

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

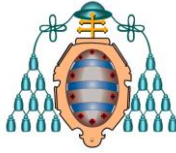
**ALIMENTOS FUNCIONALES:  
PREPARACIÓN DE UN PRODUCTO  
LÁCTEO ENRIQUECIDO CON  
RESVERATROL**

**TRABAJO FIN DE MASTER  
POR**

**MIRIAM BELTRÁN GONZÁLEZ**

**JULIO, 2013**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434.  
<http://www.unioviado.es/MBTA>



**PROFESOR TUTOR:**

Dr. Dña. M<sup>a</sup> del Carmen Pazos Medina, Catedrática de Ingeniería Química del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo.

**CERTIFICA:**

Que Dña. **Miriam Beltrán González** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7<sup>a</sup> promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 19 de julio de 2013

M<sup>a</sup> del Carmen Pazos Medina

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

# AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a la Dra. Dña. Carmen Pazos Medina, que me ha permitido realizar el Proyecto de Fin de Máster en el Grupo de Emulsiones y Fenómenos Interfaciales, por su amable dirección e inestimables correcciones en el desarrollo del mismo.

También agradecer a los integrantes de este grupo de investigación, Gemma, María y Yarima, su compañía y ayuda y, muy especialmente, a Dani, su paciencia y dedicación y, sobre todo, su cariño y amistad.

Al resto de compañeros del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, por su simpatía y apoyo y por hacer agradable el trabajo diario.

A mis compañeros de piso Héctor y Sara, por introducirme al "Asturianu" y soportar en su casa a alguien del mismo máster un año más.

A mis compañeros del Máster en Biotecnología Alimentaria, Sergio, por las risas en clase y, en especial, Laura, Derek y María, por formar una pequeña familia muy lejos de nuestras casas.

Y, por último, a mi familia y amigos, por su apoyo incondicional desde la distancia, las dos Cristinas, Granada y María y, en especial, a Patri, por conseguir sacarme una sonrisa siempre que lo necesitaba.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1. Alimentos funcionales</b> .....	<b>7</b>
2.1.1. Clasificación de los alimentos funcionales .....	8
2.1.2. Marco jurídico de la alimentación funcional.....	10
<b>2.2. Resveratrol</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3. Tensioactivos</b> .....	<b>13</b>
2.3.1. Definición y comportamiento químico .....	13
2.3.2. Clasificación de los tensioactivos .....	14
2.3.3. Fenómenos de adsorción y asociación.....	15
<b>2.4. Sistemas vesiculares</b> .....	<b>17</b>
2.4.1. Clasificación de las vesículas .....	18
<b>2.5. Niosomas</b> .....	<b>20</b>
2.5.1. Estructura niosomal y aplicaciones de los niosomas.....	20
2.5.2. Factores que influyen en la dispersión niosomal .....	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1. Materiales</b> .....	<b>37</b>
3.1.1. Materiales empleados en la formulación del sistema niosomal.	37
3.1.2. Materiales empleados en la determinación de la eficacia de encapsulación del sistema niosomal.....	38
3.1.3. Materiales empleados en la preparación del yogurt enriquecido con resveratrol .....	38
<b>3.2. Metodología experimental</b> .....	<b>39</b>
3.2.1. Preparación del sistema niosomal.....	39
3.2.2. Caracterización del sistema niosomal.....	41
3.2.3. Eficacia de encapsulación .....	45
3.2.4. Preparación de un yogurt enriquecido con resveratrol.....	49
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1. Preparación del sistema niosomal</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2. Caracterización del sistema niosomal</b> .....	<b>54</b>
4.2.1. Distribución de tamaños de partícula .....	55

4.2.2. Potencial zeta .....	64
4.2.3. Eficacia de encapsulación .....	64
4.2.4. Estabilidad .....	71
<b>4.3. Preparación de un yogurt enriquecido con resveratrol y análisis de la textura del producto .....</b>	<b>75</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>6. SÍMBOLOS.....</b>	<b>81</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>

# RESUMEN

Los cambios socioeconómicos y demográficos que ha experimentado la sociedad en las últimas décadas, han llevado a la aparición de un consumidor, que preocupado por su salud, ve en la dieta el vehículo perfecto para mantener su bienestar y calidad de vida, así como para prevenir ciertas enfermedades.

Como respuesta de la industria a esta necesidad, aparecen los alimentos funcionales, objetivo final del presente Trabajo Fin de Máster, con el que se pretende preparar un yogur enriquecido con resveratrol, un antioxidante, presente de manera natural en la uva y el vino, con reconocidas propiedades beneficiosas para la salud.

En primer lugar, se procedió a la encapsulación del resveratrol mediante niosomas, vesículas microscópicas formadas a partir de tensioactivos no iónicos. Para ello, se prepararon distintas dispersiones niosomales con dos tensioactivos diferentes y un aditivo estabilizador de membrana, susceptible de ser empleado en la industria alimentaria.

Posteriormente, se procedió a la caracterización de las dispersiones niosomales obtenidas con el fin de determinar la formulación, composición y preparación idóneas con las que conseguir los sistemas más estables y de mayor eficacia de encapsulación.

La determinación de la eficacia de encapsulación de los sistemas formulados se llevó a cabo analizando la concentración de resveratrol total y encapsulado, tras la separación del resveratrol libre mediante diálisis.

Por último, los sistemas niosomales formulados con cada tensioactivo, que presentaban mayor eficacia de encapsulación, se incorporaron a un yogurt natural, del que se determinaron sus propiedades texturales.

## **ABSTRACT**

Over the last few decades society has seen important socioeconomic and demographic changes that have led to new consumers, who are worried about their health. Many of them think diet is the best way to maintain their well-being and quality of life, as well as to prevent certain diseases.

As a response to this requirement, industry begins to produce functional foods. This is the main goal of this work, where it is intended to prepare a yogurt enriched with resveratrol, a natural antioxidant found in grapes and wine with recognized beneficial health properties.

First, encapsulation of resveratrol in niosomes, microscopic vesicles made of non-ionic surfactants, was carried out. Niosomal dispersion was prepared with two different surfactants and a food-grade additive as membrane-stabilizer.

Then, these dispersions were characterized to determine the best formulation, composition and preparation procedure yielding stable systems with high encapsulation efficiency.

Encapsulation efficiency was obtained analyzing both total and encapsulated resveratrol concentration, after removing free resveratrol by dialysis.

Finally, the best niosomal system formulated with each surfactant and showing the highest encapsulation efficiency was added to a yogurt and its textural properties were analyzed.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Evolución del comportamiento del consumidor respecto al consumo de alimentos funcionales	4
Figura 2.1	Formas isómeras del resveratrol	12
Figura 2.2	Estructura y ubicación del tensioactivo en la interfase	14
Figura 2.3	Monoesterato de sorbitan (Span 60)	15
Figura 2.4	Fenómeno de adsorción de un tensioactivo	16
Figura 2.5	Estructura de una micela y una vesícula	17
Figura 2.6	Estructura de una vesícula	18
Figura 2.7	Clasificación de las vesículas según su estructura	19
Figura 2.8	Estructura niosomal	20
Figura 2.9	Factores que afectan a la dispersión niosomal	21
Figura 2.10	Escala HLB	23
Figura 2.11	Efecto de la estructura del tensioactivo en la formación del niosoma	24
Figura 2.12	Factores que afectan al parámetro crítico de empaquetamiento (CPP)	25
Figura 2.13	Efecto de la naturaleza del compuesto encapsulado en la formación del niosoma	27
Figura 2.14	Método de dispersión de película seca	28
Figura 2.15	Ciclos de congelación/descongelación	29
Figura 2.16	Sonicación	29



Figura 2.17	Método de deshidratación/rehidratación	30
Figura 2.18	Método de extrusión	31
Figura 2.19	Aplicación del método de extrusión a vesículas MLV-FAT	31
Figura 2.20	Aplicación del método de extrusión a vesículas DRV	32
Figura 2.21	Aplicación de microfluidización a vesículas DRV	32
Figura 2.22	Preparación de esferas multilamelares	33
Figura 2.23	Preparación de vesículas por el método de evaporación en fase inversa	34
Figura 2.24	Método de diálisis con detergente	34
Figura 2.25	Método de inyección de etanol	35
Figura 2.26	Método pro-liposoma	35
Figura 3.1	Especificaciones técnicas del homogeneizador SilentCrusher M	39
Figura 3.2	Especificaciones técnicas del Rotor 8F	40
Figura 3.3	Especificaciones técnicas del homogeneizador ultrasónico CY-500	40
Figura 3.4	Características operativas del Malvern Zetasizer Nano ZS	43
Figura 3.5	Turbiscan Lab Expert (Formulacion, Francia)	44
Figura 3.6	Experimento de diálisis	46
Figura 3.7	Esquema del proceso de diálisis para la separación del RSV encapsulado	47
Figura 3.8	Cromatógrafo HPLC (Hewlett Packard series 1100, USA)	48

Figura 3.9	Esquema del funcionamiento de un equipo de HPLC	49
Figura 3.10	Fotografías del proceso de preparación de yogurt enriquecido con RSV	50
Figura 3.11	Especificaciones técnicas del texturómetro TA.XTplus (Stable Micro System, USA)	52
Figura 4.1	Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Span 60/Dodecanol con una relación en peso 1:1.5	71
Figura 4.2	Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Span 60/Dodecanol con una relación en peso 1:1	72
Figura 4.3	Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Labrasol/Dodecanol con una relación en peso 1:0.5	73
Figura 4.4	Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Labrasol/Dodecanol con una relación en peso 1:1	74
Figura 4.5	Cremado en sistemas niosomales formulados con Span 60 (izquierda) y con Labrasol (derecha)	75
Figura 4.6	Análisis textural de yogurt natural	76
Figura 4.7	Análisis textural de yogurt natural con Span 60/ Dodecanol / Resveratrol	77
Figura 4.8	Análisis textural de yogurt natural con Labrasol/ Dodecanol / Resveratrol	77

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1	Nutrientes y componentes alimentarios con propiedades funcionales	8
Tabla 2.2	Tipos de vesículas y sus principales componentes	19
Tabla 2.3	Efecto del HLB en la formación del niosoma	23
Tabla 2.4	Efecto del CPP en la formación del niosoma	26
Tabla 4.1	Diseño factorial de experimentos para cada tensioactivo	53
Tabla 4.2	Tamaño medio e índice de polidispersividad para los sistemas niosomales formulados con Span 60	55
Tabla 4.3	Análisis de la varianza de la agitación sobre el tamaño para los sistemas niosomales formulados con Span 60	57
Tabla 4.4	Análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre el tamaño	58
Tabla 4.5	Análisis de la varianza de la agitación sobre el PDI para los sistemas niosomales formulados con Span 60	58
Tabla 4.6	Análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre el PDI	59
Tabla 4.7	Tamaño medio e índice de polidispersividad para los sistemas niosomales formulados con Labrasol	60
Tabla 4.8	Análisis de la varianza de la agitación sobre el tamaño para los sistemas niosomales formulados con Labrasol	61
Tabla 4.9	Análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre el tamaño	62
Tabla 4.10	Análisis de la varianza de la agitación sobre el PDI para los sistemas niosomales formulados con Labrasol	63
Tabla 4.11	Análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre el PDI	63

Tabla 4.12	Valores de potencial zeta para sistemas niosomales formulados con Span 60 o Labrasol como tensioactivos	64
Tabla 4.13	Eficacias de encapsulación para los sistemas niosomales formulados con Span 60	65
Tabla 4.14	Análisis de la varianza de la agitación sobre la eficacia de encapsulación de los sistemas niosomales formulados con Span 60	66
Tabla 4.15	Análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre la eficacia de encapsulación	67
Tabla 4.16	Eficacias de encapsulación para los sistemas niosomales formulados con Labrasol	68
Tabla 4.17	Análisis de la varianza de la agitación sobre la eficacia de encapsulación de los sistemas niosomales formulados con Span 60	69
Tabla 4.18	Análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre la eficacia de encapsulación	69
Tabla 4.19	Análisis textural del yogurt	76

# **1. INTRODUCCIÓN**

A la espera de una definición oficial por parte de la Comunidad Europea, el *European Food Information Council* (EUFIC) habla de los *alimentos funcionales* como aquellos que se consumen dentro de una dieta habitual y que se caracterizan por contener componentes biológicos activos, los cuales aportan efectos beneficios a la salud del individuo, que se traducen en una mejora de su calidad de vida y en una disminución del riesgo de padecer determinadas enfermedades.

Tradicionalmente, siempre se han consumido ciertos alimentos por las características beneficiosas que les eran atribuidas (té, ajos, cebolla,...) relacionándolas con la prevención o el tratamiento de enfermedades y poniendo de manifiesto la influencia de la dieta sobre la salud.

Sin embargo, es en Japón, en los años 80, donde aparece por primera vez el concepto de alimento funcional como tal. Se trataban de productos con incorporaciones de bacterias lácticas y oligosacáridos, instaurados por el gobierno como respuesta a un crecimiento de la población anciana que disparó el gasto sanitario estatal.

En la actualidad, el auge de este tipo de alimentos es fruto de los importantes cambios socioeconómicos y demográficos que ha experimentado la sociedad en las últimas décadas. Así, aparece un consumidor opulento con una mayor esperanza de vida, alejado de la conciencia de necesidad y cuyas decisiones, a la hora de elegir un producto, están marcadas por sus propios deseos y muy influidas por la publicidad y determinadas pautas sociales, como son los cánones estéticos y la relación dieta-salud.

En este contexto de bienestar social, con las necesidades básicas cubiertas, mantener la salud se vuelve algo prioritario y los alimentos funcionales se presentan como el complemento perfecto a una alimentación variada y saludable, por su posibilidad de mejorar la salud y/o prevenir enfermedades crónicas como el cáncer, las dolencias cardiovasculares y la diabetes.

Desde el punto de vista de la oferta, representan para la industria la oportunidad de diferenciar ciertos productos considerados básicos y, por tanto, con poco margen de beneficio económico, como es el caso de los productos lácteos.

Estudios llevados a cabo por el departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología de la Universidad Politécnica de Cataluña sobre el conocimiento y la actitud de los consumidores hacia los alimentos funcionales (Gil y Mouhrat, 2003), muestran, en general, que los encuestados consideran a los alimentos funcionales productos buenos para la salud y de más calidad, aunque notablemente más caros.

Asimismo, según el *Instituto Nacional de Estadística* (INE), Figura 1.1, se observa una evolución positiva del comportamiento del consumidor respecto al consumo de alimentos funcionales.

Dentro de la amplia variedad de productos funcionales, presentes en el mercado, se encuentran los productos enriquecidos con antioxidantes. Los antioxidantes constituyen una barrera natural frente al ataque de los radicales libres metabolizados por el propio organismo y causantes del envejecimiento, la degeneración del sistema cardiovascular, inmunológico y nervioso y la posible aparición de determinados tipos de cáncer.

Los antioxidantes más empleados son los polifenoles, familia que engloba al resveratrol, que es el producto implicado en este trabajo.

El resveratrol es un polifenol natural presente en varias plantas y frutos, el cual destaca por su elevada concentración en la uva y el vino tinto. Aparece como respuesta de la planta al estrés fúngico o a la radiación ultravioleta (UV). Al igual que otros polifenoles, se caracteriza por ser muy sensible a los factores ambientales: luz ultravioleta, procesos oxidativos, temperaturas elevadas... por lo que se hace necesaria su encapsulación para alargar su vida útil.

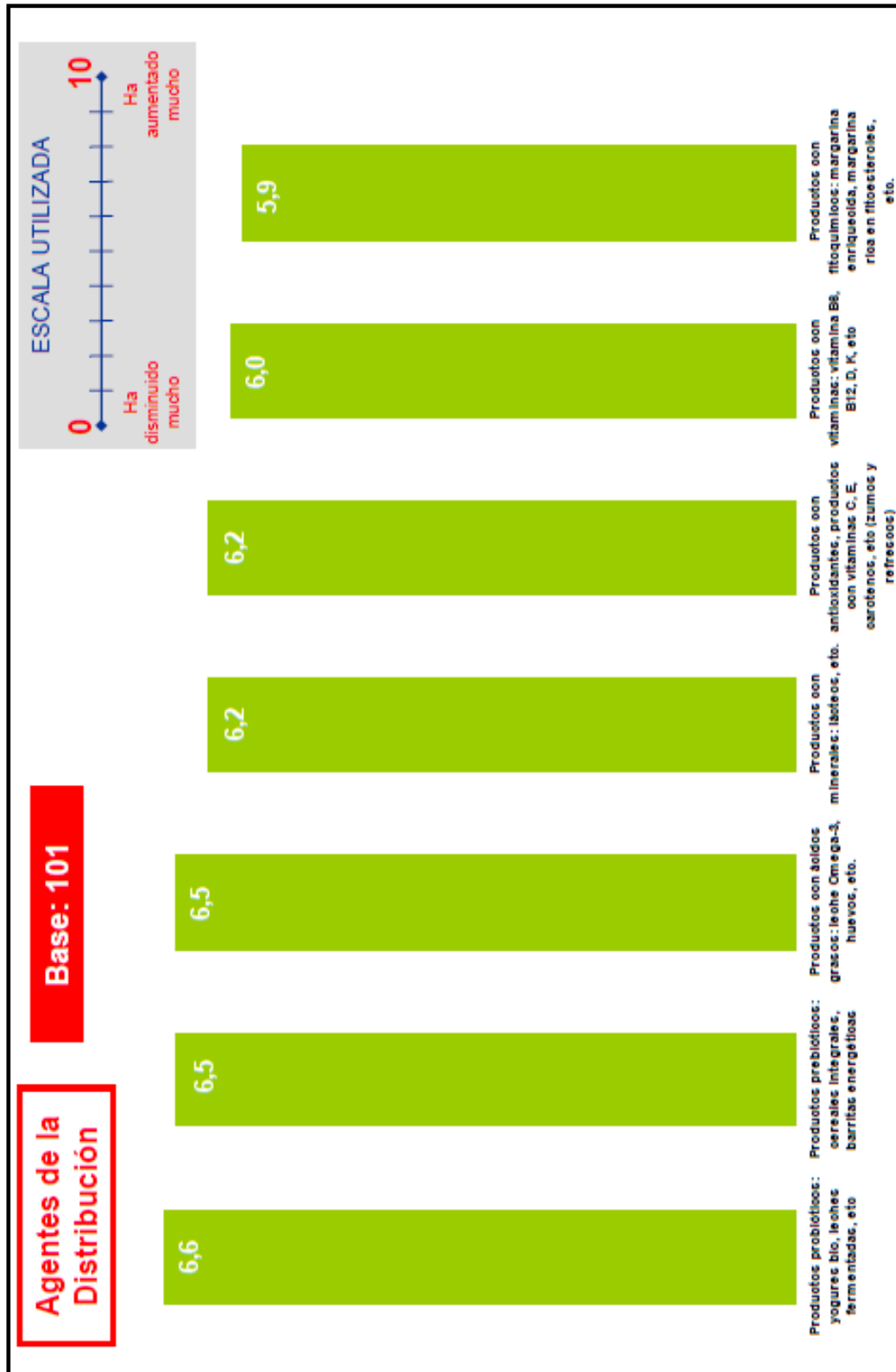


Figura 1.1. Evolución del comportamiento del consumidor respecto al consumo de alimentos funcionales



En la mayoría de los estudios previos de encapsulación de resveratrol, ésta se llevaba a cabo mediante liposomas, vesículas constituidas por fosfolípidos organizados formando una doble capa.

Como alternativa, en este trabajo se ha realizado la encapsulación de resveratrol en niosomas de grado alimentario, vesículas formadas por tensioactivos no iónicos. Este proceso presenta, además de su novedad, dos ventajas respecto a los liposomas: mayor estabilidad química y menor coste de las vesículas, lo que de cara a una futura producción industrial del alimento funcional resulta muy interesante.

El objetivo último de este trabajo es la preparación de un alimento funcional, más concretamente de un producto lácteo (yogurt), enriquecido con resveratrol. La encapsulación se realizará en niosomas de grado alimentario preparados a partir de dos tensioactivos no iónicos diferentes.

Previamente, se estudiarán las variables que influyen en la formulación y preparación de estos sistemas con el fin de conseguir la máxima estabilidad y eficacia de encapsulación del principio activo.

## **2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS**

## 2.1. Alimentos funcionales

Como se comentó anteriormente, la alimentación funcional surge como respuesta de la industria a la evolución histórica de la ciencia de la nutrición, en la que se pasa de evitar la mala alimentación y el déficit nutricional en la dieta a la promoción del bienestar y la salud.

Bajo esta nueva premisa, se considera que un alimento es funcional, si queda demostrado científicamente que afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo, dentro de un contexto de estilo de vida saludable, contribuyendo a la mejora de la calidad de vida y a la prevención de determinadas enfermedades ([Diplock et al., 1999](#)).

El alimento funcional debe reunir similares características de presentación (sabor, color, aroma,...) que su homólogo no funcional e igual forma de consumo y propiedades nutritivas, pero con el valor biológico añadido de una efecto positivo sobre la salud.

Este efecto positivo puede venir dado, bien por la adición de un componente beneficioso al alimento, o bien por la eliminación de componentes nocivos o no deseados de éste.

En la Tabla 2.1 se resumen las características de varios componentes alimentarios con propiedades funcionales.

Tabla 2.1. *Nutrientes y componentes alimentarios con propiedades funcionales (Marcos et al., 2003)*

<b>Nutrientes/Componentes alimentarios</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Patologías más comunes relacionadas</b>
Fibra alimentaria	Regulación del equilibrio bacteriano. Mejora del tránsito intestinal. Dilución de los agentes carcinógenos.	Cáncer colorrectal. Estreñimiento / diverticulosis.
Antioxidantes	Eliminación de radicales libres. Inhibición de la peroxidación lipídica.	Enfermedades cardiovasculares. Cáncer.
Bacterias ácido-lácticas	Mejora de la digestibilidad de la lactosa. Aumento de la absorción de calcio. Estimulación del sistema inmunitario.	Intolerancia a la lactosa. Estreñimiento/diarrea. Gastroenteritis. Cáncer.
Ácidos grasos omega-3	Reducción de triglicéridos y LDL-colesterol. Reducción de la agregación plaquetaria.	Enfermedades cardiovasculares.
Micronutrientes: Se, Fe, Cu, Zn, Mg, Ca...	Cofactores enzimáticos. Estimulación del sistema inmunitario.	Enfermedades cardiovasculares. Cáncer. Osteoporosis. Anemia.
Aminoácidos	Efecto sedante. Mejora de la memoria. Recuperación de la fatiga mental. Estimulación del sistema inmunitario.	Regulación del sueño. Estrés.
Cafeína	Estimulación del sistema nervioso central.	

### 2.1.1. Clasificación de los alimentos funcionales

En España se comercializa una gran variedad de productos funcionales. Los últimos estudios constatan que más del 40% de los hogares consumen este

tipo de alimentos y casi el 75% admite haberlos comprado alguna vez (Sánchez y Barrena, 2004).

La clasificación más generalizada es la siguiente:

- **Leches enriquecidas.** La leche desnatada y semidesnatada se enriquece habitualmente con vitaminas A y D y calcio asimilable, con el fin de restablecer las vitaminas eliminadas en el proceso de desnatado, las cuales mejoran la absorción del calcio y previenen la aparición de enfermedades como la osteoporosis.
- **Alimentos enriquecidos con probióticos.** Son alimentos que contienen organismos vivos. Consumidos en dosis suficiente, ejercen una serie de funciones beneficiosas en el organismo, como fomentar el equilibrio de la flora intestinal y estimular el sistema inmunitario. Los productos más conocidos son lácteos, en especial, yogures tipo bífidos.
- **Alimentos enriquecidos con prebióticos.** Los prebióticos son sustancias (distintos tipos de fibra, fundamentalmente) que tras su ingesta resultan capaces de superar la digestión y servir de sustrato fermentable a la microflora bacteriana del intestino, para su metabolismo, crecimiento y reproducción. Esto repercute muy positivamente en el organismo, ya que se mejora el tránsito intestinal y la absorción de nutrientes. De nuevo, los productos lácteos enriquecidos con prebióticos son el ejemplo más habitual en nuestros mercados.
- **Alimentos enriquecidos con fitoesteroles.** Los fitoesteroles son compuestos vegetales que dificultan la absorción de colesterol, ayudando a la reducción de niveles elevados en sangre del llamado colesterol "malo". En la dieta existen varias fuentes de fitoesteroles, presentes en frutos secos, como las nueces o almendras, cereales integrales y aceites vegetales. Sin embargo, la ingesta habitual de estos productos está muy por debajo de los límites que tendrían un efecto beneficioso para la salud, lo que justifica su implementación industrial en margarinas, yogures y leches, fundamentalmente.
- **Alimentos enriquecidos con antioxidantes.** Los antioxidantes son sustancias que, en pequeñas cantidades, logran bloquear el efecto nocivo de los radicales libres implicados en los procesos de

envejecimiento celular y la posible aparición de determinados tipos de dolencias, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Además, ayudan a la conservación de los alimentos, lo cual les otorga verdadera relevancia industrial (Gülçin, 2010). Los antioxidantes de mayor relevancia son las vitaminas, tanto hidrosolubles (Vitamina C), como liposolubles (Vitaminas A y E), y los compuestos fenólicos o polifenoles, entre los que se encuentra el resveratrol.

### 2.1.2. Marco jurídico de la alimentación funcional

El etiquetado y la publicidad de los alimentos funcionales contienen declaraciones nutricionales y alegaciones a sus propiedades saludables. Los consumidores son muy vulnerables a este tipo de manifestaciones por lo que resulta necesario un marco regulador que los proteja.

En la Unión Europea, aunque aún no existe mucha legislación, la denominación, desarrollo y comercialización de los alimentos funcionales está regulada en el *Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos*.

Su objetivo, según el artículo 1 del mismo, es garantizar un elevado nivel de protección de los consumidores, certificando que los productos comercializados sean seguros y posean un etiquetado adecuado, con la sustancia funcional que presente el producto y la cantidad exacta que contiene.

## **2.2. Resveratrol**

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es un polifenol natural de la familia de los estilbenos. Se considera un potente antioxidante (Gülçin, 2010), que está presente en más de 72 plantas (Jang et al., 1997).

Se introduce en la dieta, en pequeñas cantidades, a través de frutos, como cacahuetes, moras y arándanos, encontrándose también en el coco y en el

chocolate negro. Sin embargo, la principal fuente de resveratrol la constituyen la piel y las semillas de la uva y, en consecuencia, el vino (especialmente tinto) (Fernández-Mar et al., 2012), tan propio de nuestra zona mediterránea.

En la naturaleza actúa como una fitoalexina, sustancia química sintetizada por las plantas en respuesta a una situación de estrés (radiación ultravioleta, infecciones fúngicas, sustancias químicas, parásitos,...), que actúa como mecanismo de inhibición de posibles infecciones. Tanto es así, que la concentración de resveratrol en la planta dependerá de los citados factores exógenos.

Aunque ya era utilizado en medicina curativa hace más de 2000 años, fue detectado en la vid *Vitis vinífera* en 1976 (Langcake y Pryce, 1976) y en el vino en 1992 (Siemann y Creasy, 1992). Sin embargo, no cobró verdadero interés hasta su implicación en la llamada "paradoja francesa" (Renaud y de Lorgeril, 1992), que hablaba sobre la incoherencia de como la población francesa, aún teniendo una dieta muy rica en grasas saturadas, poseía un índice de mortalidad por enfermedad cardiovascular un 40% inferior al resto de Europa. Hoy en día, son muchos los estudios que abogan por un consumo moderado de vino para prevenir el riesgo de padecer enfermedades coronarias, lo que se justifica por los componentes bioactivos presentes en el mismo.

La estructura química del resveratrol consiste en 2 anillos fenólicos unidos por un doble enlace de estireno. Debido a ese doble enlace, el resveratrol presenta dos formas isómeras: *el trans-resveratrol* y *el cis-resveratrol*.

En la Figura 2.1 se muestra la estructura química de los isómeros del resveratrol.

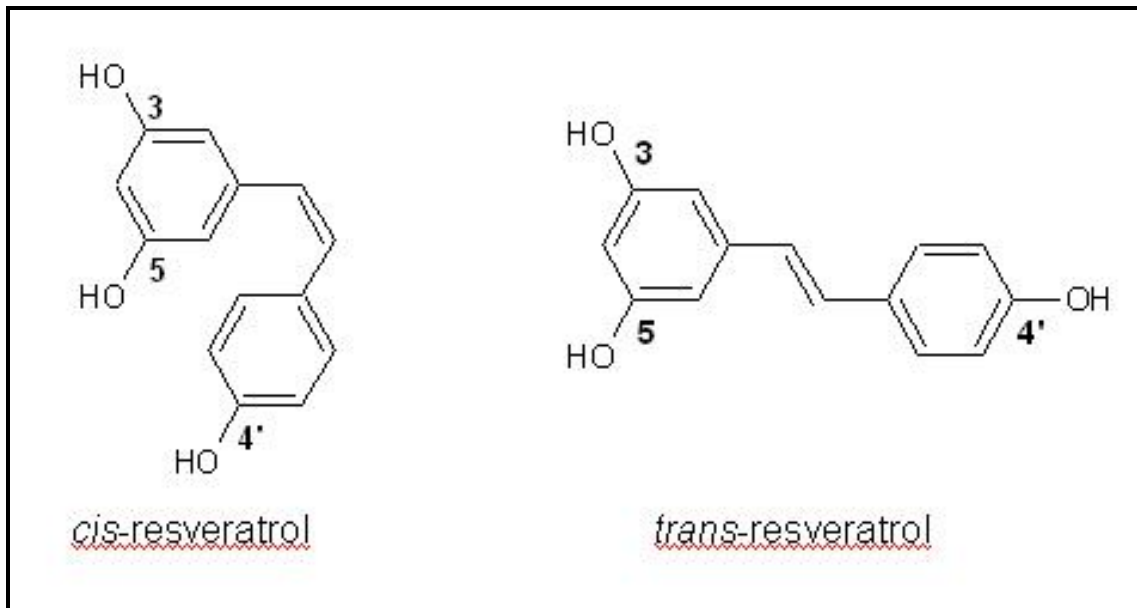


Figura 2.1. Formas isómeras del resveratrol

De ambos isómeros, el *trans-resveratrol* es el más estable y abundante, y el único que tiene efectos biológicos. El *cis-resveratrol* se puede obtener a partir del anterior mediante una reacción irreversible catalizada por la luz ultravioleta (Elíes Gómez, 2009).

Son muchos los estudios que sitúan al resveratrol como un nutracéutico, que puede ser potencialmente usado en la industria farmacéutica y alimentaria por las funciones beneficiosas que aporta: actividad antioxidante (Frémont et al., 1999; Gülçin, 2010) y anticancerígena (Jang et al. 1997) y función protectora del sistema cardiovascular previniendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Hung et al., 2000), gracias a su efecto antiinflamatorio (Orallo et al., 2002) y antiagregante plaquetario (Wang et al., 2002). Asimismo, estudios más recientes le otorgan multifuncionalidad en la prevención de enfermedades que aparecen con la edad, como la diabetes, el Alzheimer o el Parkinson (Russo et al., 2003).

Por tanto, resulta apreciable la importancia industrial del resveratrol como ingrediente funcional por sus muchas propiedades beneficiosas para la salud. Sin embargo, éstas se pueden ver limitadas por las características de la molécula, propensa a la oxidación y a la isomerización en presencia de



radiación UV, lo que justifica la encapsulación como medio necesario para aumentar su bioactividad y garantizar su estabilidad.

## **2.3. Tensioactivos**

### ***2.3.1. Definición y comportamiento químico***

Los tensioactivos o surfactantes son especies químicas caracterizadas por su naturaleza anfífila, es decir, por poseer una doble afinidad que se define, desde el punto de vista físico-químico, como una dualidad polar-apolar.

Esta característica general se debe al carácter dual de sus moléculas, compuestas por un grupo polar, hidrófilo, y un grupo no polar, hidrófobo.

El grupo hidrófilo (soluble en agua) contiene heteroátomos, como O, S, P o N, que se encuentran en un grupo alcohol, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc. El grupo hidrófobo (soluble en disolventes polares) está constituido por una cadena hidrocarbonada, tipo alquil o alquil benceno, de al menos 8 átomos de carbono. .

En cuanto a su comportamiento químico, la región hidrófila ejerce un efecto solubilizante y tiende a facilitar la disolución de la molécula, mientras que, la región hidrófoba contrarresta este efecto separándose todo lo posible de las moléculas de agua. De esta manera, para satisfacer las dos afinidades y establecer un equilibrio, los tensioactivos se sitúan en una superficie o interfase orientando sus grupos hidrófilos hacia la fase acuosa, los cuales quedan solvatados, y sus grupos hidrófobos hacia la fase no acuosa o el aire (Figura 2.2).

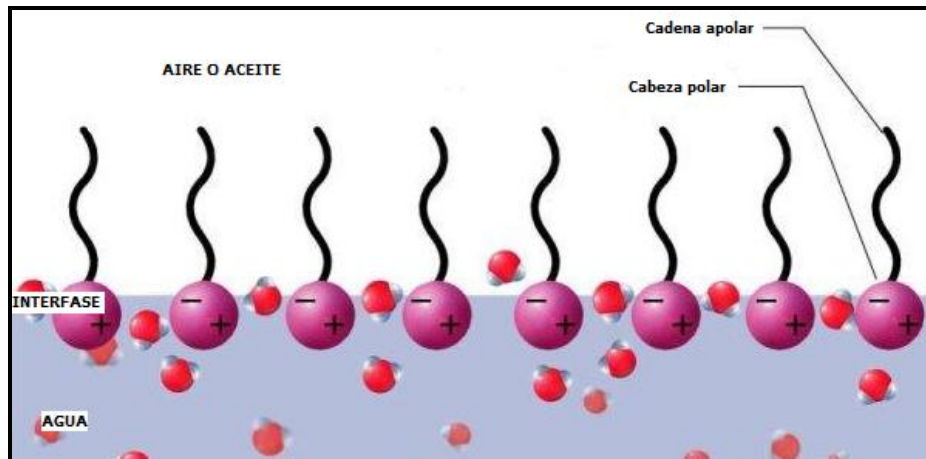


Figura 2.2. Estructura y ubicación del tensioactivo en la interfase

### 2.3.2. Clasificación de los tensioactivos

Según su forma de disociación en el agua, los tensioactivos se pueden clasificar en iónicos o no iónicos.

- **Tensioactivos iónicos.** Tienen una fuerte afinidad por el agua debido a las atracciones electrostáticas entre el grupo polar ionizado y las moléculas de agua. Se subdividen en:
  - Aniónicos. Se disocian en un anión anfífilo y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino o un amonio cuaternario. Este grupo engloba a los detergentes sintéticos, como los alquilbencenos sulfonatos, y a los jabones.
  - Catiónicos. Se disocian en un catión orgánico anfífilo y un anión, halogenuro, generalmente. La gran mayoría son compuestos nitrogenados del tipo sal de amina grasa o de amonio cuaternario. Su fabricación es más cara que en el caso de los tensioactivos aniónicos, lo que limita su uso a determinadas situaciones en las que se precisen propiedades bactericidas o facilidad de adsorción sobre sustratos biológicos o inertes de carga negativa.
  - Anfóteros. Combinan en una misma molécula dos caracteres: aniónico y catiónico. La manifestación de uno de los dos depende del pH del medio (tipo catiónico a pH ácido y tipo aniónico a pH básico).

En este grupo se encuentran aminoácidos, betaínas o fosfolípidos. Al igual que los catiónicos, también suponen un coste elevado.

- **Tensioactivos no iónicos.** Se caracterizan porque no se ionizan en disolución acuosa al poseer grupos hidrófilos de tipo alcohol, fenol, éter o amida. El grupo hidrófobo puede ser un radical alquilo o alquil benceno y a veces una estructura de origen natural, como un ácido graso, si se requiere baja toxicidad.

Los tensioactivos no iónicos son los que se utilizan en la preparación de vesículas. Sus excelentes características de estabilidad y compatibilidad, así como menor toxicidad e irritabilidad para las superficies celulares, los hacen muy adecuados para la producción de fármacos, cosméticos y alimentos. Poseen varias propiedades por lo que pueden actuar como solubilizantes, agentes humectantes y emulsionantes.

En la Figura 2.3, se muestra uno de los tensioactivos no iónicos empleados en este trabajo, el monoesterato de sorbitan o Span 60.

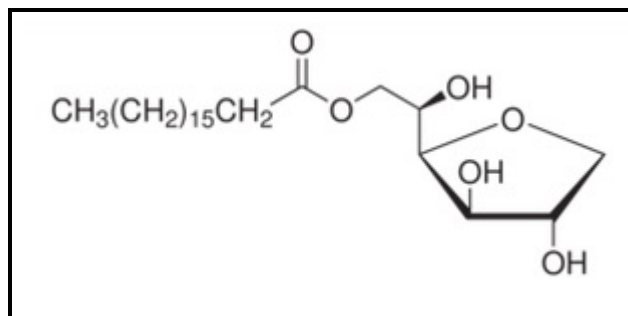


Figura 2.3. Monoesterato de sorbitan (Span 60)

### 2.3.3. Fenómenos de adsorción y asociación

La *adsorción* y la *asociación* constituyen dos de las propiedades fundamentales de los tensioactivos en disolución acuosa.

La adsorción, es el fenómeno por el cual el surfactante se ubica en una interfase o superficie orientándose de tal forma que su doble afinidad queda total o parcialmente satisfecha y disminuye su energía libre. Debido a esto,

su presencia en las interfases, incluso a concentraciones bajas, reduce considerablemente la tensión superficial del líquido.

Dependiendo de la polaridad de las distintas fases o de la superficie, el tensioactivo se adsorbe por la parte polar (cabeza) o por la región no polar (cadena o cola).

También se produce adsorción cuando solo una de las dos afinidades está satisfecha, como es el caso de la adsorción en la superficie aire-agua o en la interfase líquido-sólido (Figura 2.4).

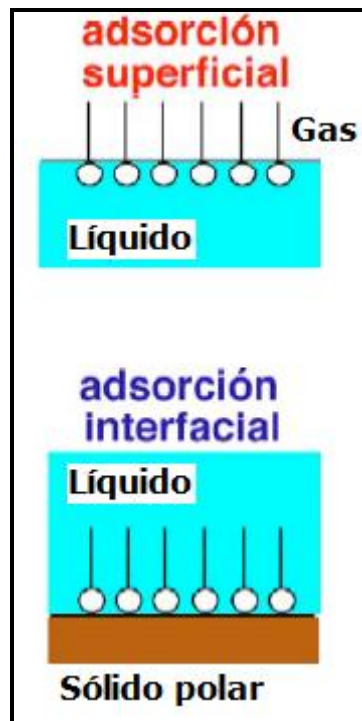


Figura 2.4. Fenómeno de adsorción de un tensioactivo

La adsorción es un fenómeno dinámico que está en equilibrio con la desorción, aunque, normalmente, dicho equilibrio se encuentra bastante desplazado hacia la primera. Esto conlleva, que las primeras moléculas de tensioactivo presentes en la disolución acuosa, movidas por el efecto hidrófobo de las colas no polares, se adsorban rápidamente en la interfase donde adquieren un estado de mínima energía. De esta manera, se llega rápidamente a la saturación de todo el espacio disponible y a la formación de una monocapa con la que comienza a darse el fenómeno de *asociación*.

Llegado a este punto, la concentración de tensioactivo presente en la disolución va aumentando hasta alcanzar la llamada *concentración micelar crítica (CMC)* y las moléculas de tensioactivo, hasta entonces en estado monómero, se asocian para formar estructuras poliméricas que pueden ser *micelas* o *vesículas*.

Las *micelas* son estructuras esféricas y de pequeño tamaño, resultado de la asociación de tensioactivos iónicos que, al tener cierta afinidad por el agua, en fase acuosa juntan sus regiones hidrófobas dejando en contacto con el líquido las cabezas polares. Las *vesículas*, en cambio, suelen estar formadas por tensioactivos no iónicos que al presentar escasa afinidad por el agua se distribuyen en una estructura de doble capa como única forma de preservar las partes hidrófobas del medio. En la Figura 2.5 se muestran las estructuras de ambas.

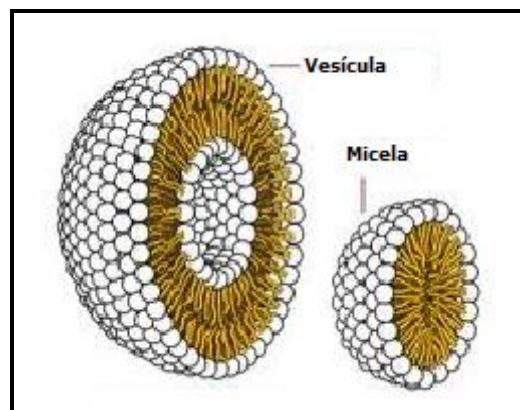


Figura 2.5. Estructura de una micela y una vesícula

## 2.4. Sistemas vesiculares

Las vesículas son partículas coloidales constituidas por moléculas de naturaleza anfífila, que se distribuyen formando una doble capa concéntrica, o bicapa, que crea un espacio interior acuoso (Uchegbu y Vyas, 1998).

Su principal utilidad es encapsular compuestos bioactivos con el fin de aumentar su solubilidad y biodisponibilidad. De esta forma, como muestra la Figura 2.6, los compuestos hidrófobos se asocian a la membrana y los hidrófilos se encierran en el compartimento acuoso.

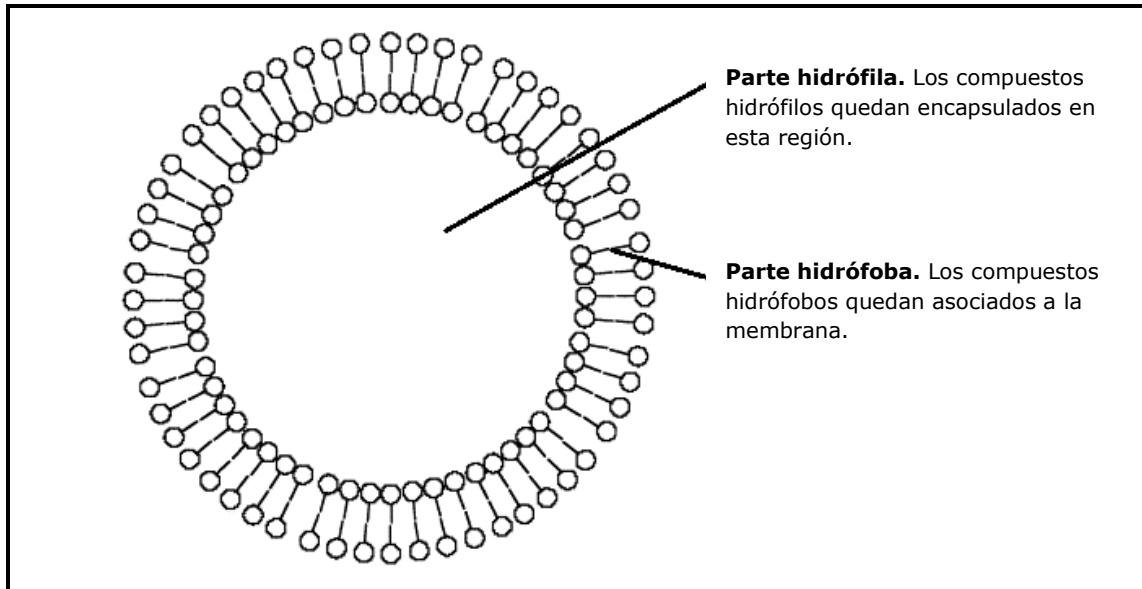


Figura 2.6. Estructura de una vesícula

#### 2.4.1. Clasificación de las vesículas

Atendiendo al tamaño y al número de dobles capas que conforman la pared de la estructura vesicular, se establece una primera clasificación para las vesículas, la cual queda esquematizada en la Figura 2.7.

- **Vesículas unilamelares**, constituidas por una sola doble capa que engloba un compartimento acuoso. Pueden ser *vesículas unilamelares pequeñas*, **SUV**, con un diámetro entre 20 y 50 nm, o *vesículas unilamelares grandes*, **LUV**, con un diámetro entre 50 y 250 nm.
- **Vesículas multilamelares**, constituidas por una doble capa que engloba a un compartimento acuoso central en donde hay otro número variable de dobles capas con sus respectivos compartimentos acuosos. El tamaño medio de partícula está comprendido entre 350 y 400 nm. Pueden ser *vesículas multilamelares*, **MLV**, si las capas son concéntricas

unas con otras, o *vesículas multivesiculares*, **MVV**, si están distribuidas aleatoriamente.

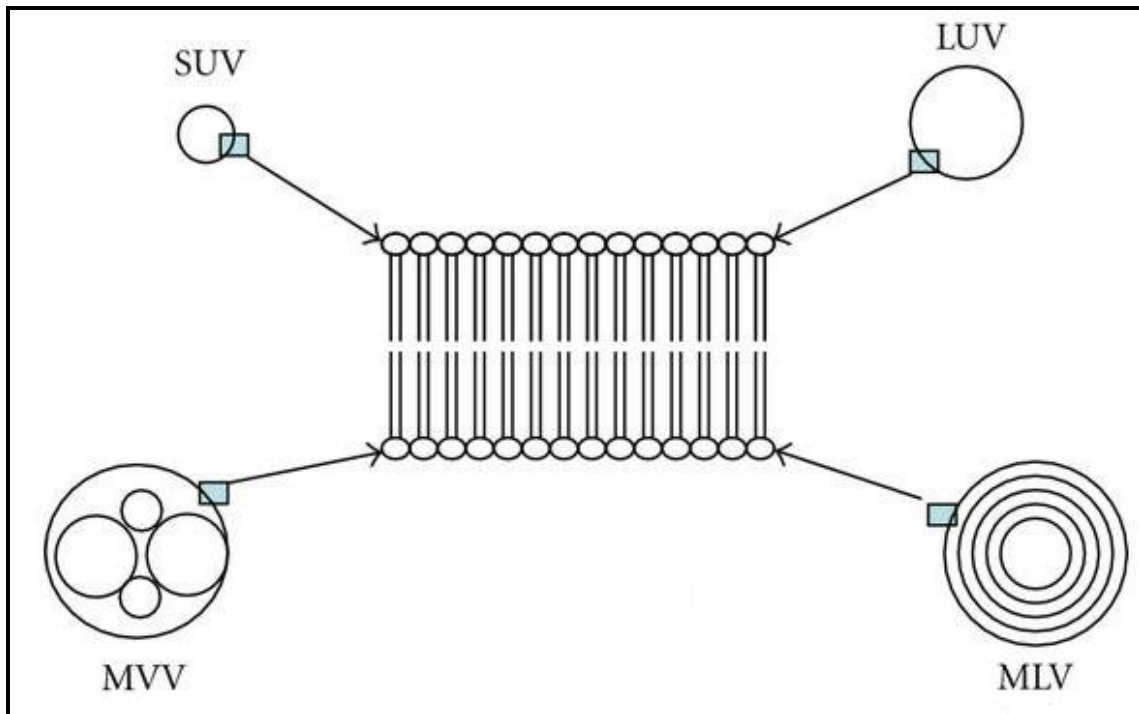


Figura 2.7. Clasificación de las vesículas según su estructura

Asimismo, los sistemas vesiculares pueden clasificarse en función de los componentes principales empleados en su formulación, como se recoge en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Tipos de vesículas y sus principales componentes (Mahale et al., 2012)

Sistema vesicular	Componentes principales
Liposomas	Fosfolípidos (naturales o sintéticos)
Niosomas	Tensioactivos no iónicos + Lípidos/Alcohol graso
Etanosomas	Fosfolípidos + Etanol
Transferosomas	Fosfolípidos + Tensioactivos de cadena simple
Bilosomas	Fosfolípidos + Tensioactivo no iónico + Sales biliares

En general, se puede decir que las vesículas están formadas por dos tipos de moléculas anfífilas: fosfolípidos, que forman *liposomas*, o tensioactivos no iónicos, que constituyen los *niosomas*.

Aunque los liposomas son capaces de encapsular con eficacia una gran variedad de compuestos bioactivos, los niosomas presentan una serie de ventajas sobre ellos: menor coste de producción y mayor estabilidad y período de vida útil.

## 2.5. Niosomas

### 2.5.1. Estructura niosomal y aplicaciones de los niosomas

Los niosomas son vesículas microscópicas constituidas por una membrana de tensioactivos no iónicos, los cuales se autoensamblan, respondiendo a su naturaleza anfífila, y forman una estructura cerrada de doble capa que encierra un espacio acuoso en su interior. En la Figura 2.8 se muestra su estructura.

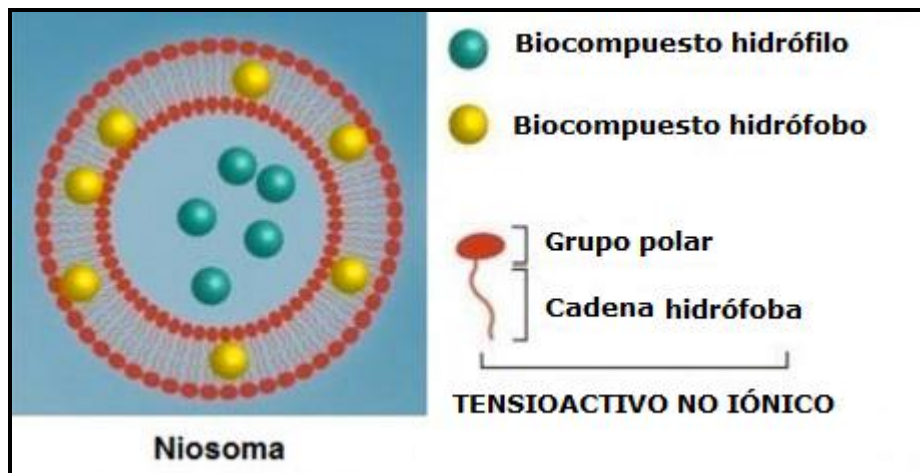


Figura 2.8. Estructura niosomal

Como se comentó anteriormente, por sus ventajas frente a otros sistemas vesiculares, se emplean mucho como medio de encapsulación y posterior liberación de compuestos bioactivos. Tienen importantes aplicaciones en la industria cosmética y alimentaria, y una gran relevancia en la industria



farmacéutica en tratamientos de dolencias pulmonares, quimioterapia o dosificación de fármacos como la insulina.

### 2.5.2. Factores que influyen en la dispersión niosomal

Existen varios factores que influyen en la formación de los niosomas, fundamentalmente: la *formulación del niosoma*, que incluye la elección del tensioactivo no iónico, el aditivo de membrana y el medio de hidratación, la *naturaleza del compuesto activo a encapsular* y el *método de preparación*.

En la Figura 2.9, se esquematizan todos los factores mencionados anteriormente, los cuales se desarrollan con posterioridad.

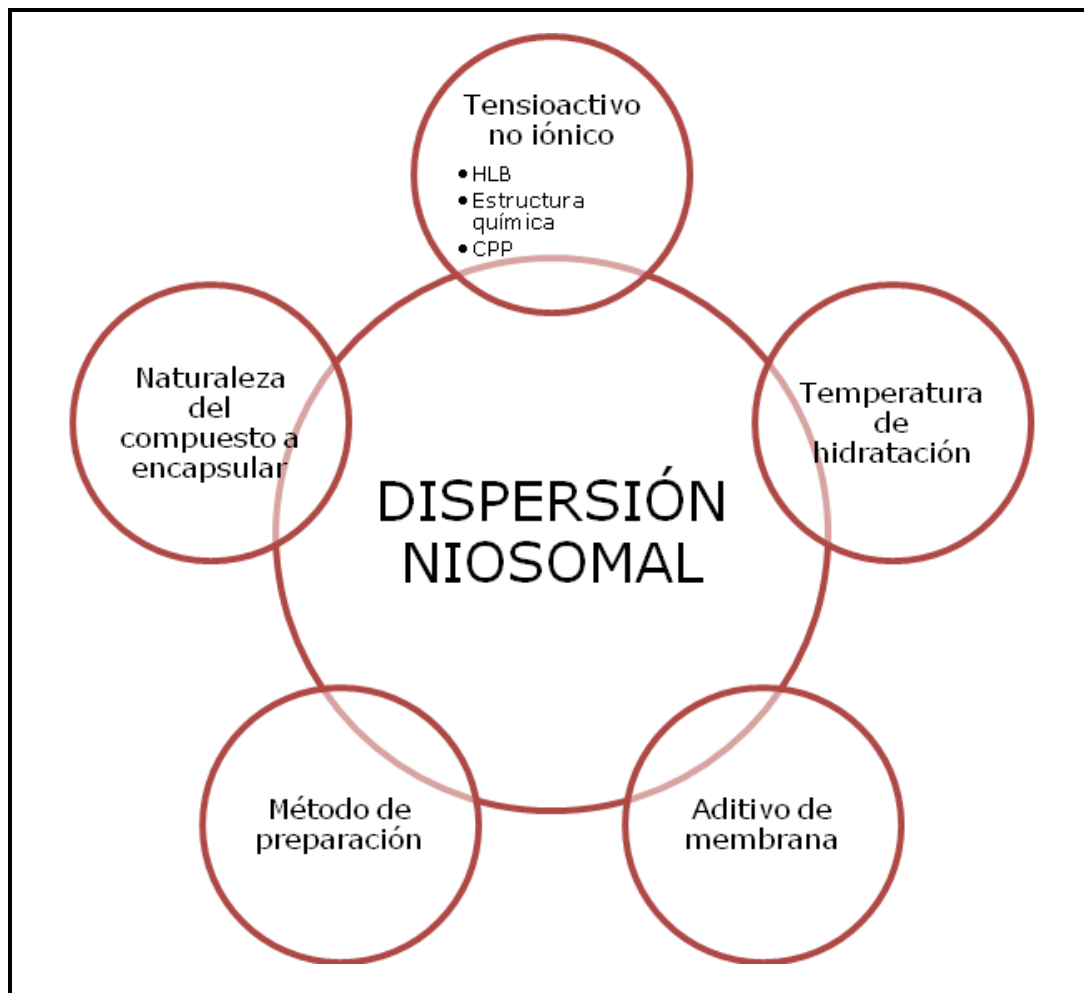


Figura 2.9. Factores que afectan a la dispersión niosomal

➤ **Formulación del niosoma.** Los componentes básicos de una dispersión niosomal son: los tensioactivos no iónicos, el medio de hidratación y los aditivos de membrana.

- Tensioactivos no iónicos. La elección del tensioactivo no iónico constituye un factor de relevancia en el futuro niosoma. Las propiedades de los tensioactivos que afectan a la formación de la dispersión son: el *balance hidrófilo-lipófilo* o *HLB* del tensioactivo, su *estructura química* y el *parámetro crítico de empaquetamiento* o *CPP* (Uchegbu y Vyas, 1998).

a) *Balance hidrófilo-lipófilo (HLB).* El valor del HLB de un tensioactivo es un indicador de la afinidad relativa de éste por las fases agua y aceite en una emulsión y, consecuentemente, una medida de su habilidad para formar vesículas.

El concepto de HLB se basa en un método experimental que consiste en atribuir un valor a los agentes emulsionantes a partir de datos relativos a la estabilidad de la emulsión. De esta forma, Griffin estableció una escala adimensional comprendida entre 1 y 20, que se muestra en la Figura 2.10.

Valores elevados de HLB implican tensioactivos hidrófilos con gran afinidad por la fase acuosa de la emulsión (solubles en disolventes polares) y baja capacidad para formar vesículas. Mientras que valores bajos de HLB corresponden a tensioactivos hidrófobos con mayor afinidad por la fase oleosa (solubles en disolventes no polares) y, por tanto, elevada tendencia a formar vesículas.

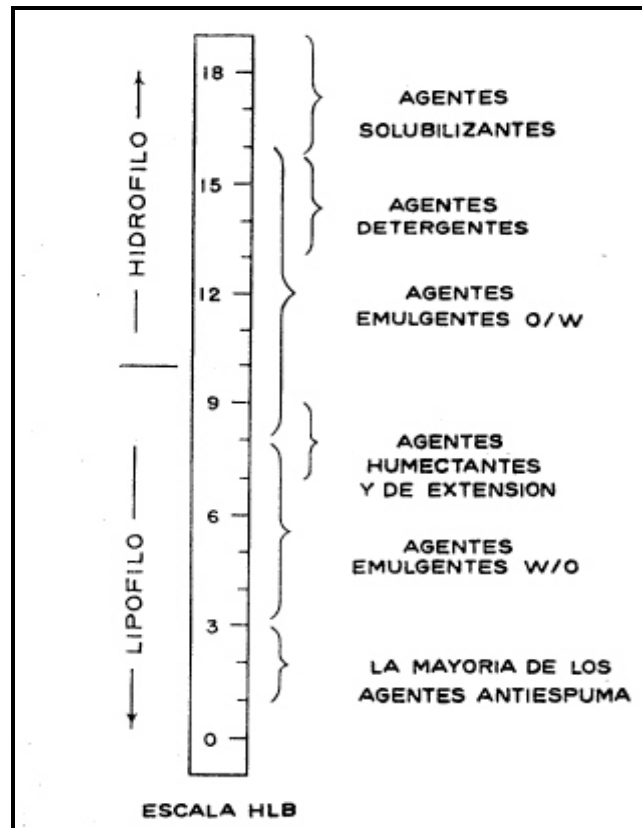


Figura 2.10. Escala HLB

En la Tabla 2.3 se resume el impacto del valor del HLB en la formación del niosoma.

Tabla 2.3. Efecto del HLB en la formación del niosoma

Valor HLB	Efecto en la dispersión niosomal
14-16	No se forman niosomas
8.6	Aumenta la eficacia de encapsulación
1.7- 8.6	Disminuye la eficacia de encapsulación

Para valores de HLB superiores a 6 resulta necesario añadir un aditivo de membrana a la formulación del niosoma para conseguir vesículas con estructura de doble capa, mientras que para valores inferiores, el aditivo es necesario para garantizar la estabilidad de la vesícula. Incluso para HLB superiores a 14

pueden formarse niosomas con el nivel óptimo de aditivo (Santucci et al., 1996).

- b) *Estructura química del tensioactivo.* La longitud de la cadena hidrófoba y el tamaño del grupo hidrófilo del tensioactivo afectan a la eficacia de encapsulación del biocompuesto en el niosoma.

La Figura 2.11 muestra los efectos que puede tener un aumento de la región hidrófila o hidrófoba del tensioactivo en el sistema niosomal (Uchegbu y Vyas, 1998).

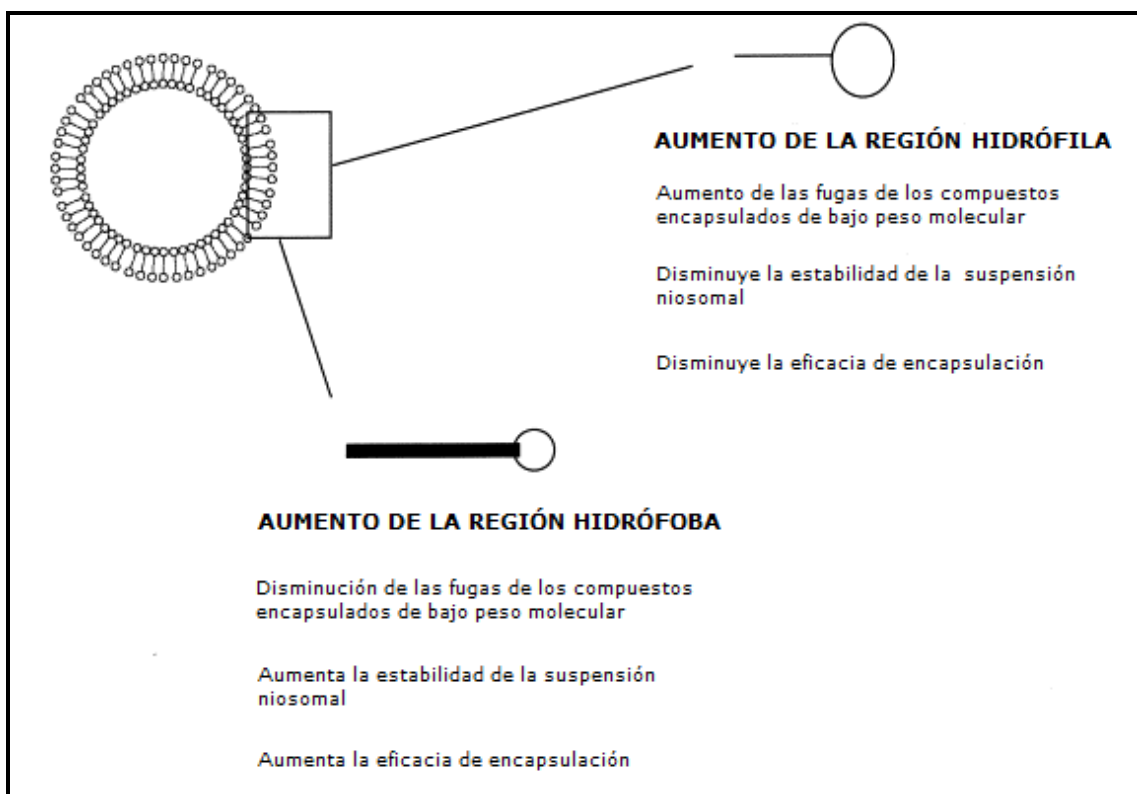


Figura 2.11. Efecto de la estructura del tensioactivo en la formación del niosoma

- c) *Parámetro crítico de empaquetamiento, CPP.* El CPP del tensioactivo es un parámetro que permite determinar su capacidad formadora de vesículas y el tipo de vesícula al que da lugar. Se define según la siguiente ecuación:

$$CPP = \frac{v}{l_c a_o} \quad (2.1)$$

Donde  $v$  es el volumen del grupo hidrófobo,  $l_c$  la longitud crítica del grupo hidrófobo y  $a_0$  el área del grupo hidrófilo. Estos parámetros se muestran de manera esquemática en la Figura 2.12 (Uchegbu y Vyas, 1998).

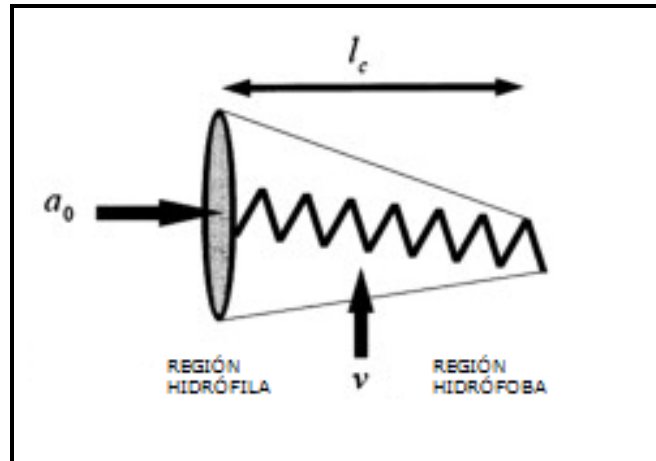


Figura 2.12. Factores que afectan al parámetro crítico de empaquetamiento (CPP)

Un CPP entre 0.5 y 1 indica que el tensioactivo tiene tendencia a formar vesículas. Sin embargo, un CPP inferior a 0.5 muestra mayor contribución por parte del grupo hidrófilo y, por tanto, que el tensioactivo tiende a formar micelas esféricas a concentraciones elevadas. Asimismo, un CPP superior a 1, gracias a la mayor contribución en este caso de la cadena hidrófoba, lleva a la obtención de micelas inversas (solo en fase oleosa).

En la Tabla 2.4 se resume el impacto del valor del CPP en la formación del niosoma.

Tabla 2.4. Efecto del CPP en la formación del niosoma

Valor CPP	Efecto en la dispersión niosomal
>1	Micelas inversas (en fase oleosa)
1-0.5	Obtención de vesículas
<0.5	Micelas esféricas

- Medio de hidratación. La temperatura del medio de hidratación afecta a la unión de los tensioactivos en la formación de la vesícula, lo que repercute directamente sobre la forma y tamaño del niosoma.

La doble capa es una estructura ordenada que puede presentarse en dos estados diferentes: *estado de gel* y *estado de líquido cristalino* o *fase lamelar*. La diferencia entre ambos estados reside en el grado de ordenamiento, el cual es mayor en la forma gel. Un mayor ordenamiento implica rigidez en las cadenas hidrófobas del tensioactivo, lo que hace al estado gel menos móvil y dificulta la formación del niosoma.

Por tanto, la temperatura de preparación de los niosomas debe ser siempre superior a *la temperatura de transición de fase gel a fase líquido cristalino del sistema*,  $T_m$ , la cual es característica de cada tensioactivo. Para la mayoría de los tensioactivos es suficiente con trabajar a unos 40 °C.

- Aditivos de membrana. La incorporación de aditivos a la formulación de la dispersión niosomal se lleva a cabo con el objetivo de aumentar la estabilidad de los niosomas.

Los aditivos interactúan con los tensioactivos influyendo en las propiedades físicas y la estructura de los niosomas. Principalmente, reducen la permeabilidad de la doble capa del niosoma formado y le otorgan rigidez, lo cual es importante bajo condiciones de estrés.

Aunque el aditivo más utilizado es el colesterol, existen trabajos (Devaraj et al., 2002) en los que se emplean alcoholes grasos como estabilizadores de membrana en su lugar, lo cual resulta muy interesante en aplicaciones alimentarias.

La cantidad de aditivo que debe añadirse depende del valor del HLB del tensioactivo. Cuando éste aumenta por encima de 10, resulta necesario incrementar la cantidad de aditivo para poder compensar los grupos hidrófilos que posee. No obstante, es importante tener en cuenta, que por encima de un cierto nivel de aditivo la eficacia de encapsulación decrece ( $CPP < 0.05$ ).

- **Naturaleza del compuesto encapsulado.** La naturaleza del compuesto bioactivo, concretamente, su carácter hidrófilo o hidrófobo, puede influir en las propiedades de la dispersión niosomal.

En la Figura 2.13, se sintetiza el efecto que pueden tener en la vesícula. Como se puede ver, la estabilidad del niosoma aumenta con el carácter hidrófobo del compuesto e incluso para compuestos anfífilos se logra aumentar la eficacia de encapsulación.

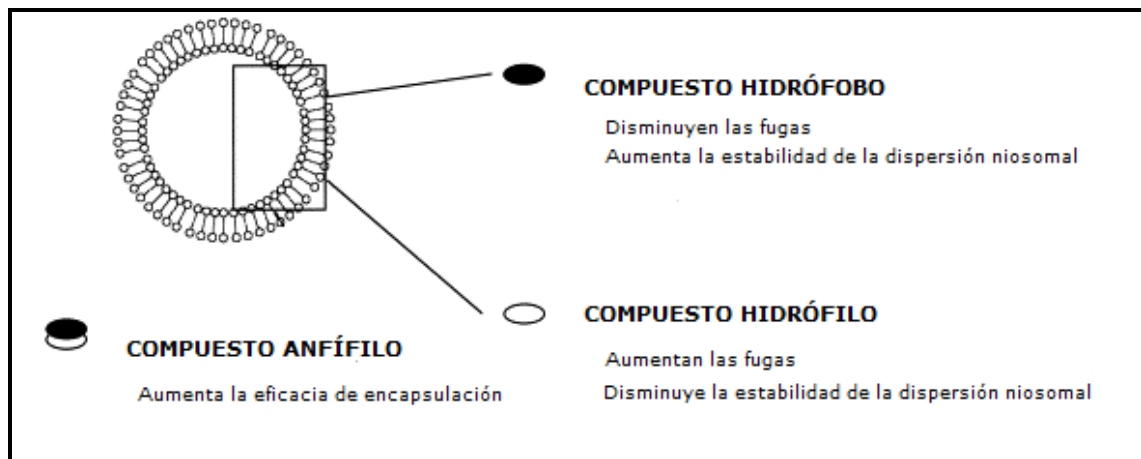


Figura 2.13. Efecto de la naturaleza del compuesto encapsulado en la formación del niosoma (Uchegbu y Vyas, 1998)

- **Métodos de preparación de la dispersión niosomal.** En general, la metodología consiste en la hidratación de una mezcla de tensioactivo/aditivo a temperatura elevada, seguido de una reducción opcional del tamaño para obtener la dispersión. Las variantes de este proceso básico dan lugar a los diferentes métodos que se detallan a continuación, los cuales influyen en el tipo de vesícula que constituye la dispersión niosomal.

Los principales métodos de preparación de vesículas se pueden agrupar en cuatro grandes grupos (Walde y Ichikawa, 2001), los cuales se describen a continuación.

- Métodos de preparación de vesículas que comienzan a partir de una película seca

a) *Preparación de vesículas multilamelares (MLV) mediante el método de dispersión de película seca*

El tensioactivo no iónico junto con el aditivo, en el caso de que sea necesario y en la proporción adecuada, se disuelven en un disolvente orgánico, generalmente cloroformo, y se someten a evaporación a vacío en un evaporador rotatorio (rotavapor), para eliminar el disolvente y obtener una delgada película niosomal en la pared del matraz. A continuación, la película formada se hidrata con una disolución acuosa del compuesto de interés a encapsular, a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase y con agitación mecánica constante y suave.

El resultado es una formación de vesículas multilamelares compuestas, en ausencia del compuesto activo, de unas 10 bicapas.

En la Figura 2.14 se esquematiza el proceso.

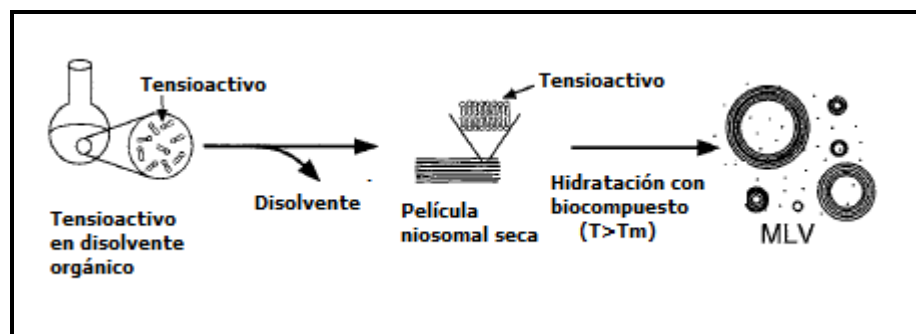


Figura 2.14. Método de dispersión de película seca

b) *Preparación de vesículas mediante ciclos de congelación-descongelación a partir de una suspensión de vesículas multilamelares (MLV-FAT)*

Consiste en someter a una suspensión de vesículas multilamelares, obtenida mediante el método anterior, a una serie de ciclos de congelación-descongelación (Figura 2.15),



que constan de una primera fase de contacto directo con nitrógeno líquido a  $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguida de una fase de descongelación en la que se eleva la temperatura por encima de la temperatura de transición.

Este método consigue un aumento de la eficacia de encapsulación y una mejor distribución de tamaño dentro de la dispersión niosomal.

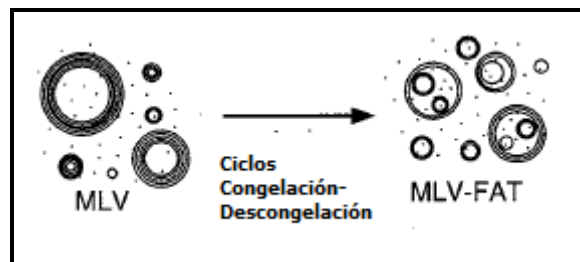


Figura 2.15. Ciclos de congelación/descongelación

- c) *Preparación de vesículas unilamellares (SUV) mediante sonicación de una suspensión de vesículas multilamellares*

La suspensión de vesículas multilamellares se somete a un tratamiento prolongado de sonicación (Figura 2.16), a temperatura superior a  $T_m$  y atmosfera inerte (nitrógeno o argón).

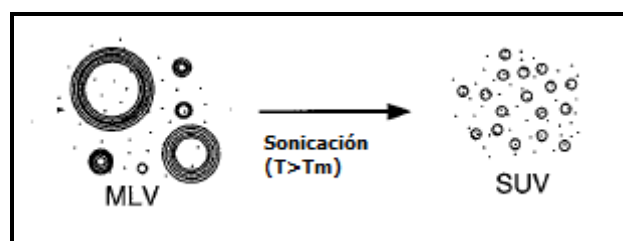


Figura 2.16. Sonicación

Este método provoca la fragmentación de las MLVs en pequeñas SUVs con diámetros inferiores a 50 nm, tamaño que dependerá también de la composición de la vesícula. Sin embargo, aunque mejora la distribución y el tamaño de la

dispersión puede desactivar algunas sustancias a encapsular, como es el caso de las enzimas.

d) *Preparación de vesículas mediante el método de deshidratación/rehidratación (DRV)*

A partir de una suspensión de vesículas multilamelares se lleva a cabo una deshidratación por liofilización o secado a vacío, seguido de una rehidratación a temperaturas superiores a  $T_m$ . Todo ello provoca la fusión de las MLVs, dando lugar a otras vesículas de mayor tamaño (Figura 2.17) y, en consecuencia, de mayor eficacia de encapsulación.

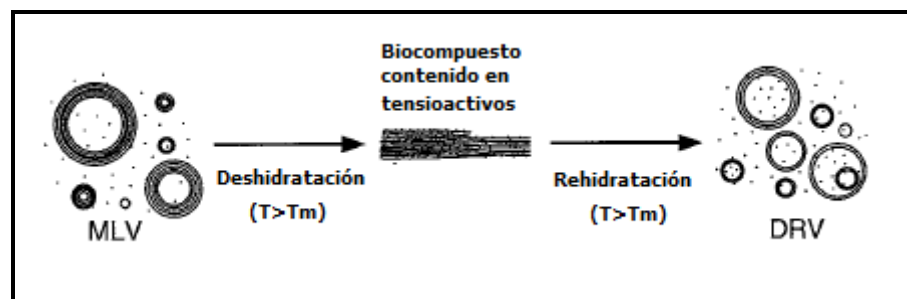


Figura 2.17. Método de deshidratación/rehidratación

Normalmente, se someten a continuación a procesos de extrusión o microfluidización para aumentar la homogeneidad de la dispersión, lo que se explicará más adelante.

e) *Preparación de vesículas mediante el método de extrusión (VET)*

La suspensión de MLVs se filtra repetidamente (normalmente unas 10 veces) a presión moderada por una serie de filtros de tamaño de poro decreciente (400, 200 y 100 nm). Se obtienen vesículas más pequeñas que reciben el nombre de VET, Figura 2.18.

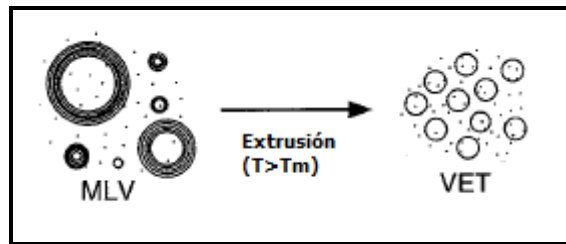


Figura 2.18. Método de extrusión

- f) *Aplicación del método de extrusión a vesículas preparadas mediante ciclos de congelación-descongelación (FAT-VET)*

Incorporando el método de extrusión a las vesículas obtenidas tras varios ciclos de congelación-descongelación, se consiguen nuevas vesículas (FAT-VET) con una mayor eficacia de encapsulación y una distribución de tamaño más homogénea (Figura 2.19).

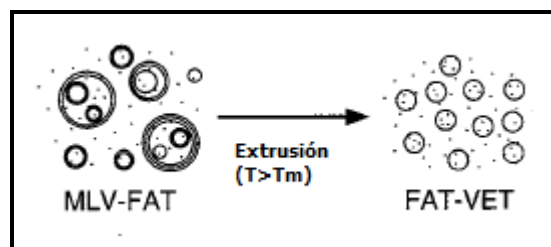


Figura 2.19. Aplicación del método de extrusión a vesículas MLV-FAT

- g) *Aplicación del método de extrusión a vesículas preparadas mediante el método de deshidratación-hidratación (DRV-VET)*

Al igual que el caso anterior, combinando ambas técnicas, deshidratación-hidratación y extrusión, se consigue un nuevo sistema niosomal (DRV-VET) con elevada eficacia de encapsulación y relativamente monodisperso (Figura 2.20).

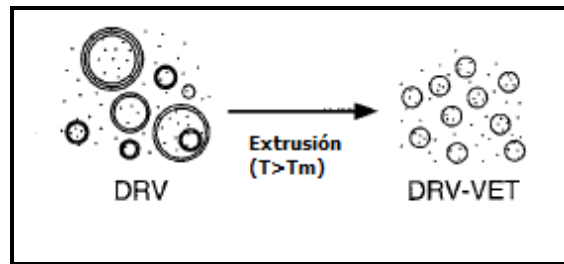


Figura 2.20. Aplicación del método de extrusión a vesículas DRV

h) *Preparación de vesículas mediante microfluidización de una suspensión DRV (DRV-MFV)*

La suspensión de vesículas, preparadas por el método de deshidratación-rehidratación (DRV), se somete a un tratamiento con un microfluidizador a elevadas presiones de homogenización (Figura 2.21), lo que transforma las vesículas multilamelares en vesículas más pequeñas (LUV,) con diámetros aproximados de 100 a 200 nm y con una capacidad de encapsulación variable en función de parámetros como el número de ciclos de microfluidización.

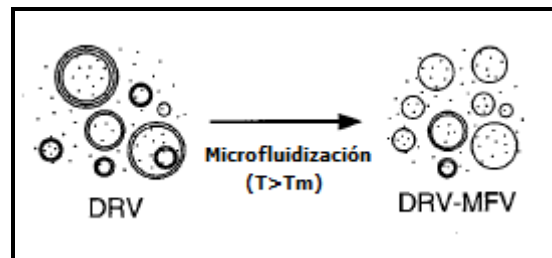


Figura 2.21. Aplicación de microfluidización a vesículas DRV

Este método también puede aplicarse a los sistemas MLV.

i) *Preparación de esferas multilamelares (MLS)*

Consiste en la aplicación de un esfuerzo controlado a una fase acuosa lamelar de anfífilos, lo que da lugar a la obtención de estructuras polihédricas (Figura 2.22), que se diluyen formando microvesículas esféricas multilamelares, llamadas *esferulitas*.

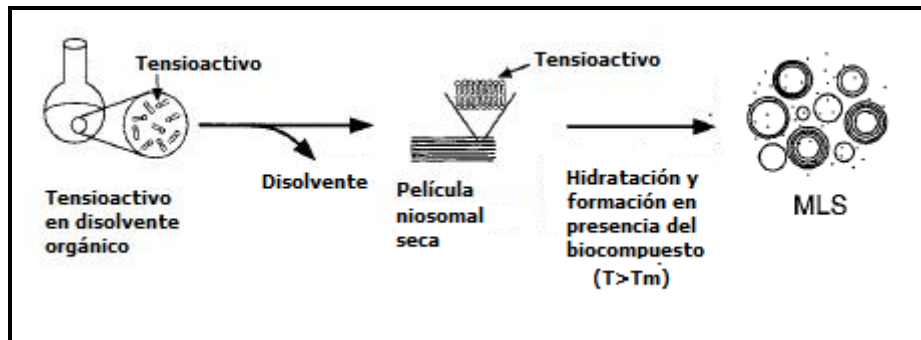


Figura 2.22. Preparación de esferas multilamelares

- Métodos de preparación de vesículas que parten de emulsiones (microemulsiones) con un disolvente no miscible en agua

a) Preparación de vesículas mediante el método de evaporación en fase inversa (REV)

En primer lugar, los tensioactivos se disuelven en un disolvente orgánico de punto de ebullición bajo (dietil éter, isopropil éter o mezclas de estos con cloroformo o metanol, si la solubilidad es baja) y se adiciona la disolución acuosa del compuesto a encapsular con una relación fase orgánica/fase acuosa de 3:1.

El sistema se agita y sonica, obteniéndose una emulsión relativamente estable. Finalmente, la fase orgánica se evapora a vacío en un evaporador rotatorio (rotavapor) formándose los niosomas que quedan dispersos en la fase acuosa.

La dispersión niosomal formada (REV) puede someterse a un proceso de extrusión final para reducir el tamaño de las vesículas, como muestra la Figura 2.23.

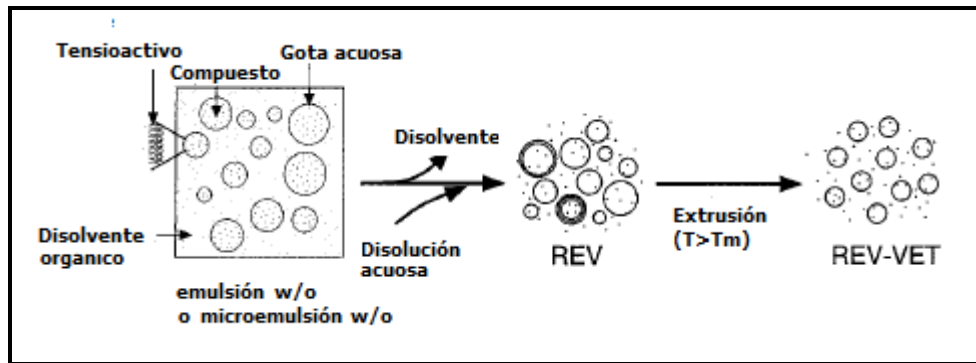


Figura 2.23. Preparación de vesículas por el método de evaporación en fase inversa

- Métodos de preparación de vesículas que emplean detergentes formadores de micelas

- a) Preparación de vesículas por el método de diálisis con detergente (DDV)

Se mezcla una dispersión acuosa de un tensioactivo formador de dobles capas con una disolución acuosa de un detergente formador de micelas, obteniéndose micelas detergente-tensioactivo. Tras una eliminación continua y controlada del detergente por diálisis, se obtienen vesículas tensioactivo-detergente, hasta conseguir finalmente vesículas niosomales sin detergente, principalmente unilamelares (Figura 2.24) y con un tamaño dependiente de variables, como la concentración de tensioactivo, la velocidad de diálisis o la relación detergente-tensioactivo.

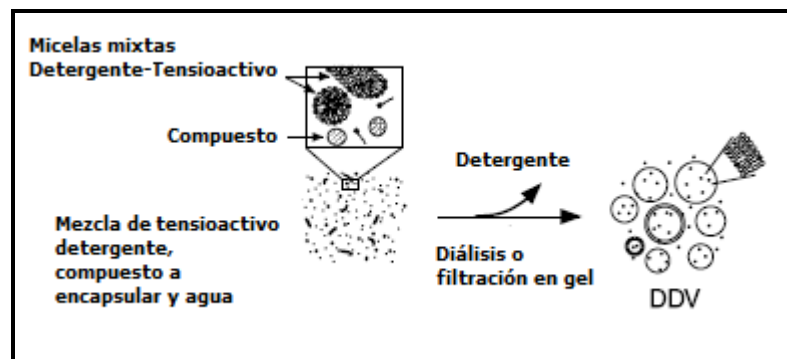


Figura 2.24. Método de diálisis con detergente

- Métodos de preparación de vesículas que se basan en la mezcla de una disolución de tensioactivos no acuosa con una disolución acuosa

a) *Preparación de vesículas por el método de inyección de etanol (VEI)*

Se inyecta una pequeña cantidad de una disolución del tensioactivo en etanol (también puede emplearse metanol) en una disolución acuosa que contiene el compuesto a encapsular, Figura 2.25. Se consiguen rápidamente vesículas de mayor o menor homogeneidad dependiendo de las condiciones experimentales.

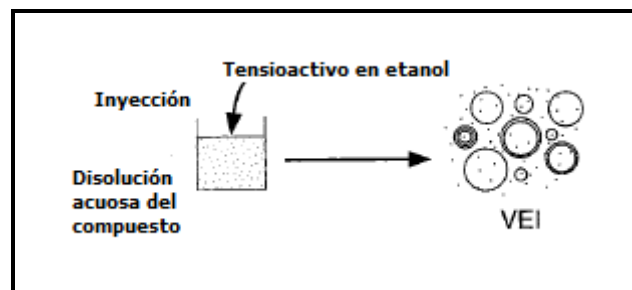


Figura 2.25. Método de inyección de etanol

b) *Preparación de vesículas por el método pro-liposoma (VPL)*

El proceso de formación de las vesículas consiste en la disolución del anfífilo formador de vesículas y etanol, junto con los compuestos de interés, que se encuentran parcialmente atrapados en ellas (Figura 2.26).

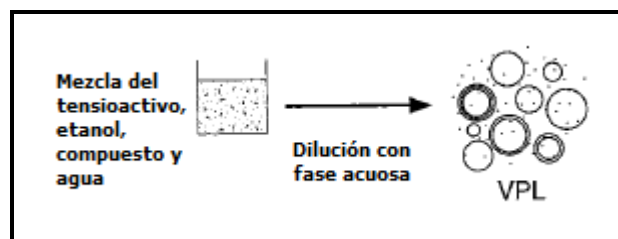


Figura 2.26. Método pro-liposoma

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



En este capítulo se describen las características de los diferentes materiales empleados, tanto en la formulación y caracterización del sistema niosomal, como en la posterior determinación de la eficacia de encapsulación y preparación final del yogurt enriquecido con resveratrol. Asimismo, se especifica la metodología experimental y los equipos utilizados en el desarrollo de la misma.

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Materiales empleados en la formulación del sistema niosomal

- **Resveratrol**, ( $C_{14}H_{12}O_3$ ) del 99% de pureza, suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania) y con número CAS (*Chemical Abstract Service*) 501-36-0. Es el principio activo a encapsular, el cual se presenta como un sólido granulado de color blanquecino, con un peso molecular 226.24 kmol/kg. Se trata de una fitoalexina fenólica, que se encuentra en la piel de la uva y otras plantas, y que, en la actualidad, constituye el objeto de numerosos estudios por su actividad antioxidante intracelular.
- **Metanol**, ( $CH_3OH$ ) del 99.9%, suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania) y con número CAS 67-56-1. Disolvente orgánico de peso molecular 32.04 kg/kmol, utilizado para preparar la disolución inicial de resveratrol.
- **Span<sup>®</sup> 60 (monoesterato de sorbitan)**, suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania) y con número CAS 1338-41-6. Tensioactivo no iónico con un HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*) de 4.7, utilizado en la formación de niosomas en los ensayos de encapsulación. Se presenta como un sólido granulado de color amarillento y en la industria alimentaria se usa como aditivo (emulsionante y estabilizante).
- **Labrasol<sup>®</sup> (Caprylocaproyl macrogol-8 glycerides EP)**, suministrado por Gattefossé (Francia). Tensioactivo no iónico dispersable en agua, con HLB de 14, utilizado en la formación de

niosomas en los ensayos de encapsulación. Se presenta como un líquido transparente poco viscoso. Solubilizante y agente humectante en la industria farmacéutica (ruta de administración oral).

- **1-Dodecanol**, ( $C_{12}H_{26}O$ ) del 98 %, suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania) con número CAS 112-53-8. Empleado como estabilizante a nivel de la doble capa lipídica de la vesícula. Se presenta como un sólido blanco y cristalino de peso molecular 186.33 kg/kmol. En la industria alimentaria es muy utilizado como potenciador del sabor.
- **Agua desionizada**, Millipore Elix 5, Merck (Alemania), utilizada para la preparación de las dispersiones niosomales.

### 3.1.2. Materiales empleados en la determinación de la eficacia de encapsulación del sistema niosomal

- **Membranas tubulares de celulosa**, suministradas por Sigma-Aldrich (Alemania). Permiten separar compuestos con un peso molecular  $\leq 1200$  a partir de compuestos con un peso molecular  $> 2.000$ . Utilizadas en el proceso de diálisis, que permite la separación de los niosomas antes de la determinación de su eficacia de encapsulación.
- **Agua desionizada**, Millipore Elix 5, Merck (Alemania).
- **Metanol**, ( $CH_3OH$ ) para análisis HPLC,  $\geq 99.9\%$ , suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania) y con número CAS 67-56-1. Utilizado, junto al agua desionizada, como fase móvil en la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

### 3.1.3. Materiales empleados en la preparación del yogurt enriquecido con resveratrol

- **Leche fresca pasteurizada**, adquirida en un supermercado local (Mercadona).
- **Yogurt natural**, adquirido en un supermercado local (Mercadona).

- **Dispersiones niosomales**, preparadas con ambos tensioactivos y optimizadas respecto a su eficacia de encapsulación.

## 3.2. Metodología experimental

### 3.2.1. Preparación del sistema niosomal

El procedimiento empleado se basa en el *método de hidratación de película seca*, descrito por Bangham *et al.* (1965), con algunas modificaciones. El tensioactivo utilizado junto con el dodecanol (relación p/p, 0.5:1; 1:1 o 1:1.5) como estabilizante y el resveratrol se disuelven en metanol. El disolvente se evapora completamente a muy baja presión y la película resultante se hidrata con agua desionizada.

Para la preparación de la dispersión niosomal, se emplearon dos técnicas de agitación:

- **Agitación por acción mecánica**, empleando un homogeneizador *SilentCrusher M* (Heidolph, Alemania) con un rotor 8F acoplado. Las características estructurales y técnicas se detallan en las Figuras 3.1 y 3.2.


	<i>Voltaje de conexión:</i> 100-230 V 50/60 Hz
	<i>Consumo eléctrico (potencia nominal):</i> 130W
	<i>Velocidad:</i> 5000-26000 rpm en relación al agua
	<i>Modalidades operativas:</i> operaciones a corto plazo
	<i>Temperatura de operación:</i> 0-40 °C
	<i>Temperatura de almacenamiento:</i> -20 a +80 °C
	<i>Humedad relativa:</i> 85% sin condensación

Figura 3.1. Especificaciones técnicas del homogeneizador *SilentCrusher M*


	Diámetro exterior: 8.2 mm
	Diámetro del rotor: 6.6 mm
	Ancho de la brocha entre el generador y el rotor: 0.3 mm
	Ancho de la ranura: 0.6 mm
	Longitud: 80 mm
	Máxima profundidad de inmersión: 55 mm
	Mínima profundidad de inmersión: 25 mm
	Volumen: 3-50 ml

Figura 3.2. Especificaciones técnicas del Rotor 8F

- **Agitación por cavitación intensa**, empleando un homogenizador por ultrasonidos CY-500 (Optic Ivymen System, Selecta, España). El generador de ultrasonidos transforma la corriente eléctrica de 220V-50 Hz en energía ultrasónica de 20 kHz, para alimentar al transductor ultrasónico. Las características estructurales y técnicas se detallan en la Figura 3.3.


	Frecuencia: 20 kHz
	Alto/Ancho/Fondo: 22/19/33 cm
	Consumo: 500 W
	Peso: 6.7 kg

Figura 3.3. Especificaciones técnicas del homogeneizador ultrasónico CY-500

Las condiciones de agitación para la preparación de los diferentes sistemas dispersos fueron las siguientes:

- Agitación mecánica
  - Velocidad de giro: 5000/10000/15000 rpm, según el experimento.
  - Tiempo de agitación: 15 minutos.
- Agitación ultrasónica
  - Amplitud de onda: 45 %.
  - Tiempo de agitación: 30 minutos.

### 3.2.2. Caracterización del sistema niosomal

La caracterización del sistema niosomal engloba, fundamentalmente, la determinación de tres propiedades: distribución de tamaños de partícula, potencial zeta y estabilidad.

- **Distribución de tamaños de partícula.** El análisis de la distribución de tamaños de los niosomas implica el conocimiento de dos parámetros: *tamaño medio de la dispersión e índice de polidispersividad (PDI)*.

El equipo en el que se realiza dicho análisis es el *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd. UK), el cual usa una técnica no invasiva de retrodispersión, *Non-Invasive Back Scatter technology* (NIBS), que permite el análisis de tamaños desde 0.6 nm hasta 6  $\mu\text{m}$ . En la Figura 3.4 se especifican sus características técnicas.

- **Potencial zeta.** Para esta determinación, se volvió a emplear el equipo *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instruments Ltd. UK), cuyas especificaciones técnicas para este otro tipo de medida se detallan también en la Figura 3.4. El equipo calcula el potencial zeta a partir de la determinación de la movilidad electroforética y la posterior aplicación de la ecuación de Henry. Para la determinación de la movilidad

electroforética, el dispositivo hace uso de una combinación de tecnologías de electroforesis y velocimetría láser Doppler (LDV, *Laser Doppler Velocimetry*). En ocasiones, esta técnica recibe el nombre conjunto de electroforesis láser Doppler. La electroforesis es el fenómeno electrocinético que tiene lugar cuando se aplica un campo eléctrico a una suspensión de partículas que presentan cargas superficiales, de forma que éstas se desplazan en la fase continua atraídas por el electrodo de signo contrario. A este movimiento se oponen las fuerzas viscosas del fluido en el que las partículas se encuentran suspendidas. Cuando se alcanza el equilibrio entre ambas fuerzas, las partículas se mueven con una velocidad constante. Esta velocidad se denomina movilidad electroforética, la cual se relaciona con el potencial zeta mediante la ecuación de Henry:

$$v_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3 \mu} \quad (3.1)$$

$v_E$  es la movilidad electroforética,  $\varepsilon$  la constante dieléctrica del medio,  $\zeta$  el potencial zeta,  $\mu$  la viscosidad del medio y  $f(ka)$  la función de Henry.

La muestra a analizar se introduce en una celda capilar DTS 1060C, que dispone de dos electrodos en ambos extremos a los que se les aplica una diferencia de potencial, de forma que las partículas se mueven hacia los electrodos de carga opuesta. La movilidad electroforética se mide, como ya se ha indicado, mediante la tecnología DLV. En este método se emplea luz láser He-Ne de 633 nm, la cual se hace pasar a través de la celda que contiene la suspensión a analizar, generando en el punto de intersección interferencias de tipo Young de longitud de onda conocida. Las partículas sólidas, al moverse dentro del campo eléctrico, dispersan parte de la radiación procedente del láser y esta luz difractada también sufre interferencias similares, estando la frecuencia de estas fluctuaciones relacionada con la velocidad de las partículas. La luz difractada se recoge en un fotodiodo, que se encuentra desviado unos 17° de la dirección del rayo láser incidente, y las señales se transfieren a un detector digital. El análisis de la función de correlación de las dos radiaciones incidentes, la procedente directamente del láser y

la difractada, mediante difracción dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*), proporciona un espectro de frecuencias con el que se calcula la movilidad electroforética y, a partir de ésta, el potencial zeta.



Tamaño de partícula	Potencial zeta
0.3 nm–10 $\mu\text{m}$ (diámetro)	3.8 nm–100 $\mu\text{m}$ (diámetro)
Dispersión de luz dinámica	Dispersión de luz electroforética
Volumen mínimo de muestra 12 $\mu\text{L}$	Volumen mínimo de muestra 150 $\mu\text{L}$
Precisión: Mejor que +/- 2%	Precisión: 0.12 $\mu\text{m}\cdot\text{cm}/\text{V}\cdot\text{s}$ para sistemas acuosos

Figura 3.4. Características operativas del Malvern Zetasizer Nano ZS

- **Estabilidad.** Para determinar la estabilidad de las dispersiones niosomales formadas en los distintos experimentos, se emplea un *Turbiscan Lab Expert* (Formulaction, Francia), mostrado en la Figura 3.5 y cuyo funcionamiento se basa en la difracción que tiene lugar cuando una suspensión es atravesada por un haz de luz infrarroja ( $\lambda = 880$  nm). El equipo dispone de una estación de envejecimiento AGS que permite realizar el análisis simultáneo de varias muestras a distintas temperaturas. Este dispositivo analiza, tanto la transmisión (sensores a

180°), como la retrodispersión (*backscattering*) a 135°, de un haz incidente de fotones. Las muestras se introducen en una celda cilíndrica de cristal alcanzando una altura en la misma de unos 40 mm, que corresponden a un volumen aproximado de 20 mL. Para realizar la medida, se produce el barrido periódico de la muestra, desde la base hasta la parte superior de la celda, obteniéndose los perfiles de luz transmitida y difractada en función de la altura de la muestra y con isolíneas de tiempo. A partir de estos datos y mediante la aplicación de la teoría Mie, el software del Turbiscan Lab Expert permite el cálculo de distintos parámetros para la evaluación de la estabilidad de las suspensiones, como por ejemplo la altura de las capas de distinta turbidez que aparecen en la suspensión o el diámetro medio de las partículas. Los resultados obtenidos facilitan la identificación de los mecanismos de desestabilización que tienen lugar y la comparación de la estabilidad de los diferentes sistemas.



Figura 3.5. Turbiscan Lab Expert (Formulacion, Francia)



### 3.2.3. Eficacia de encapsulación

La eficacia de encapsulación puede definirse como la relación porcentual entre el resveratrol encapsulado y el resveratrol total.

$$EE = \frac{\text{RSV encapsulado}}{\text{RSV total}} \times 100 \quad (3.2)$$

Dada la dificultad para determinar la cantidad de resveratrol encapsulado en el interior de los niosomas, se hace necesaria la separación del RSV libre del encapsulado. Para ello, se realiza una diálisis que permite separar el resveratrol libre del encapsulado en los niosomas. A continuación, los niosomas dializados se rompen para liberar el resveratrol y poder determinar su concentración mediante técnicas cromatográficas.

En resumen, la determinación de la eficacia de encapsulación del sistema niosomal requiere dos etapas: separación y análisis de resveratrol.

- ***Etapas de separación.*** La separación del RSV libre del encapsulado se lleva a cabo mediante *diálisis*. Se trata de un proceso de separación por membranas donde la transferencia de materia tiene lugar gracias al gradiente de concentración existente a ambos lados de la membrana.

El proceso consta de los siguientes pasos:

- Introducción de un volumen conocido de muestra (2 mL) en una bolsa de diálisis, con membranas tubulares de las características indicadas en el apartado 3.1.2.
- Sellado de la bolsa con pinzas especiales para diálisis e introducción de ésta en un volumen conocido de agua desionizada (1 L), durante 2 horas y con agitación magnética.

Una vez transcurrido este tiempo, se diluye la muestra dializada 1:10 (v/v) con metanol, de tal forma que se rompen los niosomas y se libera el resveratrol contenido en su interior (RSV encapsulado).

Por otro lado se lleva a cabo una dilución 1:10 (v/v) de la muestra sin dializar, de tal manera que se rompen los niosomas y se libera el RSV total (RSV encapsulado + RSV libre).

Las Figuras 3.6 y 3.7 muestran, respectivamente, una fotografía del vaso donde se realiza el experimento de diálisis y un esquema de las etapas del proceso de diálisis para la separación del RSV encapsulado.



Figura 3.6. Experimento de diálisis

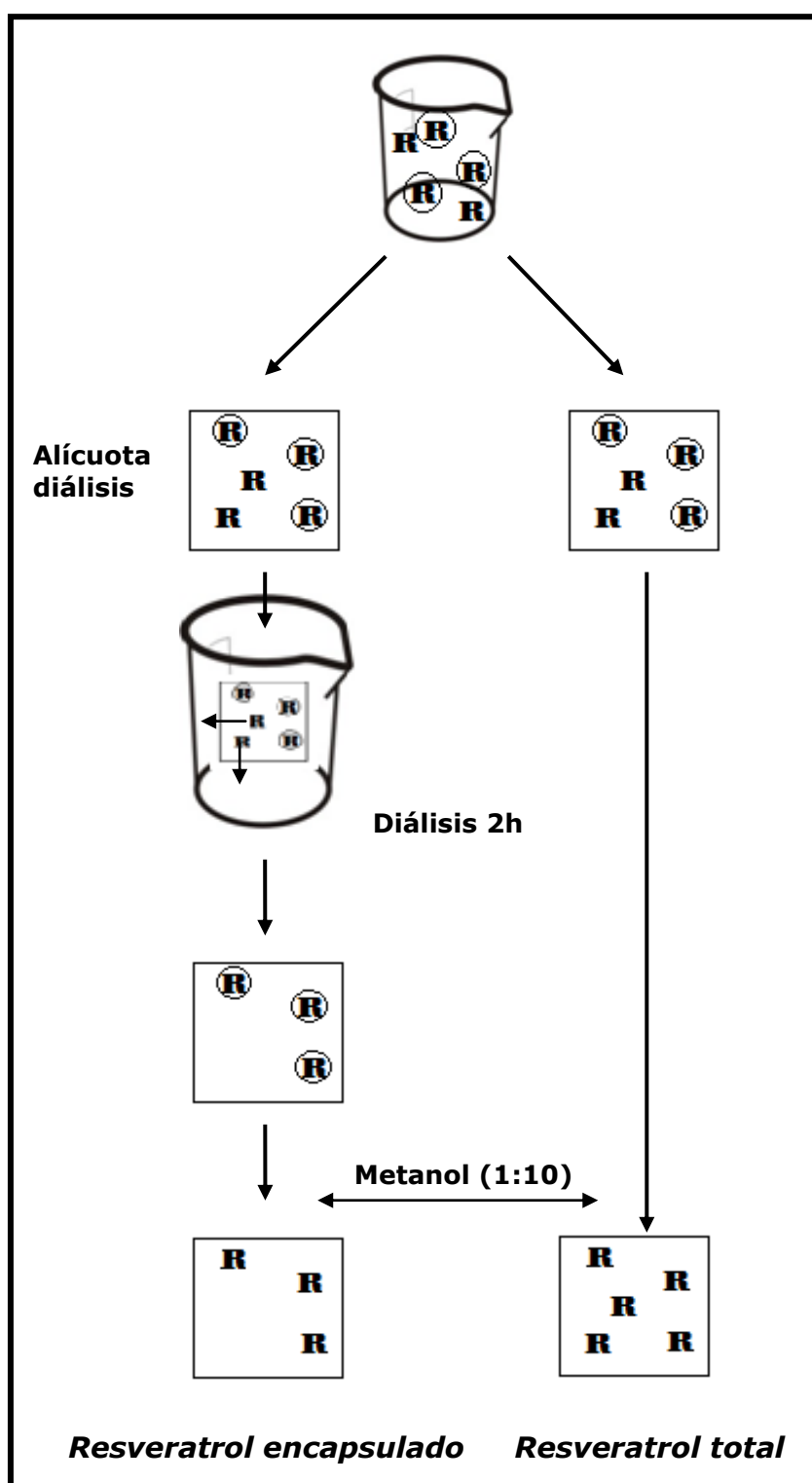


Figura 3.7. Esquema del proceso de diálisis para la separación del RSV encapsulado

- **Análisis de resveratrol.** Las muestras dializada y sin dializar, diluidas en metanol, se filtran usando un filtro de jeringa de PVDF con un tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  y se analizan por *cromatografía líquida de alta resolución* (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), utilizando un cromatógrafo HP series 1100 (Hewlett Packard, USA), mostrado en la Figura 3.8.



Figura 3.8. Cromatógrafo HPLC (Hewlett Packard series 1100, USA)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación física ampliamente utilizada, que se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil líquida. Dichos componentes interaccionan de distinta forma, según su afinidad con estas fases (Rosset et al., 1990), de tal forma que atraviesan la columna a distintas velocidades y se van separando.

La fase estacionaria utilizada para el análisis era un columna  $C_{18}$  (Agilent Technologies, USA), formada por sílice unida a grupos octadecilo ( $C_{18}H_{37}$ ) de carácter no polar. La fase móvil seleccionada (más polar que la estacionaria) consistía en una rampa de agua mili-Q y metanol en la que la proporción de éste último iba creciendo hasta acabar con metanol puro. El análisis se realizaba a una temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$ , usando un flujo de 0.8 mL/min de fase móvil.

La detección del RSV se llevaba a cabo usando, tanto un detector UV-VIS (longitud de onda: 305 nm), como un detector de fluorescencia (longitud de onda: excitación 310 nm; emisión 403 nm).

El cromatograma resultante mostraba los distintos compuestos en forma de picos, representados según su tiempo de retención (tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna) y área, según la concentración del componente en la muestra. En la Figura 3.9 se muestra el diagrama del funcionamiento de un equipo de HPLC.

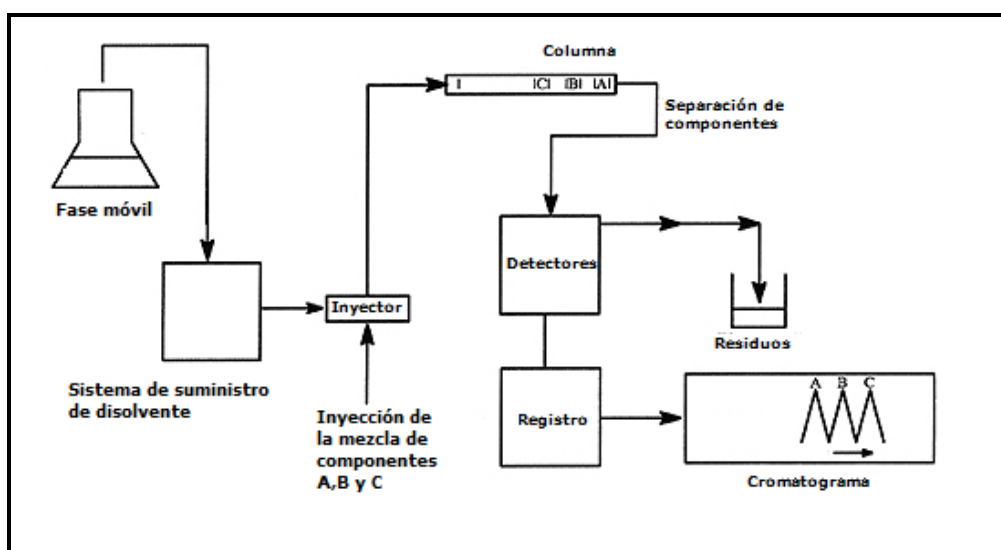


Figura 3.9. Esquema del funcionamiento de un equipo de HPLC

#### 3.2.4. Preparación de un yogurt enriquecido con resveratrol

La concentración de resveratrol que se encuentra en los vinos es variable y depende de numerosos factores. Como ejemplo, en los vinos de Rioja, donde predomina el tempranillo (85-100%), la concentración media de resveratrol total es de 4.14 mg/L.

Para la preparación de un yogurt enriquecido en este antioxidante, se eligió una concentración de 8 mg/L, aproximadamente el doble del RSV que se puede encontrar en un vino de Rioja.

Para la obtención del yogurt, se mezclaron a temperatura ambiente un litro de leche entera pasteurizada y un yogurt natural comercial. A partir de esa

mezcla, se obtuvieron tres yogures naturales, tres yogures naturales enriquecidos con el sistema niosomal Span 60-Dodecanol que presentaba la mejor eficacia de encapsulación, y otros tres enriquecidos con el sistema niosomal Labrasol-Dodecanol también de mejor eficacia de encapsulación.

La fermentación se llevó a cabo en una yogurtera casera, que mantiene una temperatura de unos 40 °C durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, el producto se enfriaba dos horas en nevera a unos 5 °C.

En la Figura 3.10 se muestran diversas fotografías del proceso de preparación del yogurt enriquecido con resveratrol.



Figura 3.10. Fotografías del proceso de preparación de yogurt enriquecido con RSV

- **Análisis de la textura del producto.** La textura de los diferentes yogures preparados se determinó mediante el analizador *TA.XTplus* (Stable Micro Systems, USA).

El analizador permite medir tres parámetros: tiempo, fuerza y distancia. A partir de ellos, se pueden evaluar las distintas propiedades

texturales, mediante el software integrado Texture Exponent: firmeza, cohesividad, adhesión, untabilidad, etc.

El analizador está formado fundamentalmente por una base y un brazo. Las muestras de los productos a analizar se colocan, según se requiera, bien sobre la misma base, bien en algún accesorio determinado, o bien sujetas entre dos accesorios.

El brazo, que incorpora la célula de carga, se mueve hacia abajo y hacia arriba para comprimir, penetrar, cortar, doblar, etc., la muestra, retornando después a la posición inicial indicada.

Existen sondas, tanto para muestras de productos, como para envases, que se eligen en función de las propiedades de éstos y del parámetro o propiedad que se quiera conocer. Las características técnicas del analizador se recogen en la Figura 3.11.


	<p><i>Capacidad de Fuerza: 50 kg<sub>f</sub> (500 N)</i></p>
	<p><i>Resolución de Fuerza: 0.1g<sub>f</sub></i></p>
	<p><i>Células de Carga: 1, 5, 30, 50 kg<sub>f</sub></i></p>
	<p><i>Rango de Velocidad: 0.01 – 40 mm/s (20mm/s a 30-50 kg<sub>f</sub>)</i></p>
	<p><i>Rango de Posición: 1-295 mm</i></p>
	<p><i>Velocidad de datos de muestreo: 8 kHz</i></p>

Figura 3.11. Especificaciones técnicas del texturómetro TA.XTplus (Stable Micro System, USA)

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4.1. Preparación del sistema niosomal

Los niosomas con resveratrol encapsulado se prepararon siguiendo un diseño factorial de experimentos, indicado en la Tabla 4.1, con Span 60 y Labrasol como tensioactivos y dodecanol como estabilizante. Como se puede comprobar, cada sistema se preparó por duplicado.

Tabla 4.1. Diseño factorial de experimentos para cada tensioactivo

<b>Exp.</b>	<b>Agitación (rpm)</b>	<b>Tensioactivo/Dodecanol (p/p)</b>
1	5000	1:0.5
1	5000	1:0.5
2	5000	1:1
2	5000	1:1
3	5000	1:1.5
3	5000	1:1.5
4	10000	1:0.5
4	10000	1:0.5
5	10000	1:1
5	10000	1:1
6	10000	1:1.5
6	10000	1:1.5
7	15000	1:0.5
7	15000	1:0.5
8	15000	1:1
8	15000	1:1
9	15000	1:1.5
9	15000	1:1.5

En la preparación del sistema niosomal se empleó el método de hidratación de película seca, descrito en el Capítulo 2, aunque con ligeras modificaciones.

El tensioactivo no iónico correspondiente junto con el dodecanol, en relación p/p, 1:0.5, 1:1 o 1:1.5, se disolvieron en un determinado volumen (26.6 mL) de disolución de resveratrol en metanol (0.225 mg/mL). La mezcla se

sometió a evaporación a vacío en un rotavapor hasta la completa eliminación del disolvente y la obtención de una película fina en la pared del matraz. La película formada se hidrató con 40 mL de agua desionizada a 40°C, para asegurar una temperatura superior a la temperatura de transición de fase.

El resveratrol, compuesto de interés a encapsular, se disolvió en el disolvente orgánico, en lugar de en el medio de hidratación, ya que el resveratrol no es soluble en agua.

La concentración de tensioactivo y resveratrol en el volumen final de dispersión fue de 30 mg/mL y 150 ppm, respectivamente.

Para la preparación de la dispersión se empleó agitación mecánica durante 15 minutos, variando la velocidad de giro según el experimento, en valores de 5000, 10000 o 15000 rpm, seguida de sonicación durante 30 minutos, con una amplitud de onda del 45%.

## **4.2. Caracterización del sistema niosomal**

Para cada uno de los sistemas niosomales resultantes, se determinaron las propiedades físicas (distribución de tamaño y potencial zeta), la eficacia de encapsulación y la estabilidad.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el análisis de la varianza de un factor (ANOVA), que se utiliza para comparar varios grupos en una variable cuantitativa.

La variable categórica, que define los grupos que se desean comparar, recibe el nombre de *variable independiente* o *factor*, en nuestro caso, la velocidad de agitación y la relación tensioactivo/dodecanol. Por otro lado, la variable cuantitativa, en la que se quieren comparar los grupos, es la *dependiente*, que en el presente análisis se corresponde con tamaño, índice de polidispersividad y eficacia de encapsulación. De esta forma, se puede

determinar cómo afectan los cambios en las variables independientes y si realmente influyen y en qué magnitud lo hacen en las dependientes.

#### 4.2.1. Distribución de tamaños de partícula

En el estudio de la distribución de tamaños, se determinaron para cada una de las dispersiones niosomales formadas dos parámetros fundamentales: el *tamaño medio de la dispersión* y el *índice de polidispersividad (PDI)*.

##### **A. Sistemas niosomales formulados con Span 60 como tensioactivo**

En la Tabla 4.2 se muestran los valores de tamaño medio y PDI determinados para los diferentes sistemas formulados con Span 60 como tensioactivo.

Tabla 4.2. *Tamaño medio e índice de polidispersividad para los sistemas niosomales formulados con Span 60*

<b>Exp.</b>	<b>Agitación (rpm)</b>	<b>Span 60/Dod. (p/p)</b>	<b>Tamaño medio (nm)</b>	<b>PDI</b>
1	5000	1:0.5	205	0.34
1	5000	1:0.5	220	0.32
2	5000	1:1	139	0.26
2	5000	1:1	162	0.24
3	5000	1:1.5	196	0.35
3	5000	1:1.5	175	0.28
4	10000	1:0.5	163	0.20
4	10000	1:0.5	161	0.23
5	10000	1:1	185	0.27
5	10000	1:1	188	0.27
6	10000	1:1.5	178	0.26
6	10000	1:1.5	183	0.27
7	15000	1:0.5	162	0.25
7	15000	1:0.5	218	0.26
8	15000	1:1	227	0.23
8	15000	1:1	190	0.34
9	15000	1:1.5	165	0.26
9	15000	1:1.5	167	0.24

El tamaño de las vesículas formadas depende, según la bibliografía, del modo de preparación, de la composición de la doble capa y del compuesto encapsulado (Manconi et al., 2002). Teóricamente, el método de hidratación de película seca da lugar a la formación de vesículas multilamelares (MLVs), cuyo diámetro oscila entre los 350 y los 400 nm.

A pesar de que cabría esperar este resultado, la Tabla 4.2 muestra unos valores de tamaño bastante inferiores, cuyo promedio no llega a los 200 nm, con lo que se puede descartar la formación de micelas, las cuales son mucho más pequeñas, y clasificar los niosomas formados como vesículas unilamelares grandes (LUVs), con diámetros entre 50 y 250 nm. Esta reducción de tamaño puede justificarse por la aplicación de sonicación durante el proceso de preparación.

La sonicación es una técnica empleada en la obtención de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs), de diámetro inferior a 100 nm y con una distribución de tamaño estrecha. Las SUVs dependen de las condiciones experimentales, como el tiempo de sonicación y la composición de la doble capa, lo que puede explicar la obtención de un tamaño medio de niosoma ligeramente mayor.

De la misma forma, en el caso del PDI, las MLVs presentan una distribución relativamente homogénea, y en los datos se observa un valor de éste por debajo de 0.4 en todos los experimentos. Estos valores de PDI obtenidos implican que los niosomas tienen una distribución de tamaños estrecha y homogénea, probablemente gracias a la sonicación.

A continuación, se estudió el efecto concreto de la agitación y la relación tensioactivo/dodecanol en el tamaño y el PDI de los niosomas formados.

#### ➤ **Análisis estadístico del tamaño**

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados del análisis de la varianza de la velocidad de agitación sobre el tamaño medio de la dispersión niosomal.

Tabla 4.3. Análisis de la varianza de la agitación sobre el tamaño para los sistemas niosomales formulados con Span 60

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tamaños 5000 rpm	6	1096.7	182.8	885.1
Tamaños 10000 rpm	6	1057.9	176.3	134.9
Tamaños 15000 rpm	6	1128.1	188.0	804.7

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	412.2	2	206.1	0.3	0.7	3.7
Dentro grupos	9123.4	15	608.2			
Total	9535.6	17				

Un valor de F, como el que muestra la Tabla 4.3, muy por debajo de su valor crítico, implica que la velocidad de agitación no influye en el tamaño de los niosomas formados, los cuales poseen un tamaño promedio constante que ronda los 180 nm. Esto puede deberse a la etapa de sonicación, que homogeniza la dispersión formada tras la agitación mecánica.

El análisis de la varianza relativa a la relación Span 60/Dodecanol sobre el tamaño medio de la dispersión niosomal se recoge en la Tabla 4.4.

Se observa que los promedios de los experimentos, agrupados según la relación en peso entre el Span 60 y el dodecanol, muestran poca divergencia entre ellos. El valor de F es inferior a su valor crítico, lo que indica que no influyen los cambios en la variable tensioactivo/dodecanol sobre el tamaño del sistema.

Tabla 4.4. Análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre el tamaño

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tamaños 1:0.5	6	1128.8	188.1	844.1
Tamaños 1:1	6	1090.3	181.7	864.5
Tamaños 1:1.5	6	1063.6	177.3	126.9

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	358.1	2	179.1	0.3	0.8	3.7
Dentro grupos	9177.5	15	611.8			
Total	9535.6	17				

➤ **Análisis estadístico del PDI**

En la Tabla 4.5 se presentan los resultados correspondientes al análisis de la varianza de la velocidad de agitación sobre el índice de polidispersividad.

Tabla 4.5. Análisis de la varianza de la agitación sobre el PDI para los sistemas niosomales formulados con Span 60

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
PDI 5000 rpm	6	1.789	0.298	0.002
PDI 10000 rpm	6	1.485	0.248	0.001
PDI 15000 rpm	6	1.586	0.264	0.001

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.008	2	0.004	2.560	0.111	3.682
Dentro grupos	0.023	15	0.002			
Total	0.031	17				

Los valores promedio de los sistemas formados a distintas velocidades de agitación son muy similares. Un PDI de 0.2 indica que existe una

distribución de tamaño muy buena y el valor de F inferior al valor crítico denota que no existe influencia de la agitación sobre el PDI, corroborando la similitud entre los valores medios antes comentados. De nuevo, la explicación reside en la aplicación de sonicación, que iguala los tamaños de las vesículas de los distintos sistemas formados, independientemente de la velocidad utilizada en la etapa previa de agitación, por lo que se consigue una distribución de tamaño similar.

El análisis de la varianza correspondiente a la relación Span 60/Dodecanol sobre el PDI, se presenta en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre el PDI

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
PDI 1:0.5	6	1.601	0.267	0.003
PDI 1:1	6	1.560	0.260	0.002
PDI 1:1.5	6	1.659	0.277	0.002

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001	2	0.000	0.191	0.828	3.682
Dentro grupos	0.032	15	0.002			
Total	0.033	17				

La proporción entre Span 60 y dodecanol tampoco influye en el PDI, que vuelve a tener un valor medio de 0.2 para todos los sistemas formados.

### **B. Sistemas niosomales formulados con Labrasol como tensioactivo**

Al igual que con el tensioactivo anterior, se determinaron los valores de tamaño medio e índice de polidispersividad para los sistemas formulados con Labrasol como tensioactivo no iónico, los cuales se recogen en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Tamaño medio e índice de polidispersividad para los sistemas niosomales formulados con Labrasol

Exp.	Agitación (rpm)	Labrasol/Dod. (p/p)	Tamaño medio (nm)	PDI
1	5000	1:0.5	333	0.25
1	5000	1:0.5	351	0.27
2	5000	1:1	294	0.22
2	5000	1:1	233	0.12
3	5000	1:1.5	368	0.33
3	5000	1:1.5	543	0.55
4	10000	1:0.5	427	0.40
4	10000	1:0.5	344	0.34
5	10000	1:1	314	0.28
5	10000	1:1	389	0.49
6	10000	1:1.5	378	0.50
6	10000	1:1.5	350	0.44
7	15000	1:0.5	418	0.40
7	15000	1:0.5	379	0.37
8	15000	1:1	373	0.36
8	15000	1:1	544	0.49
9	15000	1:1.5	688	0.48
9	15000	1:1.5	408	0.58

En esta ocasión, se observa que se obtienen tamaños de niosomas bastante más elevados que en el caso de los sistemas formulados con Span 60. Asimismo, se aprecia una distribución más heterogénea con algunos valores de PDI ligeramente superiores a 0.4.

Para la misma cantidad de estabilizante de membrana, el tamaño de la vesícula es directamente proporcional al carácter hidrófilo del tensioactivo (Uchegbu, 1994). El Labrasol posee un HLB del orden de 14 lo que indica que es un tensioactivo mucho más afín al agua que el Span 60, con un HLB de 4.7. Esto podría explicar el mayor tamaño de los niosomas formados con Labrasol. Además, desde un punto de vista estérico, el Labrasol es una molécula de mayor tamaño que el Span 60, lo que también podría justificar dicho aumento.



➤ **Análisis estadístico del tamaño**

La Tabla 4.8 muestra el análisis de la varianza de la velocidad de agitación sobre el tamaño de los niosomas formados con Labrasol como tensioactivo.

*Tabla 4.8. Análisis de la varianza de la agitación sobre el tamaño para los sistemas niosomales formulados con Labrasol*

<b>Grupos</b>	<b>Cuenta</b>	<b>Suma</b>	<b>Promedio</b>	<b>Varianza</b>
Tamaños 5000 rpm	6	2122.1	353.7	10882.1
Tamaños 10000 rpm	6	2201.0	366.8	1551.6
Tamaños 15000 rpm	6	2809.1	468.2	15448.7

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
Entre grupos	47110.0	2	23555.0	2.5	0.1	3.7
Dentro grupos	139412.3	15	9294.2			
Total	186522.3	17				

El valor de F inferior a su valor crítico determina que la variable estudiada no influye sobre el tamaño de los niosomas formados. Como ocurría en el caso del Span 60, la sonicación tras la agitación mecánica, durante la preparación de los sistemas niosomales, favorece que los tamaños sean muy similares.

La Tabla 4.9 recoge los resultados del análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre el tamaño.

Tabla 4.9. Análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre el tamaño

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Tamaños 1:0.5	6	2251.5	375.3	1566.8
Tamaños 1:1	6	2146.1	357.7	11439.1
Tamaños 1:1.5	6	2734.6	455.8	17733.8

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	32823.7	2	16411.9	1.6	0.2	3.7
Dentro grupos	153698.5	15	10246.6			
Total	186522.3	17				

Los resultados indican que la relación tensioactivo/dodecanol no afecta al tamaño de los niosomas obtenidos con el Labrasol.

#### ➤ **Análisis estadístico del PDI**

En la Tabla 4.10 se muestran los resultados del análisis de la varianza de la agitación sobre el índice de polidispersividad.

Tabla 4.10. Análisis de la varianza de la agitación sobre el PDI para los sistemas niosomales formulados con Labrasol

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
PDI 5000 rpm	6	1.733	0.289	0.022
PDI 10000 rpm	6	2.441	0.407	0.007
PDI 15000 rpm	6	2.674	0.446	0.007

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.080	2	0.040	3.328	0.064	3.682
Dentro grupos	0.180	15	0.012			
Total	0.261	17				

La agitación no afecta a la distribución de tamaño de la dispersión niosomal formada con Labrasol, de nuevo debido a la sonicación y a su efecto antes comentado.

La Tabla 4.11 resume los resultados del análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre el PDI.

Tabla 4.11. Análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre el PDI

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
PDI 1:0.5	6	2.022	0.337	0.004
PDI 1:1	6	1.959	0.327	0.023
PDI 1:1.5	6	2.867	0.478	0.008

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.086	2	0.043	3.677	0.050	3.682
Dentro grupos	0.175	15	0.012			
Total	0.261	17				

La relación tensioactivo/dodecanol no afecta al valor del PDI determinado en las diferentes dispersiones formuladas con Labrasol.

#### 4.2.2. Potencial zeta

La determinación del potencial zeta se realizó en muestras de todos los sistemas formulados, tanto con Span 60, como con Labrasol, obteniendo en ambos casos un valor medio prácticamente constante, el cual se indica en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Valores de potencial zeta para sistemas niosomales formulados con Span 60 o Labrasol como tensioactivos

<b>Sistema niosomal</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
Con Span 60	-50.1
Con Labrasol	-18.7

Los niosomas formados con Span 60 presentan un potencial zeta negativo y de valor absoluto elevado, lo que favorece la repulsión entre las partículas niosomales dentro de la dispersión, evita fenómenos de coalescencia y mantiene la estabilidad del sistema en el tiempo.

Por el contrario, los niosomas formulados con Labrasol se caracterizan por un valor absoluto de potencial zeta inferior, que implica menor repulsión, dada la carga superficial más baja, y conduce, entre otros factores, a una menor estabilidad de la dispersión, como se va a mostrar posteriormente.

#### 4.2.3. Eficacia de encapsulación

Los niosomas con resveratrol encapsulado se separan del resveratrol libre mediante un proceso de diálisis, para posteriormente determinar la cantidad de compuesto atrapado, empleando HPLC como técnica de análisis. Los valores de la eficacia de encapsulación, para cada uno de los experimentos realizados con ambos tensioactivos, se muestran en las Tablas 4.13 y 4.16.

### A. **Sistemas niosomales formulados con Span 60 como tensioactivo**

La Tabla 4.13 muestra que los valores de eficacia de encapsulación residen en un intervalo bastante amplio, ya que algunos son superiores al 60% y otros considerablemente inferiores. Estos últimos coinciden con los experimentos para la relación tensioactivo/dodecanol igual a 1:0.5 de cada serie.

Tabla 4.13. Eficacias de encapsulación para los sistemas niosomales formulados con Span 60

<b>Exp.</b>	<b>Agitación (rpm)</b>	<b>Span 60/Dod (p/p)</b>	<b>EE (%)</b>
1	5000	1:0.5	29.0
1	5000	1:0.5	29.3
2	5000	1:1	33.7
2	5000	1:1	52.0
3	5000	1:1.5	52.0
3	5000	1:1.5	47.4
4	10000	1:0.5	22.9
4	10000	1:0.5	21.5
5	10000	1:1	40.5
5	10000	1:1	40.0
6	10000	1:1.5	56.8
6	10000	1:1.5	58.5
7	15000	1:0.5	22.5
7	15000	1:0.5	16.8
8	15000	1:1	59.1
8	15000	1:1	53.2
9	15000	1:1.5	58.5
9	15000	1:1.5	72.5

#### ➤ **Análisis estadístico de la eficacia de encapsulación**

La Tabla 4.14 muestra el análisis de la varianza de la agitación sobre la eficacia de encapsulación de los niosomas formulados con Span 60.

Tabla 4.14. Análisis de la varianza de la agitación sobre la eficacia de encapsulación de los sistemas niosomales formulados con Span 60

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EE 5000 rpm	6	243.57	40.60	123.25
EE 10000 rpm	6	240.18	40.03	251.88
EE 15000 rpm	6	282.54	47.09	496.21

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	184.70	2	92.35	0.32	0.73	3.68
Dentro grupos	4356.69	15	290.45			
Total	4541.39	17				

En numerosos estudios, se atribuía a las dispersiones niosomales formuladas con Span 60 elevadas eficacias de encapsulación ([Manconi et al., 2002](#); [Hao y Li, 2011](#)). Esto se debía a que en dichos estudios se empleaban técnicas de preparación de los niosomas que favorecían la obtención de un tamaño de partícula mayor, lo que llevaba también a conseguir una mayor eficacia de encapsulación del compuesto de interés.

Los resultados de estos trabajos hacían esperar similares eficacias de encapsulación en los experimentos con Span 60. Sin embargo, la sonicación, aplicada como técnica para disminuir el tamaño niosomal y aumentar el carácter monodisperso de la distribución favoreciendo la estabilidad de la dispersión, provocó una clara disminución del porcentaje de resveratrol encapsulado.

La Tabla 4.15 resume los resultados del análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre la eficacia de encapsulación.

Tabla 4.15. Análisis de la varianza de la relación Span 60/Dodecanol sobre la eficacia de encapsulación

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EE 1:0.5	6	142.02	23.67	22.98
EE 1:1	6	278.52	46.42	94.90
EE 1:1.5	6	345.75	57.63	71.97

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3592.11	2	1796.06	28.38	$7.97 \cdot 10^{-6}$	3.68
Dentro grupos	949.28	15	63.29			
Total	4541.39	17				

Según el valor de F obtenido, muy superior a su valor crítico, la eficacia de encapsulación está claramente afectada por la relación Span 60/Dodecanol. Se observa que el porcentaje de encapsulación aumenta conforme disminuye la relación tensioactivo/dodecanol, es decir, conforme aumenta la cantidad de estabilizante añadida.

De esta forma, se puede afirmar que la mejor de las relaciones (p/p), para la obtención de una mayor eficacia de encapsulación, es la 1:1.5, mientras que la menos favorable es la 1:0.5.

En la bibliografía, se recogen estudios de preparación de sistemas niosomales con Span 60 y colesterol como aditivo estabilizante en los que la relación óptima entre ambos es de 1:1 (Manconi et al., 2002; Hao y Li, 2011; Pando et al., 2013). En el presente trabajo, el colesterol se ha sustituido por dodecanol, una molécula de volumen considerablemente menor, lo que justifica la necesidad de utilizar una mayor cantidad de aditivo, con el fin de obtener el mismo efecto estabilizante.

**B. Sistemas niosomales formulados con Labrasol como tensioactivo**

La Tabla 4.16 muestra valores de eficacia de encapsulación bastante dispersos, que van desde 63.9% al 16.3%, lo cual apunta a la segura influencia de alguna de las variables sobre este parámetro. En esta ocasión, se observan los valores más elevados para los sistemas niosomales formulados con una relación en peso tensioactivo/dodecanol de 1:0.5.

Tabla 4.16. Eficacias de encapsulación para los sistemas niosomales formulados con Labrasol

Exp.	Agitación (rpm)	Labrasol/Dod. (p/p)	EE (%)
1	5000	1:0.5	59.1
1	5000	1:0.5	51.8
2	5000	1:1	46.7
2	5000	1:1	52.7
3	5000	1:1.5	16.3
3	5000	1:1.5	24.5
4	10000	1:0.5	61.7
4	10000	1:0.5	63.9
5	10000	1:1	30.3
5	10000	1:1	48.6
6	10000	1:1.5	27.7
6	10000	1:1.5	25.5
7	15000	1:0.5	50.0
7	15000	1:0.5	34.3
8	15000	1:1	41.4
8	15000	1:1	33.6
9	15000	1:1.5	31.8
9	15000	1:1.5	22.8

➤ **Análisis estadístico de la eficacia de encapsulación**

La Tabla 4.17 muestra el análisis de la varianza de la agitación sobre la eficacia de encapsulación de los niosomas formulados con Labrasol.



Tabla 4.17. Análisis de la varianza de la agitación sobre la eficacia de encapsulación de los sistemas niosomales formulados con Span 60

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EE 5000 rpm	6	251.05	41.84	298.38
EE 10000 rpm	6	257.64	42.94	303.97
EE 15000 rpm	6	213.81	35.64	84.85

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	186.18	2	93.09	0.41	0.67	3.68
Dentro grupos	3436.02	15	229.07			
Total	3622.20	17				

Al igual que ocurre en los sistemas niosomales formulados con Span 60, la agitación no influye en la eficacia de encapsulación de resveratrol para los niosomas formulados con Labrasol.

La Tabla 4.18 resume los resultados del análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre la eficacia de encapsulación.

Tabla 4.18. Análisis de la varianza de la relación Labrasol/Dodecanol sobre la eficacia de encapsulación

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
EE 1:0.5	6	320.74	53.46	118.19
EE 1:1	6	253.24	42.21	77.25
EE 1:1.5	6	148.52	24.75	26.98

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2510.13	2	1255.06	16.93	$1.42 \cdot 10^{-4}$	3.68
Dentro grupos	1112.08	15	74.14			
Total	3622.20	17				

La ANOVA muestra claramente que los cambios en la relación (p/p) Labrasol/Dodecanol influyen en la eficacia de encapsulación de los sistemas niosomales formulados con dicho tensioactivo.

En la tabla se observa que la relación 1:0.5 conduce a un mayor porcentaje de eficacia. En este caso, no se han encontrado trabajos previos que empleen Labrasol con colesterol, como estabilizador de membrana en la formulación de las dispersiones niosomales. Por tanto, al desconocer su relación óptima, no se pueden justificar los resultados obtenidos de la misma forma que se hizo para el Span 60.

Al margen de esto, se podría predecir que, al ser el Labrasol un tensioactivo bastante hidrófilo con la cabeza polar de mayor tamaño que la cadena no polar, el estabilizante de carácter lipófilo no interaccione bien con él y la cantidad óptima de aditivo sea baja.

Por último, se determinó el valor medio de las mejores eficacias de encapsulación para el Span 60 (p/p 1:1.5) y para el Labrasol (p/p 1:0.5), obteniéndose resultados muy similares e iguales a 57.6% y 53.5%, respectivamente.

Aunque un mayor tamaño de niosoma conduce, por lo general, a mayores eficacias de encapsulación, parece existir una ligera diferencia a favor de las vesículas preparadas con Span 60, las cuales poseen un tamaño de partícula menor que las preparadas con Labrasol. La razón es la menor afinidad del resveratrol, considerado compuesto no polar, por el Labrasol de elevado carácter hidrófilo. Todo ello pone de manifiesto la mayor influencia, con respecto a la eficacia de encapsulación, de la naturaleza del compuesto a encapsular, sobre la diferencia de tamaño entre los niosomas de ambas dispersiones.

#### 4.2.4. Estabilidad

La estabilidad de los niosomas preparados se estudió mediante la obtención de los perfiles de retrodispersión de los sistemas formulados con ambos tensioactivos. Dichos perfiles se determinaron con una frecuencia de medida de 3 horas durante 15 días.

##### **A. Sistemas niosomales formulados con Span 60 como tensioactivo**

La Figuras 4.1 y 4.2 corresponden, respectivamente, a uno de los sistemas más estables y a uno de los más inestables, formulados con Span 60 y dodecanol, en relación (p/p) 1:1.5, en el primer caso, y 1:1, en el segundo.

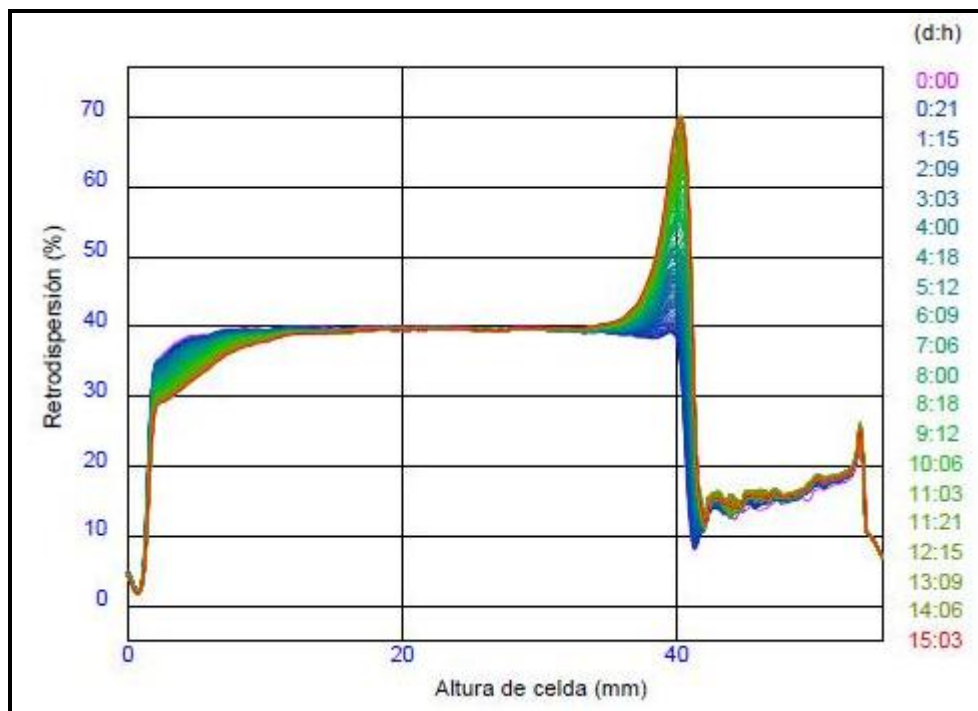


Figura 4.1. Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Span 60/Dodecanol con una relación en peso 1:1.5

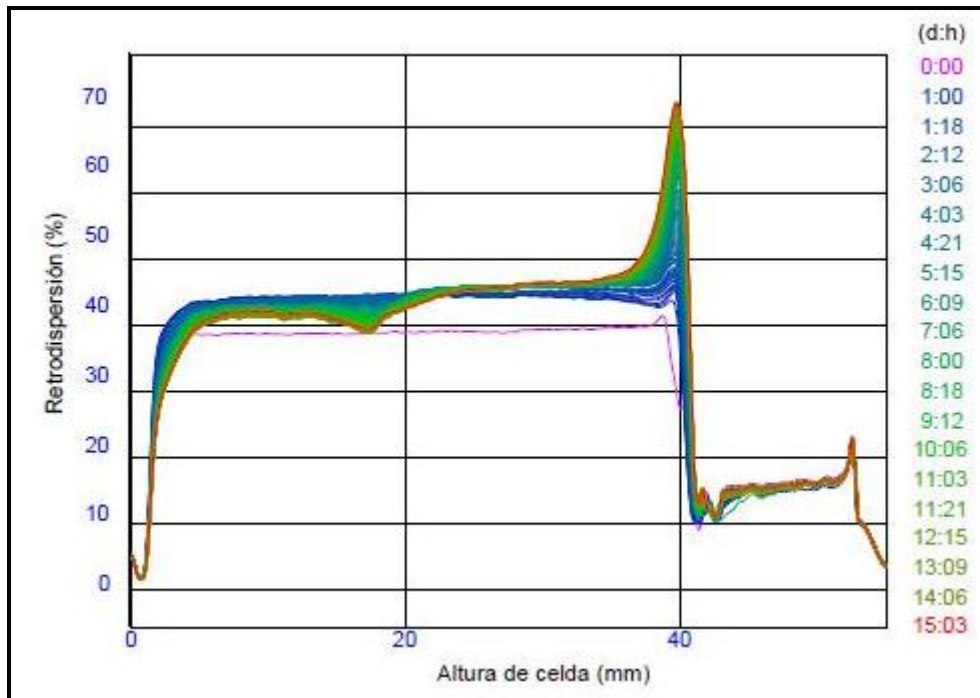


Figura 4.2. Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Span 60/Dodecanol con una relación en peso 1:1

Ambos perfiles muestran una relativa estabilidad en el tiempo para los sistemas niosomales formulados con Span 60, sin marcadas diferencias entre el mejor y el peor de los resultados. La variación de tamaño observada es bastante leve, aunque un poco más acusada en el caso de la Figura 4.2. Este aumento de tamaño da lugar a la aparición de un ligero cremado después de un cierto tiempo.

El cremado es consecuencia de fenómenos de coalescencia en las dispersiones, derivados de la variación del tamaño de las partículas con el tiempo, los cuales conducen a la flotación de éstas.

Como consecuencia de estos procesos, en los perfiles de radiación aparecen picos locales, como los que se pueden observar en las Figuras 4.1 y 4.2, los cuales indican variaciones de la retrodispersión de la dispersión.

**B. Sistemas niosomales formulados con Labrasol como tensioactivo**

Los perfiles de retrodispersión obtenidos para los sistemas niosomales formulados con Labrasol muestran, en su totalidad, una elevada inestabilidad.

La Figuras 4.3 y 4.4 corresponden a dos de los sistemas más representativos.

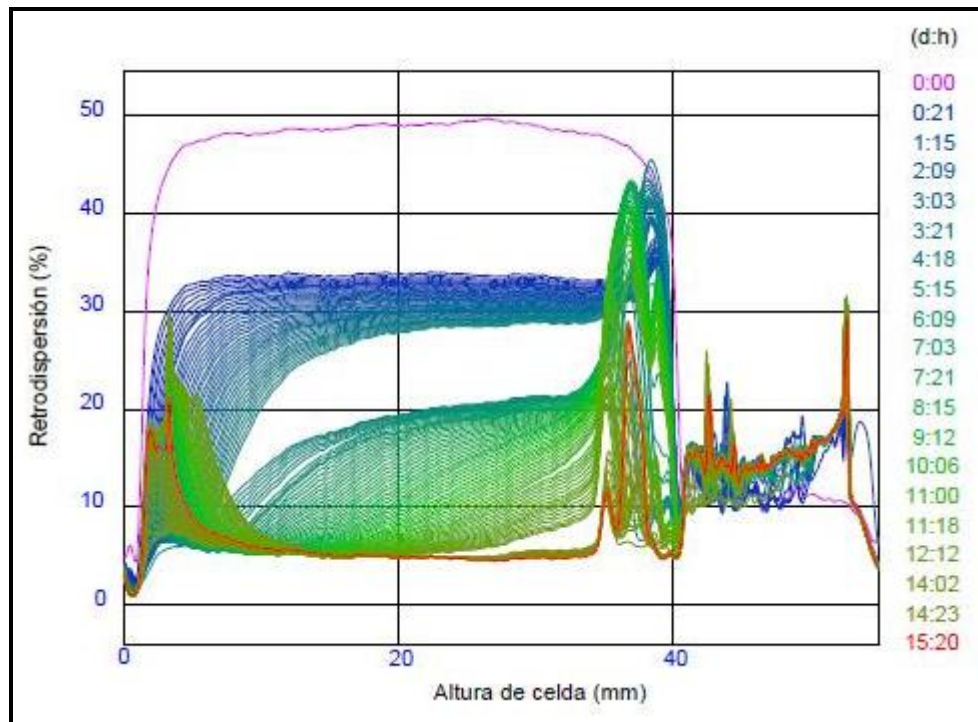


Figura 4.3. Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Labrasol/Dodecanol con una relación en peso 1:0.5

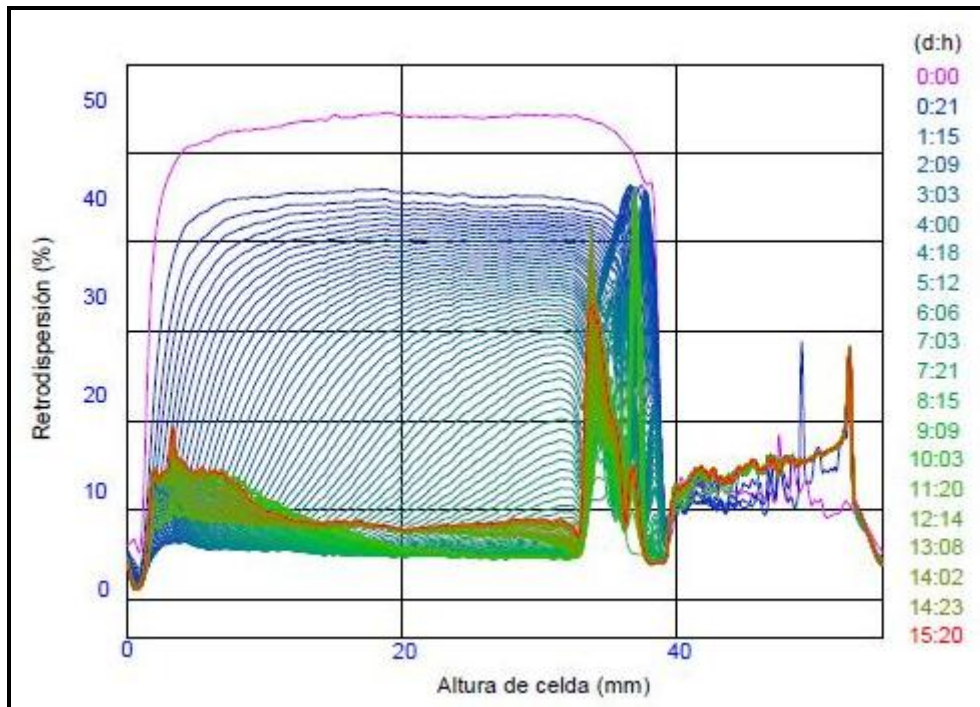


Figura 4.4 Perfil de retrodispersión de la radiación correspondiente al sistema Labrasol/Dodecanol con una relación en peso 1:1

Se puede observar como la retrodispersión va aumentando con el tiempo, lo que prueba la aparición de fenómenos de agregación de partículas, debido a variaciones de tamaño, que llevan a un incremento de la inestabilidad y conducen a la separación de las fases.

De nuevo se produce cremado, en este caso bastante más marcado que para el Span 60, como consecuencia del importante cambio de tamaño. Se observa que la inestabilidad aparece rápidamente, en algunos casos tan solo tres horas después de iniciarse la monitorización.

Por último, en la Figura 4.5, se muestran dos imágenes del cremado formado en dos sistemas, uno formulado con Span 60 y otro con Labrasol.



Figura 4.5. Cremado en sistemas niosomales formulados con Span 60 (izquierda) y con Labrasol (derecha)

### **4.3. Preparación de un yogurt enriquecido con resveratrol y análisis de la textura del producto**

Para el análisis textural, se prepararon tres yogures naturales, tres yogures naturales enriquecidos con el sistema niosomal Span 60-Dodecanol que presentaba la mejor eficacia de encapsulación (relación 1:1.5), y otros tres enriquecidos con el sistema niosomal Labrasol-Dodecanol, también de mejor eficacia de encapsulación (relación 1:0.5). La concentración de resveratrol presente en los yogures enriquecidos fue de 8 mg/L.

Mediante el texturómetro se determinaron los valores de firmeza y pegajosidad para cada uno de los yogures preparados, los cuales se recogen en la Tabla 4.19.

Tabla 4.19. Análisis textural del yogurt

Tipo de yogurt	Firmeza ( $g_f$ )	Pegajosidad ( $g_f$ )
Natural*	$7.535 \pm 0.454$	$-4.035 \pm 0.518$
Natural con Span 60	$7.642 \pm 0.106$	$-3.538 \pm 0.173$
Natural con Labrasol	$5.005 \pm 0.105$	$-2.615 \pm 0.085$

(\*) Se eliminó una de las réplicas de yogurt natural en el estudio debido a su uso en la calibración del equipo

En las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8, se muestran las gráficas proporcionadas por el texturómetro, a partir de las cuales se obtuvieron los datos recogidos en la tabla anterior.

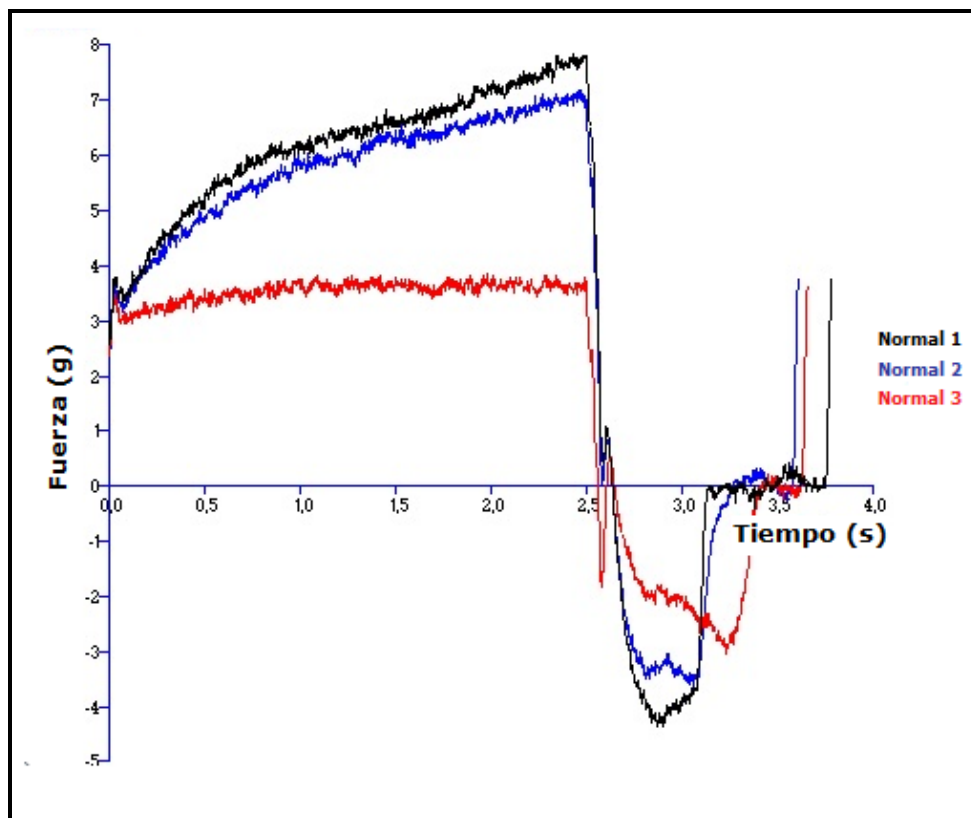


Figura 4.6. Análisis textural de yogurt natural  
 (\*) La muestra Normal 3 se empleó en la calibración del equipo



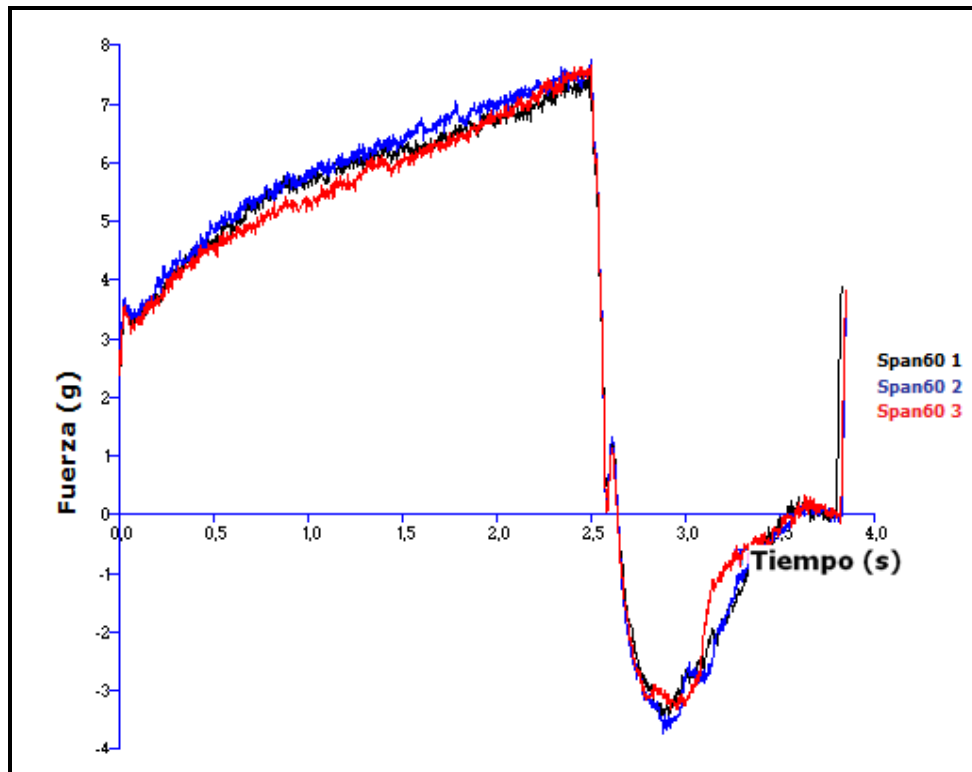


Figura 4.7. Análisis textural de yogurt natural con Span 60/Dodecanol/Resveratrol

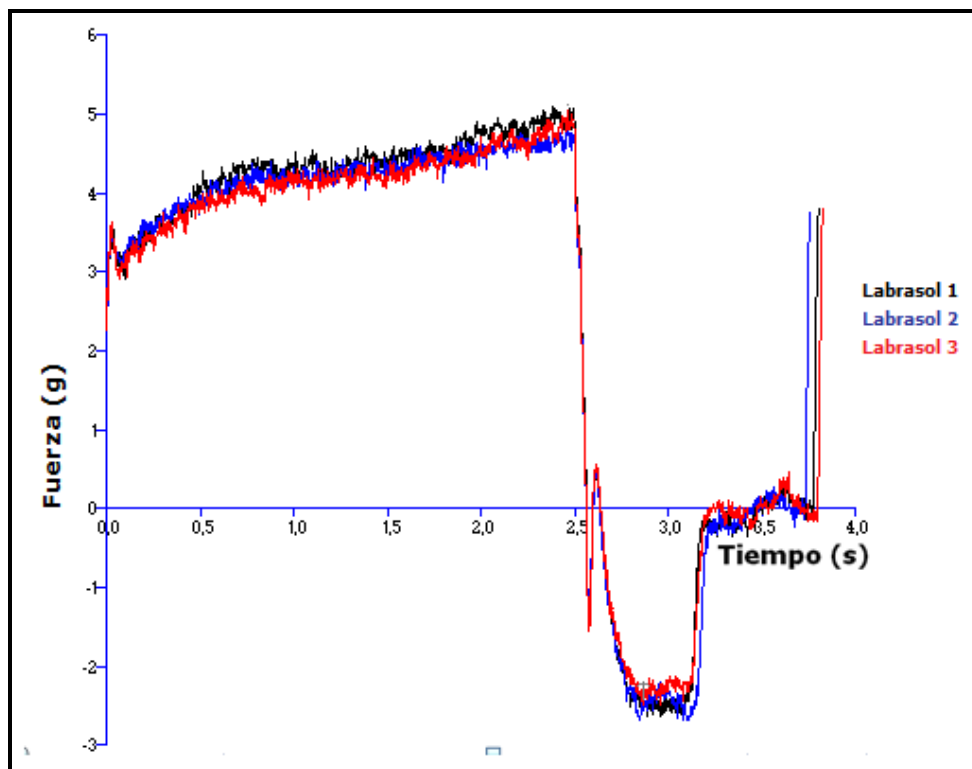


Figura 4.8. Análisis textural de yogurt natural con Labrasol/Dodecanol/Resveratrol

En primer lugar, se aprecia que no existen prácticamente diferencias entre las distintas réplicas de un mismo yogurt, lo que justifica la fiabilidad de los resultados.

En segundo lugar, comparando los diferentes tipos de yogures, se observan valores muy similares entre los enriquecidos con el sistema niosomal Span 60-Dodecanol conteniendo resveratrol y el natural.

Por otro lado, aunque existe una variación mínima, tanto en firmeza, como en pegajosidad, entre el yogur natural y el enriquecido con el sistema niosomal Labrasol-Dodecanol con resveratrol, se considera que ésta sería prácticamente inapreciable por el consumidor.

## **5. CONCLUSIONES**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido preparar dos sistemas niosomales de grado alimentario, los cuales encapsulan resveratrol con elevadas eficacias.
- De los dos sistemas formulados, Span60/Dodecanol/Resveratrol y Labrasol/Dodecanol/Resveratrol, el primero, dada su mayor estabilidad, es el que se considera más apropiado para su incorporación en posibles alimentos funcionales.
- Se ha logrado sustituir el estabilizante de membrana niosomal más habitual (colesterol) por un alcohol graso (dodecanol), lo que puede resultar de relevancia en la industria alimentaria.
- Se ha preparado un alimento funcional, yogurt enriquecido con resveratrol, cuyas características texturales son similares a las de un yogurt normal.
- A partir de un estudio económico preliminar a nivel de laboratorio, se ha establecido que el incremento en el coste del producto sería de 0.17 €/unidad.

## **6. SÍMBOLOS**

---

$a_0$	Área del grupo hidrófilo
ANOVA	Análisis de la varianza de un factor
CAS	Chemical Abstract Service
CMC	Concentración micelar crítica
CPP	Parámetro crítico de empaquetamiento
DDV	Vesículas preparadas por el método de diálisis con detergente
DLS	Dynamic Light Scattering
Dod.	Dodecanol
DRV	Vesículas preparadas mediante el método de deshidratación/rehidratación
DRV-MFV	Vesículas preparadas mediante microfluidización de una suspensión DRV
DRV-VET	Vesículas preparadas mediante el método de deshidratación/rehidratación seguido de extrusión
EE	Eficacia de encapsulación
Exp.	Experimento
$f(k_a)$	Función de Henry
F	Parámetro ANOVA
FAT-VET	Vesículas preparadas mediante ciclos de congelación/descongelación seguido de extrusión
HLB	Balance hidrófilo-lipófilo
HPLC	Cromatografía en fase líquida de alta eficacia

---

$l_c$	Longitud crítica del grupo hidrófilo
LDV	Laser Doppler Velocimetry
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLS	Esferas multilamelares
MLV	Vesículas multilamelares
MLV-FAT	Vesículas preparadas mediante ciclos de congelación/descongelación a partir de una suspensión de vesículas multilamelares
MVV	Vesículas multivesiculares
NIBS	Non-Invasive Back Scatter technology
p/p	Relación peso/peso
PDI	Índice de polidispersividad
ppm	Partes por millón
REV	Vesículas preparadas mediante el método de evaporación en fase inversa
REV-VET	Vesículas preparadas mediante el método de evaporación en fase inversa seguido de extrusión
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Resveratrol
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
$T_m$	Temperatura de transición de fase gel a fase líquido cristalino del sistema
v	Volumen del grupo hidrófilo
VEI	Vesículas preparadas por el método de inyección de etanol

VET Vesículas preparadas mediante el método de extrusión

VPL Vesículas preparadas por el método pro-liposoma

### Letras griegas

$\upsilon_E$  Movilidad electroforética

$\epsilon$  Constante dieléctrica del medio

$\zeta$  Potencial zeta

$\mu$  Viscosidad del medio

$\lambda$  Longitud de onda



## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Devaraj, G.N., Parakh, S.R., Devraj, R., Apte, S.S., Rao, B.R., Rambhau, D., 2002. *Release studies on niosomes containing fatty alcohols as bilayer stabilizers instead of cholesterol*. Journal of Colloid and Interface Science **251**, 360–365.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B., 1999. *Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document*. British Food Journal **81**, S1–S27.

Elías Gómez, J., 2009. *Efectos de los Isómeros del Resveratrol sobre la Homeostasis del Calcio y del Óxido Nítrico en Células Vasculares*. Santiago de Compostela: Santiago de Compostela Universidade. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico.

Fernández-Mar, M.I., Mateos, R., García-Parrilla, M.C., Puertas, B., Cantos-Villar, E., 2012. *Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review*. Food Chemistry **130**, 797–813.

Frémont, L., Belguendouz, L., Delpal, S., 1999. *Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids*. Life Sciences **64**, 2511–2521.

Gil, J.M., Mouhrat, Y., 2003. *Estudio de comportamiento del consumidor y leche Omega-3*, Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología.

Gülçin, İ., 2010. *Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight*. Innovative Food Science & Emerging Technologies **11**, 210–218.

Hao, Y.-M., Li, K., 2011. *Entrapment and release difference resulting from hydrogen bonding interactions in niosome*. International Journal of Pharmaceutics **403**, 245–253.

Hung, L.-M., Chen, J.-K., Huang, S.-S., Lee, R.-S., Su, M.-J., 2000. *Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes*. Cardiovascular Research **47**, 549–555.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997. *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. *Science* **275**, 218–220.

Langcake, P., Pryce, R.J., 1976. *The production of resveratrol by Vitis vinifera and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury*. *Physiological Plant Pathology* **9**, 77–86.

Mahale, N.B., Thakkar, P.D., Mali, R.G., Walunj, D.R., Chaudhari, S.R., 2012. *Niosomes: Novel sustained release nonionic stable vesicular systems – An overview*. *Advances in Colloid and Interface Science* **183–184**, 46–54.

Manconi, M., Sinico, C., Valenti, D., Loy, G., Fadda, A.M., 2002. *Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties*. *International Journal of Pharmaceutics* **234**, 237–248.

Marcos, A., González-Grass, M., Ramos, E., 2003. *Alimentos funcionales y patologías*. *Yogurvivo Alimentos funcionales* **21**, 14-15.

Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J.M., Gómez, E., Fernández, P., 2002. *The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects o long-term moderate wine consumption*. *Molecular Pharmacology* **61**, 294–302.

Pando, D., 2010. *Encapsulación de Resveratrol mediante Niosomas*. Trabajo Fin de Máster. Máster en Ingeniería de Procesos y Ambiental. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo.

Pando, D., Gutiérrez, G., Coca, J., Pazos, C., 2013. *Preparation and characterization of niosomes containing resveratrol*. *Journal of Food Engineering* **117**, 227–234.

Renaud, S., de Lorgeril, M., 1992. *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. *The Lancet* **339**, 1523–1526.

Rosset, R., Cande, M., Jardy, N., Masson, A., 1990. *Manual Pratique de Chromatographie en Phase Liquid*. Édisson Masson, París.

Ruiz, S., 2011. *Microencapsulación de Hierro en Niosomas para su Aplicación en Alimentos Funcionales*. Proyecto de Investigación. Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo.

Russo, A., Palumbo, M., Aliano, C., Lempereur, L., Scoto, G., Renis, M., 2003. *Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult*. Life Sciences **72**, 2369–2379.

Salager, J.L., 2002. *Surfactantes: Tipos y Usos*. Cuaderno FIRP S300-A, Módulo de Enseñanza en Fenómenos Interfaciales. Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos, Facultad de Ingeniería. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Sánchez, M., Barrena, R., 2004. *El consumidor ante los alimentos de nueva generación: alimentos funcionales y alimentos transgénicos*. Revista de Estudios Agrosociales y Pesqueros **204**, 95–128.

Santucci, E., Carafa, M., Coviello, T., Murtas, E., Riccieri, F.M., Alhaique, F., Modesti, A., Modica, A., 1996. *Vesicles from polysorbate 20 and cholesterol. A simple preparation and a characterization*. STP Pharma Sciences **6**, 29–32.

Siemann, E.H., Creasy, L.L., 1992. *Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine*. American Journal of Enology and Viticulture, **43**, 49–52.

Uchegbu, I.F., 1994. *Some aspects of the niosomal delivery of doxorubicin*. Ph. D. Thesis, University of London, England.

Uchegbu, I.F., Vyas, S.P., 1998. *Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics **172**, 33–70.

Walde, P., Ichikawa, S., 2001. *Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications*. *Biomolecular Engineering* **18**, 143–177.

Wang, Z., Zou, J., Huang, Y., Cao, K., Xu, Y., Wu, J.M., 2002. *Effect of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro*. *International Journal of Molecular Medicine* **9(1)**, 77-79.

<http://www.eufic.org> (junio, 2013)

<http://www.nusa.es> (junio, 2013)

<http://www.ine.es> (junio, 2013)

<http://www.sigmaaldrich.com> (junio, 2013)

<http://www.gattefosse.com> (junio, 2013)

<http://www.elmundovino.elmundo.es> (julio, 2013)