



UNIVERSIDAD DEL PAPA LOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Formación de nanoemulsiones por ultrasonido a
partir de almidón de malanga modificada
químicamente con anhídrido octenil succínico
(OSA)**

T E S I S

**Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología**

Presenta

Rocío Márquez Reyes

Director de Tesis

Dr. Andrés Aguirre Cruz

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. 2018.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/112
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 13 de septiembre de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Biotecnología de **C. Rocío Márquez Reyes**, matrícula 15140007, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Formación de nanoemulsiones por ultrasonido a partir de almidón de malanga modificadas químicamente con anhídrido octenil succínico (OSA)**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jù

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Rocío Márquez Reyes
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/0117
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 13 de septiembre de 2018

C. ROCÍO MÁRQUEZ REYES
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Andrés Aguirre Cruz	UNPA	Presidente
Dra. Delia Esther Páramo Calderón	UNPA	Vocal
Dr. Edgar García López	Cátedras CONACyT-UNPA	Secretario
Dra. Hermenegilda Moreno Díaz	UNPA	1er Suplente
Dr. Julian Mario Peña Castro	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.



Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Andrés Aguirre Cruz – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Alimentos de la **Universidad del Papaloapan**, campus Tuxtepec, bajo la dirección del **Dr. Andrés Aguirre Cruz** con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada (N° de becario 586224), asimismo se agradece también por el apoyo otorgado a través de la convocatoria BECAS MIXTAS 2016-Marzo 2017 para movilidad nacional (N° del programa 291061) y por el apoyo otorgado a través de la convocatoria Programas de Apoyos Complementarios a Mujeres indígenas Becarias CONACYT 2016 (N° del programa 291134).



En tiempos de cambio, quienes estén abiertos al aprendizaje se adueñarán del futuro, mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe.

Eric Hoffer

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha dado fortaleza para salir adelante.

A mis padres, Esther Reyes Arano y José Luis Márquez Solís por su amor y apoyo incondicional, en todos los sentidos, la confianza, por sus sabios consejos ante los retos de la vida, por no dejarme caer, cuando muchas veces quise rendirme. LOS AMO.

A mi hija, Lila Mabel Fernández Márquez, por iluminar mi vida cada mañana con su sonrisa.

A mis hermanas, Gloria Itzel Márquez Reyes y Wendy Hernández Pablo por su amor, confianza, por sus ocurrencias, por darme fuerzas ante las tempestades y simplemente por ser más que mis hermanas, mis mejores amigas.

A mi tía Gloria Márquez Solís, por su dedicación y apoyo incondicional, por siempre consentirme y recordarme que en la vida, todo lo que realmente vale, cuesta. Por ser ejemplo y pilar en mi camino, para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este proyecto, están dedicados a todas aquellas personas que, de alguna forma, son parte de su culminación.

Mis sinceros agradecimientos están dirigidos hacia el Dr. Andrés Aguirre Cruz quien es un ejemplo claro de conocimientos y disposiciones. Doctor, gracias por formar parte de mi crecimiento profesional y personal. Gracias por el rigor, la confianza, la paciencia, amistad, sinceridad, apoyo y consejos durante estos 3 años de maestría.

A mi primo Antonio de Jesús Rojas Márquez, por confiar en mí, por su apoyo y conocimientos brindados en la elaboración de tesis.

A Jonathan Fernández Santos por ayudarme en momentos de desesperación. Por su paciencia y apoyo para componer mi archivo de tesis, cuando este se dañaba. Muchísimas gracias !!!.

A los integrantes del comité revisor, Dr. Edgar García López, Dr. Julián M. Peña Castro, Dra. Hermenegilda Moreno Díaz, Dra. Delia Esther Páramo Calderón.

A todos mis amigos, compañeros y profesores de la UNPA, formaron parte de este recorrido, siempre estarán presente en mis recuerdos.

Fragmentos de esta tesis fue presentado en el siguiente congreso:

1. **Márquez-Reyes, Rocío**, Carmona-García, Roselis, Martinez-Sanchez, Cecilia E., Peña-Castro Julián, Moreno-Díaz Hemenegilda, Aguirrez-Cruz Andrés. Póster “Elaboración de una emulsión a partir de aceite de naranja/agua con almidón de malanga modificado químicamente con anhídrido octenil succínico (OSA)”. Puerto Vallarta, Jal. 25-30 de Junio del 2017. **XVII Congreso Nacional de Bioingeniería y Biotecnología.**

CONTENIDO

CONTENIDO DE TABLAS	12
CONTENIDO DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIACIONES	16
RESUMEN	17
SUMMARY	18
INTRODUCCIÓN	19
I. ANTECEDENTES	21
1.1. Tipos de emulsiones	21
1.1.1. Nanoemulsiones	21
1.1.2. Agente emulsionante o tensoactivo	22
1.1.2.1. Clasificación de los agentes tensoactivos.....	23
1.1.2.2 Características deseables en un agente tensoactivo para la formación de nanoemulsiones	24
1.1.3. Formación de las nanoemulsiones.....	25
1.2. Métodos para la preparación de nanoemulsiones.....	26
1.2.1. Homogenización por alta presión.....	26
1.2.2. Inversión de fases con temperatura o PIT	27
1.2.3. Emulsificación por ultrasonido.....	27
1.2.3.1. Equipo de ultrasonido.....	27
1.2.3.2. Fundamentos del proceso de ultrasonido.....	28
1.2.3.3. Formación de las nanoemulsiones por el método de ultrasonido.....	30
1.3. Ventajas del uso de ultrasonido para la formulación de nanoemulsiones	30
1.4. Estabilidad de las nanoemulsiones	31
1.4.1. Medición de la estabilidad en nanoemulsiones	31
1.5. Malanga	38
1.5.1. Agroecología de la malanga	39
1.6. Almidón.....	39
1.6.1. Estructura y composición química del almidón	39
1.6.1.2. Amilosa.....	40
1.6.1.3. Amilopectina	41
1.6.2. Propiedades funcionales del almidón	41
1.7. Almidones modificados.....	42
1.7.1. Fundamento del proceso de modificación química del almidón con OSA	42

1.7.2. Uso y aplicaciones de los almidones modificados por OSA	43
II. JUSTIFICACIÓN	45
III. HIPÓTESIS	46
IV. OBJETIVOS.....	47
4.1. Objetivo general.	47
4.2. Objetivos particulares.....	47
V. MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1. Diagrama experimental.....	48
5.2. Materia prima	49
5.3. Modificación del almidón de malanga con OSA.....	49
5.4. Modificación química del almidón de malanga con OSA.....	50
5.5. Caracterización del almidón de malanga.....	50
5.5.1. Determinación del grado de sustitución (GS).....	50
5.5.2. Análisis estadístico para los GS del almidón	51
5.5.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	51
5.5.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	52
5.6. Caracterización de las micro y nanoemulsiones.....	52
5.6.1. Preparación de las fases de la emulsión gruesa	52
5.6.2. Preparación de la emulsión gruesa	52
5.6.3. Preparación de las nanoemulsiones por el método de ultrasonido	53
5.6.4. Estabilidad de almacenamiento	54
5.6.4.1. Microscopía óptica de las emulsiones	54
5.6.5. Medición de la estabilidad de las nanoemulsiones.....	54
5.6.6. Determinación del tamaño de gota e índice de polidispersidad	55
5.6.7. Potencial Z.....	56
5.6.8. Análisis estadístico para las nanoemulsiones	56
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1. Primera etapa: caracterización del almidón modificado.....	57
6.1.1 Determinación del grado de sustitución (GS).....	57
6.1.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	58
6.1.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).....	61
6.2. Segunda etapa: Caracterización y estabilidad de las micro y nanoemulsiones.	62
6.2.1. Estabilidad de las nanoemulsiones en almacenamiento	63
6.2.2. Variación del tamaño de gota	65

6.2.3. Microscopía óptica de las nanoemulsiones	68
6.2.4. Medición de la estabilidad de las nanoemulsiones.....	71
6.2.5 Determinación del diámetro medio de las gotas.....	77
6.2.6. Mediciones del potencial $-\zeta$ de las nanoemulsiones	79
CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS.....	84
REFERENCIAS	85
ANEXOS	97

CONTENIDO DE TABLAS

No.		Pág.
Tabla 1.	Principales diferencias entre nanoemulsiones y emulsiones (Jafari <i>et al.</i> , 2007).....	22
Tabla 2.	Emulsificantes más utilizado en la industria alimentaria (Silva <i>et al.</i> , 2012).....	24
Tabla 3.	Características de algunos almidones (Badui-Dergal, 2013; Dai <i>et al.</i> , 2015; Torres <i>et al.</i> , 2013).....	40
Tabla 4.	Diferentes condiciones (concentración, H ₂ O y tiempo) de modificación química del almidón de malanga con OSA usadas en este trabajo.....	50
Tabla 5.	Formulación de las nanoemulsiones utilizando diferentes concentraciones de almidón nativo y modificado.....	53
Tabla 6.	Grados de sustitución en muestras de almidón de malanga modificados con OSA a partir de diferentes metodologías.....	57
Tabla 7.	Tamaño de gota de emulsiones y nanoemulsiones formuladas con almidón de malanga nativo (AMN) y modificado (AMM), utilizando diferentes tratamientos.....	67

CONTENIDO DE FIGURAS

No.		Pág.
Figura 1.	Estructura de un agente tensoactivo (Hernández-Jaimes, 2009).....	23
Figura 2.	Descripción del equipo ultrasónico (UP200S) para la producción de nanoemulsiones: a) Generador (energía eléctrica), b) Transductor (energía mecánica), c) Amplificador (amplifica las oscilaciones o vibraciones del transductor) y d) Sonotrodo (capta y traduce la energía amplificada a sonido), e) Reactor de vidrio (control de la temperatura) (Hielscher Ultrasonics GmbH).....	28
Figura 3.	Representación esquemática del crecimiento y colapso de la burbuja en el proceso de cavitación acústica (Soria & Villamiel, 2010; Abbas <i>et al.</i> , 2013).....	29
Figura 4.	Movimiento del cabezal óptico del Turbiscan durante el escaneo de una emulsión.....	33
Figura 5.	Fenómenos que pueden presentarse en una emulsión durante su almacenamiento (McClements, 1999).....	34
Figura 6.	Perfil gráfico referente al cremado de una emulsión cuando no hay dependencia (Tomado De Villepin, 2007).....	35
Figura 7.	Perfil gráfico referente al fenómeno de sedimentación en una emulsión (Tomado De Villepin, 2007).....	36
Figura 8.	Perfil gráfico referente al fenómeno de coalescencia/floculación en una emulsión (Tomado De Villepin, 2007).....	37
Figura 9.	Planta de malanga y su corno representativo (Lim, 2015).....	38
Figura 10.	Estructura química de la amilosa (Campos, 2002).....	41
Figura 11.	Estructura química de la amilopectina (Campos, 2002).....	41

Figura 12.	Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (a diferentes resoluciones) del almidón de malanga. Almidón nativo: A) 5.0 x: forma circular de algunos gránulos de almidón, B) 10 x. Almidón modificado con OSA (AMM-9): C) 5.0 x: gránulos que exhibieron superficies ligeramente rugosas, D) 10 x: presencia de poros en la superficie del almidón.....	60
Figura 13.	Espectro de FT-IR de muestras de almidón de malanga nativo (AMN) y almidón de malanga modificado (AMM-9) con OSA (GS=0.025). En la parte superior derecha se muestra la figura que representa el enlace éster característico de la modificación con OSA.....	62
Figura 14.	Imágenes de las muestras preparadas por homogenización ultrasónica (P = 60 W), antes y después de su almacenamiento (30 días a 25 °C). A): separación marcada de la fase oleosa, y B): fenómeno de cremación; corresponde a nanoemulsiones preparada almidón nativo (EAN) utilizando dos concentraciones (97 y 214 mg / mL de aceite). C): pérdida de color, y D): conservación de color; corresponden a nanoemulsiones preparada con almidón modificado (EAM) utilizando dos concentraciones (97 y 214 mg / mL de aceite).....	64
Figura 15.	Efecto de la potencia y tiempo de sonicación en la reducción de tamaño de gota de nanoemulsiones elaboradas a partir de almidón de malanga nativo (AMN) y modificado (AMM) a diferentes tiempos (7 y 10 min).....	68
Figura 16.	Imágenes de microscopía óptica (20x) de las nanoemulsiones: A) elaboradas con almidón nativo (EAN), B) con almidón modificado (EAM), utilizando un tiempo de 10 min y diferentes potencias (40, 60 y 80 W).....	70
Figura 17.	Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluadas a una temperatura de 4 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 40 W en función del tiempo de almacenamiento.....	73

Figura 18. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluadas a una temperatura de 4 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 60 W en función del tiempo de almacenamiento.....	74
Figura 19. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluada a una temperatura de 25 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 40 W en función del tiempo de almacenamiento.....	75
Figura 20. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluada a una temperatura de 25 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 60 W en función del tiempo de almacenamiento.....	76
Figura 21. Efecto de la temperatura (4 y 25 °C) y potencia de sonicación (40 y 60 W) sobre el tamaño de gota de las nanoemulsiones durante el periodo de almacenamiento (30 días). Las diferencias significativas fueron evaluadas comparando los promedios representativos de cada tratamiento. Tukey, $p < 0.05$, $n = 10$	78
Figura 22. Potencial- ζ de las nanoemulsiones O/W formuladas con AMM, utilizando diferentes potencias de ultrasonido (40 y 60 W) y dos tiempos de almacenamiento (4 y 25 °C). A). Nanoemulsión elaborada 40 W almacenadas a 4 °C, B). 40 W-25 °C, C). 60 W-4 °C, D). 60 W-25 °C. Valores seguidos por las mismas letras dentro de la misma serie no son significativamente diferentes. Tukey ($p < 0.05$).....	80

LISTA DE ABREVIACIONES

AMN	Almidón de malanga nativo
AMM	Almidón de malanga modificado
Bs	Base seca
DMG	Diámetro medio de las gotas
EAN	Nanoemulsión elaborada con almidón nativo
EAM	Nanoemulsión elaborada con almidón modificado
mg/mL	Miligramo/ mililitro de aceite
mV	Milivoltios
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MLS	Dispersión de luz múltiple
O/W	Aceite en agua
p/p	Peso/peso
Rpm	Revoluciones por minutos
TGP	Tamaño de gota promedio
t₀	Tiempo cero
ΔBS %	Porcentaje de retrodispersión delta
ΔT %	Porcentaje de transmisión de luz

RESUMEN

Las nanoemulsiones (N_{ES}) son sistemas con una amplia gama de aplicaciones, como por ejemplo en la formulación de cosméticos, detergentes, adhesivos, revestimientos, pinturas, productos farmacéuticos y algunos productos alimenticios. Los principios de formación y estabilidad de las nanoemulsiones han sido ampliamente estudiados en diversas investigaciones. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la formación, propiedades físicas y estabilidad de nanoemulsiones aceite en agua (O/W) a partir de aceite de naranja y almidón modificado de malanga (*Colocasia esculenta*) (AMM) con anhídrido octenil succínico (OSA). Primero se cuantifico el grado de sustitución (GS) del AMM y fue caracterizado por microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectrometría infrarroja con transformadas de fourier (FT-IR). Posteriormente las N_{ES} fueron formuladas evaluando el tamaño de gota (TG) por microscopía óptica (MO) y su estabilidad durante el almacenamiento a 4 y 25 °C. Como parámetro de estabilidad se cuantifico el diámetro medio de gota (DMG) y potencial Z (ζ), utilizando distintas concentraciones de AMM (97 y 214 $\mu\text{g/mL}$ de aceite), tiempos (7 y 10 min) y potencias (40, 60 y 80 W/mL) de homogenización.

El AMM por 8 h presentó el GS más alto (0.025). El análisis de MEB del AMM reveló que los grupos de OSA actúan atacando la superficie del almidón generando pequeños poros y grietas. El análisis FT-IR indicó una banda de absorción característica de los grupos éster en 1735 cm^{-1} para el AMM. La nanoemulsión (N_E) formulada con una concentración de 214 mg/mL aceite y AMM, presentó mejor estabilidad durante su almacenamiento (30 días). La microscopía óptica mostró que tanto AMM como el almidón nativo se absorbieron en la interfaz aceite-agua durante el proceso de elaboración (ultrasonido). El AMM generó un tamaño de gota más pequeño ($0.0262 \pm 0.007\ \mu\text{m}$) en la N_E . Las condiciones más adecuadas para la formulación de la N_E elaborada por ultrasonido fueron: 10 min, 60 W potencia, una relación de AMM/aceite de 214 mg/mL. La temperatura de almacenamiento más adecuada fue de 4 °C. Debido a que las N_E presentaron mejor estabilidad y un DMG más homogéneo ($178.6 \pm 2.3\ \text{nm}$). Esto indica que el uso de aceite de naranja y AMM puede ser considerado como un sistema modelo para la elaboración de N_E estables o bien ser aplicado como sistema emulsificador que sirva como vehículos para el transporte y protección de compuestos bioactivos de importancia alimenticia.

SUMMARY

Nanoemulsions (N_{ES}) are systems with a wide range of applications, such as in the formulation of cosmetics, detergents, adhesives, coatings, paints, pharmaceuticals and some food products. The principles of formation and stability of nanoemulsions have been widely studied in various investigations. The aim of the present work was to evaluate the formation, physical properties and stability of oil-in-water (O/W) nanoemulsions from orange oil and modified malanga (*Colocasia esculenta*) starch (MMS) with Octenyl Succinic Anhydride (OSA). First, the degree of substitution (DS) of the MMS was quantified and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Later the N_{ES} were formulated by evaluating the size of droplet (SD) by optical microscopy (MO) and their stability during storage at 4 and 25 °C. The mean diameter of droplet (MDD) and Z potential (ζ) were quantified as a stability parameter—using different concentrations of MMS (97 and 214 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oil), times (7 and 10 min) and potencies (40, 60 and 80 W) of homogenization.

The MMS for 8 h presented the highest DS (0.025). The MEB analysis of the MMS revealed that the OSA groups act by attacking the surface of the starch while generating small pores and cracks. The FTIR analysis indicated an absorption band characteristic of the ester groups at 1735 cm^{-1} for the MMS. The nanoemulsion (N_E) formulated with a concentration of 214 mg/mL oil and MMS presented better stability during storage (30 days). Optical microscopy showed that both MMS and native starch were absorbed at the oil-water interface during the manufacturing process of ultrasound. The MMS generated a smaller droplet size ($0.0262 \pm 0.007\ \mu\text{m}$) in the N_E . The most suitable conditions for the formulation of the N_E elaborated by ultrasound were: 7 min, 60 W power and MMS/oil ratio of 214 mg/mL. The most suitable storage temperature was 4 °C due to the N_E showing better stability and a more homogeneous MDD ($178.6 \pm 2.3\ \text{nm}$). This indicates that the use of orange oil and MMS can be considered as a model system for the production of stable N_E or be applied as an emulsifier system that serves as vehicles for the transport and protection of bioactive compounds of nutritional importance.

INTRODUCCIÓN

Las nanoemulsiones son sistemas transparentes o translúcidos comúnmente formadas por dos fases líquidas inmiscibles (agua y aceite), que en su mayoría cubren un tamaño de gota de 50-200 nm (Rajalakshmi *et al.*, 2011). A diferencia de las emulsiones, poseen un tamaño de gota a escala macro (0,5-100 μm), tienen mejor estabilidad cinética ante la separación gravitatoria, floculación y coalescencia. Estas características las hacen candidatas a numerosas aplicaciones, entre la que destacan: la liberación controlada y/o absorción de ingredientes funcionales, claridad óptica para la elaboración de productos (como las bebidas alcohólicas) (Jafari *et al.*, 2007), encapsulación de aromas (industria cosmética), elaboración de fármacos y de agroquímicos (Kaltsa *et al.*, 2014). Por tal motivo, el interés en la producción de nanoemulsiones ha crecido y se han implementado métodos de alta energía (métodos mecánicos) o de baja energía (utilizando productos químicos) para su elaboración. Los métodos mecánicos como: la microfluidización, la homogeneización de alta presión y la emulsificación por ultrasonido están siendo ampliamente utilizados en la industria (Abbas *et al.*, 2014). Sin embargo en los últimos años el proceso de emulsificación asistida por ultrasonido ha ganado popularidad entre los procesadores de alimentos, así como para la producción de nanoemulsiones, esto debido principalmente al uso eficiente de la energía, bajo costo de producción, una menor contaminación y un mejor control sobre las variables de formulación del proceso (Kaltsa *et al.*, 2014; Gülseren *et al.*, 2007).

El proceso de ultrasonido resulta ser un método eficiente para la elaboración de nanoemulsiones, ya que implica un tratamiento de alta intensidad a baja frecuencia, en el que se aplican ondas sonoras a un medio líquido, provocando la expansión y colapso de las gotas, bajo la influencia de efectos de cavitación. En este sentido se reduce el tamaño de las gotas de aceite a escala nanométrica. Una vez reducido el tamaño de gota su estabilidad dependerá del tipo y concentración del agente emulsionante. Esto se debe a que la eficacia del proceso está en virtud de la conformación estructural (anfipática) del emulsionante, el cual tiene como finalidad reducir la tensión interfacial entre las fases de la nanoemulsión (agua-aceite) permitiendo la dispersión o mezclado de ambas fases (Rajalakshmi *et al.*, 2011).

Los emulsionantes comúnmente utilizados para la preparación de nanoemulsiones de tipo alimenticio incluyen: proteínas anfipáticas (proteínas del suero de leche), fosfolípidos (lecitina) y polisacáridos anfipáticos (almidones modificados y gomas). Sin embargo, en su gran mayoría, las nanoemulsiones son desarrolladas con el uso de emulsionantes sintéticos, que resultan ser tóxicos para el uso y consumo humano en cantidades mayores. Por esta razón, la industria de alimentos busca la sustitución de emulsionantes sintéticos, con alternativas naturales, con la finalidad de crear productos libres de sustancias extrañas y favorables para el consumidor. En consecuencia, una de las tendencias; es el uso de polisacáridos para la preparación de las nanoemulsiones (Abbas *et al.*, 2014; Gülseren *et al.*, 2007).

El uso de polisacáridos y algunas proteínas en su forma nativa, resultan ser inestables y propensas a perder la funcionalidad ante factores como: temperaturas altas durante el procesamiento y fluctuaciones de pH del medio (Thomas & Atwell, 1999). Por esta razón se han propuesto como estrategia frente a este tipo de problemáticas el uso de almidones modificados. Una propuesta interesante para brindar esta funcionalidad al almidón y poder utilizarlo como agente emulsionante es la modificación con anhídrido octenil succínico (OSA por sus siglas en inglés), ya que se ha reportado (Zhang *et al.*, 2014) que esta modificación, confiere hidrofobicidad superficial en algunos almidones, lo cual brinda la posibilidad para ser utilizados como agentes estabilizantes en emulsiones aceite/agua (O/W), o agua/aceite (W/O). Esto es útil para algunas industrias como la de alimentos, cosméticos y farmacéutica (Bello-Pérez *et al.*, 2015). Sin embargo, cabe resaltar que una de las deficiencias de la modificación por OSA, (aunque ya son utilizadas como emulsificantes), es que no se ha logrado obtener la reducción del tamaño de gota a escala nano para una mayor estabilidad (Timgren *et al.*, 2011). Por tal motivo, en el presente trabajo se utilizó almidón de malanga modificado (AMM) químicamente con OSA, para la elaboración de nanoemulsiones utilizando el método de ultrasonido, con la finalidad de evaluar la formación y estabilidad.

I. ANTECEDENTES

Una emulsión es un sistema coloidal, constituido por la homogenización de dos fases líquidas inmiscibles (agua y aceite); una de estas fases se encuentra dispersa en la otra, en forma de pequeñas gotas esféricas (Bello-Pérez *et al.*, 2015), cuya estructura es estabilizada por un agente emulsionante (también llamado tensoactivo).

Los dos líquidos inmiscibles presentes en la emulsión, denominados agua (W= Water por sus siglas en ingles) y aceite (O=Oil por sus siglas en ingles) representan la fase polar y apolar respectivamente (McClements, 2012). Por tal motivo en la mayoría de los casos, que podamos formular una emulsión tendremos: las emulsiones de aceite en agua (O/W por sus siglas en ingles Oil-Water) cuando se trata de gotas de aceite dispersadas en agua y en caso contrario de agua en aceite (W/O) (Márquez, 2005).

1.1. Tipos de emulsiones

Muchas de las propiedades de las emulsiones, tales como la estabilidad, el comportamiento reológico, la viscosidad y el color, van a depender directamente del tamaño de gota y su distribución. Por tal motivo, se han clasificado a las emulsiones de la siguiente manera: a) Macroemulsiones de 0.5-100 μm , b) Microemulsiones de 100-1000 nm y c) Nanoemulsiones de 10-100 nm (Abbas *et al.*, 2014; Jafari *et al.*, 2007).

1.1.1. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales, que poseen un tamaño de gota muy pequeño (entre 10 y 100 nm) y baja polidispersidad, que generalmente, les confiere alta estabilidad cinética y apariencia translúcida (Abbas *et al.*, 2014) en comparación con las emulsiones (Tabla 1). Estas características han hecho a las nanoemulsiones objeto de numerosas aplicaciones, ya que pueden actuar como vehículos o sistemas de administración para compuestos lipofílicos tales como: nutracéuticos, fármacos, antioxidantes y agentes antimicrobianos (Silva *et al.*, 2012).

Tabla 1. Principales diferencias entre nanoemulsiones y emulsiones (Jafari *et al.*, 2007).

Características	Nanoemulsiones	Emulsiones
Tamaño de gota (fase dispersa)	10-100 nm	0.5-100 μm
Aspecto	Transparente	Lechoso
Formación	Espontánea	Homogenización
Estabilidad cinética	Alta	Baja

Las nanoemulsiones a diferencia de las emulsiones no requieren una cantidad alta de tensoactivo, por lo que pueden ser preparadas por concentraciones de tensoactivos menores al 10 %. Esto es debido a su pequeño tamaño de gota y alta estabilidad cinética (Jafari *et al.*, 2007).

1.1.2. Agente emulsionante o tensoactivo

Para producir una nanoemulsión estable es necesario disminuir la tensión superficial, por lo que es necesario el uso de un agente tensoactivo que; permite proteger la fase emulsionada con una película, impidiendo el rompimiento de las gotas (Timgren *et al.*, 2011).

Los agentes emulsionantes también llamado tensoactivos son estabilizadores coloidales que dentro de su estructura contienen una sección hidrofílica y una lipofílica como se muestra en la Figura 1. Esta estructura le confiere la capacidad para absorberse en la superficie de la gota durante la formación de nanoemulsiones, formando a su vez agregados coloidales llamado “micelas”, las cuales tienen como finalidad mezclar las fases de la nanoemulsión (Hernández-Jaimes, 2009).



Figura 1. Estructura de un agente tensoactivo (Hernández-Jaimes, 2009).

1.1.2.1. Clasificación de los agentes tensoactivos

Los agentes tensoactivos se pueden clasificar en función de la naturaleza iónica de su cabeza hidrofílica, de la siguiente manera: 1) Aniónicos: si se trata de agentes tensoactivos que presentan la cabeza hidrofílica con carga negativa, y poseen contra-ión positivo que suelen ser Na^+ . 2) Catiónicos: estos agentes tensoactivos presentan una cabeza positiva, por ejemplo, el ion trimetil amonio ($\text{N}(\text{CH}_3)^3+$) y contra-iones negativos como el Br^- (Aranberri *et al.*, 2006). 3) Iónicos: los tensoactivos iónicos pueden proporcionar una carga eléctrica a las gotas de la emulsión, ya sea con cargas positivas o negativas en la misma molécula, convirtiéndolas en moléculas neutras sin contra-iones. 4) No-iónicos, se caracterizan por crear una barrera estérica a través de grupos moleculares dirigidos hacia el medio de dispersión (Silva *et al.*, 2012); esto es debido a que carecen de grupos polares cargados, y en consecuencia poseen otros grupos moleculares, por ejemplo, los grupos moleculares etoxilados, $-(\text{OCH}_2\text{-CH}_2)_m \text{OH}$, los cuales muestran una gran afinidad hacia las moléculas de agua, debido a las fuertes interacciones dipolo-dipolo entre los enlaces de hidrógeno (Aranberri *et al.*, 2006).

En la Tabla 2 se muestran los emulsionantes/ tensoactivos utilizados con mayor frecuencia en la industria alimentaria, el tipo y la carga que poseen (Silva *et al.*, 2012).

Tabla 2. Emulsificantes más utilizado en la industria alimentaria (Silva *et al.*, 2012).

Emulsificante / tensoactivo	Tipo
Polietilenglicol (35) aceite de ricino (cremophor EL)	Tensoactivo (no iónico)
Polioxietileno-660-12- hidroxiestearato	Tensoactivo (no iónico)
Polioxietileno 4-lauril-éter	Tensoactivo (no iónico)
Span 20	Tensoactivo (no iónico)
Span 80	Tensoactivo (no iónico)
Tween 20	Tensoactivo (no iónico)
Tween 80	Tensoactivo(no iónico)
Tween 40	Tensoactivo (no iónico)
Tween 60	Tensoactivo (no iónico)
Éster de ácido graso de sacarosa (L 1695)	Tensoactivo (no iónico)
Polioxietileno 6-lauril éter	Tensoactivo (no iónico)
Monolaurato de decaglicerol (ML750)	Tensoactivo (no iónico)
Ésteres de poliglicerol de los ácidos grasos (PGES)	Tensoactivo (no iónico)
Alcanol -XC	Tensoactivo (no iónico)
Dodecil sulfato de sodio	Tensoactivo (aniónico)
Bromuro de dodecil trimetil amonio	Tensoactivo (catiónico)
Gelatina	Proteína anfipática
Proteína de suero (WPI)	Proteína anfipática
Concentrado de proteína de suero (WPC)	Proteína anfipática
Hidrolizado de proteína de suero (WPH)	Proteína anfipática
Caseinato de sodio (SC)	Proteína anfipática
Almidón modificado	Hidrocoloide (catiónico)
Pectina	Hidrocoloide (aniónico)
Lipoide S75-3	Fosfolípido anfipático

1.1.2.2 Características deseables en un agente tensoactivo para la formación de nanoemulsiones

Uno de los aspectos más importantes en la formación de productos a partir de nanoemulsiones, es la selección del emulsionante adecuado, ya que los emulsionantes se caracterizan por ser superficies activas, estos llevan a cabo dos funciones principales: la formación de nanoemulsiones y promover la estabilidad de la nanoemulsión (Ozturk & McClements, 2016). Por ello se puede resaltar las características fisicoquímicas deseables de los emulsionantes en los siguientes puntos:

- Deben reducir la tensión interfacial alrededor de 5 dinas/cm en emulsiones preparadas con agitación (Hernández-Jaimes, 2009).
- Los emulsionantes deben ser capaces de adsorberse en la interface agua y aceite, es decir deben tener una estructura anfipática (Ozturk & McClements, 2016).

- En base a su cinética de adsorción el emulsionante debe ser capaz de reducir rápidamente la tensión interfacial, evitando la agregación de las gotas (Ozturk & McClements, 2016).
- Para lograr la estabilización de la nanoemulsión el emulsionante debe ser capaz de generar una fuerte interacción repulsiva entre las gotitas de la nanoemulsión (Ozturk & McClements, 2016).
- El emulsionante debe estar en función de la capacidad de carga de la superficie, es decir, cuanto mayor sea la capacidad de carga mayor será la cantidad de emulsionante.

Los mecanismos de inestabilidad en una nanoemulsión, es influenciada por la concentración del emulsionante en la fase acuosa, y en mayor grado, por la concentración del emulsionante liposoluble, la naturaleza y viscosidad de la fase oleosa (Hernández-Jaimes, 2009).

1.1.3. Formación de las nanoemulsiones

El tipo de nanoemulsión que tiende a formarse depende del balance entre las propiedades hidrofílicas y lipofílicas del agente emulsificante. Generalmente el emulsificante suele cumplir la regla de Bancroft: donde la fase continua es aquella que solubiliza al agente emulsificante (tensoactivo). En este sentido la naturaleza anfipática del agente tensoactivo puede ser expresada en términos de una escala empírica, comúnmente denominada balance BHL (balance hidrófilo-lipófilo) (Aranberri *et al.*, 2006).

El balance hidrofílico-lipofílico es una medida de la afinidad relativa del emulsionante, en las fases: agua y aceite, el cual permite relacionar la naturaleza del emulsionante y sus propiedades como agente emulsionante. El BHL permite asignar un número a la sustancia o a la combinación de sustancias que se quiere emulsionar, para encontrar el tipo de nanoemulsión que se formará (Márquez, 2005).

El BHL mide en escala de 0 a 20, cuando dominan las interacciones del grupo hidrofílico de la molécula del emulsionante, con BHL mayores a 11 (se forman dispersiones coloidales de aceite en agua) y para valores menores a 9, dominando el grupo lipofílico

(se formarán dispersiones de agua en aceite), encontrándose nanoemulsiones con valores de BHL aproximadamente entre 9 y 11 (Márquez, 2005).

1.2. Métodos para la preparación de nanoemulsiones

La formación de nanoemulsiones requiere la aplicación de alta energía. Esta energía puede ser aplicada por equipos mecánicos o por el potencial químico inherente de los componentes. Actualmente existen tres métodos que pueden ser aplicados para la preparación de nanoemulsiones (Hernández-Jaimes, 2009).

- a) Homogenización por alta presión.
- b) Inversión de fases con temperatura o PIT (por sus siglas en inglés, Phase Inversion Temperature).
- c) Emulsificación por ultrasonido.

1.2.1. Homogenización por alta presión

En la homogenización de alta presión, las mezclas están sujetas a muy altas presiones, las cuales son generadas a través de una válvula restrictiva. Estas presiones, provocan que el esfuerzo de cizallamiento sea muy alto, generando la reducción de las gotas de la nanoemulsión (Silva *et al.*, 2012)

Los homogenizadores de alta presión generalmente trabajan en un intervalo de presión va de 50 a 350 MPa. Sin embargo, las presiones altas no pueden utilizarse para todo tipo de nanoemulsiones, por ejemplo, los sistemas O/W que utilizan metilcelulosa como emulsionante sólo podrían estabilizarse con un homogeneizador de baja presión (150 MPa) debido a que el fuerte flujo de elongación producido a presiones más altas promueve la degradación irreversible de las moléculas de cadena larga (Hernández-Jaimes, 2009).

1.2.2. Inversión de fases con temperatura o PIT

El método de inversión de fases con temperatura (PIT) se basa en la preparación de emulsiones a baja energía, aplicando un cambio brusco de temperatura, que afecta el BHL del sistema emulsionado (Jafari *et al.*, 2007). Esta técnica facilita la formación espontánea de nanoemulsiones (Abbas *et al.*, 2013). Sin embargo, su uso está limitado, porque requiere una gran cantidad de tensoactivos, una cuidadosa selección de tensoactivo y no es aplicable para producción a gran escala (Jafari *et al.*, 2007). Su aplicación se centra en sistemas formulados con tensoactivos no iónicos del tipo etoxilado, estos se caracterizan por cambiar su balance hidrofílico-lipófilico con la temperatura; es decir a temperaturas inferiores surge una inversión de fase donde la nanoemulsión resultante es de O/W mientras que a temperaturas superiores, se forman nanoemulsiones W/O (Hernández-Jaimes, 2009).

1.2.3. Emulsificación por ultrasonido

La emulsificación por ultrasonido implica un tratamiento de alta intensidad a baja frecuencia, el cual consiste en la aplicación de ondas sonoras en un medio líquido, seguido de la expansión y colapso de las gotas, bajo la influencia de los efectos de cavitación (Abbas *et al.*, 2014). Bajo este efecto, un punto importante está en medir los tiempos para la preparación de la nanoemulsión; este parámetro va a depender de la intensidad (potencia), amplitud, la cantidad de muestra y la naturaleza del material, ya que en algunos casos, entre más hidrofóbico es el material, mayor será el tiempo de sonicación (Hernández-Jaimes, 2009).

1.2.3.1. Equipo de ultrasonido

El equipo de ultrasonido para la producción de nanoemulsiones, es un sistema que consta de un generador, un transductor (convertidor de corriente eléctrica a vibraciones mecánicas), un amplificador y un sonotrodo, como se muestra en la Figura 2. El generador produce ondas eléctricas con frecuencias determinadas (normalmente de 20 a 100 kHz), mientras que los transductores ultrasónicos consisten en un material piezoeléctrico (Electrostrictivo), que convierte la energía eléctrica en oscilaciones o vibraciones mecánicas. Las vibraciones mecánicas generadas se amplifican con la ayuda de un sonotrodo o punta de titanio (Abbas *et al.*, 2013).

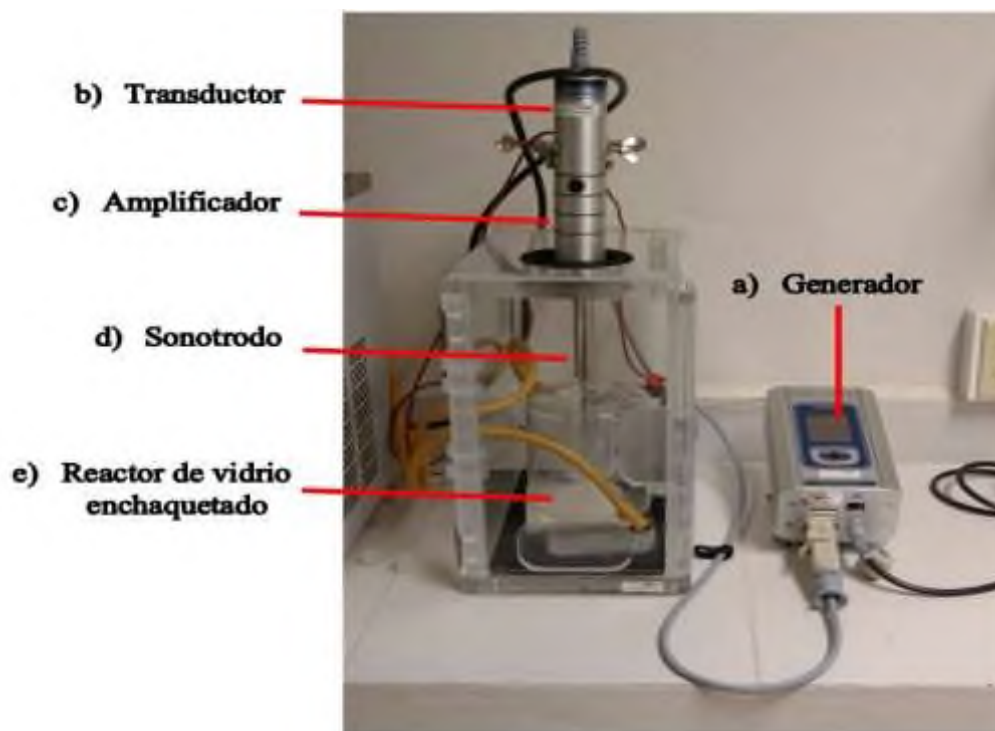


Figura 2. Descripción del equipo ultrasónico (UP200S) para la producción de nanoemulsiones: a) Generador (energía eléctrica), b) Transductor (energía mecánica), c) Amplificador (amplifica las oscilaciones o vibraciones del transductor) y d) Sonotrodo (capta y traduce la energía amplificada a sonido), e) Reactor de vidrio (control de la temperatura), (Hielscher Ultrasonics GmbH).

1.2.3.2. Fundamentos del proceso de ultrasonido

El ultrasonido se basa en la utilización de un dispositivo mecánico para la generación de fuerzas disruptivas, necesarias para la ruptura de fases macroscópicas. En general el ultrasonido se caracteriza por generar ondas sonoras en un rango de frecuencia de 20 a 100 kHz, cuando estas interactúan con la materia, provocan cambios físicos y químicos. Las ondas generadas por el ultrasonido inducen el movimiento de las partículas del medio líquido, a través de una serie de compresiones y dilataciones bajo presión fluctuante, formando pequeñas burbujas de vacío, las cuales, cuando ya no alcanzan un volumen en el que pueden absorber energía, colapsan violentamente durante un ciclo de alta presión, generando el fenómeno de cavitación.

Mientras las ondas sonoras pasan través del medio, dependiendo de la viscosidad y la conductividad del medio, disipan parte de la energía acústica en energía térmica, como se muestra en la Figura 3 (Abbas *et al.*, 2013; Sun & Tomkinson, 2002).

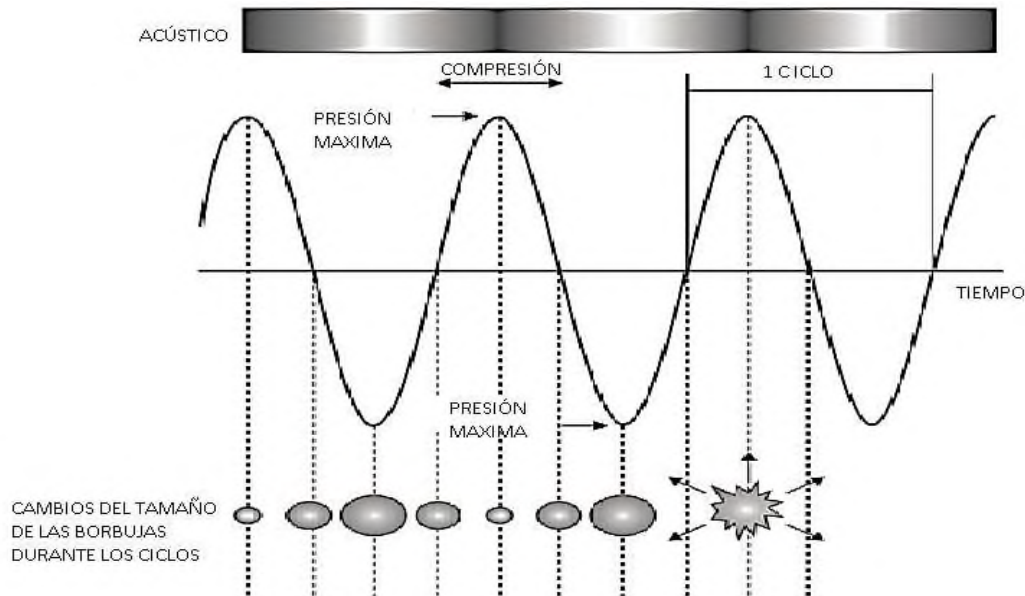


Figura 3. Representación esquemática del crecimiento y colapso de la burbuja en el proceso de cavitación acústica (Soria & Villamiel, 2010; Abbas *et al.*, 2013).

Los efectos físicos producidos por el fenómeno de cavitación acústica, son los siguientes: ondas de choque, microflujos turbulentos, fuerzas de cizalla, aumento de la temperatura, presiones altas y bajas. A partir de estos efectos, el ultrasonido se ha hecho objeto de numerosas aplicaciones, tales como: limpieza, extracción de compuestos naturales o bioactivos, inactivación de enzimas y/o microorganismos, cristalización, emulsificación y despolimerización de polisacáridos (Sun & Tomkinson, 2002).

Estudios recientes han sugerido que el ultrasonido puede cambiar la estructura y propiedades funcionales de los materiales (Soria & Villamiel, 2010; Bello-Pérez *et al.*, 2015). Por ejemplo, la aplicación de ultrasonido puede conducir la despolimerización de carbohidratos, generando cambios en la estructura y propiedades funcionales (Zhang *et al.*, 2013).

1.2.3.3. Formación de las nanoemulsiones por el método de ultrasonido

La formación de nanoemulsiones por el método ultrasonido, implica la aplicación de alta energía, ya que tiene como finalidad superar la energía libre superficial y aumentar el área interfacial entre ambas fases de la nanoemulsión, logrando que se genere la descomposición de las gotas grandes de aceite en tamaño nanométrico, ya que la energía requerida por la fase continua, forma fuerzas de cizallas para romper o deformar las gotas de la fase dispersa; en este sentido la presión ejercida por las gotas se expresan en términos de la presión de Laplace (p) como se muestra en la siguiente ecuación 1.

$$p = \gamma \left[\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right] = \frac{\gamma}{2R} \dots \dots \dots \text{Ec. 1}$$

En donde R_1 y R_2 son el radio de curvatura de la presión de las gotas esféricas, por tanto, $R_1 = R_2$; mientras que γ es la tensión interfacial de las gotas.

Las nanoemulsiones se pueden crear si la presión provocada por la tensión de cizalla es mayor que la presión de Laplace, por lo que es necesario describir la diferencia entre la presión exterior e interior de las gotas formadas en la nanoemulsión. Bajo el efecto de esta presión las gotas de tamaño micrométrico tienden a romperse en finas gotitas de tamaño nanométrico, las cuales son directamente proporcional a la tensión superficial de la nanoemulsión generada (Soria & Villamiel, 2010; Abbas *et al.*, 2013).

Cabe resaltar que la técnica de ultrasonido, proporciona grandes fuerzas de cizallamiento (por efecto de la cavitación), lo cual afecta el tamaño final de las gotas; esto dependerá fuertemente del efecto combinado de la velocidad cizallamiento y la reología de la nanoemulsión. Otros aspectos importantes son: el diseño del equipo de ultrasonido, parámetros del proceso (amplitud, frecuencia, tiempo y potencia) y propiedades fisicoquímicas de los componentes que integran la nanoemulsión (Kaltsa *et al.*, 2014; Bello-Pérez *et al.*, 2015).

1.3. Ventajas del uso de ultrasonido para la formulación de nanoemulsiones

El ultrasonido se ha convertido en una herramienta de procesamiento importante en el sector de la alimentación. Esta tecnología innovadora está siendo utilizada para el

desarrollo de productos alimenticios con propiedades funcionales mejoradas. (Abbas *et al.*, 2013).

Diversas investigaciones (Abbas *et al.*, 2013; Sugumar *et al.*, 2015; Kaltsa *et al.*, 2014) sugieren que el proceso de formulación de emulsiones y nanoemulsiones por ultrasonido ofrece más ventajas sobre los métodos de emulsificación convencionales como la microfluidización, y homogenización de alta presión, entre las ventajas más importantes se pueden citar los siguientes:

- Elaboración de emulsiones o nanoemulsiones en tiempos más cortos.
- Tamaños de gotas en escala nanométrica
- Emulsiones homogéneas.
- Mejor estabilidad de fases.
- Uso de cantidades menores de tensoactivos.
- Uso eficiente de la energía.
- Bajo costo de producción.
- No hay contaminación o casi nula.
- Fácil manejo, limpieza y control.

1.4. Estabilidad de las nanoemulsiones

La estabilidad de las nanoemulsiones está en función del pequeño tamaño de gota de la nanoemulsión. Esta característica en particular le confiere la estabilidad contra la sedimentación (o formación de crema), coalescencia, floculación, debido a que poseen movimiento browniano y, en consecuencia la velocidad de difusión es más alta que el de la sedimentación (o formación de crema) inducida por la fuerza de la gravedad (Rajalakshmi *et al.*, 2011).

1.4.1. Medición de la estabilidad en nanoemulsiones

La estabilidad de un sistema en emulsión o nanoemulsión es de gran importancia en muchas áreas del conocimiento, incluyendo el área de alimentos, debido a que en función de ésta es su vida útil o vida de anaquel. Por esta razón, después de haber generado una

emulsión hay diferentes pruebas que ayudan a comprobar si ésta permanecerá estable durante un período prolongado de tiempo.

Anteriormente, la examinación visual durante el almacenamiento era una de las técnicas más usadas para evaluar la desestabilidad física de una emulsión, sin embargo esta técnica perdió validez debido a que cada observador interpretaba de manera diferente los resultados observados. Debido a esto, se evaluaron diferentes parámetros y metodologías como: 1) índice de emulsificación (IE) y 2) microscopía óptica. Panaras *et al.*, 2011, Timgren *et al.*, 2013 y Li *et al.*, 2013 realizaron estudios para evaluar la estabilidad de emulsiones Pickering (emulsiones estabilizadas con partículas sólidas, en este caso, de almidón), utilizando un colorante liposoluble, con la finalidad de evaluar el IE (índice de emulsificación) y tamaño de gota a través del tiempo (almacenamiento), con ayuda de microscopía óptica. De esta manera, se creía que para evaluar la estabilidad de una emulsión era necesario realizar un estudio de la variación del número de gotas en relación con el tiempo de almacenamiento, lo cual experimentalmente no era factible de obtener.

Por tal motivo, actualmente se utiliza un método alternativo para medir la estabilidad de una emulsión o nanoemulsión, el cual está basado en la Dispersión de Luz Múltiple (MLS) por sus siglas en inglés (Multiple Light Scattering). El principio básico consiste en enviar fotones sobre la muestra desde una fuente de luz infrarroja (880 nm de longitud de onda). Estos fotones, después de haber sido dispersados muchas veces por las partículas o gotas que conforman la emulsión o suspensión, emergen de la muestra y son colectados por dos detectores situados en el cabezal óptico del equipo a 0 ° (detector de transmisión) y 135 ° (detector de backscattering). El detector de transmisión se emplea principalmente para muestras no opacas o transparentes y el detector de backscattering se emplea para muestras opacas. De forma general el método es realizado con ayuda de un equipo llamado Turbiscan™ LAB (formulación, Francia), el cual permite la medición de la luz transmitida (intensidad de la luz que pasa a través de la muestra) y la luz transmitida (intensidad de la luz reflejada por la muestra), la cual se obtiene en porcentaje en función de la altura de la muestra (mm) (Matos *et al.*, 2016).

El Turbiscan™ LAB, consta de un cabezal de detección que se mueve hacia arriba y hacia abajo a lo largo de una celda cilíndrica de fondo plano, el escaneo de la muestra es repitiendo en diferentes intervalos de tiempo (Ver figura 4). Este cabezal de detección se

compone de una fuente de luz (IR) de infrarrojo con una longitud de onda ($\lambda=880$) y dos detectores sincrónicos (Mengual *et al.*, 1999; Matos *et al.*, 2016).

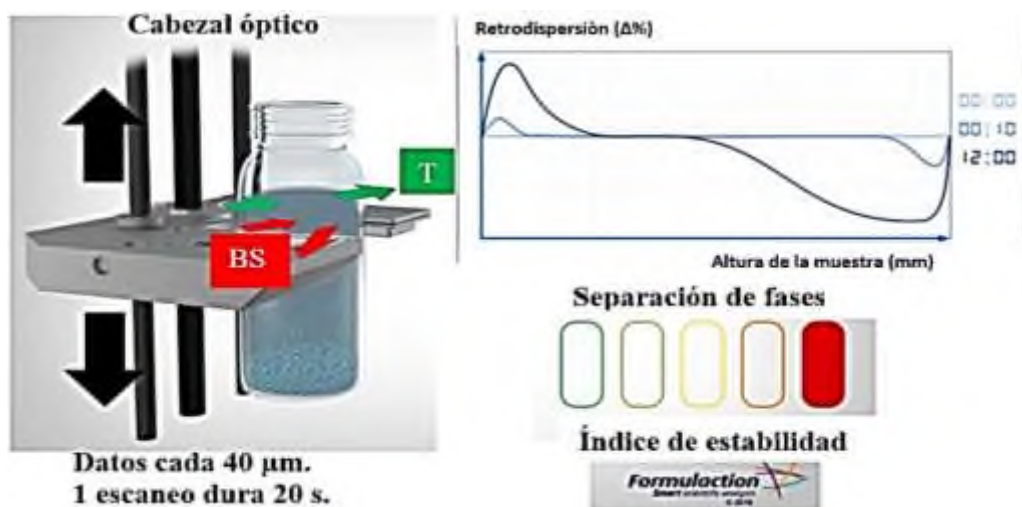


Figura 4. Movimiento del cabezal óptico del Turbiscan durante el escaneo de una emulsión.

El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra (a 0°), mientras que el detector de retrodispersión recibe la luz dispersada hacia atrás por la muestra (a 135°). El cabezal óptico de lectura escanea la muestra completa (55 mm de altura), adquiriendo los datos de transmisión (T) y retrodispersión (BS) cada 40 μm , en condiciones de reposo, generalmente a temperatura ambiente (Chauvierre *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2012; Pando *et al.*, 2013). De esta manera el análisis es completo, en la detección de los fenómenos de estabilidad en una emulsión. El equipo arroja una gráfica con los resultados para su interpretación, en donde se ven representados los fenómenos de estabilidad o inestabilidad de una emulsión, según el comportamiento característico en cada gráfico puede detectarse: La migración (cremado o sedimentación) y aumento en el tamaño de partícula o gota (coalescencia o floculación) de los sistemas complejos (ver la Figura 5).

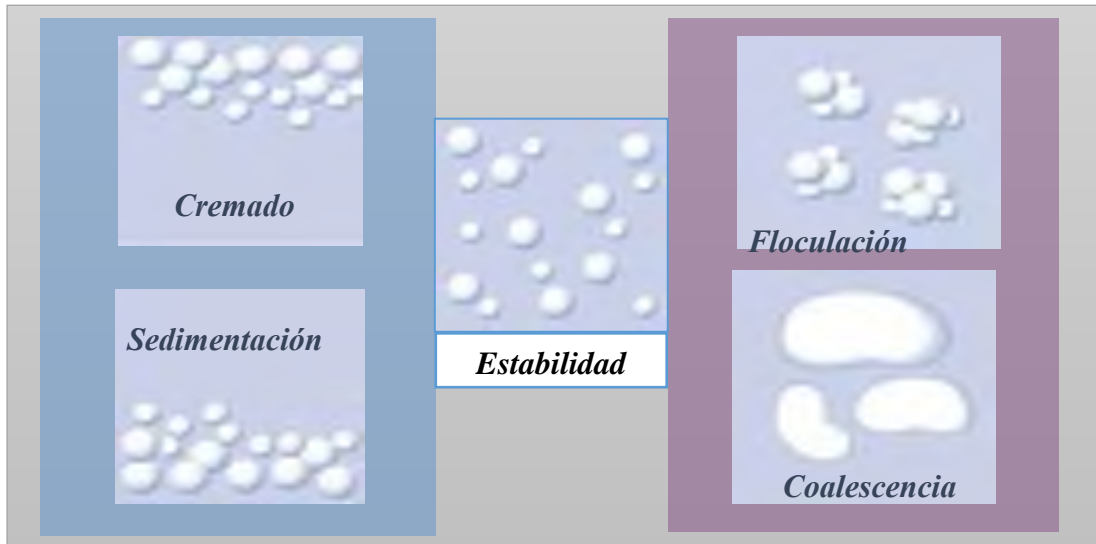


Figura 5. Fenómenos que pueden presentarse en una emulsión durante su almacenamiento (McClements, 1999).

Cremado: es un fenómeno común de inestabilidad para emulsiones o suspensiones, que ocurre cuando la fase dispersa tiene menos densidad que la fase continua. Su detección en el Turbiscan es sencilla ya que induce una variación de la concentración entre el tope y el fondo de la celda. Por ende, se obtienen los perfiles mostrados en la Figura 6. Se puede observar a simple vista que el flujo de retrodispersión (disminuye en el fondo de la muestra y debido a una disminución de la concentración de las partículas en esta parte (clarificación) y su aumento en el tope de la muestra debido a que, las gotitas de la muestra tenían menor densidad que el líquido circundante (fase continua), por lo que las curvas de BS muestran un pico en alturas, entre 0 y 20 mm. Esto es observado cuando ocurre un fenómeno de no dependencia. Si hay dependencia (partículas pequeñas y concentradas), el nivel de dispersión disminuye tanto en el fondo como en el tope (Mengual *et al.*, 1999, Herrera, 2012, Kaltasa *et al.*, 2014).

Retrodispersión delta-cremado

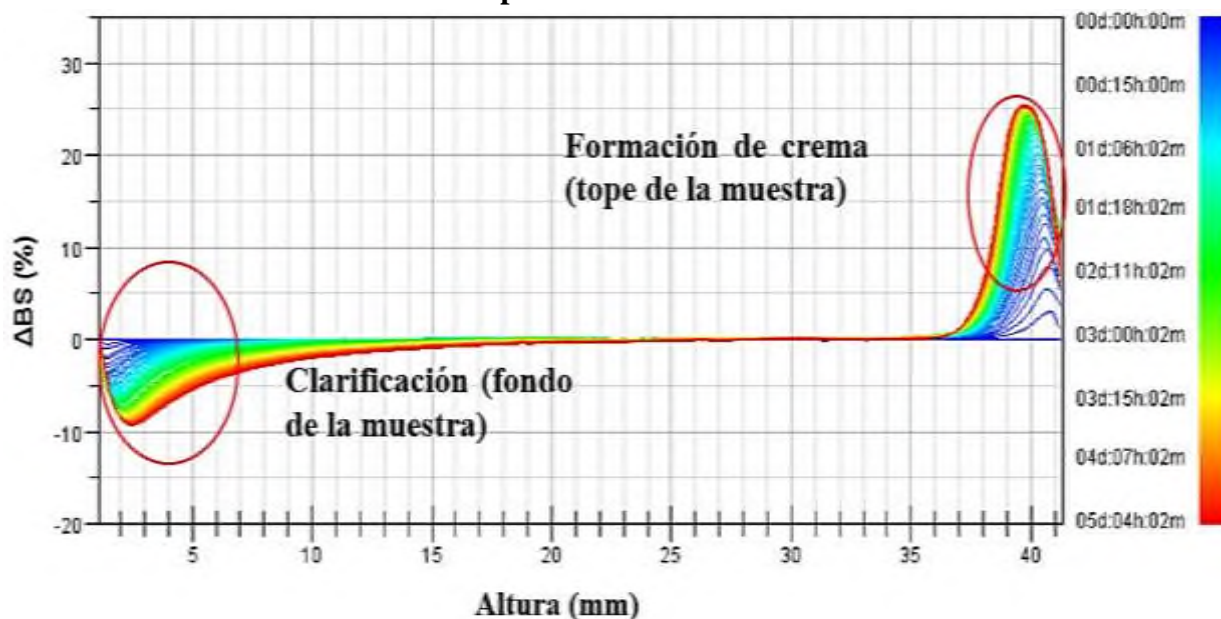


Figura 6. Perfil gráfico referente al cremado de una emulsión cuando no hay dependencia (Tomado De Villepin, 2007).

Sedimentación: es un fenómeno similar a la cremación, el cual ocurre cuando la densidad de la fase dispersa es mayor en comparación con la densidad de la fase continua. Es fácil de detectar en el Turbiscan ya que induce una variación de la concentración de la fase dispersa entre el tope y el fondo de la muestra y se obtienen los perfiles mostrados en la Figura 7. Esta vez se observa que la retrodispersión aumenta en el fondo de la muestra debido a un incremento en la concentración de la fase dispersa (sedimento) y disminuye en el tope de la muestra debido a una disminución de la concentración (clarificación). En este caso es posible tener un fenómeno de dependencia, llevando a una disminución de la retrodispersión en el fondo y tope de la muestra (Chauvierre *et al.*, 2004; Palazolo *et al.*, 2005).

Retrodispersión delta- sedimentación

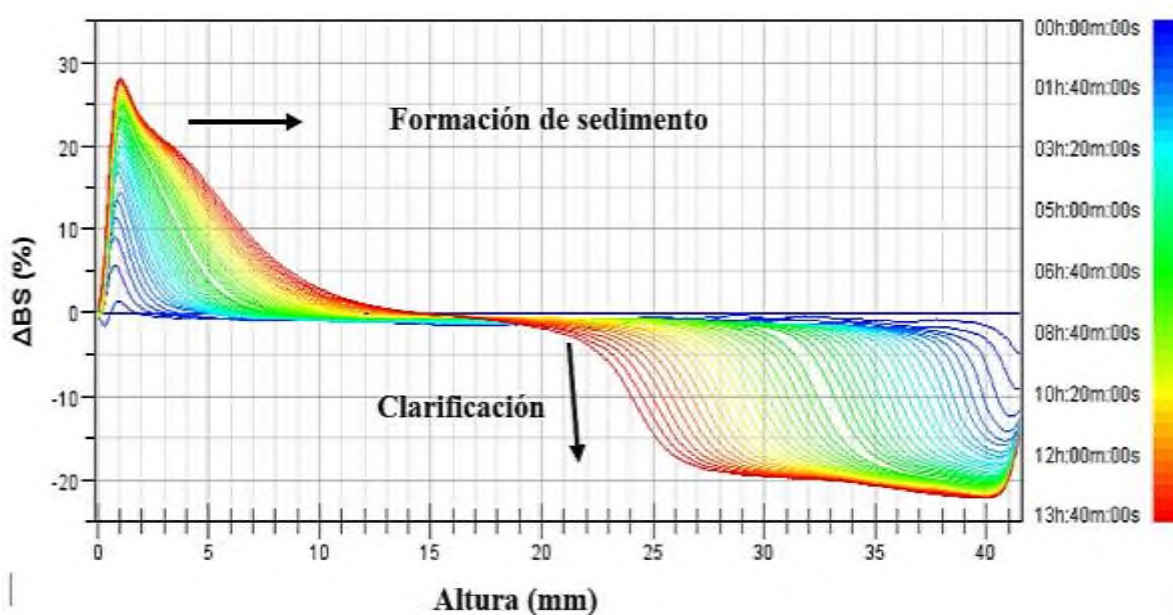


Figura 7. Perfil gráfico referente al fenómeno de sedimentación en una emulsión (Tomado De Villepin, 2007).

Floculación /coalescencia: estos fenómenos son muy diferentes desde el punto de vista fisicoquímico, pero ambos llevan a un incremento en el tamaño de las partículas. Por lo tanto, se comportan de la misma manera en el Turbiscan. Ambos fenómenos se diferencian en que la coalescencia es irreversible y conlleva a una fusión de las interfaces, y a la creación de una sola gota. La floculación, por otro lado, es sólo una agregación reversible de partículas. En algunos casos, la floculación puede llegar a la coalescencia. La variación del tamaño de partícula como consecuencia de estos fenómenos es fácilmente detectado por el Turbiscan, ya que produce una disminución de la retrodispersión a lo largo de toda la altura de la muestra, (Figura 8). En el caso de que el tamaño de partículas sea mayor que la longitud de onda de la luz incidente (850 nm), el nivel de la retrodispersión aumentará. Se puede observar en la figura simultáneamente que el nivel de retrodispersión disminuye a lo largo de toda la longitud de la muestra debido a un incremento del tamaño de partículas, característica de una coalescencia o floculación (Chauvierre *et al.*, 2004; Palazolo *et al.*, 2005).

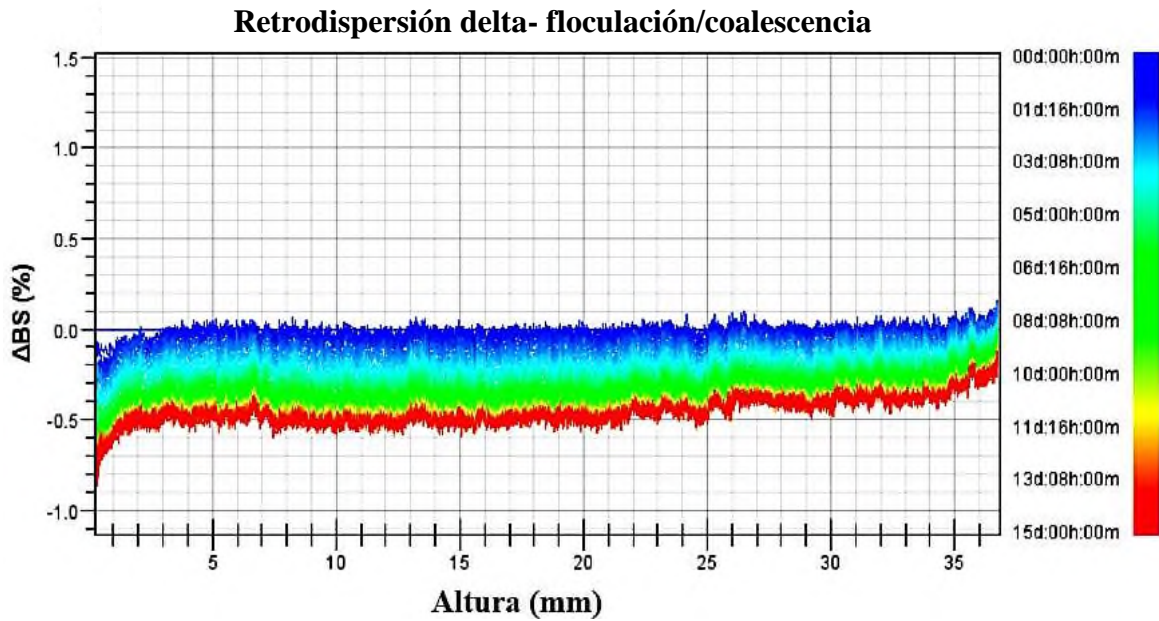


Figura 8. Perfil gráfico referente al fenómeno de coalescencia/floculación en una emulsión (Tomado De Villepin, 2007).

Esto se puede explicar a partir de la teoría de Dispersión de Luz Múltiple. Las intensidades de retrodispersión e transmisión, que se miden con Turbiscan son directamente proporcionales a ι^* , la longitud de transporte de los fotones. Este parámetro óptico corresponde más o menos a la profundidad de penetración de un fotón en la muestra, y es proporcional al diámetro y la concentración de partículas en el sistema, como se puede demostrar con esta ecuación 2. Por lo tanto, cuando el tamaño aumenta debido a fenómenos de coalescencia o agregación, o cuando la concentración cambia localmente debido a fenómenos de migración tales como el cremado y la sedimentación, esto conduce a una variación de ι^* , por lo tanto, variación de retrodispersión y transmisión.

$$\iota^* = \kappa' \frac{d}{\Phi} \dots\dots\dots\text{Ec. 2}$$

Dónde: la retrodispersión y transmisión de luz dependen de: Tamaño de partícula (d), concentración de partícula (Φ).

1.5. Malanga

La malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) también conocida como taro, es un tubérculo comestible rico en almidón perteneciente a la familia *Araceae* (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2011), se caracteriza por ser una planta perenne diploide de 50-150 cm de altura (Figura 9), de rápido desarrollo vegetativo, por lo que resulta ser aprovechable en su totalidad (Lim, 2015).

Estructuralmente la malanga posee un tallo subterráneo llamado cormo, que en su mayoría puede variar en tamaño (35 cm de largo y 15 cm de ancho) y forma (redondo, alargado y cilíndrico), dependiendo de la variedad, características agronómicas y factores climáticos a la que es sometida la planta. El cormo por otro parte se caracteriza por poseer una forma ovoide o redonda., la cual contiene una pulpa blanca almidonosa (Torres-Becerril *et al.*, 2015), que en base a la variedad de la malanga, puede ser de color amarillo claro, amarillo oscuro, naranja, rosado y morada. Esta pulpa se encuentra cubierta por una cáscara de color marrón y se caracteriza por ser áspera, fibrosa o una cubierta con anillos concéntricos en forma de cicatrices (Lim, 2015).



Figura 9. Planta de malanga y su cormo representativo (Lim, 2015).

El taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), actualmente es uno de los tubérculos más cultivados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo África Occidental, la India, Asia, el Caribe, el Pacífico, islas de la Polinesia y América del Sur (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2011; Horrocks & Weisler, 2006)

En países en desarrollo, el cultivo de taro ha tomado importancia en los últimos años debido su alto contenido en fibra (0.6-0.8 g / 100 g), proteínas (2-6 g / 100 g), mucílago, vitaminas, fósforo, calcio y contenido de almidón (70-80 g / 100 g d b), con pequeños gránulos de 1-4 μm (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2011), los cuales son altamente digeribles en el tracto gastrointestinal humano.

1.5.1. Agroecología de la malanga

La malanga (*Colocasia esculenta*) se puede encontrar en su forma nativa en bosques húmedos, orillas de los ríos, arroyos o lagos. Este cultivo puede desarrollarse en condiciones cálidas y húmedas, con temperaturas medias de 21-27 °C con una precipitación anual de 250 a 1750 mm, uniformemente distribuido durante el periodo de crecimiento. Crece sobre el nivel del mar hasta 2.400 m de altitud. Está principalmente adaptado a un ambiente húmedo. Puede ser cultivada en condiciones sumergida o inundadas. Toleran una amplia gama de suelos, pero su mejor desarrollo ha sido suelos bien drenados, con un alto nivel freático y un rango de pH de 5.5-6.5 (Lim, 2015).

1.6. Almidón

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en las plantas, después de la celulosa se almacenan en las raíces, tubérculos y semillas de las plantas; por lo que mediante su ingestión puede hidrolizarse a glucosa y proporcionar energía. Cuando se consume en la dieta humana proporciona 4 cal/g (Torres-Rápelo *et al.*, 2013)

1.6.1. Estructura y composición química del almidón

El almidón se encuentra organizado en pequeños corpúsculos discretos denominado gránulos, cuya estructura compacta permite almacenar glucosa en una reducida partícula. El tamaño, el contenido de amilosa y amilopectina son característicos de cada fuente botánica (Badui-Dergal, 2013) y pueden utilizarse para identificar su origen (Tabla 3).

Tabla 3. Características de algunos almidones (Badui-Dergal, 2013; Dai *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2013).

Tipo	Amilopectina (%)	Amilosa (%)	Temperatura de gelatinización (°C)	Tamaño del grano (µm)
Maíz	69-74	26-33	62-72	5-25
Papa	73-77	18-27	58-67	5-100
Arroz	80-85	15-19	62-78	2-5
Tapioca	80-84	16-20	51-65	5-35
Maíz céreo	99-100	0-1	63-72	5-25
Sorgo céreo	99-100	0-1	67-74	5-25
Trigo	73-77	22-26	58-64	11-41
Malanga	72-83	17-28	55 a ± 2	6.50 ± 0.2

Químicamente el almidón está constituido por dos moléculas de polisacáridos, amilosa y amilopectina, y ambas partes están conformadas por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 (Torres-Rápelo *et al.*, 2013). Las cantidades relativas de estos dos polímeros y su organización física dentro de la estructura granular, le confieren propiedades fisicoquímicas funcionales características de cada almidón (Bello-Pérez, 1999).

1.6.1.2. Amilosa

La amilosa es un polímero esencialmente lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), en el cual algunos enlaces α (1-6) pueden estar presentes (Figura 10). Se caracterizan por formar una red cristalina que favorece la retrogradación de sus pastas durante el enfriamiento, ocasionando el indeseable fenómeno de sinéresis. En comparación con la amilopectina, esta molécula se caracteriza por formar una mezcla espesante que no se retrograda fácilmente (Torres-Rápelo *et al.*, 2013), es poco soluble en agua; puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal entre 6 a 8 unidades de glucosa por cada vuelta (Hernández-Medina *et al.*, 2008).

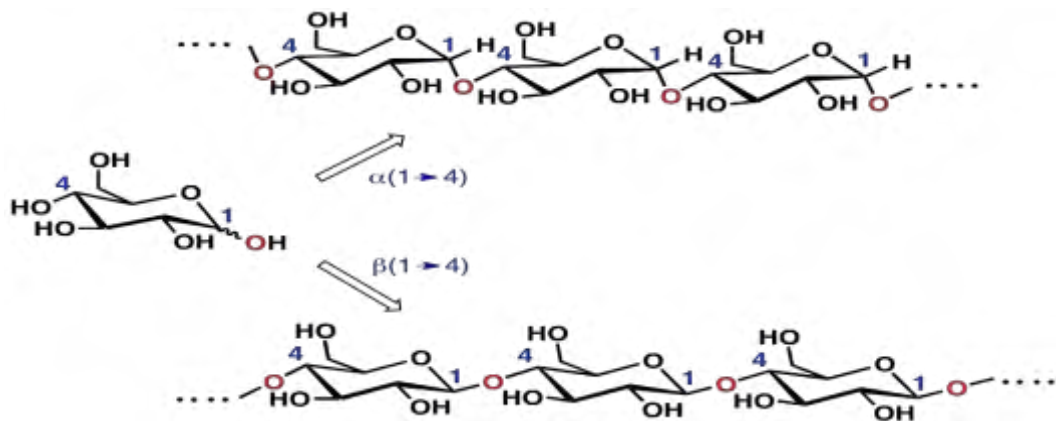


Figura 10. Estructura química de la amilosa (Campos, 2002).

1.6.1.3. Amilopectina

La amilopectina ocupa 3/4 partes de un gránulo de almidón. Es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96 % por enlaces $\alpha(1-4)$ y en un 4-6 % con uniones $\alpha(1-6)$ en los puntos de ramificación (ver Figura 11). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente a cada 15-25 unidades de glucosa. La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y en presencia de yodo produce un color rojizo violeta. Este polímero a diferencia de la amilosa no se asocia ni forman enlaces químicos (Bello Pérez *et al.*, 2002; Hernández-Medina *et al.*, 2008).

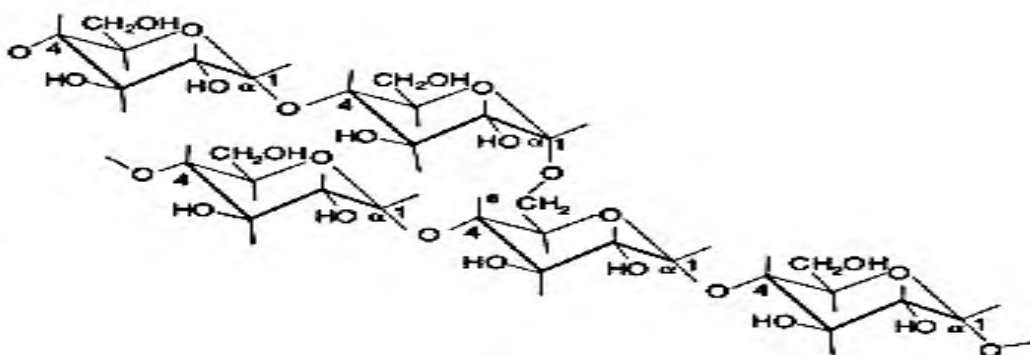


Figura 11. Estructura química de la amilopectina (Campos, 2002).

1.6.2. Propiedades funcionales del almidón

Las propiedades funcionales de los almidones dependen directamente de la relación amilosa/amilopectina, esta relación puede variar en base a la especie que se esté evaluando. Las características funcionales de los almidones son: la solubilidad, capacidad

de retención de agua, poder de hinchamiento, tendencia a retrogradar, propiedades de la pasta (viscosidad, consistencia, estabilidad del gel, claridad y resistencia al corte, formación de película), digestibilidad enzimática y capacidad de emulsificación. Durante un tratamiento hidrotérmico, el almidón sufre una serie de modificaciones que van a influir sobre su estructura, pasando por tres fases importantes: gelatinización, gelificación y retrogradación, los cuales causan hinchamiento, hidratación, fusión y ruptura de los gránulos de almidón (Badui-Dergal, 2013; Bai *et al.*, 2011).

1.7. Almidones modificados

Los almidones modificados se caracterizan por involucrar un componente ajeno a su estructura (Badui-Dergal, 2013), esto es debido a que los almidones nativos resultan ser deficientes en muchas de las aplicaciones industriales. Estas deficiencias incluyen la insolubilidad o el fracaso de los gránulos de almidón para ser soluciones más viscosas, la textura cohesiva del almidón cocido, la pérdida de viscosidad, falta de claridad y la tendencia a retrogradarse durante el almacenamiento (Bai *et al.*, 2011). Por tal motivo existen cuatro métodos de modificación, los químicos, genéticos, enzimáticos y físicos (Kaur *et al.*, 2012), para mejorar la funcionalidad de los almidones y lograr aplicaciones a nivel industrial.

Unos de los métodos de modificación más utilizados, son los métodos químicos, consisten en la introducción de grupos funcionales en la molécula del almidón, lo que altera significativamente las propiedades físicas y químicas del almidón nativo. Entre los métodos químicos utilizados con mayor frecuencia en la industria alimentaria se encuentran: los monofuncionales, como lo es el uso de anhídrido acético, enlaces éter, éster y óxido de propileno (Thomas & Atwell, 1999) entre los que destacan los almidones modificados con OSA (Octenyl Succinic Anhydride).

1.7.1. Fundamento del proceso de modificación química del almidón con OSA

Los almidones modificados con OSA surgen de una reacción de esterificación entre los grupos hidroxilo del almidón y el anhídrido octenil succínico (Sweedman *et al.*, 2013). El cual tiene como finalidad modificar la naturaleza hidrofílica de los almidones nativos a través de la incorporación de grupos hidrofóbicos de OSA, generando moléculas de tipo

anfipática (Bai *et al.*, 2011). Un parámetro comúnmente utilizado en este sentido es el grado de sustitución (GS), el cual se define como el número promedio de Succinato de Octenilo (OS), derivados por unidad de glucosa (Sweedman *et al.*, 2013).

Bello Pérez *et al.*, 2015, resaltaron que el efecto del grado de sustitución de OSA, influye en características estructurales y moleculares (por ejemplo el peso molecular y radio de giro) del almidón nativo, por lo que llegaron a la conclusión de que la inserción de grupos de OSA afectan la estructura granular, específicamente en el tamaño molecular de la amilopectina. En consecuencia, estos cambios favorecen el hinchamiento de los gránulos y la difusión de las moléculas de OSA dentro de los gránulos de almidón (Sweedman *et al.*, 2013), dando como característica, que los almidones, posean baja temperatura a la gelatinización, así como algunas veces baja retrogradación, mejor estabilidad al congelamiento y la baja tendencia a formar geles (Singh *et al.*, 2007).

1.7.2. Uso y aplicaciones de los almidones modificados por OSA

Actualmente los almidones modificados químicamente con anhídrido octenil succínico (OSA) tienen numerosas aplicaciones en emulsiones de bebidas; aceites, cosméticos o productos farmacéuticos a base de petróleo, lociones a base de alcohol, encapsulación de sabores, fragancias y vitaminas. Por tal motivo hoy en día estos almidones están siendo probados en la estabilización de emulsiones alimentarias (Bello Pérez *et al.*, 2015).

Las aplicaciones de los almidones modificados químicamente con OSA dependen en gran parte del grado de sustitución, así como del porcentaje de reactivos que se emplean durante la reacción; en este sentido se ha implementado que en la industria alimentaria se maneje una concentración $\leq 3\%$ de modificación con OSA, mientras que en la industria farmacéutica y de la cosmetología es posible emplear cantidades mayores de reactivos.

Diversos autores han trabajado con esta modificación analizando su comportamiento como agente estabilizante en diferentes modelos de emulsión.

Liu *et al.*, 2008, Han & BeMiller, 2009, reportaron que el OSA se incorpora al almidón a través de un enlace éster, lo que hace que los almidones modificados por OSA formen

una película fuerte entre el aceite y el agua, dando lugar a emulsiones resistentes a la aglomeración.

Marku *et al.* 2012 realizaron la modificación de almidón de quinoa empleando un máximo de 1.8 % de OSA y lo usaron en un sistema de emulsión agua/aceite utilizando como fase continua parafina, miglyol y aceite de karité. Entre ellos los aspectos más relevantes, fue que lograron estabilizar a temperatura ambiente hasta por 8 semanas una emulsión con un contenido de hasta 56 % de aceite.

Zhu *et al.*, 2013 mencionaron que la capacidad del almidón modificado con OSA, es absorberse entre la interface aceite-agua, la cual viene dada por la orientación del polímero, originado por el acomodo de los grupos OSA, lo cual está relacionado con el grado de sustitución y la carga superficial presente en el almidón.

Por otra parte Timgren *et al.*, 2011, modificaron el almidón de Quinoa con OSA utilizando una concentración de 1.8 % de OSA para probar la capacidad emulsificante del almidón modificado. A partir de este estudio, se concluyó que el uso de partículas de almidones modificados químicamente con OSA, generan un agente emulsificante, y a pesar de que no se obtiene tamaños de gotas pequeños, como los emulsificante de bajo peso molecular o el uso de proteínas, confieren mayor estabilidad a la emulsión. También reportaron que es importante considerar el tamaño de los gránulos de almidón nativo ya que de esto depende la estabilidad de la emulsión.

De acuerdo con lo reportado por Liu *et al.*, 2008, BeMiller 2007, Sweedman *et al.*, 2013, el almidón tiene características muy particulares, que permiten introducir de manera efectiva dentro de sus cadenas de glucosa, fragmentos de OSA para su modificación, lo que otorga nuevas características como alta viscosidad durante la formación de pastas, así como disminuir la temperatura de gelatinización. También se ha observado que el almidón modificado con OSA adquiere propiedades anfipáticas, lo que le otorga una mayor estabilidad a cambios de pH y temperatura, generando una estructura altamente organizada.

II. JUSTIFICACIÓN

El uso de emulsiones se encuentra muy presente en nuestra vida cotidiana; incluyendo tanto la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Sin embargo, su estabilidad es un problema en el sector industrial. Las nanoemulsiones a diferencia de las emulsiones, en virtud de su tamaño de gota (por debajo de los 100 nm) poseen mejores propiedades para su utilización como solubilidad, estabilidad (movimiento browniano), ofrecen mejor biodisponibilidad oral y son eficaces para la introducción de compuestos bioactivos.

El proceso de elaboración de nanoemulsiones se ha enfocado al desarrollo de tensoactivos sintéticos, los cuales tienen como función primordial reducir la energía interfacial entre las fases de la nanoemulsión, provocando su homogeneidad. Sin embargo, el uso de tensoactivos sintéticos en algunos casos resulta tóxicos para el uso y consumo humano, ocasionando que los emulsificantes tradicionales estén siendo limitados en sus aplicaciones. Por tal motivo se ha implementado el uso de polisacáridos funcionalizados, como lo es el almidón, el cual está siendo ampliamente utilizado en diferentes industrias con fines diversos. Pero para cumplir con distintas funciones tiene que ser modificado químicamente en función de la necesidad o requerimiento específico.

En la presente investigación se ha optado por el empleo de almidón de malanga modificado a través de la reacción con anhídrido octenil succínico; ya que en este sentido, los trabajos realizados en los últimos años han sido concluyentes, debido a que la modificación química de los gránulos de almidón mejora en gran medida las propiedades de los almidones nativos y amplían la gama de sus aplicaciones. La malanga como materia prima en la presente investigación, se consideró por su alto contenido de carbohidratos, principalmente de almidón, el cual posee un tamaño de gránulo comprendido entre 1 y 4 μm . Se ha reportado que el tamaño del gránulo de almidón de malanga puede ser útil como agente de relleno para compuestos biodegradables, como sustituto de grasas o la encapsulación de sabores y sustancias, además, de ser utilizado para la obtención de nanopartículas y consecuentemente para la elaboración de nanoemulsiones a través de uno de los métodos más innovadores como lo es el ultrasonido.

III. HIPÓTESIS

El uso de almidón de malanga modificado con OSA permitirá la generación de partículas anfipáticas, que podrán ser utilizadas para estabilizar nanoemulsiones aceite en agua (O/W) producidas por ultrasonido.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

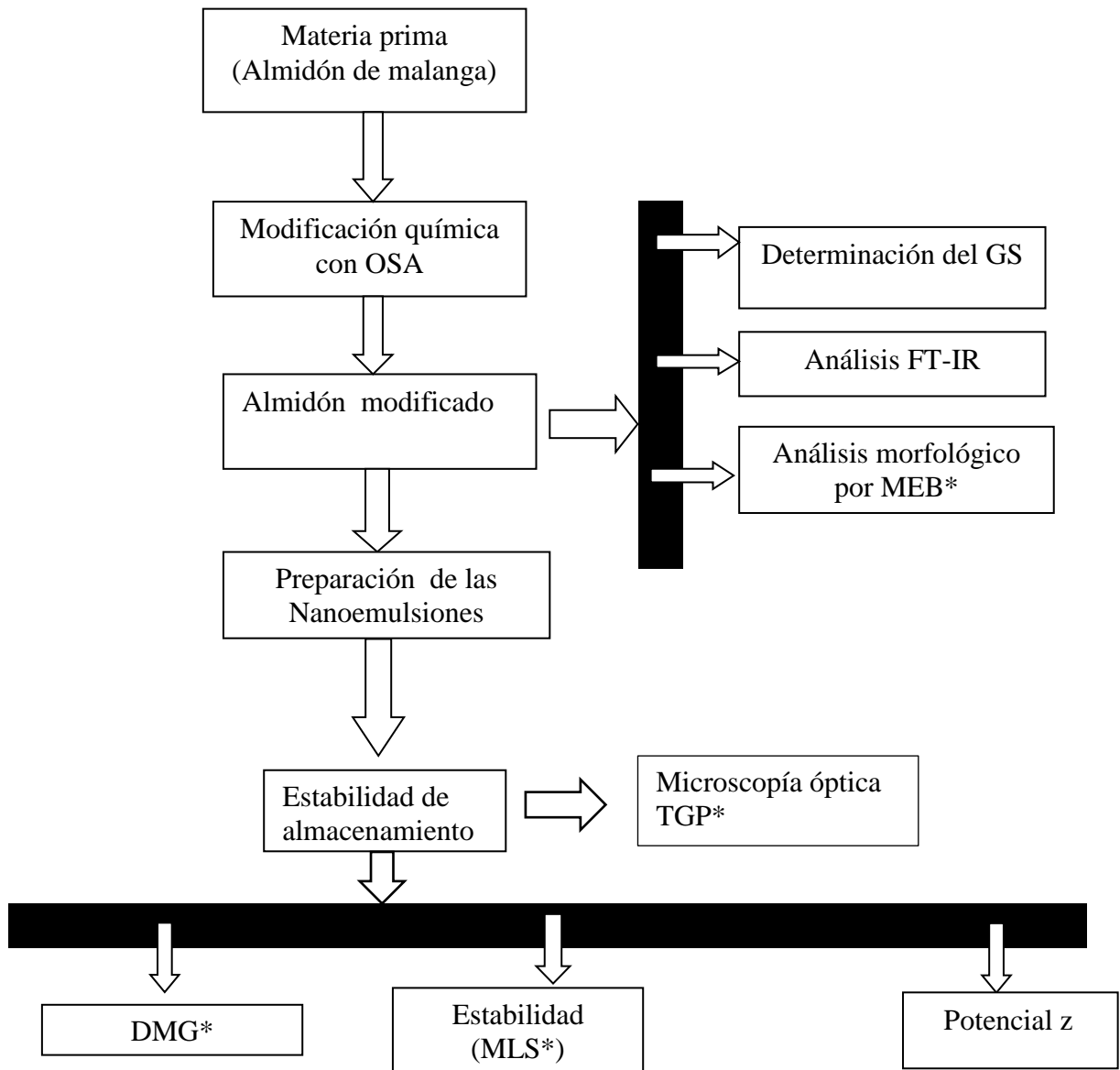
Elaborar una nanoemulsión O/W por el método de ultrasonido a partir de aceite esencial de naranja y almidón de malanga modificado químicamente con OSA.

4.2. Objetivos particulares.

- Establecer condiciones de reacción para la modificación del almidón de malanga con OSA.
- Determinar el grado de sustitución (GS) del almidón nativo (AMN) y almidón modificado (AMM) con OSA.
- Evaluar la morfología del AN y almidón AM con OSA por microscopía electrónica de barrido (MEB).
- Elaborar las nanoemulsiones a partir de dos diferentes concentraciones de AMM con OSA.
- Evaluar la estabilidad de las nanoemulsiones a dos diferentes temperaturas (4 y 25 °C) de almacenamiento.
- Determinar el diámetro medio de gota, potencial Z, así como estabilidad mediante dispersión múltiple de luz (MLS) de las nanoemulsiones durante el periodo de almacenamiento (30 días).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagrama experimental



MEB*: Microscopía electrónica de barrido.

DMG*: Diámetro medio de las gotas.

MLS*: Dispersión de Luz Múltiple.

TGP*: Tamaño de gota promedio

5.2. Materia prima

El almidón de malanga (*Colocasia esculenta*) usado para este estudio, fue proporcionado por la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, con la siguiente composición química aproximada: contenido de proteína bruta 3.14 ± 0.43 %, contenido de grasa cruda 0.28 ± 0.15 %, contenido de humedad 9.98 ± 0.32 % y cenizas 2.97 ± 0.13 . El OSA de alta pureza se adquirió de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

5.3. Modificación del almidón de malanga con OSA

Para establecer las condiciones de modificación del almidón de malanga con OSA, se evaluó la concentración de almidón, agua y tiempo de reacción. La reacción de modificación química fue llevada a cabo a un pH de $8.5 (\pm 0.2)$, temperatura de 35 °C y una concentración de reactivo (3 % v/p) con agitación constante. La Tabla 4 se elaboró en base, a lo reportado en trabajos de investigación previos: con almidón de arroz indica (Song *et al.*, 2006), maíz, maíz ceroso, patata y tapioca (Han & BeMiller, 2007), de papa (Hui *et al.*, 2009); maíz (Zhu *et al.*, 2013), almidón de maíz waxy (Miao *et al.*, 2014), nanopartículas de almidón de malanga (Jiang *et al.*, 2016) y maíz waxy (Chiu *et al.*, 2017). Estos autores establecieron diferentes metodologías del proceso de modificación con OSA para almidones de diferentes fuentes botánicas. Ya que durante el análisis de estos métodos, se observó que un factor importante en el proceso de modificación puede ser la fuente botánica del almidón. Por esta razón, estos métodos fueron evaluados para establecer las condiciones del proceso de modificación química del almidón de malanga con OSA.

Otro factor importante estudiado durante el proceso de modificación fue la concentración de almidón en un sistema acuoso (relación almidón-agua) en base al tiempo de reacción, empleado en los diferentes métodos (Tabla 4).

Tabla 4. Diferentes condiciones (concentración, H₂O y tiempo) de modificación química del almidón de malanga con OSA usadas en este trabajo.

Experimento	Concentración (g bs)	H ₂ O (mL)	Tiempo (h)	Codificación
1	20 g	45 mL	4 h	AMM-1
2	20 g	50 mL	4 h	AMM-2
3	20 g	78 mL	4 h	AMM-3
4	20 g	117 mL	4 h	AMM-4
5	20 g	117 mL	3 h	AMM-5
6	50 g	220 mL	3 h	AMM-6
7	10 g	25 mL	2 h	AMM-7
8	125 g	475 mL	24 h	AMM-8
9	30 g	100 mL	8 h	AMM-9

5.4. Modificación química del almidón de malanga con OSA

La esterificación del almidón se estableció con las metodologías reportadas por Miao *et al.*, 2014; Chiu *et al.*, 2017. Para esto se utilizaron 30 g de almidón (bs) y se dispersaron en 100 mL de agua destilada, el pH fue ajustado a 8.5 (± 0.5). Enseguida se agregó una concentración de OSA de 3 % y se dejó reaccionar a diferentes tiempos (2, 3, 4, 8 y 24 h) con agitación constante (350 rpm). Transcurrido este tiempo de reacción, la suspensión fue neutralizada, centrifugada y secada en un horno (marca: Scorpion Scientific Fab. Nac.) a una temperatura 45 °C durante 12 h. Una vez terminado el tiempo de secado, se tamizó por malla 100 (0.150 μ m de apertura) para su posterior análisis y utilidad.

5.5. Caracterización del almidón de malanga

5.5.1. Determinación del grado de sustitución (GS)

El Gs se define como el promedio, del número de sustituciones por unidad de anhídrido glucosa, en el almidón. Se determinó por titulación, de acuerdo con el método propuesto por Chiu *et al.*, 2017, el cual consistió en pesar 5 g de almidón (bs), y se dispersó en 50 mL de agua destilada, con 25 mL de una solución NaOH a 0.5 M. Posteriormente se

sometió a agitación por 24 h, una vez transcurrido este tiempo, se tituló la suspensión con una solución estándar HCl 0.5 M, usando 2 gotas de fenolftaleína como indicador.

El Gs se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\%OSA = \frac{[(V_{\text{blanco}} - V_{\text{muestra}})(0.1 \times M \times 100)]}{W} \dots \dots \dots \text{Ec. 3}$$

Donde: V_{blanco} = volumen de HCl gastados durante la titulación; V_{muestra} = volumen de HCl gastados durante la titulación de la muestra; M = molaridad de HCl; W = peso de muestra tomada (g).

Gs se determinó en base al porcentaje de sustitución obtenido con la ecuación 3

$$GS = \frac{M_{wg} \times \%OSA}{M_{wosa} \times 100 - ((M_{wosa} - 1) \times \%OSA)} \dots \dots \dots \text{Ec. 4}$$

Donde: M_{wg} = al peso molecular del residuo de glucosa (162 g / mol); M_{wosa} = peso molecular del OSA (210 g / mol).

5.5.2. Análisis estadístico para los GS del almidón

Se realizó un ANOVA simple para analizar los grados de sustitución obtenidos en cada experimento, con un nivel de confianza del 95 % (0.05 %) utilizando el programa Minitab 16. Se aplicó una prueba de Tukey para evaluar si había diferencias significativas entre los experimentos evaluados.

5.5.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica de FT-IR fue utilizada para corroborar la presencia del grupo funcional (octenil succínico) en la estructura química del almidón modificado con OSA. El análisis de FT-IR se llevó a cabo en un espectrofotómetro e interferómetro (marca dynascan, mod. Spectrum 100, Perkin Elmer) mediante la reflexión total atenuada (ATR por sus siglas

en inglés), los espectros fueron obtenidos con una resolución de 4 cm^{-1} , en un rango de $4000\text{-}515\text{ cm}^{-1}$ y un total de 20 barridos por muestra.

5.5.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Esta técnica se utilizó para obtener información referente a la morfología de la superficie del almidón de malanga nativo, a escala micrométrica. Para el estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB), se utilizó un microscopio electrónico de barrido (marca JEOL, mod. JSEM 35CX; Japan Electronic Optical Limited, Japón). Previamente, las muestras se depositaron en una cinta con capa de carbón de 30 nm de espesor la cual fue depositada al vacío (10^{-5} Torr) en una evaporadora JEOL. Las imágenes de los gránulos de almidón fueron capturadas a $5.0 \times 10 \times$.

5.6. Caracterización de las micro y nanoemulsiones

5.6.1. Preparación de las fases de la emulsión gruesa

La preparación de las fases de la emulsión gruesa se realizó, de acuerdo con la metodología propuesta por Joe *et al.*, 2012, Makur *et al.*, 2012 con algunas modificaciones menores. La fase oleosa de las nanoemulsiones aceite-en-agua (O/W), se elaboró utilizando 4 % de aceite de naranja (marca: sigma-aldrich), y almidón modificado de malanga en concentraciones de 97 y 214 mg /mL de aceite. Los componentes de esta fase se mezclaron con agua bidestilada (fase acuosa).

5.6.2. Preparación de la emulsión gruesa

La elaboración de la emulsión gruesa (O/W) se realizó de acuerdo con el método propuesto Abbas *et al.*, 2014, el cual consistió en homogeneizar la fase oleosa y la fase acuosa usando un mezclador de alta velocidad (Ultra-turrax T-25, marca Ika Works Inc.) a 11000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, para tener el volumen total emulsionado (80 mL).

5.6.3. Preparación de las nanoemulsiones por el método de ultrasonido

Las nanoemulsiones fueron elaboradas de acuerdo con la metodología descrita por: Abbas *et al.*, 2014; Sugumar *et al.*, 2015. Estas nanoemulsiones se obtuvieron con ayuda de un equipo de homogenización ultrasónico (marca: Hielscher, Mod. UP200St de 200 W y 26 kHz), utilizando un sonotrodo de 26 mm de diámetro. Para su preparación se utilizaron 40 mL de muestra (emulsión gruesa), utilizando diferentes potencias (40, 60 y 80 W/mL) y dos tiempos de sonicación (7 y 10 min).

Se elaboraron primero las nanoemulsiones control utilizando almidón nativo (AN) y posteriormente con almidón modificado (AMM-9), utilizando dos concentraciones de almidón (97 y 214 mg), por lo cual para el caso de las nanoemulsiones elaboradas con diferentes cantidades de AN se codificaron como: EAN-97 y EAN-214. Para las nanoemulsiones elaboradas con AMM-9 estas fueron codificadas como: EAM-97 y EAM-214. Las formulaciones fueron identificadas tal como se muestran en la Tabla 7.

Tabla 5. Formulación de las nanoemulsiones utilizando diferentes concentraciones de almidón nativo y modificado.

Nanoemulsiones	Concentración del almidón (mg)	GS del almidón
EAN-97	97	NP
EAN-214	214	NP
EAM-97	97	0.0250 ± 0.0014
EAM-214	214	0.0250 ± 0.0014

En este sentido el proceso de emulsificación dio la pauta para visualizar la estabilidad de las nanoemulsiones durante el almacenamiento y al mismo tiempo ver cómo influye la concentración de almidón en su elaboración utilizando ultrasonido.

5.6.4. Estabilidad de almacenamiento

Se evaluó la estabilidad mediante el método propuesto Nejadmansouri *et al.*, 2016 con algunas modificaciones menores. Las nanoemulsiones fueron almacenadas durante un periodo de 1 mes. Todas las muestras se colocaron en tubos de vidrios con tapa, ligeramente sellados, y se almacenaron a temperatura ambiente.

5.6.4.1. Microscopía óptica de las emulsiones

Las emulsiones se agitaron suavemente en un tubo de vidrio antes del análisis para asegurar que fueran homogéneos. Se colocó una gota (5 μ L) de cada emulsión (con ayuda de una micropipeta) en un portaobjetos de vidrio y luego cubierto con un cubreobjetos, para para posteriormente ser observado al microscopio.

La microestructura de las emulsiones fue observada utilizando un Microscopio Trinocular con lámpara de mercurio (marca Proiser, mod. UB200i) equipado con un módulo de cámara de video. Las imágenes así como la variación del tamaño de gota fueron adquiridas a través de una PC, utilizando el programa ISAS Proiser (sistema CASAS). Este equipo cuenta con una cámara, la cual maneja un procesamiento de imagen digital a través de un Software ISAS V.1.

5.6.5. Medición de la estabilidad de las nanoemulsiones

Se realizaron lecturas ópticas de las muestras, mediante la técnica de Dispersión Múltiple de la Luz (MLS por sus siglas en ingles), para determinar si presentaban algún fenómeno de desestabilidad (sedimentación, coalescencia, cremado y floculación) a través del tiempo. Estas lecturas ópticas, se aplicaron a muestras almacenadas a temperaturas de 4 y 25 °C, (elaboradas a potencias de 40 y 60 W) empleando un equipo Turbiscan Lab expert (Toulouse, Francia). Se vació una alícuota (20 mL) de la nanoemulsión, en un vial de vidrio de fondo plano (altura= 55 mm, volumen= 35 mL), se colocó en la celda del equipo para su análisis. Donde la luz retrodispersada se presentó como una función de la altura de la muestra. Se empleó la función modo de referencia la cual sustrae la primera curva (t_0) de las observaciones subsecuentes, transformándolas en una línea base. Las

muestras se monitorearon el primer día al tiempo 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h y posteriormente se monitorearon cada semana (día 7, 15, 23 y 30) hasta cumplir el mes.

5.6.6. Determinación del tamaño de gota e índice de polidispersidad

El Diámetro medio de las gotas (MDD: Mean droplet diameter) y el índice de polidispersidad de las gotas (PDI: Polydispersity index) de la nanoemulsión se determinó por triplicado, utilizando un Malvern Zetasizer (Marca: Malvern Instruments, Ltd, modelo: ZS90) equipado con una tecnología de dispersión de luz dinámica (DLS) y una celda de Fourier (DTS0012). Las muestras fueron diluidas (1:200 μL de agua bidestilada) antes de su medición (esto con la finalidad de garantizar el libre movimiento browniano de las gotas). Las muestras se equilibraron a 25 °C durante 1 min.

El índice de polidispersidad es una medida adimensional de la distribución del tamaño de gota, calculado a partir del análisis acumulativo de cada función de correlación de la muestra (Abbas *et al.*, 2014). Esta función de correlación es una combinación del coeficiente de difusión (D_i) de cada gota que se convierte en gotitas de diámetro (d_i) usando la ecuación de Stokes-Einstein para obtener el tamaño de gotas presentes en la nanoemulsión (Zhang *et al.*, 2016):

$$d_i = \frac{K_b T}{3\pi n D_i} \quad \text{Ec. 4}$$

Dónde:

k_b : es la constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ k}^{-1}$)

T: es la temperatura absoluta

n: es la viscosidad.

Este índice proveerá información sobre la muestra: dado que los valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños (Zhang *et al.*, 2016).

5.6.7. Potencial Z

El potencial Z (ζ) es determinado a través de la medición de la velocidad de las gotas cuando son colocadas en un campo magnético aplicado, por tal motivo se determinó la carga eléctrica de las gotas de la nanoemulsión mediante la medición de la movilidad electroforética a 25 °C, en base a la metodología propuesta por Zhang *et al.*, 2016; Abbas *et al.*, 2014: donde se utilizó un equipo conocido como Malver Zetasizer (marca: Malvern Instruments, Ltd, mod. ZS90) equipado con una celda capilar plegada (DTS 1070).

Las nanoemulsiones fueron diluidas 1:200 veces en agua bidestilada antes de cada medición, se monitoreó un tiempo 0, a las 6, 12, 24 h el primer día, y posteriormente se realizaron mediciones cada semana (día 7, 15, 23 y 30) hasta cumplir el mes. Se obtuvieron resultados con 3 réplicas cada uno. Donde los valores obtenidos se expresaron en mV.

Se tomó como intervalo 30 mV (Positiva o negativa) como máximo para medir la estabilidad de las nanoemulsiones en virtud de las cargas de las partículas. Indicando que los potenciales zeta de 0 a ± 30 mV indican inestabilidad, mientras potenciales zeta mayor que 30 mV indican estabilidad (Sugumar *et al.*, 2015, Rebolleda *et al.*, 2015).

5.6.8. Análisis estadístico para las nanoemulsiones

Se realizó un ANOVA de dos vías para analizar los valores de tamaño de gota promedio (TGP), diámetro medio de gota (DMG), potencial Z, con un nivel de confianza del 95 % (0.05 %) utilizando el programa Minitab 16. Se aplicó una prueba de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las muestras elaboradas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Primera etapa: caracterización del almidón modificado

En esta etapa se determinó el grado de sustitución (GS) de los almidones obtenidos en cada uno de los experimentos, con la finalidad de seleccionar la muestra con el GS más alto para preparar las nanoemulsiones; además de estandarizar el método de modificación con OSA para el almidón de malanga. Posteriormente se realizó un análisis cualitativo mediante MEB y FT-IR para verificar si se llevó a cabo la modificación con OSA en el almidón.

6.1.1 Determinación del grado de sustitución (GS)

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para el GS del almidón de malanga nativo (AMN) y las muestras de almidón modificado (AMM-1 a AMM-9) evaluadas para el proceso de modificación química con OSA. El valor mínimo y máximo para el GS de las muestras de almidón sometidas a modificación fue de 0.0014 ± 0.0005 y 0.0250 ± 0.0014 , respectivamente.

Tabla 6. Grados de sustitución en muestras de almidón de malanga modificados con OSA a partir de diferentes metodologías.

Muestra	Grado de sustitución (GS)
AMN	NP
AMM-1	0.0014 ± 0.0005^d
AMM-2	0.0023 ± 0.0002^{cd}
AMM-3	0.0047 ± 0.0001^{bc}
AMM-4	0.0017 ± 0.0001^d
AMM-5	0.0017 ± 0.0001^d
AMM-6	0.0014 ± 0.0002^d
AMM-7	0.0018 ± 0.0001^d
AMM-8	0.0071 ± 0.0026^b
AMM-9	0.0250 ± 0.0010^a

*Promedio de tres repeticiones \pm el error estándar, **NP**: No presenta. Los valores que no comparten una letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Los resultados de GS observados en esta investigación fueron comparados con los valores reportados por otros autores Song *et al.*, 2006 (0.018 GS); Liu *et al.*, 2008 (0.020 GS), Bello-Pérez *et al.*, 2015 (0.016 GS) y Jiang *et al.*, 2016 (0.036 GS), cuya finalidad o aplicación es para grado alimenticio. El GS más alto (0.0250) fue observado en la muestra AMM-9. Esto se debe al tiempo de reacción y concentración de almidón en proporción con el agua (p/p) utilizado en este experimento, lo cual garantizó una mayor proximidad de las moléculas de OSA en los gránulos de almidón. Se ha reportado que los grupos hidroxilos en el almidón son inmóviles, por lo que su reacción dependerá de la proximidad de las moléculas de OSA con los grupos hidroxilos (Huber & BeMiller, 2001; Boshale & Singhal 2006; Sweedman *et al.*, 2013). Una posible explicación a esto es que el agua fue proporcional a la cantidad de almidón, lo que favoreció que los gránulos de almidón se hincharan durante la agitación, provocando así la difusión de las moléculas de OSA dentro del gránulo de almidón. Esto mostró que la concentración de almidón en proporción al agua, fue un factor importante en el aumento del grado de sustitución.

Otra variable importante fue el tiempo de reacción (8 h). Se observó que la eficiencia del proceso de modificación química depende fuertemente del origen botánico del almidón, así como del tamaño, morfología, estructura y superficie del gránulo, además de presentar una composición química diferente (en el contenido de amilosa y amilopectina); los cuales son factores importantes en un proceso de modificación química (Huber & BeMiller, 2001; Wang & Wang, 2002; Hui *et al.*, 2009 Rayner *et al.*, 2012).

6.1.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se obtuvieron las micrografías mediante MEB (a diferentes resoluciones de 5.0 x y 10 x) para el almidón nativo de malanga (AMN) y el modificado con OSA (AMM-9) con mayor grado de sustitución (0.0250), ya que este valor se encontró, dentro de los reportados para grado alimenticio (ver Figura 12). El almidón nativo de malanga, mostró gránulos con formas poligonales e irregulares (Figura 12 B) y algunos gránulos de formas redondas (Figura 12 A) con un tamaño variado que va de 1 a 10 μm con una superficie lisa. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pérez *et al.*, 2005, Njintang *et al.*, 2008 y Smisek *et al.*, 2012, en almidón de malanga (*Colocasia esculenta*), quienes observaron gránulos de almidón de forma redondeada, elipsoidal-truncada y poliédrica con tamaños que van de 0.5 y 5.0 μm , en almidón de malanga de la misma variedad.

De forma general las imágenes obtenidas mediante MEB, mostraron que el almidón de malanga posee gránulos con formas poligonales e irregulares. Sin embargo los resultados obtenidos para el almidón modificado con OSA mostraron que la modificación causó algunos cambios en la superficie de los gránulos de almidón en comparación con el almidón nativo, ya que los gránulos exhibieron superficies ligeramente rugosas y sus bordes perdieron algo de definición (Figura 12 C), además de que presentaron ligeros poros hacia los lados del gránulo (Figura 12 D); esto probablemente se debió a que el OSA actuó atacando primero la superficie, formando estos poros; estas características coinciden con las presentadas en la modificación (con OSA) del almidón de arroz indica, maíz waxy, amaranto y papa (Song *et al.*, 2006; Bhosale & Singhal., 2006; Hui *et al.*, 2009; Sandhu *et al.*, 2015). En este sentido, Sweedman *et al.*, 2013 describieron que mediante un análisis de espectroscopía fotoelectrónica se puede corroborar que los grupos funcionales que interactúan con el OSA (OH) se encuentran en la superficie del gránulo de almidón.

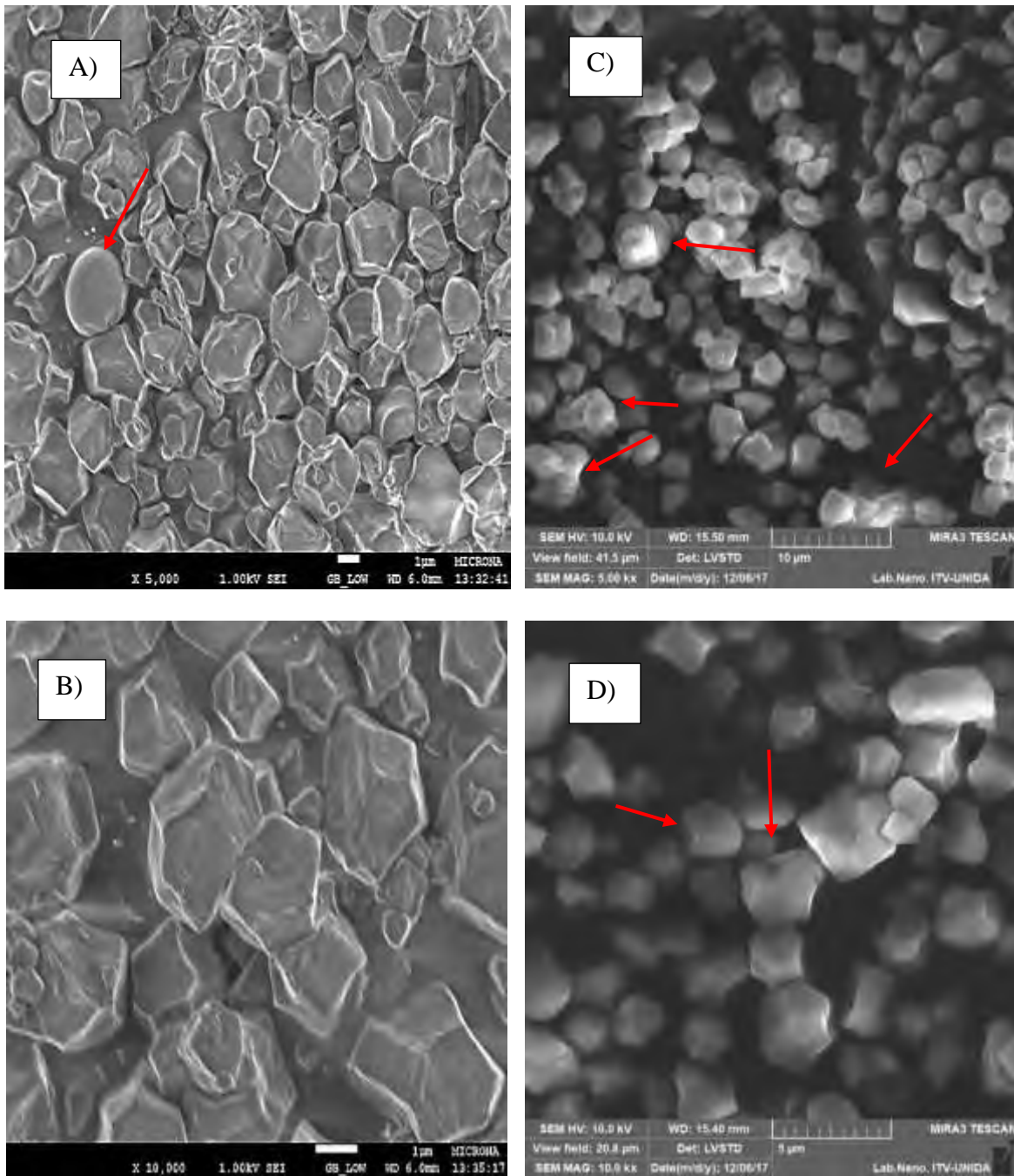


Figura 12. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (a diferentes resoluciones) del almidón de malanga. Almidón nativo: A) 5.0 x: forma circular de algunos gránulos de almidón, B) 10 x. Almidón modificado con OSA (AMM-9): C) 5.0 x: gránulos que exhibieron superficies ligeramente rugosas, D) 10 x: presencia de poros en la superficie del almidón.

6.1.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

Para determinar si la esterificación se llevó a cabo, se analizaron las muestras de almidón nativo de malanga (AMN) y almidón modificado (AMM-9) por FT-IR. Los resultados se presentan en la Figura 13, donde los espectros de IR para el AMN y el AMM-9 mostraron perfiles similares. En la huella dactilar, se observaron bandas de absorción discernibles a 1220, 1155, 1000, y 980 cm^{-1} , que se atribuyeron al estiramiento del enlace C-O (Fang *et al.*, 2004), también se observó una banda 1643 cm^{-1} , la cual de acuerdo con Hui *et al.*, 2009 y Song *et al.*, 2006 se origina del agua ligada en la monocapa del almidón. Otra banda característica se presentó a los 3000 a 3700 cm^{-1} , que es atribuida a las vibraciones de los grupos hidroxilos (O-H) (Zuluaga *et al.*, 2009; Adel *et al.*, 2010), la cual fue observada también en AMM-9. Las bandas de absorción observadas a 2931 cm^{-1} , son atribuidas al estiramiento del C-H asociado con anhidroglucosa (Jiang *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2006).

Con respecto al AMM-9, se observó que la banda característica de los grupos OH (3000 a 3700 cm^{-1}) disminuyó su intensidad después de la modificación química con OSA. Esta disminución fue debida a la introducción del grupo funcional del OSA (Octenil Succínico) el cual sustituye a los grupos hidroxilos (O-H) a lo largo de la cadena del almidón. Este puede ser confirmado con la presencia de una nueva banda de absorción a 1735 cm^{-1} , lo que sugiere que en esta zona se llevó a cabo la absorción de los grupos éster carbonilo de OSA.

Estos resultados corresponden con lo reportado por Hui *et al.*, 2009 y Jiang *et al.*, 2016, quienes observaron la presencia de una nueva banda entre 1724 y 1727 cm^{-1} en almidón de papa y nanopartículas de almidón de malanga (ambas modificadas con OSA), estas fueron atribuidas a la formación del grupo éster. Por otra parte, Robinsón & Robinson, 2001, reportan que la banda característica de los grupos éster se encuentra dentro 1750-1730 cm^{-1} .

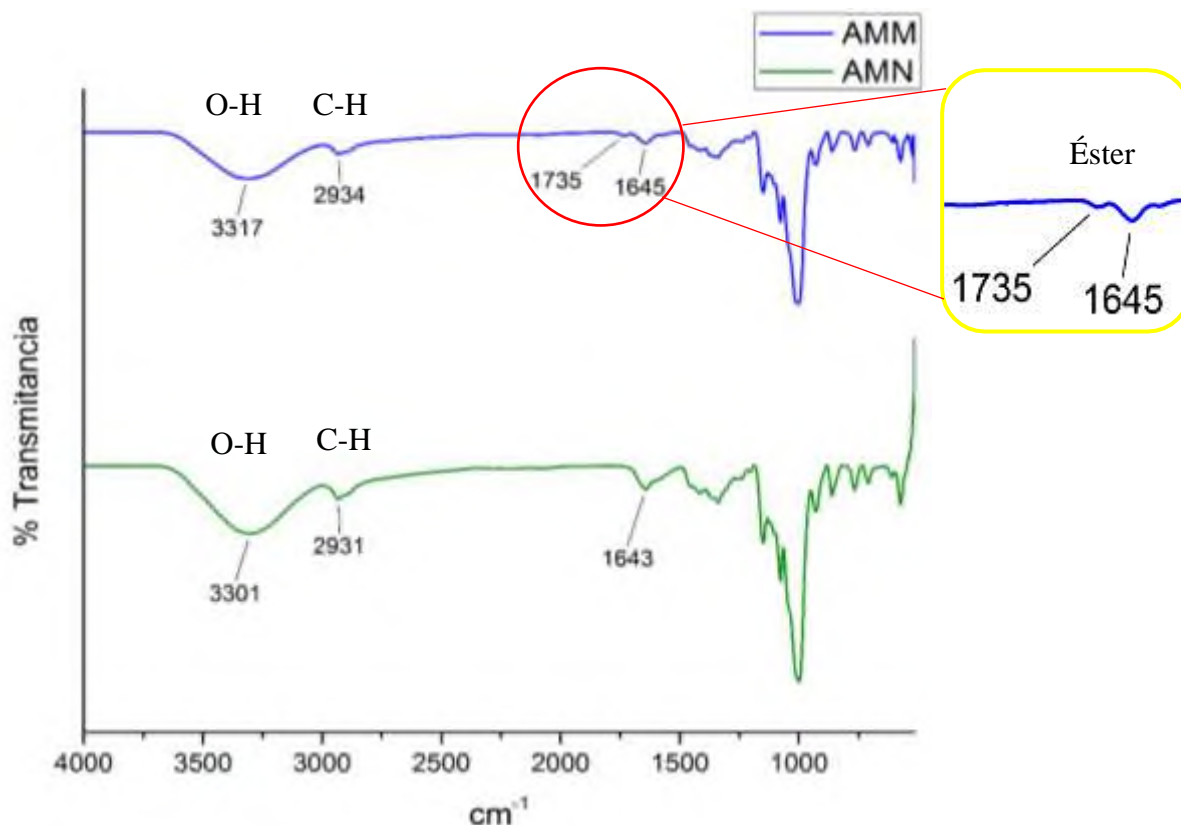


Figura 13. Espectro de FT-IR de muestras de almidón de malanga nativo (AMN) y almidón de malanga modificado (AMM-9) con OSA (GS=0.025). En la parte superior derecha se muestra la figura que representa el enlace éster característico de la modificación con OSA.

6.2. Segunda etapa: Caracterización y estabilidad de las micro y nanoemulsiones.

En esta etapa, se realizó la selección de la muestra (AMM-9) de almidón modificado de malanga (AMM), que presentó el valor más alto de GS (0.0250) para la preparación de las nanoemulsiones. Se evaluó primero la estabilidad durante el almacenamiento (forma visual separación de fases) y tamaño de gota (microscopía óptica) de las micro y nanoemulsiones cada semana durante un mes a una temperatura de 25 °C. Posteriormente se evaluó la estabilidad de las nanoemulsiones por medio de la técnica de dispersión múltiple de la luz (MLS) utilizando Turbiscan Lab y Malvern Zetasizer para obtener el tamaño de gota, índice de polidispersidad y potencial Z de las muestras preparadas y almacenadas durante un tiempo de 30 días a dos temperaturas (4 y 25 °C).

6.2.1. Estabilidad de las nanoemulsiones en almacenamiento

Se realizó la preparación de las muestras que serían evaluadas durante almacenamiento por 30 días (25 °C) a partir de AMN y AMM utilizando dos concentraciones (97 y 214 mg /mL de aceite), diferentes potencias de homogenización ultrasónica (40, 60 y 80 W) y dos tiempos (7 y 10 min). Las muestras elaboradas fueron clasificadas como nanoemulsión elaboradas con almidón nativo (EAN) y con almidón modificado (EAM). Se realizó una evaluación visual con respecto a la apariencia física y separación de fases de las muestras almacenadas.

En la Figura 14 se presentan únicamente las muestras (EAN y EAM) elaboradas con una potencia de 60 W, ya que éstas presentaron diferencias físicas más notorias (ver anexo II) antes y después del periodo de almacenamiento (30 días). Las EAN presentaron una coloración lechosa (Figura 14 A, B) después del proceso de homogenización ultrasónica al tiempo cero (t_0), sin importar la concentración (97 y 214 mg /mL de aceite) de AMN utilizado. Por el contrario, las EAM evaluadas al t_0 presentan una coloración semitransparente con pequeñas partículas suspendidas a cualquiera de las dos concentraciones utilizadas (97 o 214 mg / mL de aceite) de AMM (anexo III, Figura 14 C Y D). El tamaño de gota del aceite presente en un sistema de este tipo (emulsión) es característica de la coloración que pueda presentar una muestra, una coloración lechosa en una emulsión se relaciona con tamaños de gotas grandes (por arriba de 1 μm), por lo cual puede presentar cierta inestabilidad durante el periodo de almacenamiento (ver anexo I, II) (Jafari *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2014).

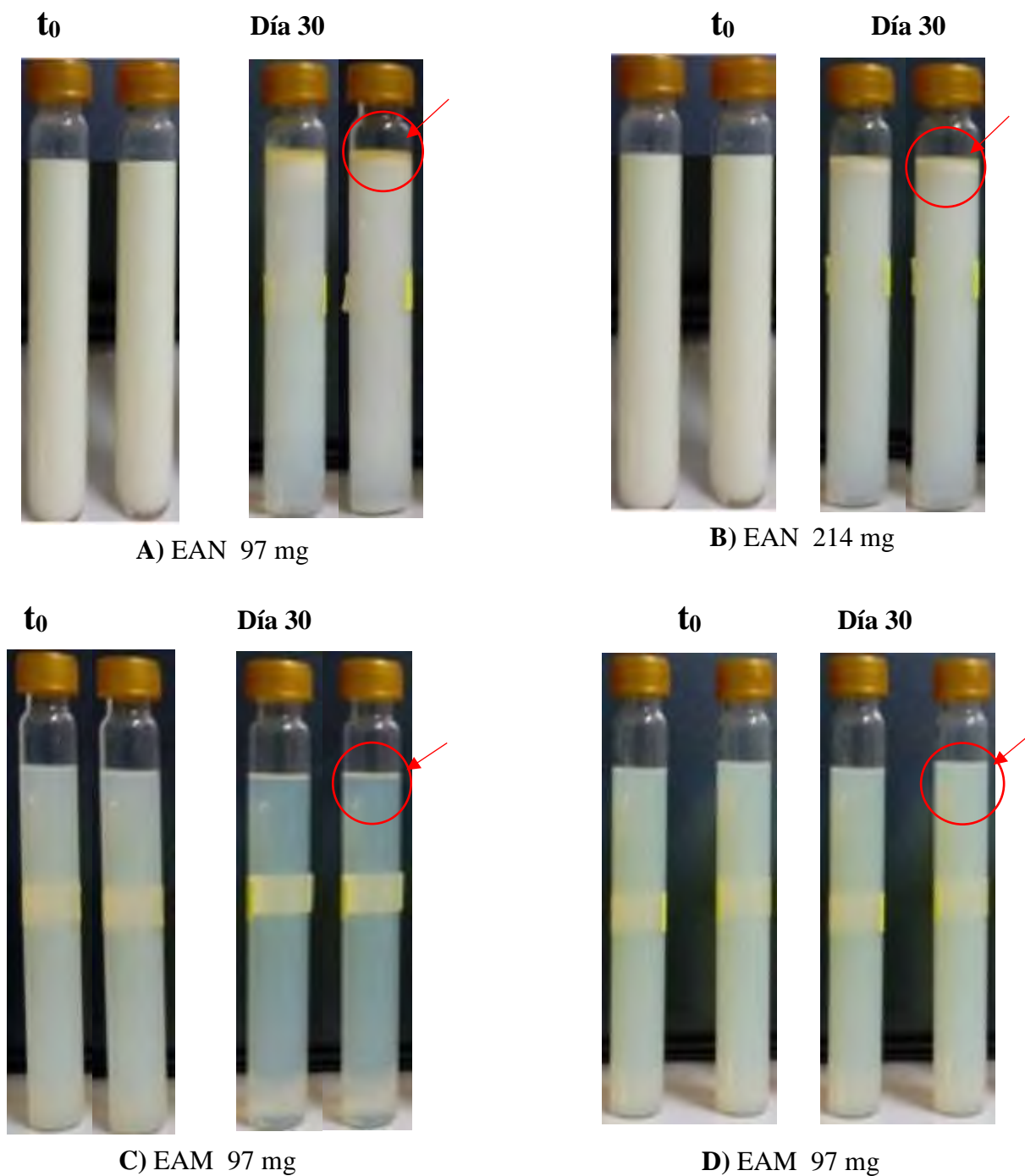


Figura 14. Imágenes de las muestras preparadas por homogenización ultrasónica ($P = 60 \text{ W}$), antes y después de su almacenamiento (30 días a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). A): separación marcada de la fase oleosa, y B): fenómeno de cremación; corresponde a nanoemulsiones preparada almidón nativo (EAN) utilizando dos concentraciones (97 y 214 mg / mL de aceite). C): pérdida de color, y D): conservación de color; corresponden a nanoemulsiones preparada con almidón modificado (EAM) utilizando dos concentraciones (97 y 214 mg / mL de aceite).

La separación de fases fue observada, durante las primeras horas de almacenamiento con las muestras de las EAN, presentado signos de inestabilidad, debido al fenómeno conocido como cremación (Figura 14 B), en donde las partículas se concentran en la superficie o en el fondo (dependiendo de la densidad relativa de las dos fases), observándose una separación muy notoria de la fase oleosa en la parte superior de la muestra (EAN). Este comportamiento de inestabilidad es conocido como trifásico por algunos autores (Panaras *et al.*, 2011; Tigreen *et al.*, 2013). Por el contrario las muestras (EAM) elaboradas con AMM favorecieron la homogenización y estabilidad de la fase oleosa y fase acuosa, logrando estabilizar el sistema formulado (nanoemulsión). Sin embargo, un fenómeno importante observado durante el almacenamiento, fue la pérdida de color para las muestras EAM 97 (Figura 14 C). Esta ligera disminución de la turbidez podría atribuirse a la pérdida por evaporación y degradación del aceite durante el almacenamiento (Zhang *et al.*, 2016; Nejadmansouri *et al.*, 2016; Ozogul *et al.*, 2017), dejando de lado la parte microbiológica; ya que se ha reportado que los aceites esenciales (aceite de naranja) tienen excelentes propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Además, de que se ha informado su efectividad contra un amplio espectro de bacterias y hongos (Burt 2004; Weiss *et al.*, 2009; Sugumar *et al.*, 2015). Esto puede explicarse debido a que las nanoemulsiones tienen un área superficial mayor, lo cual está influenciado por el tamaño de gota, lo que permite la transmisión de luz sea más fácil, además que si la concentración de emulsionante no recubren completamente a las gotas de aceite, estas pueden ser atacadas más fácilmente por la luz.

6.2.2. Variación del tamaño de gota

Para evaluar si el efecto físico de la coloración y turbidez de las muestras (EAN y EAM) analizadas visualmente en la sección anterior, que estaba relacionada con el tamaño de gota, se realizó el análisis de las muestras mediante microscopía óptica. En la Tabla 7 se presentan estos resultados del tamaño de gota promedio (TGP) para cada muestra analizada, en función de la potencia de homogenización ultrasónica (40, 60 y 80 W) y tiempo homogenizado (7 y 10 min).

El TGP de las muestras EAN elaboradas a 7 min de homogenización disminuyó (3.6364 a 0.765 μm) al pasar de una potencia de 40 a 60 W, este mismo efecto puede ser observado a un tiempo mayor (10 min) de homogenización con 40 y 60 W. Sin embargo,

el TGP fue más pequeño (2.870 a 0.243 μm). Por el contrario al utilizar una potencia mayor (80 W) con tiempos de homogenización de 7 y 10 min el TGP para las muestras preparadas aumentó ligeramente (1.032 y 0.462 μm). Esto indicó que una potencia intermedia (60 W) y un tiempo de 10 min, favorece más la reducción del tamaño de gota. En caso contrario, al utilizar potencias muy altas (80 W) y tiempos mayores (10 min) el sistema tiende a volver a generar gotas de tamaño superior (1.032 o 0.462 μm) en comparación con potencias intermedias (60 W). Lo anterior puede ser debido al fenómeno de sobre-procesamiento generado por el efecto de sonicación el cual se acentúa con potencias más altas (80 W) durante el proceso de emulsificación (Kolb *et al.*, 2001, Marie *et al.*, 2002, Jafari *et al.*, 2007). Como consecuencia, aunque la entrada de energía fue mayor durante la emulsificación, no garantizó que el tamaño de gota fuera menor. Esto se explica al hecho, de que durante la emulsificación a alta presión hay un proceso dominante de ruptura de gotitas que da como resultado un incremento en el área superficial, lo cual provoca, que la nueva interfaz deba estabilizarse mediante la adsorción del emulsionante en la interfaz aceite/agua. Sin embargo, si la escala de tiempo de la adsorción del emulsionante en el aire es más larga que la escala de las colisiones, favorecidas por el flujo turbulento generado por la sonicación, la gota no estará completamente cubierta por el emulsionante, lo que conduce a una nueva coalescencia (este resultado fue corroborado con la microscopía óptica en la siguiente subsección), es decir mayores tamaños de gotas. Además de una resistencia mecánica débil, en la interacción del emulsionante en la interfaz de la emulsión, la cual puede ser responsable de una recuperación posterior (Karbstein *et al.*, 1995; Sonneville *et al.*, 2004; McClemets, 2012; Abbas *et al.*, 2014; Orturk *et al.*, 2016).

Tabla 7. Tamaño de gota de emulsiones y nanoemulsiones formuladas con almidón de malanga nativo (AMN) y modificado (AMM), utilizando diferentes tratamientos.

Muestra preparada con AMN		Tiempo (min)	
Potencia (W)	7	10	
	Tamaño (μm)	Tamaño (μm)	
40	3.6364 ± 2.01 ^a	2.870 ± 1.54 ^a	
60	0.7659 ± 0.39 ^b	0.243 ± 0.02 ^b	
80	1.0320 ± 0.49 ^b	0.462 ± 0.24 ^b	
Muestra preparada con AMM			
Potencia (W)	7	10	
	Tamaño (μm)	Tamaño (μm)	
40	0.1804 ± 0.01 ^a	0.1796 ± 0.13 ^a	
60	0.0716 ± 0.01 ^b	0.0262 ± 0.007 ^b	
80	0.1773 ± 0.02 ^a	0.0953 ± 0.01 ^a	

Nota. Estos resultados fueron obtenidos, mediante el sistema CASA (programa ISAS PROISER). Los valores representan el promedio representativo de los tamaños de gota ± error estándar. Las diferencias significativas fueron evaluadas por el software Minitab 16 Statistical. Tukey, $P > 0.05$, $n = 10$. Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística significativa.

El TGP para las muestras EAM presentó una tendencia muy similar (disminución de tamaño de gota) comparadas con las EAN a una potencia 40 a 60 W, presentando valores de TGP de 0,071 a 0.0262 μm, sin embargo el análisis estadístico demostró que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$) en cuanto al tiempo de homogenización ultrasónica (7 y 10 min), para ambas muestra (EAN y EAM). Al igual que en las muestras preparadas con AMN, el TGP en las nanoemulsiones (0.243 ± 0.02 y 0.462 ± 0.24 μm), no mostraron diferencias significativas, al pasar por una potencia (60 a 80 W), a un tiempo de 10 min. En caso contrario las muestras EAM preparadas con AMM a 60 W a 7 y 10 min, presentando tamaños de gotas más pequeños 0.071 y 0.0262 μm, fueron significativamente diferentes en comparación con las muestras tratadas a (40 y 80 W). Esto indicó que la potencia a 60 W eligiendo un tiempo de 10 min de homogenizado, fue el tratamiento más adecuado para reducir el tamaño de gota y con ello mejorar la estabilidad de las fases (aceite/agua) para generar una nanoemulsión con un tamaño de gota alrededor de los 0.0262 ± 0.007 μm, esto también puede ser observado en la Figura

15, donde se evaluó el efecto de la potencia y tiempo de sonicación en la reducción del tamaño de gota.

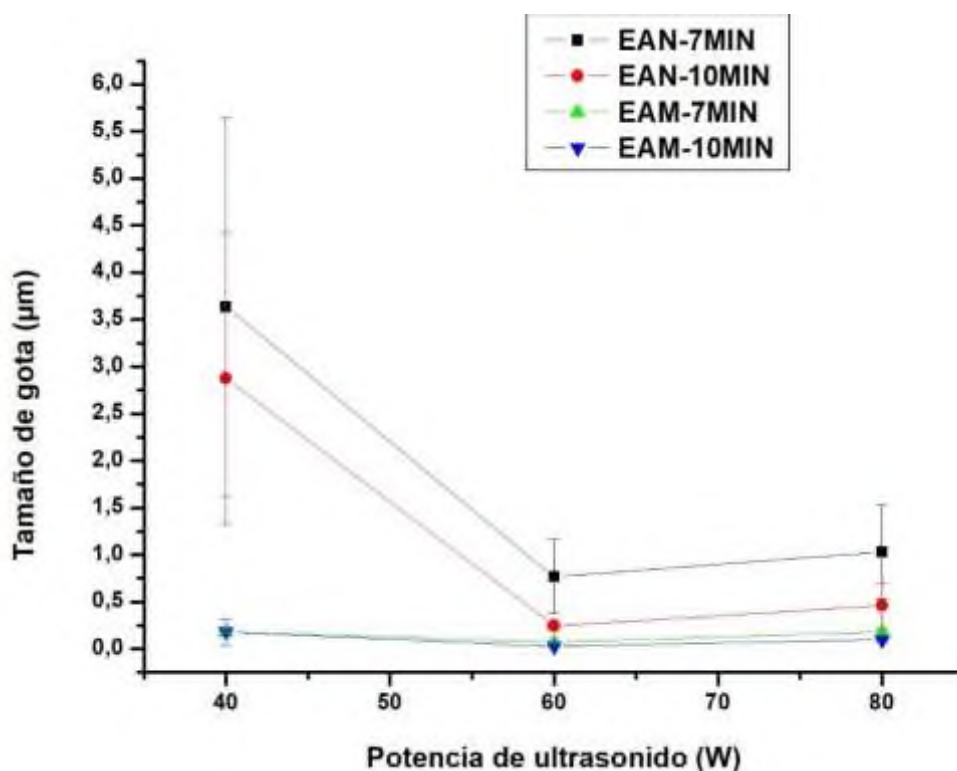


Figura 15. Efecto de la potencia y tiempo de sonicación en la reducción de tamaño de gota de nanoemulsiones elaboradas a partir de almidón de malanga nativo (AMN) y modificado (AMM) a diferentes tiempos (7 y 10 min).

Por otra parte cabe resaltar que el aumento en la potencia (80 W), de acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 15), mostraron un exceso en el procesamiento (sobrepesamiento), durante la elaboración de las nanoemulsiones (EAN y EAM). Esto se atribuyó a que la aplicación de energía mecánica (80 W) fue excesiva para el volumen de la muestra (100 mL). Por lo que se debe tener en cuenta que el TGP final es el resultado de un equilibrio entre la ruptura de las gotas (causado por el proceso de cavitación) y la re-coalescencia, como se ha venido mencionando (Trujillo-Cayado *et al.*, 2017, Leal-Castañeda *et al.*, 2018).

6.2.3. Microscopía óptica de las nanoemulsiones

El análisis de microscopía óptica se realizó con la finalidad de corroborar y comparar los resultados obtenidos de TGP que presentaron las muestras (EAN y EAM) elaboradas a

10 min de homogenización ultrasónica. En la Figura 16 se presentan las imágenes de microscopía óptica (20x) de las muestras antes mencionadas utilizando diferentes potencias (40, 60 y 80 W). Los resultados mostraron diferencias importantes entre las EAN y las EAM. Las nanoemulsiones elaboradas con AMM presentaron gotas más finas con una distribución uniforme (Figura 16 B, D y F) para todas las potencias evaluadas, mientras que las emulsiones elaboradas con AMN, exhibieron gotas voluminosas de tamaño mayor (Figura 16 A, C y E), este comportamiento es debido al fenómeno de floculación y coalescencia.

El proceso de emulsificación con ultrasonido utilizando potencias de 40 y 60 W fue contundente en la reducción del tamaño de gota. Esto es atribuido a la fuerza disruptiva durante el proceso de homogenización ultrasónica, en la cual se generan fuerzas de cizallamiento sobre las gotas de aceite y esto es más efectivo al aumentar la potencia (40 a 60 W). Este efecto de cizalla provoca la ruptura de los glóbulos de aceite, generando glóbulos más pequeños (Abbas *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2002; Soria & Villamiel, 2010). Sin embargo, este efecto fue contrario al pasar de una potencia de 60 a 80 W, lo cual puede atribuirse al fenómeno de cavitación por medio del cual se genera este efecto de cizallamiento provocado a mayor potencia un aumento importante en la temperatura, lo cual pudiera estar provocando que los pequeños glóbulos de aceite formados en un principio, debido a su inestabilidad cinética, tienda a reintegrarse nuevamente en glóbulos grandes para alcanzar su estabilidad.

Es importante comentar que apartir de una examinacion visual no es posible concluir que concentración de almidón (modificado), potencia y tiempo es mejor para la estabilidad de las nanoemulsiones (aceite-agua). Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos mediante la examinación visual, se descartó la concentración de almidón de 97 mg /mL de aceite (ya que fueron las muestras que perdieron color durante el almacenamiento y mostraron mayor separación de la fase oleosa en las nanoemulsiones control (EAN). Por tal motivo el estudio se redujo a la preparación de nanoemulsiones con una concentración 214 mg/mL de aceite y almidón a potencias de 40 y 60 W durante un tiempo de homogenizado de 10 min, para los análisis.

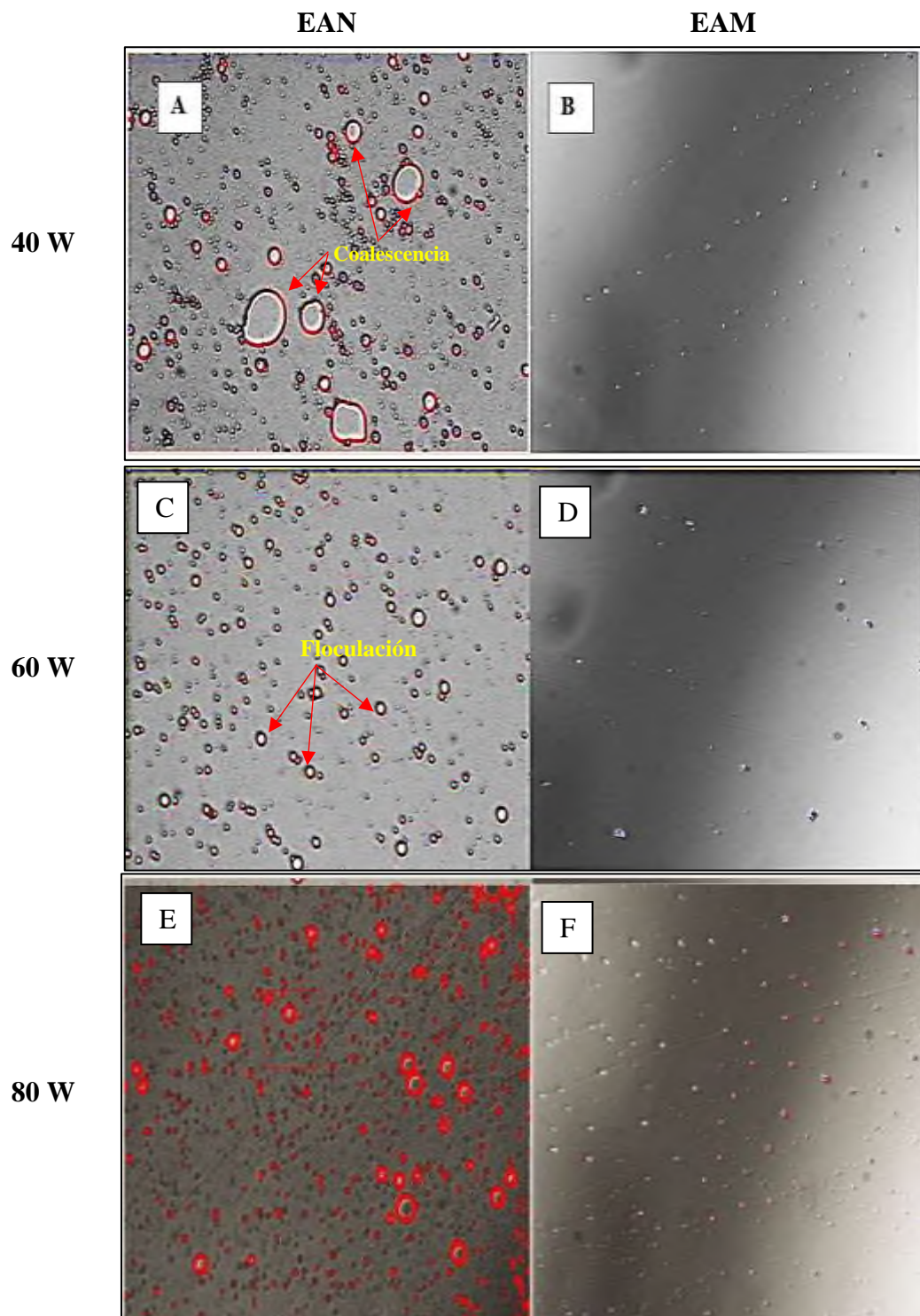


Figura 16. Imágenes de microscopía óptica (20x) de las nanoemulsiones: A) elaboradas con almidón nativo (EAN), B) con almidón modificado (EAM), utilizando un tiempo de 10 min y diferentes potencias (40, 60 y 80 W).

6.2.4. Medición de la estabilidad de las nanoemulsiones

El análisis de la estabilidad utilizando el Turbiscan permite la caracterización de la nanoemulsión sin dilución, por lo que resulta adecuado para el control de calidad y la optimización de la formulación (Feng *et al.*, 2016). Las mediciones del Turbiscan proporcionan información de estabilidad o inestabilidad del sistema formulado en función del tiempo (periodo de un mes). Se obtuvieron perfiles de retrodispersión delta (ΔBS %) y transmisión de luz (ΔT %) para las nanoemulsiones elaboradas a 40 y 60 W antes y durante el periodo de almacenamiento, los resultados se presentan de manera gráfica en función del tiempo ($t = 0$) y el escaneo de la altura de la muestra (20 mL). Este análisis permite identificar los fenómenos de inestabilidad en las nanodispersiones de aceite; tales como la migración de partículas (formación de crema o sedimentación) y variación de tamaños o agregados (coalescencia, floculación) de acuerdo con lo que reporta Mengual *et al.*, 1999.

Los perfiles de transmisión y retrodispersión de las nanodispersiones de aceite en agua (O/W) elaboradas con AMM a distintas potencias (40 y 60 W) y almacenadas a dos temperaturas (4 y 25 °C) se presentan en las Figuras 17-20, respectivamente. En donde el eje X representa la altura del tubo (mm), el eje Y representa el porcentaje de luz de transmisión ó retrodispersada, los colores de las curvas corresponden al tiempo en días (eje Y secundario). En este sentido, todas las nanodispersiones presentaron una tendencia lineal a través de tiempo, lo cual indica que existe migración de partículas o gotas de aceite en las muestras evaluadas. Se ha reportado (Feng *et al.*, 2001; Leal-Castañeda *et al.*, 2018) que la intensidad inicial de la retrodispersión (ΔBS) en un tiempo inicial ($t = 0$) esta relacionando con el tamaño y densidad de las partículas en sistemas emulsionados o nanoemulsionados. En este sentido cuando solo existe una variación en el tamaño de gota (por ejemplo, coalescencia), los perfiles ΔBS siempre serán negativos, esto se explica con el hecho de que cuando el tamaño de la partícula o gota aumenta, la densidad de la misma disminuye. Un caso contrario a esto, se presenta cuando en la nanodispersión se tiene el fenómeno de migración de partículas, en donde el menisco de las curvas de ΔBS , detectará un valor positivo notándose la presencia de una fase cremosa y una región clarificada de la muestra en la parte inferior (valor negativo), tal como reportan algunos autores (Palazolo *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2004).

En la Figura 17, se presenta el perfil de transmisión y retrodispersión de las nanodispersiones O/W, elaboradas con AMM a 40 W y almacenadas a 4 °C. En esta se puede observar que no hay cambios sustanciales en la retrodispersión, lo que significa que la variación del tamaño de gota durante el periodo de almacenamiento (30 días) es muy ligero y no se observó visualmente sedimentación en el sistema formulado (nanodispersión). Esto es razonable puesto que cuando este fenómeno aparece (sedimentación), se observa un aumento de retrodispersión frente al tiempo en el fondo de la muestra (lado izquierdo del espectro) de forma similar a lo reportado por Shakeel & Ramadan, 2010. Al comparar las nanodispersiones realizadas con 40 y 60 W (Figuras 17 y 18) almacenadas a 4 °C, se puede apreciar que la nanoemulsión preparada con 60 W tienen mejor estabilidad en comparación con las preparadas a 40 W de potencia, esto debido a la altura que presentan en ΔBS , con una separación de las bandas muy marcada, esto también se puede corroborar con la tendencia que muestran las gráficas de ΔT % (transmisión de luz), con valores de 0 a 10 y de 0 a 20 para la nanodispersión preparada a 60 W. De acuerdo con la ley de Mie (del ΔBS), el tamaño de gota aumenta cuando el diámetro de la gota es mayor a 0.5 μm (Mengual, 1999, Pizzino, 2009). Por tal motivo no hubo cambios significativos en la estabilidad de las nanoemulsiones (40 y 60 W) después de 30 días de almacenamiento a 4 °C y 25 °C (Figuras 18-20). Esto fue corroborado con la medición del diámetro medio de gota presentado en la siguiente sección tamaños de gotas.

En el caso de las nanodispersiones preparadas con 40 y 60 W (Figura 19 y 20) almacenadas a 25 °C, se pueden apreciar un aumento en los valores de ABS (0 a -6 y 0 a -10) con forme aumenta el tiempo y la temperatura de almacenamiento. Esto se puede observar también en los valores de ΔT % que van de 0 a 13 y 0 a 23 para las nanoemulsiones preparadas a 4 °C y 25 °C respectivamente. Esto sugiere que la temperatura de almacenamiento es muy importante para este tipo de sistemas pues de ello depende también la estabilidad de una nanoemulsión.

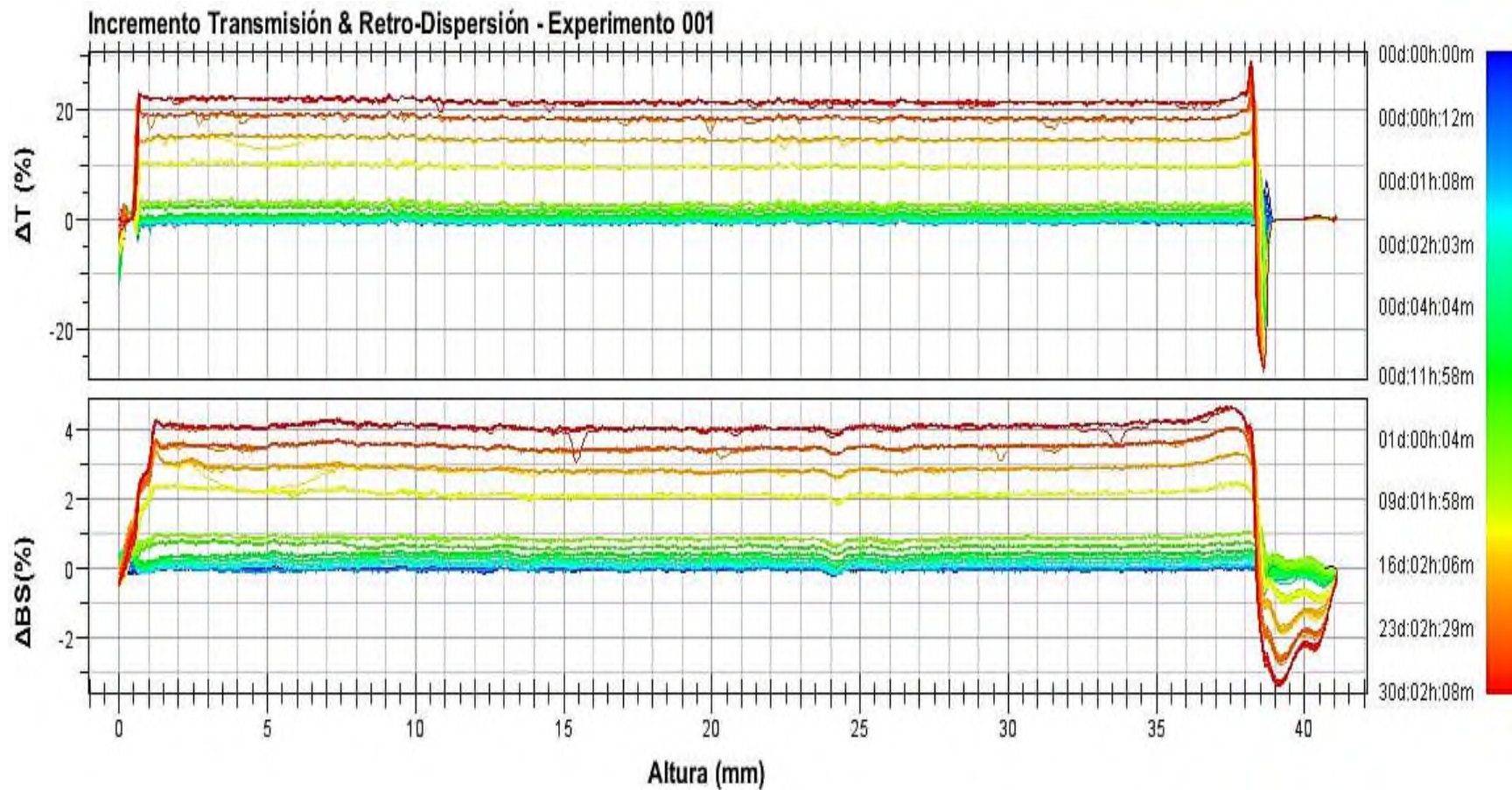


Figura 17. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluadas a una temperatura de 4 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 40 W en función del tiempo de almacenamiento.

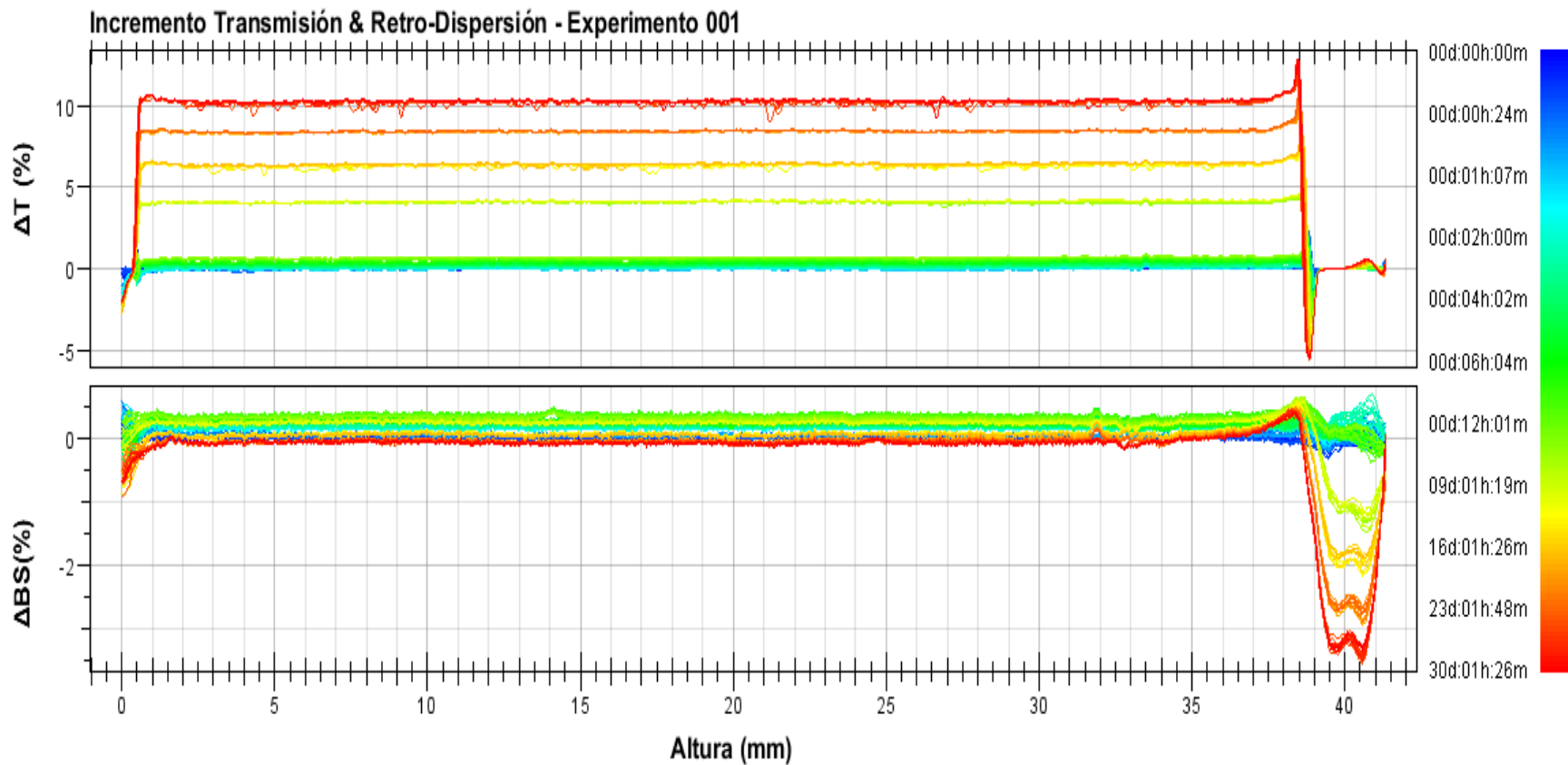


Figura 18. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluadas a una temperatura de 4 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 60 W en función del tiempo de almacenamiento.

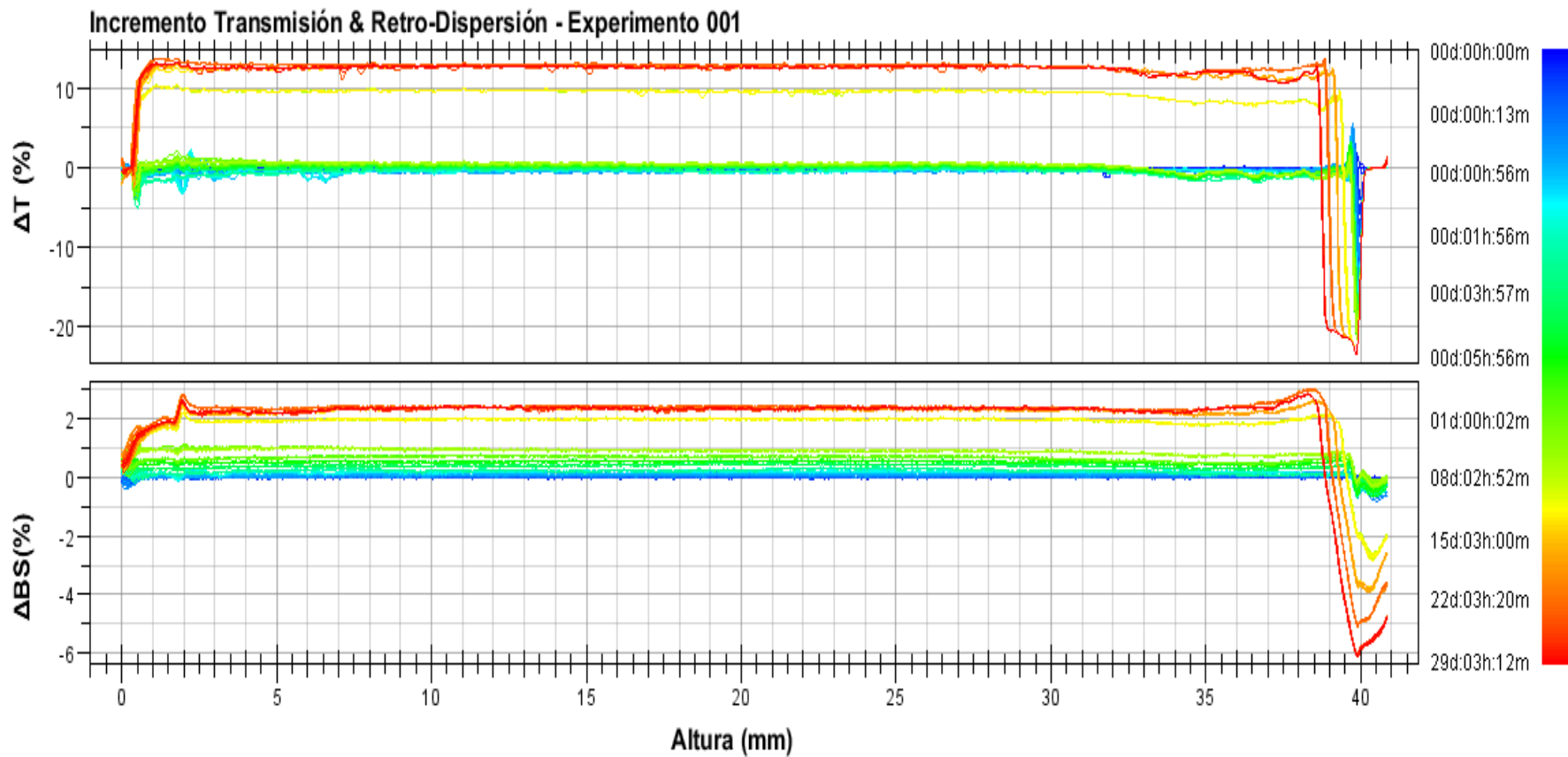


Figura 19. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluada a una temperatura de 25 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 40 W en función del tiempo de almacenamiento.

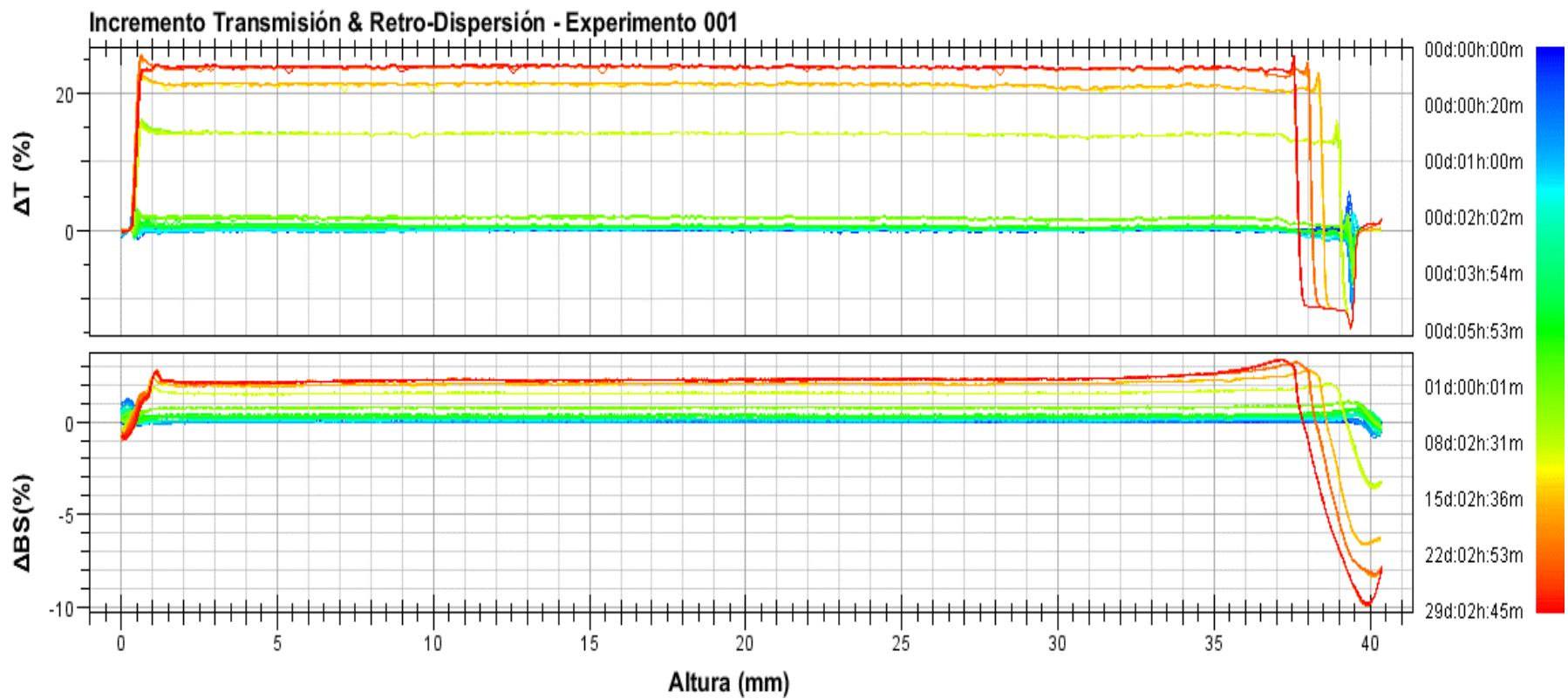


Figura 20. Perfiles de transmisión y retrodispersión de nanoemulsiones O/W estabilizadas con AMM, evaluada a una temperatura de 25 °C y utilizando una potencia de ultrasonido de 60 W en función del tiempo de almacenamiento.

6.2.5 Determinación del diámetro medio de las gotas.

Las nanoemulsiones poseen tamaños de gotas extremadamente pequeños (100 a 200 nm) y baja polidispersidad, ventajas que permiten una mejor estabilidad, comparado con las emulsiones convencionales o microemulsiones. Por lo tanto, el diámetro medio de gota (DMG) en la formulación de una nanoemulsiones es un parámetro importante para definir la aplicación y estabilidad de las mismas. En la Figura 21 se muestran los resultados del DMG para las nanoemulsiones EAM, tratadas con distintas potencias de sonicación (40 y 60 W), durante su almacenamiento (30 días) a dos diferentes temperaturas (4 °C y 25 °C).

En esta gráfica se puede apreciar, que las nanoemulsiones elaboradas con una potencia de 40 W almacenadas a 4 °C, tuvo un mejor resultado, al tener DMG menor (165.8 ± 3.8 nm) en comparación con las otras muestras, sin embargo el análisis estadístico ($P < 0.05$) no mostró diferencias significativas con las muestras elaboradas a 60 W, almacenadas a 4 °C (DMG= 178.6 ± 2.3 nm) y 25 °C (DMG= 175.3 ± 8.1 nm). Esto probablemente se debió, al efecto de la energía cinética provocada, por el aumento en la potencia de sonicación (Kaltasa *et al.*, 2014). Por el contrario, la muestra preparada a una potencia de 40 W y almacenadas a 25° presenta un cambio sustancial (DMG mayor) con forme aumentó el tiempo de almacenamiento.

El aumento del DMG para esta formación durante el almacenamiento (primer día hasta el final de su almacenamiento) fue de 161-567 nm. Este comportamiento del aumento en el DMG exponencial, es atribuido a dos factores:

Primero: El fenómeno de agregación de las gotas durante el almacenamiento. Algunos autores (Zhao *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2016; Leal-Castañeda *et al.*, 2018) han especulado que los agregados de las gotas son causados por: floculación de las gotitas o concentración de gotitas de aceite durante la sublimación del agua por efecto de la temperatura (25 °C).

Segundo: El efecto de la temperatura propició el aumento en el tamaño de gota debido al movimiento disperso de las gotas a través de la fase continua, lo cual puede originar un mayor número de colisiones entre las gotas de aceite.

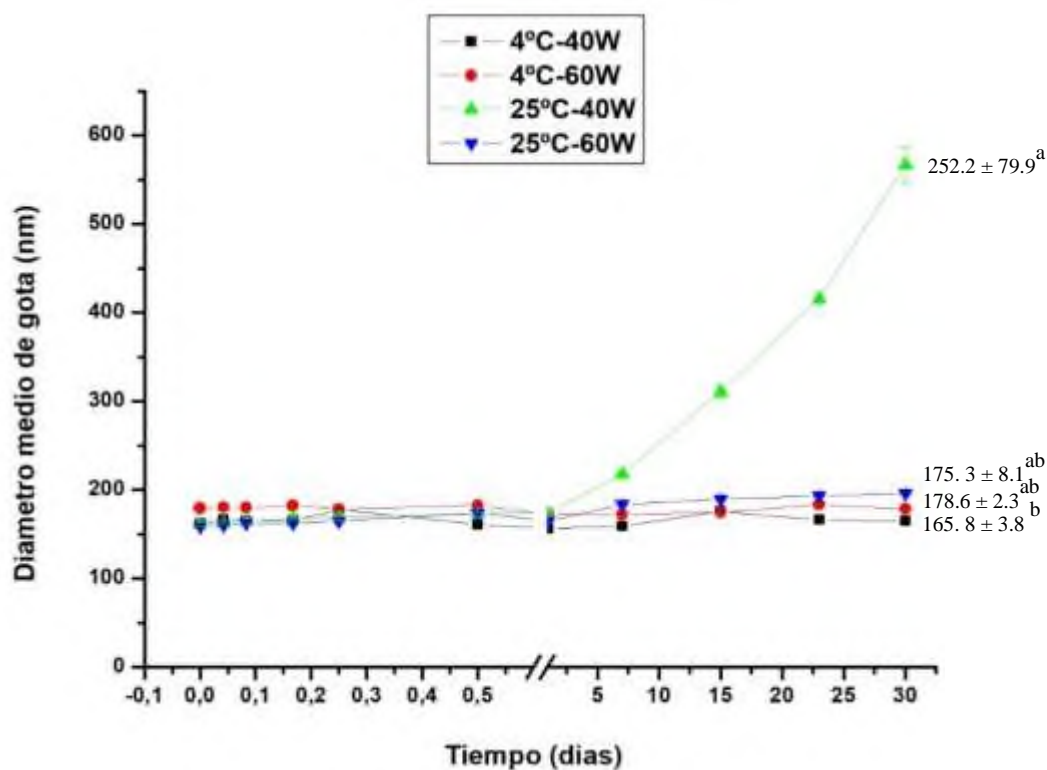


Figura 21. Efecto de la temperatura (4 y 25 °C) y potencia de sonicación (40 y 60 W) sobre el tamaño de gota de las nanoemulsiones durante el periodo de almacenamiento (30 días). Las diferencias significativas fueron evaluadas comparando los promedios representativos de cada tratamiento. Tukey, $P < 0.05$, $n=10$.

En este sentido Nejadmansouri *et al.* (2016), reportó que la temperatura tiene influencia directa en la movilidad de las gotas de aceite, la cual puede ser mayor a temperaturas más elevadas (25 °C). Por esta razón, la muestra almacenada a 25 °C y preparada con una potencia de 40 W, presentó DMG mayor, en comparación con las demás muestras preparadas. Sin embargo, se puede observar que la nanoemulsión preparada a 60 W de potencia y almacenada (25 °C) bajo las mismas condiciones no presenta un aumento significativo del DMG (175.3 ± 8.1 nm) después del día 7, en comparación con la muestra preparada a 40 W (252.2 ± 79.9 nm). Esto se debe a que la potencia de homogenización fue lo suficientemente efectiva para

reducir el tamaño de gota en la nanoemulsión para brindar mejor estabilidad durante el periodo de almacenamiento.

Por otra parte, cabe resaltar que el aumento en el tamaño de partícula se debe al movimiento browniano de las gotas dispersas a través de la fase continua (agua), este movimiento se agudiza más con el aumento de la temperatura. En este sentido la repulsión electrostática es un factor clave para estabilidad durante el almacenamiento de una nanoemulsión. Se ha reportado que valores de repulsión electrostática altos generan mejor estabilidad, mientras que valores de repulsión electrostática bajos inducen los fenómenos de inestabilidad como; floculación/coalescencia de las gotas de aceite (Tcholakova *et al.*, 2006; McClements, 2015). Por tal motivo, se realizó el análisis del potencial Z ($-\zeta$) para evaluar este parámetro en las nanoemulsiones elaboradas.

6.2.6. Mediciones del potencial $-\zeta$ de las nanoemulsiones

El potencial zeta (ζ) o potencial electrocinético es un parámetro fundamental utilizado en el estudio de las interacciones, repulsión o atracción de partículas en suspensión en un líquido. El potencial- ζ permite el estudio de la estabilidad de suspensiones coloidales, emulsiones y nanoemulsiones, por tal motivo este análisis fue utilizado para evaluar las fuerzas de repulsión entre partículas del almidón y las gotas de aceite presentes en las nanoemulsiones, ya que la mayoría de los sistemas acuosos coloidales se estabilizan a través de la repulsión electrostática. Cuanto mayor sea la fuerza de repulsión entre las partículas, menor será la probabilidad de que se acerquen y formen agregados. En forma teórica, si el valor absoluto del potencial- ζ está por debajo de ± 30 mV, una nanoemulsión puede exhibir estabilidad parcial o débil, lo cual puede dar lugar a fenómenos como aglomeración o floculación, mientras que a valores más altos (± 30 mV) de potencial- ζ , las nanoemulsiones formuladas pueden presentar mejor estabilidad (Abbas *et al.*, 2014, Salvia-Trujillo *et al.*, 2015; Sugumar *et al.*, 2015; Guerra-Rosas *et al.*, 2016).

Los resultados del potencial- ζ (carga superficial de las gotas de aceites) de las nanoemulsiones O/W formuladas con AMM, utilizando diferentes potencias de ultrasonido

(40 y 60 W) y dos tiempos de almacenamiento (4 y 25 °C) se muestra en la Figura 22. En este estudio todos los resultados fueron negativos, lo que puede estar relacionado con la presencia de grupos cargados negativamente (grupos carboxilos) en las moléculas del almidón modificado, grupos funcionales donados por el reactivo utilizado (OSA) para la modificación del almidón (Nilsson & Bergenstahl, 2007, Sweedman *et al.*, 2013).

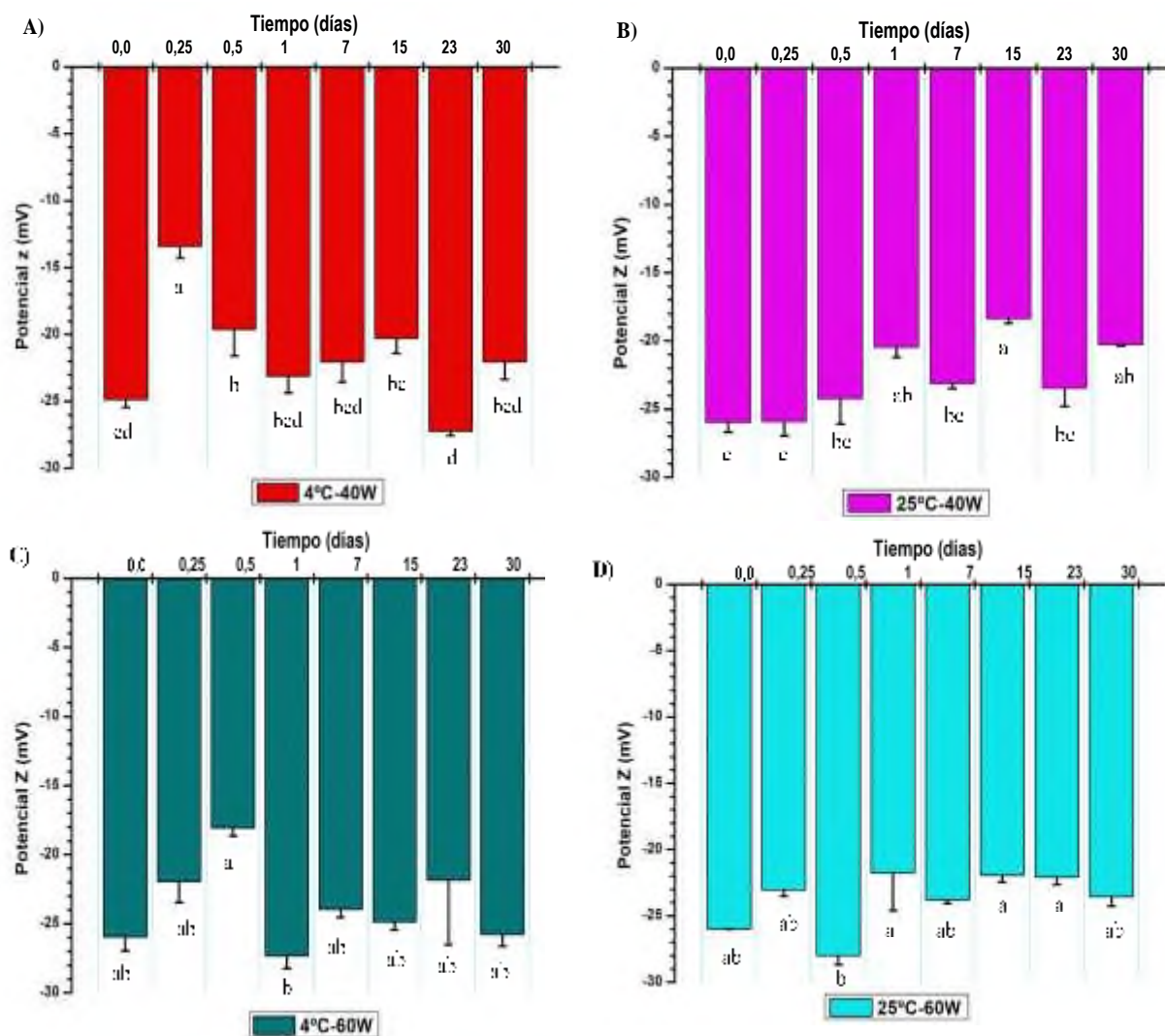


Figura 22. Potencial- ζ de las nanoemulsiones O/W formuladas con AMM, utilizando diferentes potencias de ultrasonido (40 y 60 W) y dos tiempos de almacenamiento (4 y 25 °C). A). Nanoemulsión elaborada 40 W almacenadas a 4 °C, B). 40 W-25 °C, C). 60 W-4 °C, D). 60 W-25 °C. Valores seguidos por las mismas letras dentro de la misma serie no son significativamente diferentes. Tukey (P < 0.05).

El valor inicial y final de potencial- ζ para las nanoemulsiones preparadas con 40 W y almacenadas a 4 y 25 °C fueron los siguientes: 25.76 ± 0.84 , 22.03 ± 1.32 y -25.96 ± 0.70 , -20.3 ± 0.05 . Estos resultados mostraron que a 4 °C las nanoemulsiones son más estables, en cuanto a la variabilidad del potencial- ζ durante el tiempo de almacenamiento (ver la Figura 22 A, B). En caso contrario, las nanoemulsiones almacenadas a 4 °C y 25 °C aplicando una potencia de 60 W no presentaron diferencias significativas, entre la fluctuación de sus valores, a través del tiempo (30 días). Donde el valor inicial y final del potencial- ζ , fue: 25.93 ± 1.03 , -25.7 ± 0.84 y -25.9 ± 0.03 , -23.5 ± 0.69 respectivamente. Esto indicó que la estabilidad estuvo en función de la potencia aplicada, al no presentar diferencias significativas en el potencial- ζ a través del tiempo, durante su almacenamiento a 4 y 25 °C (ver la Figura 22 C y D).

Cabe resaltar que a pesar de que las cargas eléctricas de las nanoemulsiones se encontraban por debajo -30 mV, el tamaño de gota presentado fue suficiente para evitar los fenómenos de inestabilidad durante el tiempo de almacenamiento, esto coincide con lo reportado por otros autores (Rebolleda *et al.*, 2015, Guerra-Rosas *et al.*, 2016).

En este sentido Zhao *et al.*, 2015, reportó valores de potencial- ζ entre -27.2 a -29.7 mV (negativamente bajos) para emulsiones elaboradas con distintos aceites esenciales (canola, naranja y maíz), concluyendo que con dichos valores de potencial- ζ no se observó inestabilidad en las emulsiones. Por otro lado, Lieberman, *et al.*, 1996, reportó un valor absoluto del potencial- ζ de -25 mV, observando, en este caso, fenómenos de inestabilidad (floculación y sedimentación) en las emulsiones. Por lo tanto, se puede deducir que persisten las altas fuerzas de repulsión (debido a las condiciones estéricas o poliméricas) entre las gotas de la emulsión para una buena estabilidad física. En este sentido se ha reportado que el fenómeno de floculación en las emulsiones es un proceso reversible, que en su mayoría no es perjudicial para la desestabilización física de la emulsión, por lo que debe importarse que no se presente coalescencia (Rayner *et al.*, 2014, Chauvierre *et al.*, 2004 y Palazolo *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Las condiciones de modificación con OSA efectuadas en el experimento 9 (concentración (30g de almidón en bs), H₂O (100 mL), tiempo de reacción (8 h)) fue la más adecuada para modificar el almidón ya que esta presentó el valor más alto de GS (0.025), en comparación con los demás experimentos (AMM-1-8).

El análisis de microscopia electrónica de barrido del almidón modificado permitió observar que la modificación con OSA afecta superficialmente la estructura del almidón.

La espectroscopía FT-IR mostró la vibración característica de los grupos éster carbonilo del almidón modificado con OSA mediante una banda de absorción en 1735 cm⁻¹.

Las nanoemulsiones elaboradas con una concentración de 214 mg /mL de aceite de AMM, presentó mejor estabilidad, ya que no se observaron cambios en su apariencia física durante el almacenamiento.

EL análisis de microscopia óptica de las nanoemulsiones elaboradas con AMN, permitió observar la presencia de fenómenos de desestabilización (cremado, floculación y coalescencia) a tiempos muy prematuros (1^{er} día de almacenamiento), a diferencia de las nanoemulsiones EAM, las cuales permanecieron estables durante el periodo de almacenamiento de un mes.

El almidón de malanga modificado con OSA (GS= 0.025), utilizado como estabilizador en en las nanoemulsiones (O/W), mejoro la estabilidad de las muestras con respecto a su almidón nativo.

El TGP mostró que las nanoemulsiones elaboradas con almidón modificado, utilizando una potencia de 60 W a un tiempo de 10 min, son más estables, al poseer un tamaño de gota ($0.0262 \pm 0.007 \mu\text{m}$) menor a las elaboradas con almidón nativo ($0.243 \pm 0.02 \mu\text{m}$). Indicando que la potencia aplicada es un factor clave para la reducción del tamaño de gota.

El análisis DMG mostro que las muestras elaboradas 60 W resultaron ser más estable al no mostrar diferencia significativas en el DMG durante su almacenamiento a 4 °C (178.6 ± 2.3 nm) y 25 °C (175.3 ± 8.1) en comparación las muestras elaboradas a 40 W almacenadas a 4 °C (165.8 ± 3.8 nm) y 25 °C (252.2 ± 79.9 nm).

Aunque los valores de potencial- ζ de las nanoemulsiones se encontraron por debajo de ± 30 mV, marcando signo de inestabilidad, las cinéticas obtenidas mediante la retrodispersión y transmisión de luz revelo que la estabilidad de la emulsión estuvo en función del tamaño de gota.

PERSPECTIVAS

Debido a las características cualitativas (FT-IR y MEB) presentadas en el almidón modificado con OSA, se sugiere realizar estudios para evaluar el efecto de la modificación en la estructura molecular del almidón.

Para la formulación de las nanoemulsiones es necesario tener un buen manejo de las condiciones de elaboración (temperatura, proceso de homogenización e incorporación de las fases para el sistema agua/ almidón/ aceite).

También es conveniente efectuar el estudio de comportamiento de fases (acuosa y oleosa), así como la viscosidad de las nanoemulsiones, para las concentraciones de almidón modificado utilizados en este trabajo.

Estudios previos acerca de la estabilidad de las nanoemulsiones con almidón modificado con tamaños de partícula menor (178.6 ± 2.3 nm) al utilizado en este trabajo. Con base a esto se sugiere utilizar métodos de hidrólisis acida para disminuir el tamaño del almidón de malanga y evaluar cómo el tamaño influye en las propiedades emulsificantes de estos hirdolizados.

Dentro de las actividades que podrían realizarse a futuro se encuentra la evaluación de las nanoemulsiones a nivel micelar, para su posible utilización en la encapsulación de compuestos bioactivos.

REFERENCIAS

1. Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista iberoamericana de polímeros*, 7 (3), 211-231.
2. Abbas, S., Bashari, M., Akhtar, W., Li, W. W., & Zhang, X. (2014). Process optimization of ultrasound-assisted curcumin nanoemulsions stabilized by OSA-modified starch. *Ultrasonics sonochemistry*, 21 (4), 1265-1274.
3. Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., & Zhang, X. (2013). An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions. *Food engineering reviews*, 5 (3), 139-157.
4. Adel, A. M., El-Wahab, Z. H. A., Ibrahim, A. A., & Al-Shemy, M. T. (2010). Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. *Bioresource technology*, 101 (12), 4446-4455.
5. Badui-Dergal S. (2013). Química de los alimentos. (Qta. Ed.). Pp. 68-80.
6. Bai, Y., Shi, Y. C., Herrera, A., & Prakash, O. M. (2011). Study of octenyl succinic anhydride-modified waxy maize starch by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate polymers*, 83 (2), 407-413.
7. Becher P (2001) Emulsions: theory and practice. Oxford University Press, UK.
8. BeMiller, J. N. (2009). One hundred years of commercial food carbohydrates in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (18), 8125-8129.
9. Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Sánchez-Hernández, L., & Paredes-López, O. (1999). Isolation and partial characterization of banana starches. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (3), 854-857.

10. Bello-Pérez, L. A., Contreras-Ramos, R. Romero-Manilla, J. Solorza-Feria, y A. Jiménez-Aparicio. 2002. Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *Musa paradisiaca* L. (var. Macho). *Agrociencia*, 36, 169–180.
11. Bello-Pérez, L. A., Bello-Flores, C. A., del Carmen Nuñez-Santiago, M., Coronel-Aguilera, C. P., & Alvarez-Ramirez, J. (2015). Effect of the degree of substitution of octenyl succinic anhydride-banana starch on emulsion stability. *Carbohydrate polymers*, 132, 17-24.
12. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94 (3), 223-253.
13. Bhosale, R., & Singhal, R. (2006). Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. *Carbohydrate polymers*, 66 (4), 521-527.
14. Campos P. Los carbohidratos: combustible principal de la célula. Biología II. Ed. Limusa 2002, 2, pp.15-16.
15. Chauvierre, C., Marden, M. C., Vauthier, C., Labarre, D., Couvreur, P., & Leclerc, L. (2004). Heparin coated poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles coupled to hemoglobin: a new oxygen carrier. *Biomaterials*, 25 (15), 3081-3086.
16. A new approach for the characterization of insoluble amphiphilic copolymers based on their emulsifying properties. *Colloids polym Sci*, 282, 1097–1104
17. Dai, L., Qiu, C., Xiong, L., & Sun, Q. (2015). Characterisation of corn starch-based films reinforced with taro starch nanoparticles. *Food chemistry*, 174, 82-88.
18. De Villepin, Ronan. (2007). Guía del Turbiscan LAB. Manual. Ed. 1. Reino Unido Francia. *Formulations smart scientifics analysis SAS 10*, 104.

19. Domian, E., Brynda-Kopytowska, A., & Oleksza, K. (2015). Rheological properties and physical stability of o/w emulsions stabilized by OSA starch with trehalose. *Food hydrocolloids*, 44, 49-58
20. Dokić, L., Krstonošić, V., & Nikolić, I. (2012). Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. *Food hydrocolloids*, 29 (1), 185-192.
21. Fang, J. M., Fowler, P. A., Sayers, C., & Williams, P. A. (2004). The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydrate polymers*, 55, 283–289.
22. Gülseren, İ., Güzey, D., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions. *Ultrasonics sonochemistry*, 14 (2), 173-183
23. Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food hydrocolloids*, 52, 438-446.
24. Hernández-Jaimes, M.C. Encapsulación de nanoemulsiones de extractos de Equisetum arvense. Tesis de maestría. Universidad autónoma Metropolitana Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. 2009.
25. Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food science and technology*, 28 (3), 718-726.
26. Herrera M.L. (2012) Nano and Micro Food Emulsions. In: Analytical Techniques for Studying the Physical Properties of Lipid Emulsions. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, vol 3. Springer, Boston, MA.

27. Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (2001). Location of sites of reaction within starch granules. *Cereal chemistry*, 78 (2), 173-180.
28. Hui, R., Qi-He, C., Ming-liang, F., Qiong, X., & Guo-qing, H. (2009). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. *Food chemistry*, 114 (1), 81-86
29. Horrocks, M., & Weisler, M. I. (2006). A short note on starch and xylem of *Colocasia esculenta* (taro) in archaeological deposits from Pitcairn Island, southeast Polynesia. *Journal of archaeological science*, 33 (9), 1189-1193.
30. Han, J. A., & BeMiller, J. N. (2007). Preparation and physical characteristics of slowly digesting modified food starches. *Carbohydrate polymers*, 67 (3), 366-374.
31. Jafari, S., M., He, Y., & Bhandari, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European food research and technology*, 225 (5-6), 733-741
32. Jiang, S., Dai, L., Qin, Y., Xiong, L., & Sun, Q. (2016). Preparation and characterization of octenyl succinic anhydride modified taro starch nanoparticles. *Plos one*, 11 (2), e0150043.
33. Joe, M. M., Chauhan, P. S., Bradeeba, K., Shagol, C., Sivakumaar, P. K., & Sa, T. (2012). Influence of sunflower oil based nanoemulsion (AUSN-4) on the shelf life and quality of Indo-Pacific king mackerel (*Scomberomorus guttatus*) steaks stored at 20 C. *Food control*, 23 (2), 564-570.
34. Kaltsa, O., Gatsi, I., Yanniotis, S., & Mandala, I. (2014). Influence of ultrasonication parameters on physical characteristics of olive oil model emulsions containing xanthan. *Food and bioprocess technology*, 7 (7), 2038-2049.

35. Kaur, B., Ariffin, F., Bhat, R., & Karim, A. A. (2012). Progress in starch modification in the last decade. *Food hydrocolloids*, 26 (2), 398-404
36. Karbstein, H., & Schubert, H. (1995). Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions. *Chemical engineering and processing: process intensification*, 34 (3), 205-211.
37. Kolb, G., Viardot, K., Wagner, G., & Ulrich, J. (2001). Evaluation of a new high pressure dispersion unit (HPN) for emulsification. *Chemical engineering & technology: industrial chemistry-plant equipment-process engineering-biotechnology*, 24 (3), 293-296.
38. Leal-Castañeda, E. J., García-Tejeda, Y., Hernández-Sánchez, H., Alamilla-Beltrán, L., Téllez-Medina, D. I., Calderón-Domínguez, G., & Gutiérrez-López, G. F. (2018). Pickering emulsions stabilized with native and lauroylated amaranth starch. *Food hydrocolloids*, 80, 177-185.
39. Lim, T. K. (2015). Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. *Modified stems, roots, bulbs*, 9, 96-102.
40. Liu, Z., Li, Y., Cui, F., Ping, L., Song, J., Ravee, Y., & Wang, Y. (2008). Production of octenyl succinic anhydride-modified waxy corn starch and its characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (23), 11499-11506.
41. Lieberman, H. A., Rieger, M. M., & Banker, G. S. (1996). Pharmaceutical dosage forms: Disperse systems volume 2. New York: Marcel Dekker.
42. Nilsson, L., & Bergenståhl, B. (2007). Adsorption of hydrophobically modified anionic starch at oppositely charged oil/water interfaces. *Journal of colloid and interface science*, 308 (2), 508-513.
43. McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8 (6), 1719-1729.

44. McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
45. Marku, D., Wahlgren, M., Rayner, M., Sjöö, M., & Tingren, A. (2012). Characterization of starch Pickering emulsions for potential applications in topical formulations. *International journal of pharmaceutics*, 428 (1-2), 1-7.
46. Márquez, R. Obtención de emulsiones parentales mediante el método de transición de fases. Tesis de ingeniería. Universidad de los andes. 2005.
47. Marie, P., Perrier-Cornet, J. M., & Gervais, P. (2002). Influence of major parameters in emulsification mechanisms using a high-pressure jet. *Journal of food engineering*, 53 (1), 43-51.
48. Miao, M., Li, R., Jiang, B., Cui, S. W., Zhang, T., & Jin, Z. (2014). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic esters of sugary maize soluble starch and waxy maize starch. *Food chemistry*, 151, 154-160.
49. Matos, M., Marefati, A., Gutiérrez, G., Wahlgren, M., & Rayner, M. (2016). Comparative emulsifying properties of octenyl succinic anhydride (OSA)-modified starch: Granular form vs dissolved state. *Plos one*, 11 (8), e0160140.
50. Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the Turbiscan MA 1000. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*, 152 (1-2), 111-123.
51. Marefati, A., Bertrand, M., Sjöö, M., Dejmek, P., & Rayner, M. (2017). Storage and digestion stability of encapsulated curcumin in emulsions based on starch granule Pickering stabilization. *Food hydrocolloids*, 63, 309-320.

52. Njintang, Y. N., Scher, J., & Mbofung, C. M. F. (2008). Physicochemical, thermal properties and microstructure of six varieties of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) flours and starches. *Journal of food engineering*, *86* (2), 294-305.
53. Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M. H., Niakosari, M., Yousefi, G. H., & Golmakani, M. T. (2016). Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*, *506*, 821-832.
54. Nejadmansouri, M., Hosseini, S. M. H., Niakosari, M., Yousefi, G. H., & Golmakani, M. T. (2016). Physicochemical properties and storage stability of ultrasound-mediated WPI-stabilized fish oil nanoemulsions. *Food hydrocolloids*, *61*, 801-811.
55. Ozogul, Y., Yuvka, İ., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A. R., Öz, M., & Ozogul, F. (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT- Food science and technology*, *75*, 677-684
56. Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current opinion in food science*, *7*, 1-6
57. Panaras, G., Moatsou, G., Yanniotis, S., & Mandala, I. (2011). The influence of functional properties of different whey protein concentrates on the rheological and emulsification capacity of blends with xanthan gum. *Carbohydrate polymers*, *86* (2), 433-440.
58. Pan, L. G., Tomás, M. C., & Añón, M. C. (2004). Oil-in-water emulsions formulated with sunflower lecithins: vesicle formation and stability. *Journal of the american oil chemists' society*, *81*(3), 241-244.

59. Pérez, E., Schultz, F. S., & de Delahaye, E. P. (2005). Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium* (tannia) and *Colocassia esculenta* (taro). *Carbohydrate polymers*, *60* (2), 139-145.
60. Palazolo GG, Sorgentini DA, Wagner JR (2005) Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food hydrocolloids*, *19*, 595–604.
61. Rajalakshmi, R., Mahesh, K., & Kumar, C. K. (2011). A critical review on nanoemulsions. *Int j innov drug discov*, *1*, 1-8.
62. Rayner, M., Marku, D., Eriksson, M., Sjöö, M., Dejmek, P., & Wahlgren, M. (2014). Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids and surfaces a: physicochemical and engineering aspects*, *458*, 48-62.
63. Rebolleda, S., Sanz, M. T., Benito, J. M., Beltrán, S., Escudero, I., & San-José, M. L. G. (2015). Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions. *Food chemistry*, *167*, 16-23.
64. Rodríguez-Miranda, J., Ruiz-López, I. I., Herman-Lara, E., Martínez-Sánchez, C. E., Delgado-Licon, E., & Vivar-Vera, M. A. (2011). Development of extruded snacks using taro (*Colocasia esculenta*) and nixtamalized maize (*Zea mays*) flour blends. *LWT-Food science and technology*, *44* (3), 673-680.
65. Rieger, M. M., & Banker, G. S. (Eds.). (1996). *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems* (Vol. 1). Marcel Dekker.
66. Rubison, Kenneth A. y Rubison Judith F. (2001). *Análisis instrumental*. Ed. Prentice Hall. ISBN: 84-205-2988-5.

67. Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food hydrocolloids*, *43*, 547-556.
68. Shakeel, F., & Ramadan, W. (2010). Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, *75* (1), 356-362.
69. Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food and bioprocess technology*, *5* (3), 854-867.
70. Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., & Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: a review. *Carbohydrate polymers*, *92* (1), 905-920.
71. Singh, J., Kaur, L., & McCarthy, O. J. (2007). Factors influencing the physicochemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications: a review. *Food hydrocolloids*, *21* (1), 1-22.
72. Song, X., He, G., Ruan, H., & Chen, Q. (2006). Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified early indica rice starch. *Starch-stärke*, *58* (2), 109-117.
73. Simsek, S., & El, S. N. (2012). Production of resistant starch from taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) corm and determination of its effects on health by in vitro methods. *Carbohydrate polymers*, *90* (3), 1204-1209.
74. Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in food science & technology*, *21* (7), 323-331.

75. Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J. T., & L'aloret, F. (2004). Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in colloid and interface science*, *108*, 145-149.
76. Sugumar, S., Singh, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2015). Nanoemulsion of orange oil with no nionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. *Springer*, 3-8.
77. Sun, R. C., & Tomkinson, J. (2002). Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydrate polymers*, *50* (3), 263-271.
78. Sandhu, K. S., Sharma, L., & Kaur, M. (2015). Effect of granule size on physicochemical, morphological, thermal and pasting properties of native and 2-octenyl-1-ylsuccinylated potato starch prepared by dry heating under different pH conditions. *LWT-Food science and technology*, *61* (1), 224-230.
79. Torres-Becerril, M., Carmona-García, R., Aguirre-Cruz, A. (2015). Obtención y caracterización estructural y funcional de almidón acetilado de malanga (*Colocasia esculenta Schott*). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, *6*, 905-912.
80. Tingren, A., Rayner, M., Sjöö, M., & Dejmek, P. (2011). Starch particles for food based Pickering emulsions. *Procedia food science*, *1*, 95-103.
81. Thomas, D. J. & Atwell, W. A. 1999. Starch. Eagan press handbook Series. *New York*. 1- 94.
82. Torres Rapelo, A., Montero Castillo, P., & Duran Lengua, M. (2013). Propiedades fisicoquímicas, morfológicas y funcionales del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*). *Revista lasallista de investigación*, *10* (2).

83. Tcholakova, S., Denkov, N. D., Ivanov, I. B., & Campbell, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in colloid and interface science*, *123*, 259-293.
84. Trujillo-Cayado, L. A., Alfaro, M. C., García, M. C., & Muñoz, J. (2017). Comparison of homogenization processes for the development of green O/W emulsions formulated with N, N-dimethyldecanamide. *Journal of industrial and engineering chemistry*, *46*, 54-61.
85. Wang, Y. J., & Wang, L. (2002). Characterization of acetylated waxy maize starches prepared under catalysis by different alkali and alkaline-earth hydroxides. *Starch-stärke*, *54* (1), 25-30.
86. Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M., & McClements, J. (2009). Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In *Global issues in food science and technology*, 425-479).
87. Whitney, K., Reuhs, B. L., Martinez, M. O., & Simsek, S. (2016). Analysis of octenylsuccinate rice and tapioca starches: Distribution of octenyl succinic anhydride groups in starch granules. *Food chemistry*, *211*, 608-615.
88. Zhang, J., Bing, L., Reineccius, G. (2016). Comparison of modified starch and Quillaja saponins in the formation and stabilization of flavor nanoemulsions. *Food chemistry*, *192*, 53-59.
89. Zhang, B., Chen, L., Zhao, Y., Li, X. (2013). Structure and enzymatic resistivity of debranched high temperature-pressure treated high-amylose corn starch. *Journal of cereal science*, *57*, 348-355.
90. Zhao, X., Liu, F., Ma, C., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Effect of carrier oils on the physicochemical properties of orange oil beverage emulsions. *Food research international*, *74*, 260-268.

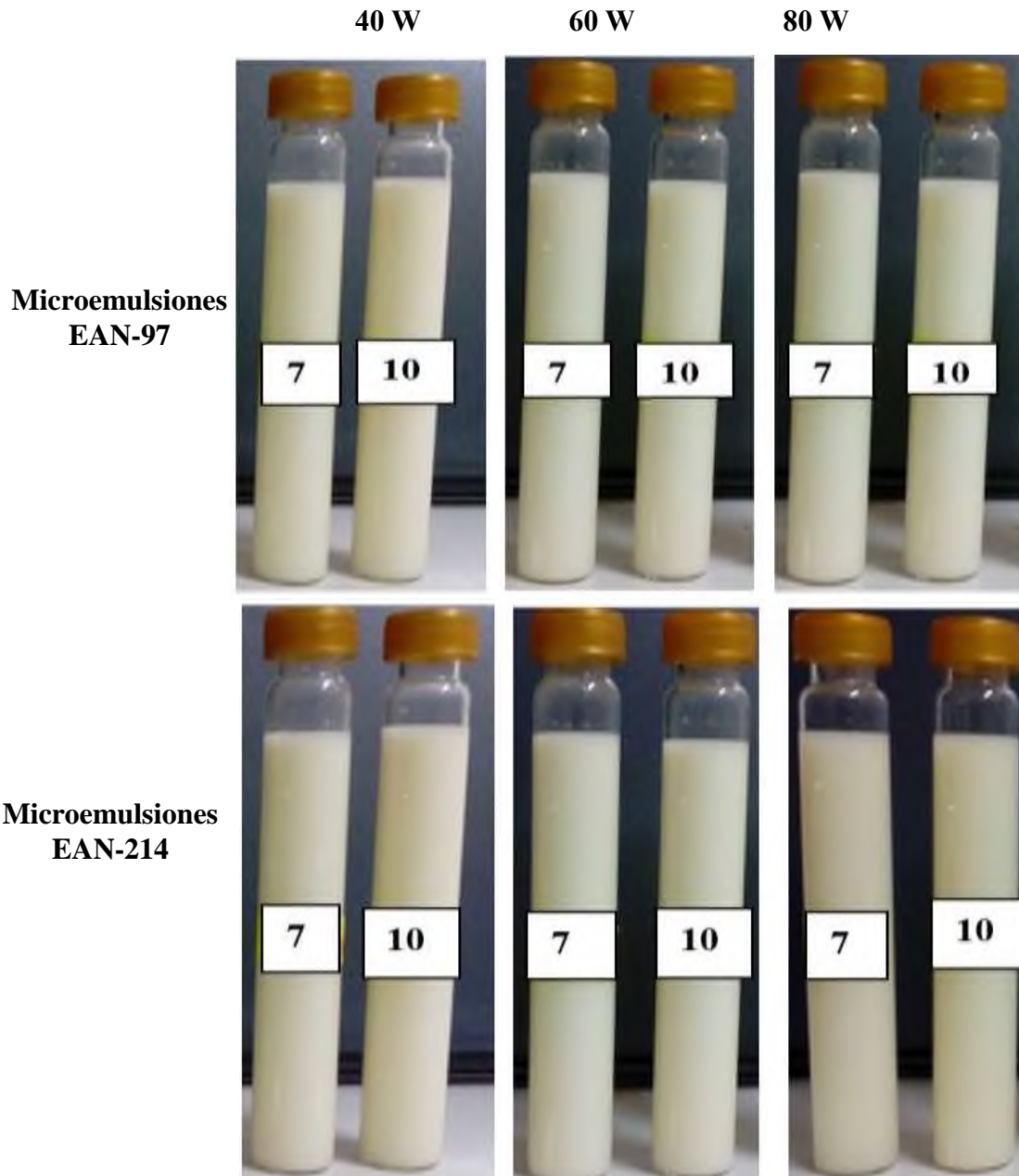
91. Zhu, J., Li, L., Chen, L., Y Li, X. (2013). Nano-structure of octenyl succinic anhydride modified starch micelle. *Food hydrocolloids*, 32, 1-8.

92. Zuluaga, R., Putaux, J. L., Cruz, J., Vélez, J., Mondragon, I., & Gañán, P. (2009). Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate polymers*, 76 (1), 51-59.

ANEXOS

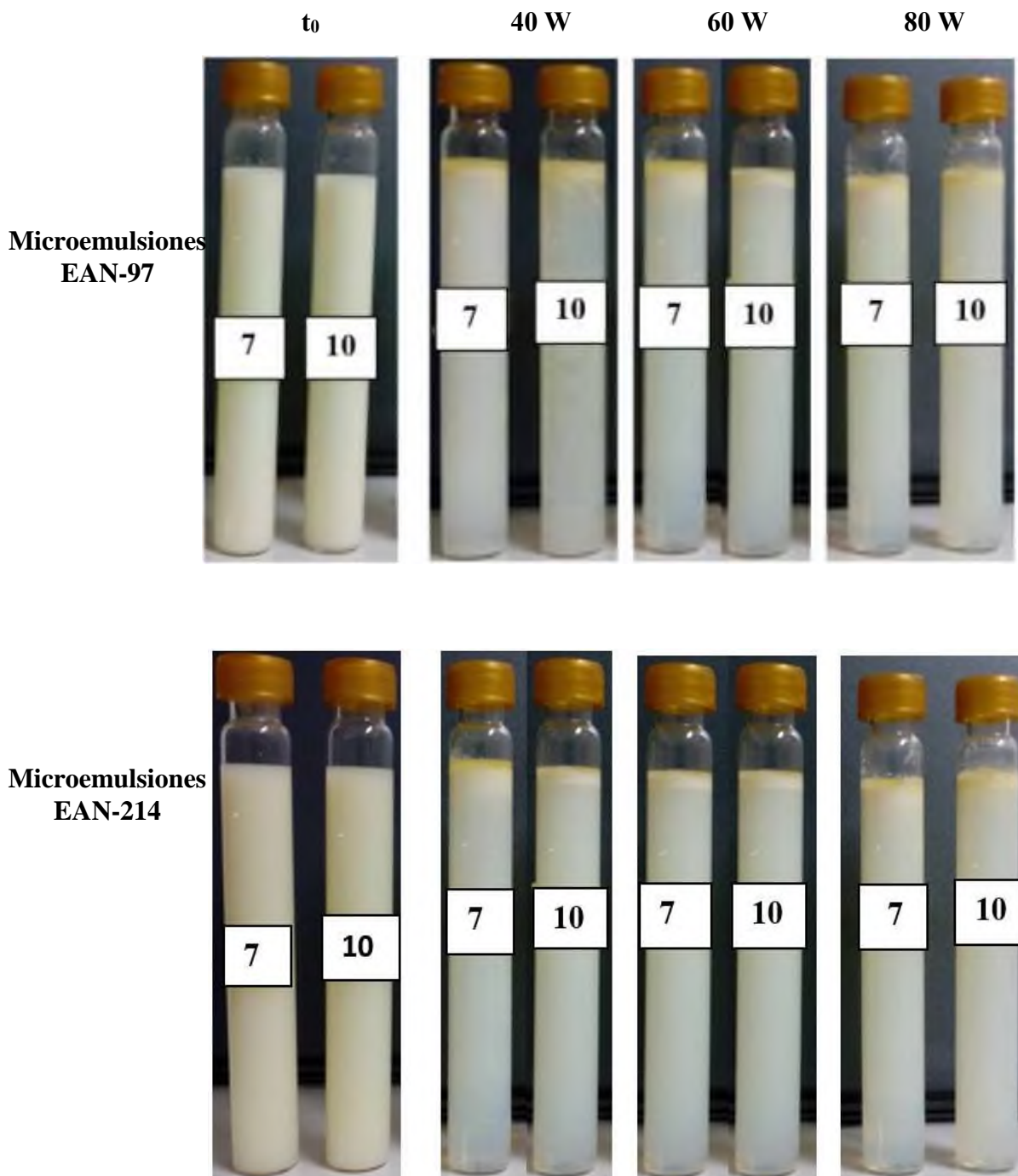
ANEXO I. Imágenes de las nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de AN (97 y 2014 μg), tiempos (7 y 10 min) y potencias de sonicación (40, 60 y 80 W) antes de su almacenamiento.

Potencias de sonicación (W)

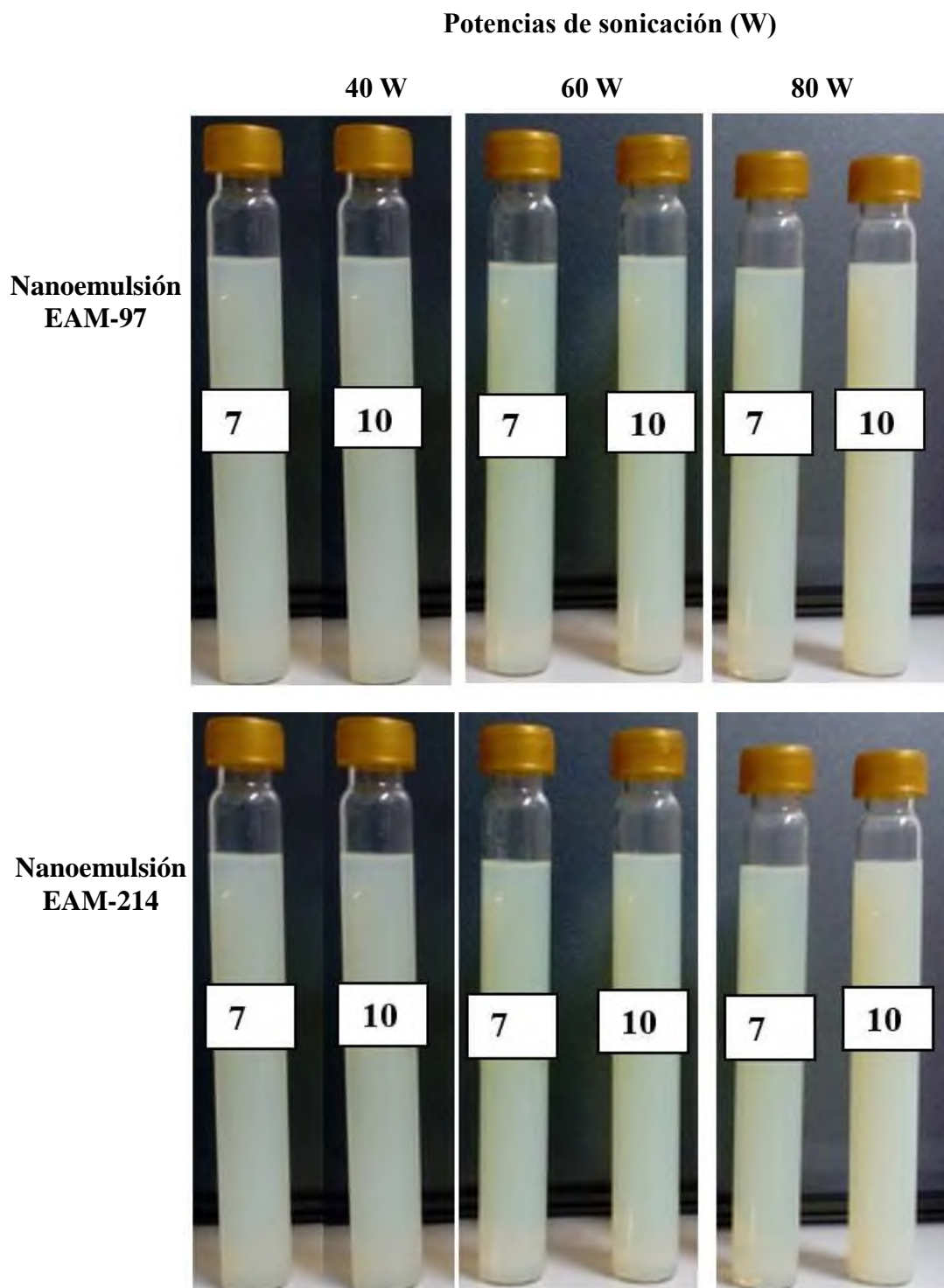


ANEXO II. Imágenes de las nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de AMN (97 y 2014 μg), tiempos (7 y 10 min) y potencias de sonicación (40, 60 y 80 W) después de 30 días de almacenamiento.

Potencias de sonicación (W)



ANEXO III. Imágenes de las nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de AM (97 y 2014 μg), tiempos (7 y 10 min) y potencias de sonicación (40, 60 y 80 W) antes de su almacenamiento.



ANEXO IV. Imágenes de las nanoemulsiones preparadas con diferentes concentraciones de AN (97 y 2014 μg), tiempos (7 y 10 min) y potencias de sonicación (40, 60 y 80 W) despues de 30 días de almacenamiento.

Potencias de sonicación (W)

