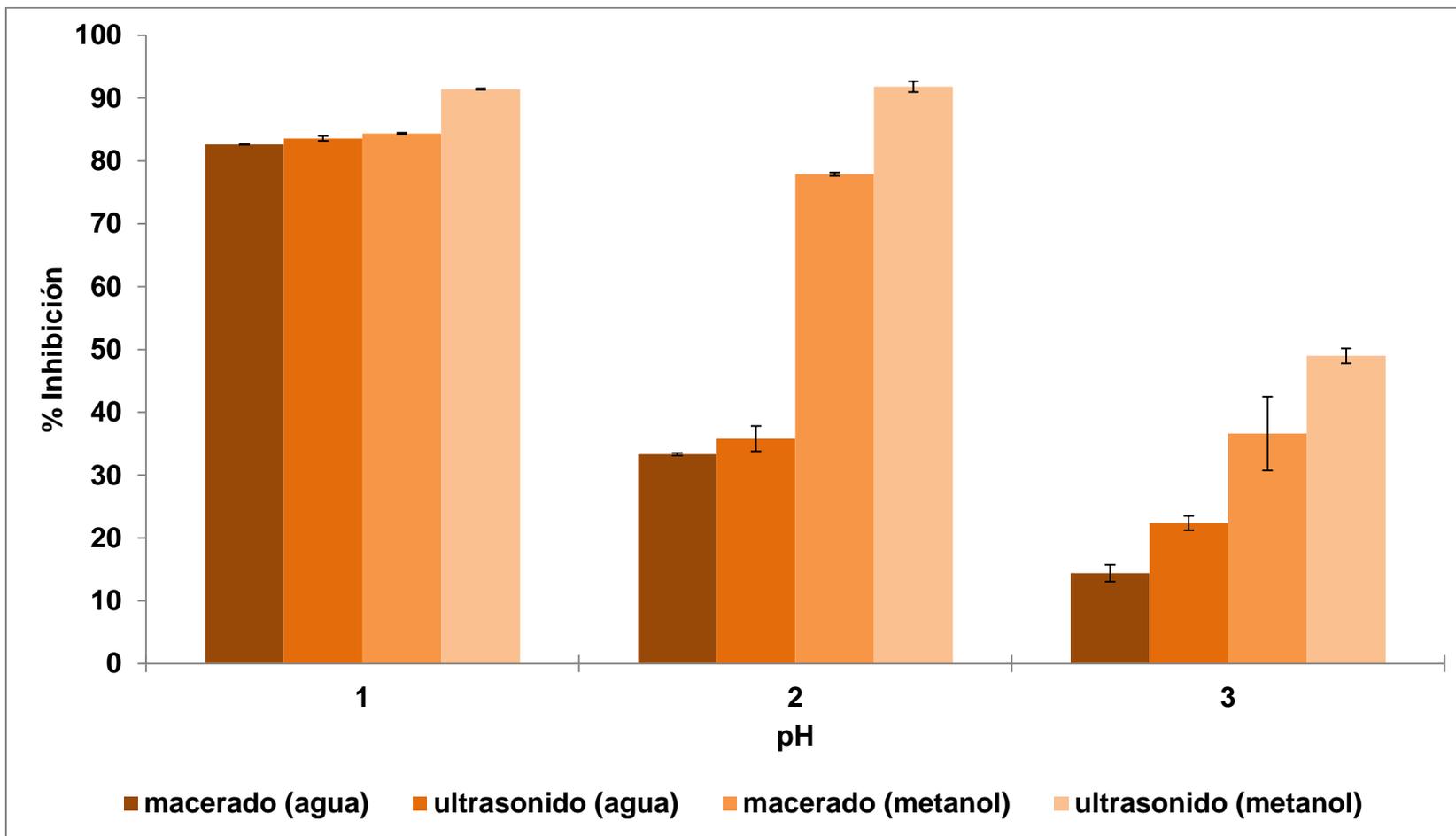


Figura 3.2. Porcentaje de inhibición del reactivo DPPH de los extractos del maíz morado de las pruebas de extracción.

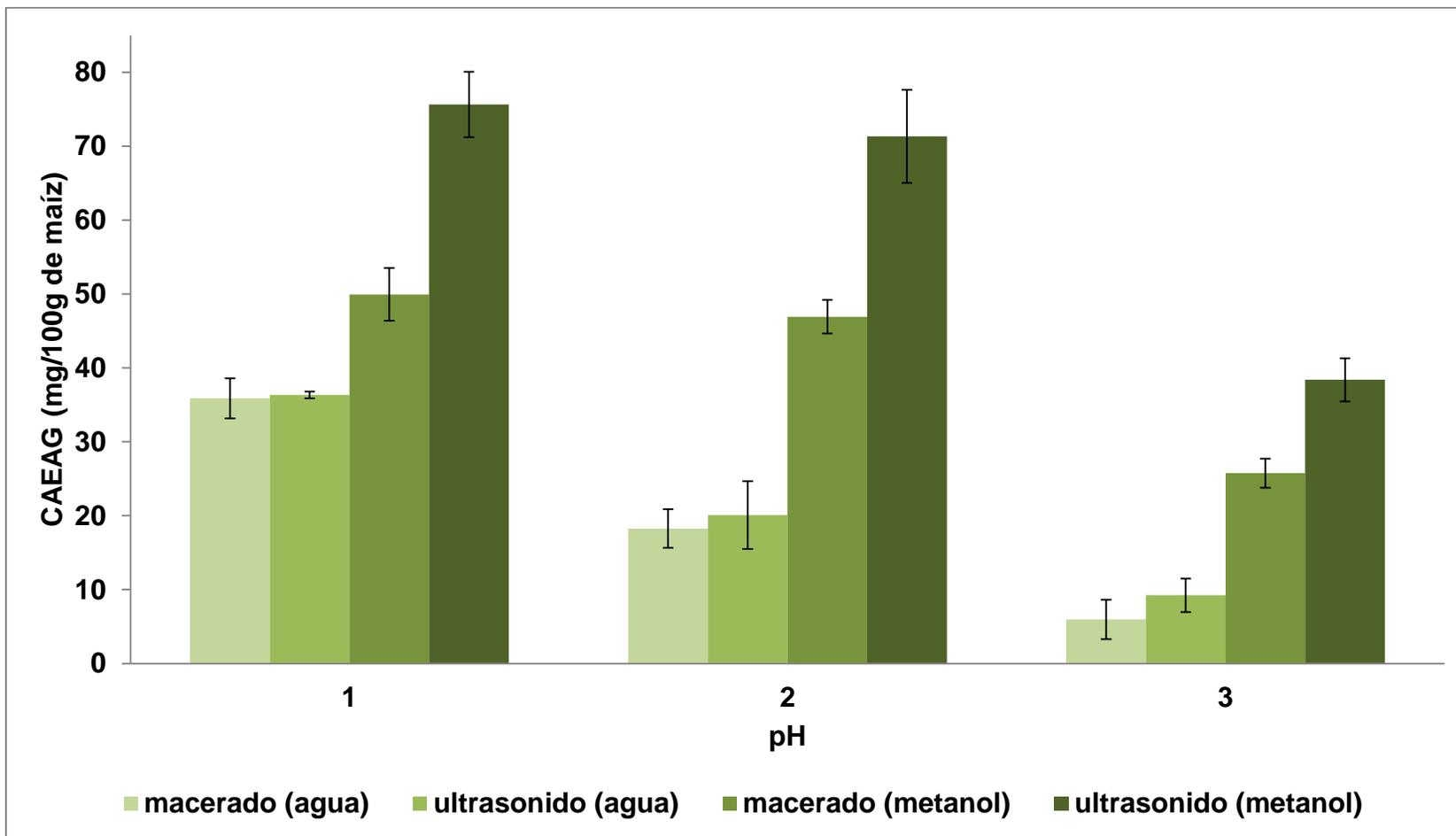


Figura 3.3. Capacidad antioxidante obtenida por el método FRAP de los extractos de maíz morado en las pruebas de extracción.

3.2. FORMULACIÓN DE LAS EMULSIONES DOBLES

Previo a la incorporación del extracto en la emulsión, se realizó el análisis de estabilidad utilizando agua destilada en la fase acuosa interna. En la Figura 3.4 se muestra el efecto de la variación del % peso de WPI en la fase continua y la velocidad de homogeneización secundaria en el diámetro medio de partícula, $D(4,3)$, medido durante un tiempo total de 220 horas. El $D(4,3)$ incrementa junto con el % peso de WPI cuando la velocidad de agitación secundaria es 360 rpm; a 600 rpm el $D(4,3)$ promedio de las emulsiones frescas es $6.1 \mu\text{m}$ para todas las concentraciones de WPI. Se dice que una emulsión es estable cuando sus propiedades físicas y químicas no cambian con el tiempo, el $D(4,3)$ debe ser constante por un lapso de tiempo considerable, se puede decir que todas las emulsiones preparadas en este análisis fueron estables por un lapso mínimo de 220 horas.

En la Figura 3.5 se muestra el porcentaje de formación de cremado en las emulsiones dobles con agua destilada en la fase acuosa interna. Al cabo de 220 horas se obtuvo 15% de cremado, o menos, en las emulsiones obtenidas a 600 rpm, no mostrando diferencia significativa al variar la concentración de WPI. Cuando la velocidad de homogeneización secundaria fue 360 rpm las emulsiones presentaron cremado superior al 20%, además, el porcentaje de cremado final aumentó en relación directa con la concentración de WPI en la fase acuosa externa.

El cremado disminuye la distancia entre las gotas aumentando la probabilidad de que la emulsión se desestabilice, se debe elegir la formulación en la que cremado ocurra más lentamente. En otras investigaciones se ha demostrado que la adición o incremento de proteína de leche en la fase continua reduce el diámetro medio de gota y esto disminuye la formación de cremado (Swaisgood, 1996; Jiménez-Alvarado, et al., 2009; Saehun, et al., 2010), en este análisis, el incremento de concentración de WPI en la fase dispersa no disminuyó el $D(4,3)$ ni la formación

de cremado, es posible que el WPI aumentara en gran medida la diferencia de densidades entre la fase dispersa y continua aumentando el cremado en las emulsiones cuya velocidad de homogeneización secundaria fue de 360 rpm.

Es un hecho que la disminución del tamaño de partícula mejora la estabilidad de la emulsión (McClements, 2005), es por esto que se debe elegir la formulación y el proceso con el que se logre el menor $D(4,3)$, con base lo anterior, la velocidad de homogeneización secundaria seleccionada para las emulsiones con extracto de maíz morado en la fase acuosa interna fue de 600 rpm.

Las emulsiones con extracto de maíz morado en la fase acuosa interna fueron estables, es decir, no se observó alguna variación significativa de $D(4,3)$ durante un tiempo total de 220 horas, como muestran las barras de error. En las Figuras 3.6 y 3.7 se muestra la variación del tamaño de partícula y el porcentaje de formación de cremado respectivamente; es importante resaltar que hubo una reducción de hasta el 33% en el $D(4,3)$ de las emulsiones frescas en comparación con las que contenían agua destilada; no hubo disminución en el $D(4,3)$ al elevar la concentración de WPI en la fase continua.

La formación de cremado se redujo notablemente obteniendo resultados menores al 2.5% al cambiar el agua destilada por extracto. El rango de concentración de WPI utilizado en este trabajo no muestra mejoría en la estabilidad de la emulsión. En la Figura 3.8 se muestra una fotografía de una emulsión con extracto, 12.5 %p de WPI en la fase continua y velocidad de homogeneización de 600 rpm, cuyo $D(4,3) = 4.2 \mu\text{m}$, la emulsión formada es del tipo C con muchas gotas en el interior.

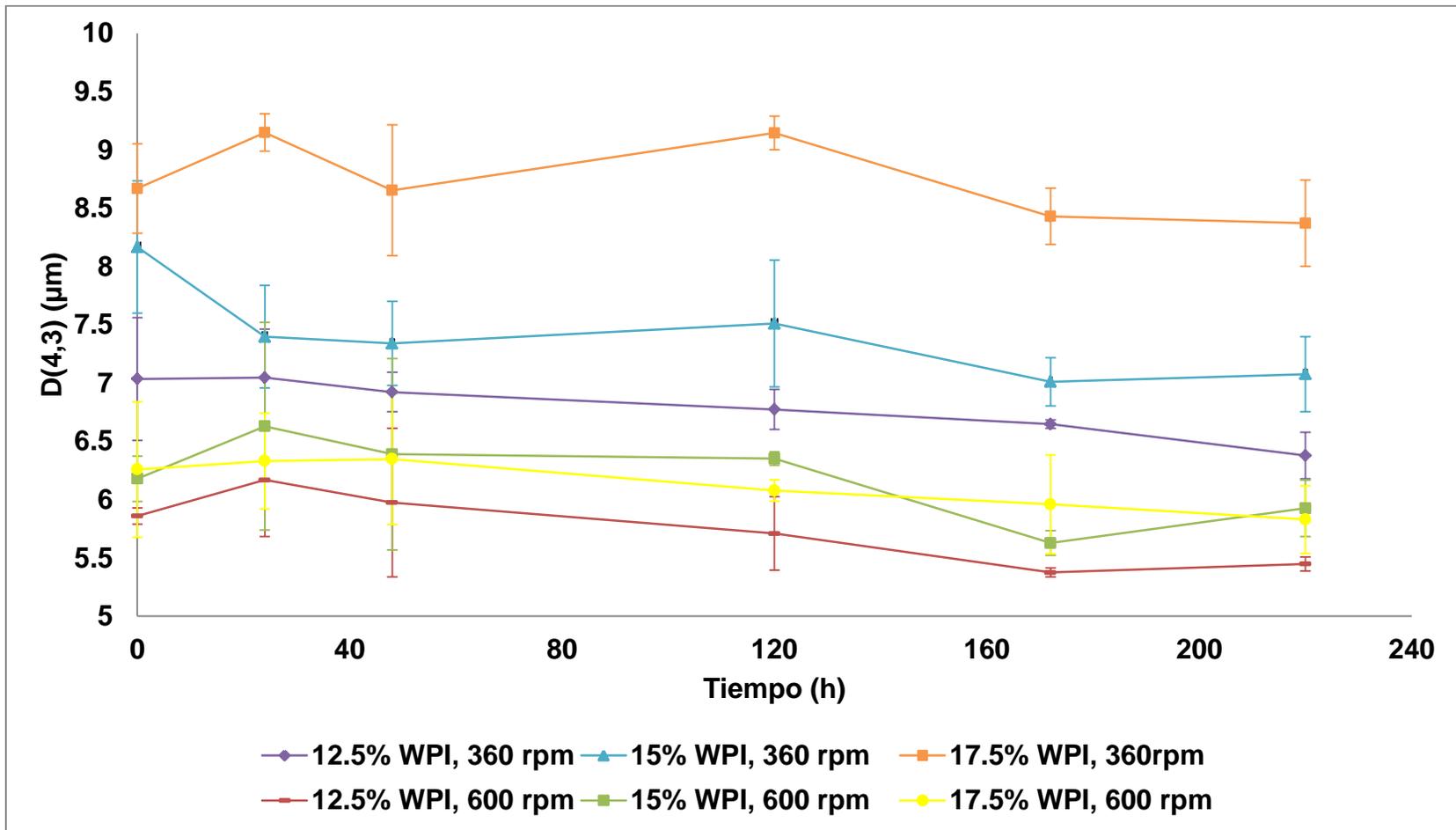


Figura 3.4. Variación en el diámetro D(4,3) de las emulsiones dobles con W1: agua destilada.

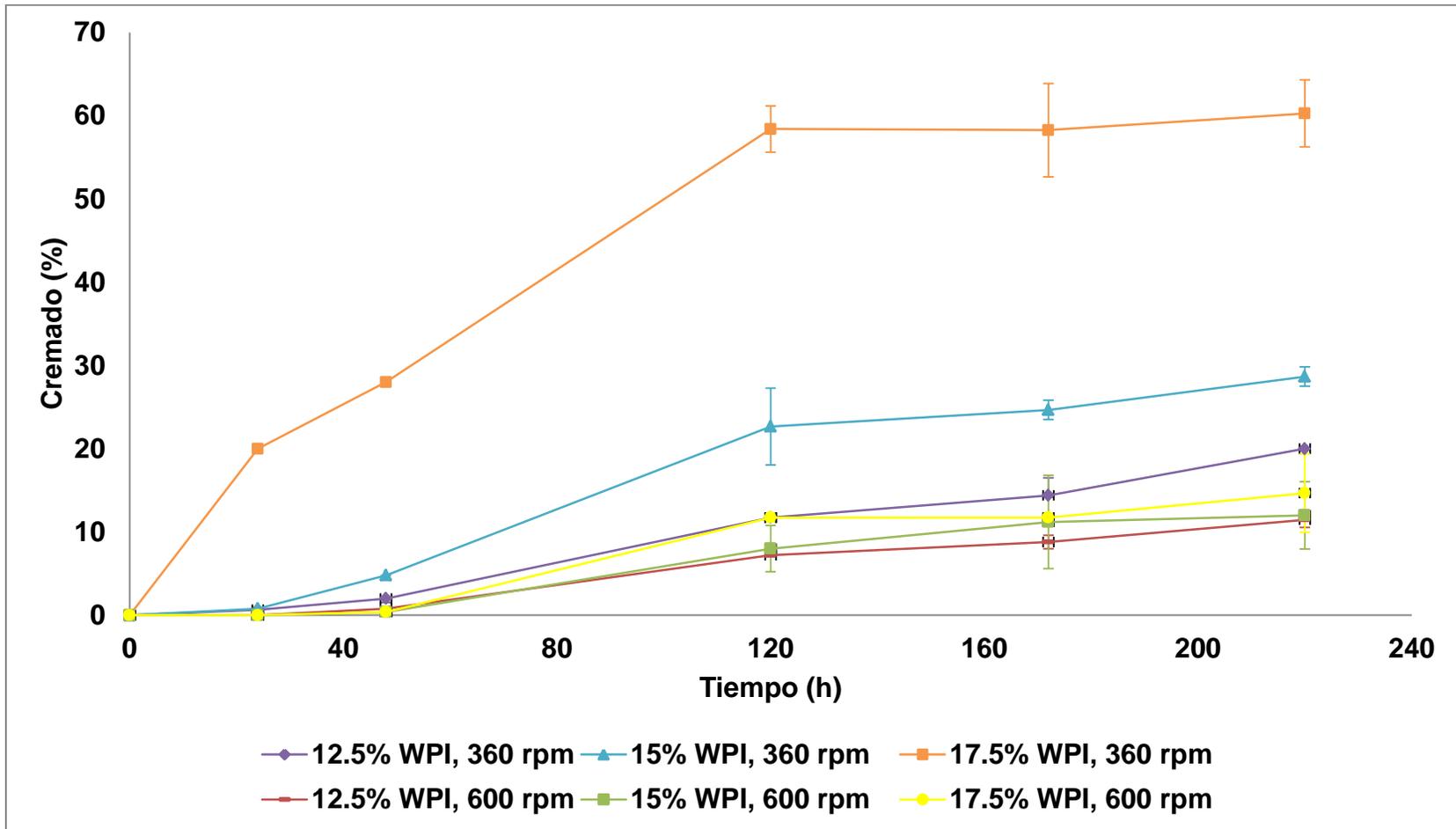


Figura 3.5. Variación en el porcentaje de cremado de las emulsiones dobles con W1: agua destilada.

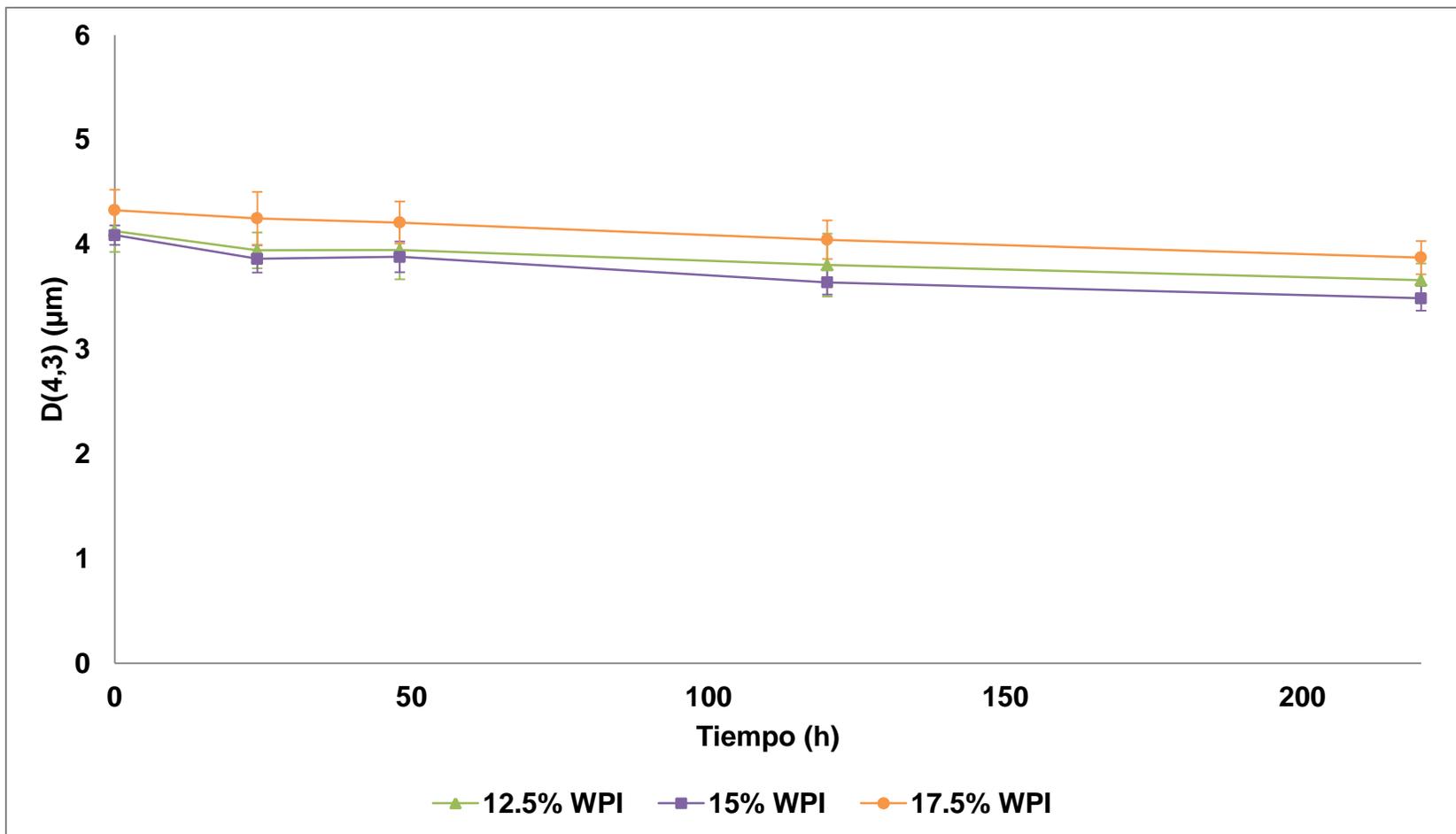


Figura 3.6. Variación en el diámetro $D(4,3)$ de las emulsiones dobles con W_1 : extracto de maíz morado.

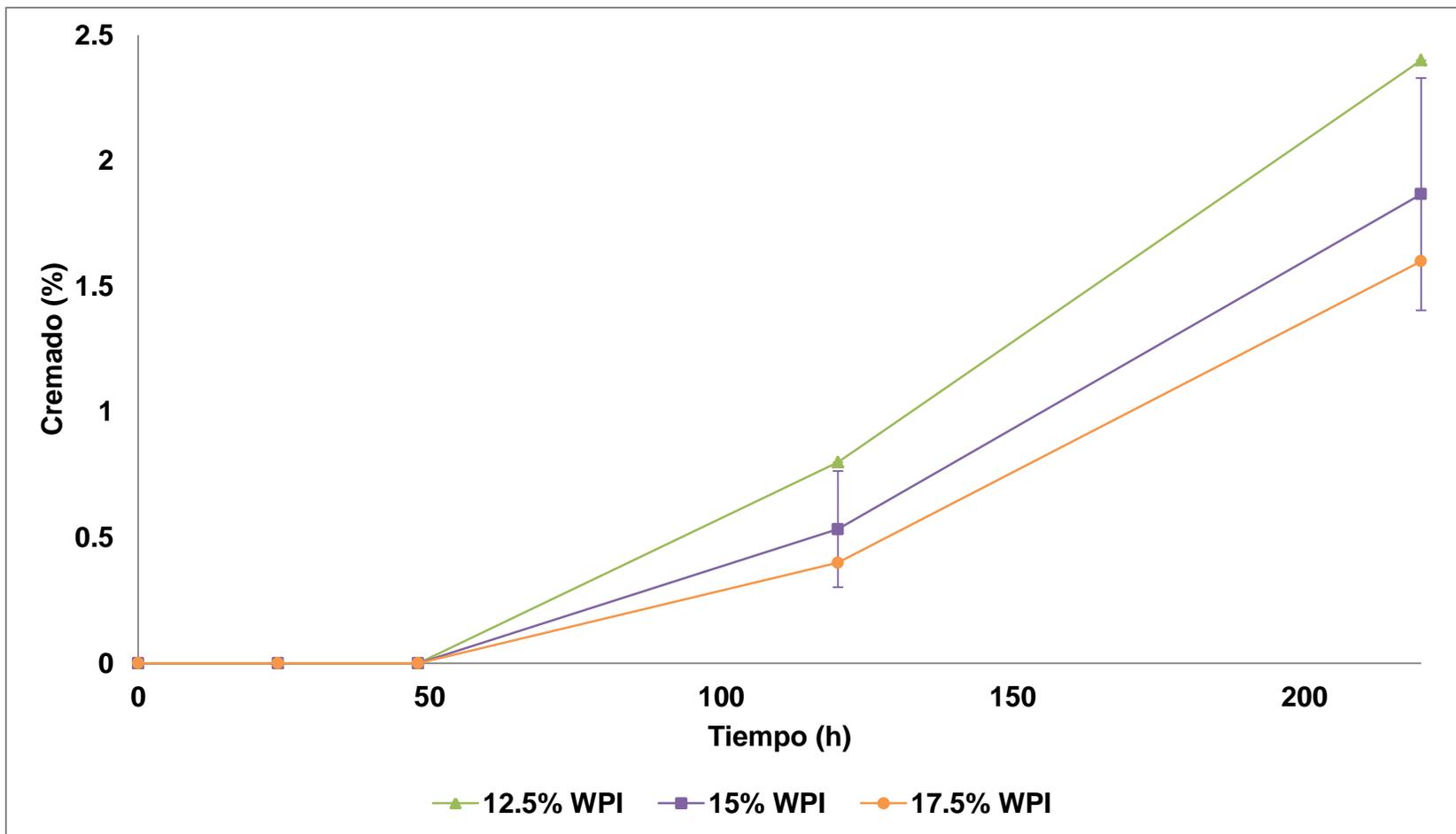


Figura 3.7. Variación en el porcentaje de cremado de las emulsiones dobles con W_1 : extracto de maíz morado.

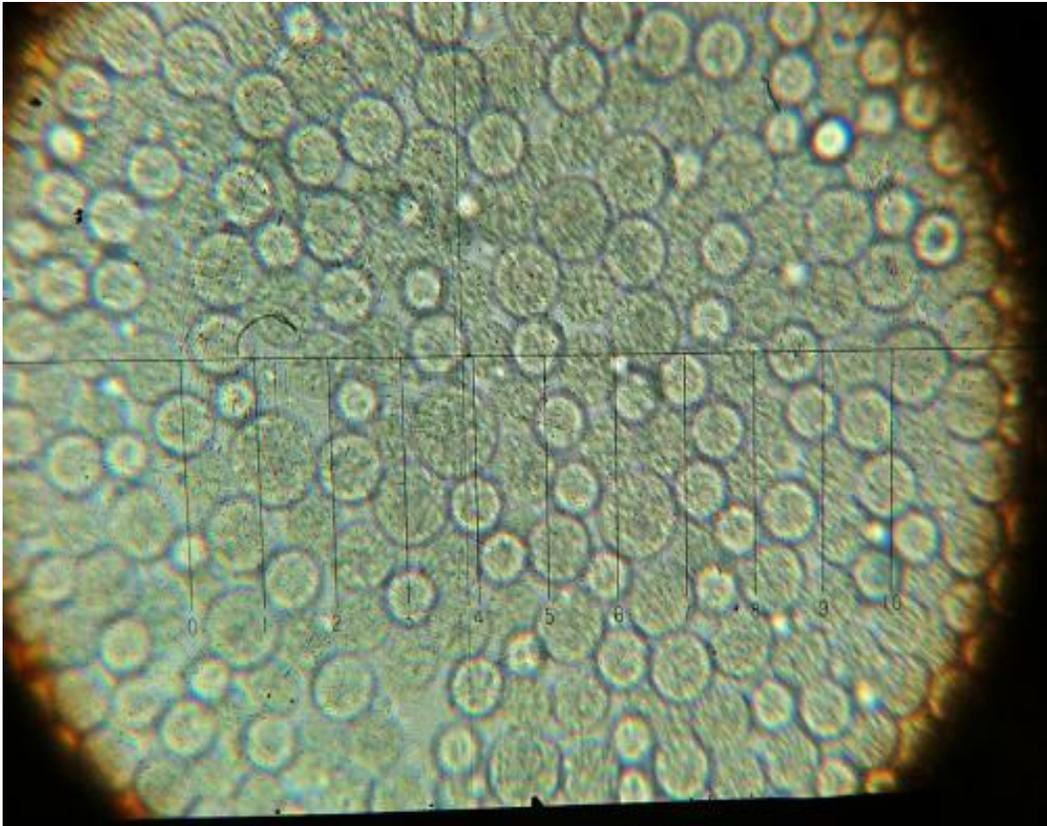


Figura 3.8. Emulsión doble con W_1 : extracto de maíz morado, con 12.5% WPI a 600 rpm.

3.3. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE COMPUESTOS

En la Figura 3.9 se muestra el comportamiento de los factores L , a^* y b^* de las emulsiones dobles en la simulación de la liberación del extracto. Se obtuvieron coeficientes de correlación de 0.9423 y 0.9957 en los factores a^* y b^* respectivamente, la relación entre la concentración de antocianinas y estos dos factores ya había sido comprobado en otras investigaciones (Goncalves, et al., 2007; Pérez-Vicente, et al., 2004; Alighourchi & Barzegar, 2009).

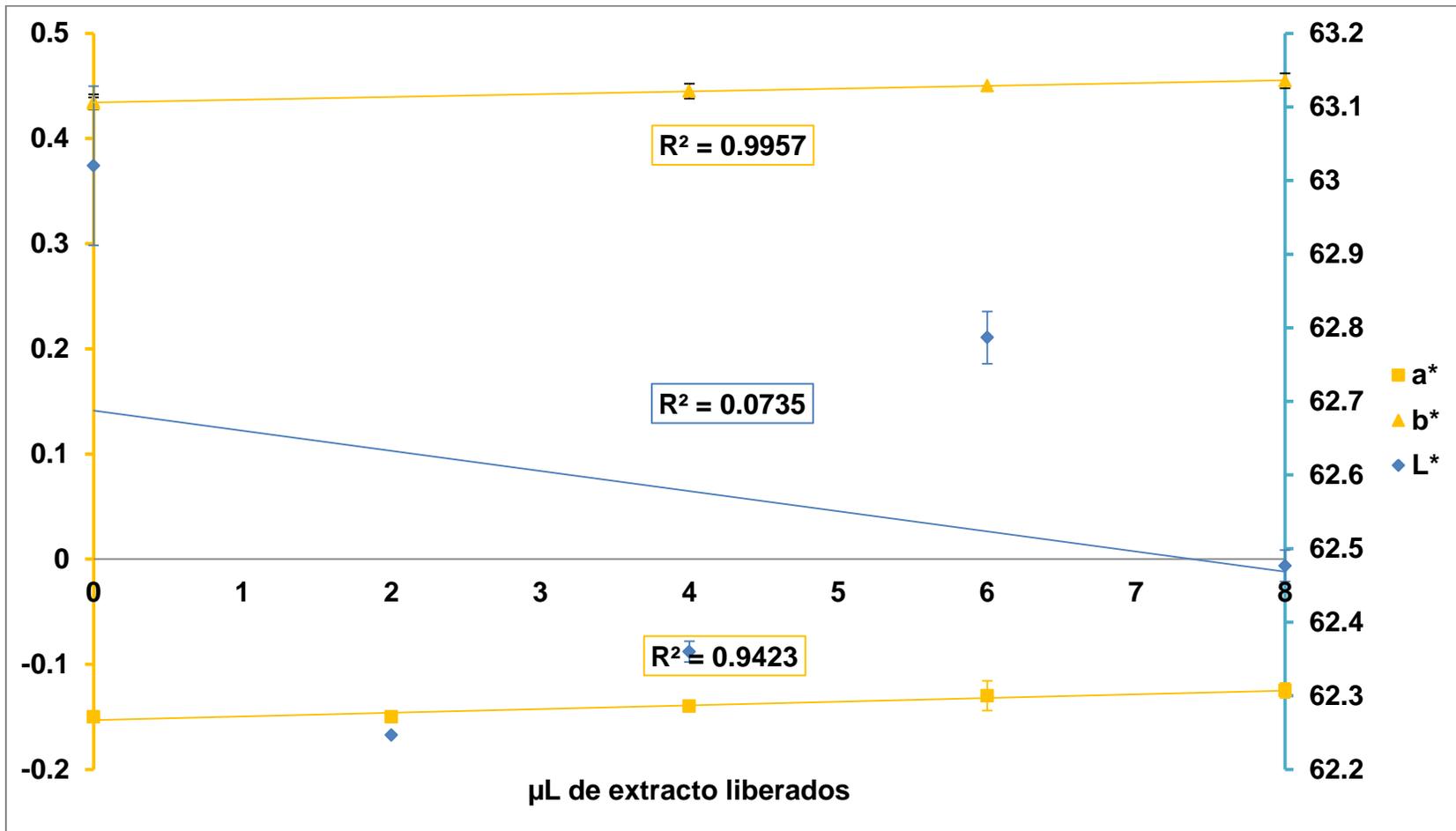


Figura 3.9. Correlación de los parámetros de la escala CIE L*a*b* en la simulación de liberación del extracto en la emulsión doble.

El incremento en el valor C^* respecto al volumen de extracto liberado se muestra en la Figura 3.10 cuyo coeficiente de correlación lineal es de 0.9928. La cinética de liberación se obtuvo a partir de esta curva. El ángulo de tono de todas las muestras fue $358.7^\circ \pm 0.05$, es sabido que el ángulo de tono depende de los a^* y b^* de la escala CIEL*a*b* por lo que ligeras variaciones en éstos provocará variaciones en el ángulo de tono.

En la Figura 3.11 se muestra la variación del porcentaje de extracto liberado medido en las emulsiones dobles, se observa que el porcentaje aumenta hasta alcanzar un máximo, esto ocurre a partir de los 28 días, lo que corresponde a $2.7\% \pm 0.3$. El ángulo de tono promedio de todas las muestras fue $358.5^\circ \pm 0.1$. En paralelo, se midió la distribución de tamaño de partícula, los resultados se muestran en la Figura 3.12, según esta figura, a los 29 días un porcentaje de las gotas aumentó su diámetro a un rango de 25 – 30 μm que corresponde a 5 veces su tamaño inicial, a pesar de esto, el D(4,3) aumenta levemente debido a que este porcentaje de gotas es mucho menor al de las gotas que conservan su tamaño original.

Cuando la fase acuosa interna tiene mayor presión osmótica que la externa, puede haber hinchamiento de las gotas internas debido a la difusión de agua desde la fase externa a la interna (Mezzenga, et al., 2004), este hinchamiento generalmente es seguido de la ruptura de la membrana oleosa y por lo tanto de la desaparición de algunas de las gotas internas (Chanamai & McClements, 2000) junto con los ingredientes encapsulados en ellas (Dickinson, 2011) dando lugar a la liberación de los compuestos, el aumento en el tamaño de gota de las emulsiones analizadas en este trabajo puede ser reflejo de este fenómeno.

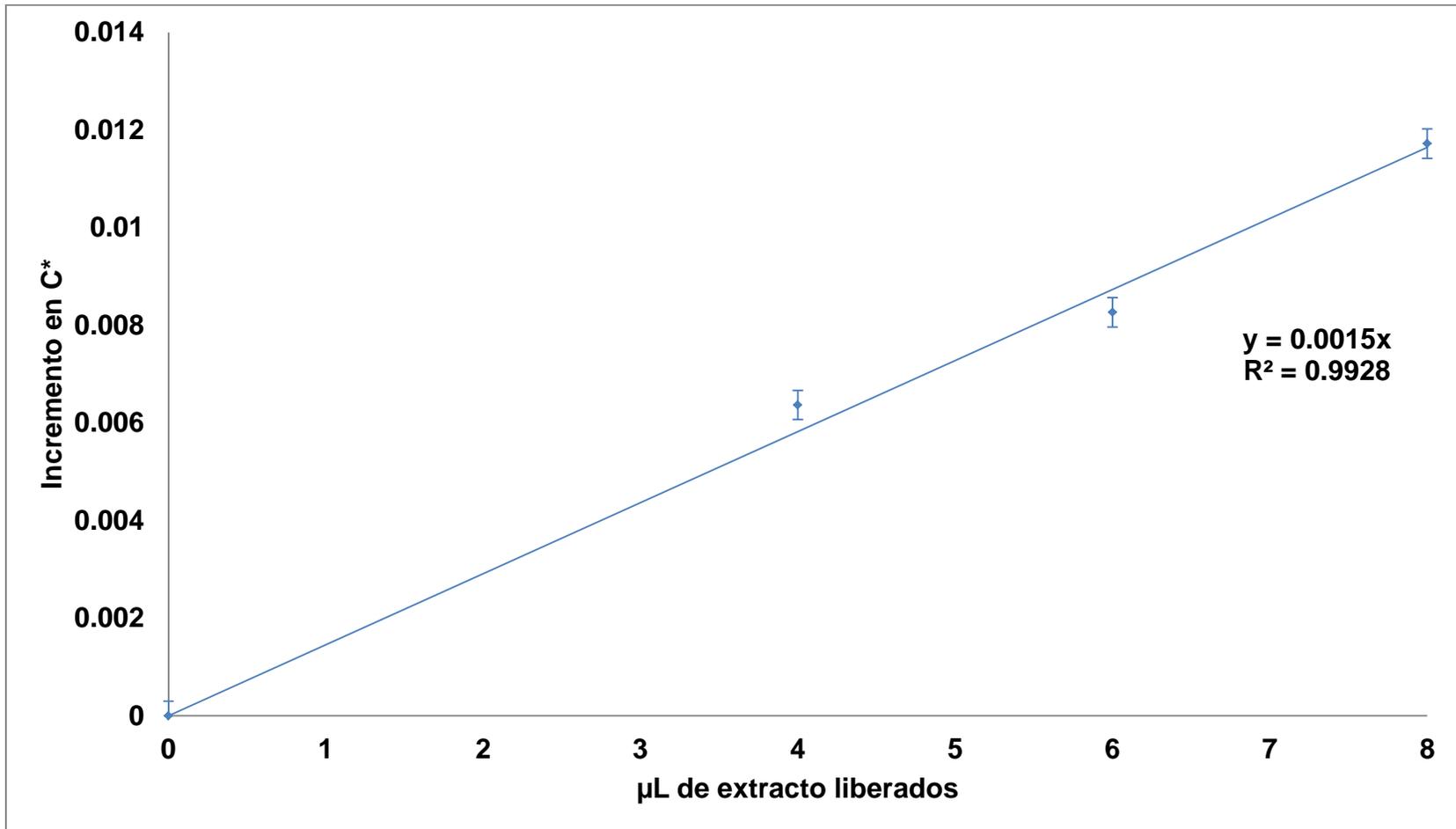


Figura 3.10. Incremento del factor C^* en la simulación de liberación extracto.

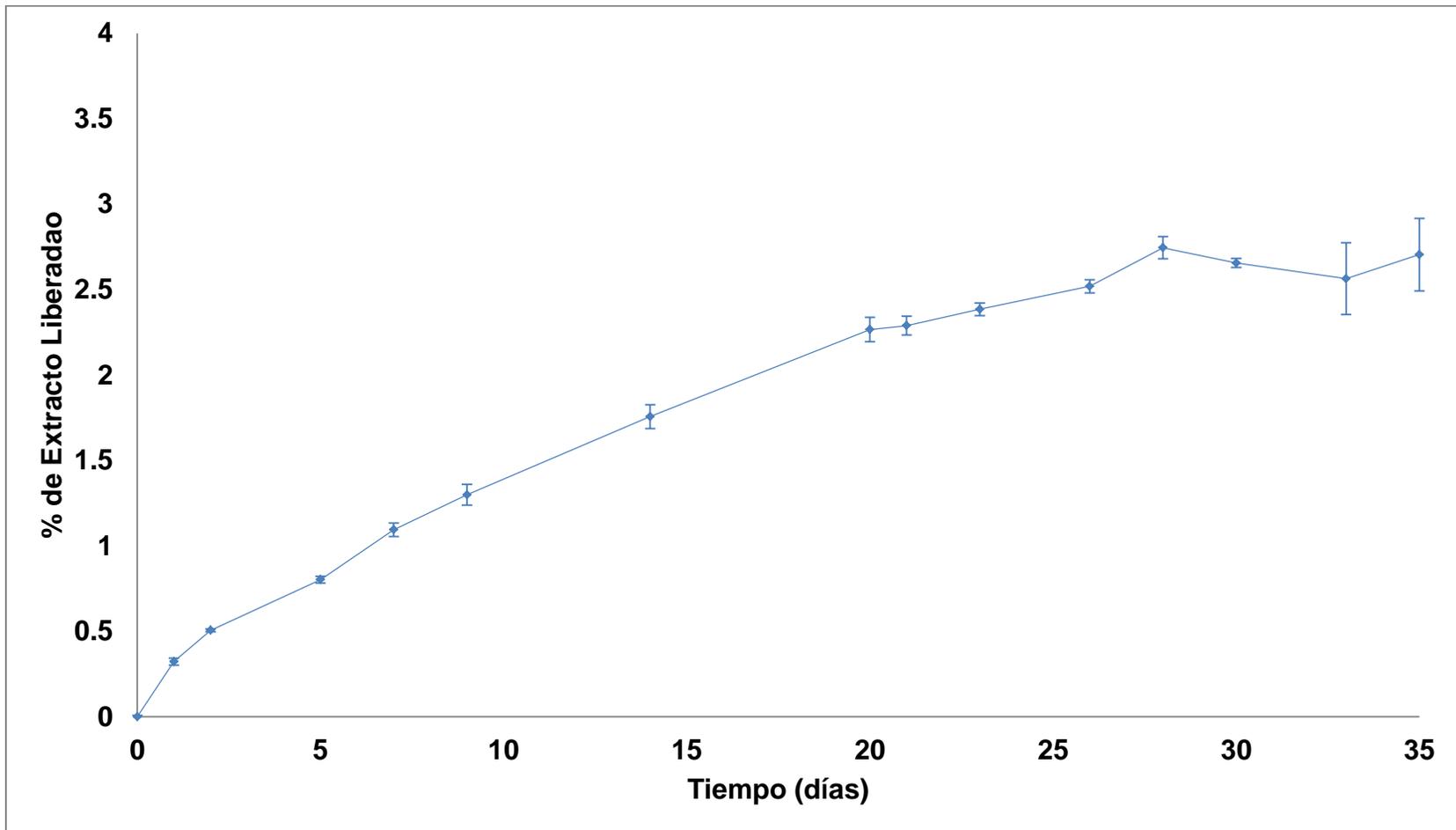


Figura 3.11. Liberación del extracto de maíz morado en la emulsión doble.

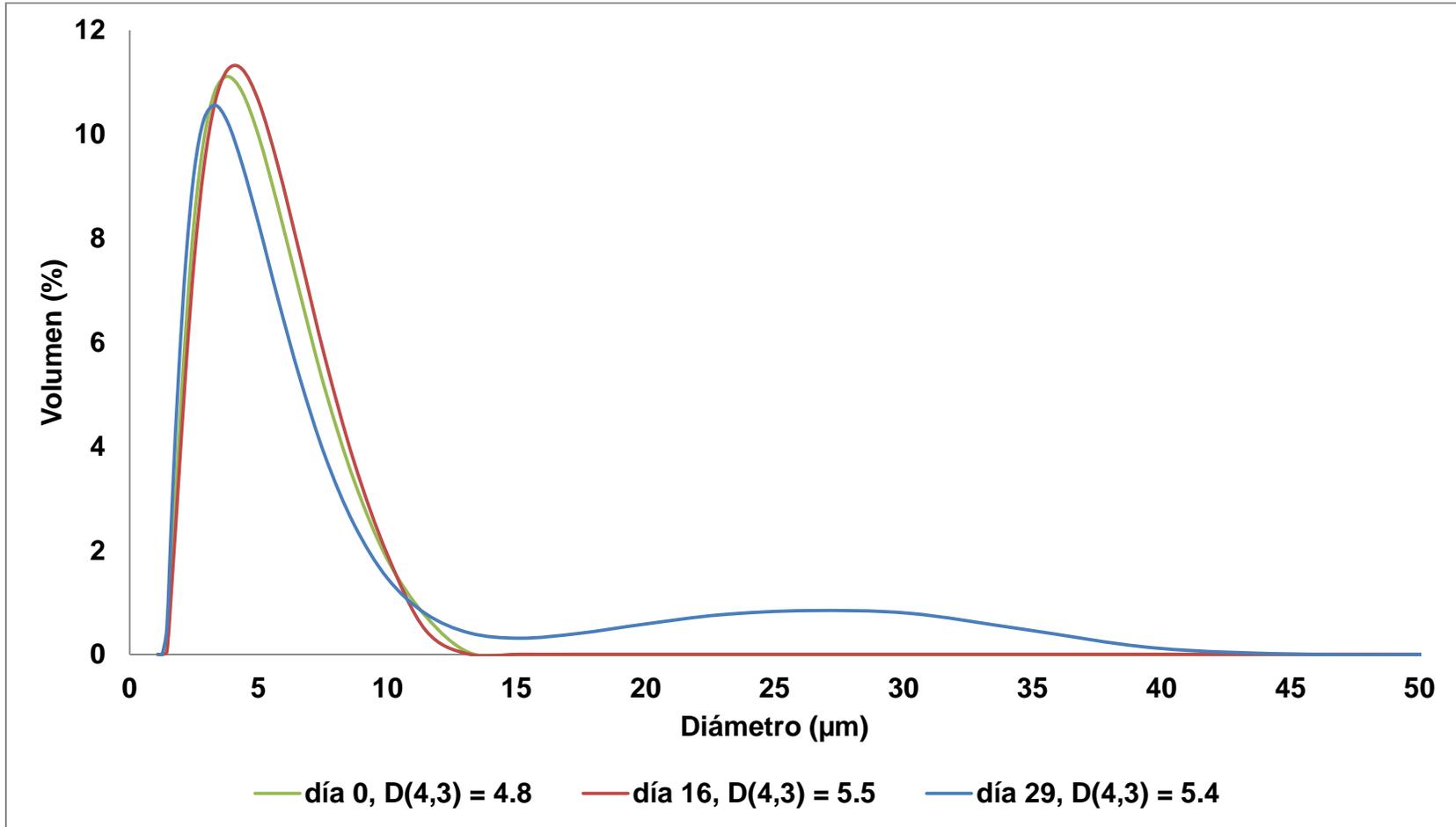


Figura 3.12. Distribución del tamaño de partícula y D(4,3) (μm) de las emulsiones dobles en tres intervalos de tiempo.

3.4. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN

En la Figura 3.13 se muestran los datos obtenidos para la determinación del coeficiente de reparto en los sistemas bifásicos extracto/mezcla de aceite con emulsificantes, cabe mencionar que se midió la absorbancia al extracto en forma independiente para identificar si existía degradación en el tiempo de medición, las absorbancias en la fase acuosa incluyen esta degradación. Es posible observar que la absorbancia del extracto en la fase acuosa disminuye a través del tiempo, la absorbancia en la fase oleosa no cambia, por lo tanto, el extracto migra a la interfase, obteniendo así el coeficiente de reparto: $K = (C_m/C) = 0.0468$.

El espesor de la capa oleosa utilizado para la determinación del coeficiente de difusión se propuso a partir de los valores reportados por Kim y Shah (Kim & Shah, 1990) que son los esperados en una emulsión doble siendo $\delta = 1 \mu\text{m}$. El área de la gota interna se determinó a partir del diámetro medio de glóbulo de aceite medido en el tiempo cero. En la Tabla 2 se muestra el resumen de los parámetros utilizados en el programa para la determinación del coeficiente de difusión a partir de la primera ley de Fick.

Tabla 2. Parámetros utilizados en el programa para la determinación del coeficiente de difusión a partir del modelado de la primera ley de Fick.

Parámetro	Valor
D(4,3) del glóbulo de aceite (μm)	4.819
Espesor de la membrana oleosa (δ , μm)	1
Área de la gota interna (A , cm^2)	24.9655×10^{-8}
Coficiente de reparto (K , adimensional)	4.68×10^{-2}
Coficiente de difusión inicial (D_0 , $\text{cm}^2 / \text{día}$)	1×10^{-8}
Concentración inicial del extracto (C_0 , %)	100

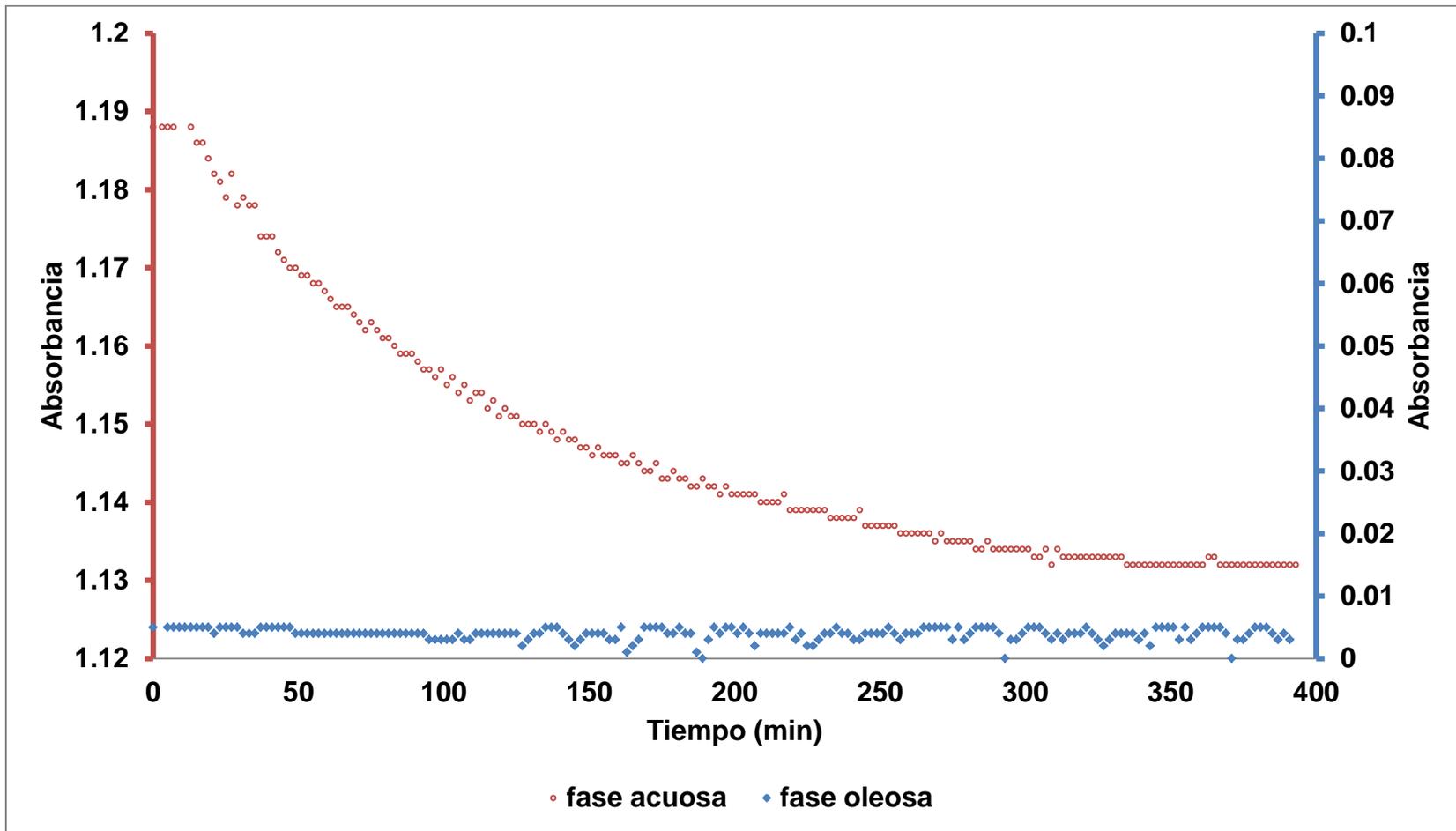


Figura 3.13. Variación de la absorbancia del extracto en las fases acuosa y oleosa del sistema bifásico para la determinación del coeficiente de reparto.

El modelo obtenido a partir de la primera ley de Fick (Figura 3.14) fue seccionado para el mejor ajuste a los datos experimentales. La primera sección describe la liberación del extracto durante los primeros 9 días reportando $D = 1.16 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$. La segunda sección describe la liberación del extracto de los días 20 a 35 reportando $D = 3.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Los coeficientes de difusión para sistemas de líquidos binarios se encuentran en el orden 10^{-4} (Bird, et al., 2007). Kim y Shah (Kim & Shah, 1990) mencionan que los valores de coeficiente de difusión en emulsiones dobles son típicamente del orden de 10^{-8} , además, se ha encontrado valores menores en emulsiones W/O/W como las que contienen NaCl y gelatina cuyo $D = 4.68 \pm 0.13 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Sapei, et al., 2012); las diferencias entre estos valores pueden deberse al incremento en la magnitud de resistencia al libre paso de los compuestos en las emulsiones dobles generada por la capa oleosa que actúa como una membrana de separación, el coeficiente de difusión obtenido a partir de la primera ley de Fick, presentado en este trabajo, da la idea de que la membrana oleosa no representa una barrera importante, incluso, que el extracto difunde a la fase continua como si fuera un sistema de líquidos binarios, por lo que este modelo no describe los fenómenos que ocurren en la emulsión doble.

La Figura 3.15 muestra la respuesta del ajuste de parámetros a partir de la segunda ley de Fick con los resultados siguientes: $D_{eq} = 1.0417 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $\beta = -1.089$ y $Sh = 1 \times 10^{-4}$. La relación entre las concentraciones de extracto de maíz morado en la fase acuosa interna dadas por el modelo y las obtenidos experimentalmente en la cinética de liberación se muestra en la Figura 3.16 con coeficiente de correlación $R^2 = 0.974$. Este modelo describe más adecuadamente la transferencia de masa que sucede en la emulsión doble formulada en este trabajo, esto se debe en gran parte a la inclusión del efecto convectivo, el valor obtenido de Sh demuestra que la transferencia de masa se debe principalmente al efecto difusivo.

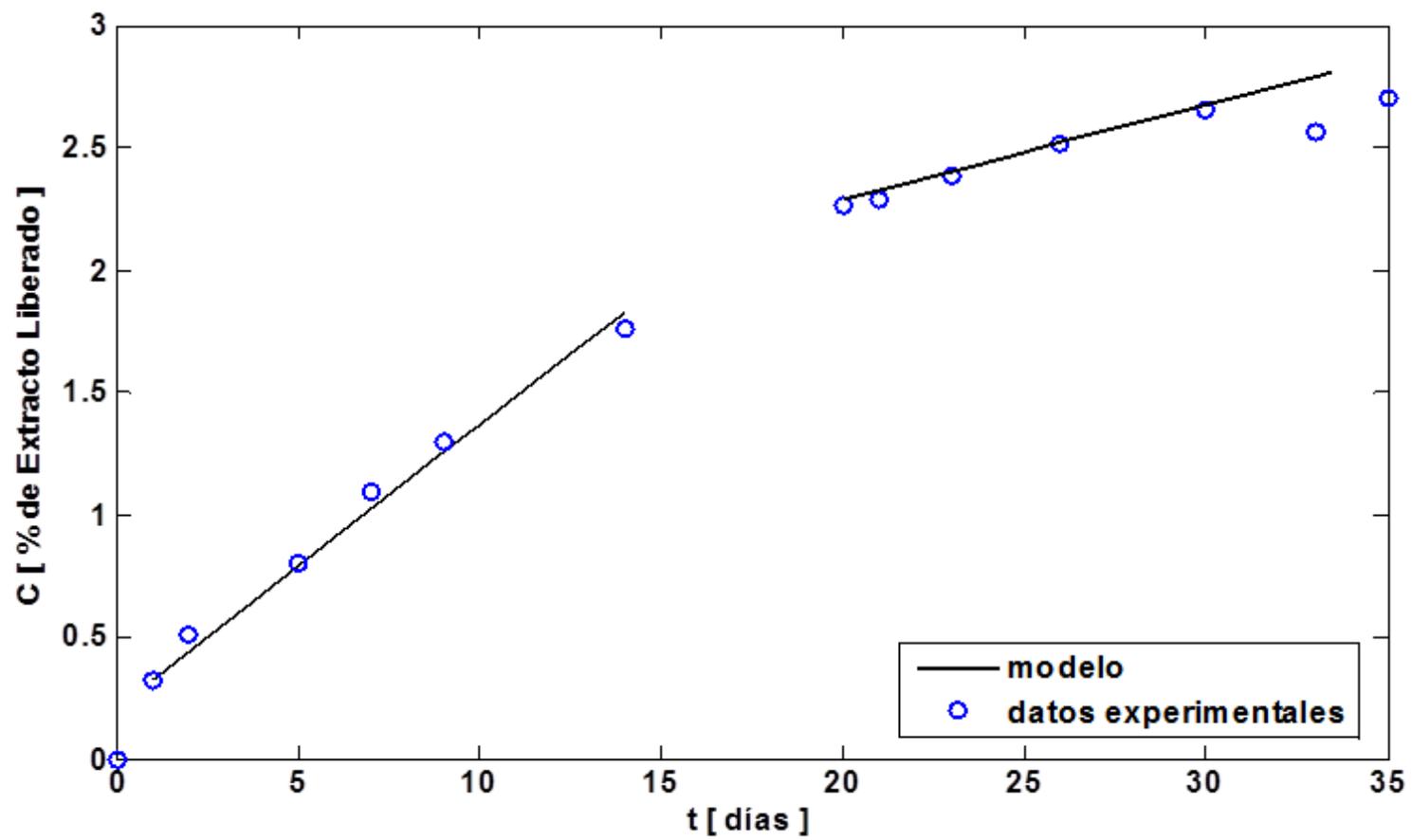


Figura 3.14. Ajuste del modelo a los datos experimentales de la cinética de liberación en los primeros 9 días de análisis.

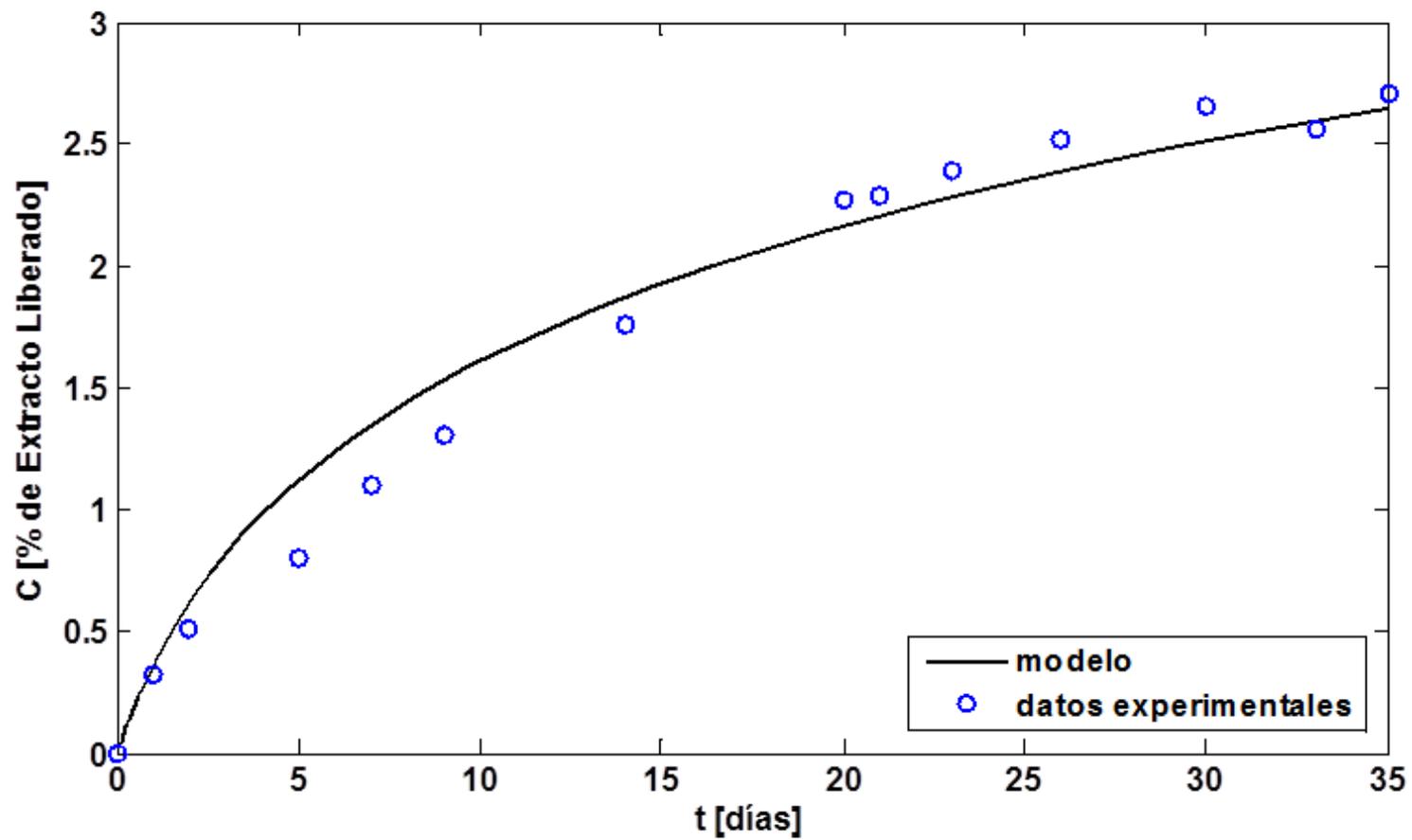


Figura 3.15. Ajuste del modelo a los datos experimentales de la cinética de liberación en los primeros 9 días de análisis.

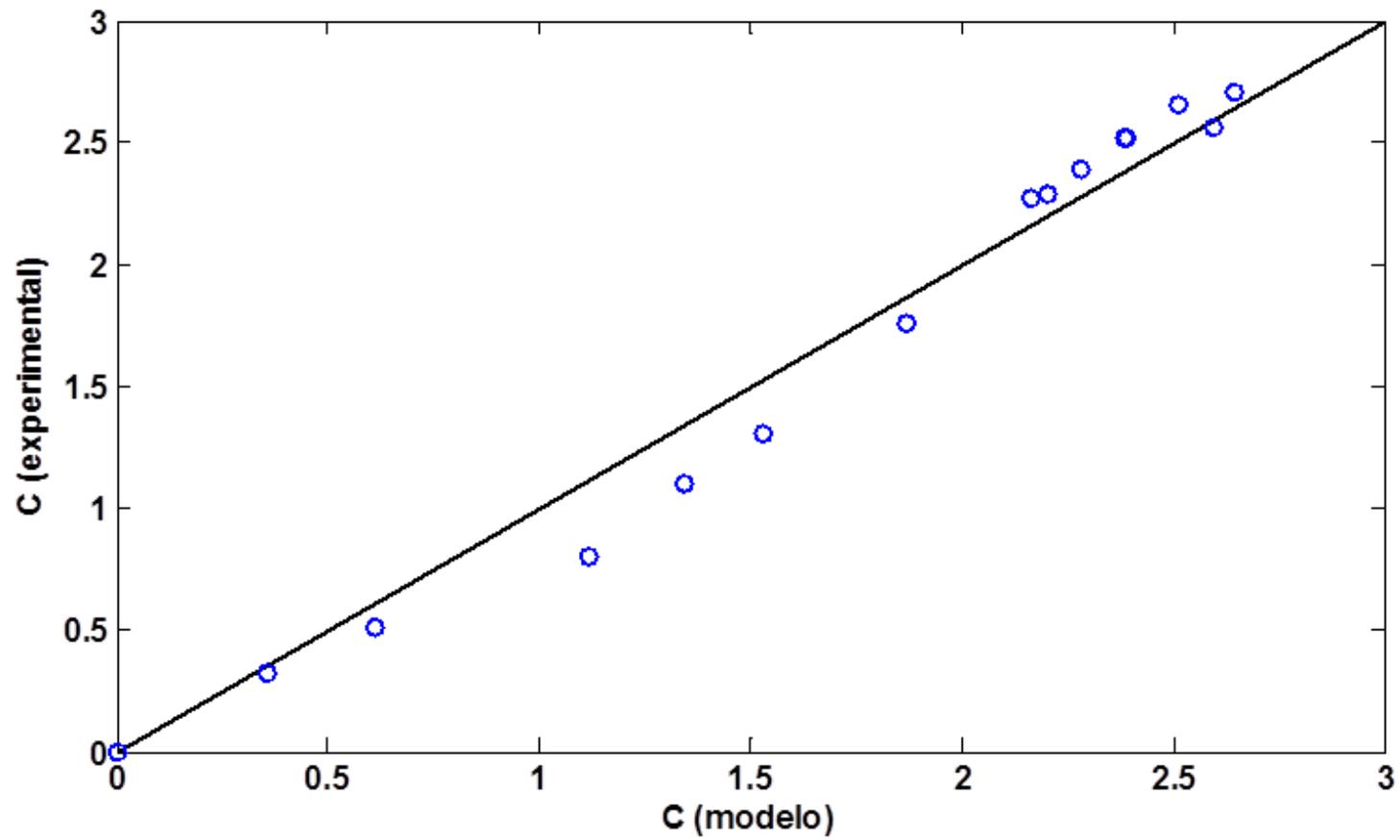


Figura 3.16. Ajuste del modelo a los datos experimentales de la cinética de liberación en los primeros 9 días de análisis.

CONCLUSIONES

- El contenido de FT en los extractos de maíz morado se ve afectado por el solvente y pH utilizados. Las mayores concentraciones de FT y AT se obtuvieron con metanol a pH 2. La capacidad antioxidante de los extractos varía significativamente al cambiar el solvente, pH y método de extracción obteniendo mayor capacidad antioxidante en las extracciones con ultrasonido.
- Las emulsiones dobles que incrementaron su estabilidad al verse disminuido el porcentaje de formación de cremado y el diámetro medio de partícula son las preparadas a 600 rpm como velocidad de homogeneización secundaria, a esta velocidad, el incremento del % en peso de WPI en la fase continua no es un factor significativamente importante en la estabilidad de las emulsiones dobles.
- Las variaciones del contenido de extracto en la fase continua están altamente correlacionadas con el incremento en el valor C^* obtenido a partir de los índices a^* y b^* de la escala CIELab*. Fue posible formular una emulsión con estabilidad de 35 días y características de liberación controlada. El incremento en el tamaño de partícula a los 29 días de análisis sugiere que la diferencia de presión osmótica entre las fases interna y externa de la emulsión doble llevó a la liberación del 2.7% del extracto de maíz morado.
- El modelo de la segunda ley de Fick y principalmente la inclusión del efecto convectivo permitieron la determinación del coeficiente de difusión del extracto de maíz morado siendo $D_{eq} = 1.0417 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

REFERENCIAS

1. Alighourchi, H. & Barzegar, M., 2009. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. *Journal of Food Engineering*, Volumen 90, pp. 179-185.
2. Anderson, O. & Francis, G., 2004. Techniques of pigment identification. *Annual Plant Reviews-Plant Pigments and Their Manipulation*, Volumen 14, pp. 293-341.
3. Antolovich, M. y otros, 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, Volumen 127, pp. 183-198.
4. Aoki, H. y otros, 2004. Inhibitory effect of anthocyanin colors on mutagenicity induced by 2-amino-1methyl-6-phenylimidazol [4,5-b] pyridine (PhIP). *Foods Food Ingredients Journal*, Volumen 209, pp. 240-246.
5. Arena, E., Fallico, B. & Maccarone, E., 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, Volumen 74, pp. 423-427.
6. Arnao, M. B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Science Technology*, Volumen 11, pp. 419-421.
7. Arnous, A., Makris, D. & Kefalas, P., 2002. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Volumen 15, pp. 655-665.
8. Aveyard, R., Binks, B. & Mead, J., 1986. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions I*, Volumen 82, p. 1755.
9. Becher, P., 2001. *Emulsions: Theory and Practice*. 3 ed. Washington: American Chemical Society.
10. Benichou, A., Aserin, A. & Garti, N., 2004. Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, pp. 108-109, 29-41.

11. Benichou, A., Aserin, A. & Garti, N., 2007. W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complexes.. *Colloids and Surfaces A- Physicochemical and Engineering Aspects*, Volumen 294(1-3), pp. 20-32.
12. Bird, R. B., Stewart, W. E. & Lightfoot, E. N., 2007. *Fenómenos de Transporte*. México: Reverté.
13. Bonnet, M. y otros, 2009. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions.. *Food Hydrocolloids*, Volumen 23(1), pp. 92-101.
14. Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review*, Volumen 56, pp. 317-333.
15. Chanamai, R. & McClements, D., 2000. Creaming stability of flocculated monodisperse oil-in-water emulsions.. *Journal of Colloid and Interface Science*, Volumen 225 (1), pp. 214-218.
16. Cole, M. L. & Whateley, T. L., 1997. Release rate profiles of theophylline and insulin from stable multiple w/o/w emulsions. *Journal of Controlled Release*, Volumen 49 (1), pp. 51-58.
17. Cornec, M. y otros, 1998. Emulsion stability as affected by competitive adsorption between an oil-soluble emulsifier and milk proteins at the interface. *Journal of Food Science*, Volumen 63, pp. 39-43.
18. Decker, E. A., 1997. Phenolics: Prooxidants or antioxidants. *Nutritional Reviews*, Volumen 55, pp. 396-398.
19. Dickinson, E., 2008. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter*, pp. 932-942.
20. Dickinson, E., 2011. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. *Food Biophysics*, Volumen 6, pp. 1-11.
21. Florence, A. & Whitehill, D., 1985. *Stability and stabilization of water-in-oil-in-water multiple emulsions*. Washington D.C.: Macro- and Microemulsions: Theory and Applications. ACS Symposium Series 272.
22. Ford, A. & Roberts, A., 1998. Colour Space Conversions. En: s.l.:s.n.
23. Fujita, H., 1952. The extract pattern of a concentration-dependent diffusion in a semi-infinite medium.2.. *Textile Research Journal*, Volumen 22 (12), pp. 823-827.

24. Garti, N., Aserin, A. & Cohen, Y., 1994. Mechanistic considerations of the release of electrolytes from multiple emulsions stabilized by BSA and nonionic surfactants. *Journal of Controlled Release*, Volumen 29 (1-2), pp. 41-51.
25. Garti, N., Seiller, M. & Grossiord, J., 1998. *Multiple emulsions: structure properties and applications*. Paris: Editions de Santé.
26. Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E., 2001. Anthocyanins characterization and measurements with UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
27. Goldblatt, M. y otros, 2006. New polyelectrolyte emulsion breaker improves oily wastewater clean up at lower usage rates. *Water and Process Technologies*, pp. 1-6.
28. Goncalves, B. y otros, 2007. Effect of ripness and postharvest storage on the evolution of color and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, Volumen 103, pp. 976-984.
29. Gorriti G., A. y otros, 2009. Extracción de Antocianinas de las corontas de *Zea mays* L. "Maíz Morado".. *Ciencia e Investigación*, Volumen 12 (2), pp. 64-74.
30. Griffin, W., 1946. *Journal of Society of Cosmetic Chemists*, Volumen 1, p. 311.
31. Harborne, J. B., 1989. General procedures and measurements of total phenolics. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Volumen 50, pp. 5-18.
32. Hino, T. y otros, 2000. Drug release from w/o/w emulsions prepared with different chitosan salts and concomitant creaming up. *Journal of Controlled Release*, Volumen 69 (3), pp. 413-419.
33. Hunter, R. J., 1989. *Foundations of Colloid Science*. Oxford, UK: Oxford University Press.
34. Israelachvili, J. N., 1992. *Intermolecular and Surface Forces*. Londres: Academic Press.

35. Jiménez-Alvarado, R. y otros, 2009. Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, Volumen 23, pp. 2425-2433.
36. Jing, P. & Giusti, M., 2005. Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corncobs (*Zea mays* L.) and it's application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 53, pp. 8775-8781.
37. Kim, D.-O., Lee, K., Lee, H. & Lee, C., 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 50, 3713-3717.
38. Kim, M. & Shah, D., 1990. Mass transfer studies on multiple emulsion as a controlled mass release system. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 7(3), pp. 163-168.
39. Kuskoski, E. M. y otros, 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Volumen 25(4), pp. 726-732.
40. Laugel, G., Baillet, A., Seiller, M. & Ferrier, D., 1998. Oil-water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: Comparition with simple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, Volumen 160 (1), pp. 109-117.
41. Liang, Z. y otros, 2011. CIELAB Coordinates in Response to Berry Skin Anthocyanins and Their Composition in Vitis.. *Journal of Food Science*, Volumen 76 (3), pp. 490-497.
42. Li, B. y otros, 2011. Study of the Encapsulation Efficiency and Controlled Release Property of Whey Protein Isolate-Polysaccharide Complexes in W1/O/W2 Double Emulsions. *International Journal of Food Engineering*, Volumen 7:3, pp. 1-25.
43. Malone, M. E., Appleqvist, I. A. M. & Norton, I. T., 2003. Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 2. Taste and aroma release.. *Food Hydrocolloids*, Volumen 17 (6), pp. 775-784.
44. Martin, A., Swarbrick, J. & Cammarata, N., 1993. *Physical Pharmacy*, pp. 371-373 y 487-490.

45. Martínez, F., González, G. J., Culebras, J. & Tuñón, M. J., 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, Volumen 17, pp. 271-278.
46. McClements, D. J., 2005. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. Segunda ed. Massachusetts, Amherst: CRC Press.
47. Mezzenga, R., Folmer, B. & Hughes, E., 2004. Design of double emulsions by osmotic pressure tailoring. *Langmuir*, Volumen 20, pp. 3574-3582.
48. Monagas, M., Martín-Álvarez, P. J., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B., 2006. Time course of the colour of young red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle.. *International Journal of Food Science and Technology*, Volumen 41, pp. 892-899.
49. Montoya, B. H. y otros, 2003. Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *Vitae*, 10(2), pp. 72-79.
50. Mora-Rochin, S. y otros, 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking.. *Journal of Cereal Science*, Volumen 52, pp. 502-508.
51. Moyer, R. A. y otros, 2002. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Volumen 50, pp. 519-525.
52. Murillo-Martínez, M. y otros, 2010. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, pp. 1-9.
53. Myers, D., 1988. *Surfactant Science Technology*. Weinheim, Alemania: VCH Publishers.
54. O'Regan, J. & Mulvihill, D. M., 2010. Sodium caseinate-maltodextrin conjugate stabilized double emulsions: encapsulation and stability.. *Food Research International*, Volumen 43 (1), pp. 224-231.
55. Opawale, F. & Burgess, D., 1998. Influence of interfacial rheological properties of mixed emulsifier films on the stability of water-in-oil-in-water

- emulsions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volumen 50, pp. 965-973.
56. Pérez-Vicente, A., Serrano, P., Abellán, P. & García-Viguera, C., 2004. Influence of packaging material on pomegranate juice color and bioactive compounds during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volumen 84, pp. 639-644.
57. Prior, R. L. & Cao, G., 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 27(11/12), pp. 1773-1181.
58. Prior, R. L. y otros, 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* specie. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Volumen 46, pp. 2686-2693.
59. Re, R. y otros, 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medical*, Volumen 26, pp. 1234-1237.
60. Rodríguez-Saona, L. & Wrolstad, R., 2001. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
61. Rosano, H., Gandolfo, F. & Hidrot, J., 1998. Stability of W1/O/W2: multiple emulsions. Influence of Ripening and Interfacial Interactions. *Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering aspects*, Volumen 138, pp. 109-121.
62. Saehun, M. y otros, 2010. Preparation and Characterization of Water/Oil/Water Emulsions Stabilized by Polyglycerol Polyricinoleate and Whey Protein Isolate.. *Journal of Food Science*, Volumen 75 (2), pp. 116-125.
63. Sapei, L., Naqvi, M. A. & Rousseau, D., 2012. Stability and release properties of double emulsions for food applications.. *Food Hydrocolloids*, Volumen 27, pp. 316-323.
64. Scalbert, A., Manach, C. & Morand, C., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volumen 45, pp. 297-306.

65. Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M. & Adachi, S., 2006. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*, Volumen 20 (8), pp. 1164-1169.
66. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Volumen 299, pp. 152-178.
67. Swaisgood, H. E., 1996. *Characteristics of milk*, in *Food Chemistry*. 3 ed. New York, N.Y.: Marcel Dekker.
68. Tedajo, G. M. y otros, 2005. Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, Volumen 288 (1), pp. 63-72.
69. Thakur, G., 2012. Gelatin-based emulsion gels for diffusion-controlled release applications. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, Volumen 23, pp. 645-661.
70. Tsuda, T. y otros, 2003. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, Volumen 133, pp. 2125-2130.
71. Tung-Sheng, C. y otros, 2010. New Analytical Method for investigating the Antioxidant Power of Food Extracts on the Basis of Their Electron-Donating Ability: Comparison to the Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 58, pp. 8477-8480.
72. Walstra, P., 2003. *Physical Chemistry of Foods*. New York: Marcel Dekker.
73. Welty, J. R., Wicks, C. E. & Wilson, R. E., 2004. *Fundamentos de Transferencia de momento, calor y masa*. Segunda ed. México: Limusa Wiley.
74. Wrolstad, R. E., Durst, R. W. & Lee, J., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, pp. 423-428.

75. Ya-Qin, M. y otros, 2008. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from Ultrasonic treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 56, pp. 5682-5690.
76. Zheng, S., Zheng, Y., Wasan, D. & McCormick, D., 1993. Hemoglobin multiple emulsion as an oxygen delivery system. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volumen 1158, pp. 65-74.

APÉNDICES

Apéndice 1. Curvas patrón utilizadas en el análisis de extracción para la determinación de Fenoles Totales y capacidad antioxidante por el método FRAP.

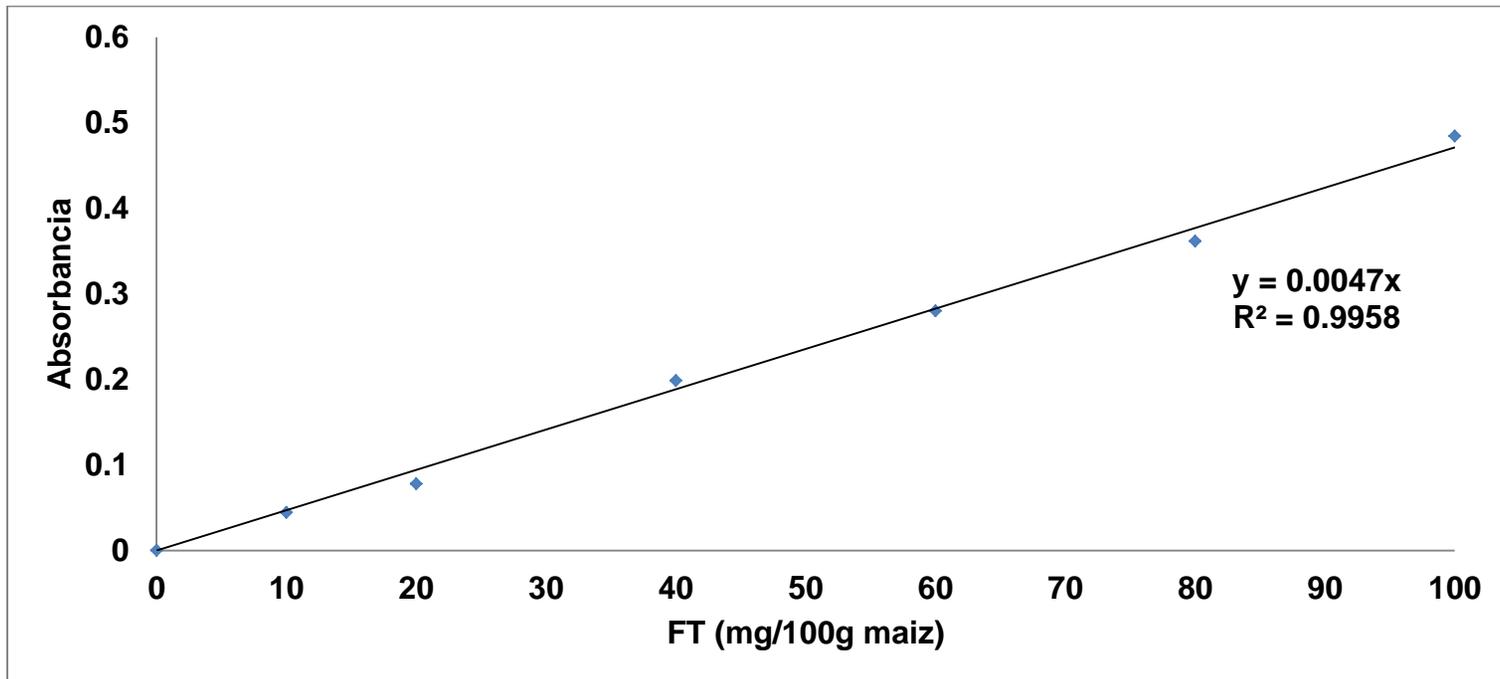


Figura A1. Curva patrón utilizada para la determinación de Fenoles Totales.

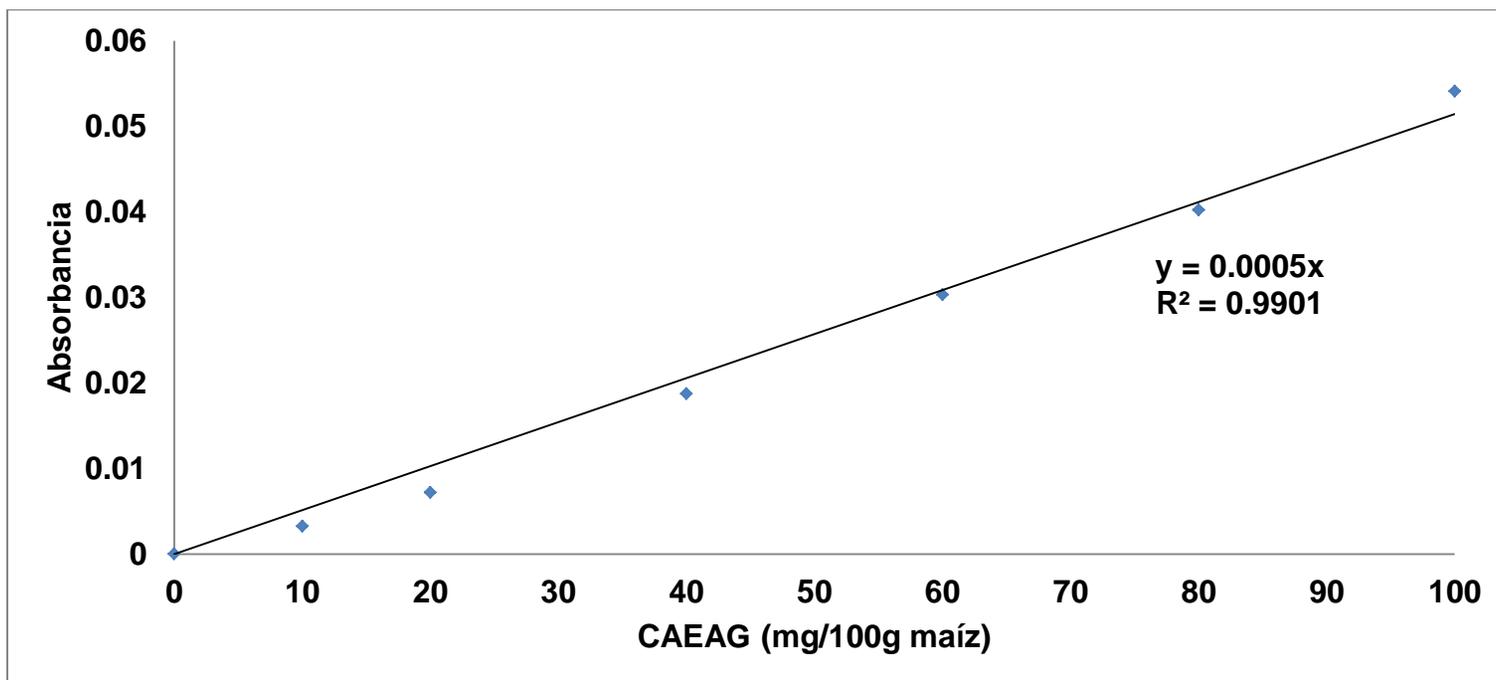


Figura A2. Curva patrón utilizada para la determinación de capacidad antioxidante con el método FRAP.

Apéndice 2. Desarrollo de las ecuaciones para el modelado de la segunda ley de Fick.

La segunda ley de Fick expresada en coordenadas cilíndricas se expresa como:

$$\frac{\partial C_t}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 D \frac{\partial C_t}{\partial r} \right) \quad (\text{a1})$$

$$D = D_{eq} e^{\left(-\beta \left(1 - \frac{C_t}{C_{eq}} \right) \right)} \quad (\text{a2})$$

Donde C_t es la concentración del extracto en la fase continua de la emulsión en el tiempo t , r es la coordenada radial del glóbulo de aceite considerando $r = 0$ el reservorio de extracto de maíz morado y $r = R_{eq}$ el radio del glóbulo de aceite en el equilibrio. D_{eq} , C_{eq} y R_{eq} se refieren a la difusión, concentración de extracto en la fase continua y radio del glóbulo de aceite, respectivamente, en el equilibrio. β es el número adimensional que relaciona la difusividad inicial y de equilibrio. Las condiciones inicial (CI) y de frontera (CF) que describen el sistema son las siguientes:

$$\text{CI:} \quad t = 0, \quad 0 \leq r \leq R_{eq}, \quad C_t = 0 \quad (\text{a3})$$

$$\text{CF1:} \quad t > 0, \quad r = 0, \quad \frac{\partial C_t}{\partial r} = 0 \quad (\text{a4})$$

$$\text{CF2:} \quad t > 0, \quad r = R_{eq}, \quad -D \frac{\partial C_t}{\partial r} = k_c (C_t - C_\infty) \quad (\text{a5})$$

La CF2 representa la transferencia de masa entre la superficie del glóbulo de aceite y la fase continua de la emulsión, siendo k_c el coeficiente convectivo de transferencia de masa y C_∞ la concentración de extracto en la fase fluida.

Se utilizaron $C = C_t/C_{eq}$, $\tau = t/t_{eq}$ y $\varepsilon = r/R_{eq}$ para la adimensionalización del sistema:

$$\frac{\partial C}{\partial \tau} = Da \frac{1}{\varepsilon^2} \frac{\partial}{\partial \varepsilon} \left(\varepsilon^2 e^{(-\beta(1-C))} \frac{\partial C}{\partial \varepsilon} \right) \quad (\text{a6})$$

Donde $Da = t_{eq} D_{eq} / R_{eq}^2$. Las condiciones inicial y de frontera quedaron de la siguiente forma:

$$\text{CI:} \quad \tau = 0, \quad 0 \leq \varepsilon \leq 1, \quad C = 0 \quad (\text{a7})$$

$$\text{CF1:} \quad \tau > 0, \quad \varepsilon = 0, \quad \frac{\partial C}{\partial \varepsilon} = 0 \quad (\text{a8})$$

$$\text{CF2:} \quad \tau > 0, \quad \varepsilon = 1, \quad -\frac{\partial C_t}{\partial r} = Sh \left(C - C_\infty / C_{eq} \right) e^{\beta(1-C)} \quad (\text{a9})$$

Sh es el *número de Sherwood* que describe la transferencia de masa molecular con respecto a la resistencia del fluido a la transferencia de masa por convección.

$$Sh = \frac{k_c R_{eq}}{D_{eq}} \quad (\text{a10})$$

El modelo discretizado que es el que se utiliza en el código en Matlab es el siguiente:

$$\frac{\partial C_i}{\partial \tau} = Da e^{\beta(C_i-1)} \left[\frac{1}{\Delta \varepsilon^2} (C_{i+1} - 2C_i + C_{i-1}) + \left(\frac{C_{i+1} - C_i}{2\Delta \varepsilon} \right)^2 + \frac{1}{\varepsilon_i \Delta \varepsilon} (C_{i+1} - C_{i-1}) \right] \quad (\text{a11})$$

Con:

$$\varepsilon_i = \frac{i-1}{Nr}, \quad i = 2, 3, \dots, Nr-1 \quad (\text{a12})$$

$$\text{Cl:} \quad \tau = 0, \quad 0 \leq \varepsilon \leq 1, \quad C_i = 0, \quad i = 2, 3, \dots, Nr-1 \quad (\text{a13})$$

$$\text{CF1:} \quad \begin{aligned} &\tau > 0, \quad \varepsilon = 0 \\ &C_1 = \frac{4C_2 - C_3}{3} \end{aligned} \quad (\text{a14})$$

$$\text{CF2:} \quad \begin{aligned} &\tau > 0, \quad \varepsilon = 1 \\ &C_{Nr} = \frac{4C_{Nr-1} - C_{Nr-2} + 2Sh\Delta\varepsilon(-C_{Nr} + C_\infty/C_{eq})e^{\beta(1-C_{Nr})}}{3} \end{aligned} \quad (\text{a15})$$

Siendo Nr el número de puntos de discretización.

Apéndice 3. Código utilizado para la determinación de coeficiente de difusión a partir de la primera ley de Fick.

```
% inicio del archivo liberacionoficial9d.m
% trabajo de tesis de karen estrada
% proyecto tesis de maestría
% calculo del coeficiente de difusión de la liberación de extracto de maíz
% morado en la emulsion doble usando la primera ley de Fick
%
%-----
function liberacionoficial9d
%-----
clc; clear all; format compact;
% datos experimentales
global t_exp Ca_exp
t_exp = [86400 172800 432000 604800 777600 1209600]; % tiempo en segundos
Ca_exp = [0.323036584 0.506185042 0.802404747 1.094350018 1.29933255 1.756558116];
% cm3 de extracto lib / cm^3 de emulsion
% parametros del problema
Ca0 = 100; % concentracion inicial en el interior de gota mL de extracto / mL de emulsion
A0 = 24.9655e-8; % cm^2, área de la gota interna
k = 0.0468; % coeficiente de reparto
d0 = 0.0001; % cm, espesor de la membrana de aceite 1 micrometro del articulo
% condición inicial de difusion
D0 = 1e-8;
x0 = D0;
options=optimset('LargeScale','off','Display','iter','HessUpdate','bfgs');
% uso de la rutina fminunc para la optimizacion no lineal
[x,fmin,flag,output,grad,hess]=fminunc(@fobj,x0,options,t_exp,Ca_exp);
% impresion de resultados
fprintf('D = %f \n',x(1))
% calculo del modelo diferencial
[t,Ca]=ode15s(@modelo,[t_exp(1) t_exp(end)],[Ca_exp(1)],[],x)
tm = t/(24*3600);
t_exp = [0 86400 172800 432000 604800 777600 1209600 1728000 1814400 1987200 2246400 2592000 2851200
3024000]/(24*3600)
```

```

Ca_exp = [0 0.323036584 0.506185042 0.802404747 1.094350018 1.29933255 1.756558116 2.265751417 2.288997862
2.384899148 2.519521463 2.655636292 2.563232261 2.704812582];
%Datos obtenidos en el ajuste del día 20 al 35
t2 = [1728000 1857600 1987200 2116800 2246400 2376000 2505600 2635200 2764800 2894400]/(24*3600);
Ca2 = [2.2890 2.3469 2.4048 2.4627 2.5205 2.5783 2.6360 2.6938 2.7514 2.8091];
% trazo de la respuesta
figure(3), plot(tm,Ca,'k',t_exp,Ca_exp,'bo',t2,Ca2,'k', 'linewidth', 2)
xlabel('t [ días ]'),ylabel('C [ % de Extracto Liberado ]')
legend('modelo','datos experimentales')

%-----
function fun = fobj(x,t_exp,Ca_exp)
%-----
% rutina para el calculo de la funcion objetivo
% aplicando el metodo de minimos cuadrados no lineales
Ca0 = Ca_exp(1); % condicion inicial
t_span = [t_exp(1) t_exp(end)];%intervalo de integracion
soln = ode15s(@modelo,t_span,Ca0,[],x); % uso de la rutina ode15s para la resolucio de la EDO
Ca = deval(soln,t_exp); % obtencion del valor de la concentracion en los valores de
% los datos experimentales
fun = 0; % inicializacion de la funcion objetivo
for i=1:length(Ca_exp)
    fun = fun + (Ca_exp(i) - Ca(i))^2;
end
%-----
function dCadt = modelo (t,Ca,x)
%-----
% ruina para la declaracion de la ecuacion
Ca0 = 100; % concentracion inicial en el interior de gota microL de extracto / mL de emulsion
A0 = 24.9655e-8; % cm^2, área de la gota interna
k = 0.0468; % coeficiente de reparto
d0 = 0.0001; % cm, espesor de la membrana de aceite 1 micrometro del articulo
D = x(1);% reasignacion de parametros
dCadt = ((D*A0*k)/d0)*(Ca0-Ca); %ley de Fick
% fin del archivo liberacionoficial9d.m

```

Apéndice 4. Código utilizado para la determinación de coeficiente de difusión a partir de la segunda ley de Fick.

```
% inicio del archivo emulsionDifusionConvectivoOficial.m
% modelo con resistencia interna y externa
% trabajo de tesis de karen estrada
% proyecto tesis de maestría
% calculo del coeficiente de difusión de la liberación de extracto de maíz
% morado en la emulsion doble usando la segunda ley de Fick
%
function emulsionDifusionCovectivoOficial
clc; clear all; format compact;
% datos
t_exp = [0 86400 172800 432000 604800 777600 1209600 1728000 1814400 1987200 2246400 2592000 2851200
3024000]/(24*3600); %tiempo en s
Ca_exp = [0 0.323036584 0.506185042 0.802404747 1.094350018 1.29933255 1.756558116 2.265751417 2.288997862
2.384899148 2.519521463 2.655636292 2.563232261 2.704812582];
teq = t_exp(end); % dias
Rd = 5.4e-4/2; % cm radio de globulo de aceite
Deq = 9e-6; % cm2/dia
DEQ =Deq/(24*3600)
beta = -1.089
Sh = 0.0001;
nr = 100; % numero de puntos de discretizacion
dE = 1/nr;
np = 14;
Ceq = Ca_exp(end);
tf = t_exp(np); % tiempo adimensional de integracion
Cinf = Ca_exp(np);
C0(1:nr-2) = 0; % concentracion adimensional inicial tau = 0
odeset = [];
[tau,Ca] = ode15s(@difusivo,[0,tf],C0,odeset,teq,Deq,beta,Rd,Sh,Ceq,Cinf,dE,nr);
C(1:length(tau),1:nr) = 0; % inicializacion del vector de composicion
C(:,2:nr-1) = Ca;
% calculo de las concentraciones de acuerdo a las condiciones de frontera
for i =1:length(tau)
```

```

        C(i,1) = ( 4*C(i,2)-C(i,3) )/3;
        C(i,nr) = ( 4*C(i,nr-1)-C(i,nr-2)+2*Sh*dE*exp(beta*(1-C(i,nr)))*(-C(i,nr)+Cinf/Ceq) )/3;
end % for i
C
t_exp = [0 86400 172800 432000 604800 777600 1209600 1728000 1814400 1987200 ...
2246400 2592000 2851200 3024000]/(24*3600); %tiempo en s
Ca_exp = [0 0.323036584 0.506185042 0.802404747 1.094350018 1.29933255 1.756558116 ...
2.265751417 2.288997862 2.384899148 2.519521463 2.655636292 2.563232261 2.704812582];

soln = ode15s(@difusivo,[0,tf],C0,odeset,teq,Deq,beta,Rd,Sh,Ceq,Cinf,dE,nr);
Cmm = deval(soln,t_exp)
figure(1)
plot(tau,C,'k',t_exp,Ca_exp,'bo','linewidth',2)
xlabel('t [días]'),ylabel('C [% de Extracto Liberado]')
legend('modelo','datos experimentales')

figure (2)
plot([0,3],[0,3],'k',Cmm,Ca_exp,'bo','linewidth',2)
xlabel('C (modelo)'),ylabel('C (experimental)')

%
function dCdtau = difusivo(tau,y,teq,Deq,beta,Rd,Sh,Ceq,Cinf,dE,nr)
Da = teq*Deq/Rd^2;
C(1:nr) = 0; % inicializacion del vector de composicion
C(2:nr-1) = y;
% calculo de las concentraciones de acuerdo a las condiciones de frontera
C(1) = ( 4*C(2)-C(3) )/3;
C(nr) = ( 4*C(nr-1)-C(nr-2)+2*Sh*dE*exp(beta*(1-C(nr)))*(-C(nr)+Cinf/Ceq) )/3;
% desarrollo de las ecuaciones diferenciales del modelo difusivo
% con resistencia interna y externa a la tranferencia de masa
for i=2:nr-1
    E(i) = ( i-1 )/nr;
    dCdtau(i-1) = Da*exp( beta*( C(i)-1 ) )*( C(i+1)-2*C(i)+C(i-1) )/dE^2 + ...
( ( C(i+1)-C(i-1) )/(2*dE) )^2 + ...
( C(i+1)-C(i-1) )/( E(i)*dE );
end
dCdtau = dCdtau';
% fin del archivo emulsionDifusionConvectivoOficial.m

```