



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**MICROEMULSIFICACIÓN COMO
TÉCNICA DE SOLUBILIZACIÓN DE
ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ANDREA SAORI MAJLUF TREJO



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS

VOCAL: PROFESOR: EFRÉN HERNÁNDEZ BALTAZAR

SECRETARIO: PROFESOR: ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

1ER. SUPLENTE: PROFESOR: FRANCISCO GARCÍA OLIVARES

2° SUPLENTE: PROFESOR: JOAQUÍN GONZÁLEZ ROBLEDO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA. EDIFICIO A. FACULTAD DE QUÍMICA**

ASESOR DEL TEMA: ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: ANDREA SAORI MAJLUF TREJO

(nombre y firma (s))

Agradecimientos

A Dios, por permitirme llegar hasta este día, guiándome en el camino de la vida, siendo la luz que ilumina mis ojos para dar un paso adelante.

A mis padres, que regalándome la vida, me han dado además lo mejor de ella: amor, valores, confianza, apoyo y educación. Por sus consejos, sus regaños, su amistad, sus sacrificios y esfuerzos, para que yo llegara hasta aquí el día de hoy. Soy lo que soy gracias a ellos.

A mi hermano, por su paciencia, su amistad, su compañía en los desvelos y por compartir tantos momentos importantes.

A mis abuelos, por sus sabios consejos y su gran ejemplo de superación.

A mis padrinos Víctor (Q.E.P.D) y Mónica, por consentirme, cuidarme, y brindarme siempre su valioso apoyo.

A Antonio, por brindarme su tiempo, amor, confianza, apoyo y por crecer a mi lado.

A mis primos y mis tíos, especialmente a mi tío Pablo por su apoyo moral.

Al M en C Enrique Amador, por confiar en mí, por sus enseñanzas, paciencia, amistad y apoyo brindados durante la realización de esta tesis.

A la M en C Socorro Alpízar, por compartir su experiencia, por sus consejos que me han hecho crecer profesionalmente, por todo el apoyo, la confianza y amistad.

Al Dr. Efrén Hernández y la M en C Verónica Zamora, por compartir su conocimiento, por sus consejos y amistad.

A Sandra Tecocuatzi (Nutrer) e Ileana Bautista (BASF) por proporcionarme materias primas necesarias para la realización de esta tesis.

A Edna Álvarez (Malvern) por permitirme utilizar el Zetasizer Nano.

Por último, y no menos importantes a mis compañeros y amigos en la carrera: Karla, Luisa, Donají, Verónica, Erika, Mónica y Alejandro, por tanto tiempo compartido en teorías y laboratorios.

"Desde el principio, la curiosidad y el conocimiento rechazan las cosas simples y aisladas; gustan de encontrar medidas y relaciones de situaciones complejas, e investigan hasta el placer de transgredirlas y de cambiarlas de significado",

Loris Malaguzzi.

Índice

Contenido	Página
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	
2.1 Lípidos Alimentarios	
2.1.1 Características de los lípidos	2
2.1.2 Nomenclatura	4
2.1.3 Ácidos Grasos Omega 3	7
2.2 Efectos Benéficos de los Omegas en el Ser Humano	
2.2.1 En la enfermedad cardiovascular	11
2.2.2 En los procesos inflamatorios	13
2.2.3 En la gestación y lactancia	15
2.2.4 En enfermedades de la piel	16
2.2.5 Efectos anticancerígenos	17
2.2.6 En la nutrición clínica	19
2.3 Microemulsiones	
2.3.1 Definición y características	20
2.3.2 Agentes emulsionantes	23
2.4 Aceite de Castor Hidrogenado Polietilenglicolizado	27
3. Objetivos	30
4. Desarrollo Experimental	
4.1 Materia prima	31
4.2 Materiales y equipos	
4.2.1 Materiales	31
4.2.2 Equipos	32
4.3 Diseño Experimental	33
4.4 Metodología	

4.4.1	Preparación de solución reguladora de pH	37
4.4.2	Preparación de solución stock de parabenos	37
4.4.3	Realización de los ensayos	37
4.4.4	Medición de pH	38
4.4.5	Determinación de tamaño de partícula	39
4.4.6	Cuantificación de transparencia óptica	39
5.	Resultados y Análisis	
5.1	Descripción física del sistema	40
5.2	Transparencia Óptica	48
5.3	Tamaño de glóbulo	51
5.4	Medición de pH	53
6.	Conclusiones	60
7.	Apéndices	
7.1	Apéndice 1: Lista de abreviaturas	61
7.2	Apéndice 2: Certificado analítico del aceite de pescado	62
7.3	Apéndice 3: Tablas de ANOVA	64
7.4	Apéndice 4: Gráficos de distribución de tamaño de glóbulo	68
8.	Bibliografía	72

1. Introducción

Antes de que los ácidos grasos esenciales fueran descubiertos, y aun antes de que sus funciones hubieran dejado de ser un misterio, en todas partes del mundo había tradiciones que tomaban en cuenta el efecto benéfico sobre la salud de lo que hoy llamamos “ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga”. Bien es sabido que el emperador Moctezuma comía pescado fresco en su palacio gracias a un relevo de veloces corredores. Hace mucho que las madres de familia creen en las virtudes del aceite de hígado de bacalao. Sin embargo, fue a partir de la década de los 80’s donde se multiplicaron los trabajos destinados a elucidar las funciones específicas de los ácidos grasos esenciales.

Los ácidos grasos *omega* 3 aportan muchos beneficios a la salud humana, ya que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer y enfermedades inmunológicas, y son de vital importancia en el desarrollo del cerebro y la retina. Los principales alimentos en los que se puede encontrar una mayor cantidad de ácidos grasos Omega 3 (EPA y DHA) son los pescados, moluscos, crustáceos y algas.

Este trabajo aborda la formación de microemulsiones, como una técnica para solubilizar ácidos grasos en un vehículo acuoso. Una microemulsión se puede definir como una mezcla isotrópica, traslúcida, y estable de una fase acuosa, una oleosa y un surfactante.

Las ventajas de solubilizar a los Ácidos Grasos Omegas mediante la formación de una microemulsión son: 1) adicionar al sistema sustancias solubles en la fase acuosa, 2) permitir la incorporación de otros compuestos insolubles en agua, 3) mejora de propiedades organolépticas (en comparación a las emulsiones), 4) proporcionan un aumento de la biodisponibilidad.

Para poder formar las microemulsiones, se hace uso de diagramas ternarios, los cuáles son de gran importancia y utilidad cuando se emplean tres factores en concentraciones diferentes, ya que permiten la localización de las zonas y de algunas de sus características donde se encontrarán las microemulsiones.

2. Marco Teórico

2.1 Lípidos alimentarios.

2.1.1 Características de los lípidos

La palabra lípido viene de *lipos*, que significa “grasa” en griego. Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Los Ácidos Grasos son un tipo de lípidos que se caracterizan por tener en su estructura una “cabeza” hidrófila polar, conectada a una “cola” hidrocarbonada hidrófoba apolar. Las moléculas lipídicas en un medio acuoso tienden a agruparse formando una asociación no covalente: tanto por la asociación de las colas apolares que estimulan la entropía, como por las fuerzas de Van Der Waals entre las zonas hidrocarbonadas de las moléculas (Mathews, 2002)

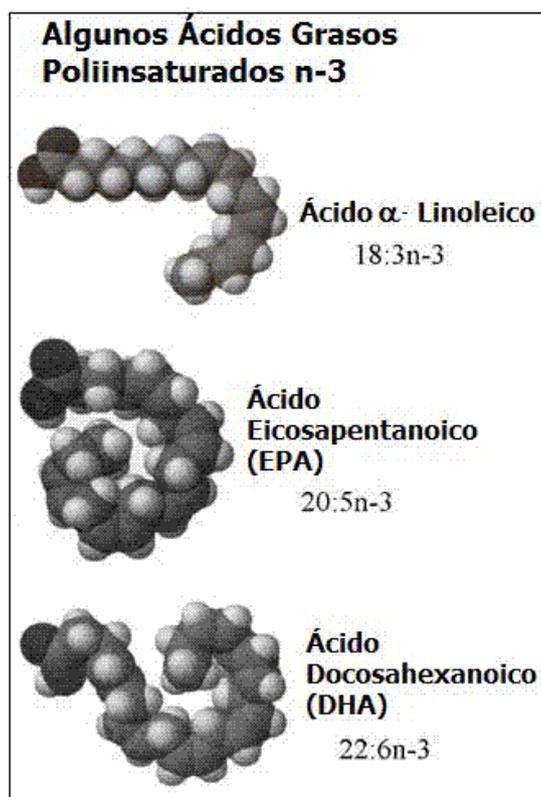


Figura 1. Modelo Molecular de Algunos Ácidos Grasos Poliinsaturados n-3 (tomado de www.chemistrydaily.com)

Los ácidos grasos AG, son ácidos carboxílicos con cadenas largas de hidrocarburos, contienen un número par de átomos de carbono y no son ramificados porque se sintetizan a partir de acetato, compuesto de dos átomos de carbono (Mathews, 2002). Ver figura 1. De acuerdo con Mataix (2004), los ácidos grasos de interés biológico, que contienen entre 4 y 26 átomos de carbono, son compuestos muy insolubles en agua y ricos en energía metabólica. Se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo a la longitud de su cadena:

- a) Ácidos grasos de cadena corta (4- 6 átomos de carbono)
- b) Ácidos grasos de cadena media (8- 12 átomos de carbono)
- c) Ácidos grasos de cadena larga (14- 18 átomos de carbono)
- d) Ácidos grasos de cadena muy larga (20 o más)

Los ácidos grasos pueden ser saturados, careciendo de dobles enlaces carbono- carbono; o ser insaturados y tener dobles enlaces carbono- carbono, llamándose ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Los puntos de fusión de los ácidos grasos saturados aumentan con el incremento de la masa molecular porque hay más interacciones de Van Der Waals entre las moléculas; mientras que para los ácidos grasos insaturados el incremento es en menor grado. (Mathews, 2002)

Los enlaces dobles en los ácidos grasos naturales tienen la configuración *cis*, lo que produce una flexión en la molécula, lo que evita que se empaquen tanto como los ácidos grasos saturados (Mathews, 2002). Los ácidos grasos con dobles enlaces de tipo *trans* son rectos, como los AG saturados, son capaces de producir la misma cantidad de energía, pero no tienen las mismas propiedades biológicas.

Estos ácidos tienden a acumularse en los tejidos, como el músculo cardiaco, promoviendo alteraciones tisulares y así mismo está demostrado su efecto hipercolesterolemiantes, es decir, aumentan los niveles de colesterol en la sangre. (Mataix, 2004)

2.1.2 Nomenclatura

Los ácidos grasos naturales más frecuentes suelen tener un nombre común, además del nombre sistemático. Cuando existen dobles enlaces, la nomenclatura sistemática tradicional indica el carácter *cis* o *trans* y su posición contando a partir del grupo carboxílico. Atendiendo a razones fisiológicas, resulta mucho más útil y simple indicar exclusivamente el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la posición del primero de ellos contando a partir del carbono terminal no carboxílico, añadiendo ***omega*** o ***n***. Esta forma de nombrar a los ácidos grasos insaturados comenzando por el extremo metílico y no por el carboxílico, resulta más fisiológica, de tal modo que aquellos con una misma numeración ***omega*** están relacionados metabólicamente.

En las siguientes tablas, se muestran los ácidos grasos más frecuentes en alimentos de consumo habitual, divididos de acuerdo a las saturaciones que presentan.

Marco Teórico

Tabla 1. Ácidos grasos saturados y monoinsaturados más frecuentes en alimentos de consumo habitual

	Número de Carbonos	Número de Dobles Enlaces	Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula	Punto de Fusión (°C)
Saturado	4	0	Butírico	Butanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-5.9
	6	0	Caproico	Hexanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	-3.4
	8	0	Caprílico	Octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	16.7
	10	0	Cáprico	Decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	31.6
	12	0	Láurico	Dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44.2
	14	0	Mirístico	Tetradecánico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	54.4
	16	0	Palmitico	Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63
	18	0	Estearico	Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69.4
	20	0	Araquídico	Elcosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76
	22	0	Behénico	Docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	84.2
	24	0	Lignocérico	Tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	85.86
Monoinsaturados	16	1	Palmitoleico	9cis-Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-0.5
	18	1	Oleico	9cis-Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	13
	18	1	Elaídico	9trans-Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	67-69
	20	1	Gadoleico	9cis-Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	74-76
	20	1	Gondoico	11cis-Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	74-76
	22	1	Erúico	13cis-Docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	80-82

Tabla 2. Ácidos grasos poliinsaturados más frecuentes en alimentos de consumo habitual

		Número de Carbonos	Número de Dobles Enlaces	Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula	PF (°C)
Poliinsaturados	ω-9	20	3		3c, 6c, 9c Eicosatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	
	ω-6	18	2	Linoleico	9cis, 12cis Octadecaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	-5
		18	3	γ-Linolénico	6c, 9c, 12c Octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	-11
		20	3	Dinomo- γ-linolénico	8c, 11c, 14c Eicosatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	
		20	4	Araquidónico	5c, 8c, 11c, 14c Eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-49
		22	4	Artrénico	7c, 10c, 13c, 16c Docosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	
		22	5	Osmond	4c, 7c, 10c, 13c, 16c Docosapentaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	
	ω-3	18	3	α-Linolénico	9c, 12c, 15c Octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	
		18	4	Estearidónico	6c, 9c, 12c, 15c Octadecatetraenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_4(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	
		20	5	Timnodónico	5c, 8c, 11c, 14c, 17c Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_5(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-54
		22	5	Clupanodónico	7c, 10c, 13c, 16c, 19c Docosapentaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_5(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	
		22	6	Cervónico	4c, 7c, 10, 13c, 16c, 19c Docosahexaenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_6(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-56

2.1.3 Ácidos Grasos *omega* 3.

Como se mencionó anteriormente, ***omega*** es un término que se usa para indicar la posición del primer doble enlace a partir del extremo metilo en un ácido graso insaturado. Los ácidos grasos omega 3 reportados son: octadecatrienoico (18 C), octadecetetraenoico (18 C), eicosapentaenoico (20 C), docosapentaenoico (22 C). Los ácidos grasos más importantes desde el punto de vista alimentario son los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) que están presentes en los animales acuáticos. Es interesante destacar que el grado de insaturación y la longitud aumenta conforme lo hace la salinidad y la frialdad del agua, lo que permite la vida de los animales que lo contienen pues no se modifican sus grasas corporales a la temperatura del medio acuático en que viven. (Mataix 2004)

Las células humanas no pueden sintetizar al ácido alfa-linoleico, precursor del EPA y del DHA, sin embargo, pueden metabolizarlo mediante desaturación y elongación, lo que ocurre principalmente en el hígado. La figura 2 resume el metabolismo de los AG Omega 3 a EPA y DHA (López, 2006):

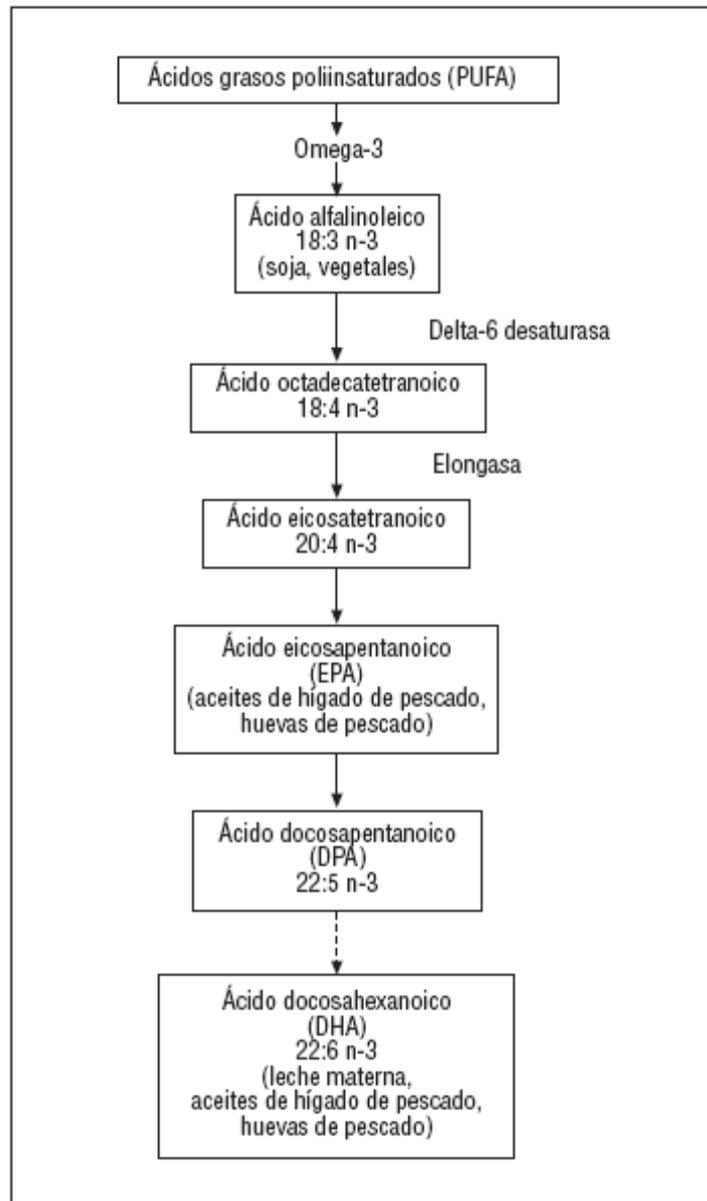


Figura 2. Metabolismo de los Ácidos Grasos n-3 (López 2006)

Los ácidos grasos esenciales son llamados así, debido a que nuestro organismo no los sintetiza, sin embargo, los necesita imperiosamente. La alimentación debe aportar obligatoriamente estas moléculas, por lo tanto, se produce una dependencia de la dieta para obtener estos nutrientes. (Odent, 1990)

De acuerdo al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, la ingesión diaria recomendada (IDR) de energía para la población mexicana se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. IDR para la población mexicana (2001)

EDAD (años)	kJ/kg		kcal/kg	
0 a 0.5	450		108	
0.5 a 0.9	410		98	
1.0 a 2.9	418		100	
3.0 a 6.9	368		88	
7.0 a 9.9	301		72	
	M	F	M	F
10.0 a 11.9	272	222	65	53
12.0 a 13.9	230	196	55	47
14.0 a 17.9	209	188	50	45
18 a 64.9	188	167	45	40
65.0 y +	142	142	34	34
Embarazo	+ 1254		+300	
Lactancia	+2090		+500	

M= sexo masculino; F= sexo femenino

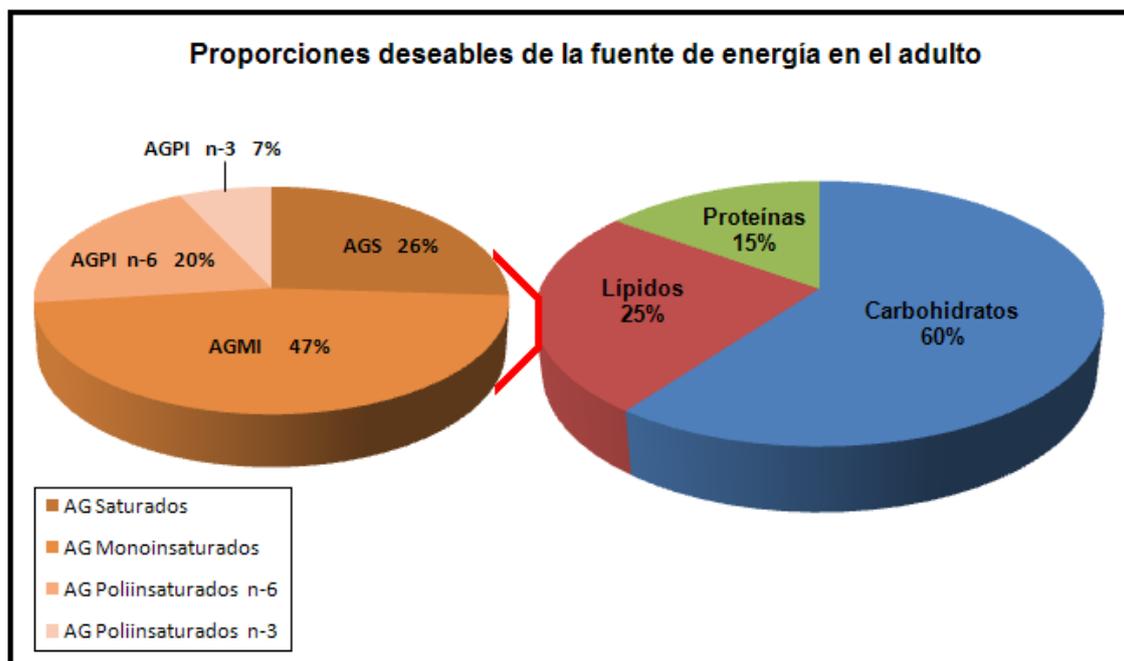
Se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) La edad está en años cumplidos. Por ejemplo, 7.0 a 9.9 significa desde que se cumplen siete años hasta un día antes de cumplir diez y 0.5 a 0.9 significa desde que se cumplen 6 meses (medio año) hasta un día antes de cumplir el año.
- 2) Las IDR de energía se expresan en kJ (kilojoule) y en kcal (kilocaloría) por kg. de peso teórico para la edad, independientemente de cual es el peso real.

- 3) Las proporciones deseables de las fuentes de energía son: a) En el adulto Hidratos de carbono 60 a 63% (sacarosa no más de 10%), Lípidos 25% y proteínas 12 a 15%, b) En infantes y niños: Hidratos de carbono 55% (hasta 15% de sacarosa), lípidos 30% y proteínas 15%.
- 4) Lípidos: La composición deseable por cada 100g de ácidos grasos es: 26% AG Saturados, 47% AG Monoinsaturados, 20% AG Poliinsaturados n-6 y 7% AG Poliinsaturados n-3 (si es posible, la mitad de los AG poliinsaturados n-3 debe provenir de alimentos marinos).

De acuerdo a la FAO (Food and Agricultural Organization), un gramo de lípidos, aporta 9 kilocalorías

Figura 3. Proporciones deseables de las fuentes de energía en el adulto



2.2 Efectos Benéficos de los Omegas en el ser humano

2.2.1 En la enfermedad cardiovascular.

Las grasas constituyen uno de los nutrientes más importantes de nuestra alimentación ya que contribuyen a satisfacer las demandas de energía y se incorporan a los tejidos y órganos, determinando la composición y funcionalidad de las membranas celulares. (Mataix 2004).

De acuerdo al Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI), las principales causas de muerte en personas mayores de 30 años son: enfermedades del corazón, tumores malignos y diabetes mellitus. (INEGI, 2009)

En 1980, Dyerberf estableció una nueva dimensión entre la relación de los ácidos grasos omega 3 y la enfermedad cardiovascular, ya que se determinó una nueva relación respecto a la grasa de la dieta y la mortalidad por enfermedad coronaria, al describir que la mortalidad por infarto de miocardio en los esquimales de Groelandia, ajustada por la edad, era significativamente menor a la de los daneses, a pesar del alto contenido en grasa y colesterol y bajo contenido de carbohidratos en su dieta (Bang 1980).

En las últimas décadas, se han investigado el efecto de la dieta enriquecida en ácidos grasos AGPI n-3 de origen marino sobre la incidencia de eventos coronarios. En un estudio denominado DART (Diet and Reinfarction Trial), en pacientes con infarto de miocardio reciente, se administró grasa de pescado 2 veces por semana y se obtuvo un 29% de reducción en la mortalidad total en comparación con la del grupo control (Burr 1989).

Algunos estudios mostraron que la ingesta en la dieta de AGPI n-3 estaba asociada con un menor riesgo de Insuficiencia Cardíaca (IC), pero ningún estudio había examinado la asociación entre ácidos grasos e IC.

En el 2008 Kazumasa y colaboradores reportaron un estudio donde incluyeron a 3592 pacientes de entre 45 a 64 años con riesgo de aterosclerosis, es decir, endurecimiento de los vasos sanguíneos debido a la acumulación local de fibras y lípidos. Se les dio un seguimiento de 14.3 años (1989- 2003) donde se identificaron 197 casos de IC tras ajustar por edad, el aumento de ácidos grasos saturados, en especial el ácido mirístico se asoció con el incidente de alta frecuencia en hombres y mujeres. El ácido araquidónico y los AGPI n-3, especialmente el ácido docosahexanoico, fueron asociados con una disminución de IC en mujeres pero no en hombres. El ácido eicosapentanoico no fue asociado con la incidencia de Insuficiencia Cardiaca. Se concluyó que tanto en hombres como en mujeres, los niveles altos de ácidos grasos saturados, pueden incrementar el riesgo de IC, mientras que en mujeres, el ácido araquidónico y los AGPI omega-3 disminuyen el riesgo de IC. (Kazumasa, 2008)

Los ácidos grasos n-3, particularmente los de cadena larga, pueden afectar a numerosos factores implicados en el desarrollo de la aterosclerosis, lo que inicialmente podría influir en una progresión más lenta de la enfermedad. Se ha descrito que los ácidos grasos omega-3 reducen las concentraciones de quimioattractantes, factores de crecimiento y producción de moléculas de adhesión, lo que puede favorecer una reducción en la migración de leucocitos y células de músculo liso vascular en la íntima de la pared vascular y retrasar el proceso aterosclerótico. Los ácidos grasos omega -3 también tienen un efecto hipotensor que, aunque pequeño, ocurre tanto en pacientes normotensos como hipertensos. Tres mecanismos principales parecen estar involucrados en el efecto protector cardiovascular de los ácidos grasos omega -3: su efecto antiinflamatorio, su efecto antitrombótico y su acción antiarrítmica. (López, 2006)

2.2.2 Beneficios en los procesos inflamatorios

La inflamación consiste en la agregación de leucocitos y la extravasación de varias proteínas plasmáticas en un sitio de infección, y la activación de leucocitos y proteínas para eliminar el agente infeccioso. (Abbas, 2007)

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo último es librar al organismo de la causa de la lesión celular iniciada por microorganismos, toxinas, alérgenos, etc. Sin embargo, los procesos inflamatorios y de reparación pueden ser perjudiciales cuando se vuelven crónicos. (Mataix, 2002).

El Ácido Eicosapentanoico (EPA) puede inhibir el metabolismo del Ácido Araquidónico de forma competitiva y suprimir o limitar la producción de eicosanoides proinflamatorios. El EPA es un sustrato potencial para la síntesis de un proagregante plaquetario muy débil (TXA₃), vía cicloxigenasa, sin embargo, esta enzima es muy poco eficiente cuando el EPA es utilizado como sustrato. Sin embargo, la lipooxigenasa, puede utilizar al EPA como sustrato para la formación de LBT₅, un compuesto con escasa actividad proinflamatoria. Así, si se aumenta la ingesta de ácidos grasos *omega* -3, se puede desviar el equilibrio de los eicosanoides hacia la formación de compuestos con menor actividad inflamatoria.

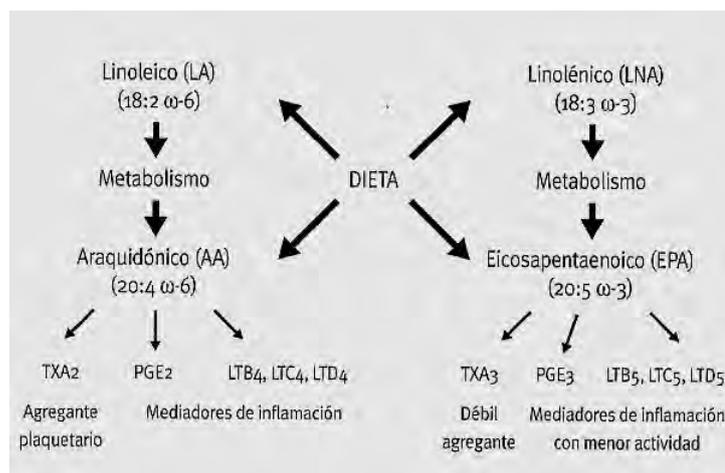


Figura 4. Interacciones de los ácidos grasos omega 3 con el ácido araquidónico en la formación de eicosanoides.

Se han realizado algunos estudios en pacientes que presentan la enfermedad de Crohn. Ésta es una enfermedad inflamatoria granulomatosa crónica que puede afectar a cualquier zona del tubo digestivo aunque preferentemente se localiza en la zona ileocecal. Se caracteriza por ser una enfermedad transmural, es decir, que afecta todas las capas intestinales, desde la capa más interna (mucosa) hasta la capa superficial (serosa), afectando al intestino de forma discontinua, con segmentos sanos alternados con zonas anormales. Los síntomas más frecuente son el dolor abdominal y la diarrea; el curso clínico se caracteriza por la alternancia de fases recidiva y de remisión (Sopena 2005)

A finales de la década pasada, Lorenz-Meyer et. al. publicaron un artículo donde muestran un estudio aleatorizado y controlado mediante placebo en el que 204 pacientes con enfermedad de Crohn que se recuperaban de un relapso se distribuían aleatoriamente a recibir 5.1g/día de ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3 o un placebo, durante 1 año. En el grupo tratado con omega-3 la cantidad de prednisolona que fue necesario utilizar para el control de la enfermedad, disminuyó significativamente. (Lorenz- Meyer, 1996)

En otro experimento similar, Belluzzi y colaboradores llevaron a cabo un estudio controlado, doble ciego en 78 pacientes con enfermedad de Crohn, utilizando un suplemento de 2.7g/día de ácidos grasos omega 3, durante un año. El número de relapsos (reincidencias) disminuyó significativamente y el número de pacientes que permanecía en remisión aumentó en el grupo tratado con el suplemento de ácidos grasos omega 3. (Belluzi 2000)

2.2.3 Efectos benéficos en la gestación y lactancia.

Los periodos de gestación e infancia están asociados a un rápido crecimiento y desarrollo tisular, por lo tanto, las necesidades de ácidos grasos esenciales de la mujer en gestación y del feto, así como de los neonatos, son muy elevadas. En el tercer trimestre de la gestación, los requerimientos fetales de DHA son elevados debido al crecimiento de tejido nervioso. El feto obtiene los ácidos grasos esenciales de la madre mediante la transferencia placentaria. (Mataix, 2004)

Durante la gestación, la madre adapta su metabolismo a las necesidades del feto; en el primer periodo, la concentración de fosfolípidos plasmáticos aumentan en más de 50%, como consecuencia de la hiperlipidemia asociada al este estado de gestación, la concentración de DHA aumenta hasta en un 52%. Además, bajas concentraciones en plasma de DHA están relacionadas con un peso inferior de la placenta y lo que se relaciona con una gestación más corta. (Gil 2002)

Durante el último trimestre de gestación, el feto capta 50- 60 mg/ día de AGPI n-3 correspondientes a un 4-5% de la energía requerida. Para que exista un equilibrio adecuado, la madre gestante debería ingerir alrededor de 100 mg/día de estos ácidos grasos. Una vez considerada la competencia metabólica entre AGPI n-6 y n-3, Gil y colaboradores sugieren que una mujer gestante debiera de consumir 2.7g/día de aceite de pescado desde la semana treinta, traduciéndose esto en un aumento significativo de los AGPI n-3 en los fosfolípidos del cordón umbilical y en una disminución de los ácidos grasos n-6. (Gil 2002)

Los recién nacidos alimentados con leche materna ingieren niveles más elevados de DHA en comparación con los alimentados con fórmulas lácteas (Innis 1996)

2.2.4 Efectos benéficos en enfermedades de la piel.

Anteriormente, se mencionó que los precursores de los eicosanoides son derivados de AGPI que proceden de la dieta, es razonable pensar que la síntesis de mediadores de la inflamación *in vivo* a partir de ácido araquidónico puede manipularse modificando la ingesta de AGPI. Bittinger y colaboradores (1988), estudiaron la suplementación de la dieta con aceite de pescado a pacientes con psoriasis (enfermedad inflamatoria crónica de la piel), comprobando que alivia las lesiones cutáneas de forma moderada a excelente. Esta aproximación facilita una alternativa de tratamiento de la psoriasis con efectos colaterales despreciables.

Los efectos de dicha suplementación *in vivo* son compatibles con los resultados obtenidos en los fosfolípidos en la membrana de la epidermis en los sujetos que ingieren aceite de pescado en los que se observa un aumento del EPA y del DHA, así como de sus metabolitos. Que atenúan la biosíntesis de eicosanoides proinflamatorios en las células mononucleares infiltradas.

2.2.5 Efectos Anticancerígenos.

Las causas por las que una célula normal se transforma y pierde el control de su crecimiento dependen de diversos factores de riesgo que, si persisten en el tiempo y son de suficiente intensidad, aumentan la probabilidad del desarrollo de un cáncer. La figura 5, muestra los factores de riesgo en el desarrollo del cáncer:

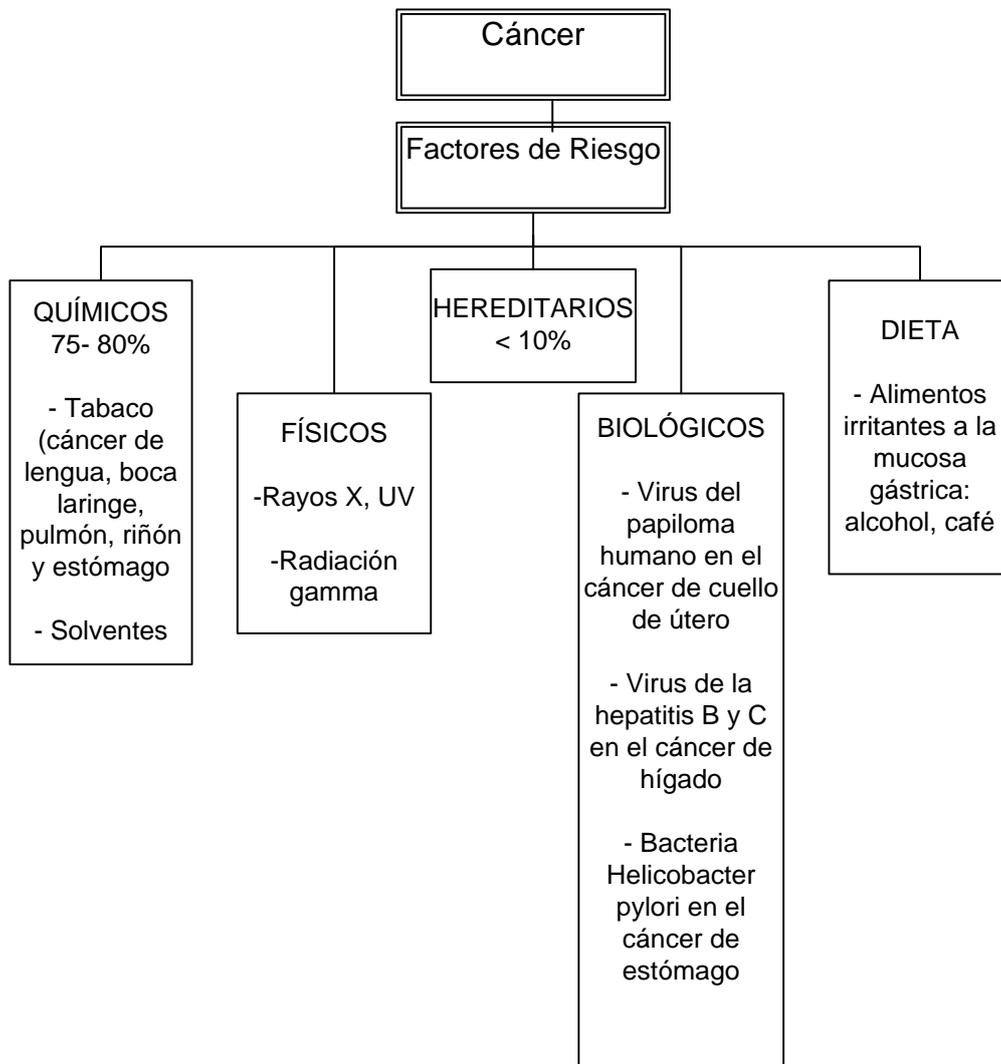


Figura 5. Factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del cáncer

Los estudios epidemiológicos constituyen el principal instrumento experimental para identificar la relación causal entre la ingesta de un nutriente y el cáncer. Mediante este método ha sido posible establecer una correlación entre la ingesta excesiva de grasa, de ácidos grasos saturados y alcohol, y la disminución en la ingesta de fibras dietéticas y antioxidantes con el aumento de la incidencia de cáncer en poblaciones que se caracterizan por estos hábitos alimenticios.

Estos excesos de una mala nutrición, fomentan los cánceres de aparato digestivo, hígado, páncreas, mama y próstata. Por el contrario, el consumo de AGPI *omega-3* se asocia con una disminución en la expresión de los cánceres de mama, colon y próstata. (Matarese, 2004)

En el año 2001, Siddiqui y colaboradores, publicaron un artículo donde se indica que el DHA afecta a la expresión de receptores en la superficie de células T de leucemia (Jurkat), reduciendo la actividad de proteínas de adhesión; la cuál es imprescindible en células cancerígenas para la metástasis. En este sentido, resulta interesante observar que cuando las células humanas de adenocarcinoma de colon (CX-1) aumentan su contenido de DHA en la membrana celular, se reduce drásticamente su capacidad de adhesión a células endoteliales.

Un mecanismo molecular a través del cuál los AGPI n-3 pueden actuar como anticancerígenos es la inhibición de la iniciación de la traducción del RNA mensajero. Palakurthi y colaboradores, publicaron en el año 2000, que si la información genética contenida en el RNAm se corresponde con la síntesis de proteínas necesarias para que progrese el ciclo celular, la inhibición de la iniciación de la traducción, implica su bloqueo. Se ha demostrado en células cancerígenas que el EPA es capaz de inhibir la iniciación de la traducción del ARNm cuya secuencia se corresponde con la ciclina D1 y E. La reducción de la síntesis de estas proteínas obliga a detener el crecimiento celular en la fase G1. El EPA actuaría reduciendo parcialmente la capacidad de almacenamiento de iones calcio por las células cancerígenas, lo cual activaría la proteína quinasa R que desactivaría el factor 2α de iniciación eucariótica necesario para la traducción del ARNm.

2.2.5 Efectos Benéficos en la nutrición clínica.

En investigación clínica son cada vez más las estrategias terapéuticas para aumentar la eficacia del soporte nutricional artificial. Así, la nutrición no sólo constituye una medida de soporte, sino que en muchas ocasiones pasa a ser una forma específica de tratamiento. Estas terapéuticas incluyen el uso de factores de crecimiento y nutrientes presentes en la dieta oral normal, pero ausentes en las mezclas estándar tradicionalmente usadas en nutrición artificial, dirigidos a mejorar la absorción intestinal, las funciones digestivas, inmunológicas y de barrera. (Mataix 2004)

El desarrollo del soporte nutricional y sus implicaciones metabólicas nos va permitiendo la incorporación de determinados nutrientes, como los ácidos grasos *omega-3* en fórmulas de nutrición enteral y parenteral, para su aplicación en pacientes con insuficiencia metabólica, con eficacia demostrada. (Mataix 2004)

Recientemente, se han enriquecido a formulaciones artificiales con AGPI n-3. Ya que cuando éstos se incorporan a la fracción fosfolipídica de la membrana celular, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico producen una serie de metabolitos que son metabólicamente menos activos que los derivados de ácido araquidónico. Comprenden efectos sobre el sistema cardiovascular e inmunológico, así como la cascada metabólica de las citocinas durante situaciones de enfermedad crítica, funcionando como mediadores proteínicos e las células. (Geerling, 2000)

Meydani y su grupo de investigación (2003), publicaron, que los preparados especiales de nutrición enteral denominados “inmunomoduladores” que incluyen ácidos grasos omega 3, además de satisfacer las necesidades nutritivas del paciente, modulan con bastante eficacia su función inmunológica.

2.3 Microemulsiones

2.3.1 Definición y características

Las microemulsiones son sistemas dispersos de un aceite en un vehículo acuoso, o dos fases inmiscibles, termodinámicamente estables, transparentes y traslúcidos, estabilizados por un surfactante puro o en mezcla con un cosurfactante, que puede ser un alcohol de cadena corta. Las microemulsiones son ópticamente claras porque el diámetro de las partículas en el sistema coloidal es menor que un cuarto de longitud de onda de la luz incidente. (Prince, 1977)

Estos sistemas presentan baja viscosidad mostrando características de fluidos Newtonianos. (Teipel 2000).

Además de su transparencia y de su capacidad de formarse espontáneamente, una microemulsión se distingue de una emulsión (como lo indica su nombre), por el tamaño del glóbulo el cuál es de ~100- 600 nm para la primera y de 0.1- 50 μm para la segunda. (Eccleston 1995), aunque Attwood (1994) menciona que el tamaño del glóbulo en una microemulsión es de 10 a 200 nm y en una emulsión es de 1-20 μm .

Un modelo para esquematizar la representación de microemulsiones es mediante diagramas de fase, formados por tres componentes: la fase oleosa, la fase acuosa y el surfactante o tensoactivo. Cuando existe una alta concentración de fase acuosa, las pequeñas gotas de la fase acuosa están dispersas en agua y forman lo que se conoce como una microemulsión aceite en agua (o/w), por el contrario, cuando pequeñas gotas de agua son dispersadas en un vehículo oleoso, la microemulsión es llamada agua en aceite (w/o). En cada fase, los glóbulos de aceite y agua son separados por una película formada por el surfactante. La siguiente figura muestra un diagrama de fases ternario compuesto por aceite, agua y surfactante, donde se muestra la formación de micelas, de microemulsión y regiones multifase.

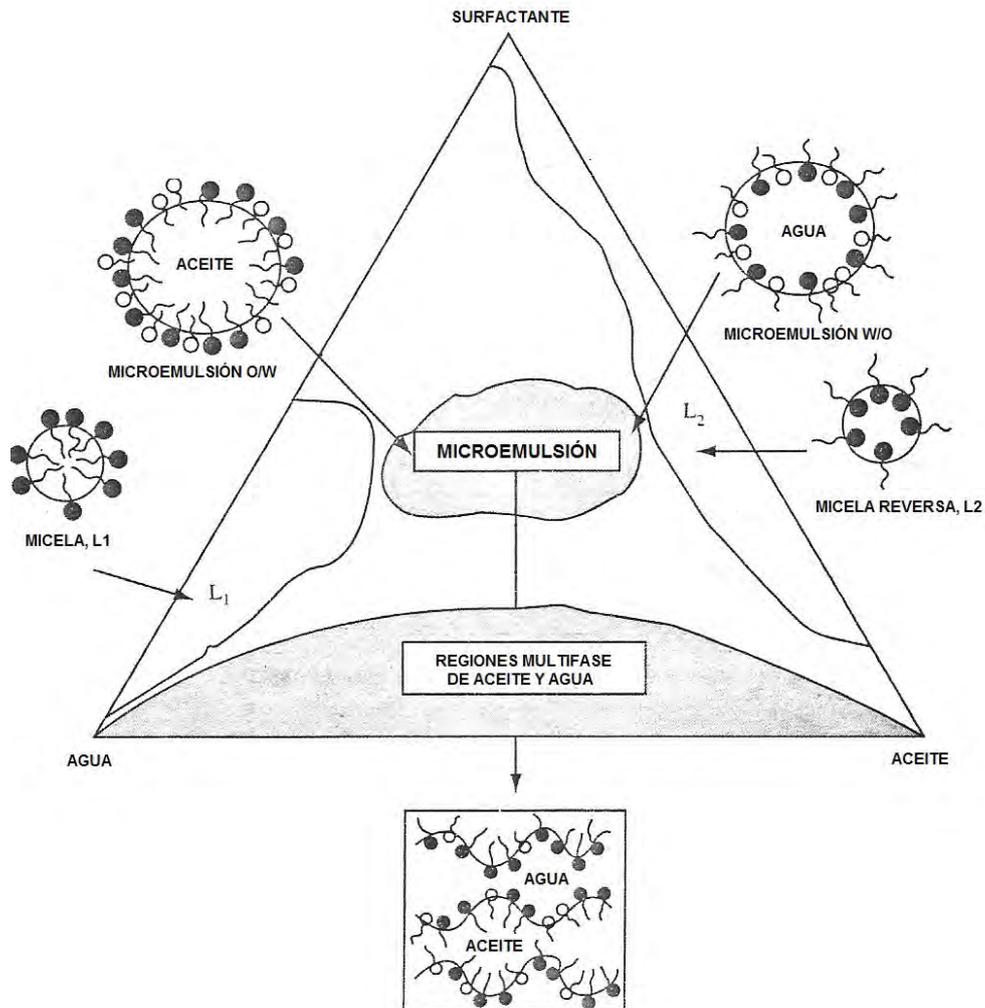


Figura 6. Diagrama de fases ternario para mezclas de aceite, agua y un surfactante, mostrando representaciones esquemáticas de varias estructuras: micelas, microemulsión y regiones multifase. (Tomado de Eccleston 2007)

Las microemulsiones aumentan la biodisponibilidad de la fase oleosa, manteniendo la dispersión molecular, extendiendo la ventana de absorción en el tracto gastrointestinal, permitiendo una absorción más rápida. (Meinzer, 2003)

Las microemulsiones han sido también utilizadas en la administración tópica, incrementando la absorción de fármacos solubles en la fase oleosa. (Linn 1990)

Se ha mencionado antes que las microemulsiones se forman espontáneamente, debido a ello, la energía libre implicada cuando el área interfacial aumenta, ΔG debe ser negativo. ($\Delta G = \gamma \Delta A$, donde ΔA es el incremento en el área interfacial). La tensión interfacial entre la fase oleosa y la acuosa, es reducida a un valor mínimo por la capa interfacial, dando un valor muy pequeño, pero positivo de la energía libre. Aunque no existen reglas estrictas para elegir los componentes apropiados para una microemulsión, se señala que hay una guía general (Swarbrick 2007, Mitchell 1981), basada en observaciones; el surfactante elegido para un aceite en particular debe de:

1. Disminuir la tensión interfacial a un valor muy bajo, para favorecer la dispersión durante el proceso de preparación de la microemulsión.
2. Tener el carácter hidrofílico- lipofílico apropiado, para proveer la curvatura correcta a la región interfacial para la microemulsión deseada (o/w, w/o o bicontinua).
3. Proveer de una capa flexible que pueda formar pequeños glóbulos.

2.3.2 Agentes emulsionantes.

Anteriormente se ha mencionado que una microemulsión está formada por una fase oleosa, una acuosa y un emulsionante, al que también se denomina surfactante o tesoactivo.

Un surfactante es aquel agente que tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial, aunque la definición más aceptada, está basada en la ecuación de adsorción de Gibbs. De acuerdo con esta ecuación, cualquier material que hace una contribución a la energía libre en la superficie de un sistema de dos componentes es un surfactante.

Se puede tratar la termodinámica de superficie, en una manera similar a una solución. El cambio de energía, dU , acompañado de un cambio infinitesimal reversible en el sistema está dado por (Florence, 2006):

$$dU = dq_{\text{rev}} - dw \quad (1) \quad \text{ó} \quad dU = Tds - dw \quad (2)$$

dq_{rev} y dw son, respectivamente, el calor absorbido y el trabajo efectuado durante el cambio reversible.

Para un sistema abierto (donde existe una transferencia de materia entre fases), una de las ecuaciones anteriores puede expresarse como:

$$dU = Tds - dw + \sum \mu_i dn_i \quad (3)$$

donde μ_i y n_i son el potencial químico y el número de moles, respectivamente, del componente i .

Cuando se aplica la ecuación (3) a la capa superficial, el trabajo es el requerido para incrementar el área de la superficie por una cantidad infinitesimal, dA , a temperatura, presión y número de moles constante. Este trabajo es efectuado contra la tensión superficial y se representa como:

$$dw = \gamma dA \quad (4)$$

La forma más conocida de la ecuación de Gibbs es:
$$\Gamma_2 = - \frac{d\gamma}{d\mu_2} \quad (5)$$

Otra forma de expresar la ecuación es:
$$\Gamma_2 = - \frac{1}{RT} \left(\frac{d\gamma}{d \ln a_2} \right) \quad (6)$$

Manteniendo la temperatura constante:
$$\mu_2 = RT \ln a_2 \quad (7)$$

En las ecuaciones, Γ_2 es la concentración en exceso del soluto en la superficie (surfactante) γ es la tensión superficial, a es la actividad del soluto, μ_2 es el potencial químico; R y T son constantes. La ecuación de Gibbs puede ser aplicada a sistemas acuosos y no acuosos. (Adamson, 1982)

Los emulsionantes pueden ser clasificados de acuerdo con sus caracter iónico en aniónicos, catiónicos, y no iónicos (Griffin,1949):

- Aniónicos: la porción activa de esta clase de emulsionantes es el anion. En general, estos emulsionantes son más estables a pH ácido y permiten mantener el pH del sistema en un rango entre 4.5 y 6.5. Algunos ejemplos de estos emulsionantes son: ésteres de ácido sulfúrico, acilamidas de aminoácidos, sulfonatos.
- Catiónicos: éstos tiene una alta actividad en la superficie, sin embargo, son los menos utilizados, son irritables a la piel y ojos y tienen un rango considerable de incompatibilidades, incluyendo materiales anionicos, algunos ejemplos son: sales de amonio cuaternarias, aminas terciarias.
- No iónicos: esta clase de emulsionantes muestran un excelente pH y compatibilidad con electrolitos en emulsiones, aunque su rango de HLB es muy amplio (2- 28). Las emulsiones que los contienen, son generalmente bajos en irritación potencial, estables y tienen excelentes características de compatibilidad. Algunos ejemplos son: ésteres de etilenglicol, ésteres de sorbitán, alcoholes grasos etoxilados.

El balance entre las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de un surfactante ha sido denominado como balance del sistema hidrofílico/ lipofílico (HLB). A mediados del siglo pasado, Griffin estableció una escala empírica de valores de HLB para una variedad de surfactantes no iónicos. El concepto original de Griffin define al HLB como el porcentaje (por peso) de la parte hidrofílica, dividida entre 5 para producir valores más manipulables (Griffin, 1949):

$$HLB = \frac{\% \text{ hidrofílico (peso)}}{5}$$

Una escala de HLB puede ser utilizada para establecer el rango óptimo de eficiencia para un emulsionante apropiado para una cierta actividad como agente humectante, antiespumante o detergente. Aunque los números de la escala han sido asignados por arriba de 40, el rango usual está entre 1 y 20. Los materiales que son altamente polares o hidrofílicos son asignados números más altos que los materiales que son menos polares y más lipofílicos

Tabla 3. Actividad y valor de HLB de emulsinantes.

Actividad	HLB asignado
Antiespumantes	1 - 3
Emulsionantes (w/o)	3 - 6
Agentes humectantes	7 - 9
Emulsionantes (o/w)	8 - 18
Solubilizantes	15 - 20
Detergentes	13 - 15

Tomada de Betageri, 2007.

En una solución acuosa diluída, los surfactantes existen como monómeros, pero a altas concentraciones, un número de moléculas de surfactante pueden agregarse para formar micelas, las cuales son frecuentemente idealizadas geoméricamente como entidades esféricas o perfectas estructuras laminares.

La concentración específica a la cuál las propiedades fisicoquímicas de un surfactante en una solución acuosa diluída sufre repentinamente una discontinuidad, es referida como la concentración micelar crítica cmc. (Friberg, 1983)

Las moléculas anfifílicas pueden formar micelas o estructuras de asociación. Las fuerzas que conducen a la formación de este tipo de complejos son las interacciones dipolo- dipolo de los grupos de la cabeza polar, que en el caso de micelas inversas son éstas las que están en el centro, la siguiente figura muestra lo mencionado (Tanford, 1980):

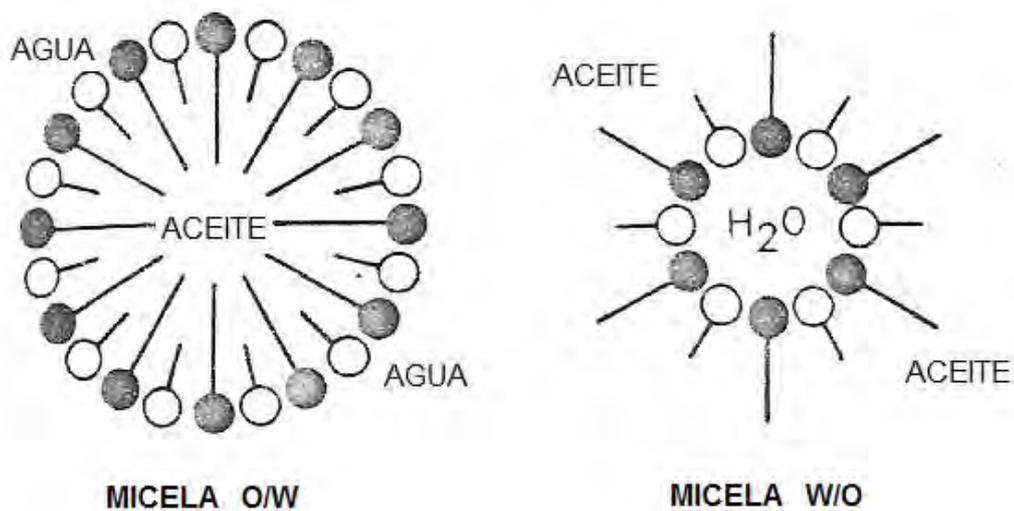


Figura 7. Modelo de la formación de micelas y micelas invertidas (Rieger 1988)

2.4 Aceite de Castor Hidrogenado Polietilenglicolizado

Ya se ha mencionado, que un agente emulsionante, puede clasificarse en iónico, aniónico o no iónico. Se ha utilizado como agente emulsionante al Aceite de Castor Hidrogenado Polietilenglicolizado (**ACH 40**), el cuál se caracteriza por tener una naturaleza no iónica.

El ACH 40, cuya nomenclatura es oxisterato polietilenglicol o también aceite de castor hidrogenado PEG-40 (de acuerdo al Handbook of Excipients 2004), se produce de la reacción de 40 moles de óxido de etileno con un mol de glicerina. Los principales componentes de los diferentes grados de ACH, incluyendo al RH 40, son los ésteres de ácidos grasos polietilenglicol glicerol glicol y ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol.

En la siguiente figura, se representa la estructura química del ACH 40, donde se puede notar, la porción hidrofílica, que consiste de glicoles de polietilen y etoxilatos de glicerol y la porción hidrofóbica correspondiente a la cadena larga de carbonos.

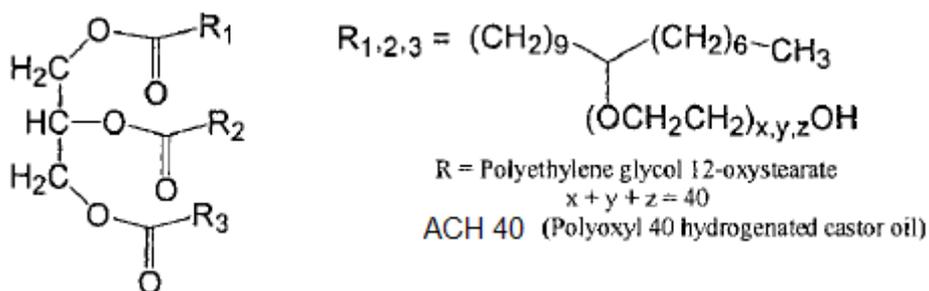


Figura 8. Estructura del ACH (tomada Strickley, 2004)

Característicamente, el ACH 40 es un líquido viscoso o una pasta suave de color blanquecino, que en solución acuosa presenta un tenue olor característico y un sabor ligero. (BASF 1992)

La siguiente tabla muestra algunas de las características de este emulsionante:

Tabla 4. Características del ACH 40

Característica	ACH 40
Índice de Saponificación	50- 60
Índice de Hidroxilo	60- 75
Índice de Acidez	1
Índice de Iodo	1
Contenido de agua (Método Fischer's)	2%
Valor de pH de solución acuosa al 10%	6-7

Los diferentes grados del ACH forman una solución clara en agua, etanol y propanol, sin embargo, cuando es disuelto en alcoholes completamente anhidros, es necesario adicionar 0.5 a 1% de agua para obtener soluciones claras. Cuando la temperatura empieza a aumentar, la solubilidad en agua disminuye y a una cierta temperatura, la solución se torna turbia. (BASF 1992)

En cuanto a la estabilidad de los diferentes grados de ACH, se reporta que no se alteran en soluciones hidroalcohólicas, en este caso no se está utilizando un alcohol como cosurfactante, sin embargo se reporta que en soluciones acuosas tiene buena estabilidad, aunque la adición de bases o ácidos fuertes puede provocar la saponificación de los ésteres.

Las soluciones acuosas que contienen a los diferentes grados de ACH, pueden esterilizarse por calentamiento a 120°C. Debe tomarse en consideración que esto puede provocar una ligera disminución en el valor del pH (BASF 1992)

Uno de los principales usos del ACH 40, de acuerdo a la ficha técnica de BASF, es la solubilización de principios activos insolubles en un medio acuoso ya que este excipiente tiene la característica de ser inodoro e insípido en soluciones acuosas. Para obtener una solución acuosa clara, se recomienda: mezclar al principio activo con el ACH y calentar a 60°C- 65°C. Además, el agua que se adicione, debe igualmente ser calentada en ese rango de temperatura y se debe incorporar al sistema lentamente con agitación. Como un resultado de la hidratación, la solución se torna espesa provocando que el sistema adquiera su máxima viscosidad. A medida que se continúa incorporando el agua a adicionar a la mezcla, la viscosidad del sistema disminuye.

3. Objetivos

- Solubilizar Ácidos Grasos Omega 3 en una fase acuosa, empleando la técnica de Microemulsificación.

Para ello es necesario:

- Proponer un diagrama ternario que esquematice la zona de trabajo
- Determinar las proporciones de fase oleosa, fase acuosa y tensoactivo, que forman una microemulsión.
- Caracterizar los sistemas obtenidos en el desarrollo experimental, para definir aquellos que se consideran microemulsiones:
 - Descripción física
 - Evaluación de la transparencia óptica
 - Medición del tamaño de glóbulo de los sistemas
 - Estudio del efecto de la concentración de ACH 40 y de la concentración de aceite de pescado en el pH

4. Desarrollo Experimental

4.1 Materia Prima.

Para llevar a cabo la formación de la microemulsión, se ha utilizado:

- Aceite de pescado Virgina Prime gold (certificado analítico anexo #3)
- Aceite de Castor Hidrogenado Polietilenglicolizado. Lote 79630675L0
- Solución reguladora de citratos pH 4
- Edetato trisódico R. A.
- Butilhidroxitolueno R. A.
- Metilparabeno M. P.
- Propilparabeno M. P.

4.2 Material y equipos

4.2.1.1 Material

El material utilizado para el desarrollo experimental, consta de:

- Matraz volumétrico de 500 ml
- Matraz volumétrico de 50 ml
- Matraz volumétrico de 25 ml
- Pipeta volumétrica de 1 ml
- Vaso de precipitado de 250 ml
- Vaso de precipitado de 50 ml
- Espátula de cromo- níquel

4.2.1.2 Equipos

Para realizar el desarrollo experimental, se ha utilizado:

- Balanza analítica Explorer Ohaus
 - Máx 210 g. d= 0.1 mg.
 - Item No. E12140

- Agitador de hélice, 4 palas.
 - Motor IKA® RW 20 digital
 - Apropriado para viscosidades de hasta 10.000 mPas

- Parrilla de calentamiento
 - Corning Stirrer/ Hot plate
 - Model PC- 420. Serial No. 240598054063

Una vez que los sistemas se fabricaron, es necesario determinar algunas de sus características, como lo son apariencia, pH, tamaño del glóbulo, intensidad luminosa y viscosidad, para ello, se ha utilizado:

- Potenciómetro Oakton. Equipar
 - pH/ mV/ Ion/°C meter

- Zetasizer nano. Malvern Instruments. Nano series. Nano Z-S
 - Sensibilidad 0.6- 6000 nm. Software DTS (nano) 5.00

- Espectrofotómetro UV- Visible Ocean Optics
 - Model SAD 500 CE.
 - Conformado por: Fuente de luz (Deuterio- Tungsteno) UV/ VIS DT 1000 CE.
 - Portaceldas CUV- UV
 - Celda de cuarzo de 1cm
 - Software IBase 32

4.3. Diseño Experimental

El diseño de experimentos permite lograr una planeación en el desarrollo, conociendo la cantidad y el orden de los componentes de forma planeada y organizada, realizando el menor número de experimentos que arrojen resultados de calidad.

En este caso se propone la formación de sistemas donde se varía la cantidad de fase acuosa, de fase oleosa y de surfactante.

La siguiente tabla muestra la formulación base de los componentes de la microemulsión:

Tabla 5. Fórmula Base

Componente (variable)	
Aceite de pescado	X_1
ACH 40	X_2
Solución reguladora de pH	X_3
Componente (constante)	Cantidad
Edetato trisódico	10 mg/ml
Butilhidroxitolueno	1 mg/ ml
Metilparabeno	0.2 mg/ ml
Propilparabeno	0.02 mg/ ml

Donde $X_1+X_2+X_3$ es el 98% de la formulación.

Para determinar las cantidades de los excipientes utilizados, se consultó la literatura correspondiente a formulaciones de soluciones orales (Niazi, 2009). La cantidad de antioxidante, conservadores antimicrobianos y quelante corresponde aproximadamente a un 2% de la formulación total.

Ensayos previos permitieron determinar el intervalo de concentración para la fase oleosa, el tensoactivo y la fase acuosa, que conforman el 98% de la formulación y que se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Intervalo de concentración de los componentes con cantidades variables.

	Componente	Intervalo % (w/v)
X ₁	Aceite de pescado	1%- 5%
X ₂	ACH 40	15%- 25%
X ₃	Solución Reguladora de pH	68%- 82%

Para llevar a cabo el diseño de experimentos, se usó el programa STATGRAPHICS PLUS versión 5.0, utilizando un diseño de mezclas, con tres variables, diseño aumentado, obteniendo 14 ensayos a realizar En la tabla 6 se muestra el diseño:

Tabla 7. Matriz de experimentos.

Ensayo	Aceite de pescado %	ACH 40 %	Solución reguladora de pH %
1	5	25	68
2	5	15	78
3	1	25	72
4	1	15	82
5	3	20	75
6	4	22.5	71.5
7	4	17.5	76.5
8	2	22.5	73.5
9	2	17.5	78.5
10	5	20	73
11	3	25	70
12	3	15	80
13	1	20	77
14	3	20	75

Se puede observar que el existe una repetición en el centro, brindando valores de proporciones iguales para el ensayo 5 y el 14.

En el siguiente diagrama ternario se muestra la localización de los sistemas:

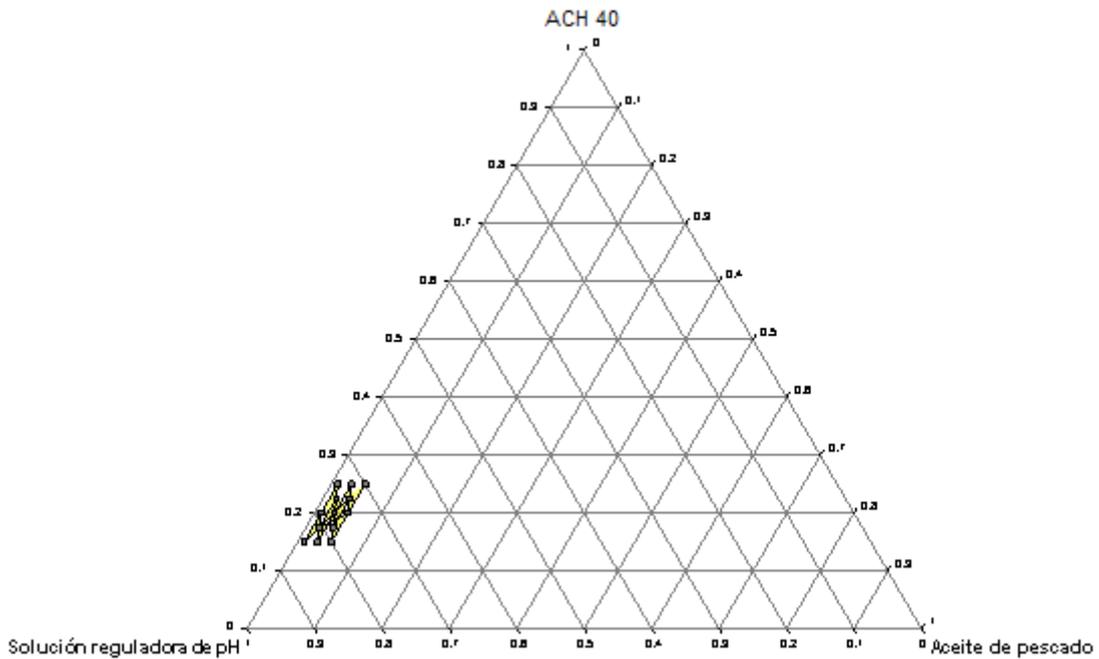


Figura 9. Diagrama ternario elaborado con los datos sugeridos por el programa STATGRAPHIC PLUS 5.0, y elaborado por el programa ProSim Ternary Diagram.

Debido a las restricciones propias de la formulación, se puede observar que los ensayos propuestos se localizan en la parte inferior del diagrama, la siguiente figura muestra el esquema ampliado y a los ensayos propuestos remarcados:

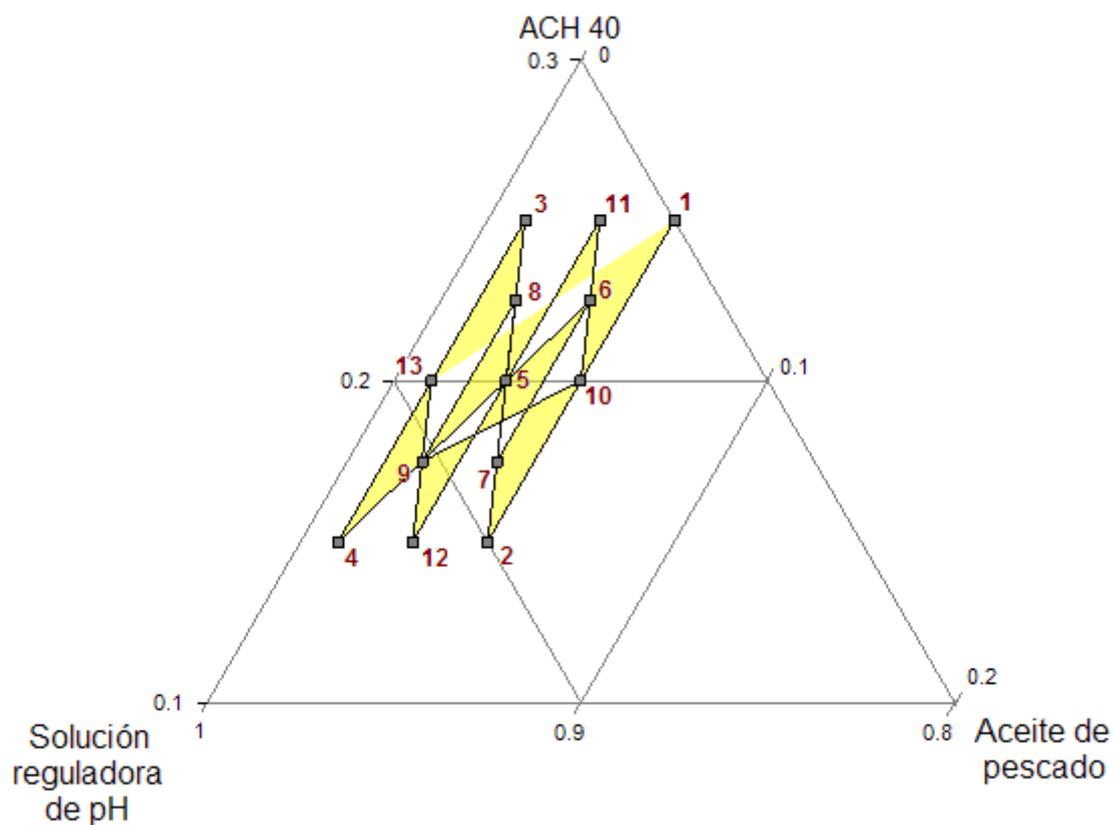


Figura 10. Diagrama ternario ampliado con los ensayos a realizar localizados.

La tabla 8 muestra las concentraciones de ACH 40 y de Aceite correspondientes a cada ensayo de acuerdo a su nivel en el diagrama ternario.

Tabla 8. Concentración de ACH y de Aceite en cada uno de los ensayos de acuerdo a su nivel.

Nivel	[ACH]	Ensayos #	[Aceite]	Ensayos #
1	15%	2, 4 y 12	1%	3, 4 y 13
2	17.50%	7 y 9	2%	8 y 9
3	20%	5, 10 y 13	3%	5, 11 y 12
4	22.50%	6 y 8	4%	6 y 7
5	25%	1, 3 y 11	5%	1, 2 y 10

A cada uno de los ensayos, se les evaluará su apariencia, pH, tamaño de glóbulo y transparencia óptica, para observar las características que permitan definir a los sistemas en los que se forman microemulsiones.

4.4 Metodología

4.4.1 Preparación de solución reguladora de citratos pH 4.

Se pesaron 6 g de ácido cítrico y 5.5 g de citrato de sodio, se colocaron en un matraz volumétrico de 500 ml, se disolvieron y se llevaron al aforo con agua purificada por el método de destilación.

4.4.2 Preparación de solución de parabenos

Se pesaron 504.1 mg de metilparabeno y 54.5 mg de propilparabeno. Los cuales se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml, se disolvieron en 10 ml de etanol y se llevaron al aforo con agua purificada.

4.4.3 Realización de los ensayos. Metodología general

En base a la matriz de experimentos obtenida con STATGRAPHICS 5.0 (y que se encuentra en la tabla 7), se empleó la siguiente metodología, para preparar 50 ml de cada sistema:

- ❖ Pesado de materia prima.
Se pesaron las cantidades requeridas de aceite de pescado Virginia Prime y de ACH 40. Además de los excipientes requeridos: Butilhidroxitolueno (50 mg) y EDTA (500 mg), en las cantidades necesarias para obtener la concentración establecida en las tablas 5 y 7.

- ❖ Preparación de la fase acuosa.
 - En un vaso de precipitados de 250 ml, se colocaron aproximadamente el 75% de la cantidad necesaria de solución reguladora de pH, requerida para el ensayo.
 - Se adicionaron 500 mg de EDTA y se agitaron hasta solubilizar completamente.
 - Se agregaron 1 ml de la solución de parabenos.
 - Se calentaron a $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo la temperatura constante.

- ❖ Preparación de la fase oleosa.
 - En un vaso de precipitado de 50 ml, se pesó la cantidad de aceite.
 - Se adicionaron 50 mg de BHT y se agitaron hasta solubilizar.
 - Se calentaron a $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo la temperatura constante

- ❖ Preparación del tensoactivo.
 - En un vaso de precipitados de 250 ml, se pesó la cantidad requerida del tensoactivo ACH 40. (tabla 7)
 - Se calentó a $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo la temperatura constante

- ❖ Formación de la microemulsión.
 - Se mezcló el tensoactivo y la fase oleosa a 200 rpm, durante 2 minutos.
 - Se mantuvo la temperatura constante ($65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)
 - Se aumentaron las revoluciones por minuto a 400 y adicionar lenta y continuamente la fase acuosa a la mezcla anterior.
 - Agitar por aproximadamente 3 minutos, manteniendo la temperatura constante.
 - Se Dejó enfriar a temperatura ambiente.
 - Trasvasar a un matraz volumétrico de 50 ml y aforar.

Se repitió esta metodología con cada uno de los ensayos propuestos en las tablas 5 y 7

4.4.4. Medición de pH

Para determinar el pH de cada sistema, previamente se calibró el potenciómetro Oakton con soluciones pH 4, 7 y 10, a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió el pH de cada ensayo realizado, lavando cuidadosamente el electrodo entre cada medición y procurando que éste fuera sumergido completamente en el sistema.

4.4.5. Determinación de tamaño de partícula

Se utilizó el Equipo Zetasizer Nano, para medir el tamaño de partícula. Este equipo funciona midiendo la absorción de la luz correlacionando, mediante un algoritmo el movimiento browniano de las partículas con el tamaño. Para ello, se utilizó una celda de vidrio de un centímetro de ancho, la cuál fue enjuagada con agua destilada entre cada medición. Es importante antes de cada medición, agitar la muestra antes de colocarla en la celda. La medición se llevó a cabo a temperatura ambiente.

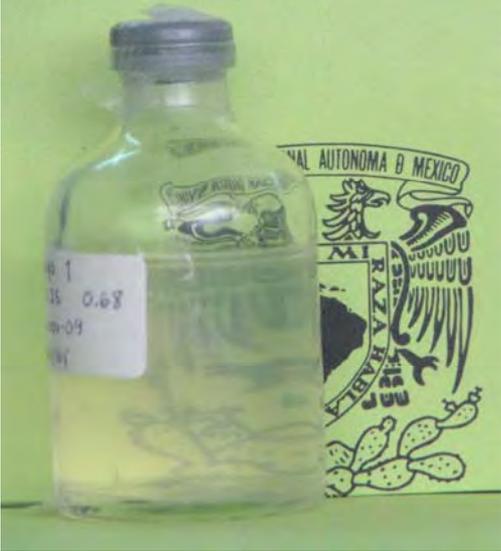
4.4.6. Cuantificación de transparencia óptica

La transparencia óptica se relaciona con la cantidad de luz que dejar pasar cada sistema. Para cuantificarla, se utilizó una celda de cuarzo con un centímetro de ancho, la cuál fue lavada con agua destilada entre cada medición. La lectura se realizó a 500 nm, en el modo I (Irradiancia Relativa) en la zona del visible. Medición realizada a temperatura ambiente.

5. Resultados.

5.1 Descripción Física del sistema

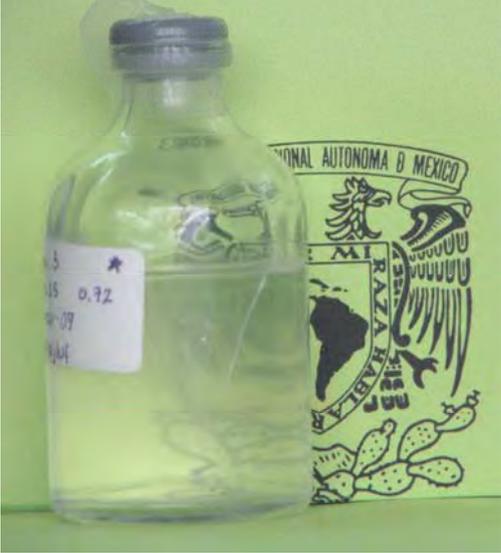
Ensayo 1

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 5% - ACH 40 25% - Solución reguladora de pH 68% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, ligeramente turbio, de color amarillo tenue.</p> <p>Claridad: ++</p>	

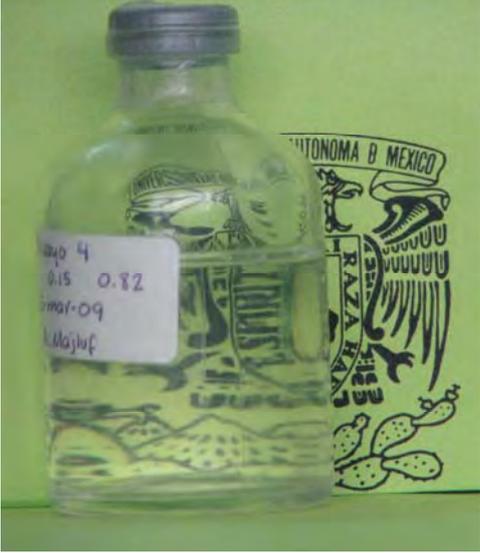
Ensayo 2

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 5% - ACH 40 15% - Solución reguladora de pH 78% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, turbio, de color amarillo tenue.</p> <p>Claridad: +</p>	

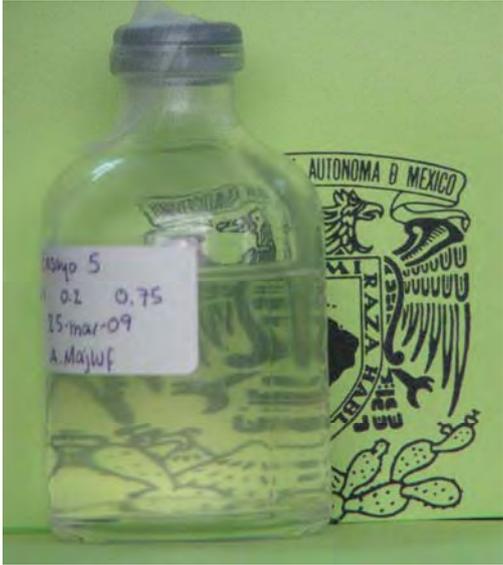
Ensayo 3

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 1% - ACH 40 25% - Solución reguladora de pH 72% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, ligeramente turbio e incoloro.</p> <p>Claridad: ++</p>	

Ensayo 4

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 1% - ACH 40 15% - Solución reguladora de pH 82% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, transparente e incoloro.</p> <p>Claridad: ++++</p>	

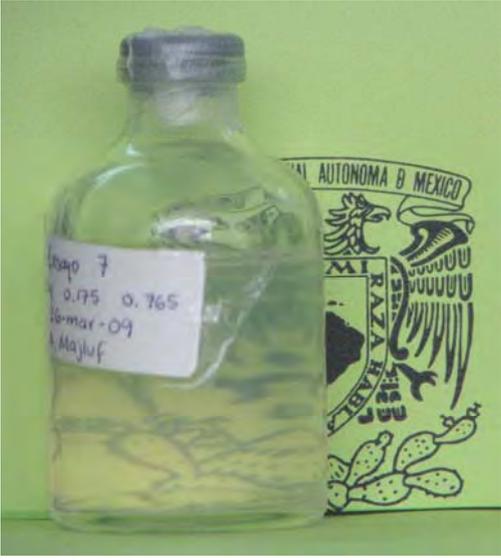
Ensayo 5

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 3% - ACH 40 20% - Solución reguladora de pH 75% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, transparente e incoloro.</p> <p>Claridad: +++</p>	

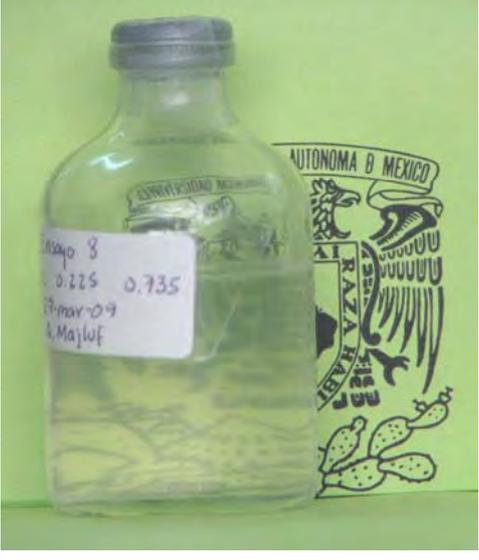
Ensayo 6

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 4% - ACH 40 22.5% - Solución reguladora de pH 71.5% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, opaco, de color amarillo tenue.</p> <p>Claridad: +</p>	

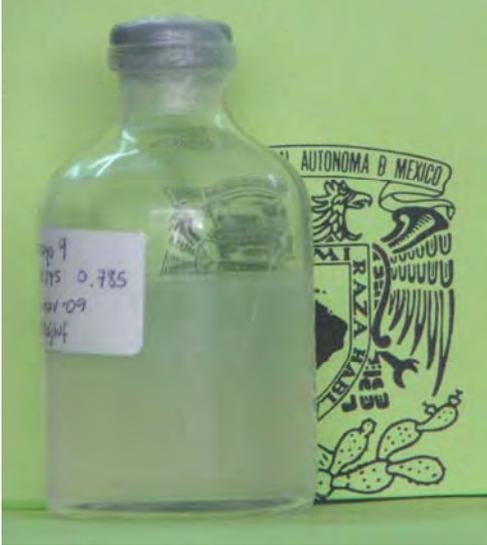
Ensayo 7

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 4% - ACH 40 17.5% - Solución reguladora de pH 76.5% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, transparente, de color amarillo muy claro.</p> <p>Claridad: +++</p>	

Ensayo 8

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pesca 2% - ACH 40 22.5% - Solución reguladora de pH 73.5% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, ligeramente turbio, casi incoloro.</p> <p>Claridad: ++</p>	

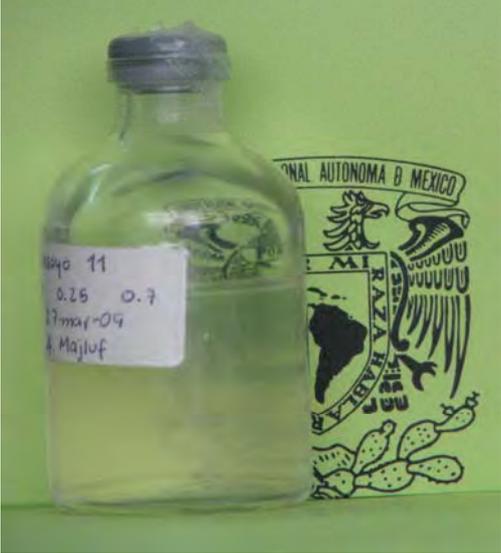
Ensayo 9

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 2% - ACH 40 17.5% - Solución reguladora de pH 78.5% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, turbio, casi incoloro.</p> <p>Claridad: +</p>	

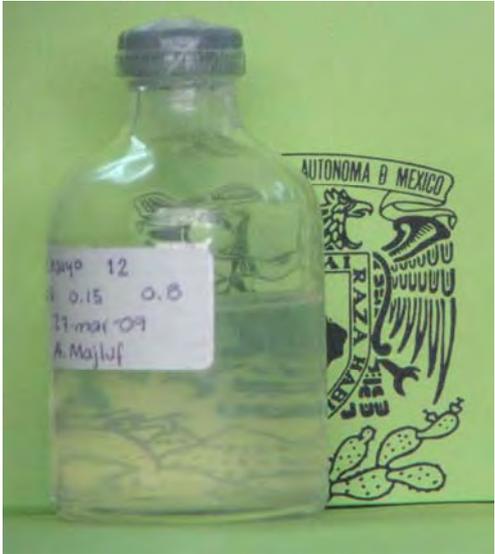
Ensayo 10

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 5% - ACH 40 20% - Solución reguladora de pH 73% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, transparente, de color amarillo tenue.</p> <p>Claridad: +++++</p>	

Ensayo 11

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 3% - ACH 40 25% - Solución reguladora de pH 70% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, opaco, de color ligeramente amarillo.</p> <p>Claridad: +</p>	

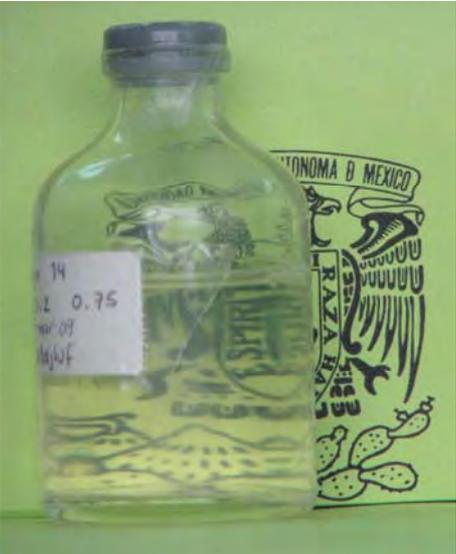
Ensayo 12

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 3% - ACH 40 15% - Solución reguladora de pH 80% 	
<p>Apariencia</p> <p>Sistema homogéneo de una sola fase, ligeramente opaco, de color amarillo tenue.</p> <p>Claridad: ++</p>	

Ensayo 13

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 1% - ACH 40 20% - Solución reguladora de pH 77% 	
<p>Apariencia</p>	
<p>Sistema homogéneo de una sola fase, transparente e incoloro.</p> <p>Claridad: ++++</p>	

Ensayo 14

<p>Componentes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aceite de pescado 3% - ACH 40 20% - Solución reguladora de pH 75% 	
<p>Apariencia</p>	
<p>Sistema homogéneo de una sola fase, transparente e incoloro.</p> <p>Claridad: +++</p>	

Resultados

Observando los diferentes sistemas puede notarse que sólo los ensayos 4, 5, 10, 13 y 14 son claros o transparentes, es decir, que permiten el paso de la luz. Tal cualidad es característica de las microemulsiones. A diferencia del resto de los ensayos que presentan cierta opacidad.

Es importante señalar que los sistemas que físicamente se presentan como microemulsiones, tienen una concentración de 15% de ACH 40, en el ensayo 4 y de 20% de ACH 40 para el 5, 10, 13 y 14. En el ensayo 4 se mezcló la cantidad mínima de ACH 40 con la menor concentración de aceite. Mientras que la concentración de aceite para los sistemas antes mencionados, es de 1%, 3% y 5%.

Lo anterior demuestra que se puede formar la microemulsión con la concentración más baja de ACH 40 siempre y cuando se utilice la concentración mínima de aceite (1%). Además se pueden obtener microemulsiones utilizando 20% de ACH 40 a diferentes concentraciones de aceite (1%, 3% y 5%)

Para el resto de los sistemas, la opacidad del sistema se debe a:

- una cantidad excesiva de ACH 40, ya que éste en altas concentraciones opacifica, en presencia o ausencia de fase oleosa
- una cantidad elevada de aceite
- una cantidad insuficiente de ACH 40 en relación con la de aceite

Tabla 9. Calificación de la Transparencia Óptica:

Turbio (0.035-0.135)	Ligeramente turbio (0.147-0.184)	Claro (0.202-0.220)	Muy claro (0.241-0.261)
+	++	+++	++++

5.2 Transparencia Óptica

Tabla 10. Datos de Transparencia óptica determinados en la región visible del espectro (500 nm).

Ensayo #	Resultado
1	0.178
2	0.135
3	0.147
4	0.261
5	0.220
6	0.107
7	0.202
8	0.184
9	0.035
10	0.241
11	0.124
12	0.172
13	0.244
14	0.204

Para observar el efecto del ACH 40 y del aceite de pescado en la Transparencia Óptica, se llevó a cabo un análisis de varianza, para encontrar la relación correspondiente. El ANOVA mostró que hay 5 efectos significativamente diferentes de cero, que influyen en la Transparencia óptica ($P < 0.05$).

El siguiente gráfico, muestra dichos efectos, indicando que los componentes por sí solos, así como la interacción entre ellos, tienen un efecto positivo en la respuesta, mostrando una R^2 de 95.5183%

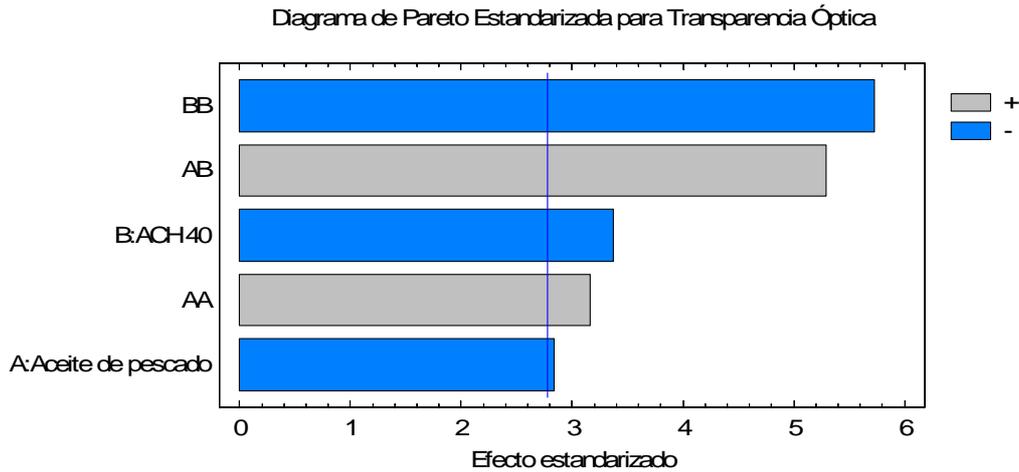


Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizado para Transferecia Óptica

Se obtuvo, la ecuación de regresión donde se ajustan todos los datos. La ecuación del modelo justado es:

$$\text{Transparencia Óptica} = 0.210429 - 0.0188333 \cdot \text{Aceite de pescado} - 0.0223333 \cdot \text{ACH 40} + 0.0336429 \cdot \text{Aceite de pescado}^2 + 0.043 \cdot \text{Aceite de pescado} \cdot \text{ACH 40} - 0.0608571 \cdot \text{ACH 40}^2$$

A continuación se muestra el Gráfico que representa a la superficie de respuesta estimada:

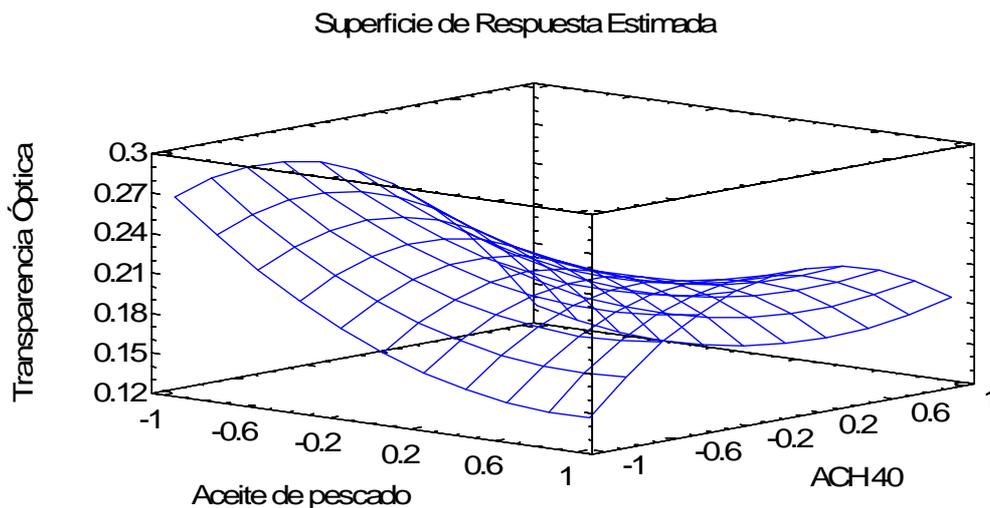


Figura 12. Superficie de respuesta para Transferecia Óptica en función de la concentración de aceite y la concentración de ACH 40

El siguiente gráfico muestra la representación por zonas de la respuesta (Transparencia Óptica) para los diferentes niveles del ACH 40 y del aceite de pescado.

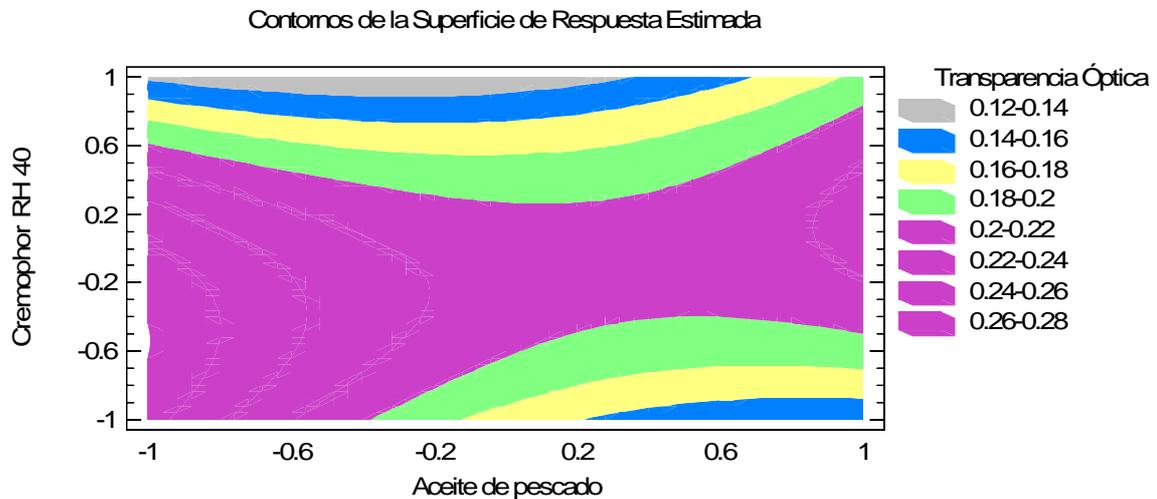


Figura 13. Gráfica de contornos en función de la concentración de aceite y de la concentración de ACH 40.

La zona indicada con color morado es la zona donde los sistemas muestran ser más claros, se puede observar que la transparencia óptica es mayor a 0.2 en esta zona.

Fuera de esta zona, se encuentran los sistemas que presentan una transparencia óptica menor a 0.2, y que en su apariencia, son sistemas turbios.

5.3 Tamaño de glóbulo

La tabla 11 muestra los resultados obtenidos de la medición de tamaño de glóbulo de los ensayos 8, 10, 11, 12, 13, y 14. En el apéndice 4, se encuentran las gráficas de distribución de tamaño, obtenidas con el equipo Zetasizer Nano.

Tabla 11. Resultados del tamaño de glóbulo en determinados ensayos.

Ensayo	Aceite (%)	ACH 40 (%)	Promedio de las mediciones (nm)
8	2	22.5	99.58
10	5	20	56.68
11	3	25	262.17
12	3	15	71.86
13	1	20	30.16
14	3	20	35.40

De acuerdo con Attwood, 1994, las microemulsiones se caracterizan por tener un determinado tamaño de partícula (de 10 a 200 nm). En la tabla anterior se puede observar que los ensayos 8, 10, 11, 12, 13 y 14 tienen un promedio de tamaño de glóbulo dentro de ese intervalo. Mientras que el ensayo 11 muestra un promedio de tamaño de glóbulo superior al característico de las microemulsiones. La diferencia entre estos tamaños se debe a la composición de los sistemas. Debido a ello, se analizaron los tamaños de glóbulo respecto a la concentración de los componentes.

Para conocer cómo influye la concentración de aceite en el tamaño de glóbulo del sistema, se realizó un análisis de regresión donde se mantuvo la concentración de ACH 40 constante (20%) y se varió la concentración de aceite de pescado (1%, 3% y 5%). El análisis de varianza (ver apéndice 4, tabla 6) indica que existe una relación entre el tamaño de glóbulo y la concentración del aceite en el sistema, lo cuál permite ajustarla a un modelo.

El modelo lineal: $\text{tamaño} = 20.8519 + 663.083 \cdot \text{aceite}$, muestra una R^2 de 88.64%, sin embargo, el modelo que más se ajusta a los resultados experimentales, con una R^2 de 98.26% es:

$$\text{Tamaño} = \exp(3.35738 + 267.769 \cdot \text{aceite}^2)$$

La figura 14 muestra una representación de tal modelo. La línea central corresponde al promedio de tamaño de partícula, mientras que las líneas amarillas y negras corresponden al intervalo de una y dos desviaciones estándar, respectivamente.

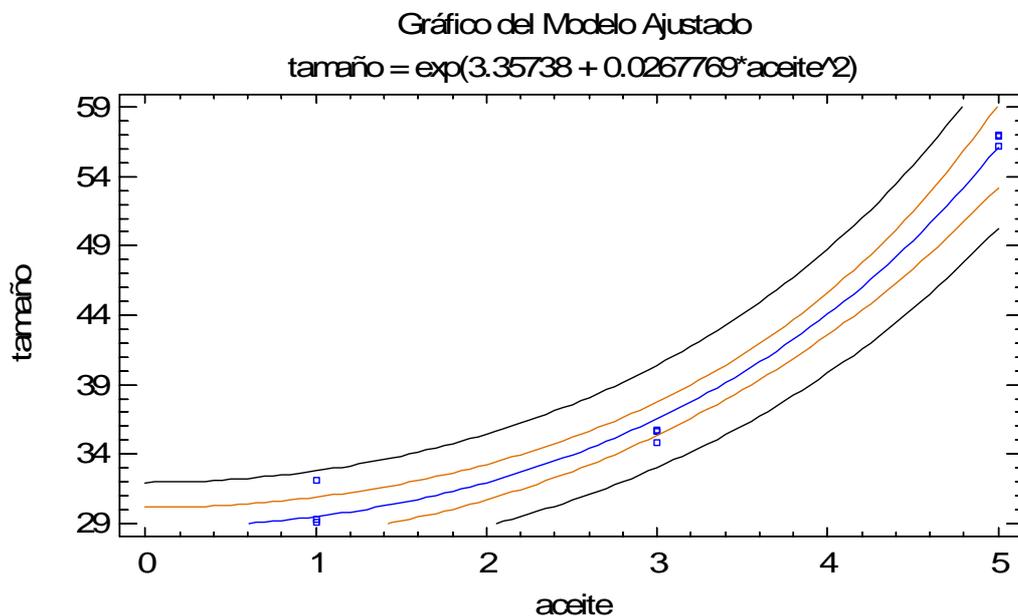


Figura 14. Representación del modelo ajustado (tamaño vs aceite de pescado)

De la misma manera, se llevó a cabo el análisis del efecto en el tamaño del glóbulo respecto a la variación en la concentración de ACH 40 (15%, 20% y 25%), manteniendo constante la cantidad del aceite de pescado (3%); se obtuvo de la tabla de análisis de varianza (apéndice 4, tabla 7) que existe una relación moderadamente fuerte entre el ACH 40 y el tamaño del glóbulo de los sistemas. El modelo lineal obtenido presenta una R^2 de 61.73%:

$$\text{tamaño} = -271.179 + 1813.15 \cdot \text{ACH}.$$

5.4 Medición de pH

La tabla 12 muestra los resultados obtenidos de la medición de pH:

Tabla 12. Resultados obtenidos de la medición de pH

Muestra	pH			promedio
	1	2	3	
1	4.3	4.35	4.3	4.32
2	4.15	4.16	4.17	4.16
3	4.36	4.27	4.34	4.32
4	4.22	4.2	4.21	4.21
5	4.26	4.34	4.34	4.31
6	4.33	4.33	4.29	4.32
7	4.28	4.23	4.28	4.26
8	4.33	4.3	4.33	4.32
9	4.17	4.28	4.25	4.23
10	4.29	4.28	4.22	4.26
11	4.36	4.35	4.34	4.35
12	4.28	4.26	4.21	4.25
13	4.27	4.29	4.28	4.28
14	4.31	4.32	4.3	4.31

Para determinar la existencia de una diferencia significativa del pH entre los sistemas, se llevó a cabo el análisis de varianza utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XV.II.

De la prueba ANOVA, se obtiene una $P < 0.05$ (apéndice 3, tabla 1) por lo que existe una diferencia estadísticamente significativa del promedio de pH entre ensayos. El análisis de pruebas de múltiple rangos (tabla 2 del apéndice 4), indica la presencia de 6 diferentes grupos homogéneos con diferente pH.

La figura 15 esquematiza los promedios de pH para los diferentes ensayos, se puede observar a simple vista que existe diferencia entre ciertos grupos.

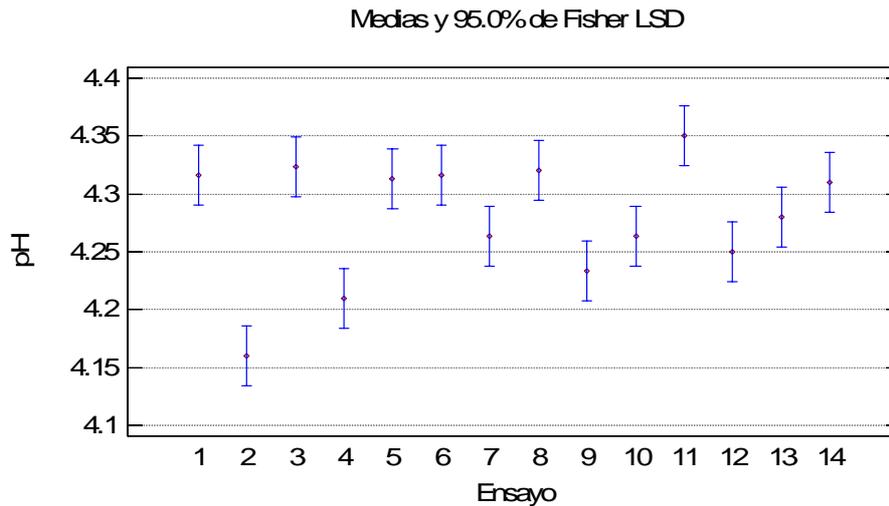


Figura 15. Gráfica de medias de pH en los diferentes ensayos.

Para determinar qué condiciones causan una diferencia en el pH se realizó un análisis estadístico de éste en función de la cantidad de fase acuosa (solución reguladora de pH), de la concentración de aceite y en función de la concentración de ACH 40.

En primera instancia, se estableció la concentración de ACH 40 (20%) constante y se determinó la cantidad de fase acuosa como factor variable. El ANOVA para pH en función de la cantidad de fase acuosa muestra una $P > 0.05$, por lo que no hay una diferencia estadísticamente significativa de pH en función de la cantidad de solución reguladora de pH (apéndice 3, tabla 3)

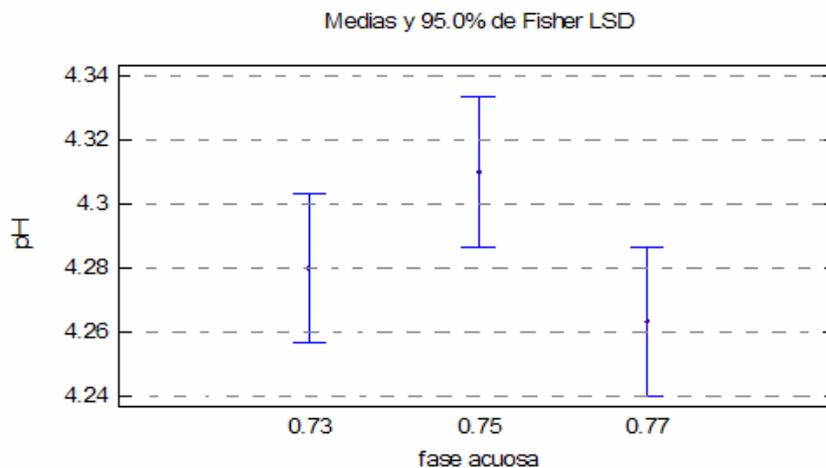


Figura 16. Promedios de pH en función de la cantidad de fase acuosa

Resultados

En la figura anterior, se puede observar que los promedios con intervalos, se traslapan, mostrando que no hay una diferencia con significancia estadística en el pH, cuando se varía la cantidad de fase acuosa, que corresponde a la solución reguladora e pH.

Se observa, en la figura 16, la media de pH en función de la concentración de aceite, donde se aprecia que existe una variación muy pequeña en la medida de pH cuando se modifica la concentración del aceite de pescado. Incluso se puede mencionar que aparentemente no cambia el pH en función de la concentración de aceite.

La tabla ANOVA para pH en función de la concentración de aceite, indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de aceite y otro, con un nivel del 95.0% de confianza ($P > 0.05$). Ver apéndice 3, tabla 4

Lo que muestra que el pH no se verá afectado cuando la concentración de aceite se modifica en el sistema

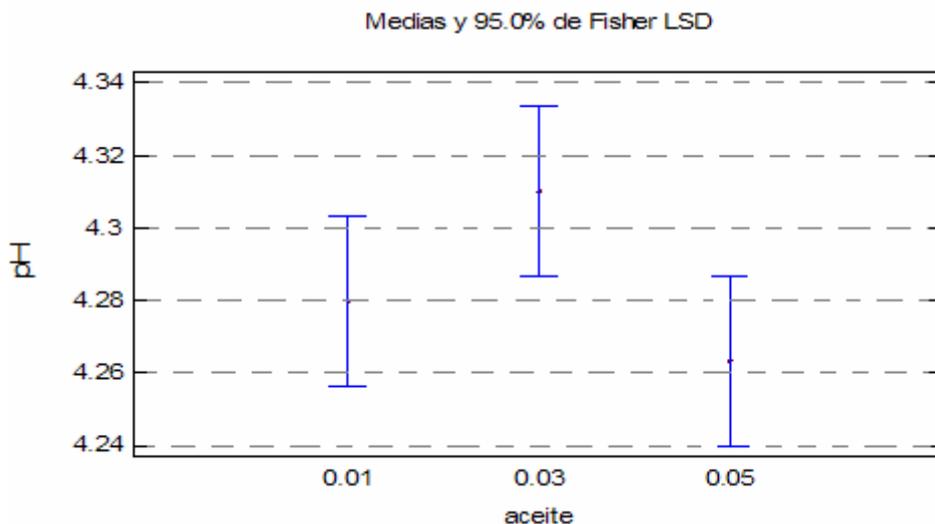


Figura 17. Gráfica de medias de pH en función de la concentración de aceite

Se realizó también, un ANOVA de pH en función la concentración de ACH 40, donde éste último se determinó como factor variable, mientras que el aceite de pescado se mantuvo en una concentración constante (3%).

Resultados

El siguiente gráfico muestra las medias de pH en función de la concentración de ACH 40, lo que permite observar una diferencia práctica en los resultados. En la gráfica destaca que mientras la concentración de ACH 40 aumenta, el pH de los sistemas, es mayor:

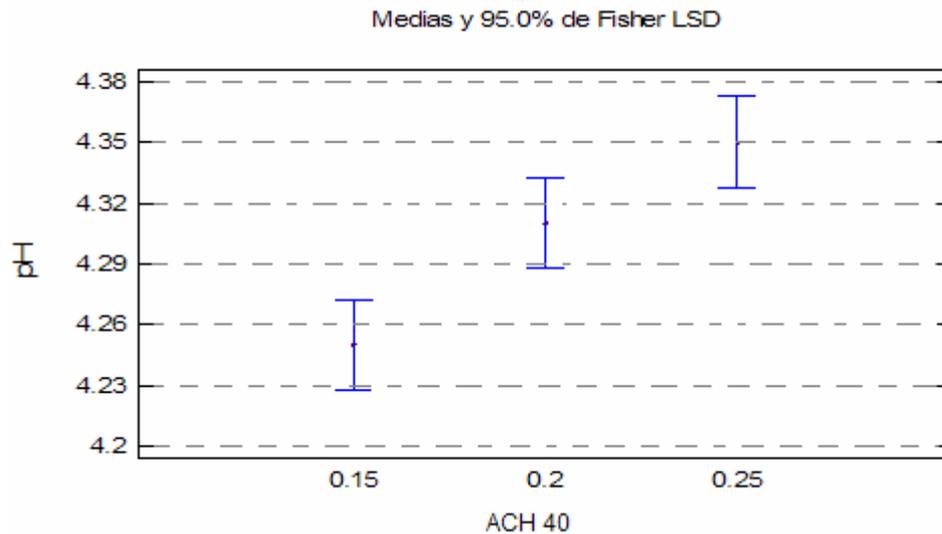


Figura 18. Medias de pH en función de la concentración de ACH 40

La tabla ANOVA de pH en función de la concentración de ACH 40, indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de ACH 40 y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. ($P < 0.05$) (Ver apéndice #3, tabla 5)

En la información técnica del ACH 40, se menciona que una solución acuosa de éste al 10%, presenta un pH entre 6 y 7. Y que si el sistema es calentado a 120°C para su esterilización puede presentarse una disminución del pH, sin embargo, no se ha encontrado información de que la concentración de ACH 40 provoque un aumento de pH.

Debido a esto, se realizó un estudio experimental para evaluar el efecto del pH en función del ACH 40, para esto, se determinó el pH de 50 ml de agua purificada a temperatura ambiente, el cuál fue de 5.9; se calentaron los 50 ml de agua a 65°C (que es la temperatura a la cuál se utiliza el ACH 40), se

Resultados

adicionaron 5 gramos de ACH 40 a 65°C (para obtener una concentración del 10%) y se midió el pH, dando un resultado promedio de 6.16 a 65°C y de 6.12 a temperatura ambiente. La solución se calentó nuevamente, y se adicionaron otros 5 gramos de ACH 40 (concentración final de 20%), obteniendo una pH promedio de 6.29 a 65°C y 6.25 a temperatura ambiente. Lo anterior indica que al aumentar la concentración de ACH 40 en un medio acuoso, el pH aumentará su valor en el orden de décimas.

Una vez que se ha establecido la dependencia del pH respecto a la concentración del ACH 40, se buscó el modelo que más se ajuste a esta relación, encontrándose el modelo lineal, con un coeficiente de correlación igual a 0.907841:

$$\text{pH} = 4.10333 + 0.01 * \text{ACH 40}.$$

El siguiente gráfico muestra la representación esquemática de dicho modelo:

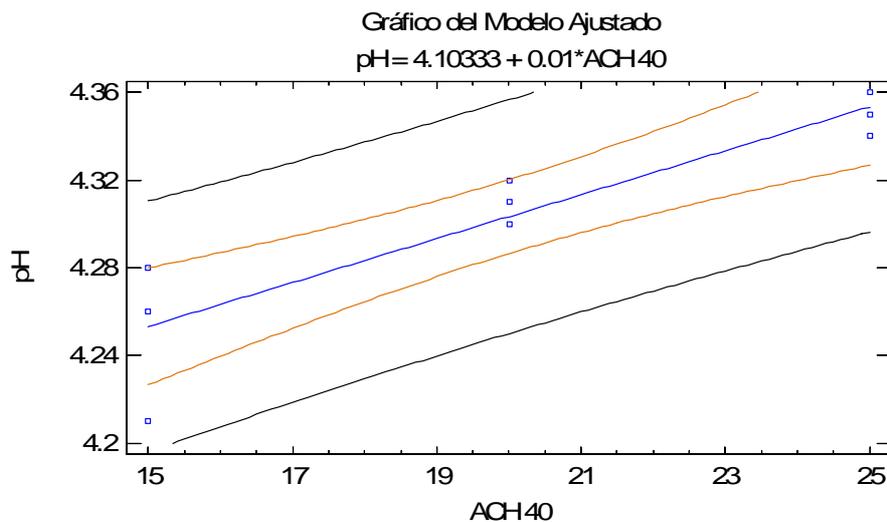


Figura 19. Modelo ajustado de pH en función de la concentración de ACH 40

El siguiente esquema (Diagrama de Pareto) muestra los factores que afectan de manera significativa al pH. Los efectos son la concentración de ACH 40 y el efecto cuadrático de la concentración de aceite.

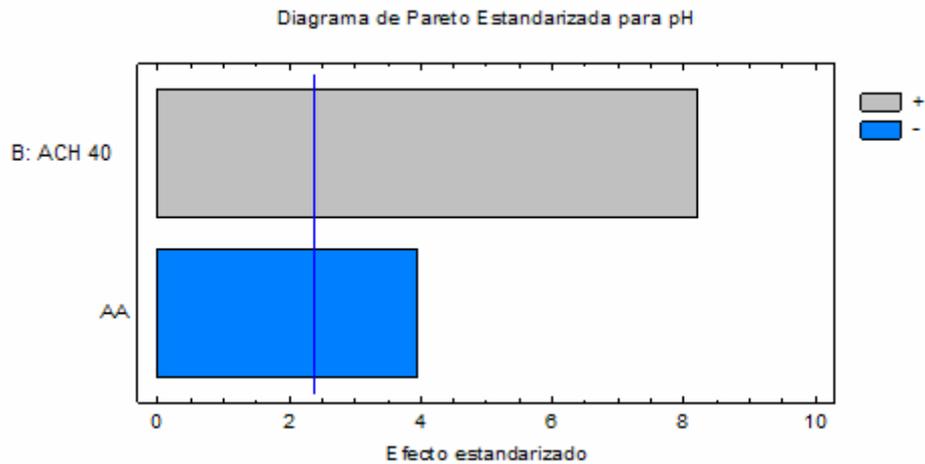


Figura 20. Diagrama de Pareto Estandarizada para pH

El análisis de varianza realizado para los efectos estandarizados, (apéndice # 3, tabla 6), indica que ambos efectos (ACH 40 y efecto cuadrático del aceite) son significativamente diferentes de cero.

En la figura 21, se muestra la gráfica de efectos principales para pH, en la cuál se observa que a medida de que hay un incremento en la concentración de aceite, el pH aumenta, hasta un punto máximo, después del cuál éste empieza a disminuir. Mientras que para el ACH 40, existe una relación más directa.

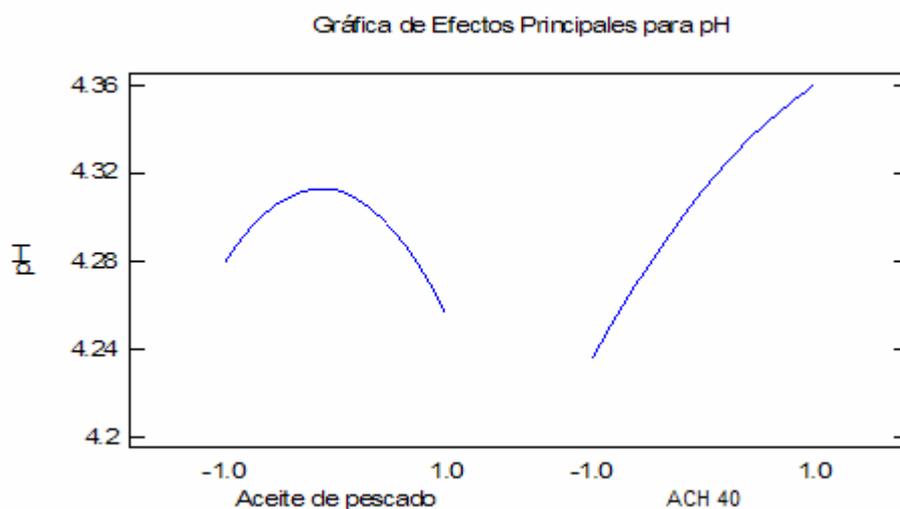


Figura 21. Efectos principales para pH

En la figura 22 aparece la superficie de respuesta para el pH en función de la cantidad de aceite y de ACH 40:

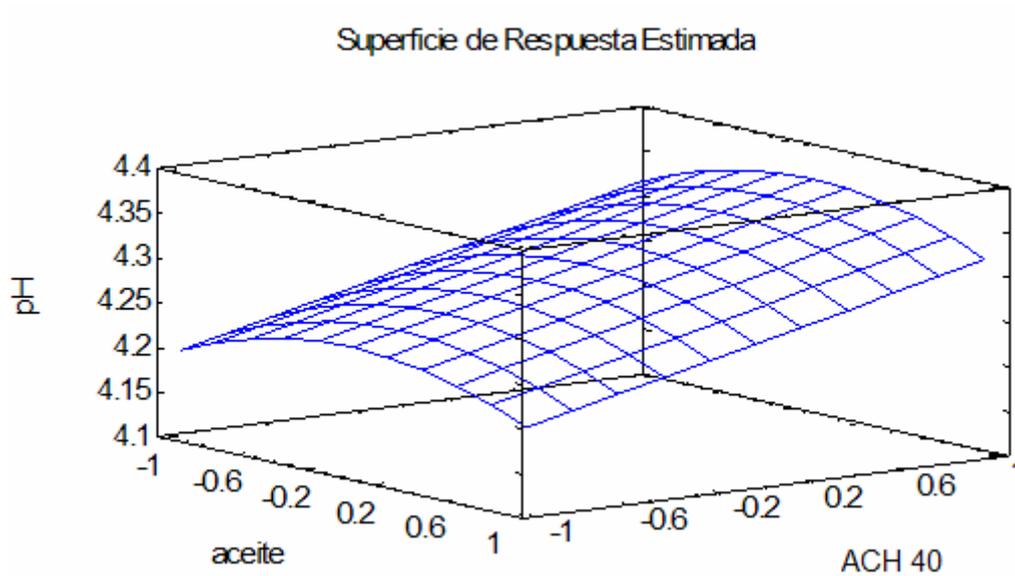


Figura 22. Superficie de respuesta estimada

El modelo que representa la superficie de respuesta es:

$$\text{pH} = 4.31214 - 0.0116667 \cdot \text{aceite} + 0.0616667 \cdot \text{ACH} - 0.0442857 \cdot \text{aceite}^2 + 0.0125 \cdot \text{aceite} \cdot \text{ACH} - 0.0142857 \cdot \text{ACH}^2$$

R^2 de 92.2175%

6. Conclusiones

Se realizó un diagrama pseudoternario, en base al diseño de experimentos.

La concentración de ACH 40 a la cuál se formará una microemulsión es de 20% cuando se utilizan concentraciones de 1%, 3% y 5% de fase oleosa y de 15% de ACH 40 cuando se utiliza la cantidad mínima propuesta de aceite.

En base a la caracterización de los sistemas se concluye que:

- Visualmente la apariencia y claridad de algunos sistemas, indican la presencia de microemulsiones, sin embargo, esto no asegura que realmente se trate una de éstas.
- Sólo aquéllos con una transparencia óptica superior a 0.2, y un tamaño de glóbulo entre 30 y 60 nm pueden clasificarse como microemulsiones, por lo que puede mencionarse que sólo se logro la formación de la microemulsión para los ensayos 10, 13 y 14
- Se encontró además que un aumento en la concentración de ACH 40, puede incrementar ligeramente el pH

Lista de abreviaturas

- ACH 40: aceite de castor hidrogenado polietilenglicolizado
- AG: ácido graso
- AGMI: ácido graso monoinsaturado
- AGPI: ácido graso poli insaturado
- BHT: butilhidroxitolueno
- DHA: ácido docosahexaenoico
- EDTA: ácido etilendiamino tetracético
- EPA: ácido eicosapentaenoico
- LBT₅: compuesto con escasa actividad proinflamatoria
- n-3 u omega 3: nombre utilizado para indicar una saturación partiendo del carbono terminal
- Rpm: revoluciones por minuto
- TXA₃: proagregante plaquetario muy débil

Certificado analítico del Aceite de pescado.



FISH OIL

TYPICAL ANALYSIS
(3 Year Average)

	Typical	Range
Free Fatty Acids (as Oleic), %	0.2	0.05 - 0.50 (max)
Iodine Value (Wijs)	172	170 - 200
Color (Gardner Scale)	7	6 - 8
Moisture & Impurities, %	0.2	0.2 - 0.5 (max)
Total omega 3 Fatty Acids, %	35.15	30 - 40
Total omega 6 Fatty Acids, %	5.44	4 - 6
Omega 6 : Omega 3 ratio	0.15	
EPA + DHA	25.05	

TYPICAL FATTY ACID COMPOSITION

C10:0	Capric	0.00	C19	Isoarachidic	0.00
C12:0	Lauric	0.12	C20	Arachidic	0.30
C13:0	Brassylic	0.06	C20:1	Gadoleic	1.59
C14:0	Myristic	8.48	C20:2 (ω6)	Auricolic	0.32
C14:1	Myristoleic	0.22	C20:3 (ω6)	Bishomopinolenic	0.44
C15:0	Pentadecanoic	1.07	C20:4 (ω3/ω6)	Arachidonic	2.55
C15:1	Pentadecenoic	0.03	C20:5 (ω3)	Eicosapentaenoic	12.73
C16:0	Palmitic	17.52	C21:0	Heneicosanoic	0.00
C16:1	Palmitoleic	11.51	C21:5 (ω3)		0.64
C16:2	Hexadecadienoic	1.49	C22:0	Behenic	0.14
C16:3	Hiragonic	1.30	C22:1	Erucic	0.73
C16:4 (ω3)	Hexadecatetraenoic	1.02	C22:2		0.05
C17	Heptadecanoic	1.06	C22:4 (ω6)	Adrenic	0.36
C17:1	Heptadecenoic	0.64	C22:5 (ω3)	Clupanodonic (DPA)	2.78
C18	Stearic	3.10	C22:6 (ω3)	Docosahexaenoic	12.31
C18:1	Oleic	9.52	C23:0	Tricosanoic	0.05
C18:2 (ω6)	Linoleic	1.96	C24:0	Lignoceric	0.00
C18:3 (ω3/ω6)	Linolenic	2.18	C24:1	Selacholeic	0.44
C18:4 (ω3)	Moroctic	3.30			

These values are typical of menhaden. Depending on supply availability, it may be necessary to supplement with oil of similar composition from other fish species. refolspecsh/rev3/12/2008



Omega Protein, Inc. operates the only fully integrated marine oil refinery in the United States. This oil has been fractionated for better handling characteristics such as flowability, alkali refined to reduce free fatty acids, and clay bleached to reduce color and odor bodies as well as oxidative precursors. This facility also has the ability to customize its products with various antioxidants and packaging requirements.

Applications:

Agricultural applications include pet food, larval aquaculture, omega-3 shell eggs, rumen bypass feeds, equine performance & nutrition, better immune response, coat condition, and increased quality of life for critically ill companion animals.

Industrial applications include leather tanning, alkyds for paints, drilling fluids, lubricants, water proofing, dyes, deflocculants, releasants, and fatty acid production.

Storage & handling:

Due to the nature of a polyunsaturated oil such as Virginia Prime Gold, proper handling is required to ensure oil stability and quality. The following are recommended handling suggestions.

Virginia Prime Gold has been fractionated to reduce stearine, however storing containers for extended periods of time in temperatures below 45°F may cause additional stearine crystals to appear. This is a normal occurrence at low temperatures

Supplemental information:

Refractive Index (@ 60 °C)	1.4645	Specific Heat (cal/g)	0.53
Saponification Value	195	Heat of Fusion (cal/g)	54
Unsaponifiable Matter (%)	1	Slip Melting Point, °C	13
Titer (°C)	32	Boiling Point, °C	>250
Caloric Value (cal/g)	9.5	Flash Point (°C)	360
Metabolizable Energy, Cal/lb	4199	Viscosity (cps)	
Metabolizable Energy, Cal/kg	9257		@ 20 °C 75
Specific Gravity			@ 50 °C 25
	@ 15 °C 0.92		@ 90 °C 10
	@ 30 °C 0.91		
	@ 45 °C 0.90		



Note: Since this material is derived from a living source the actual values may vary.

2105 City West Blvd, Ste 500, Houston, TX 77042-2838

Phone: 713 623 0060 Fax: 713 940 6166

www.omegaproteininc.com

These values are typical of menhaden. Depending on supply availability, it may be necessary to supplement with oil of similar composition from other fish species. rafolspecsh/rev3/12/2008

Tablas de ANOVA de los diferentes análisis estadísticos.

Tabla 1. Tabla ANOVA para pH de los diferentes ensayos realizados

Tabla ANOVA para pH por ensayo

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.108012	13	0.00830861	8.72	0.0000
Intra grupos	0.0266667	28	0.000952381		
Total (Corr.)	0.134679	41			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de pH en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 8.72404, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de ensayo y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 2. Pruebas de Múltiple Rangos para pH por ensayo

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Ensayo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	3	4.16	X
4	3	4.21	XX
9	3	4.23333	XX
12	3	4.25	XX
10	3	4.26333	XX
7	3	4.26333	XX
13	3	4.28	XXX
14	3	4.31	XXX
5	3	4.31333	XXX
1	3	4.31667	XX
6	3	4.31667	XX
8	3	4.32	XX
3	3	4.32333	XX
11	3	4.35	X

Se han identificado 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla 3. Tabla ANOVA para pH en función de la cantidad de fase acuosa

Tabla ANOVA para pH por fase acuosa

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00335556	2	0.00167778	3.08	0.1200
Intra grupos	0.00326667	6	0.000544444		
Total (Corr.)	0.00662222	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de pH en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.08163, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de fase acuosa y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 4. Tabla ANOVA para pH en función de la concentración de Aceite

Tabla ANOVA para pH por aceite

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00335556	2	0.00167778	3.08	0.1200
Intra grupos	0.00326667	6	0.000544444		
Total (Corr.)	0.00662222	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de pH en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 3.08163, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de aceite y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 5. Tabla ANOVA para pH en función de la concentración de ACH 40

Tabla ANOVA para pH por ACH 40

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.0152	2	0.0076	15.20	0.0045
Intra grupos	0.003	6	0.0005		
Total (Corr.)	0.0182	8			

El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de pH en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 15.2, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de pH entre un nivel de ACH 40 y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 6. Análisis de varianza para pH

Análisis de Varianza para pH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Aceite de pescado	0.000816667	1	0.000816667	7.28	0.0542
B:ACH 40	0.0228167	1	0.0228167	203.35	0.0001
AA	0.00457619	1	0.00457619	40.79	0.0031
AB	0.000625	1	0.000625	5.57	0.0776
BB	0.00047619	1	0.00047619	4.24	0.1084
Error total	0.00044881	4	0.000112202		
Total (corr.)	0.03041	9			

R-cuadrada = 98.5241 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 96.6793 por ciento
Error estándar del est. = 0.0105926
Error absoluto medio = 0.00552381
Estadístico Durbin-Watson = 3.07939 (P=0.7714)
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.597954

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de pH en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 7. Regresión simple “tamaño vs aceite”

Variable dependiente: tamaño (nm)
Variable independiente: aceite (variable)
Logarítmico-Y Cuadrado-X: $Y = \exp(a + b \cdot X^2)$

Coefficientes

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	3.35738	0.020675	162.388	0.0000
Pendiente	267.769	13.4678	19.8822	0.0000

NOTA: intercepto = ln(a)

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.642436	1	0.642436	395.30	0.0000
Residuo	0.0113763	7	0.00162518		
Total (Corr.)	0.653812	8			

Coefficiente de Correlación = 0.991262
R-cuadrada = 98.26 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98.0114 por ciento
Error estándar del est. = 0.0403136
Error absoluto medio = 0.02603
Estadístico Durbin-Watson = 0.954262 (P=0.0101)
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.194748

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo log-Y X-cuadrada para describir la relación entre tamaño y aceite. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{tamaño} = \exp(3.35738 + 267.769 \cdot \text{aceite}^2)$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre tamaño y aceite con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98.26% de la variabilidad en tamaño. El coeficiente de correlación es igual a 0.991262, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.0403136.

Tabla 8. Regresión simple “tamaño vs ACH 40”

Variable dependiente: tamaño

Variable independiente: ACH (variable)

$$\text{Raíz Cuadrada-Y Cuadrado-X: } Y = (a + b \cdot X^2)^2$$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.444071	2.91402	-0.152391	0.8848
Pendiente	220.15	66.05	3.33307	0.0207

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	78.0646	1	78.0646	11.11	0.0207
Residuo	35.1346	5	7.02691		
Total (Corr.)	113.199	6			

Coeficiente de Correlación = 0.830435

R-cuadrada = 68.9622 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 62.7546 por ciento

Error estándar del est. = 2.65083

Error absoluto medio = 2.06785

Estadístico Durbin-Watson = 1.00372 (P=0.0127)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.306558

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo raíz cuadrada-Y X-cuadrada para describir la relación entre tamaño y ACH 40. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{tamaño} = (-0.444071 + 220.15 \cdot \text{ACH}^2)^2$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre tamaño y ACH 40 con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 68.9622% de la variabilidad en tamaño. El coeficiente de correlación es igual a 0.830435, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.

Distribución de tamaño de glóbulo en determinados ensayos

Para determinar el tamaño de partícula de los ensayos, se utilizó el equipo Zetasizer Nano. El cuál tiene la capacidad de correlacionar el movimiento browniano de los glóbulos de los sistemas con el tamaño de estos mediante un algoritmo. Con este equipo se mide la absorbancia de la luz y se correlaciona con la distribución del tamaño.

Condiciones de medición: Temperatura ambiente (25°C)

Tabla 1. Diámetro promedio y desviación estándar de los ensayos a los que se les determinó tamaño de glóbulo

Ensayo #	Diámetro promedio (nm)	Desviación estándar (nm)
8	99.58	19.21
10	56.68	0.4029
11	262.17	79.22
12	71.86	50.27
13	30.16	1.711
14	35.40	0.4661

A continuación se muestran las gráficas de distribución de tamaño de glóbulo para los diferentes ensayos realizados. En cada gráfica se observan tres corridas de la muestra (representadas gráficamente en diferentes colores), lo que permite una mayor confianza en la medición del tamaño del glóbulo. La amplitud del área bajo la curva, se relaciona con el tamaño de glóbulo de la muestra.

En la parte de arriba de las imágenes, se indica el diámetro y la intensidad obtenidas de cada corrida.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 115.5	Peak 1: 20.31	34.2	6.706
Pdl: 0.604	Peak 2: 1555	25.9	626.9
Intercept: 0.953	Peak 3: 120.5	25.0	48.24

Result quality : Refer to quality report

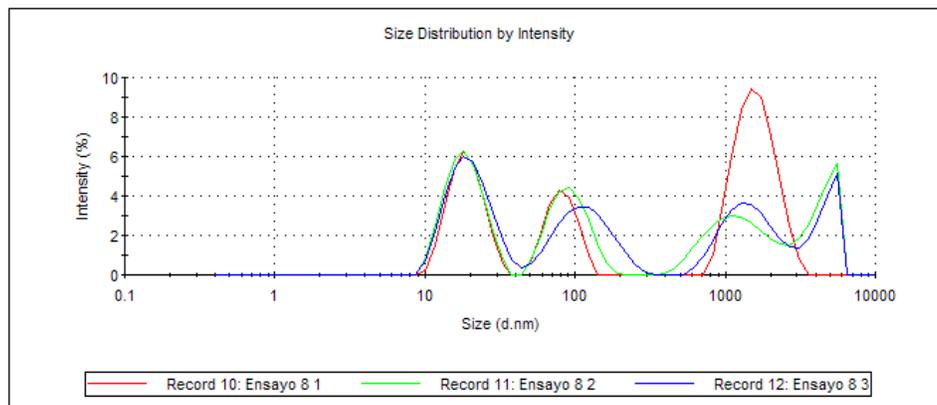


Figura 1. Distribución de tamaño de glóbulo para el ensayo 8

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 56.85	Peak 1: 104.8	86.2	62.50
Pdl: 0.431	Peak 2: 17.47	13.8	4.552
Intercept: 0.959	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good

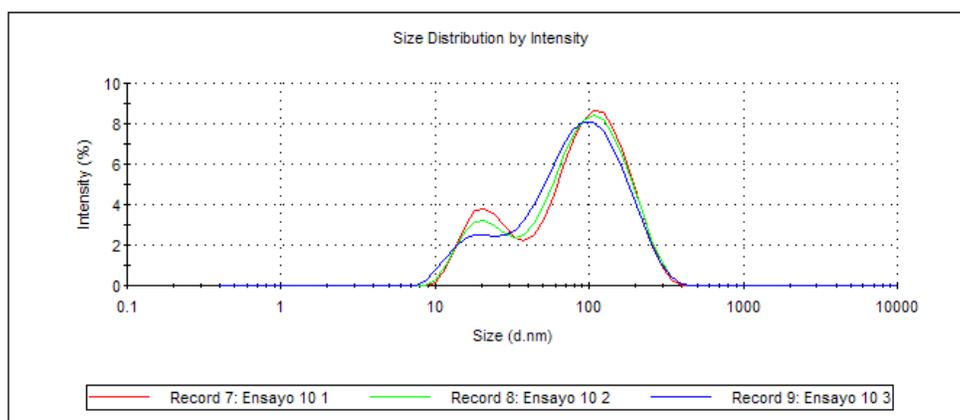


Figura 2. Distribución de tamaño de glóbulo para el ensayo 10

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 268.2	Peak 1: 142.2	34.9	39.94
Pdl: 0.566	Peak 2: 22.30	31.6	6.389
Intercept: 0.950	Peak 3: 1157	25.3	300.6

Result quality : Refer to quality report

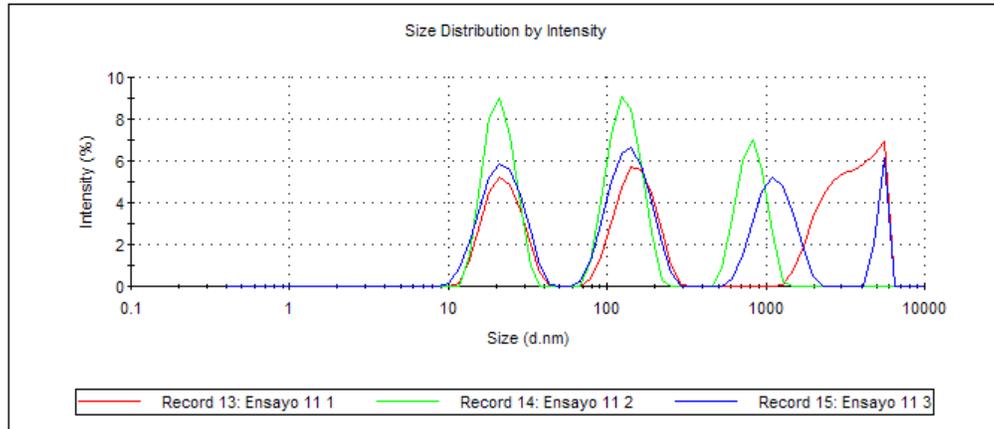


Figura 3. Distribución de tamaño de glóbulo para el ensayo 11

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 42.66	Peak 1: 52.87	88.3	33.25
Pdl: 0.470	Peak 2: 4112	6.9	1113
Intercept: 0.965	Peak 3: 1089	4.8	419.8

Result quality : Good

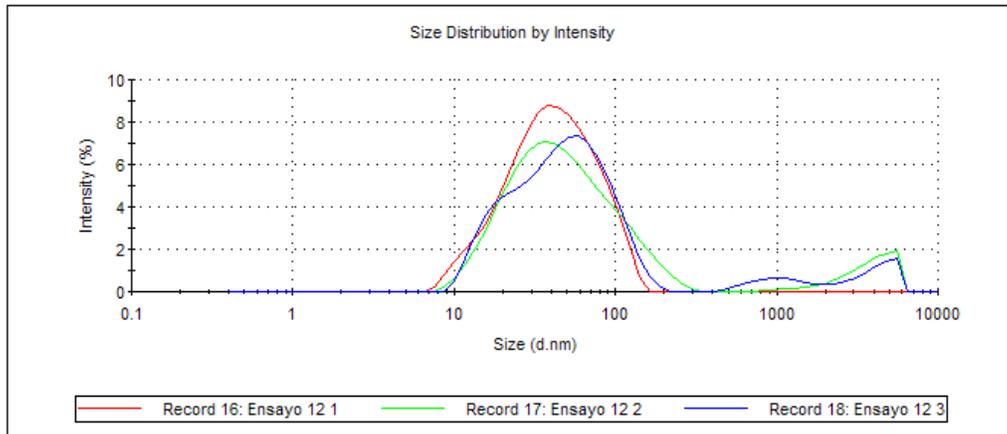


Figura 4. Distribución de tamaño de glóbulo para el ensayo 12

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 29.05	Peak 1: 19.55	63.5	6.449
Pdl: 0.468	Peak 2: 2498	21.5	1344
Intercept: 0.960	Peak 3: 137.1	14.9	43.80
Result quality : Refer to quality report			

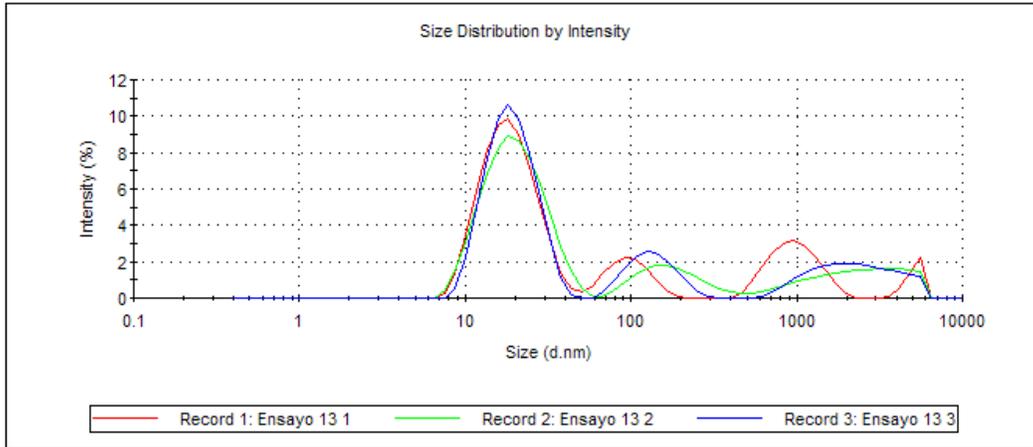


Figura 5. Distribución de tamaño de glóbulo para el ensayo 13

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 35.70	Peak 1: 27.15	52.8	11.70
Pdl: 0.420	Peak 2: 120.0	47.2	64.29
Intercept: 0.949	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			

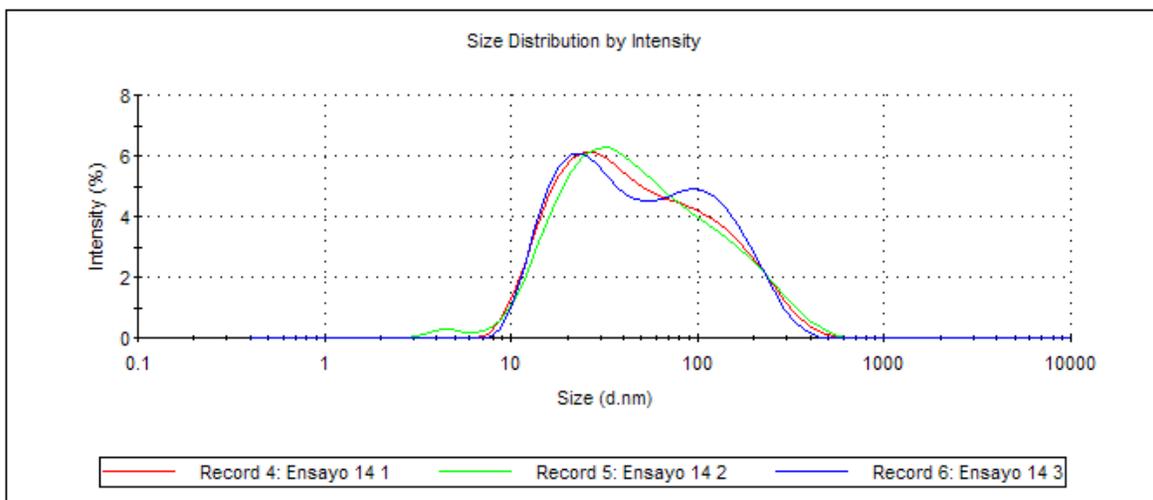


Figura 6. Distribución de tamaño de glóbulo para el ensayo 14

Bibliografía

1. Abbas, et. Al; Cellular and Molecular Immunology. Saunders Elsevier. 6a ed. 2007. p. 27
2. Adamson, A. Physical Chemistry of Surfaces, 1982. In Lieberman, H. Pharmaceutical Dosage Forms. Disperse Systems. NY: Marcel Dekker, 1988. Vol 1. Página 286.
3. Attwood D. Microemulsions in Colloidal drug delivery systems (J. Kreuter ed.), Marcel Dekker, New York 1994.
4. Bang HO, et.al. The composition of the Eskimo food in Northwestern Greenland. Am J Clin Nutr 1980;33:2657- 2666
5. BASF, Aceite de Castor Hidrogenado Polietilenglicolizado. Technical Information. Aug 1992. Consultada en abril de 2009
6. BASF, Grados de Aceite de Castor Hidrogenado Polietilenglicolizado. Technical Leaflet. May 1992. Consultada en abril de 2009
7. Belluzi A, et. Al. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease. Am J Clin Nutr 2000; 71 (suppl): 3395- 3425
8. Betageri, Guru. Semisolid preparations in Swarbrick James, editor. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. Informa healthcare, 2007. Página 3261.
9. Bittinger SB, et. Al. A double-blind, randomized placebo- controlled trial of fish oil in psoriasis. Lancet 1988; 1: 378- 380

10. Burr ML, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet. 1989;2:757-61
11. Eccleston G.M. Emulsions and Microemulsions in Swarbrick James, editor. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. Informa healthcare, 2007. Página 1562
12. FAO <http://www.rlc.fao.org/bases/alimento>. Consultada en marzo 2009
13. Florence, A., Attwood, D. Physicochemical principles of Pharmacy. USA: PhP. 2006. P. 181
14. Friberg, S.et.al. Surfactant association structures of relevance to cosmetic preparations. In Lieberman, H. Pharmaceutical Dosage Forms. Disperse Systems. NY: Marcel Dekker, 1988. Vol 1. Página 316.
15. Geerling BJ, et. al. Nutritional supplementation with n-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: effects on antioxidant status and fatty acid profile. Inflamm Bowel Dis 2000; 6:77-84.
16. Gil, A. et. AL. Role of dietary long- chain polyunsaturated fatty acids on tissue and lipoprotein composition and susceptibility to peroxidation. Recent Res Devel in Lipids Res 1998;2:333- 368
17. Griffin, W. Soc Cosmet Chem. 1949. In Lieberman, H. Pharmaceutical Dosage Forms. Disperse Systems. NY: Marcel Dekker, 1988. Vol 1. Página 289.

18. Griffin, W.C. Hydrophilic- Lipophilic balance. 1949 in Swarbrick James, editor. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. Informa healthcare, 2007. Página 3201.
19. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ingestión diaria recomendada (IDR) de energía para la población mexicana, 2001. <http://quetzal1.innsz.mx/docs/idren.pdf>. Consultada en abril de 2009
20. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/defunciones.aspx?tema=P>. Consultada en abril de 2009
21. Kazumasa et. Al; Plasma fatty acid composition and incident heart failure in middle-aged adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. American Heart Journal Volume 156, Issue 5, November 2008, Pages 965-974
22. Linn E.E. Microemulsions for intradermal delivery of cetyl alcohol and octyl dimethyl PABA. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. 2007. P. 1563
23. López, A. Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega- 3. Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6:31D-7D
24. Lorenz- Meyer, et. Al. Omega-3 fatty acids and carbohydrates diet for maintenance of remission in Crohn's disease. Scan J Gastroenterol 1996; 31:778- 785
25. Mataix, J; et al. Libro blanco de los Omega-3. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2004. 162 páginas.

26. Matarese, L. et. Al. Nutrición Clínica Práctica. España: Elsevier. P. 125-128. 2004
27. Mathews, C. K., et. al. Bioquímica. Madrid: Pearson Educación, 2002. P. 353- 354.
28. Meinzer A., Mueller E. and Vonderscher J. in Bulletin technique Gattefossé N°88 : 21 – 26. 2003. (<http://www.vetcontact.com/presentations>). Consultada en marzo de 2009
29. Meydani SN, et. Al. Immunologic effects of National Cholesterol Education Panel Step- 2b diets with and without fish- derived n-3 acid enrichment. J Clin Invest. 1993, 92: 105-113.
30. Mitchell, D. et. al. Micelles vesicles and microemulsions. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. 2007. P. 1563.
31. Niazi, Sarfaraz. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations, Liquid Products. Volume 3. Informa Healthcare, 2009. P. 206- 223.
32. Odent, M. La salud y los ácidos grasos esenciales. Barcelona: Ediciones Urano. 1990. P.12-13.
33. Omega-3 essential fatty acid @ 3Dchem.com. Linolenic acid (ALA), omega-3 essential fatty acid. Consultada en abril de 2009
34. Palakurthi, SS; et.al, Inhibition of traslation initiation mediates the anticancer effect of the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid. Cancer Res. 60: 2919- 2925. 2000.

35. Prince L.M. Microemulsions. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. 2007. P 3262
36. Siddiqui RA, et.al. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase- mediated process. Biochim. Biophys. Acta 1499:265- 275. 2001.
37. Sopena, R. Algoritmos en diagnóstico por la imagen. España: Elsevier. 2006. P. 127-128
38. Strickley, R (2004) "Solubilizing excipients in oral and injectable formulations" Pharmaceutical research, Vol. 21, No. 2
39. Tandford, C. The hidrophobic effect. 1980 in Lieberman, H. Pharmaceutical Dosage Forms. Disperse Systems. NY: Marcel Dekker, 1988. Vol 1. Página 328.
40. Teipel, V. et.al. Rheologische eigenschaften von wässrigen nicht- ionischen tensidlösungen on oszillatorischer scherströmung. 2000. Swarbrick James, editor. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd edition. Informa healthcare, 2007. Página 3143.