



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,
para la obtención del Grado Académico de: Doctor en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos

En el campo de: **Nanotecnología aplicada a alimentos**

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS
BIOPOLIMÉRICAS PARA LA ENCAPSULACIÓN DE
ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Instituto de Tecnología de Alimentos-FIQ – UNL

Autor:

Lic. Osvaldo Ernesto SPONTON

Director: MSc. **Liliana G. SANTIAGO**

Co-Director: Dr. **Carlos R. CARRARA**

Miembros del Jurado de la Tesis:

Dr. Luis M. GUGLIOTTA

Dr. Francisco SPERONI

Dr. Sergio VAUDAGNA

2016

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Liliana Santiago por la orientación y guía para el desarrollo de la presente tesis.

A mi co-director Carlos Carrara por su buena predisposición y ayuda no solo en aspectos académicos sino también personales.

Al financiamiento de los siguientes proyectos:

- i) PICT-2014-2636: “Estudio de las propiedades estructurales y biológicas de nanocomplejos formados por albúminas y compuestos bioactivos lipofílicos”. Organismo Financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT).
Directora: Msc. Liliana G. Santiago.
- ii) CAI+D-2013-50120110100-171-LI: “Estrategias de nano y microencapsulación de agentes bioactivos relevantes en salud humana”.
Organismo Financiador: Universidad Nacional del Litoral (UNL).Directora: Msc. Liliana G. Santiago.
- iii) PIO-UNER-CONICET: “Incorporación de nanopartículas biopoliméricas con actividad antimicrobiana en películas biodegradables”. Organismo Financiador: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET). Director Dr. Adrian Perez.
- iv) PICT-2011-1118: “Aprovechamiento de productos forestales no madereros: purificación, caracterización y aplicaciones de goma Brea y goma Espina Corona. Organismo Financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT).
Director. Dr. Carlos Carrara

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de la Beca Doctoral.

Al Sistema Nacional de Microscopía y a José L. Fernández por la adquisición de las imágenes AFM y el asesoramiento al respecto.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos, y la Facultad de Ingeniería Química por brindarme el espacio y los recursos para la realización del desarrollo experimental de la presente tesis.

A mi esposa Gabriela, por ser parte de esta etapa de mi vida y por toda su ayuda brindada.

A mis padres Pilo y Chela, por estar siempre presentes y por los principios de trabajo y de vida que me han inculcado.

A mi hermano Eduardo por su ayuda y asesoramiento en aspectos informáticos.

A mis compañeros Adrián, Silvana, Virginia, Julia, Juan Pablo, Paula, Flavia, Laura, Joana por toda la ayuda brindada y su buena predisposición.

A Beatriz Pierini y Alicia Guibert por su incentivo y aliento en la realización del doctorado.

A Marcelo Schmidt por su buena predisposición y la ayuda brindada en el área técnica de equipamiento de laboratorio.

A Gabriel Vinderola por facilitar la liofilización de las muestras.

A Patricia Zimet por su asesoramiento en RP-HPLC.

RESUMEN

RESUMEN

En los últimos años se han desarrollado nanopartículas biopoliméricas para la encapsulación de compuestos bioactivos. Dichas nanopartículas surgen de las interacciones entre proteínas y polisacáridos (PS), siendo, por lo general, la proteína el vehículo al que se unen los compuestos bioactivos. Varias proteínas han sido estudiadas en este sentido (β -lactoglobulina, albúmina sérica bovina, α -lactoalbúmina, entre otras). Sin embargo, no se ha estudiado a la ovoalbúmina (OVA), que es la proteína mayoritaria de la clara de huevo.

Por otro lado, una de las estrategias para potenciar la capacidad de las proteínas de ligar compuestos bioactivos es el calentamiento de sus soluciones a fin de producir su desnaturalización y agregación.

También se ha demostrado que la unión de un PS a la proteína vehículo, por medio de interacciones electrostáticas, confiere ciertas ventajas concernientes a la protección del compuesto bioactivo.

En este contexto, en la presente tesis se propone la obtención de nanopartículas de OVA (OVAn) por calentamiento para la vehiculización de ácido linoleico (AL), un ácido graso esencial, tomado como modelo de ácido graso poliinsaturado (PUFA). Cabe mencionar que el AL es un compuesto hidrofóbico. Además se propone la caracterización del proceso de formación de complejos AL-OVAn. Por otra parte, se estudian las interacciones OVA-PS, utilizando goma arábiga (GA) y pectina de alto metoxilo (PAM). Por último, se realiza una caracterización de sistemas AL-OVAn, AL-OVAn-GA y AL-OVAn-PAM en polvo obtenidos por liofilización.

Las OVAn obtenidas a partir de tratamiento térmico presentaron un diámetro hidrodinámico que estuvo en un rango de 40-140 nm (determinado por dispersión de luz dinámica) y se registró un aumento con el tiempo de calentamiento, mientras que la

hidrofobicidad superficial (determinada por fluorescencia extrínseca) aumentó de 6 a 8 veces con el tratamiento. Además, mediante microscopía de fuerza atómica se encontró que las OVAn presentaron forma redondeada.

Por otro lado, se realizó la caracterización del proceso de formación de complejos AL-OVAn a través de la evaluación de aspectos estequiométricos, cinéticos, termodinámicos y estructurales. Se encontró que el proceso de formación de complejos AL-OVAn puede ajustarse a un modelo de adsorción de pseudo-segundo orden y que involucra un proceso de adsorción física vía interacciones hidrofóbicas de AL sobre las OVAn, donde los sitios más internos se llenarían primero. La unión del AL a las OVAn es endotérmica, conducida entrópicamente y se completa en menos de 1 h.

Respecto al estudio de las interacciones OVAn-PS para encontrar las mejores condiciones de producción de nanopartículas biopoliméricas para la encapsulación de AL, se determinó el potencial Zeta de los sistemas mixtos y la composición de fases en función del pH (7,0-2,5). Se encontró que la GA se unió en mayor proporción a las OVAn que la PAM, debido a su menor densidad de carga. Además, a $\text{pH} < 6,0$ se produjo la separación de fases, donde el 85% de las OVAn precipitaron independientemente del pH y el PS usado.

Por último, se obtuvieron los sistemas AL-OVAn-GA y AL-OVAn-PAM en polvo y AL-OVAn como control. Se encontró que la presencia de PS aumentó considerablemente la eficiencia y el rendimiento de encapsulación. En cuanto a la estabilidad oxidativa se encontró que el sistema AL-OVAn-PAM fue el que permitió una mayor conservación del AL, seguido por el sistema AL-OVAn y por último AL-OVAn-GA.

En la presente tesis se realizó un abordaje básico involucrando también algunos aspectos prácticos de una metodología que permite la obtención de AL encapsulado en

polvo a partir de su unión a nanopartículas de OVA y la subsiguiente unión de los complejos AL-OVA a un PS.

ÍNDICE

Índic

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Nanotecnología en el sector alimenticio.....	1
1.1.1. Nanoencapsulación.....	3
1.2. Tipos de nanopartículas para encapsulación.....	6
1.3. Métodos de producción de nanopartículas.....	8
1.4. Caracterización de nanopartículas biopoliméricas.....	16
1.5. Materiales utilizados para la producción de nanopartículas para alimentos.....	20
1.5.1. Proteínas.....	20
1.5.1.1. Ovoalbúmina. Características generales.....	21
1.5.1.2. Obtención de OVA.....	24
1.5.1.3. Antecedentes de desnaturalización y agregación por calentamiento de la OVA.....	25
1.5.2. Polisacáridos.....	28
1.5.2.1. Goma arábica.....	29
1.5.2.2. Pectina de alto metoxilo.....	31
1.5.3. Interacciones proteína-polisacárido.....	32
1.6. Compuestos lipofílicos. Vehiculización por formación de complejos.....	38
1.7. Estabilidad química de PUFAs.....	44
1.8. Fundamentación del tema elegido.....	46
2. OBJETIVOS.....	50
2.1. Objetivo general.....	50
2.2. Objetivos específicos.....	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
3.1. Materiales.....	52
3.2. Métodos.....	52
3.2.1. Formación de nanopartículas de OVA.....	52
3.2.2. Caracterización de nanopartículas de OVA y de sus complejos con AL.....	53
3.2.2.1. Determinación de tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz.....	53
3.2.2.2. Evaluación de la morfología por Microscopía de Fuerza Atómica.....	60
3.2.2.3. Determinación de hidrofobicidad superficial y estudio de interacción AL-OVAn por fluorescencia.....	62
3.2.2.3.1. Determinación de hidrofobicidad superficial por fluorescencia extrínseca.....	65
3.2.2.3.2. Determinación de la interacción AL-OVAn por fluorescencia intrínseca.....	65

3.2.2.4. Estudio de formación de complejos proteína-ligando mediante medidas de turbidez.....	67
3.2.2.4.1. Estimación de la estequiometría AL-OVAn por turbidez.....	67
3.2.2.4.2. Determinación de la cinética de formación de complejos AL-OVAn.....	67
3.2.2.5. Determinación de la carga eléctrica superficial por medidas de potencial Zeta.....	70
3.2.2.5. Determinación del potencial Zeta de soluciones de AL, AL-OVAn y OVAn	74
3.2.3. Estudio de las interacciones OVAn-PS.....	74
3.2.3.1. Determinación de la interacción OVAn-PS por turbidez.....	75
3.2.3.2. Determinación de la proteína por el Método de Lowry.....	75
3.2.3.3. Determinación del polisacárido por el Método del fenol-sulfúrico.....	76
3.2.4. Obtención y caracterización de sistemas AL-OVAn-PS en polvo.....	77
3.2.4.1. Determinación de la capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y rendimiento de encapsulación por HPLC.....	78
3.2.4.2. Reconstitución de los polvos.....	84
3.2.4.3. Ensayos de estabilidad oxidativa del AL.....	84
3.3. Tratamiento estadístico de datos.....	85
4. RESULTADOS.....	86
4.1. Obtención y caracterización de nanopartículas de ovoalbúmina.....	88
4.1.1. Análisis del tamaño de partículas de OVA tratada térmicamente.....	88
4.1.2. Estudio de aspectos morfológicos de OVAn por AFM.....	91
4.1.3. Efecto del tratamiento térmico sobre la hidrofobicidad superficial de soluciones de OVA.....	93
4.1.4. Caracterización coloidal de las OVAn en solución.....	96
4.2. Obtención y caracterización de los complejos AL-OVAn.....	100
4.2.1. Efecto del tratamiento térmico sobre la capacidad de ligar AL.....	100
4.2.2. Caracterización del complejo AL-OVAn.....	104
4.2.2.1. Efecto de la temperatura sobre la fluorescencia intrínseca de complejos AL-OVAn.....	105
4.2.2.2. Análisis de la fluorescencia extrínseca del complejo AL-OVAn.....	110
4.2.2.3. Estimación de la estequiometría de formación de complejos AL-OVAn por medidas de turbidez.....	113
4.2.2.4. Análisis de los aspectos cinéticos relativos a la formación de complejos AL-OVAn.....	117
4.2.2.5. Análisis de los aspectos termodinámicos relativos a la formación de complejos AL-OVAn.....	123
4.2.2.6. Consideraciones prácticas derivadas de los parámetros estequiométricos, cinéticos y termodinámicos.....	125

4.2.2.7. Análisis de los aspectos estructurales y morfológicos de los complejos AL-OVAn.....	127
4.2.2.7.1. Análisis de tamaño de partícula y de potencial Zeta.....	127
4.2.2.7.2 Análisis de la morfología de los complejos AL-OVAn evaluada por AFM	129
Estudio de las interacciones OVAn-PS.....	131
4.3. Estudio de las interacciones OVAn-PS.....	132
4.3.1. Análisis de la turbidez y potencial Zeta de sistemas OVAn-PS.....	132
4.3.2. Análisis de la composición de las fases.....	136
4.3.3. Relación entre PS _p y turbidez.....	142
4.3.4. Selección de los sistemas OVAn-PS para la obtención de los sistemas en polvo.....	143
4.4. Caracterización de los complejos AL-OVAn-PS en polvo.....	146
4.4.1. Características generales de los polvos.....	146
4.4.2. Capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y rendimiento.....	146
4.4.3. Reconstitución de los polvos.....	148
4.4.4. Estabilidad oxidativa del AL.....	151
5. CONCLUSIONES.....	155
6. APÉNDICE.....	158
6.1. Lista de símbolos y abreviaturas.....	158
6.2. Figuras y tablas.....	161
7. REFERENCIAS.....	169

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología en el sector alimenticio

En los últimos años se ha presentado un cambio de paradigma tecnológico debido a una gran variedad de procedimientos radicalmente nuevos de manufactura, de producción y almacenamiento energético, de procesamiento alimentario, de tratamiento médico, de procesamiento de información y comunicación, entre otros. Esto se debe a la utilización de la nanotecnología, una forma de ingeniería molecular, que ofrece posibilidades incomparables en los campos antes mencionados (Bowman, 2007, Griego y col. 2016).

La nanotecnología se define como la creación, utilización y manipulación de materiales, dispositivos o sistemas en la escala nanométrica (10^{-9} m) (Fathi y col., 2012). La Comisión Europea define a un nanomaterial como un material natural, accidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado sin unir, o como agregado, o aglomerado, donde al menos el 50% de las partículas de la distribución de tamaño en número tiene una o más dimensiones externas en el rango de tamaño de 1 a 100 nm (European Commission-a). Sin embargo, no hay justificación científica para la elección de dicho rango, sino, más bien, se debe a que las propiedades específicas descritas de los nanomateriales se encuentran en este rango (European Commission-b; Cushen y col., 2012). Cabe mencionar que por debajo de cierto tamaño crítico, las propiedades de los materiales cambian abruptamente. Este tamaño crítico depende de la propiedad en cuestión y del material, de ahí la dificultad de definir un límite superior en el rango de tamaño para la denominación nano (Cushen y col., 2012).

En el ámbito alimentario no hay una clara definición del término nano. De hecho, existe una cantidad significativa de referencias científicas que utilizan el término nanopartículas para referirse a estructuras con tamaño de unos pocos cientos de

nanómetros, en lugar de estrictamente < 100 nm (Gutiérrez y col., 2013). Incluso se ha sugerido que la nanotecnología en dicho sector involucra estructuras menores a 1000 nm pero mayores a una simple molécula, incluyendo nanopartículas, nanofibras y nanofilms (Joye y col., 2016).

La nanotecnología encuentra aplicación en todos los sectores de la industria alimentaria, desde la producción primaria agrícola, con el desarrollo de sistemas de entrega (*delivery*) de plaguicidas con mejor adherencia y con menor impacto ambiental hasta el desarrollo de envases inteligentes que poseen sensores que dan información al consumidor acerca del estado del producto. Sin embargo, el progreso en este sentido puede verse demorado por la falta de aspectos regulatorios y por los riesgos potenciales (Cushen y col., 2012). De hecho, las principales razones de la incorporación tardía de la nanotecnología en el sector alimentario está relacionada con cuestiones inherentes al rotulado de los productos y los aspectos relativos a la salud de los consumidores (Sozer y Kokini, 2009).

Las aplicaciones nanotecnológicas en la agricultura y en el sector alimentario son relativamente recientes comparado con su uso en *delivery* de drogas y fármacos. En lo que a productos alimenticios se refiere, el desarrollo de la nanotecnología está involucrado en dos aspectos: envases y alimentos en sí. En lo que respecta a envases, la nanotecnología encuentra aplicaciones tales como: i) mejoramiento de los mismos como barreras de gases y de humedad; ii) extensión de la vida útil vía utilización de envases activos; iii) nanoaditivos; iv) envasado inteligente; v) entrega y liberación controlada de nutraceuticos; vi) envases anti-microbianos o autolimpiantes y vii) monitoreo de las condiciones del producto durante su transporte. Por otro lado, en relación al alimento en sí, las aplicaciones nanotecnológicas estarían involucradas en: i) análisis de calidad y seguridad alimentaria (nanosensores); ii) detección de patógenos; iii) enmascaramiento

de sabores; iv) liberación controlada de nutrientes encapsulados; v) protección a la oxidación y vi) *delivery* de nutracéuticos y *flavors* nanoencapsulados (Robles-García y col., 2016; Sozer y Kokini, 2009). Es importante mencionar que el desarrollo de ingredientes alimenticios nanoestructurados y sistemas de *delivery* para nutrientes y suplementos constituye el principal foco de las aplicaciones nanotecnológicas en el sector alimentario (Robles-García y col., 2016). Los sistemas de entrega o *delivery* se definen como el atrapamiento (encapsulación) de un material bioactivo en un transportador o vehículo para controlar su velocidad de liberación (Tamjidi y col., 2013).

1.1.1. Nanoencapsulación

En general, la encapsulación se define como un proceso que atrapa una sustancia (agente activo) en otra sustancia (material de pared), produciendo partículas en la escala nanométrica (nanoencapsulación), micrométrica (microencapsulación) y hasta milimétrica (Ray y col., 2016).

La sustancia encapsulada, puede ser llamada centro, relleno, fase activa, interna o carga útil, mientras que la sustancia que encapsula el agente activo se llama capa, membrana, cáscara, cápsula, material de transporte, fase externa o matriz (Ray y col., 2016).

La encapsulación de compuestos bioactivos es un concepto relativamente antiguo y se centró originalmente en la protección de las vitaminas frente a la oxidación. Actualmente, la encapsulación constituye una de las aplicaciones más importantes de micropartículas y nanopartículas biopoliméricas en el sector alimentario. En este sentido, uno de los principales atractivos de la encapsulación mediante el uso de micro y nanopartículas radica en su capacidad de controlar el destino biológico de los nutrientes

y nutracéuticos después de la ingestión. Por lo tanto, es posible el diseño de dichas partículas con propiedades a medida (Joye y McClements, 2014).

En lo que respecta a ingredientes activos, se pueden distinguir dos tipos: moléculas bioactivas (es decir, nutracéuticos) y células bioactivas (es decir, probióticos). Una amplia variedad de diferentes nutracéuticos pueden ser encapsulados, incluyendo vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, fitoesteroles, y péptidos bioactivos. La eficacia de los nutracéuticos es fuertemente dependiente de su biodisponibilidad. Los factores que afectan negativamente a la biodisponibilidad son la desestabilización durante el procesamiento, la baja solubilidad y/o permeabilidad en el tracto gastrointestinal, y la degradación/metabolismo en el mismo. En este sentido, la ciencia de alimentos ha estado utilizando conceptos desarrollados en las ciencias farmacéuticas para la administración oral de fármacos para crear sistemas de encapsulación que puedan ser utilizados en alimentos (Joye y McClements, 2014).

Por otro lado, la nanoencapsulación sería una herramienta sumamente útil para diseñar ingredientes que puedan ser utilizados en el desarrollo de alimentos funcionales (Sozer y Kokini, 2009). El sector de los alimentos funcionales constituye uno de los sectores de más rápido crecimiento en la industria alimentaria, debido a la creciente demanda, por parte de los consumidores, de alimentos que promuevan salud y bienestar. El desarrollo de alimentos funcionales es particularmente importante debido a su potencial para prevenir enfermedades, promover la salud y reducir costos en el cuidado de la misma. Una de las formas de lograr estos alimentos es a partir de la adición de nutrientes deseables y bioactivos (Sanguansri y Augustin, 2010). De este modo, se presenta la posibilidad de formular ingredientes funcionales capaces de vehicular compuestos bioactivos para su incorporación en alimentos.

La vehiculización de compuestos bioactivos a través del uso de nanopartículas presentaría varias ventajas: i) protección de nutrientes frente a la degradación por oxidación u otras reacciones químicas o enzimáticas durante la producción y/o almacenamiento, lo que prevendría el desarrollo de sabores y olores indeseables y pérdida de valor metabólico; ii) minimización de efectos adversos sobre algunas características sensoriales tales como la transparencia en ciertas bebidas (Zimet y Livney, 2009), y enmascaramiento de propiedades desagradables (Robles-García y col., 2016); iii) mejor biodisponibilidad debido a las propiedades de liberación, solubilidad, tiempo de residencia prolongada en el tracto gastrointestinal y absorción eficiente de los nutrientes a través de las células (Sozer y Kokini, 2009; Zimet y Livney, 2009); iv) algunos complejos proteína-ácido graso (oleico, linoleico) presentan actividad antitumoral, la cual residiría en el ácido graso, siendo la proteína un agente “solubilizante” del mismo (Fontana y col, 2013). Todo esto, sumado al hecho de que estas nanopartículas pueden ser producidas a partir de simples operaciones de procesamiento usando compuestos de grado alimenticio o GRAS (generalmente reconocidos como seguros) tales como proteínas, lípidos y polisacáridos, permitiría su utilización para el desarrollo de ingredientes alimenticios (McClements y Li, 2010).

De especial interés resulta la vehiculización de compuestos bioactivos de carácter lipofílico para los cuales se han desarrollado sistemas de entrega (*delivery systems*) para su encapsulación, protección y liberación (Matalanis y col., 2011). Dicho interés radica en que existen algunos nutrientes y compuestos lipofílicos bioactivos que no pueden ser sintetizados por el organismo humano. Entre ellos se encuentran aminoácidos, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Ante la imposibilidad de ser sintetizados, estos compuestos deben ser incorporados a través de los alimentos. La ingesta reducida o nula de dichos nutrientes a menudo se asocia con el desarrollo de

diferentes enfermedades, lo cual remarca la importancia de la influencia de la dieta sobre la salud (Ilyasoglu y El., 2014).

Por otro lado, debido a una creciente demanda de alimentos libres o reducidos en materia grasa, las industrias alimentarias se ven motivadas a desarrollar dichos alimentos utilizando sustitutos que imiten las propiedades sensoriales y tecnológicas de las grasas. En este sentido, se ha propuesto que la reducción del contenido de materia grasa de los alimentos con la consecuente disminución en su ingesta podrían proveer cantidades inadecuadas de micronutrientes lipofílicos (Zimet y Livney, 2009). De este modo, se presenta el desafío de incorporar los compuestos lipofílicos en alimentos con matrices acuosas. Esta problemática puede ser abordada desde una estrategia de diseño de micro y nanoestructuras (Ilyasoglu y col., 2014; Matalanis y col., 2011; Zimet y Livney, 2009).

1.2. Tipos de nanopartículas para encapsulación

En la Fig. 1 se muestran algunos tipos de estructuras nanométricas que pueden ser utilizadas para la encapsulación de compuestos lipofílicos (McClements y Li, 2010). La mayoría de las nanopartículas usadas pertenecen al grupo de los coloides (emulsiones, micelas, mono- y bicapas lipídicas) (Sozer y Kokini, 2009). En general, estos sistemas pueden ser divididos en dos grupos: sistemas basados en polímeros y sistemas basados en lípidos (Tamjidi y col., 2013).

Dentro de los sistemas basados en lípidos se encuentran los liposomas, las nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y los vehículos lipídicos nanoestructurados (NLC) (Tamjidi y col., 2013). Estas estructuras se describen brevemente a continuación.

Los liposomas son vesículas que se forman mediante la hidratación de surfactantes tales como los fosfolípidos cuando se mezclan con agua en condiciones de bajo esfuerzo de corte. Los fosfolípidos se disponen en láminas al unirse las colas entre sí, formando una membrana o bicapa que contiene agua en su interior. Los liposomas son transportadores flexibles, pueden contener compuestos tanto hidrosolubles como liposolubles y proveen también la posibilidad de direccionamiento o vectorización hacia sitios específicos (Tamjidi y col., 2013).

Por otro lado, las nanoemulsiones pueden ser consideradas como emulsiones que poseen gotas muy pequeñas, con un radio medio entre 10 y 100 nm. Las gotas son estabilizadas por una capa que consiste de una mezcla de surfactante y co-surfactante. Las nanoemulsiones son ópticamente transparentes o solo poseen una leve turbidez y presentan mejor estabilidad frente a la separación gravitacional o agregación que las emulsiones convencionales o microemulsiones (Tamjidi y col., 2013).

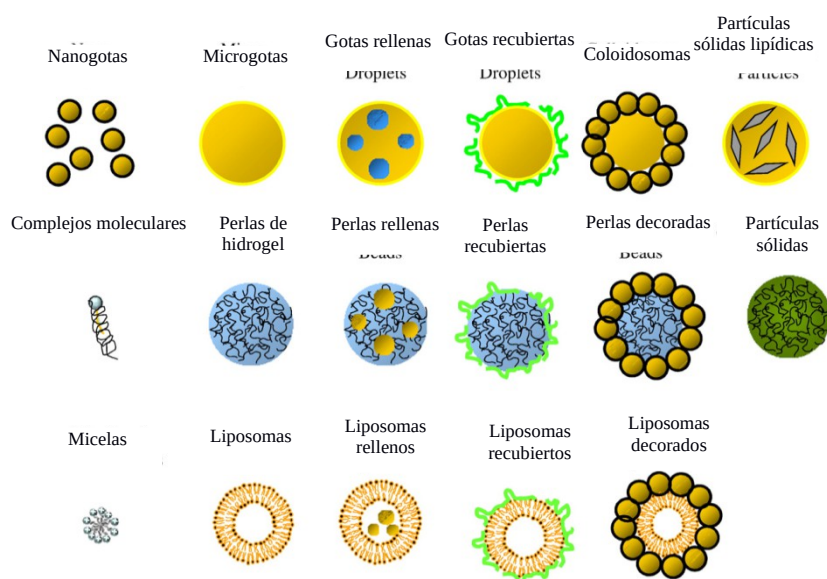


Figura 1. Diferentes estructuras utilizadas para la encapsulación de compuestos bioactivos (McClements y Li, 2010).

Las SLN contienen gotas de lípido que están completamente cristalizadas y poseen una estructura cristalina altamente ordenada con el compuesto bioactivo formando parte de la misma. Las SLN son producidas a partir de un lípido sólido o una mezcla de lípidos sólidos. La liberación del componente bioactivo puede ser controlada a través del estado físico de la matriz lipídica (Tamjidi y col., 2013).

Los NLC son SLN modificadas en las cuales la fase lipídica contiene tanto lípidos sólidos (grasa) como líquidos (aceite) a temperatura ambiente. El aceite se incorpora en el centro de un lípido sólido. Este sistema posee una alta capacidad de carga y liberación controlada. La matriz sólida constituye una barrera que puede proteger el compuesto activo, sensible a factores de deterioro en la fase acuosa (Tamjidi y col., 2013).

En lo que respecta a los sistemas basados en polímeros se destacan aquellos basados en biopolímeros e incluyen: hidrogeles, hidrogeles rellenos, partículas biopoliméricas, complejos de inclusión y complejos de polielectrolitos (Joye y McClements, 2014). Los biopolímeros utilizados incluyen proteínas y polisacáridos (Joye y col., 2016), los cuales se describen en la sección 1.5.

Los hidrogeles nanométricos están formados por una matriz polimérica entrecruzada que retiene gran cantidad de agua. Los hidrogeles también pueden encerrar subestructuras más pequeñas tales como gotas de lípidos lo que constituye las llamadas partículas de hidrogel rellenas (Joye y col., 2016).

Las nanopartículas biopoliméricas poseen un centro interno más denso y con menos contenido de agua que los hidrogeles. Estas nanopartículas pueden ser producidas por desolvatación, desnaturalización térmica de proteínas globulares (proteínas de la soja, huevo y del suero lácteo) o autoensamblados de proteínas flexibles

(caseína) (Joye y col., 2016). Dichos procedimientos se describen en la siguiente sección.

1.3. Métodos de producción de nanopartículas

Para muchas aplicaciones es importante diseñar nanopartículas de modo tal que su composición conduzca a características fisicoquímicas y funcionales deseadas. Por ejemplo, si se desea crear nanopartículas para suministrar un componente antitumoral en el colon, las mismas deberían ser diseñadas para resistir la disrupción en la boca, en el estómago y en el intestino delgado, pero que se disgregue en el colon (Matalanis y col., 2011).

Existen numerosas técnicas para la producción de nanopartículas, las cuales pueden ser clasificadas en dos grupos: de arriba hacia abajo (*top-down*) y de abajo hacia arriba (*bottom-up*) dependiendo del enfoque físico-químico en cuestión (Fig. 2) (Joye y McClements, 2014; Sozer y Kokini, 2009).

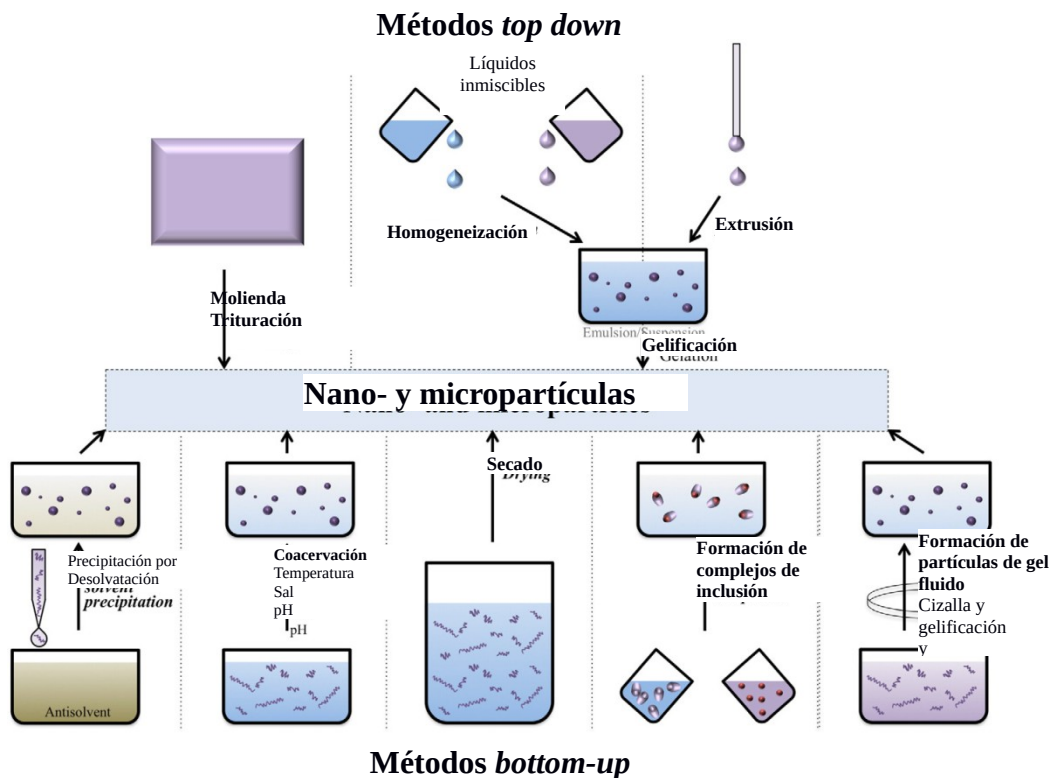


Figura 2. Representación esquemática de diferentes técnicas *bottom-up* y *top-down* usadas en la producción de micro- y nanopartículas (Joye y McClements, 2014).

La metodología *top-down* implica ruptura o disgregación de sólidos o líquidos (o partículas grandes en partículas más pequeñas) mediante esfuerzos mecánicos e incluye procesos como molienda, trituración, homogeneización. Las fuerzas disruptivas que tienen lugar son cizalla, impacto y compresión. Son ampliamente utilizadas pero tienen algunas limitaciones inherentes a equipamiento de alto nivel, mantenimiento y gastos de funcionamiento, y dificultades en la creación de partículas con propiedades estructurales bien definidas. Además, los esfuerzos mecánicos aplicados pueden causar degradación de los compuestos bioactivos. Otro método comúnmente utilizado es la extrusión, donde una partícula se forma mediante la inyección de una solución de biopolímero en un entorno de gelificación (Joye y McClements, 2014).

Las metodologías *bottom-up* implican la construcción de nanopartículas por autoensamblaje o auto-organización de moléculas debido a cambios en las condiciones ambientales, tales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura o la concentración. Ejemplos de ello son la desolvatación, la coacervación y la formación de complejos de inclusión. En general, los requerimientos de energía son menores que los requeridos para estrategias *top-down* y se puede tener mayor control sobre tamaño, morfología y estado físico de las partículas (Joye y McClements, 2014). En este sentido, las partículas biopoliméricas se forman por autoasociación o autoensamblado de uno o más biopolímeros a partir de una solución acuosa de los mismos. Para esto, las condiciones de la solución son alteradas de forma tal que las interacciones biopolímero-biopolímero sean favorecidas por sobre las interacciones biopolímero-solvente (Matalanis y col., 2011). A continuación se detallan algunas de las metodologías *bottom-up* aplicadas a la producción de nanopartículas basadas en biopolímeros.

Desolvatación. Consiste en la agregación de las moléculas del biopolímero en solución (soluto) inducida por una disminución en la calidad del solvente que rodea a las moléculas de soluto, de modo tal que se induce una sobresaturación, lo que constituye la fuerza impulsora para la agregación y posterior precipitación del soluto (Joye y McClements, 2014; Matalanis y col., 2011). Comúnmente, esto se logra mediante la adición de un alcohol a una solución acuosa (biopolímeros polares) o viceversa en caso de biopolímeros apolares. Cuando se alcanza cierto contenido crítico de alcohol las moléculas proteicas en solución tienden a autoasociarse espontáneamente conduciendo a la formación de agregados (Matalanis y col., 2011). La desolvatación es apropiada para producir nanopartículas tanto de proteínas como de polisacáridos. Los solventes comúnmente usados para esta metodología son agua, solventes orgánicos y CO₂ supercrítico. Los solventes a utilizar deben ser miscibles en el rango de concentraciones usadas para la producción de nanopartículas. Luego de que las partículas son formadas debe existir una repulsión suficientemente fuerte entre ellas para prevenir agregación adicional. Es una tecnología atractiva ya que no se necesita equipamiento especial u operaciones complejas, sumado a los bajos costos de producción. Es una técnica ampliamente utilizada para producir nanopartículas con fines farmacéuticos (Joye y McClements, 2014). El principal inconveniente que presenta esta metodología es la recuperación del solvente para su reutilización y eventualmente podría requerir el empleo de agentes entrecruzantes (por ejemplo, glutaraldehído) para consolidar la estructura de las nanopartículas (Rajendran y col., 2016).

Complejos de inclusión. Se refiere a la encapsulación de una molécula bioactiva “huésped” (también llamada “ligando”) en una cavidad o sitio de una molécula que oficia de soporte u “hospedadora” (Fig. 3). Las interacciones pueden ser

tanto específicas como no específicas, siendo las fuerzas involucradas: puente de hidrógeno, van der Waals e interacciones hidrofóbicas. En la industria alimentaria es difícil encontrar biopolímeros que tengan cavidades apropiadas. Algunos ejemplos son las ciclodextrinas, la β -lactoglobulina (BLG), la albúmina sérica bovina (BSA) y el almidón. Esta metodología se ha empleado para la encapsulación de moléculas orgánicas volátiles, enmascaramiento de olores y sabores, y en la preservación de aromas y sustancias lipofílicas bioactivas como resveratrol y ácidos grasos (DHA, CLA, etc) (Joye y McClements, 2014; Matalanis y col., 2011; Zimet y Livney, 2009).

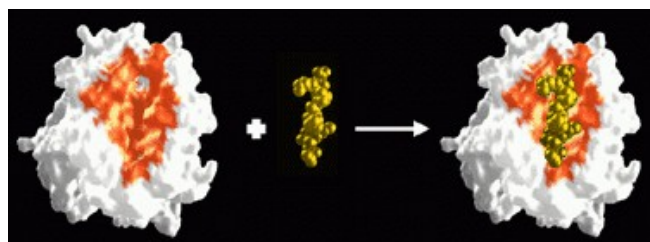


Figura 3. Formación del complejo proteína-ligando ().

Las moléculas de polisacárido individuales que tienen grupos laterales iónicos o no polares también pueden unir lípidos y tensioactivos a través de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas a grupos laterales iónicos o no polares, respectivamente (Matalanis y col., 2011).

Por ejemplo, la formación de los complejos de inclusión entre una proteína y un compuesto lipofílico permite la solubilización del mismo, lo que da lugar al concepto de vehiculización. De este modo, la proteína o partícula proteica sería un nanovehículo del compuesto lipofílico. Es importante remarcar que la vehiculización no solo se limita a nutraceuticos o bioactivos en el ámbito alimentario sino que también se extiende a fármacos hidrofóbicos administrados por vía oral (Gutiérrez y col., 2013; Zimet y Livney, 2009). Además, es importante mencionar que la formación de los complejos de

inclusión involucra un tiempo de incubación del nanovehículo en presencia del compuesto bioactivo en solución para permitir la unión (Joye y McClements, 2014).

La β -lactoglobulina (BLG) tanto en su forma nativa como agregada es una de las proteínas más estudiadas por su capacidad de formar complejos de inclusión con ligandos lipofílicos bioactivos (Lange y col., 1998; Le Maux y col., 2013; Perez y col., 2015; Wang y col., 1999; Zimet y Livney, 2009, etc). Esto se debe a la presencia de sitios específicos de unión al ligando en la superficie de la estructura globular de la proteína nativa. Dichos sitios han sido identificados como dos bolsillos (*pocket*) hidrofóbicos. Uno de ellos consiste en una estructura cónica o β -barril que posee una gran cavidad central hidrofóbica (*calyx*), mientras que el otro se ubica entre la α -hélice y la superficie externa del β -barril. Se considera que el *calyx* es el principal sitio de unión a diferentes ligandos hidrofóbicos (Shpigelman y col., 2014; Wang y col., 1999).

Coacervación. Los coacervados se forman cuando dos biopolímeros con cargas opuestas interactúan entre sí a través de atracciones electrostáticas, aunque también pueden tomar lugar otras interacciones como interacciones hidrofóbicas y puente de hidrógeno. Los biopolímeros pueden precipitar alrededor de un núcleo de compuesto bioactivo encapsulándolo. Estos biopolímeros formarían una pared que puede ser luego entrecruzada para mantener su integridad. Este método hace dificultoso el control del tamaño de partícula dado que no se puede prevenir la aglomeración. Además, dependiendo de los biopolímeros utilizados, las partículas muestran una estabilidad fisicoquímica limitada en varias matrices acuosas (Joye y McClements, 2014).

Es importante mencionar que la atracción electrostática puede darse entre un polisacárido aniónico (PS) y una proteína, la cual a su vez puede estar formando un complejo de inclusión con algún compuesto lipofílico. De este modo, pueden generarse nanopartículas biopoliméricas donde la presencia del PS confiere protección adicional al

compuesto bioactivo y estabilidad coloidal al sistema (Zimet y Livney, 2009). En la sección 1.5.3 se detallan las interacciones entre proteínas y PS.

Entrecruzamiento. Los biopolímeros pueden agregarse por la adición de agentes entrecruzantes a una solución acuosa con una concentración por debajo de la requerida para la formación de un gel macroscópico. De esta forma, se producen geles nanométricos. Los agentes entrecruzantes pueden ser químicos (glutaraldehído o formaldehído), enzimáticos (transglutaminasa, lacasa), o iones minerales (potasio, calcio o tripolifosfato). El entrecruzamiento también puede ser promovido alterando condiciones del medio como presión o temperatura. Los enlaces formados pueden ser químicos (enlaces covalentes) o físicos (enlaces no covalentes), siendo importante este aspecto en la reversibilidad del sistema (Matalanis y col., 2011).

Fotosíntesis. Las proteínas globulares están estabilizadas por enlaces disulfuro (SS) intramoleculares. Normalmente, dichos SS están ocluidos profundamente en la proteína. Recientemente, se ha demostrado que estos SS pueden ser reducidos fotoquímicamente en condiciones fisiológicas y sin la utilización de agentes desnaturizantes o reductores. Esto se debe a que los residuos de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) se excitan bajo la iluminación UV (~250–298 nm) y expulsan electrones. Estos pueden ser capturados por enlaces disulfuro cercanos produciéndose la ruptura de los mismos. De este modo, la proteína sufre un cambio conformacional exponiendo sus sitios hidrofóbicos y agregándose. El desplegamiento y autoensamblado de las proteínas puede ser controlado por el ajuste del tiempo de iluminación y la intensidad de la luz UV. Controlando estas variables pueden formarse agregados nano y micrométricos y hasta fibrillas amiloides. La estabilidad de estas nuevas estructuras es gobernada por la formación de SS intermoleculares (Xie y col., 2015).

Agregación térmica. Es una metodología que se aplica fundamentalmente a las proteínas. La formación de partículas proteicas puede darse cuando soluciones de proteínas globulares se calientan por encima de su temperatura de desnaturalización (T_m) en condiciones donde hay una atracción relativamente débil entre las moléculas de proteínas. El tamaño y la carga de estas partículas se pueden controlar mediante la alteración de la concentración inicial de biopolímero, temperatura y tiempo de calentamiento, pH y fuerza iónica (Matalanis y col., 2011). También se pueden formar a partir de proteínas globulares térmicamente desnaturalizadas utilizando una técnica de formación de partículas en frío. En esta técnica, una solución de proteína globular se calienta por encima de T_m en condiciones donde existe una fuerte repulsión entre las moléculas de proteína de modo que las moléculas se despliegan pero no se agregan extensivamente. Las condiciones de la solución que promueven la repulsión incluyen un pH alejado del pI de la proteína y una fuerza iónica baja. Luego se promueve la asociación proteica mediante el ajuste de pH hacia un valor \sim pI o añadiendo contraiones mono o divalentes como NaCl y CaCl₂, respectivamente. El componente lipofílico a encapsular se puede mezclar con la solución de proteína desnaturalizada térmicamente, antes de la formación de las partículas (Matalanis y col., 2011).

El empleo de agregados proteicos obtenidos térmicamente para el desarrollo de nanovehículos resulta interesante debido a que la capacidad de ligar compuestos lipofílicos aumenta considerablemente, respecto a la proteína nativa, producto de la exposición de sitios hidrofóbicos promovida por el desplegamiento que toma lugar en la desnaturalización. Esto, juntamente con la agregación, permite la creación de nuevos sitios de unión al ligando, lo cual finalmente se traduce en una mayor cantidad de carga de bioactivo por unidad de masa de proteína (Le Maux y col., 2013).

En este sentido, Le Maux y col. (2013) estudiaron la capacidad de ligar linoleato de la BLG agregada en forma de dímeros y de nanopartículas. Los dímeros covalentes fueron producidos por calentamiento a 80°C, 30 min de una solución de BLG (5 g/L) en buffer Bis-Tris pH 6,7 en presencia de CuCl₂. Por otro lado, las nanopartículas fueron producidas por calentamiento a 85°C, 15 min de una solución de BLG (10 g/L) pH 5,9. Ellos encontraron que el número de moléculas de linoleato unidas por monómero de BLG aumentó con el grado de agregación (nativa < dímero < nanopartículas), aunque la constante de asociación para cada conjunto de sitios de unión permaneció similar (Le Maux y col., 2013).

Además, Shpigelman y col. (2010) han producido nanopartículas de BLG por calentamiento a 75°C y 85°C por 20 min de la solución proteica (0,65 y 0,8%) en buffer fosfato pH 7. Luego agregaron EGCG (Epigallocatequina 3-galato, un potente antioxidante sensible a la oxidación), formándose el complejo EGCG-BLG. Los complejos formados con proteína precalentada demostraron una disminución significativa en la velocidad de degradación de EGCG respecto a aquellos con BLG nativa. El tamaño de las nanopartículas proteicas obtenidas fue menor a 10 nm. Cabe mencionar que aún después del calentamiento se detectó proteína nativa. El tamaño final de los complejos ECGC-BLG fue de ~18 nm.

Como puede notarse, la formación de agregados de BLG inducidos térmicamente para la producción de nanovehículos de compuestos bioactivos ha sido ampliamente estudiada. En este sentido, otra proteína globular que ha demostrado capacidad de generar nanopartículas con elevada hidrofobicidad superficial por calentamiento es la OVA (Croguennec y col. 2007). Sin embargo, no se ha evaluado aún dichas nanopartículas como nanovehículos de compuestos hidrofóbicos.

1.4. Caracterización de nanopartículas biopoliméricas

Las características de las nanopartículas biopoliméricas determinarán su comportamiento y estabilidad dentro de la matriz del alimento y en el tracto gastrointestinal. Por ello resulta sumamente importante caracterizar adecuadamente las propiedades de las partículas en términos de tamaño, carga, morfología, composición, estado físico y características mecánicas. Para ello, se requiere una combinación de varios métodos de análisis (Joye y McClements, 2014).

Tamaño. El tamaño es una de las características más importantes de las nanopartículas y es determinado, comúnmente, por métodos de dispersión de luz estática (SLS) o dinámica (DLS) y por técnicas de microscopía. SLS determina la intensidad de luz dispersada en función del ángulo mientras que DLS determina la intensidad de luz dispersada a un ángulo fijo en función del tiempo como consecuencia del movimiento browniano de las partículas en el seno de la solución (Joye y McClements, 2014). En la sección 3.2.2.1 se dan más detalles de la técnica DLS.

Carga eléctrica. Las partículas usualmente están cargadas debido a las características eléctricas de las moléculas que las componen. Las propiedades eléctricas de las partículas son usualmente caracterizadas por su potencial Zeta (Joye y McClements, 2014).

La magnitud del potencial Zeta da una indicación de la probable estabilidad del sistema coloidal. En general, si todas las partículas en suspensión poseen altos valores absolutos de potencial Zeta (en general, mayores de 30 mV ya sean positivos o negativos) tenderán a repelerse entre sí y no predominará la aglomeración. Sin embargo, si las partículas tienen valores absolutos de potencial Zeta bajos, no habrá fuerzas para prevenir que las partículas se unan, produciendo la inestabilidad coloidal del sistema (Malvern Instruments Ltd, 2014).

El potencial Zeta es altamente sensible al pH y a la fuerza iónica. Como se detalló con anterioridad, su análisis es útil para predecir la estabilidad coloidal de las suspensiones de partículas, vale decir, cuan estable son los sistemas a la agregación y además, provee una indicación de las fuerzas electrostáticas entre partículas. También puede ser útil para determinar la localización del compuesto bioactivo dentro de las partículas biopoliméricas, es decir, ubicación en la superficie o en el interior. Además, resulta útil para el estudio de recubrimientos de partículas coloidales cargadas con biopolímeros de carga opuesta (Joye y McClements, 2014). En la sección 3.2.2.5 se dan más detalles sobre el potencial Z.

Morfología. Para el estudio de la morfología usualmente se emplean técnicas de microscopía. El microscopio óptico convencional y los confocales solo permiten observar estructuras con tamaño > 1000 nm, por lo que resulta inadecuado para el estudio de nanopartículas. Para ello resultan apropiados los microscopios electrónicos y de fuerza atómica.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite obtener información de las superficies, tales como la composición y la topología. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) da información de estructuras muy delgadas mediante el paso de electrones a través de ellas. La microscopía de fuerza atómica (AFM) es útil para observar la estructura de las superficies de las partículas, pudiendo obtenerse información tridimensional. La preparación de las muestras para observación por AFM involucra procedimientos relativamente más suaves que en las técnicas electrónicas, por lo que se reduce el riesgo de daño o alteración de las propiedades de la muestra previo a la medición (Joye y McClements, 2014). En la sección 3.2.2.2 se dan más detalles de la técnica de AFM, utilizada en el presente trabajo para la evaluación de la morfología.

Composición y estado físico. Resulta un desafío determinar la composición de las partículas y la distribución del compuesto activo dentro de las mismas, debido a las muy pequeñas dimensiones involucradas. Se ha utilizado la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X para el análisis químico de la composición de la superficie de partículas, mientras que el análisis elemental fue usado para estudiar la composición global de las mismas o si ciertos compuestos fueron encapsulados dentro de las mismas. La espectroscopia Raman puede también proveer información sobre la presencia del bioactivo u otro componente dentro de las partículas (Joye y McClements, 2014).

Por otro lado, la calorimetría diferencial de barrido puede ser utilizada para detectar interacciones entre los biopolímeros en las partículas, las cuales también pueden ser estudiadas por medio de espectroscopia de infrarrojo y Raman.

Para estudiar la cristalinidad de compuesto encapsulado o la matriz biopolimérica puede realizarse análisis de difracción de rayos X (Joye y McClements, 2014).

Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación. Cuando se evalúa la aptitud de nanopartículas biopoliméricas como sistemas de encapsulación para un compuesto bioactivo específico, los factores de interés más importantes son la capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación. La capacidad de carga se define como el porcentaje de masa de compuesto bioactivo contenido en las partículas en relación a la masa total del sistema; mientras que la eficiencia de encapsulación se define como el porcentaje de masa del compuesto bioactivo contenido en las partículas en relación a la masa total de compuesto bioactivo en el sistema (dentro y fuera de las partículas). Ambos factores requieren de la separación de las partículas del medio. Generalmente, se realiza la centrifugación o la filtración de la suspensión de partículas y

la cantidad de bioactivo libre se determina a partir del sobrenadante o del pellet con o sin extracción (Joye y McClements, 2014; Zimet y Livney, 2009).

Eficiencia de retención. Se define por el porcentaje de bioactivo contenido en la partícula en un tiempo determinado en relación al tiempo inicial. Los mecanismos más comunes por los cuales se produce la liberación del bioactivo son la difusión, hinchamiento, disociación y/o degradación. Por lo general, las partículas se rompen o comienzan a desintegrarse bajo ciertos factores externos como cambios en el pH, fuerza iónica, temperatura, actividad enzimática o fuerzas mecánicas. Las características de liberación están determinadas por la dimensión de las partículas, tamaño de poro, degradación y permeabilidad de la matriz y la solubilidad y concentración del compuesto encapsulado (Joye y McClements, 2014).

Por último, es importante mencionar que uno de los aspectos a tener en cuenta es que la aceptabilidad de partículas de biopolímero en los productos alimenticios está influenciada por su percepción dentro de la boca. Por lo general, las partículas más grandes detectadas como entidades individuales que dan una sensación arenosa son de alrededor de 50-100 μm . También depende de otras propiedades como la dureza y la morfología y de las características del medio circundante (por ejemplo, viscosidad) (Joye y McClements, 2014).

1.5. Materiales utilizados para la producción de nanopartículas para alimentos

El uso de nanopartículas en el sector alimentario implicaría que las mismas sean preparadas a partir de ingredientes de grado alimenticio usando operaciones de procesamiento económicas y seguras. Uno de los enfoques más prometedores para crear partículas coloidales de grado alimenticio es el uso de biopolímeros como bloques de construcción. En este sentido, las proteínas y los PS serían particularmente útiles.

Ejemplos de proteínas son la albúmina sérica bovina, caseínas, gelatina, ovoalbúmina, glicinina de soja, β -lactoglobulina y lactoferrina; mientras que como PS se incluyen alginatos, carrageninas, goma arábica, pectinas, entre otros (Matalanis y col., 2011).

1.5.1. Proteínas

Las proteínas son biopolímeros formados por aminoácidos y poseen una gran variedad de diferentes estructuras (espiral aleatoria o al azar, fibrosa y globular). La estructura molecular dependerá de la secuencia de aminoácidos y condiciones ambientales como exposición a diferentes temperaturas, presiones, solventes, pH y fuerza iónica. Las proteínas tienden a adoptar una estructura tal que maximice la energía libre global del sistema (Matalanis y col., 2011).

Para la utilización de las proteínas en la producción de sistemas de *delivery* deben conocerse algunas características fisicoquímicas como su temperatura de desnaturalización térmica, punto isoeléctrico, perfil de potencial Zeta *versus* pH, sensibilidad a iones mono o multivalentes y susceptibilidad a enzimas. Estas características permitirán establecer condiciones que promuevan la asociación de moléculas proteicas entre sí o con otras moléculas no proteicas (Matalanis y col., 2011).

Las proteínas poseen una ventaja competitiva sobre otras plataformas para el desarrollo de nanosistemas de *delivery* ya que son biocompatibles, anfifílicas y se encuentran ampliamente disponibles como materia prima (Rajendran y col., 2016).

Particularmente importante resulta la anfifilicidad ya que permitiría la formación de complejos de inclusión con ligandos lipofílicos, permitiendo la vehiculización de los mismos (Livney, 2012). Como se mencionó en la sección 1.3, una de las proteínas más estudiadas en este aspecto es la β -lactoglobulina. También se han realizado estudios en este sentido con otras proteínas tales como la α -lactoalbúmina (y 2014), la β -

conglucina (David y col. 2015), zeína y gliadina (Joye y col. 2015), entre otras. Sin embargo, una de las proteínas que no ha sido extensamente estudiada en este sentido es la OVA (véase sección 1.8), la cual es objeto de estudio en el presente trabajo doctoral.

1.5.1.1. Ovoalbúmina. Características generales

Resulta esencial conocer la estructura molecular de los biopolímeros a utilizar para la formación de nanovehículos ya que esto influirá sobre su funcionalidad. Además hay que tener en cuenta que en el alimento se encuentran otros componentes como agua, lípidos, azúcares y minerales algunos de los cuales pueden ser esenciales para el autoensamblaje de componentes proteicos (Matalanis y col., 2011).

La ovoalbúmina (OVA) es la proteína más abundante de la clara de huevo y la que más contribuye a sus propiedades funcionales. En el huevo de gallina constituye el 54% del total de proteínas de la clara, mientras que en pavo y pato un 40%. Es una fosfoglicoproteína monomérica (Giosafatto y col., 2012; Weijers y col., 2002) y es la principal responsable de las propiedades funcionales que poseen las proteínas de la clara de huevo, tales como capacidad gelificante, espumante, emulsionante y de retención de agua (Weijers y col., 2002). Esto se debe no solo a que la OVA es la proteína mayoritaria de la clara de huevo, sino a sus excepcionales propiedades térmicas y superficiales (Croguennec y col., 2007). Además, posee un alto valor nutricional y una exclusiva importancia en estudios inmunológicos, tanto en cultivos de células animales como en el desarrollo de anticuerpos (Datta y col., 2009).

La OVA fue una de las primeras proteínas en ser aislada en su forma pura. Su fácil disponibilidad en grandes cantidades la ha llevado a su difundido uso como estándar en estudios de estructura y propiedades de proteínas (Huntington y Stein, 2001). En su forma purificada está constituida por una mezcla con tres isoformas

llamadas A1, A2 y A3, de acuerdo al número de residuos fosfato unidos (dos, uno y cero, respectivamente) (Shinohara y col., 2005; Weijers y col., 2002). Los sitios de fosforilización son Ser 68 y Ser 344. La proteína posee además, una cadena hidrocarbonada simple que representa un 3% del peso y está covalentemente unida al nitrógeno amido de Asn292 (Giosafatto et al., 2012).

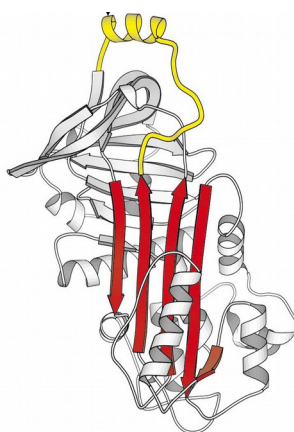


Figura 4. Estructura 3D de la OVA (Huntington y Stein, 2001).

La OVA es una proteína globular (Fig. 4) que está constituida por 385 aminoácidos, de los cuales la mitad son hidrofóbicos y la tercera parte son cargados, mayormente ácidos, confiriendo a la proteína un pI de 4,5. Posee un peso molecular de 43 kDa y un diámetro hidrodinámico medio de 6,4 nm. Además, posee 4 grupos sulfhidrilo (SH) ocluidos en el interior de la proteína globular y un enlace disulfuro (SS) por molécula (Croguennec y col., 2007).

En la literatura se emplean diferentes terminologías para la OVA. La OVA nativa (N-) puede ser convertida en estable (S-) a través de la formación de un intermediario (I-). Todas estas especies son capaces de agregarse. A su vez, la especie nativa puede estar formada por una fracción N1 y otra N2. Esta última puede desnaturalizarse pero

no agregarse. La cantidad de S-OVA dependerá del tiempo de almacenamiento y del pH interno de los huevos (Weijers y col., 2003).

Debido a aspectos estructurales, la OVA se incluye en la superfamilia de las serpinas (*serine proteinase inhibitor*), la cual incluye más de 300 miembros homólogos que comparten una estructura terciaria común, aunque la OVA no presente efecto inhibidor de proteasas (Shinohara y col., 2005; Yamasaki y col., 2003).

1.5.1.2. Obtención de OVA

Los métodos de extracción y purificación de OVA incluyen procedimientos como precipitación usando sales o solventes, precipitación por reducción de fuerza iónica y/o pH y aislamiento usando cromatografía líquida. La desventaja de los dos primeros métodos es la mayor o menor reversibilidad de la degradación de las proteínas, lo cual puede evitarse con la cromatografía líquida. La precipitación con sales (sulfato de amonio, sulfato de sodio), permite obtener grandes cantidades de OVA pero producen un subproducto con altas concentraciones de sal. Además, solo se alcanza alta pureza con el aumento de los ciclos de precipitación/solubilización. Por otro lado, la cromatografía de intercambio iónico (IEC) resulta mejor que los métodos de precipitación en el sentido de que se alcanza mayores porcentajes de pureza sin degradación proteica y sin subproductos. Sin embargo, IEC conduce a menores rendimientos/recuperación de OVA. No obstante, en el caso de la OVA, el menor rendimiento no sería un problema mayor en términos económicos debido al bajo costo de la materia prima (clara de huevo) (Croguennec y col., 2000).

La IEC se basa en la unión competitiva entre componentes por los sitios cargados de la resina durante la saturación de la columna. Finalmente, solo la proteína más fuertemente unida a la resina es retenida. La purificación de la OVA a partir de la

clara de huevo por medio de IEC incluye los siguientes pasos: i) dilución de la clara y ajuste a pH 6 seguido de refrigeración y centrifugación para separar la ovomucina; ii) ajuste de pH (alcalino) y centrifugación; iii) acondicionamiento de la columna de Q-Sepharosa; iv) corrida de la solución de clara a purificar; v) elución modificando la concentración salina; vi) limpieza de la columna; vii) desalinización de la OVA por diafiltración con agua desionizada; viii) liofilización. De este modo es posible obtener OVA con una pureza del 94% y un contenido de sal menor al 0,5% en base seca (Croguennec y col., 2000).

Otro procedimiento para la purificación de OVA incluye la ultrafiltración, el cual se caracteriza por un alto rendimiento. Este método es fuertemente afectado por las condiciones operacionales y fisicoquímicas (Datta y col., 2009). En este sentido, Datta y col. (2009) obtuvieron OVA con una pureza del 98,7% mediante el siguiente proceso: i) centrifugación de la clara para eliminar lípidos y coloides; ii) dilución con solución de NaCl y ajuste de pH; iii) primera etapa de ultrafiltración con membrana de polietersulfona de corte 30 kDa; iv) segunda etapa de ultrafiltración del retenido de la primera etapa con membrana de polietersulfona de corte 50 kDa.

1.5.1.3. Antecedentes de desnaturalización y agregación por calentamiento de la OVA

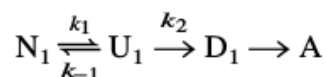
La agregación de proteínas es un proceso importante en muchos sistemas biológicos y procesos industriales. En general, es producida por un cambio conformacional de la proteína inducida por calentamiento, escisión enzimática y otros procesos que afectan la estructura plegada. Luego de este cambio en la estructura tienen lugar una serie de reacciones que promueven la formación de agregados. Esto es importante debido a que para la mayoría de las aplicaciones funcionales de las

proteínas, se requiere en mayor o menor medida de la desnaturalización y agregación (Weijers y col., 2003).

La OVA es especialmente susceptible a la desnaturalización superficial y coagulación interfacial. Esto es lo que le confiere excepcionales propiedades de espumado a la clara de huevo (Croguennec y col., 2007). Cuando sus soluciones acuosas son agitadas se forman agregados insolubles (Wolfe, 1966).

Cuando las proteínas globulares son calentadas, las moléculas se despliegan por lo que parte de las regiones hidrofóbicas internas quedan expuestas. Este proceso de desnaturalización es seguido por la agregación (Weijers y col., 2002). Debido a la desnaturalización, pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas y exposición de grupos tioles (SH), los cuales pueden formar enlaces disulfuro (SS), a través de una reacción irreversible (Weijers y col., 2003).

La siguiente ecuación se detalla para describir el proceso de desnaturalización térmica irreversible de proteínas (Weijers y col., 2003):



Ecuación 1

donde, N, U, D y A son las formas nativa, desplegada, desnaturalizada y agregada de la proteína, respectivamente; mientras que k_1 , k_{-1} y k_2 son las constantes de velocidad para las reacciones correspondientes. De este modo, la desnaturalización irreversible de las proteínas involucra al menos dos pasos, el desplegamiento reversible de la proteína nativa, seguido por la alteración irreversible del estado desplegado a un estado desnaturalizado (Weijers y col., 2003).

En lo que respecta al proceso de desnaturalización térmica de la OVA, Weijers y col. (2003), encontraron que la cinética de desnaturalización (tiempo medio de reacción) fue independiente de la concentración de proteína (0,1–60 g/l) y de sal (3–100 mM),

pero fue fuertemente dependiente de la temperatura. A 80°C, el 50% de las proteínas se desnaturalizaron y agregaron en menos de 2 min, mientras que a 68,5°C este proceso tardó ~ 6 hs. Además encontraron que cuando la OVA fue sometida a largos tiempos de calentamiento, presentó aproximadamente un 20% de monómeros correspondientes a una fracción intermedia estable (SI-OVA). La abundancia de esta fracción no dependió de la temperatura en el rango de 72-85°C. La fracción SI corresponde a monómeros que son desnaturalizados pero no agregados. Al no agregarse, esta fracción no contribuiría a la funcionalidad de la OVA en lo que respecta a aspectos estructurales y de gelificación (Weijers y col., 2003).

Según las condiciones del medio, la agregación proteica inducida por desnaturalización térmica puede dar lugar a la formación de un gel. Por ejemplo, las soluciones de OVA a pH 7 calentadas a 78°C durante 20 hs y a baja fuerza iónica (3 mM NaN₃) gelifican a una concentración mayor a 60 g/l, mientras que para alta fuerza iónica (0,1 M NaCl) gelifican a una concentración mayor a 12 g/L (Weijers y col., 2002).

Calentando por debajo de la concentración de formación de gel pueden formarse agregados de diferentes tamaños y morfologías, dependiendo de las condiciones del medio. Al respecto, Nyemb y col. (2014) calentaron soluciones de OVA (20 g/L) a 80°C por 6 hs a diferentes pH y fuerzas iónicas y encontraron agregados lineales (pH 9/0,03 M NaCl; tamaño: 10-140 nm), lineales ramificados (pH 7/0,03 M NaCl; tamaño 7,5-140 nm), esféricos (pH 7/0,3 M NaCl; tamaño 10-80 µm) y esféricos aglomerados (pH 5/0,8M; tamaño: 20-250 µm). Este comportamiento se puede explicar por el efecto de la fuerza iónica y el pH sobre las interacciones electrostáticas y la carga neta, respectivamente. A pH ~ pI, la carga neta se aproxima a la neutralidad por lo que se ve minimizada la repulsión electrostática y consecuentemente, predomina la agregación,

mientras que a un pH alejado del pI predomina la repulsión y los agregados formados poseen tamaño pequeño (Nyemb y col., 2014).

Croguennec y col. (2007), produjeron agregados de OVA en un rango de tamaño de 67-272 nm al calentar soluciones de OVA de 10 g/L a pH 7, NaCl 50 mM durante 5-40 min a 80°C. En dichos agregados se verificó un aumento considerable en la hidrofobicidad superficial producto de la exposición de grupos hidrofóbicos ocluidos en la estructura globular nativa.

También se han obtenido agregados de OVA por tratamiento térmico a $\text{pH} < \text{pI}$. Lara y col. (2012) calentaron soluciones de OVA 2% en agua Milli-Q pH 2 a 90°C por 24 hs y obtuvieron agregados con morfología fibrilar de diferentes dimensiones (Tipo I, II y III). Las fibrillas Tipo I, II y III presentaron una altura (determinada por AFM) de 7, 4 y 2,5 nm y una longitud de 3000, 300 y 67 nm, respectivamente.

Por otro lado, cabe mencionar que los agregados de OVA inducidos por calentamiento son más susceptibles a la digestión por medio de enzimas gastrointestinales, jugando, a su vez, un papel muy importante su morfología y tamaño en la extensión de la digestión. Al respecto, Nyemb y col. (2014), demostraron que el 37% de la OVA monomérica permanece inalterada después de la digestión gastrointestinal in vitro de la OVA nativa. A su vez, los agregados esféricos-aglomerados, presentaron un valor levemente inferior, mientras que los lineales y los lineales-ramificados presentaron menos del 1%, siendo su digestión prácticamente completa y más rápida. Esto se explica por una mayor exposición de los sitios de escisión enzimática y, consecuentemente, por una mayor accesibilidad de las enzimas a los mismos, en el caso de agregados lineales (Nyemb y col., 2014).

1.5.2. Polisacáridos

Convencionalmente, los polisacáridos (PS), son polímeros constituidos por más de 10 monosacáridos unidos por distintos enlaces glucosídicos. Sin embargo, la mayoría de los PS naturales poseen cientos y hasta miles de unidades monoméricas (Dergal, 1999).

Al igual que en las proteínas, la estructura molecular de los PS depende de su secuencia monomérica. Los homopolisacáridos poseen un solo tipo de monómero mientras que los heteropolisacáridos consisten de diferentes tipos de monómeros (o monosacáridos). Los PS difieren entre sí en términos de tipo, número de monosacáridos, secuencia, y enlace dentro de la cadena polimérica. Esta diversidad lleva a diferencias en propiedades moleculares y fisicoquímicas, tales como peso molecular, grado de ramificación, estructura, flexibilidad, carga eléctrica e interacciones. Dichas diferencias moleculares conducen a cambios en las propiedades funcionales tales como solubilidad, espesamiento, gelificación, capacidad de retención de agua, actividad superficial, emulsificación y digestibilidad (Matalanis y col., 2011).

La bibliografía reporta que distintos PS se han utilizado para el desarrollo de nanopartículas. Entre ellos: pectina de alto metoxilo (Zimet y Livney, 2009; Perez y col. 2015), goma arábiga (Tan y col., 2016), alginato de sodio (Zahoor y col., 2005), carrageninas (Grenha y col., 2009), etc. Para el presente trabajo se utilizaron goma arábiga y pectina de alto metoxilo.

1.5.2.1. Goma arábiga

La GA es un polisacárido que se obtiene de los exudados de árboles africanos de la especie *Acacia senegal*. La GA o también llamada goma Acacia, se obtiene por exudación de troncos y ramas de árboles de 5 o más años de edad de las especies

arbóreas *Acacia senegal* y *Acacia seyal* (Williams y Phillips, 2000). Es ampliamente utilizada en formulaciones alimenticias y farmacéuticas orales y tópicas como agente emulsionante y espesante (Tan y col., 2016).

La GA es un complejo conjugado proteína-PS siendo la fracción PS un arabinogalactano aniónico compuesto de tres fracciones: la fracción 1, que representa el 88,4% del total, es un arabinogalactano de masa molecular de $2,79 \times 10^5$ Da y es deficiente en proteína. La fracción 2, que representa el 10,4% del total, es un complejo arabinogalactano-proteína con una masa molecular de $1,45 \times 10^6$ Da, siendo la proteína la mitad del mismo. En promedio, cada molécula de la fracción 2 consistiría de 5 bloques de carbohidratos de masa molecular $2,8 \times 10^5$ Da covalentemente unidos a través de una cadena de aminoácidos. La fracción 3 consiste de una o más glicoproteínas y representa solo el 1,24% del total de la goma pero contiene el 25% del total de la proteína (Niu y col., 2015).

La fracción de PS de la GA está compuesta por D-galactosa (40% de los residuos), L-arabinosa (24%), L-ramnosa (13%), ácido D-glucurónico (21%) y ácido 4-O-metil-D-glucurónico (Weinbreck, 2004). La estructura molecular de la GA es altamente ramificada (Fig. 5), lo que hace que las moléculas sean muy compactas y con un volumen hidrodinámico relativamente pequeño (radio de giro ~ 24 nm). Esto hace que sus soluciones posean viscosidad sólo a muy altas concentraciones (Weinbreck, 2004; Williams y Phillips, 2000). A pH próximo a la neutralidad, sus grupos carboxilo se encuentran disociados y llevan a la molécula a adquirir una estructura abierta, altamente cargada y expandida (Tan y col., 2016).

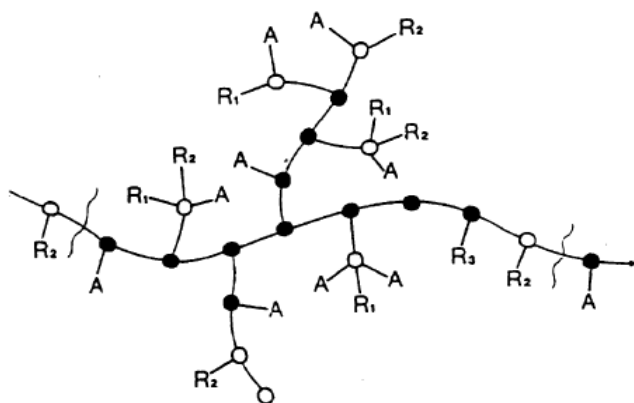


Fig. 5. Posible estructura del componente PS de la GA. A: Arabinosil; círculos llenos: galactosa unida por enlace β 1,3 glicosídico; círculos vacíos: galactosa unida por enlace β 1,6 glicosídico (galactosa o ácido glucurónico unido o grupo terminal); R_1 : ramnosa-ácido glucurónico; R_2 : galactosa-3-arabinosa; R_3 : arabinosa-3-arabinosa-3-arabinosa (Williams y Phillips, 2000).

1.5.2.2. Pectina de alto metoxilo

Las pectinas comerciales usadas como aditivos son heteropolisacáridos que contienen al menos un 65% en peso de unidades de ácido galacturónico, el cual puede estar presente como ácido libre (sal de sodio, potasio, calcio o amonio), metil ester (esterificado naturalmente con metanol) o, en pectinas amidadas, como amida (Fig. 6). Las pectinas son derivadas de la ruptura de protopectinas más complejas que están presentes en el tejido vegetal y también contiene un rango de azúcares neutros incluyendo ramnosa, galactosa, arabinosa, y pequeñas cantidades de otros azúcares (Williams y Phillips, 2000).

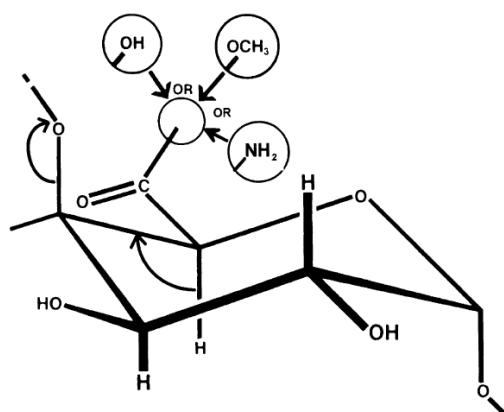


Figura 6. Unidades de ácido galacturónico (-OH), ester (-OCH₃) y amida (-NH₂) encontrada en pectinas (Williams y Phillips, 2000).

La mayor fuente de material crudo para la obtención de las pectinas son las cáscaras de los cítricos, el residuo de la extracción de jugos y aceites de cítricos y la pulpa de manzana (residuo seco de la extracción del jugo de manzana). Las cáscaras de limón y lima se prefieren por la mayor calidad de las pectinas, aunque la cáscara de naranja está disponible en mucha mayor cantidad. Las pectinas forman parte de una clase más amplia de sustancias pépticas, las cuales constituyen uno de los principales PS de la pared celular en plantas terrestres. Las presentaciones comerciales suelen tener azúcar agregada para estandarizar su desempeño (Williams y Phillips, 2000).

Tras la extracción con ácido a partir de la fuente vegetal, la pectina posee una estructura predominante que consiste en ácido D-galacturónico unido por enlaces α -(1,4) (Sperber y col., 2009).

Las pectinas se clasifican según el grado de metil-esterificación o metoxilación (DM) en pectinas de bajo metoxilo (PBM) (DM < 50%) y pectinas de alto metoxilo (PAM) (DM > 50%). La distribución de los grupos metoxilos puede ser en forma aleatoria o en bloques (Sperber y col., 2009; Williams y Phillips, 2000).

La PAM se emplea en mermeladas de frutas con sólidos solubles totales 60-70% y un pH en el rango de 3,0 a 3,3; como estabilizantes de dispersiones de proteínas a pH reducido como en el yogur o bebidas de jugo de frutas/leche y análogos de lácteos como los preparados a partir de soja. También en jaleas blandas de pastelería. Recientemente se ha demostrado su capacidad de estabilizar coloidalmente los complejos PUFA-BLG (Perez y col., 2015; Zimet y Livney, 2009)

1.5.3. Interacciones proteína-polisacárido

Cuando se encuentran presentes en solución biopolímeros de diferente naturaleza (como proteínas y polisacáridos, PS) pueden ocurrir diferentes interacciones entre ellos bajo determinadas condiciones (Matalanis y col., 2011). La comprensión de estas interacciones resulta de relevante importancia para el diseño de nanopartículas biopoliméricas destinadas a la vehiculización de compuestos bioactivos. En particular, porque el PS puede conferir i) estabilidad coloidal al complejo ligando-proteína y ii) mayor protección del ligando bioactivo frente a agentes de deterioro (Zimet y Livney, 2009). Estas ventajas que ofrece el PS se basan en la formación de una capa protectora y/o diferentes estructuras cuando interacciona con proteínas en solución. Las fuerzas que gobiernan este comportamiento son principalmente de naturaleza electrostática (atracción y repulsión), aunque también pueden ocurrir otras interacciones no covalentes como interacciones hidrofóbicas, Van der Waals y puentes de hidrógeno que estabilizan los complejos proteína-PS formados (Fioramonti y col, 2014; McClements, 2006).

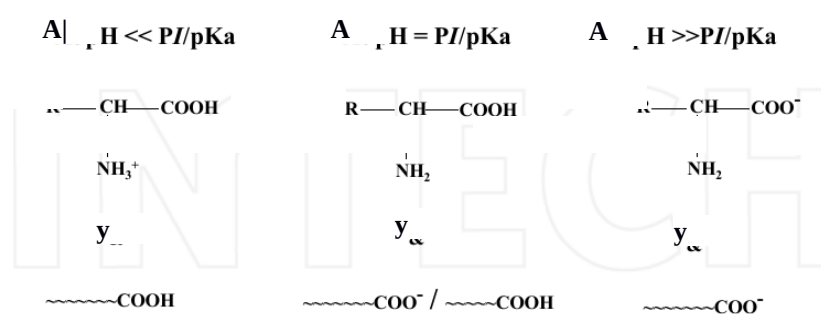
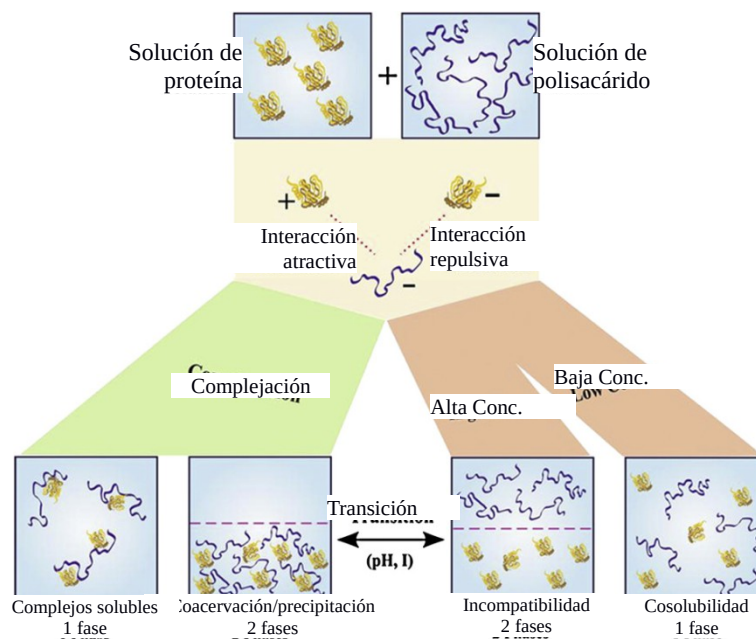


Figura 7. Variación de la densidad de carga de proteínas y polisacáridos en varios rangos de pH en relación al pI y al pKa (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012).

Las interacciones electrostáticas se explican por la carga neta que lleva cada biopolímero en las condiciones en que se produce la mezcla. Por un lado, las proteínas

poseen grupos que confieren carga tanto positiva (grupos amino, $-\text{NH}_3^+$) como negativa (grupos carboxilos, $-\text{COO}^-$) a la molécula (Fig. 7). La carga neta total de la macromolécula proteica dependerá del pH. Existe un pH en el cual la proteína posee idéntica cantidad de cargas positivas y negativas, resultando en una carga eléctrica cero. Este valor de pH se conoce como el punto isoeléctrico (pI). A un pH menor al pI las proteínas tendrán carga neta positiva mientras que a un pH mayor al pI la carga neta será negativa (Fig. 7) (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012).

Por otro lado, la carga eléctrica de un PS depende de la naturaleza de los grupos iónicos a lo largo de su cadena polimérica, tanto como de las condiciones de la solución acuosa. Algunos PS son neutros (almidón, celulosa), otros aniónicos (alginato, carrageninas, goma arábiga) y otros catiónicos (quitosano). La magnitud de la carga eléctrica de los PS iónicos depende del pH en relación al pKa de los grupos cargados (Fig. 7). Los PS aniónicos tienden a ser neutros a valores de pH suficientemente menores al pKa, pero negativos por encima del mismo (Matalanis y col., 2011).



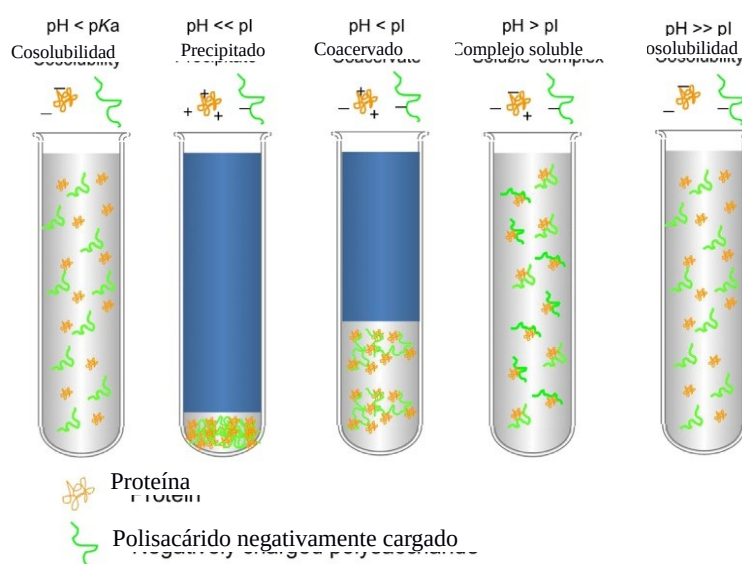


Figura 8. Representación esquemática de las interacciones proteína-PS en solución acuosa (Matalanis y col., 2011; Davidov-Pardo y col., 2015).

Los grupos funcionales cargados más comunes en PS son los sulfato ($pK_a \sim 2$; ejemplo: carrageninas), grupos carboxilos ($pK_a \sim 3,5$; ejemplo: pectinas, goma arábica, alginato) y aminos ($pK_a \sim 6,5$; ejemplo: quitosano). La carga eléctrica de los PS puede ser alterada por presencia de otras especies iónicas como iones mono (Na^+) o divalentes (Ca^{++}) que se unen a grupos con carga opuesta (Matalanis y col., 2011).

Por lo tanto, en una mezcla proteína-PS aniónicos podrá existir un rango de pH ($pH > pI$) en el que ambos biopolímeros tendrán carga negativa lo que produciría principalmente interacciones repulsivas promoviendo la cosolubilidad y/o la incompatibilidad termodinámica dependiendo de la concentración (Fig. 8). Un sistema donde se produce la cosolubilidad presentará una sola fase (biopolímeros distribuidos homogéneamente a través de todo el sistema) y ocurre a baja concentración total de biopolímeros. La incompatibilidad termodinámica ocurre cuando la concentración total de biopolímeros es muy alta, presentándose dos fases en el sistema, cada una de ellas rica en uno de los dos biopolímeros (separación de fases segregativa) (Fig. 8). El origen molecular de este efecto es usualmente la exclusión estérica. Por otro lado, cuando el

pH está cercano al pI se forman complejos solubles ya que comienzan a cobrar importancia las cargas netas positivas en la proteína y la consecuente atracción electrostática entre los biopolímeros, presentando el sistema una sola fase (complejos distribuidos homogéneamente a través de todo el sistema) (Fioramonti y col, 2014; Ghosh y Bandyopadhyay, 2012; Matalanis y col., 2011; McClements, 2006; Weinbreck y col., 2003). La solubilidad se explica por el exceso de cargas de los complejos. Sin embargo, cuando el pH es menor al pI, la carga neta de los complejos se aproxima a la neutralidad, lo que se traduce en la agregación y sedimentación, quedando un sistema con dos fases, siendo una de ellas rica en ambos biopolímeros (separación de fases asociativa). Esto se denomina coacervación compleja (Davidov-Pardo y col., 2015; Ghosh y Bandyopadhyay, 2012; Livney, 2008). En resumen, una mezcla proteína-PS en solución resulta en un sistema que puede presentar una o dos fases (de diferentes composiciones) según las condiciones del medio acuoso (Fig. 8).

Las interacciones entre proteínas y PS están gobernadas por el tipo de biopolímeros involucrados (peso molecular, densidad de carga *versus* pH, flexibilidad), la composición de la solución (relación proteína:PS y concentración total de biopolímero) y las condiciones del medio (pH y fuerza iónica) (McClements, 2006; Weinbreck y col, 2003).

Teniendo en cuenta la formación de complejos solubles en torno al pI de la proteína, la presencia de un exceso de PS impediría la precipitación isoeléctrica de la proteína debido a la formación de complejos negativamente cargados, los cuales debido a la repulsión electrostática permanecerían solubles y estables (Zimet y Livney, 2009). En este sentido, Zimet y Livney (2009) demostraron que el punto isoeléctrico del complejo β -Lactoglobulina-Pectina de bajo metoxilo fue de 2,26 mientras que el pI de la β -Lactoglobulina se encuentra en un rango de 4,7-5,2. Como puede notarse, el PS

aumentó la estabilidad coloidal del sistema en un rango de pH en el que se produciría la precipitación isoelectrica de la proteína por disminución de su carga neta.

Los complejos proteína-PS exhiben varias propiedades interesantes para su aplicación en alimentos, tales como actividad superficial para estabilizar interfaces aire-agua o aceite-agua, propiedades espesantes y gelificantes y también presentan capacidad para encapsular/vehicular distintos compuestos bioactivos (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012). Particularmente, la combinación de proteínas que presentan dominios hidrofóbicos con polisacáridos, caracterizados por largas estructuras hidrofílicas, constituyen magníficos surfactantes macromoleculares, exhibiendo excelente capacidad de estabilización de fases insolubles en medios acuosos (Livney, 2008).

La encapsulación incluye todos los aspectos de protección y estabilización de moléculas activas (*flavors* y bioactivos) frente a condiciones drásticas externas (calor, potencial redox, cizallamiento, temperatura, luz, oxígeno, humedad, etc.) (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los complejos electrostáticos pueden ser sensibles al pH y la fuerza iónica, tanto como a los cambios de temperatura, lo que puede causar su disociación o agregación. Por otro lado, suele ser difícil crear sistemas transparentes basados en nanopartículas biopoliméricas, por ejemplo, para bebidas claras. Esto se debe al elevado peso molecular de los biopolímeros y, consecuentemente, de los complejos formados, lo cual produce una alta dispersión de la luz (Livney, 2008; Perez y col., 2015).

La liberación controlada facilita la entrega del compuesto encapsulado en el lugar deseado a una velocidad adecuada. Las condiciones para la encapsulación de moléculas bioactivas dependen de la sensibilidad (térmica y estabilidad redox) y de la naturaleza (solubilidad en agua y aceite) del mismo. La liberación puede ser controlada por procesos mecánicos, variaciones de pH (condiciones de acidez en el estómago y de

neutralidad en el intestino) o acción enzimática (Ghosh y Bandyopadhyay, 2012). Esto permite programar un perfil de liberación en una zona específica del tracto digestivo (Livney, 2008).

Una de las ventajas que ofrecen los complejos proteína-PS usados como bloques de construcción de sistemas de entrega (*delivery systems*) es que la mayoría de las proteínas y los PS son obtenidos de materias primas naturales alimenticias por lo que son considerados sustancias GRAS (generalmente reconocidas como seguras), naturales y “amigables” en términos de rotulado. Además, las proteínas y PS alimenticios se encuentran ampliamente disponibles y son, salvo algunas excepciones, relativamente económicos (Livney, 2008).

1.6. Compuestos lipofílicos. Vehiculización por formación de complejos

Algunos de los compuestos lipofílicos que pueden ser vehiculizados a través de la formación de complejos con proteínas incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, polifenoles, drogas oncológicas, *flavors*, entre otros. A continuación se describen algunos de ellos y se dan ejemplos de compuestos que han sido estudiados en relación a su capacidad de formar complejos con proteínas. Es importante destacar que los complejos ligando-proteína se producen por el agregado de una solución del ligando hidrofóbico en algún solvente que sea miscible (etanol, dimetilsulfóxido, etc.) en la solución acuosa donde se encuentra la proteína (Shapira y col., 2010).

Vitaminas. Las vitaminas A, D, E y K y los carotenoides son compuestos liposolubles que están naturalmente presentes en alimentos o son usados como excipientes en diferentes campos industriales como el farmacéutico o el cosmético. Aunque los carotenoides no pertenecen a la clasificación habitual de vitaminas, son estudiados como tales debido a que 50 de los 600 carotenoides fueron identificados como pro-vitamina A. Las vitaminas liposolubles son sensibles a la oxidación, por lo

tanto, la encapsulación podría constituir un método apropiado para preservar sus propiedades durante el almacenamiento y mejorar sus propiedades fisiológicas al verse protegida contra la temperatura, la luz, radicales libres o el oxígeno. La encapsulación también puede favorecer una mayor eficiencia de administración, permitiendo dosis más pequeñas y disminuyendo así posibles síndromes de hipervitaminosis y efectos secundarios (Gonnet y col., 2010).

La vitamina A tiene diferentes formas químicas en el organismo, dependiendo de su ubicación y función: retinol, ésteres de retinol, retinal y ácido retinoico (RA). El retinol se puede convertir en retinal, compuesto que se encuentra implicado en la visión nocturna. El RA regula la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis (calcificación de los huesos). RA es un agente terapéutico utilizado para la leucemia, cáncer de piel y tratamiento de enfermedades. RA también podría ser eficaz en otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama (Gonnet y col., 2010).

La vitamina D es una hormona secosteroide y está involucrada en el metabolismo del calcio. Tiene dos formas químicas principales. La primera es la vitamina D3 (colecalfiferol) que es sintetizada en la piel después de la exposición a la luz y la segunda es la vitamina D2 (ergocolecalciferol), la cual se forma luego de la irradiación del ergosterol, considerado como un precursor biológico (provitamina) de vitamina D (Gonnet y col., 2010).

La vitamina E está formada por ocho moléculas compuestas por un anillo de cromanol y una cadena lateral fitol: cuatro tocoferoles (α , β , γ , y δ) y cuatro tocotrienoles (α , β , γ , y δ). Los prefijos α , β , γ y δ indican la posición de los grupos metilo en el anillo cromanol. El α -tocoferol es el más abundante en la naturaleza. Una molécula de α -tocoferol puede atrapar dos radicales peroxilo responsables de la iniciación de la oxidación de lípidos. Por lo tanto, esta molécula protege a los lípidos de

membrana contra la oxidación. La vitamina E tiene también un efecto positivo sobre la fertilidad. La vitamina E quinona posee actividad anticoagulante a través de la inhibición de la carboxilasa dependiente de vitamina K, que regula la coagulación de la sangre. Además, una deficiencia de vitamina E podría producir mala absorción de grasas en bebés prematuros. (Gonnet y col., 2010).

La vitamina K comprende a la vitamina K1 (filoquinona) y K2 (menaquinona 4). Están compuestas por un grupo de cabeza naftoquinona hidrófila y una cola hidrofóbica de cadena carbonada. La vitamina K presenta propiedades antihemorrágicas. Es un co-factor esencial de la carboxilasa responsable de la carboxilación de residuos de glutamato en los mecanismos de activación de la protrombina y de otros factores de coagulación de la sangre. La vitamina K también está implicada en mineralización o deposición de calcio en los huesos. Su deficiencia se caracteriza por un sangrado incontrolable, calcificación de cartílagos acompañada de graves malformaciones óseas o deposición de sales insolubles de calcio en las paredes de las arterias y cartílagos, lo que aumenta el riesgo cardiovascular (Gonnet y col., 2010).

Polifenoles. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que generalmente están involucrados en la defensa contra la radiación UV o la agresión de patógenos. Su estructura molecular consta de varios anillos fenólicos (anillo aromático con grupos hidroxilos). Existen muchas moléculas que poseen una estructura polifenólica y que pueden ser clasificadas en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen dichos anillos entre sí. De este modo se distinguen los ácidos fenólicos, los flavonoides (donde se incluyen las antocianinas), los estilbenos y los lignanos. En lo que respecta a los efectos benéficos sobre la salud, los polifenoles jugarían un importante rol en la prevención de varias

enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Manach y col., 2004).

Un compuesto polifenólico de tipo estilbeno es el resveratrol, el cual se encuentra principalmente en las pieles de uva, maní, y en las raíces de la hierba *Polygonum cuspidatum*. El resveratrol ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre la salud humana, tales como una reducción del riesgo de ciertos tipos de cáncer, efectos anti-inflamatorios y reducción de la hipertensión, la aterosclerosis y la trombosis. Por lo tanto, existe un interés considerable en el uso de resveratrol como un ingrediente nutracéutico en productos alimenticios y bebidas. Sin embargo, la incorporación de este compuesto bioactivo en productos comerciales actualmente está limitada por su baja solubilidad en agua, sensibilidad a la radiación UV y baja biodisponibilidad oral. La unión de resveratrol a proteínas ha demostrado ser un proceso espontáneo impulsado por interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y de van der Waals (Joye y col., 2015). En particular, Joye y col. (2015) demostraron que el resveratrol se une a la zeína (proteína del endospermo de maíz) por medio de puentes de hidrógeno y a la gliadina (proteína del endospermo de trigo) a través de interacciones hidrofóbicas.

Flavors. Se ha demostrado que compuestos volátiles del sabor (*flavor*) pueden formar complejos con proteínas. Guichard y Langourieux (2000) estudiaron la interacción de dichos compuestos con BLG y encontraron una buena correlación lineal entre el log de la constante de asociación y la hidrofobicidad de la molécula de las series cetonas, aldehídos, alcoholes y lactonas y para las series de ésteres metílico, etílico, propílico y butírico. Dentro de la misma clase química, la constante de afinidad aumentó con el aumento de la longitud de la cadena, lo que sugiere una unión por medio de interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, para alcoholes terpénicos y compuestos fenólicos no se observó este comportamiento por lo que se verían implicadas

características estereoquímicas. Por otro lado, demostraron que para el eugenol, un compuesto extraído de clavo de olor que posee alta afinidad por la BLG, la percepción del aroma disminuyó significativamente con la presencia de BLG en la solución, lo cual explicaría una disminución de la volatilidad del *flavor*. Sin embargo, este comportamiento no se registró para la vainillina un compuesto con baja afinidad por la BLG (Guichard y Langourieux, 2000).

Drogas oncológicas. Muchos de los agentes antitumorales son altamente hidrofóbicos, incluyendo alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina y vincristina), epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido), taxenos (paclitaxel y docetaxel) y camptotecinas (topotecán e irinotecán) (Shapira y col., 2010).

Por otro lado, son conocidos los inconvenientes de la administración intravenosa de drogas quimioterapéuticas (desde aspectos psicológicos del paciente hasta hospitalización, entre otros). Teniendo esto en cuenta, la disponibilidad de terapias de administración oral adecuadas y eficaces sería una contribución significativa a la calidad de vida del paciente, lo que permitiría un cómodo tratamiento en su hogar, una disminución del riesgo a contraer infecciones con patógenos resistentes a antibióticos y una reducción significativa de costos. Sin embargo, muchos medicamentos no pueden ser administrados por vía oral debido a diversos factores, por ejemplo, escasa solubilidad en agua, lo que limita su biodisponibilidad oral y obstaculiza su perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos (Bar-Zeev y col., 2016).

Recientemente Bar-Zeev y col. (2016) han desarrollado un novedoso sistema que permitiría la administración vía oral de una droga (paclitaxel, PTX) y de un quimiosensibilizador (Tariquidar, TQD) para el tratamiento de cáncer gástrico. Estos compuestos son altamente insolubles en agua. Sin embargo, al unirse a la β -caseína, se confiere solubilidad a los mismos, evitándose la formación de microcristales. Cabe

mencionar que el PTX causa serios efectos secundarios, incluyendo toxicidad al sistema nervioso periférico. Además, su limitada bioaccesibilidad al tumor lleva a su administración en grandes dosis induciendo una mayor toxicidad y resistencia multidroga (MDR). Los ensayos de citotoxicidad de los complejos β -caseína-PTX junto con β -caseína-TQD exhibieron una notable eficacia sinérgica contra células humanas de carcinoma gástrico presentando MDR. Por lo tanto, el empleo de β -caseína para la solubilización de estas drogas, constituiría un nuevo sistema terapéutico eficaz que puede superar la MDR en el tratamiento del cáncer gástrico y que puede ser administrado por vía oral, con todas las ventajas que ello implica. Es importante remarcar que la fácil digestibilidad de las proteínas constituye una propiedad que potencia el desarrollo de este tipo de tratamientos y, en especial la β -caseína, posee la capacidad de autoasociarse en micelas lo que permite un mejor entrapamiento de la droga hidrofóbica (Bar-Zeev y col., 2016). La β -caseína también ha demostrado capacidad de solubilizar, vinblastina, irinotecán, mitoxantrona y docetaxel (Shapira y col., 2010).

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los PUFAs son ácidos grasos que presentan más de una insaturación (C=C) en su cadena carbonada. Tomando el extremo metilo terminal (-CH₃) de la molécula como C1, si la primer insaturación se encuentra entre el C3 y el C4, el PUFA se denomina ‘omega-3’ o ‘n-3’, mientras que si la primer insaturación se encuentra entre el C6 y el C7 el PUFA se llama ‘omega-6’ o ‘n-6’ (Fig. 9). Ejemplos de PUFAs n-3 son el ácido docosahexanoico (DHA; 22:6) con 6 insaturaciones, el eicosapentanoico (EPA; 20:5) con 5 insaturaciones y el ácido α -linolénico (ALA; 18:3) con 3 insaturaciones. Como ejemplo de PUFA n-6 se encuentran el ácido araquidónico (AA; 20:4) con 4 insaturaciones y el ácido linoleico (AL; 18:2) con 2 insaturaciones (Ruxton y col., 2004).

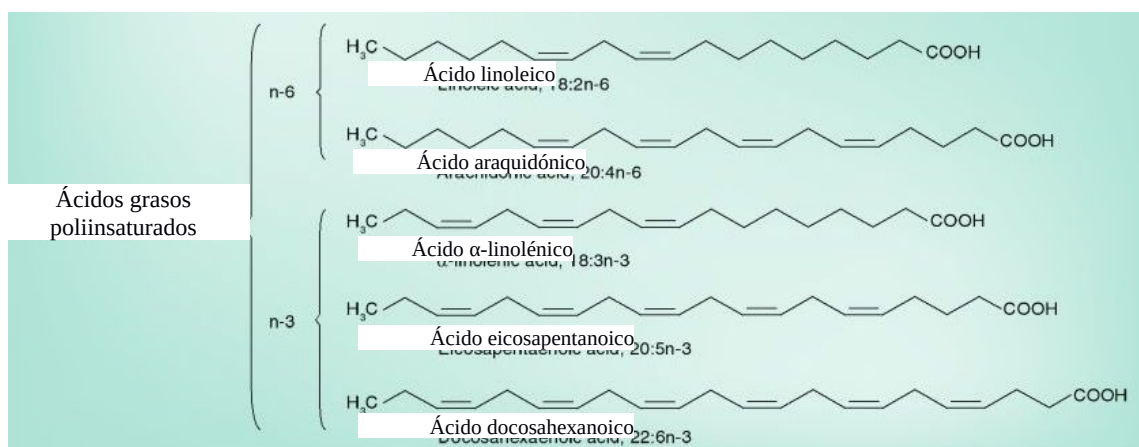


Figura 9. Estructura molecular de ácidos grasos poliinsaturados ().

La ingesta de PUFAs presenta numerosos efectos benéficos para la salud humana incluyendo disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, inflamación intestinal, asma, fibrosis quística, artritis reumatoidea, trastornos mentales e inadecuado desarrollo cerebral. El organismo humano posee la capacidad de sintetizar EPA y DHA a partir de ALA. A su vez, también tiene la capacidad de sintetizar AA a partir de AL. Sin embargo, el AL y ALA no pueden ser sintetizados endógenamente por el organismo por lo que son esenciales en la dieta humana (Ruxton y col., 2004).

El carácter lipofílico de los PUFAS les confiere una muy baja solubilidad en agua lo cual ha limitado su uso en la formulación de alimentos. La formación de complejos de inclusión PUFA-proteína sumado a una asociación con un PS, no solo permitiría su solubilización en medios acuosos sino también su protección frente a la oxidación, brindando así mayor estabilidad tanto coloidal como química (Zimet y Livney, 2009). Zimet y Livney (2009) llegaron a esta conclusión con complejos DHA-BLG unidos, a su vez, con pectina de bajo metoxilo.

1.7. Estabilidad química de PUFAs

En los alimentos, los ácidos grasos se encuentran esterificados con glicerol formando las moléculas lipídicas llamadas triglicéridos. Estos lípidos son susceptibles al deterioro mediante diferentes mecanismos los cuales se engloban bajo el término rancidez. La rancidez se divide en dos grupos: lipólisis o rancidez hidrolítica y autoxidación o rancidez oxidativa (Dergal, 1999). La lipólisis se debe a la acción de las lipasas que liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos. El calentamiento en presencia de agua también produce lipólisis (Dergal, 1999). Por otro lado, la autoxidación se debe a la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos (Dergal, 1999). Es decir, los lípidos pueden ser oxidados por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (Fennema, 1996).

Además, es importante mencionar que los ácidos grasos libres son más susceptibles a la oxidación que los ácidos grasos esterificados con glicerol (triglicéridos) (Fennema, 1996).

La autoxidación de lípidos es una reacción con oxígeno molecular por medio de un mecanismo autocatalítico y constituye la principal reacción involucrada en el deterioro oxidativo de lípidos (Fennema, 1996). Se denomina autoxidación porque es un mecanismo que genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran el curso de la reacción. Entre los productos de reacción se encuentran algunos compuestos de bajo peso molecular que le confiere el olor característico a las grasas oxidadas. A medida que aumenta el número de insaturaciones la oxidación se produce más rápido (Dergal, 1999).

Se conoce que el mecanismo de la autoxidación funciona a través de la producción de radicales libres y que posee un gran número de rutas, aunque en términos

prácticos se considera que se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Fig. 10) (Dergal, 1999).

Iniciación	RH	-----	R· + H·	Radical libre
Propagación	R· + O ₂	-----	ROO·	Radical hidroperóxido
	ROO· + RH	-----	R· + ROOH	Hidroperóxido
Terminación	R· + R·	-----	RR	Compuestos muy estables
	R· + ROO·	-----	ROOR	
	ROO· + ROO·	-----	ROOR + O ₂	
	RO· + R·	-----	ROR	
	2 RO· + 2 ROO·	-----	2 ROOR + O ₂	

Figura 10. Mecanismo de autooxidación de lípidos (Dergal, 1999).

Aunque la autooxidación requiere de una energía de activación relativamente baja (20 a 35 kcal/mol), la formación de un radical libre a partir de la reacción de un ácido graso con el oxígeno es termodinámicamente difícil de producirse ya que el oxígeno en su estado normal es muy poco electrofílico y por sí solo no actúa sobre los C=C. Por lo tanto, la reacción de formación de los primeros radicales (iniciación) necesaria para comenzar la propagación debe ser catalizada. Se ha propuesto que la iniciación de la oxidación puede ocurrir por descomposición de hidroperóxidos, catalizada por metales (hierro y cobre) o por exposición a la luz (Dergal, 1999; Fennema, 1996).

Como se observa en la Fig. 10, la etapa de propagación genera hidroperóxidos, que por ser muy reactivos, propician otras transformaciones como su ruptura y la consecuente formación de nuevos radicales que alimentan la reacción, interacción con otras moléculas, etc. Los productos finales de la autooxidación incluyen polímeros de

alto peso molecular, aldehídos, cetonas, ácidos, cetoglicéridos y epóxidos (Dergal, 1999).

Por otro lado, las altas temperaturas, especialmente por encima de 60°C, aceleran la autoxidación, de manera que la velocidad se duplica por cada 15°C de aumento. Cabe aclarar que la refrigeración y aún la congelación no necesariamente la inhiben ya que la presencia de catalizadores y la disponibilidad de los reactivos puede provocar que se lleve a cabo aún en estas condiciones (Dergal, 1999).

1.8. Fundamentación del tema elegido

Uno de los aspectos que se desea abordar en la presente tesis doctoral es el estudio de la nanopartículas de OVA como nanovehículo de PUFAs, a través de la formación de complejos de inclusión. En este sentido, es importante mencionar que en la literatura existente hasta el momento, no se han reportado estudios que evalúen a la OVA, tanto nativa como sus agregados, como nanovehículo de PUFAs. Sin embargo, en lo que respecta a la OVA nativa, se encuentran dos estudios que serían relevantes en relación a la temática a desarrollar.

Uno de ellos (Kamilya y col., 2007), estudia la interacción de OVA nativa con ácido esteárico por fluorescencia intrínseca, observándose que la presencia del mismo produce una disminución en la fluorescencia intrínseca de la proteína (Kamilya y col., 2007). En base a este resultado se sugiere que la OVA formaría complejos con ácidos grasos. Sin embargo, no se ha reportado un estudio exhaustivo que involucre la determinación de parámetros (estequiométricos, termodinámicos, cinéticos, etc.), asociados a dicha unión o interacción.

Por otro lado, King y col. (1989) han demostrado la capacidad de la OVA de ligar ácido oleico (AO), el cual es un ácido graso monoinsaturado. Sin embargo, sólo se

planteó un estudio con el uso de este ácido graso para realizar una modificación de la OVA como alternativa a la acilación covalente. En este sentido, ellos solamente trabajaron con una concentración fija de AO (20 moles AO/mol OVA). Se demostró que el AO se une a la OVA por medio de interacciones hidrofóbicas confiriéndole, además, una carga neta más negativa. También sugirieron que los aminoácidos Trp y Tyr estarían involucrados en los sitios de unión del OA a la OVA (King y col., 1989).

Estos estudios demuestran la potencialidad de la OVA y sus agregados como nanovehículos de PUFAs. En el presente trabajo, se propone el uso de AL como PUFA modelo. Como se mencionó en la sección 1.6, el AL es un ácido graso esencial para el organismo humano.

En base a lo expuesto en los párrafos anteriores, cabe destacar que, si bien la OVA no posee dominios o sitios hidrofóbicos de unión bien definidos en su estructura, tales como los que se reportan para BLG y BSA, se demostró que igualmente puede ligar compuestos hidrofóbicos. Esto se debe a que las asociaciones ligando-proteína frecuentemente están basadas en interacciones no específicas (Livney 2012).

Uno de los aspectos importantes de la evaluación de OVA como nanovehículo de PUFAs radica en que es la proteína mayoritaria de la clara de huevo, la cual constituiría una fuente proteica de alta disponibilidad para el desarrollo de sistemas de encapsulación de compuestos hidrofóbicos.

Por otro lado, se ha demostrado el aumento en la capacidad de ligar compuestos hidrofóbicos de proteínas sometidas a tratamiento térmico respecto a las nativas (Le Maux y col., 2013). Esto se explica por la exposición de grupos hidrofóbicos (ocultos en la estructura globular) que se da por el proceso de desnaturalización térmica (Croguennec y col., 2007; Perez y col. 2014). En este sentido, el tratamiento térmico constituye una estrategia interesante para aumentar la funcionalidad de una proteína

globular en relación a su capacidad de vehiculizar compuestos hidrofóbicos. El atractivo del tratamiento térmico para la potenciación de la funcionalidad de proteínas radica en que involucra operaciones simples de procesamiento y no requiere de la utilización de solventes. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone, en primer lugar, el estudio del efecto del tratamiento térmico sobre el tamaño de agregados de OVA a fin de encontrar condiciones que permitan obtener vehículos de tamaño nanométrico (OVAn).

Además, como se mencionó anteriormente, el tratamiento térmico de las proteínas globulares en solución produce no solo el aumento de su hidrofobicidad sino también la agregación de las macromoléculas para formar nuevas entidades proteicas. Este aspecto sumado a la potenciación de la capacidad de ligar compuestos hidrofóbicos presupone el abordaje del estudio de la interacción ligando-proteína no solo a partir de las técnicas y modelos tradicionales (fluorescencia, por ejemplo) sino a partir de nuevos enfoques que implican y permiten un mejor entendimiento de las interacciones y una revisión crítica respecto a la aptitud de los métodos tradicionalmente usados. En este sentido, en la presente tesis se propone el abordaje del estudio de la formación de nanocomplejos AL-OVAn a partir de un modelo de adsorción, siendo las OVAn adsorbentes y AL adsorbato.

Por otra parte, como se mencionó en la sección 1.5.3, las proteínas y los PS pueden interactuar en diferentes formas en función del pH. Además, el PS puede conferir estabilidad química al ligando unido a la proteína por lo que puede ser utilizado para proteger el AL frente a la oxidación. De allí que resulta particularmente interesante el estudio de las interacciones entre agregados de OVA y PS, a fin de encontrar las condiciones que permitan la producción de nanopartículas biopoliméricas. En la presente tesis se propone el uso de GA y PAM como PS aniónicos para el estudio de su interacción con agregados de OVA. Cabe mencionar que no se registran en la

bibliografía existente estudios de agregados de OVA y PS, por lo que los resultados derivados del presente trabajo constituirían un avance en el conocimiento sobre estas interacciones.

Por último, cabe mencionar que uno de los principales inconvenientes en la producción de nanopartículas biopoliméricas es que se elaboran en régimen muy diluido. Esto no solo se debe a características propias de los sistemas proteína-PS sino también a su potencial utilización como matriz para la solubilización de compuestos hidrofóbicos en alimentos tipo bebidas (Zimet y Livney, 2009). Estos aspectos limitarían, en principio, su aplicación en ciertos alimentos ya que su incorporación implicaría el agregado o la presencia de cantidades excesivas de agua, lo que alteraría significativamente las propiedades de aquellos alimentos que no poseen excesiva cantidad de agua. Este inconveniente supone entonces la necesidad de concentrar las nanopartículas biopoliméricas. Para ello puede plantearse el empleo de la separación de fases asociativa previo a alguna técnica de secado como, por ejemplo, la liofilización, a fin de eliminar el agua para obtener los nanovehículos en forma de polvo. De este modo, una de las ventajas de la obtención de las nanopartículas biopoliméricas en polvo sería que permitiría el agregado a alimentos en mayores concentraciones y su uso no estaría limitado a los alimentos fundamentalmente acuosos. El estudio del proceso de obtención de nanopartículas biopoliméricas (AL-OVA-GA y AL-OVA-PAM) en polvo y su caracterización es otra de las temáticas que se abordan en la presente tesis.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

En la presente tesis se propone como **Objetivo general**:

Reunir conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, que permitan el diseño y caracterización de nanovehículos para el transporte, protección y liberación de PUFAs a partir de nanopartículas de OVA obtenidas por tratamiento térmico y polisacáridos aniónicos (PS). Como PUFA modelo se empleará ácido linoleico (AL).

2.2. Objetivos específicos

Se proponen como **Objetivos específicos**:

Objetivo 1. Estudiar las condiciones de las variables que permitan la obtención de agregados de OVA de tamaño nanométrico (OVAn) con elevada hidrofobicidad superficial.

Objetivo 2. Estudiar la obtención y caracterización de los complejos AL-OVAn.

Objetivo 3. Estudiar la interacción de OVAn con PS para encontrar condiciones que permitan la obtención de nanopartículas biopoliméricas.

Objetivo 4. Obtener y caracterizar las nanopartículas biopoliméricas AL-OVAn-PS en polvo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para los estudios desarrollados en la presente tesis se utilizó la ovoalbúmina (OVA) como proteína globular modelo. La OVA (producto A5503, 98% de pureza de acuerdo a electroforesis en gel de agarosa) fue adquirida en Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). El ácido linoleico (AL) fue también adquirido en Sigma-Aldrich. El AL se mantuvo almacenado a -18°C bajo atmósfera de nitrógeno para evitar su oxidación. El ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) fue obtenido de Fluka Chemie AG (Suiza). La goma arábiga (composición % b.s.: fibra soluble 89,5; azúcares 4,50; proteína 2,89; cenizas 3,06; grasa 0,05) fue provista por el Centro Enológico Rivadavia S.A. (Argentina). La pectina de alto metoxilo (grado de esterificación 66-70%) (Composición % b.s.: fibra dietaria 74,7; azúcares 20,9; proteína 2,20; cenizas 2,20; grasa 0) fue provista por Cargill™ (Argentina). Se utilizó NaCl y fosfato di y monobásico de potasio de Cicarelli (Argentina).

3.2. Métodos

3.2.1. Formación de nanopartículas de OVA

Las soluciones de OVA se prepararon disolviendo la proteína en NaCl 50 mM y dejando por una noche a 4°C para completar su hidratación. Luego, el pH se ajustó a 7,5 usando NaOH y las soluciones se filtraron empleando membranas de ésteres de celulosa de 0,22 micras (Merk Millipore, Alemania) con el fin de eliminar la existencia de posibles agregados proteicos. La concentración de proteína se verificó por

espectroscopía de absorción a 280 nm usando un coeficiente de extinción de $0.712 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Croguennec y col., 2007).

Para el tratamiento térmico, se seleccionó un rango de temperatura en torno a la temperatura de desnaturalización de OVA ($80,1^\circ\text{C}$) (Matsudomi y col., 2001), en base a bibliografía existente y a ensayos previos (Sponton y col. 2015) con el fin de permitir la exposición de los residuos hidrofóbicos ocluidos que tiene lugar durante la desnaturalización por calentamiento (Croguennec y col., 2007). Las soluciones de OVA se colocaron en tubos de vidrio tapados y se calentaron en baño de agua a 75°C , 80°C y 85°C . Estos sistemas fueron llamados OVA-75, OVA-80 y OVA-85, respectivamente. Los tubos fueron retirados del baño de agua a diferentes tiempos (3, 5, 10, 15, 20, 25 min), e inmediatamente se enfriaron en un baño de hielo. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis. Las condiciones del medio acuoso (pH 7,5 y fuerza iónica de NaCl 50 mM) bajo las cuales se llevó a cabo el tratamiento térmico se fijaron con el fin de promover una considerable repulsión electrostática y, en consecuencia, una baja agregación lo que podría generar agregados de tamaño nanométrico (Croguennec y col., 2007).

3.2.2. Caracterización de nanopartículas de OVA y de sus complejos con AL

3.2.2.1. Determinación de tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz

La dispersión de luz dinámica (DLS, en inglés *Dynamic Light Scattering*) es una técnica no invasiva y no destructiva que permite medir el tamaño de una gran población de partículas en un corto tiempo (Arzenšek y col., 2010; Malvern Instruments Ltd-a). También es conocida como PCS (*Photon Correlation Spectroscopy*) o como QELS (*Quasi-elastic Light Scattering*) (Arzenšek y col., 2010).

El equipo DLS consta básicamente de tres componentes: un láser, el cual hace incidir un haz de luz sobre la muestra; un detector que colecta la luz dispersada y; un correlador digital que permite procesar la señal (Fig. 11) (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

En la presente tesis, el equipo utilizado en las mediciones de tamaño fue un Zetasizer Nano ZS90 - Malvern Instruments Ltd. (Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne de longitud de onda de salida de 632,8 nm. Este equipo permite medir tamaños de partículas en un rango de 0,6 a 6000 nm (Malvern Instruments Ltd-a).

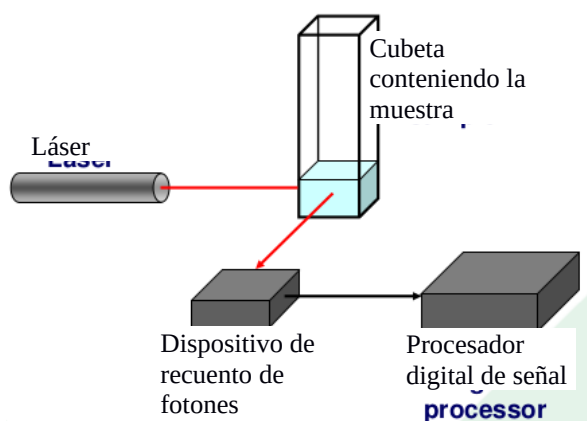


Figura 11. Disposición de los componentes del equipo de medición de tamaño de partícula por DLS (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

La técnica de DLS se basa en el hecho de que las partículas y las macromoléculas en solución a temperatura constante están sometidas a movimiento Browniano (Malvern Instruments Ltd-a). El movimiento Browniano es un movimiento aleatorio producto de la colisión de las moléculas de solvente con las partículas bajo análisis (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). Fijadas la viscosidad y la temperatura, la velocidad del movimiento Browniano dependerá del tamaño de partícula (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). Cuanto más pequeño sea el tamaño

de partícula, más rápido será el movimiento Browniano y cuanto más grande, más lento se volverá. La velocidad del movimiento Browniano se define por el coeficiente de difusión traslacional (D) (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

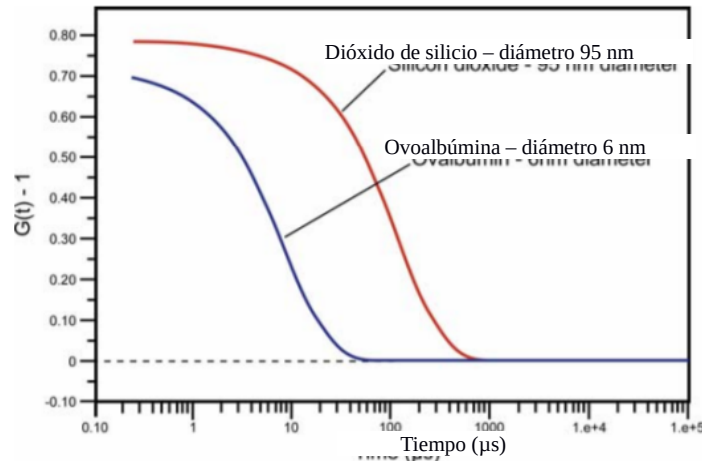


Figura 12. Función de correlación representativa de partículas con diferente tamaño (dióxido de silicio y ovoalbúmina) (Malvern Instruments Ltd-a).

Como consecuencia del movimiento Browniano la luz dispersada del conjunto de partículas fluctuará con el tiempo (Malvern Instruments Ltd-a). La fluctuación de la luz dispersada con el tiempo es procesada por el correlador (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). El correlador es básicamente un comparador de señal. En DLS, mide el grado de similitud de una señal consigo misma a intervalos de tiempo fijos, t , $t+\delta t$, $t+2\delta t$, $t+3\delta t$, etc, donde δt es del orden de los nano o microsegundos. El correlador permanentemente suma y multiplica fluctuaciones en corta escala de tiempo a partir de la señal de intensidad de luz dispersada y así genera la función de correlación de la muestra (Fig. 12). De este modo, si se compara la intensidad de una señal consigo misma a tiempo cero, habrá una correlación perfecta. Con el transcurso del tiempo, la señal irá variando, por lo que la correlación disminuirá. Para una señal aleatoria, la correlación se reducirá siempre hasta algún punto en que la señal no tendrá relación con

la señal original y la correlación se volverá cero. El tiempo que toma este decaimiento de la función de correlación es característico de la velocidad de difusión y, por lo tanto, del tamaño de la partícula (Fig. 12). Si las partículas son grandes, la señal cambiará lentamente y la correlación persistirá por más tiempo que en el caso de partículas pequeñas, donde sucede lo contrario (Fig. 12) (Malvern Instruments Ltd-a; Malvern Instruments Ltd-b).

En DLS, toda la información respecto al movimiento o difusión de partículas en solución está contenida en la función de correlación (Fig. 12) (Malvern Instruments Ltd-a). A partir de la deconvolución de la función de correlación (método de CONTIN) se obtiene la distribución de tamaño de partícula (PSD). La PSD obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por partículas de varios tamaños y es conocida como distribución de tamaño en intensidad (PSDi) (Arzenšek y col., 2010). El área bajo cada pico en la gráfica PSDi es proporcional a la intensidad dispersada relativa de cada familia de partículas (Malvern Instruments Ltd-a).

Cuando la curva de correlación es ajustada a un algoritmo cumulante exponencial simple, es posible obtener un único valor de coeficiente de difusión (D) representativo del conjunto de partículas, a partir del cual es posible calcular un único valor de diámetro hidrodinámico (asumiendo que las partículas tienen forma esférica) usando la ecuación de Stokes-Einstein (Ec. 2) (Malvern Instruments Ltd-a):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta d_H}$$

Ecuación 2

donde, d_H es el diámetro hidrodinámico (m); D es el coeficiente de difusión traslacional ($m^2 s^{-1}$); k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} N m K^{-1}$); T es la temperatura

absoluta (K) y; η es la viscosidad del solvente (N s m^{-2}) (Arzenšek y col., 2010). El diámetro hidrodinámico medido por DLS se refiere al diámetro que posee una partícula que difunde en un fluido (Malvern Instruments Ltd-b).

De esta manera, el diámetro hidrodinámico se define como el diámetro de una esfera rígida que difunde a la misma velocidad de difusión que la partícula bajo análisis (independientemente de si la partícula es esférica o no) (Fig. 13). Esto permite describir a un objeto tridimensional citando solo una única dimensión (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). El d_H obtenido usando la ecuación de Stokes-Einstein es un valor promedio ponderado por la intensidad de dispersión de luz de las partículas y se llama Z-average (Zav) o diámetro hidrodinámico cumulante (Arzenšek y col., 2010). El Zav permite citar un único valor promedio de tamaño de una PSDi, lo que puede ser apropiado para distribuciones monomodales, pero es claramente inadecuado para dar una completa descripción de la distribución de resultados en distribuciones polidispersas (Malvern Instruments Ltd-a).

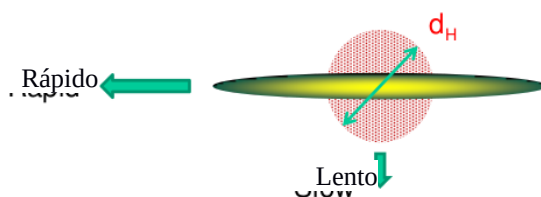


Figura 13. Diámetro hidrodinámico (d_H en la figura) de una partícula no esférica (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

Por otro lado, el análisis de cumulantes de la función de correlación no solo permite obtener el Zav sino también un índice de polidispersidad global (PDI), el cual es indicativo del ancho de una distribución de tamaño global asumiendo un solo valor

medio (Zav) (Arzenšek y col., 2010; Nobbmann-Malvern Instruments Ltd.; Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

El término polidispersidad (o, más recientemente dispersidad, según recomendación de la IUPAC) se utiliza para describir el grado de "no uniformidad" de una distribución de tamaño. Distribuciones con $PdI < 0,1$ se denominan monodispersas, mientras que $PdI > 0,1$ caracterizan a muestras polidispersas con polidispersidad moderada (0,1-0,4) y polidispersidad amplia ($> 0,4$) (Malvern Instruments Ltd-d).

Una distribución monodispersa puede ser correctamente caracterizada por los valores de Zav y de PdI, mientras que en muestras polidispersas es necesario mostrar las distribuciones.

Debido a que la intensidad de luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro, la PSDi tenderá a sesgarse hacia mayores tamaños de partícula y hará más difícil la medición de partículas pequeñas, debido a que la contribución a la intensidad de luz dispersada por las partículas será extremadamente baja en comparación con las de mayor tamaño cuando ambas están presentes en la solución (Arzenšek y col., 2010; Malvern Instruments Ltd-a).

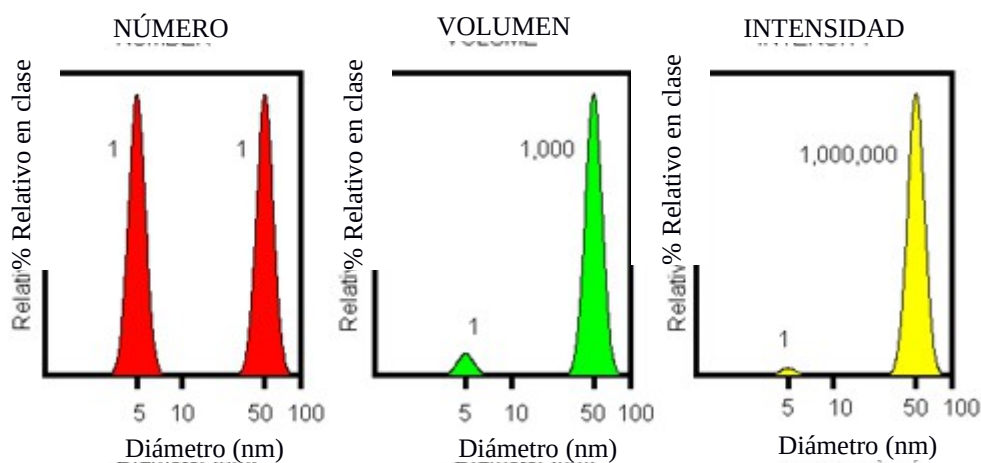


Figura 14. Distribuciones de tamaño de partícula en número, volumen e intensidad (Arzenšek y col., 2010).

En la Fig. 14 puede apreciarse mejor este efecto. Allí se observan dos poblaciones de partículas con igual cantidad o número (izquierda). Sin embargo, en la distribución en volumen, el porcentaje relativo resulta mil veces mayor para la población de partículas más grandes (centro), mientras que el porcentaje de intensidad de luz dispersada es un millón de veces mayor respecto a la población de partículas pequeñas (Arzenšek y col., 2010).

Si bien DLS permite obtener PSD_i, es posible realizar las transformaciones a partir de ella a fin de obtener las PSD en volumen (o masa) (PSD_v) y la PSD en número (PSD_n) aplicando la teoría de Mie, donde son empleadas las propiedades ópticas del analito (índice de refracción y absorción). Los supuestos requeridos para la transformación son: i) las partículas pueden ser modeladas como esferas; ii) todas las partículas tienen una densidad equivalente y homogénea; iii) no hay error en la PSD_i. En relación a este último punto, DLS tiende a sobrestimar el ancho de los picos de la PSD_i lo cual se traduce en un pequeño grado de polidispersidad inherente (Malvern Instruments Ltd-a). Las transformaciones PSD_v y PSD_n tienden a magnificar esto por lo que no deberían usarse para informar tamaños, sino más bien, para informar cantidades relativas de material a nivel de cada pico (composición en masa o en número) (Malvern Instruments Ltd-a; Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). Por otro lado, es importante mencionar que el hecho de que la intensidad sea proporcional a la sexta potencia del diámetro permite detectar la presencia de trazas de agregados los cuales se evidenciarán en la PSD_i, pero no en la PSD_v o PSD_n (Arzenšek y col., 2010).

En las mediciones realizadas en el presente trabajo los valores de diámetro hidrodinámico que se informan se obtuvieron a partir del pico de la PSD_i. El índice de polidispersidad (PDI) también se consideró en el análisis de las PSD. Los índices de

refracción de disolvente y proteínas fueron 1,33 y 1,50, respectivamente (Croguennec y col., 2007). Las mediciones se realizaron al menos por duplicado a 25°C.

3.2.2.2. Evaluación de la morfología por Microscopía de Fuerza Atómica

El principio de trabajo de la microscopía de fuerza atómica (AFM) se basa en la medición de la fuerza de interacción entre una punta (*tip*) y la superficie de la muestra usando sondas especiales que constan de un *cantilever* (micro-viga voladiza elástica) con una punta afilada en el extremo (Fig. 15). La fuerza aplicada a la punta por la superficie resulta en una flexión del *cantilever*. Midiendo la deflexión del *cantilever* es posible evaluar la fuerza de interacción punta-superficie (Mironov, 2004).

La adquisición de la topografía de la superficie de la muestra se realiza mediante el registro de las pequeñas desviaciones del *cantilever*. Para ello se emplea un sistema óptico, el cual está alineado de manera que el haz emitido por un diodo láser se enfoca en el *cantilever*, y el haz reflejado llega al centro de un fotodetector (Fig. 15) (Mironov, 2004).

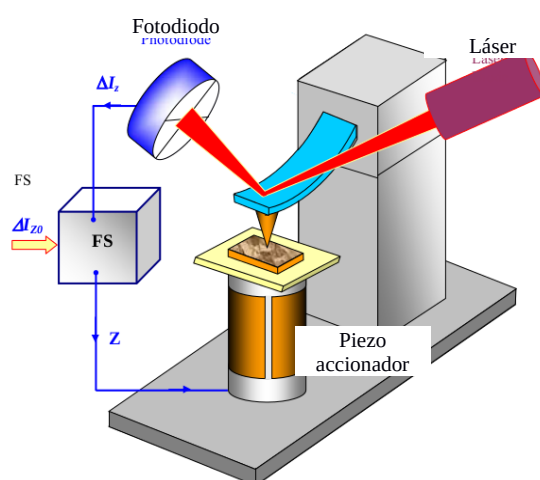


Figura 15. Esquema simplificado del funcionamiento de microscopio AFM (Mironov, 2004).

En relación a las dimensiones, la punta de AFM tiene un par de micrones de largo y frecuentemente, menos de 10 nm de diámetro en el extremo. Esta magnitud es importante ya que influirá en la resolución. El *cantilever* vinculado al tip posee 100-200 μm de longitud (Schalley, 2007).

La interacción de la punta con la muestra tiene características complejas. Sin embargo, pueden resumirse en que la punta es atraída por la muestra a largas distancias y es repelida a distancias cortas (Mironov, 2004). Es decir, la atracción aumenta hasta que la punta y la superficie tienen aproximadamente la distancia de un enlace químico. Cuando la distancia entre la punta y la superficie disminuye aún más, la interacción se vuelve repulsiva. En el modo *tapping*, la interacción del *cantilever* con la superficie consiste en fuerzas de van der Waals más la fuerza elástica que es sumada durante el contacto, aunque predominan las fuerzas repulsivas (Mironov, 2004; Schalley, 2007).

En la práctica se usa más frecuentemente el modo de semi-contacto (también llamado modo de contacto intermitente o *tapping*). En esta técnica, las oscilaciones forzadas en el *cantilever* son excitadas cerca de una frecuencia de resonancia con una amplitud aproximadamente 10-100 nanómetros. El *cantilever* se aproxima a la superficie de modo que en la semi oscilación inferior la punta entra en contacto con la superficie de la muestra ejerciendo intensas fuerzas de repulsión (Mironov, 2004; Schalley, 2007). Durante el barrido, son registrados los cambios de amplitud y fase de las oscilaciones del *cantilever*. La interacción del *cantilever* con la superficie en el modo *tapping* comprende las fuerzas de van der Waals más la fuerza elástica que es sumada durante el contacto. El cambio de fase de la oscilación en el *cantilever* también se registra como "imagen de contraste de fase" (Mironov, 2004).

Para las mediciones por AFM en el presente trabajo, se prepararon soluciones de OVA_n y AL-OVA_n (43 mol AL/mol OVA) en una concentración de 0,01 g/L de OVA_n.

Luego, alícuotas de 2 μL de muestra de OVAn y AL-OVAn fueron adsorbidas a una superficie de mica clivada (1 cm^2), adherida a discos de acero, a través de secado en cámara de vacío a temperatura ambiente y protegido de la luz para evitar el deterioro oxidativo del AL. Las imágenes fueron tomadas en modo *tapping* en aire en un microscopio Agilent 5400 (USA). Para ello se usaron *cantilevers* estándar de silicio con parte trasera recubierta de aluminio (Budget Sensors; model: Tap300Al-G, Bulgaria), con las siguientes especificaciones: longitud: $125\text{ }\mu\text{m}$; radio de la punta: $< 10\text{ nm}$; ancho medio: $30 \pm 5\text{ }\mu\text{m}$; espesor: $4 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$; altura de la punta: $17 \pm 2\text{ }\mu\text{m}$; constante de fuerza del resorte: 40 N/m . La frecuencia de oscilación del *cantilever* usada fue 280 kHz . Las muestras fueron barridas a una velocidad de 1 línea/s . Las imágenes se procesaron por medio del software Gwyddion 2.44. La estimación de los diámetros de partícula (diámetros AFM) se obtuvieron a partir de las imágenes de fase por medio de las herramientas del software.

3.2.2.3. Determinación de hidrofobicidad superficial y estudio de interacción AL-OVAn por fluorescencia

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia (emisión de luz a partir de una sustancia o fluoróforo) que ocurre a partir de estados electrónicamente excitados (Albani, 2004; Lakowicz, 2006). En una población de moléculas el pasaje de electrones de un único nivel electrónico fundamental a un estado excitado es inducido por absorción de luz (fotones). En el estado excitado la molécula es energéticamente inestable y puede retornar al estado basal. Una de las formas en que puede suceder esto es con la emisión de un fotón con una tasa de radiación constante. De este modo, la fluorescencia se define como la emisión de un fotón por parte de un fluoróforo, al pasar del estado de más baja excitación al estado basal (Albani, 2004).

El tiempo promedio en el que el fluoróforo retorna de su estado excitado a su estado basal es ~ 10 ns (10×10^{-9} s), por lo que la emisión es un proceso muy rápido (10^8 s⁻¹). Por lo tanto, para poder observar la emisión de fluorescencia el fluoróforo debe ser excitado en forma continua (Albani, 2004; Lakowicz, 2006).

El fenómeno de fluorescencia ocurre típicamente a partir de moléculas aromáticas. En el caso de las proteínas, estas cuentan con tres aminoácidos aromáticos que son responsables de la absorción y fluorescencia de las mismas. Estos fluoróforos son triptofano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) y comúnmente son llamados fluoróforos intrínsecos. También existen fluoróforos extrínsecos como el ácido 1-anilino naftalen 8-sulfónico (ANS) (Albani, 2004; Lakowicz, 2006). Ambos tipos de fluoróforos permiten realizar caracterizaciones estructurales y de interacción proteína-ligando.

La fluorescencia puede ser cuantificada a partir de la obtención de espectros de emisión usando un espectrofotómetro de fluorescencia. Un espectro de emisión corresponde a una distribución de la intensidad de emisión de fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión medida a una única longitud de onda de excitación (constante). También puede obtenerse el espectro de excitación a una longitud de onda de emisión constante (Lakowicz, 2006). En la presente tesis se trabajó solamente con espectros de emisión.

El espectrofotómetro de fluorescencia cuenta con una fuente de excitación (lámpara o láser), un monocromador de excitación o filtro (si la fuente es una lámpara) y un divisor de haz que se ubica en la trayectoria de la luz de excitación (Fig. 16). Este divisor refleja parte de la luz de excitación a una celda de referencia, que generalmente contiene un fluoróforo estable de referencia. El divisor de haz consiste en una fina pieza de cuarzo transparente, que refleja aproximadamente el 4% de la luz incidente. La

intensidad de la solución estándar es típicamente aislada con un filtro de paso de banda, y es proporcional a la intensidad de la luz de excitación. Los cambios en la intensidad de la lámpara de arco pueden ser corregidos dividiendo la intensidad de la muestra por la del fluoróforo de referencia (Albani, 2004; Lakowicz, 2006).

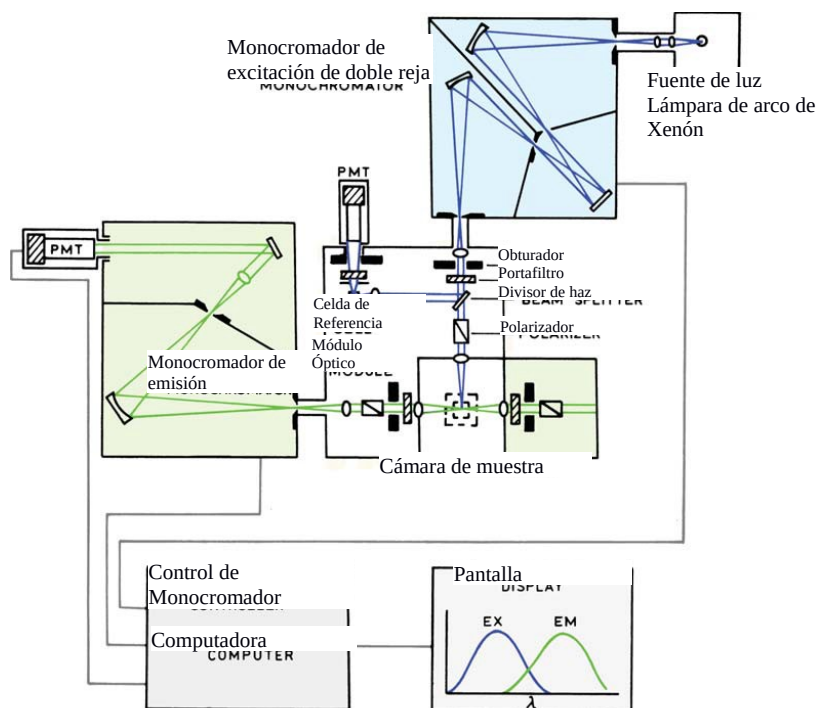


Figura 16. Diagrama esquemático de un espectrofotómetro de fluorescencia (Lakowicz, 2006).

Además cuenta con una cámara para ubicar la cubeta con la muestra a analizar y un monocromador de emisión o filtro (en el caso de que solo se desee registrar la intensidad a una longitud de onda de emisión constante). Los monocromadores están motorizados para permitir barrido automático de longitud de onda (Albani, 2004; Lakowicz, 2006).

La fluorescencia se detecta con tubos fotomultiplicadores y se cuantifica con dispositivos electrónicos. Los datos de salida se presentan generalmente en forma gráfica y se almacenan digitalmente (Lakowicz, 2006).

La energía absorbida por un fluoróforo es mayor que la energía liberada, por lo que la longitud de onda de emisión será siempre mayor a la de absorción (Albani, 2004).

El equipo utilizado para realizar las mediciones de fluorescencia en la presente tesis fue un espectrofotómetro de fluorescencia F-2000, Hitachi (Japón), el cual cuenta con una lámpara de Xenón de 500 W y celda de cuarzo para la muestra.

3.2.2.3.1. Determinación de hidrofobicidad superficial por fluorescencia extrínseca

En el presente trabajo se realizaron mediciones de fluorescencia extrínseca a fin de determinar la hidrofobicidad superficial. Para ello se utilizó la sonda ANS que tiene la propiedad de aumentar su fluorescencia cuando se une de manera no covalente a regiones hidrofóbicas expuestas sobre la superficie de proteínas (Croguennec y col., 2007).

Las muestras se diluyeron en buffer fosfato 50 mM, pH 7 hasta una concentración proteica de 0,043 g/L (1 μ M de OVA). Luego se agregaron 10 μ L de ANS 8 mM a 2 ml de solución (Croguennec y col., 2007). Posteriormente, se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 390$ nm). Del pico de cada espectro se registró la intensidad de emisión de fluorescencia (F_{ANS}) y la longitud de onda correspondiente (λ_{ANS}). A partir de la F_{ANS} se halló la intensidad de fluorescencia relativa (IFR-ANS), siendo IFR-ANS igual al cociente entre la F_{ANS} de la OVA tratada térmicamente y la F_{ANS} de la OVA nativa. A su vez, se obtuvieron los corrimientos en λ_{ANS} ($\Delta\lambda_{ANS}$) como la diferencia entre λ_{ANS} de la OVA tratada térmicamente y la OVA nativa.

El aumento en IFR-ANS y la magnitud del corrimiento de λ_{ANS} hacia menores valores ($\Delta\lambda_{ANS}$ negativo) son relacionados con la disminución de la polaridad del sitio de unión proteína-ANS (Albani, 2004).

3.2.2.3.2. Determinación de la interacción AL-OVA por fluorescencia intrínseca

Cuando una proteína se une a un ligando (*binding*), su fluorescencia intrínseca puede disminuir, fenómeno que se conoce como apagamiento de fluorescencia o *quenching* (Shpigelman y col., 2010). Esto sucede porque los complejos proteína-ligando absorben luz pero retornan inmediatamente al estado basal sin emisión de fotones (Lakowicz, 2006).

Para las mediciones de fluorescencia intrínseca se diluyeron las muestras en buffer fosfato 50 mM, pH 7 hasta una concentración de 0,043 g/L (1 μ M de OVA). Luego se agregaron volúmenes crecientes de solución etanólica de AL 15 mM alcanzando una concentración final entre 0 y 75 μ M de AL. La concentración de etanol no superó 0,5 % v/v, por lo que no cabría esperar alteración alguna de la estructura proteica. Las soluciones resultantes fueron dejadas 3 hs en reposo a fin de lograr alcanzar el equilibrio. Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca se obtuvieron a λ_{em} entre 310 y 360 nm, con excitación a λ_{ex} de 280 nm. Del pico de cada espectro se registró la intensidad de emisión de fluorescencia (F) y la longitud de onda correspondiente (λ). Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente.

A partir de la F se halló la intensidad de fluorescencia relativa (IFR), siendo IFR igual al cociente entre la F de la OVA con una dada concentración de ligando y la F de la proteína sin ligando.

Del ajuste de los datos de intensidad de fluorescencia al modelo de Stern-Volmer (Ec. 3) se puede obtener la constante de asociación (K_a), la cual se consideró como una estimación de la capacidad de *binding* de la proteína:

$$\frac{F_0}{F} = K_a [L] + 1 \quad \text{Ecuación 3}$$

Aquí, F_0 y F son la intensidad máxima de fluorescencia sin y con ligando, respectivamente y $[L]$ es la concentración total de ligando. Por regresión lineal de F_0/F versus $[L]$ pudo hallarse el valor de K_a como la pendiente del modelo de regresión lineal (Lakowicz, 2006).

3.2.2.4. Estudio de formación de complejos proteína-ligando mediante medidas de turbidez

3.2.2.4.1. Estimación de la estequiometría AL-OVAn por turbidez

Se agregaron volúmenes crecientes de solución etanólica de AL 100 mM a 2 ml de soluciones de OVA nativa y de OVAn (0,5 g/L en buffer fosfato 50 mM pH 7). También se preparó un sistema sin proteína (AL solo). La concentración final de AL estuvo en el rango de 0-1200 μ M. Tras 1 h de incubación se midió la turbidez (absorbancia a 400 nm) en un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido). Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

3.2.2.4.2. Determinación de la cinética de formación de complejos AL-OVAn

Se realizaron mediciones de turbidez (absorbancia a 400 nm) en función del tiempo de soluciones de AL en presencia de nanopartículas de OVA (OVAn, obtenidas

por calentamiento a 85°C por 5 min) en un rango de temperaturas de 20°C-40°C. El equipo utilizado fue un espectrómetro UV/Vis Lambda 20 Perkin Elmer (Estados Unidos), el cual consta de un termo-circulador de agua lo cual permite realizar mediciones a temperatura constante. En primer lugar, se colocaron 2,4 ml de solución de AL (1,25 mM en buffer fosfato 50 mM pH 7) en la celda de medición y se comenzó la lectura de absorbancia a 400 nm en función del tiempo. Después de ~20 s, se agregó 0,6 ml de solución de OVAn (Fig. 17) y se mezcló inicialmente mediante sucesivas succiones para alcanzar la homogeneidad. Luego se dejó sin agitación. Se trabajó con concentraciones variables de OVAn alcanzándose diferentes relaciones molares AL/OVA (L/P) entre 21,5 y 172 mol AL/mol OVA (los moles de OVAn fueron expresados en base a la unidad monomérica de OVA). Al agregar la solución de OVAn, la mezcla comenzó a disminuir la turbidez como resultado de la formación de complejos AL-OVAn. El momento en que la turbidez comenzó a disminuir fue tomado como tiempo inicial (coincidente con el momento de agregado de la solución de OVAn) (Fig. 17).

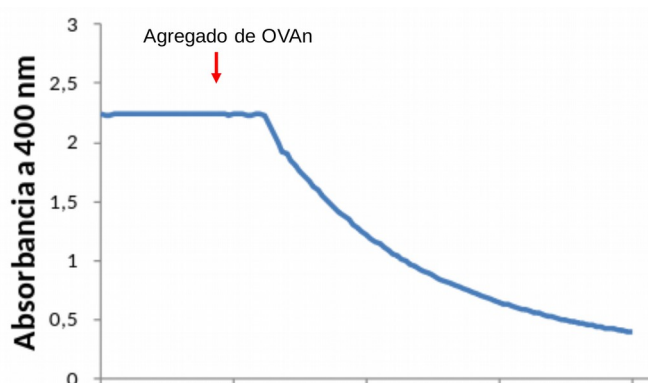


Figura 17. Variación de la absorbancia de solución de AL tras el agregado de OVAn.

Los resultados se informan como turbidez relativa, definida como el cociente entre la turbidez a un tiempo dado y la turbidez inicial. Las mediciones se realizaron al menos por duplicado.

La evolución de la turbidez con el tiempo se analizó asumiendo un proceso de adsorción *batch* sin agitación, donde la OVAn fue tomada como adsorbente y el AL como adsorbato. Para el análisis de los datos, se propuso el siguiente balance de masa (Yao y Chen, 2015):

$$L - L_t = q_t \cdot m \quad \text{Ecuación 4}$$

donde L es la cantidad total de moles de AL (obtenida a partir de la turbidez inicial); L_t es la cantidad de AL no adsorbido a tiempo t en la solución (obtenida a partir de la turbidez a tiempo t); q_t es la cantidad (moles) de AL adsorbidos por unidad de masa de adsorbente a tiempo t; m es la masa de adsorbente (OVAn). Cuando se alcanza el equilibrio de adsorción, q_t es definido como q_e , es decir, los moles de AL adsorbidos por mol de OVAn en el equilibrio (Yao y Chen, 2015).

Los datos de turbidez en función del tiempo se ajustaron a dos modelos de cinética de adsorción: modelo de pseudo-primer-orden y modelo de pseudo-segundo orden (Ec. 5 y Ec. 6, respectivamente) (Yao y Chen, 2015):

$$-\ln\left(1 - \frac{q_t}{q_e}\right) = k_1 \cdot t \quad \text{Ecuación 5}$$

$$q_t = \frac{k_2 \cdot q_e^2 \cdot t}{1 + k_2 \cdot q_e \cdot t} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de pseudo-primer-orden y de pseudo-segundo orden, respectivamente. El valor de k_1 se obtiene por medio de regresión lineal de $-\ln(1-q_t/q_e)$ versus t , mientras que los parámetros cinéticos del modelo de pseudo-segundo orden se pueden obtener a partir de su forma lineal:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad \text{Ecuación 7}$$

En la Ec. 7 puede observarse que $1/q_e$ es la pendiente mientras que $1/k_2 \cdot q_e^2$ es la ordenada al origen.

3.2.2.5. Determinación de la carga eléctrica superficial por medidas de potencial

Zeta

El potencial Zeta es una propiedad física que exhiben las partículas en suspensión, las moléculas y los materiales de interfase. Está asociado a la presencia de cargas en la superficie de las mismas. La carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de los iones de la región interfacial a su alrededor, resultando en un aumento de la concentración de contra iones (iones de carga opuesta a la de la partícula) cerca de la superficie (Malvern Instruments Ltd, 2014). La capa de líquido que rodea a una partícula se divide en dos partes: la capa de Stern, donde los iones están fuertemente unidos a la partícula, y la capa difusa donde los iones están unidos de manera más débil. A su vez, dentro de la capa difusa se define un borde o límite hipotético dentro del cual los iones y las partículas forman una entidad estable. Es decir, que cuando la partícula se mueve, los iones dentro de este límite también se mueven con ella. El potencial en este límite hipotético es lo que se conoce como potencial Zeta (Fig. 18) (Malvern Instruments Ltd, 2014).

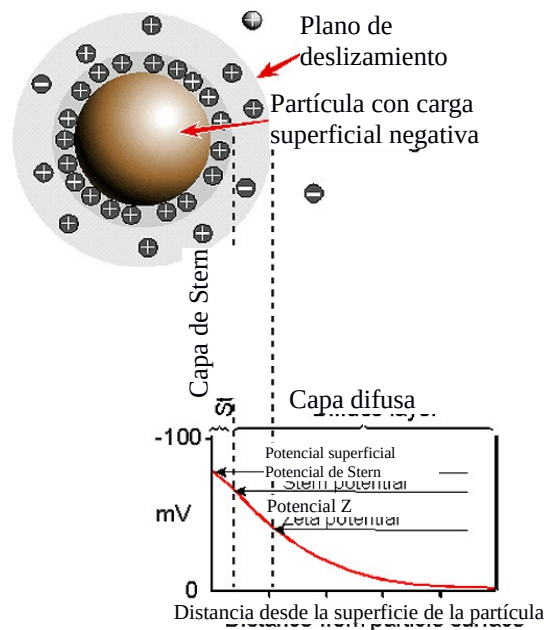


Figura18. Representación esquemática del potencial Zeta (Malvern Instruments Ltd, 2014).

Cuando se aplica un campo eléctrico, las partículas cargadas suspendidas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. La viscosidad se opone a ese movimiento, pero cuando el equilibrio entre estas dos fuerzas es alcanzado, las partículas se mueven a velocidad constante (Malvern Instruments Ltd, 2014). La velocidad depende de la fuerza del campo eléctrico o gradiente de voltaje, de la constante dieléctrica del medio, de la viscosidad y del potencial Zeta. La velocidad de una partícula por unidad de campo eléctrico es llamada movilidad electroforética. El potencial Zeta está relacionado con la movilidad electroforética por la ecuación de Henry (Ec. 8):

$$U_E = \frac{2\varepsilon z F(\kappa a)}{3}$$

Ecuación 8

donde U_E es la movilidad electroforética; z es el potencial Zeta; ε es la constante dieléctrica del solvente; η es la viscosidad del solvente; $f(\kappa a)$ es la función de Henry

($f(\kappa a) = 1$ según la aproximación de Smoluchowski para partículas en medio polar)
(Malvern Instruments Ltd, 2014).

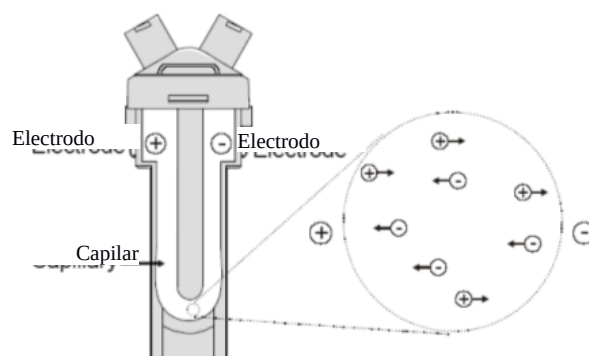


Figura 19. Celda para medición de potencial Zeta (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

El sistema clásico de micro-electroforesis es una celda capilar con electrodos en cada extremo en los cuales se aplica un potencial (Fig. 19). Las partículas se mueven hacia el electrodo y su velocidad es medida y expresada como movilidad electroforética (Malvern Instruments Ltd, 2014).

En la presente tesis, el equipo utilizado para las mediciones de potencial Zeta fue un Zetasizer Nano ZS90 - Malvern Instruments Ltd. (Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne con una longitud de onda de salida de 632,8 nm. El instrumento mide la movilidad electroforética de las partículas utilizando el efecto Doppler (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

El sistema de medición de potencial Zeta consta de seis componentes principales (Fig. 20). En primer lugar, se utiliza un láser como fuente de luz para iluminar las partículas dentro de la muestra. Esta fuente de luz se divide en dos para proporcionar un haz incidente y otro de referencia. Cuando un campo eléctrico se aplica a la celda, las partículas que se mueven a través del volumen de medición harán fluctuar la intensidad de luz con una frecuencia proporcional a la velocidad de las partículas (Malvern

Instruments Ltd, 2014; Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). El haz láser incidente pasa a través del centro de la celda, y la luz dispersada se detecta en un ángulo de alrededor de 13° (Malvern Instruments Ltd, 2014). El haz de luz dispersada es combinado con el haz de referencia. De este modo se crea un haz resultante cuyas variaciones en intensidad son registradas por el detector (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.). Esta información se pasa a un procesador de señal digital y luego a una computadora. La intensidad de la luz dispersada detectada debe estar dentro de un rango específico adecuado al detector para una medición correcta. Esto se consigue utilizando un atenuador, que ajusta la intensidad de la luz que llega a la muestra y, por lo tanto, la intensidad de la dispersión. Además, para corregir las diferencias en el grosor de la pared de la celda y la refracción del dispersante, se instalan ópticas de compensación para mantener la alineación óptima.

La movilidad de la partícula es determinada por la medida de la diferencia de fase (fase = frecuencia x tiempo) entre la frecuencia resultante y la frecuencia de referencia (320 Hz). El corrimiento de fase promedio con el tiempo mide la movilidad electroforética de la partícula (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

Para determinar el signo del Potencial Zeta se determina el sentido del desplazamiento Doppler, para lo cual se compara la frecuencia del haz resultante con la frecuencia del haz de referencia. Luego, si la frecuencia del haz resultante es menor a la del haz de referencia, el potencial Zeta obtenido será negativo mientras que si es mayor será positivo (Shaw, ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd.).

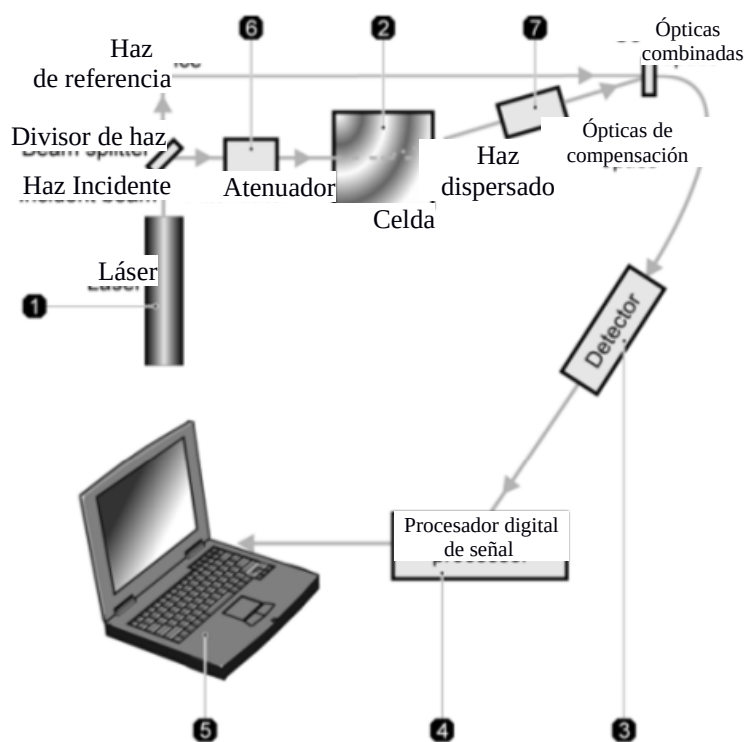


Figura 20. Disposición de los componentes del sistema para la determinación de potencial Zeta. (Malvern Instruments Ltd, 2014).

3.2.2.5. Determinación del potencial Zeta de soluciones de AL, AL-OVAn y OVAn

El potencial Zeta de sistemas AL sin y con OVAn se determinaron a partir de soluciones con concentración de OVAn de 2 g/L y de AL de 0,28 g/L (L/P: 21,5 mol AL/mol OVA). Las determinaciones se hicieron por triplicado a 25°C.

3.2.3. Estudio de las interacciones OVAn-PS

El proceso de nanoencapsulación de AL usando OVAn como nanovehículo y un PS para brindar protección adicional implicaría, en primer lugar, la formación del complejo AL-OVAn. Para ello, es necesario un tiempo de incubación de OVAn en una solución de AL (buffer fosfato 50 mM pH 7). Posteriormente, se agregaría el PS y se ajustaría el pH a fin de permitir la unión del PS al complejo AL-OVAn. La elección del PS, su concentración y pH final implicaría abordar primeramente el estudio de las

interacciones OVAn-PS (sin el agregado de AL). Para ello, se prepararon soluciones de OVAn, diluida a 2 g/L con buffer fosfato 50 mM pH 7, a partir de la solución 10 g/L.

Los PS empleados fueron PAM y GA. Las soluciones de PS fueron preparadas dispersando los PS en agua desionizada en concentraciones de 2, 1 y 0,6 g/L. Luego se mezclaron volúmenes iguales de estas soluciones con la de proteína. De esta forma se obtuvieron mezclas con concentración final de OVAn de 1 g/L y de PS 1, 0,5 y 0,3 g/L.

Tras la mezcla, se redujo el pH de a 0,5 unidades, desde 7 hasta 2,5, agregando solución de HCl (0,5-1 M) bajo agitación. Alcanzado el valor de pH deseado, se contaron 2 min para la estabilización del sistema y luego se tomaron alícuotas para las subsiguientes determinaciones: turbidez (sección 3.2.3.1), potencial Zeta (sección 3.2.2.5), centrifugación y composición de fases (secciones 3.2.3.2 y 3.2.3.3).

La centrifugación se llevó a cabo a 5000 g durante 15 min a 25°C. Estas condiciones se establecieron considerando la posible aplicación industrial del proceso de concentración. Para hallar la composición de las fases (pellet y sobrenadante) se determinó el contenido de proteína y de PS en el sobrenadante, hallándose la del pellet por diferencia, respecto del total agregado.

3.2.3.1. Determinación de la interacción OVAn-PS por turbidez

Se determinó la turbidez inicial (absorbancia a 400 nm) de los sistemas OVAn-PS inmediatamente después de la preparación de cada muestra.

3.2.3.2. Determinación de la proteína por el Método de Lowry

Se determinó el contenido de proteína, mediante el método de Lowry, a partir de los sobrenadantes de los sistemas OVAn-PS centrifugados. El método de Lowry consta de dos etapas: i) formación del complejo proteína-Cobre en condiciones alcalinas y con

leve calentamiento (a los fines de acelerar la formación del complejo); ii) reducción del fosfomolibdato del reactivo Folin-Ciocalteu por parte del complejo proteína-cobre produciendo un color azul detectable colorimétricamente (García Arellano y Vasquez Duhalt, 1998; García y Sánchez-Rojas, 1985).

Los reactivos empleados en esta técnica son: i) solución A: solución de 1 g de tartrato de sodio-potasio más 50 g de carbonato de sodio disueltos en 250 ml de NaOH 1 N, y luego diluida a 500 mL; ii) solución B: solución de 2 g de tartrato de sodio-potasio más 1 g de sulfato de cobre pentahidratado disuelto en 90 ml de agua más 10 ml de NaOH 1 N y; iii) solución C: 1 volumen de reactivo de Foulin-Ciocalteu diluido en 15 volúmenes de agua (Hartree, 1972).

El procedimiento consta de los siguientes pasos: i) dilución de la muestra; ii) agregado de 0,9 ml de solución A a 1 ml de la muestra diluida y posterior calentamiento a 50°C por 10 min; iii) agregado de 0,1 ml de solución B; iv) agregado de 3 ml de solución C con posterior calentamiento a 50°C por 10 min; v) lectura de absorbancia a 750 nm tras enfriado (Hartree, 1972). La curva de calibrado se realizó con OVA_n en un rango de concentración de 0-0,015 g/L.

Se obtuvo el rendimiento de separación de OVA_n (RS_{OVA_n}) a partir de la siguiente fórmula:

$$RS_{OVA_n}(\%) = \frac{OVA_n \text{ en pellet (g)}}{OVA_{n \text{ total (g)}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

También se halló el factor de concentración tras el proceso de centrifugación, definido como:

$$\text{Factor de Concentración} (\%) = \frac{\text{Conc. OVA en pellet} \left(\frac{g}{100 g} \right)}{\text{Conc. OVA en el sistema inicial} \left(\frac{g}{100 g} \right)} \quad \text{Ecuación 10}$$

3.2.3.3. Determinación del polisacárido por el Método del fenol-sulfúrico

La determinación de la concentración de PS en el sobrenadante se realizó mediante el método del fenol-sulfúrico desarrollado por Dubois y col. (1956). El método se fundamenta en la hidrólisis del polisacárido con ácido sulfúrico y la reacción de los productos resultantes con fenol, dando como resultado un producto coloreado (López Zerpa, 2008).

El procedimiento de esta técnica involucra los siguientes pasos: i) agregado de 25 μL de fenol 80 % p/p a 1 ml de muestra diluida; ii) agregado de 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado; iii) dejar enfriar y leer la absorbancia a la longitud de onda correspondiente (480 nm para el caso de GA y PAM) (Dubois y col., 1956).

Las curvas de calibrado tanto para PAM como para GA se realizaron en un rango de concentración de 0-0,12 g/L.

Se determinó el contenido de PS en el sobrenadante y por diferencia con el PS total empleado se halló el PS en pellet. Los resultados se expresaron como PS en pellet (PS_p) (Ec. 11) y fracción de PS en pellet (RS_{PS}) (Ec. 12), a fin de determinar el contenido de PS por unidad de masa de OVA y la fracción de PS total que precipitó, respectivamente:

$$PS_p (\%) = \frac{PS \text{ en pellet } (g)}{OVA \text{ en pellet } (g)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

$$RS_{PS}(\%) = \frac{PS \text{ en pellet (g)}}{PS \text{ total (g)}} \cdot 100$$

Ecuación 12

3.2.4. Obtención y caracterización de sistemas AL-OVAn-PS en polvo

Se obtuvieron sistemas AL-OVAn-GA y AL-OVAn-PAM. Por otro lado, se preparó un sistema AL-OVAn sin PS. Para la preparación de los sistemas se partió de soluciones a pH 7 (buffer fosfato 20 mM) con las composiciones mostradas en la Tabla 1. Estas composiciones fueron establecidas de acuerdo a criterios que se detallan en la sección 4.3.4.

Tabla 1. Composición de las soluciones empleadas para obtener los sistemas en polvo.

Sistema	Concentración (g/L)		
	OVAn	AL	PS
AL-OVAn	1	0,28	-
AL-OVAn-GA	1	0,28	1
AL-OVAn-PAM	1	0,28	0,5

El pH de los sistemas se ajustó a 3,0 para los sistemas con PS y a 5,0 para el sistema sin PS. Luego se centrifugó a 5000 g, 15 min. Posteriormente, se separó el sobrenadante y el pellet fue congelado a -80°C para su posterior secado por liofilización por 48 hs mediante equipo Christ® Alpha 1-4 LD plus (Reino Unido) con temperatura de condensador de -55°C y presión 0,001 mbar. Las muestras fueron suavemente trituradas en mortero y almacenadas en atmósfera de nitrógeno a -18°C hasta su análisis.

3.2.4.1. Determinación de la capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y rendimiento de encapsulación por HPLC

La cromatografía líquida de alta presión (o performance) (HPLC) es una técnica adecuada para la separación de compuestos químicos y biológicos que no son volátiles. La técnica HPLC involucra la inyección de un pequeño volumen de una muestra líquida en un tubo relleno de partículas porosas de 1,8 a 5 μm de diámetro (fase estacionaria). Los componentes individuales de la muestra son transportados a lo largo del tubo relleno (columna) por un líquido (fase móvil) forzado a alta presión entregada por una bomba. Los componentes de la muestra son separados entre sí debido a las interacciones químicas y/o físicas que se producen entre el analito y las partículas de relleno. Luego, los componentes separados salen de la columna y son registrados a través de un detector que permite su cuantificación mediante una técnica de medición. En la Fig. 21 se muestra el principio de la cromatografía líquida (Agilent Technologies, Inc.).

Los principales componentes de un equipo HPLC incluyen: 1) bomba; 2) inyector; 3) columna; 4) detector; 5) ordenador (Fig. 22).

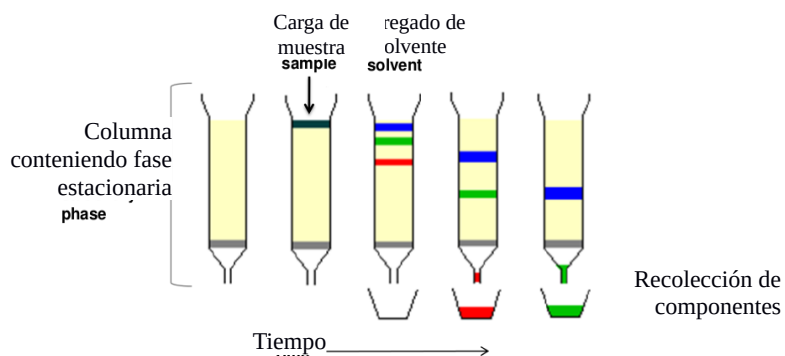


Figura 21. Principio de la cromatografía líquida (Agilent Technologies, Inc.).

La bomba fuerza la fase móvil a través del cromatógrafo a una velocidad específica de flujo (ml/min), pudiéndose alcanzar presiones de 6000-9000 psi (400 a 600 bar). Durante el experimento, la bomba puede suministrar una fase móvil de composición constante (isocrática) o una fase móvil de composición variable (gradiente) (Agilent Technologies, Inc.).

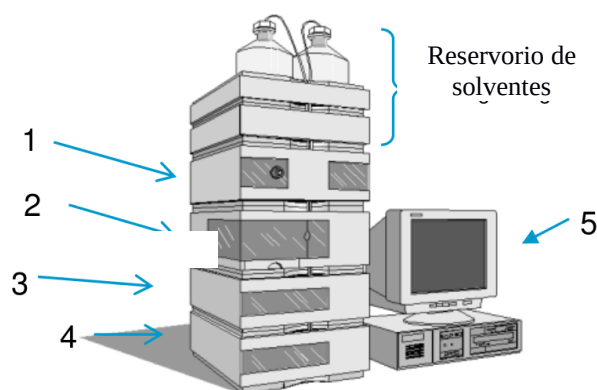


Figura 22. Principales componentes de un equipo HPLC (Agilent Technologies, Inc.).

El inyector permite introducir un pequeño volumen (5-20 μL) de muestra líquida en la corriente de flujo de la fase móvil. La columna posee la fase estacionaria que separa los componentes de la muestra de interés usando varios parámetros físicoquímicos. Las partículas pequeñas dentro de la columna son las que causan la elevada contrapresión a velocidades de flujo normal. La bomba debe empujar con fuerza para mover la fase móvil a través de la columna y esta resistencia provoca una alta presión dentro del cromatógrafo (Agilent Technologies, Inc.).

Las pequeñas partículas porosas de las columnas para HPLC pueden tener químicamente unida a su superficie una fase (C18, por ejemplo) que interactúa con los componentes de la muestra separándolos entre sí (Fig. 23). El proceso de retención de los analitos es determinado por la elección del relleno de la columna y la selección de la fase móvil para empujar el analito a través del relleno de la columna.

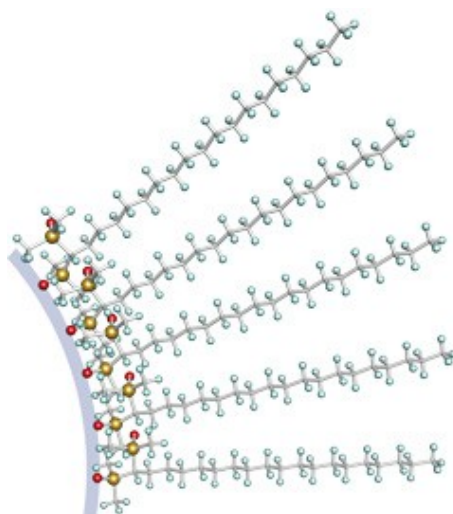


Figura 23. Superficie de partículas de sílice con C18. ()

El detector puede registrar y cuantificar las moléculas individuales que salen (eluyen) de la columna, proveyendo una salida a un registrador o a un ordenador, el cual produce un gráfico (cromatograma) de la respuesta del detector (intensidad de señal en función del tiempo). A partir del cromatograma se puede determinar el tiempo de elución o retención de los componentes de la muestra (análisis cualitativo) y la cuantificación de los mismos (análisis cuantitativo). Además, el ordenador permite controlar los módulos del instrumento HPLC (Agilent Technologies, Inc.).

El análisis cuantitativo a partir del cromatograma involucra la inyección de una muestra con una cantidad conocida del compuesto de interés y la medición de la altura o el área del pico correspondiente en el cromatograma. En muchos casos hay una relación lineal entre la altura o el área y la cantidad de analito (Agilent Technologies, Inc.).

Existen 4 modos de separación de analitos (fase reversa; fase normal y adsorción; intercambio iónico; exclusión). La cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) es el modo comúnmente más usado y consiste en un relleno de columna no polar y la fase móvil es agua más un solvente orgánico miscible en agua (metanol, acetonitrilo).

Usualmente se realiza un gradiente de fase móvil, donde se comienza con una determinada composición de agua la cual va disminuyendo por la adición del solvente orgánico en función del tiempo. El solvente orgánico aumenta la fuerza de la fase móvil y eluye compuestos que están fuertemente retenidos por el relleno de la columna (Agilent Technologies, Inc.).

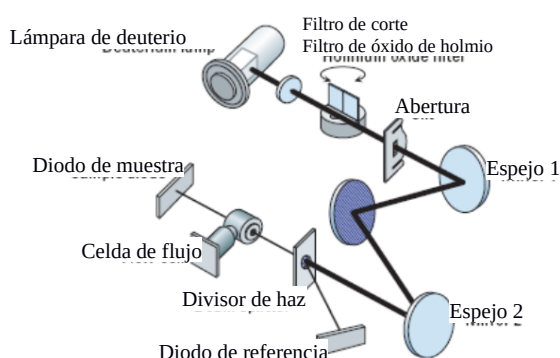


Figura 24. Detector espectroscópico de absorción UV de longitud de onda variable (Agilent Technologies, Inc.).

Las técnicas de detección más comunes son espectroscopía, índice de refracción y fluorescencia. En la espectroscopia de absorción UV, un haz de luz ultravioleta es direccionado a través de una celda de flujo y un sensor mide el paso de luz a través de la celda (Fig. 24). Si un compuesto que eluye de la columna absorbe la luz cambiará la cantidad de luz que llega al sensor. Este cambio es amplificado y direccionado a un registrador o un sistema de adquisición de datos (Agilent Technologies, Inc.).

En el presente trabajo se utilizó un equipo Perkin Elmer el cual consta de una bomba (Series 2000), un detector UV/vis (785A) y una interfase (NCI 900). La longitud de onda del detector fue 195 nm. Se utilizó una columna Simmetry300™, Waters Corp. (USA), con relleno C18 (RP18, ODS, Octadecyl); longitud: 250 mm; diámetro interno: 4,6 mm; tamaño de partícula: 5 μm ; tamaño de poro: 30 nm.

Para la determinación de AL se utilizó una fase móvil de composición variable con un gradiente lineal de 30% agua + 70% acetonitrilo (ACN) a 100% ACN en 15 min. Luego se mantuvo 100% ACN por 5 min. Para ello se usó una mezcla 30% agua + 70% ACN como fase A y ACN 100 % como fase B. Ambas fases fueron acidificadas con ácido acético 0,12% v/v (Li y col., 2001).

Se realizó una curva de calibrado de AL. Para ello se disolvió el AL en hexano. Luego se tomó una alícuota de 0,2 ml y se la dispuso en frascos tipo Epcocler color ámbar de 5 ml. Se produjo la evaporación con corriente de nitrógeno. Las muestras fueron conservadas en atmósfera de nitrógeno a -18°C hasta el momento de su análisis. Antes de inyectar al cromatógrafo se disolvió agregando 1 ml de metanol. De este modo, el rango de concentración final de la solución metanólica fue 20-140 mg/L.

A fin de determinar la capacidad de carga, la eficiencia de encapsulación y el rendimiento se realizaron determinaciones por HPLC de AL libre y AL total presentes en los sistemas AL-OVAn y AL-OVAn-PS en polvo.

Determinación de AL libre. Se denominó AL libre al AL extraíble del polvo por medio de solvente orgánico. Para ello, se mezcló 0,01 g de polvo con 1 ml de hexano en vortex por 1 min. Luego se centrifugó a 10000 g, 30 min. Posteriormente, se tomó 0,5 ml de la fase superior (hexano) y se colocó en un recipiente donde se evaporó con corriente de nitrógeno. Las muestras fueron conservadas a -18°C en atmósfera de nitrógeno hasta su análisis.

Determinación de AL total. Se procedió a realizar una digestión de la muestra de acuerdo a Gallardo y col. (2013). Para ello, se agregó 1 ml de HCl 8 N y se colocó en baño precalentado a 70°C. Posteriormente, se subió la temperatura a 100°C y se mantuvo por 30 min. Tras el enfriamiento se agregaron 2,5 ml de hexano, se agitó en vortex por 1 min y se centrifugó a 20 g, 15 min para facilitar la separación de fases.

Luego se tomaron 0,5 ml de la fase superior (hexano) y dicho volumen se dispuso en frasco tipo Epocler color ámbar de 5 ml donde se realizó la evaporación del solvente orgánico por corriente de nitrógeno. Las muestras se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno a -18°C hasta el momento del análisis. Para la cuantificación por RP-HPLC, se agregó un volumen de metanol y luego se inyectó en el equipo correspondiente.

Para la cuantificación por HPLC, se agregó metanol y se inyectó 20 μL en el equipo en las condiciones que se mencionaron anteriormente. Los valores de AL libre y total se expresaron en porcentaje respecto al polvo.

La cantidad de AL encapsulado en el polvo se determinó con la siguiente ecuación:

$$AL_E = AL_T - AL_L \quad \text{Ecuación 13}$$

donde AL_E es el contenido de AL encapsulado en el polvo (%); AL_T es el contenido de AL total en el polvo (%) y AL_L es el contenido de AL libre en el polvo (%).

Al contenido de AL total en el polvo se lo definió como capacidad de carga (CC). Es decir, $CC = AL_T$.

La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó con la siguiente ecuación:

$$EE = AL_E / AL_T \cdot 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

El rendimiento de encapsulación (RE) se calculó con la siguiente ecuación:

$$RE = AL_E \cdot m / AL_0 \quad \text{Ecuación 15}$$

donde m es la masa total de polvo y AL_0 es la cantidad inicial de AL que se usó en el proceso de obtención del polvo (sección 3.2.4). RE indicaría el porcentaje de AL que se encuentra encapsulado en el polvo respecto a la cantidad usada para obtener el mismo.

3.2.4.2. Reconstitución de los polvos

Los polvos se reconstituyeron en agua desionizada a una concentración de 2 g/L. Luego de 24 hs de hidratación, se determinó el pH de las dispersiones. Posteriormente, el valor de pH se ajustó a 7 mediante el agregado de NaOH 0,5 M y se almacenó por 24 hs a fin de permitir una mayor dispersión del material.

La dispersión de AL-OVAn-PAM pH 7 fue centrifugada a 2000 g por 15 min y luego se determinó el tamaño de partícula en el sobrenadante por DLS (de acuerdo a lo expuesto en la sección 3.2.2.1). Los tamaños informados corresponden a los picos de las PSDi

3.2.4.3. Ensayos de estabilidad oxidativa del AL

Se evaluó la estabilidad del AL presente en los polvos, frente a la exposición de los mismos al aire y a una temperatura de 40°C para acelerar la oxidación (Zimet y Livney, 2009). Para ello, se pesaron 0,2 g de polvo en tubos de vidrios los cuales se taparon y se colocaron en estufa, al abrigo de la luz a 40°C. Las muestras fueron retiradas a los días 1, 2, 5 y 13 y se les determinó el contenido de AL total de acuerdo a lo expuesto en la sección 3.2.4.1. Luego se calculó el porcentaje de AL no oxidado (AL_{NO}) con la siguiente ecuación:

$$AL_{NO}(\%) = \frac{AL_T^t}{AL_T^0} \cdot 100$$

Ecuación 16

donde AL_T^t es el contenido de AL en el polvo a un tiempo t, mientras que AL_T^0 es el contenido inicial de AL en el polvo.

3.3. Tratamiento estadístico de datos

Para el tratamiento estadístico de datos y la confección de las gráficas se utilizó el software R con interfaz Rstudio.

Las diferencias significativas fueron determinadas mediante ANOVA con un nivel de significancia de 0,05. Para determinar diferencias significativas entre grupos, tras el ANOVA, se aplicó el método de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

4. RESULTADOS

Capítulo 1

Obtención y caracterización de nanopartículas de ovoalbúmina

4.1. Obtención y caracterización de nanopartículas de ovoalbúmina

En este capítulo se presentan resultados concernientes a la obtención y caracterización de nanopartículas de OVA mediante tratamiento térmico bajo las condiciones detalladas en la sección 3.2.1 (10 g/L; pH 7,5; NaCl 50 mM; 0-25 min; 75-85°C). Como se mencionó en dicha sección, estas condiciones fueron seleccionadas de acuerdo a información bibliográfica (Croguennec y col., 2007) estudios previos (Sponton y col., 2015)

4.1.1. Análisis del tamaño de partículas de OVA tratada térmicamente

En la Fig. 25 se muestra la intensidad de luz dispersada en función del tamaño de partícula (PSDi) de soluciones de OVA tratadas térmicamente (75, 80 y 85°C, 10 g/L, pH 7,5, NaCl 50 mM). Las muestras presentaron PSDi monomodales por lo que el pico de intensidad se informa como diámetro hidrodinámico (Carvalho y col., 2013). Como ha sido mencionado en la sección 3.2.2.1 el diámetro hidrodinámico se define como el diámetro de una esfera equivalente que difunde a la misma velocidad media que la partícula bajo examinación (Niidome, 2015). Puede observarse que OVA-75 presentó distribuciones más anchas que OVA-80 y OVA-85. Además, los valores de PDI (índice de polidispersidad) para OVA-75 (0,25-0,28) fueron más grandes que para OVA-80 (0,19-0,20) y OVA-85 (0,20-0,22). En todos los casos, los valores de PDI indican que las muestras poseen polidispersidad moderada (Malvern Instruments Ltd-d). Cabe mencionar que no se registró ninguna tendencia en los valores de PDI con el tiempo de calentamiento (Tabla A1, apéndice).

Además, las PSDi para los diferentes tiempos de calentamiento estuvieron más cercanas entre sí para OVA-80 y OVA-85 comparadas con OVA-75. Esta diferencia se aprecia mejor en la Fig. 26, donde se presentan los diámetros hidrodinámicos (pico) en

función del tiempo de calentamiento para OVA-75, OVA-80 y OVA-85. Como puede observarse, el tamaño de los agregados fue de alrededor de 100 nm, por lo que los agregados de OVA podrían ser definidos como “nanopartículas” (OVAn) (Gutiérrez y col., 2013).

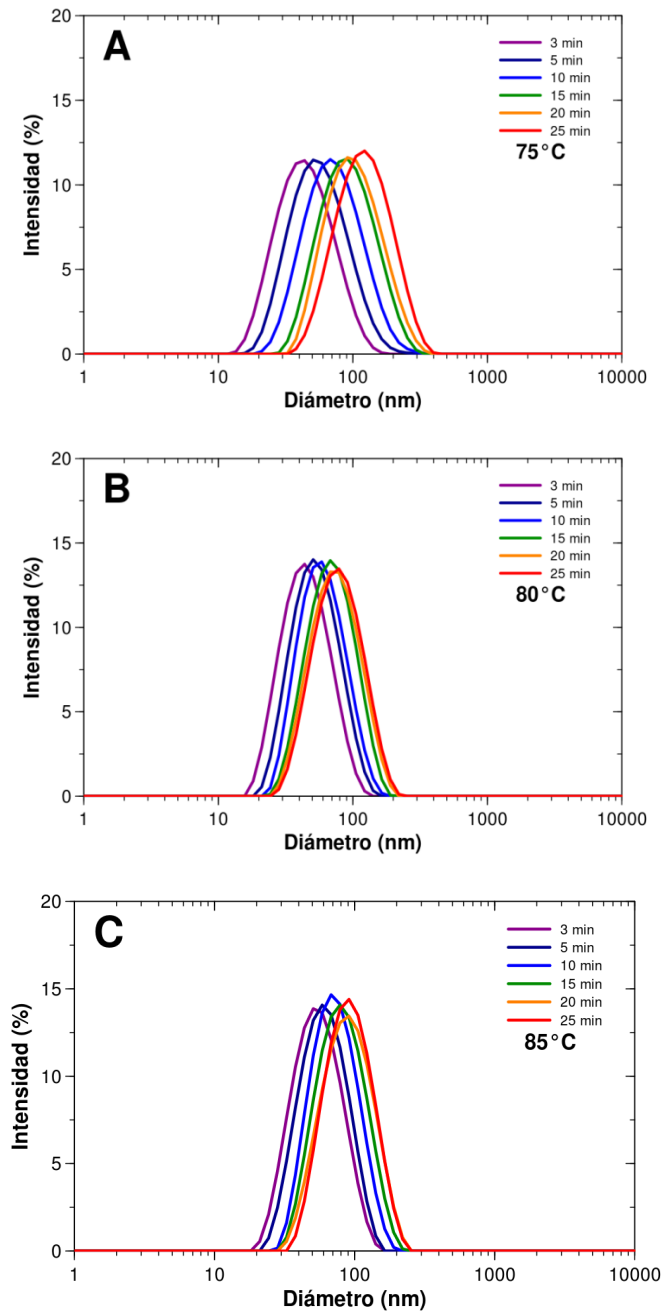


Figura 25. Distribución de tamaño de partícula de OVA tratada térmicamente a pH 7,5: A: 75°C, B: 80°C y C: 85°C por 0, 3, 5, 10, 15, 20 y 25 min. Concentración de OVA: 1 g/L. Fuerza iónica: 50 mM NaCl.

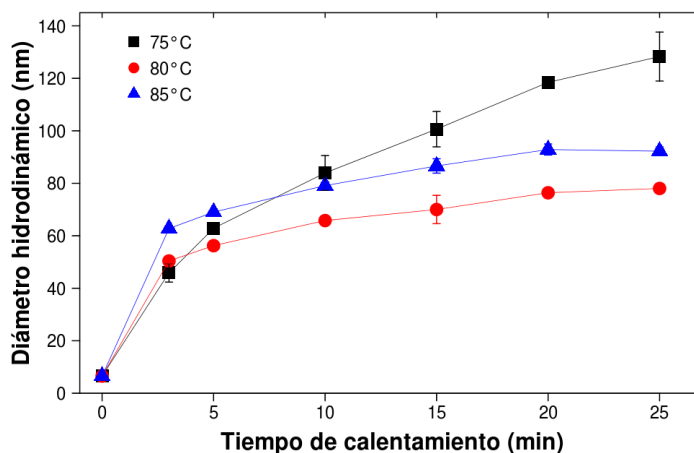


Figura 26. Diámetros hidrodinámicos de soluciones de OVA tratadas a diferentes tiempos y temperaturas de calentamiento. Las barras de error son la desviación estándar del análisis realizado por duplicado.

En la Fig. 26 se observa que para los tratamientos térmicos a las tres temperaturas, el diámetro hidrodinámico de OVA aumentó con el tiempo de calentamiento hasta alcanzar prácticamente un *plateau*. Los tamaños de las OVA obtenidas bajo diferentes condiciones son comparables a los obtenidos por Croguennec y col. (2007), quienes trabajaron en condiciones similares (80°C, pH 7, 50 mM NaCl, 10 g/L OVA). Como se observa en la Fig. 26, el tamaño de las OVA aumentó con la temperatura de para un tiempo de calentamiento de 3 min. Estos agregados estarían formados principalmente por interacciones hidrofóbicas, las cuales gobiernan los estadios iniciales de agregación (Sánchez-Gimeno y col., 2006). Durante el tratamiento térmico se produce, en primer lugar, un desplegamiento/desnaturalización parcial de la OVA, por lo que las regiones hidrofóbicas ocultas en el interior de la estructura globular se exponen al medio acuoso (Nyemb y col., 2014; Weijers y col., 2002). Luego, los agregados inicialmente formados (estabilizados por interacciones hidrofóbicas) serían rigidizados a través de la formación de puentes disulfuro. Estos enlaces covalentes tomarían lugar a un mayor tiempo de calentamiento (Sánchez-

Gimeno, y col., 2006). Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje del total de los sulfhidrilos libres (SH) tomarían parte en la formación de puentes disulfuro (SS). Croguennec y col. (2007) encontraron que sólo un 10 % de los SH totales reaccionan para formar SS, permaneciendo el resto como SH libres tras 40 min de calentamiento a 80°C.

Por otro lado, también puede notarse en la Fig. 26 que el valor del diámetro de las OVAn, después de 10 min de calentamiento, presentó el siguiente orden: OVA-75 > OVA-85 > OVA-80. El mayor tamaño en OVA-75 podría explicarse teniendo en cuenta que las atracciones hidrofóbicas aumentan con la temperatura hasta los 60-70°C, y por encima de dicho valor comienzan a decrecer (Bryant, y McClements, 1998). Por lo tanto, las atracciones hidrofóbicas estarían más favorecidas a 75°C que a 80 y 85°C. Consecuentemente, una mayor agregación vía interacciones hidrofóbicas tomaría lugar a 75°C resultando en un mayor tamaño para las OVAn obtenidas a 75°C que aquellas obtenidas a mayor temperatura.

Es importante mencionar que el Z-Average (promedio ponderado en intensidad) fue ~20% menor que los correspondientes valores informados de los picos. Esto se explica teniendo en cuenta que el ajuste cumulante se hace solo con la parte inicial de la función de autocorrelación, por lo que se sobreestima el decaimiento inicial a partir de la parte más pequeña de la distribución (Nobbmann, 2014).

4.1.2. Estudio de aspectos morfológicos de OVAn por AFM

Las OVAn fueron analizadas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), a fin de evaluar sus aspectos morfológicos. En la Fig. 27 se muestran micrografías (imágenes topográficas y de fase) de OVAn obtenidas a 85°C, 5 min. En general pueden verse partículas con forma redondeada que presentan diámetro menor a 100 nm. A partir

de la escala lateral de la imagen topográfica (Fig. 27A), puede notarse que las partículas presentaron una muy alta relación diámetro/altura. Según Arzeni y col. (2015), esto podría ser explicado teniendo en cuenta que durante la etapa de secado que conlleva la preparación de la muestra para su observación, las partículas se aplastarían sobre la superficie del soporte de mica.

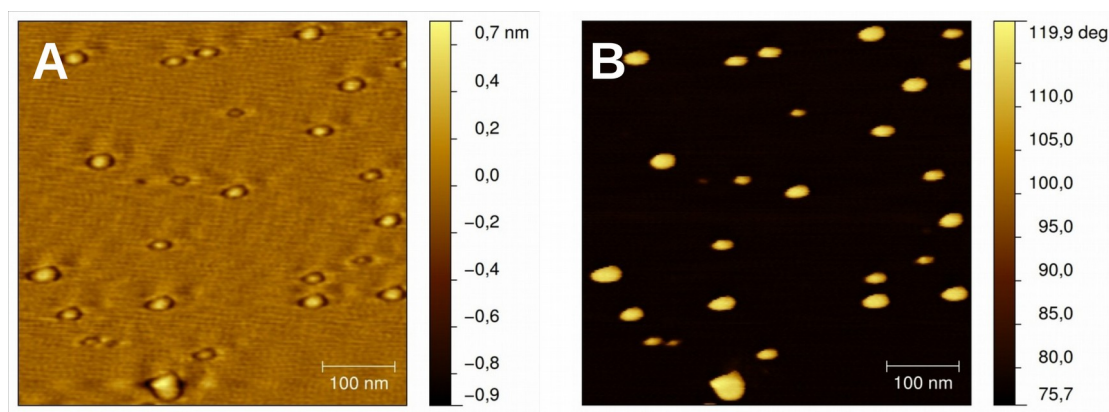


Figura 27. Imágenes (**A:** topográfica; **B:** fase) adquiridas por AFM de OVA obtenidas a 85°C, 5 min.

Puede observarse también en la Fig. 27, que existen partículas con diámetros menores a 10 nm. Esta población de partículas correspondería a moléculas de OVA que no han sido agregadas. De acuerdo a Weijers y col. (2003), parte de la OVA no agregada durante el tratamiento térmico correspondería a una fracción de intermediario estable, es decir, monómeros que se desnaturalizaron pero que no se agregan.

Como puede notarse en la Fig. 25, la población de monómeros de OVA no fue detectada por DLS. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que, en DLS, las partículas pequeñas pueden no ser detectadas debido a que las partículas más grandes dispersan la luz con mayor intensidad que las pequeñas (Arzeni y col., 2015). Respecto a esto, Arzeni y col. (2015), determinaron el tamaño por DLS de muestras de nanopartículas proteicas filtradas por diferentes tamaños de poro. Encontraron que las

poblaciones de partículas más pequeñas que no fueron detectadas en las muestras no filtradas fueron efectivamente detectadas en las muestras que fueron filtradas y que, por lo tanto, no presentaron las partículas de mayor tamaño. Además, se debe tener en cuenta que AFM provee un diámetro físico de las partículas sobre una superficie sólida, mientras que DLS proporciona un diámetro hidrodinámico, el cual incluye la capa de hidratación que rodea a la partícula (Arzeni y col., 2015). Sin embargo, la información obtenida por ambas técnicas sería complementaria y proporcionaría una caracterización más profunda para este tipo de nanopartículas.

Respecto a la morfología de agregados de OVA inducidos por calentamiento, Nyemb y col. (2014) obtuvieron agregados con diferentes morfologías (lineal, lineal-ramificada, esférica de tamaño micrométrico y esféricas agregadas) mediante tratamiento térmico de soluciones de OVA a 80°C, durante 6 hs a diferentes pH (5-9) y fuerzas iónicas (0,03-0,8 M NaCl). Es importante destacar que estas diferentes morfologías fueron obtenidas tras el tratamiento térmico de OVA en una escala de tiempo muy superior a la que se trabajó en la presente tesis. Las partículas obtenidas aquí corresponderían a los estadios iniciales de agregación. En otras palabras, el tiempo de calentamiento dado no sería suficiente para llegar a un estado de agregación como los reportados en la bibliografía.

4.1.3. Efecto del tratamiento térmico sobre la hidrofobicidad superficial de soluciones de OVA

Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia extrínseca (como una medida de la hidrofobicidad superficial) de soluciones de OVA tratada térmicamente a 75, 80, y 85°C durante 5 y 25 minutos y también se incluyó una solución de OVA nativa como control. Estas muestras fueron seleccionadas bajo la hipótesis de que la máxima

hidrofobicidad superficial podría alcanzarse ya a los 5 min de tratamiento, mientras que un calentamiento posterior sólo produciría agregación, sin desplegamiento adicional (exposición de residuos hidrofóbicos ocluidos), de acuerdo a estudios realizados por Croguennec y col. (2007). En este sentido, se incluyeron las soluciones de OVA calentadas por 25 a fin de verificar la hipótesis mencionada.

Como se mencionó en la sección 1.5.1.3 Los tratamientos térmicos de soluciones de proteínas inducen la desnaturalización de las mismas con el consecuente desplegamiento de la estructura molecular y la exposición de las regiones hidrofóbicas ocluidas. Este fenómeno confiere una mayor hidrofobicidad superficial a la proteína. La hidrofobicidad superficial puede ser determinada por medio de mediciones de fluorescencia extrínseca usando como sonda el ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) (Croguennec y col., 2007; Matsudomi y col., 2001). La interacción del ANS con las zonas hidrofóbicas de la proteína normalmente se caracteriza por un considerable aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS, en comparación a la débil fluorescencia de una solución de sonda pura. Además, se producen corrimientos a nivel del máximo de intensidad de emisión hacia valores de longitud de onda menores (corrimiento al azul) (Albani, 2004). Es sabido que la extensión de la desnaturalización y, en consecuencia, la intensidad de fluorescencia extrínseca aumenta bruscamente cuando la solución de OVA se calienta por encima de 70°C (Galazka y col., 1999).

En cuanto a la intensidad de fluorescencia extrínseca, la Fig. 28A muestra que las OVA_n registraron un aumento de 6 a 8 veces en los valores de IFR-ANS respecto de la OVA nativa. Los valores de IFR-ANS para OVA-75 aumentaron de forma significativa ($p < 0,05$) con el tiempo de calentamiento, mientras que los valores IFR-ANS para OVA-80 y OVA-85 alcanzaron un valor máximo en 5 min. Los valores más

altos de hidrofobicidad superficial se registraron para OVA-80 y OVA-85 en 5 min y para OVA-80 a 25 min.

Por otro lado, en los espectros de OVA_n, fueron registrados corrimientos al azul de la longitud de onda máxima emisión. Estos resultados se muestran en la Fig. 28B, donde $\Delta\lambda_{ANS}$ (corrimiento al azul) es la diferencia entre λ_{ANS} de OVA nativa y OVA_n. Se observó un comportamiento similar al de IFR-ANS. El $\Delta\lambda_{ANS}$ de OVA-75, aumentó con el tiempo de calentamiento, mientras que el $\Delta\lambda_{ANS}$ de OVA-80 y OVA-85 alcanzaron un máximo a los 5 min. El valor máximo de desplazamiento se presentó para OVA-80.

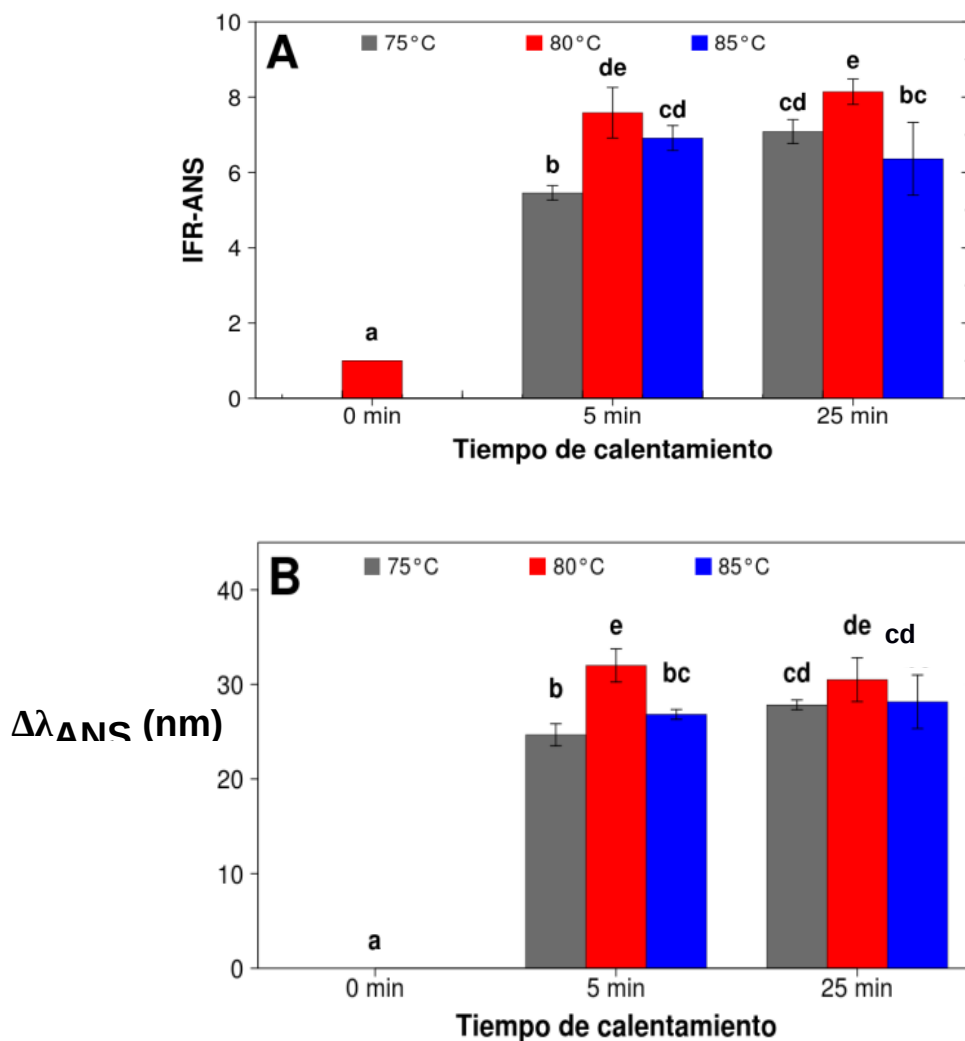


Figura 28. Fluorescencia extrínseca de la OVA nativa y tratada térmicamente (75, 80 and 85°C). **A:** Intensidad de fluorescencia relativa (IFR-ANS). **B:** Desplazamiento de la longitud de

onda del pico emisión ($\Delta\lambda_{\text{ANS}}$). Las letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados de IFR-ANS y de $\Delta\lambda$ indicarían que durante el tratamiento térmico, la OVA expuso sus regiones hidrofóbicas ocultas. De este modo, estas regiones se hicieron más accesibles al ANS. El corrimiento al azul indica que las moléculas de ANS unidas estarían en un entorno más hidrofóbico (Albani, 2004). El comportamiento de OVA-80 y OVA-85, sugiere que la mayoría de las moléculas OVA fueron desnaturalizadas/desplegadas a los 5 min de calentamiento y un calentamiento adicional no induciría una posterior desnaturalización. En general, estos resultados están de acuerdo con Coguenec y col. (2007). Por otro lado, OVA-75 no presentó este comportamiento, lo que indicaría que la desnaturalización de la proteína no se pudo completar a los 5 min de calentamiento, tal como se observó para OVA-80 y OVA-85.

4.1.4. Caracterización coloidal de las OVA_n en solución

Las características coloidales de complejos proteína-ligando están fuertemente influenciadas por las características de la proteína en solución (Perez y col., 2015). Por ello, a continuación se discuten algunos aspectos concernientes a la estabilidad coloidal derivados de las mediciones de turbidez y potencial Zeta en función del pH, para soluciones de OVA nativa y OVA_n (ambas sin AL).

En la Fig. 29 se muestran medidas de potencial Zeta para OVA nativa y para OVA_n (85°C, 5 min) y de turbidez de sus respectivas soluciones, para distintos valores de pH. Para ambas muestras pueden observarse leves diferencias entre los perfiles de potencial Zeta *versus* pH, siendo, en general, bastante similar el comportamiento entre las mismas (Fig. 29A). Calculando el pI a partir de la regresión lineal de los puntos en el

rango de cambio de signo del potencial Zeta se obtuvieron los valores 4,82 y 4,98, para la OVA y la OVAn, respectivamente. El pI obtenido para la OVA nativa fue próximo al hallado por Xiong y col., 2016 quienes obtuvieron un valor de 4,85. La diferencia entre los pI de la OVA nativa y OVAn podría atribuirse a la exposición de grupos cargados que acompañaría los cambios conformacionales ocurridos durante el proceso de desnaturalización/agregación de la proteína.

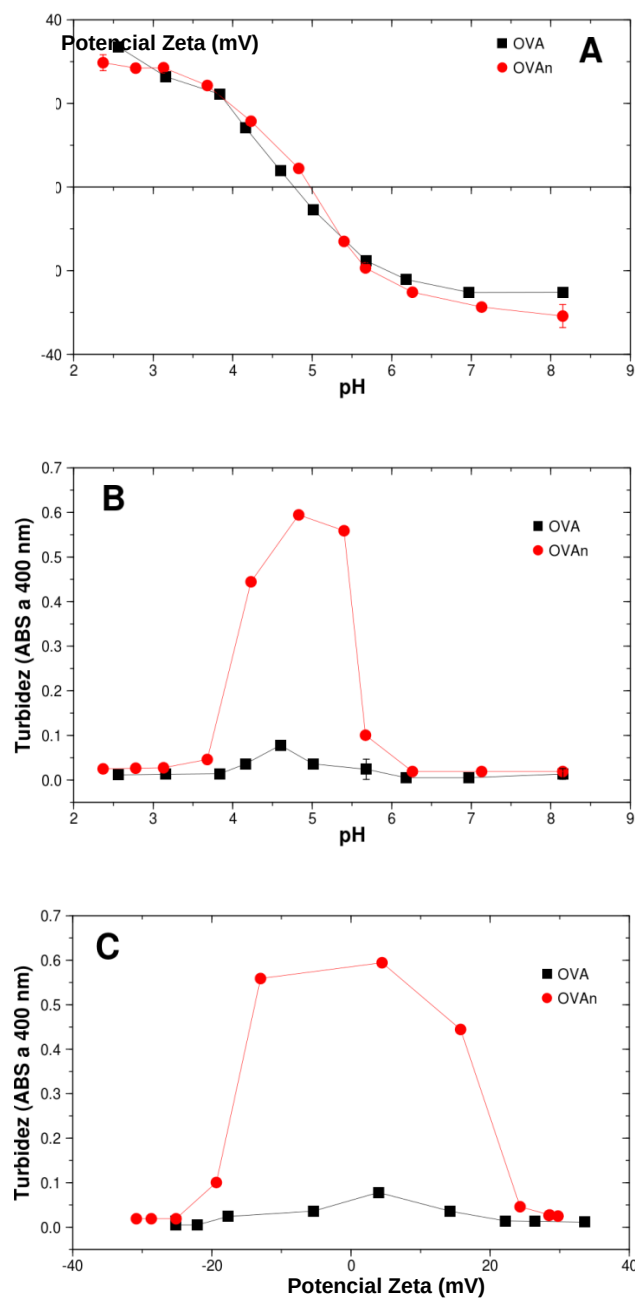


Figura 29. Potencial Zeta (A) y Turbidez (B) en función del pH de OVA y OVAn (85°C, 5 min). Turbidez en función del potencial Zeta (C). Concentración proteica: 1 g/L.

Por otro lado, en la Fig. 29B se observa la turbidez de la solución en función del pH. Se observa un máximo cercano al pI para ambas muestras. Además, puede notarse que la turbidez de la solución de OVAn fue considerablemente mayor, en el rango de pH 4,0-6,0, produciéndose una separación de fases visible. Esta diferencia puede explicarse considerando el mayor tamaño de las partículas que se asocian en solución en torno al pI. Estos valores de turbidez también pueden ser explicados considerando el potencial Zeta. En la Fig. 29C, se observa que la turbidez aumenta considerablemente en el rango de potencial Zeta entre -20 y +20 mV. Valores de potencial Zeta dentro de este rango serían muy bajos como para que la repulsión electrostática contribuya a la estabilidad coloidal (cargas positivas a $\text{pH} < 4$ y negativas a $\text{pH} > 6$). Como resultado de la disminución de la repulsión se produce la atracción y asociación de las partículas confiriendo una turbidez apreciable al sistema.

Capítulo 2

Obtención y caracterización de los complejos

AL-OVAn

4.2. Obtención y caracterización de los complejos AL-OVAn

En este capítulo se presentan resultados concernientes a la obtención y caracterización de los complejos AL-OVAn. En primer lugar, se evaluó la capacidad de ligar AL de las OVAn obtenidas por calentamiento a 75, 80 y 85°C, durante 0, 5 y 25 min (sección 4.2.1). Luego se seleccionó el tratamiento que permitió generar las OVAn con mayor capacidad de ligar AL y se realizó una caracterización del proceso de formación de los complejos de AL-OVAn (sección 4.2.2).

4.2.1. Efecto del tratamiento térmico sobre la capacidad de ligar AL

La fluorescencia intrínseca puede aplicarse para estudiar la interacción proteína-ligando (Shpigelman y col., 2010). La OVA posee tres residuos de aminoácidos fluorescentes en su estructura molecular: triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Sin embargo, el Trp es el residuo dominante en la emisión de fluorescencia, debido a que toma lugar la transferencia de energía de Tyr y Phe a Trp (Kamilya y col., 2007). A $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, los residuos Tyr y Trp son excitados (Shpigelman y col., 2010). Una molécula de OVA posee tres residuos de Trp y diez de Tyr (Gill y Hippel, 1989). Cuando las proteínas o sus agregados se unen a ligandos, su fluorescencia intrínseca puede disminuir. Esto se conoce como *quenching* o extinción de fluorescencia (Shpigelman y col., 2010; Wang y col., 2013). Al absorber luz, estos complejos proteína-ligando vuelven inmediatamente al estado fundamental sin emisión de fotones (Lakowicz, 2006).

Para la evaluación de la formación de complejos se determinó la capacidad de ligar AL de las OVAn a través de mediciones de fluorescencia intrínseca de las soluciones OVAn en presencia de concentraciones crecientes de AL.

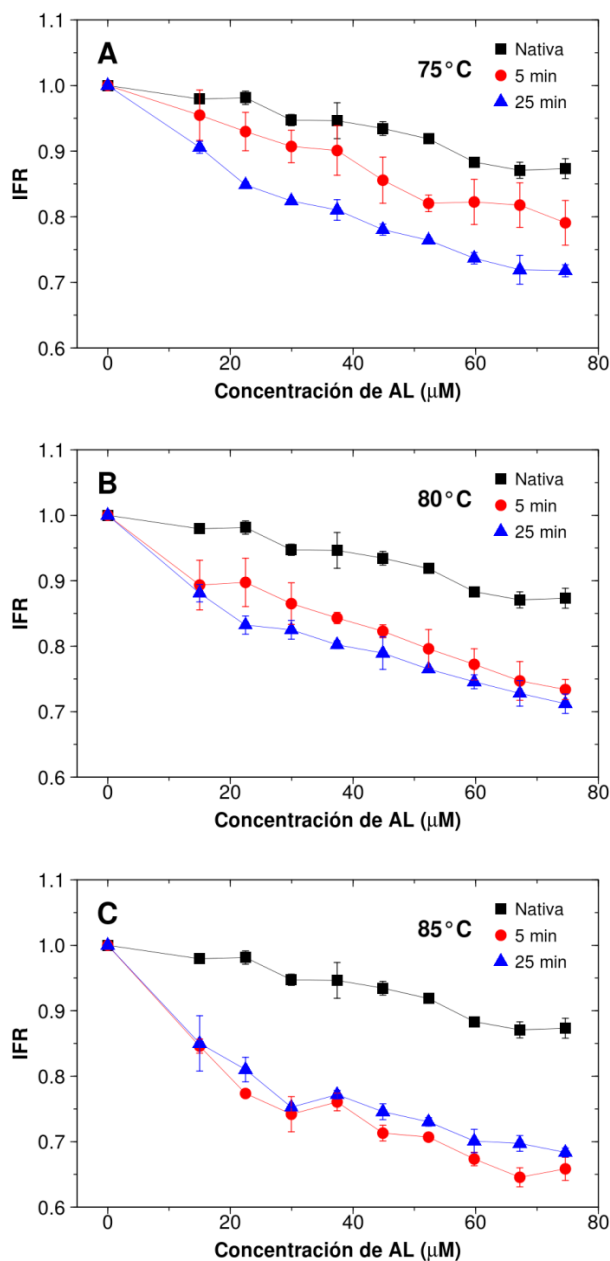


Figura 30. Intensidad de fluorescencia relativa (IFR) en función de la concentración de AL para OVA nativa y tratadas térmicamente: A: 75°C; B: 80°C; y C: 85°C por 0 min, 5 min y 25 min. Concentración proteica: 0.043 g/L (1 μM como monómero).

La Fig. 30 muestra la IFR en función de la concentración de AL para la OVA nativa y para los sistemas OVA-75, OVA-80 y OVA-85 tratados a 5 y 25 minutos. Las curvas se analizan teniendo en cuenta que la magnitud del *quenching* (disminución de IFR) sería proporcional a la cantidad de sitios con fluoróforos de la proteína ocupados

por el AL (Lakowicz, 2006; Wang y col., 2013). Como puede observarse en la Fig. 30, la IFR para la OVA nativa muestra una leve disminución con el aumento en la concentración de AL y por lo tanto, un ligero *quenching* o extinción de la fluorescencia. Por otro lado, la IFR para las OVA_n disminuyeron más pronunciadamente que para la OVA nativa.

Por otro lado, se observa que hubo una mayor disminución de IFR con el aumento de la temperatura. Esto indica que habría mayor cantidad de AL unido a las OVA_n a medida que aumenta la temperatura del tratamiento térmico que se utilizó para la obtención de las OVA_n. Además, OVA-75,25 (Fig. 30A) muestra mayor formación de complejos que OVA-75,5. Una tendencia similar se observó para OVA-80 (Fig. 30B), aunque las curvas de 5 y 25 minutos estuvieron más próximas entre sí. En OVA-85 (Fig. 30C), esta tendencia se invirtió ligeramente, lo que sugiere una mayor unión de AL para OVA-85,5 que OVA-85,25.

Por otra parte, para las muestras de OVA_n, se registró un corrimiento al azul de 2 nm en la longitud de onda correspondiente al pico del espectro de emisión (Fig. A2-A4, apéndice). Un corrimiento al azul en la longitud de onda indicaría que los Trp que emiten a mayores longitudes de onda son extinguidos más fácilmente que lo que emiten a longitudes menores. Cabe mencionar que cuando se registran menores longitudes de onda en el pico de emisión del Trp significa que el Trp se encuentra en un entorno más apolar. Es decir, que el ligando se uniría a los Trp más accesibles mientras que los más internos serían menos accesibles y responsables de la fluorescencia remanente (Lakowicz, 2006).-

Este comportamiento no se observó para la OVA nativa, la cual no mostró ningún cambio en la longitud de onda del máximo de intensidad de fluorescencia (Fig. A1, apéndice), lo que podría indicar que los residuos de Trp no estarían involucrados en

la unión de AL a la OVA nativa, posiblemente por la inaccesibilidad de los mismos al ligando. En este sentido, Kamilya y col. (2007), estudiaron la interacción ácido esteárico-OVA nativa y propusieron que el residuo Tyr sería un probable sitio de unión del ácido graso. El extremo carboxílico de ácido esteárico perturbaría la excitación de la Tyr y, al no producirse la transferencia de energía de Tyr a Trp, se daría una extinción de la de fluorescencia del Trp (Kamilya y col., 2007).

La extinción de la fluorescencia intrínseca debido a la unión de un ligando a la proteína puede ser descrita por el modelo de Stern-Volmer (Ec. 3). El valor K_a es indicativo de la concentración del complejo fluoróforo-ligando formado y de la exposición superficial del fluoróforo al ligando o inhibidor de la fluorescencia (*quencher*) (Lakowicz, 2006). Por lo tanto, el valor de K_a podría tomarse como una estimación de la capacidad de ligar AL de las OVA. Cabe mencionar que cuando F_0/F versus $[L]$ es efectivamente lineal, hay una sola clase de fluoróforo, todos igualmente accesibles al inhibidor de la fluorescencia, *quencher* o ligando (Lakowicz, 2006; Shpigelman y col., 2010). En la presente tesis, los valores de fluorescencia intrínseca fueron ajustados de acuerdo a la Ec. 3 (Fig. A5, apéndice), presentándose valores de R^2 entre 0,863 y 0,987, lo cual indica un buen ajuste.

La Tabla 2 presenta los valores de K_a [M^{-1}]. Se puede señalar que OVA nativa muestra el valor más bajo K_a , lo que sugiere que la OVA nativa tiene una capacidad de ligar AL inferior a las OVA. Por otro lado, OVA-75 muestra un aumento del valor de K_a con el tiempo de calentamiento, mientras OVA-85 exhibe una tendencia opuesta siendo mayor K_a para 5 min que para 25 min de calentamiento. Respecto a OVA-80, no se presenta diferencia significativa para el valor K_a con el tiempo de calentamiento ($p > 0,05$).

Comparando los valores de K_a de las OVAn con la hidrofobicidad superficial (sección 4.1.3) para aquellas obtenidas a 25 min de tratamiento térmico, se observa que el valor máximo de hidrofobicidad superficial (OVA-80) no se corresponde con el máximo valor de K_a . Es importante remarcar que tanto OVA-80 como OVA-85 presentaron la hidrofobicidad superficial máxima en 5 min de tratamiento térmico (Fig. 28), pero sólo OVA-85 muestra el máximo K_a (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de K_a [M^{-1}] (promedio \pm desviación estándar) para la OVA nativa y para OVAn obtenidas por calentamiento a 75, 80 y 85°C durante 5 y 25 min. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Muestra	Tiempo de calentamiento	
	5 min	25 min
OVA-75	3578 \pm 774 (b)	5275 \pm 222 (cd)
OVA-80	4842 \pm 136 (c)	4979 \pm 318 (cd)
OVA-85	6659 \pm 264 (e)	5604 \pm 143 (d)
OVA nativa	2192 \pm 120 (a)	

De este comportamiento podría deducirse que la capacidad de ligar AL de las OVAn dependería no sólo de la hidrofobicidad superficial, sino también de la estructura de la proteína, es decir, la conformación de sitios hidrófobos superficiales o en la estructura interna de los agregados con capacidad para acomodar moléculas de AL (Le Maux y col., 2013).

4.2.2. Caracterización del complejo AL-OVAn

En la sección 4.2.1 se demostró que la solución de OVA tratada a 85°C por 5 min fue la que presentó el mayor valor de K_a (Tabla 2). Esto significa que las OVAn obtenidas con dicho tratamiento son las que presentan la mayor capacidad de ligar AL. Por ello, la muestra obtenida en el tratamiento a 85°C por 5 min (NaCl 50 mM, pH 7,5)

fue seleccionada para la caracterización del complejo AL-OVAn a través de mediciones de AFM, fluorescencia, turbidez, distribución de tamaño de partícula (DLS) y potencial Zeta.

4.2.2.1. Efecto de la temperatura sobre la fluorescencia intrínseca de complejos AL-OVAn

Como se mencionó en la sección 4.2.1, en un experimento de fluorescencia intrínseca, la disminución de la fluorescencia es un fenómeno conocido como *quenching*, extinción o apagamiento. Dicho fenómeno puede ocurrir por dos mecanismos diferentes: dinámico (colisional) o estático (Lakowicz, 2006). El *quenching* dinámico es caracterizado por un proceso en el cual el *quencher* desactiva el estado excitado del Trp por medio de encuentros difusivos, retornando al estado fundamental. Un aumento en la temperatura produce una difusión molecular más rápida aumentando las colisiones y, consecuentemente, la eficiencia del *quenching*. Por otro lado, el *quenching* estático consiste en la formación de complejos no fluorescentes entre el fluoróforo y el *quencher*, lo cual es independiente de la difusión o de la existencia de colisiones moleculares (Lakowicz, 2006; van de Weert y Stella, 2011).

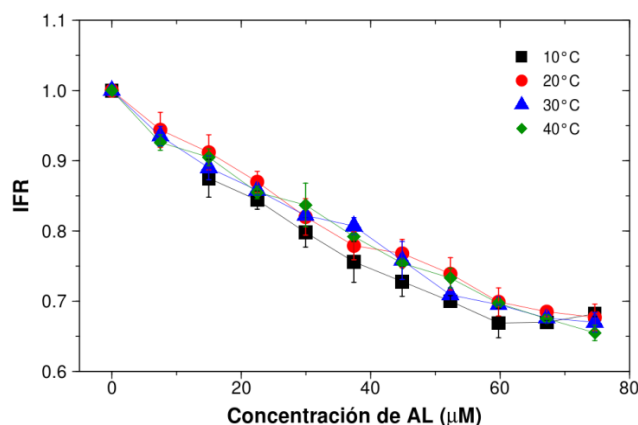


Figura 31. Curvas de intensidad de fluorescencia relativa intrínseca en función de la concentración de AL, a diferentes temperaturas (10°C-40°C). Concentración de proteína: 0,043 g/L (1 μM como monómero).

La Fig. 31 muestra el efecto de la temperatura (10°C-40°C) sobre la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de soluciones de complejos AL-OVAn. Puede observarse que, para todas las temperaturas, IFR disminuyó con el aumento en la concentración de AL. Además, se observó un solapamiento entre todas las curvas y no se observó una tendencia clara con la temperatura. Por lo tanto, como la temperatura aparentemente no tendría efecto sobre la magnitud del *quenching* de fluorescencia, se puede deducir que el fenómeno observado puede ser interpretado como *quenching* estático (Lakowicz, 2006; van de Weert y Stella, 2011).

A fin de determinar los parámetros de unión de AL y OVAn, se aplicaron los modelos doble logarítmico (Ec. 17) y Scatchard Modificado (Ec. 18):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \cdot \log [L]_{\text{libre}} \quad \text{Ecuación 17}$$

$$[P] \cdot (1 - f_i) = \frac{[L]}{n} \cdot \left(\frac{1}{f_i} \right) - \frac{1}{K_a \cdot n}$$

Ecuación 18

$$f_i = \frac{F - F_0}{F_{\text{max}} - F_0}$$

Ecuación 19

donde F y F₀ son la intensidad máxima de fluorescencia con y sin ligando, respectivamente; K_a es la constante de asociación; [L]_{libre} es la concentración de ligando libre (o no unido); [L] es la concentración de ligando total; n es el número de sitios de unión al ligando de la proteína o número de moléculas de ligando unidas (Le Maux y col., 2013; van de Weert y Stella, 2011). Es importante remarcar que [L]_{libre}, requerido para el modelo doble logarítmico (Ec. 17), resulta muy difícil de determinar

experimentalmente ya que involucraría pasos de ultracentrifugación, extracción y cuantificación por técnicas cromatográficas. Por lo tanto, van de Weert y Stella (2011) proponen que si $[L]$ es al menos 10 veces mayor que la proteína total $[P]$, $[L]/[P] > 10$, puede tomarse $[L]_{\text{libre}} \approx [L]$. En la presente tesis, las mediciones de fluorescencia fueron realizadas a $[L]/[P]$: 15-75, por lo que, en principio, sería aplicable el modelo doble logarítmico (Ec. 17).

Tabla 3. Parámetros de unión (K_a y n) de complejos AL-OVAn a diferentes temperaturas, obtenidos por el modelo doble logarítmico (Ec. 17). Los resultados son expresados como promedio \pm desvío estándar. CV% (coeficiente de variación) = desvío estándar/ K_a promedio *100. R^2 : coeficiente de regresión lineal del ajuste de los datos a la Ec. 17. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Temperatura	K_a [M^{-1}]	CV%	n	R^2
10°C	$2,17 \pm 2,19 \times 10^3$ (a)	100,7%	$0,84 \pm 0,10$ (a)	$0,938 \pm 0,049$
20°C	$8,99 \pm 6,97 \times 10^3$ (a)	77,5%	$1,01 \pm 0,09$ (ab)	$0,970 \pm 0,022$
30°C*	$3,58 \pm 2,17 \times 10^3$ (a)	60,6%	$0,92 \pm 0,07$ (ab)	$0,973 \pm 0,010$
40°C	$6,97 \pm 2,98 \times 10^3$ (a)	42,7%	$0,99 \pm 0,05$ (b)	$0,993 \pm 0,003$

*Una de las tres réplicas presentó $R^2 < 0,8$, por lo que no fue considerada.

Los parámetros de unión obtenidos a partir del modelo doble logarítmico se muestran en la Tabla 3. Puede observarse una buena correlación ($R^2 > 0,93$), aunque los valores de K_a presentaron alta dispersión ($CV\% > 40\%$). Como era de esperar, el aumento de la temperatura no produjo diferencias significativas entre los valores de K_a ($p > 0,05$). Por otro lado, se observa que el valor de n fue ~ 1 . En este sentido, considerando el valor de n arrojado por el modelo doble logarítmico surge el interrogante de cómo se interpretaría el mismo teniendo en cuenta que i) el modelo doble logarítmico no incluye la concentración de proteína como parámetro y que ii) las OVAn no constituyen un sistema monodisperso, tal como serían las proteínas nativas puras. Podría sugerirse que, al no contemplar la concentración de proteína para la

obtención de los parámetros de unión y hallarlos solo a partir de los datos de fluorescencia intrínseca, se estarían utilizando datos que serían más bien indicativos de la concentración del fluoróforo que de la proteína.

Por otro lado, cabe mencionar que la concentración proteica de OVA_n podría ser expresada de dos maneras: i) peso molecular promedio de las OVA_n; ii) en base a la unidad monomérica de OVA (teniendo en cuenta que las OVA_n están formadas por la agregación de varios monómeros de OVA). Esto es sumamente relevante porque, al parecer, el modelo doble logarítmico arroja un valor de $n \sim 1$, independientemente de si se está expresando en base al peso molecular promedio o a la unidad monomérica. Consecuentemente, habría una inconsistencia, ya que si una unidad monomérica de OVA tiene la capacidad de ligar 1 molécula de AL, y suponiendo que una nanopartícula de OVA (OVA_n) está formada por 5 moléculas de OVA agregada, se estaría asumiendo que una OVA_n tendría la capacidad de ligar 5 moléculas de AL, cuando en realidad el modelo también contempla la posibilidad de que el valor de n para una OVA_n puede ser 1. En otras palabras, la no contemplación de la definición de unidad proteica por parte del modelo conlleva a resultados erróneos en la estequiometría de unión, lo cual queda en evidencia cuando se trabaja con agregados proteicos. Por lo tanto, el modelo doble logarítmico no sería apropiado para la obtención de la estequiometría de unión.

Además, de acuerdo a van de Weert y Stella (2011), el modelo doble logarítmico sería una linealización del modelo de Hill y n sería solo el coeficiente de Hill, el cual es menor que el número real de sitios de unión o moléculas de ligando unidas. El coeficiente de Hill es comúnmente utilizado para estimar el número de moléculas de ligando que pueden unirse a un receptor para producir un efecto funcional. Sin embargo, para un receptor con más de un sitio de unión, la ecuación de Hill no refleja un esquema de reacción físicamente posible. De este modo, el coeficiente se explicaría mejor como

un coeficiente de interacción, reflejando la extensión de la cooperatividad entre múltiples sitios de unión a ligandos (Weiss, 1997).

Otro modelo utilizado para determinar parámetros de unión por fluorescencia es el de Scatchard modificado (Ec. 18). En principio, este modelo sería más apropiado que el doble logarítmico, ya que no sería necesario conocer $[L]_{\text{libre}}$ porque se utiliza $[L]$. Además, el modelo presenta la concentración de proteína como uno de los parámetros necesarios para la determinación de K_a y n a través del ajuste de los datos. Los valores de los parámetros de unión obtenidos por dicho modelo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de unión (K_a y n) de complejos AL-OVAn a diferentes temperaturas, obtenidas por el modelo de Scatchard modificado (Ec. 18). Los resultados son expresados como promedio \pm desvío estándar. CV% (coeficiente de variación) = desvío estándar/ K_a promedio *100. R^2 : coeficiente de regresión lineal del ajuste de los datos a la Ec. 18. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Temperatura	K_a [M^{-1}]	CV%	n	R^2
10°C*	$1,47 \pm 0,66 \times 10^5$ (a)	45,3%	47 ± 11 (a)	$0,958 \pm 0,013$
20°C	$2,17 \pm 1,40 \times 10^5$ (a)	64,8%	82 ± 31 (a)	$0,887 \pm 0,048$
30°C**	$2,93 \times 10^5$ (a)	-	36 (a)	0,831
40°C	$2,04 \pm 1,10 \times 10^5$ (a)	53,7%	53 ± 12 (a)	$0,940 \pm 0,032$

*Una de las tres réplicas presentó $R^2 < 0,8$, por lo que no fue considerada.

**Dos de las tres réplicas presentaron $R^2 < 0,8$, por lo que no fueron consideradas.

Puede observarse que el aumento de la temperatura no produjo diferencias entre los valores de K_a . Además, los valores de CV% $> 45\%$, demuestran una gran dispersión de los valores de K_a hallados por este modelo. Por otro lado, los valores de n también mostraron alta variabilidad. Sin embargo, fueron muy diferentes de los hallados con el modelo doble logarítmico. Por lo tanto, debido a la alta dispersión que manifestaron los parámetros de unión, el modelo de Scatchard no fue apropiado para el ajuste de los datos de *quenching* de fluorescencia intrínseca de los complejos AL-OVAn.

Resumiendo, el modelo doble logarítmico no resulta apropiado para obtener parámetros de unión ya que no brindaría la estequiometría real de los complejos proteína-ligando. Por otro lado, el modelo de Scatchard Modificado aunque sería el apropiado, registró mucha dispersión en los resultados, por lo que a continuación se presentan otros abordajes para la obtención de los parámetros de unión.

4.2.2.2. Análisis de la fluorescencia extrínseca del complejo AL-OVAn

Como se mencionó en la sección 1.5.1.1, la OVA posee 385 aminoácidos de los cuales la mitad son hidrofóbicos. Dentro de los aminoácidos hidrofóbicos de la OVA se encuentra una cantidad de 3 Trp y 10 Tyr, los cuales constituirían fluoróforos intrínsecos de la proteína (sección 4.2.1). Por lo tanto, de los más de 150 aminoácidos hidrofóbicos que presenta la OVA, sólo 13 de ellos estarían involucrados en la emisión de fluorescencia intrínseca. Por otro lado, cabría esperar que la unión del ligando a la proteína podría producirse no solamente a estos 13 aminoácidos sino también en otros sitios hidrofóbicos que no correspondan a los fluoróforos intrínsecos. Esto significaría que el monitoreo de la fluorescencia intrínseca de los complejos AL-OVAn estaría dando información parcial del total de sitios hidrofóbicos presentes en la proteína. Por ello, a fin de reunir información en relación al total de los sitios de unión al ligando, se podría plantear el monitoreo de la fluorescencia de la proteína a partir del uso de una sonda fluorescente capaz de unirse a los sitios hidrofóbicos de misma. En este sentido, se planteó dicho estudio por medio de la utilización de la sonda ANS.

En la Fig. 32A se muestran los espectros de fluorescencia extrínseca (ANS) de dispersiones de OVAn en presencia de diferentes concentraciones de AL. Puede observarse que la intensidad de fluorescencia del ANS disminuyó con el aumento de la concentración de AL. Este comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta que

la fluorescencia del ANS se produce cuando esta molécula se une en forma no covalente a sitios hidrofóbicos en la proteína (Albani, 2004; Perez y col., 2012). Sin embargo, el AL también se uniría a dichos sitios, por lo que, cuando se forman los complejos AL-OVAn, habría menor cantidad de sitios hidrofóbicos disponibles para la unión del ANS a la proteína y, consecuentemente la fluorescencia del ANS disminuiría (Gonzalez y Miksovska, 2014).

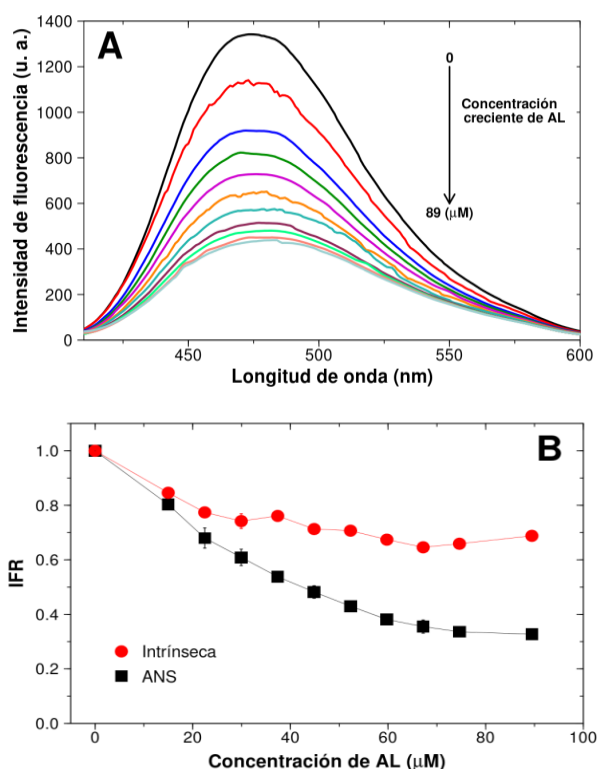


Figura 32.A: Espectros de emisión de fluorescencia extrínseca de ANS de OVAn (OVA-85,5) con concentraciones crecientes de AL. **B:** Curvas de intensidad de fluorescencia relativa intrínseca y extrínseca. Concentración de proteína: 0.043 g/L (1 μM como monómero).

Además, se registró un corrimiento al rojo en el pico de los espectros de emisión del ANS (Fig. A6, apéndice), lo cual sugiere que el ANS se unió a un ambiente cada vez más polar conforme aumentó la concentración de AL. Esto sugeriría que el modo de unión del AL a las OVAn podría responder a un mecanismo en el cual los sitios internos se ocuparían primero.

La Fig. 32B muestra la IFR tanto extrínseca como intrínseca de dispersiones de OVAn en función de la concentración de AL. Como puede observarse, tanto IFR-ANS como la IFR intrínseca alcanzaron un valor aproximadamente constante a la misma concentración de AL ($\sim 75 \mu\text{M}$), la cual correspondería a una condición de saturación. Sin embargo, la disminución en la IFR-ANS fue más pronunciada que su contraparte intrínseca. Si se asume que la IFR es directamente proporcional al número de sitios hidrofóbicos, estos resultados indicarían que del total de sitios que poseen fluoróforos intrínsecos, el 30% estarían ocupados mientras que del total de sitios hidrofóbicos, el 70% estarían ocupados por el AL. Esto confirmaría que las moléculas de AL se unirían no solo a sitios hidrofóbicos con fluoróforos intrínsecos sino también a otros sitios hidrofóbicos.

En relación a esto, el hecho de que haya sitios hidrofóbicos no ocupados por el AL podría significar que la formación del complejo AL-OVAn requeriría la presencia de sitios hidrofóbicos con una disposición espacial particular de los residuos de aminoácidos en OVAn (Le Maux y col., 2013; Perez y col., 2014). De este modo, los sitios hidrofóbicos que no reunieron esta característica fueron ocupados por el ANS y serían responsables de la fluorescencia extrínseca a nivel de la saturación de AL (IFR $\sim 0,3$).

Teniendo en cuenta que la disminución en la fluorescencia se debe al aumento de la concentración de AL, se aplicó el modelo de Scatchard modificado (Ec. 18) para obtener parámetros de unión (Fig. A7, apéndice). Se encontró un buen ajuste de los datos experimentales al modelo ($R^2 = 0,987 \pm 0,011$), resultando en los siguientes parámetros: $n: 49 \pm 2$ y $K_a: 9,80 \pm 2,53 \times 10^5 \text{ M}$. Estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud que los hallados ajustando los datos de fluorescencia intrínseca al mismo modelo (Tabla 4), pero presentan una dispersión menor. Sin

embargo, el valor de K_a obtenido a partir de datos de fluorescencia extrínseca fue significativamente mayor que el hallado con los datos intrínsecos, lo cual puede explicarse por el descenso más pronunciado de la fluorescencia extrínseca respecto a intrínseca (Fig. 32B).

Por último, es importante destacar que, teniendo en cuenta que el ANS es un fluoróforo que puede unirse a todos los sitios hidrofóbicos, el estudio de la interacción proteína-ligado por medio de fluorescencia no se limitaría a la presencia de fluoróforos intrínsecos en el sitio de unión.

4.2.2.3. Estimación de la estequiometría de formación de complejos AL-OVAn por medidas de turbidez

Una molécula de PUFA es una molécula anfifílica que posee una pequeña cabeza polar (grupo carboxílico) y una cola hidrofóbica (cadena alifática) (Fennema, 1996). Esta última le confiere una elevada hidrofobicidad y, en consecuencia, una muy baja solubilidad en agua (Zimet y Livney, 2009). En solución acuosa, cuando la concentración de PUFA excede un valor crítico, conocido como concentración micelar crítica (CMC), toma lugar el auto-ensamblaje de las moléculas de ácidos grasos, formando estructuras supramoleculares, tales como micelas, bicapas intermediarias y vesículas relativamente grandes, que confieren turbidez a la solución (Fig. 33). Dichas especies están en equilibrio con la especie no asociada o en solución (monómero) (Akoh y Min, 2002; Chen y Szostak, 2004; Fontana y col., 2013).

Revestimiento de
vesículas
preformadas
(fase rápida)

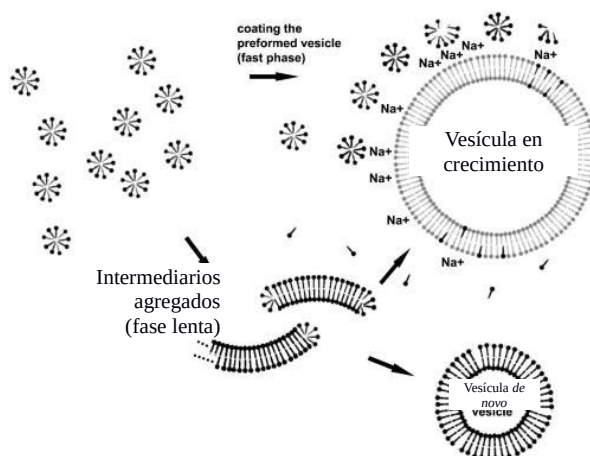


Figura 33. Representación esquemática de la formación de micelas, bicapas intermediarias y vesículas de ácido graso mediante auto-ensamblaje molecular (Chen y Szostak, 2004).

Es importante remarcar que el autoensamblaje se debe a que las moléculas de ácidos grasos se asocian a través de la aproximación de sus colas, mientras que las cabezas permanecen en contacto con las moléculas de agua (Fennema, 1996).

La Fig. 34A muestra la turbidez de soluciones de AL sin y con OVA nativa y tratada térmicamente. Se observa que la solución sin proteína presentó un aumento lineal de la turbidez con el aumento de la concentración de AL. Estas soluciones presentaron turbidez debido a que los tamaños de los autoensamblados supramoleculares de AL estarían en el mismo orden de la longitud de onda de la luz, lo que produjo un fuerte fenómeno de dispersión (McClements y Li, 2010). Sin embargo, el AL en presencia de OVA, presentó una marcada disminución de la turbidez, la cual permaneció aproximadamente constante en el rango de concentración de AL evaluado. Este resultado podría sugerir la interrupción de la formación de los autoensamblados supramoleculares de AL y la formación de complejos AL-OVA debido a la unión del AL a las OVA (Fontana y col., 2013). Bajo las mismas condiciones, OVA nativa produjo una ligera disminución en la turbidez, lo que indicaría que las moléculas de AL se unen a la OVA nativa pero en una proporción más baja. Esto es consistente con la

menor capacidad de unión determinada a partir de mediciones de fluorescencia intrínseca para la OVA nativa (tal como fue discutido en la sección 4.2.1).

La Fig. 34B muestra el aspecto visual de soluciones de AL a 500 μM sin (izquierda) y con proteína (derecha). Como puede observarse, la presencia de OVA_n produjo una disminución visible de la turbidez de la solución de AL hasta alcanzar un aspecto casi translúcido. Esto se debería a que el tamaño de las partículas es menor que la longitud de onda de luz, lo que produce una muy débil dispersión de luz (McClements y Li, 2010).

Por otro lado, en la Fig. 35, se muestra la turbidez de soluciones de AL sin y con OVA_n en un rango mayor de concentración de AL que el mostrado en la Fig. 34A. Puede observarse que la turbidez de la solución de OVA_n comienza a aumentar a partir de una determinada concentración de AL.

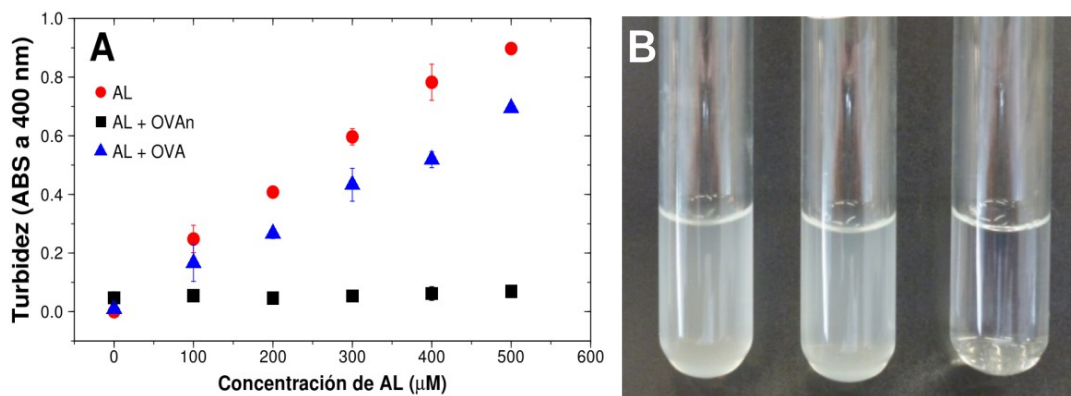


Figura 34.A: Turbidez de soluciones de AL con OVA nativa, OVA_n y sin proteína. **B:** Apariencia visual de soluciones de AL a 500 μM sin proteína (izquierda), con OVA nativa (centro) y con OVA_n (derecha). Concentración de proteína: 0,5 g/L.

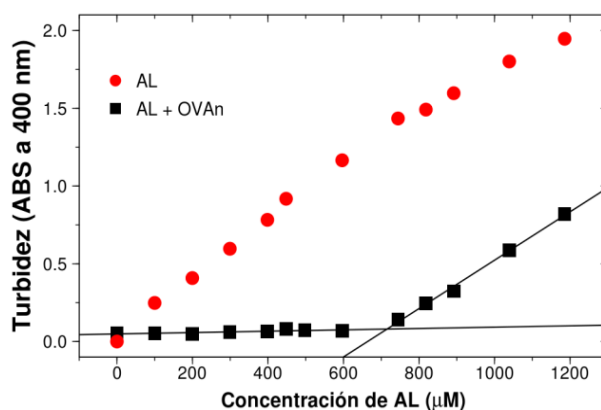


Figura 35. Turbidez de soluciones de AL sin y con OVAn a 0,5 g/L (11,3 µM como OVA monomérica).

El comportamiento descrito podría explicarse considerando que el AL se une a OVAn hasta que se alcanza una concentración en la cual todos los sitios de unión de las OVAn estarían ocupados por las moléculas de AL (saturación) y a partir de la cual las moléculas de AL libre comienzan a asociarse entre sí para formar autoensamblados supramoleculares, que serían los que confieren la turbidez a la solución. Para determinar dicha concentración se ajustó por un lado, la zona de la curva de turbidez constante y por otro lado, la de turbidez creciente a dos modelos de regresión lineal, respectivamente. Luego, a partir de las dos ecuaciones obtenidas se halló el punto de intersección de ambas rectas. Este punto correspondió a una concentración de AL de 712 µM, la cual correspondería a la concentración micelar crítica (CMC) del AL en presencia de OVAn (CMC'). Como puede notarse la CMC' es ~12 veces más grande que la CMC correspondiente al AL sin OVAn (60 µM) (Serth y col., 1991). La concentración de AL correspondiente a la saturación se estimó a partir de la diferencia entre CMC' y CMC (asumiendo que CMC del AL puro no cambia en presencia de OVAn), resultando en 652 µM. Debido a que las OVAn están formadas por la unión de varias moléculas de OVA, se puede obtener el número de moléculas de AL que se une a las OVAn en base a unidades monoméricas de OVA (Le Maux y col., 2013). En las

mediciones de turbidez, la concentración de OVAn fue de 0,5 g/L, lo cual corresponde a 11,6 μM (en términos de unidad monomérica de OVA). Teniendo esto en cuenta, la estequiometría de unión AL:OVA sería $652:11.6 = 56:1$. Es decir, se unirían 56 moléculas de AL por unidad monomérica de OVA. Este resultado está en el mismo orden del encontrado por Le Maux y col. (2013), para nanopartículas β -Lactoglobulina obtenidas por tratamiento térmico. Por otro lado, esta estequiometría es levemente superior a la obtenida aplicando el modelo de Scatchard a partir de datos de fluorescencia (sección 4.2.2.2).

4.2.2.4. Análisis de los aspectos cinéticos relativos a la formación de complejos AL-OVAn

Teniendo en cuenta que las OVAn producen la disminución de la turbidez de soluciones de AL se plantearon estudios de cinética de formación de complejos AL-OVAn a partir de la evolución de la turbidez con el tiempo. Para ello se asumió un proceso de adsorción *batch* en el cual las OVAn fueron tomadas como adsorbentes y el AL como adsorbato. Las mediciones fueron realizadas a diferentes temperaturas y relaciones molares AL/OVA (L/P).

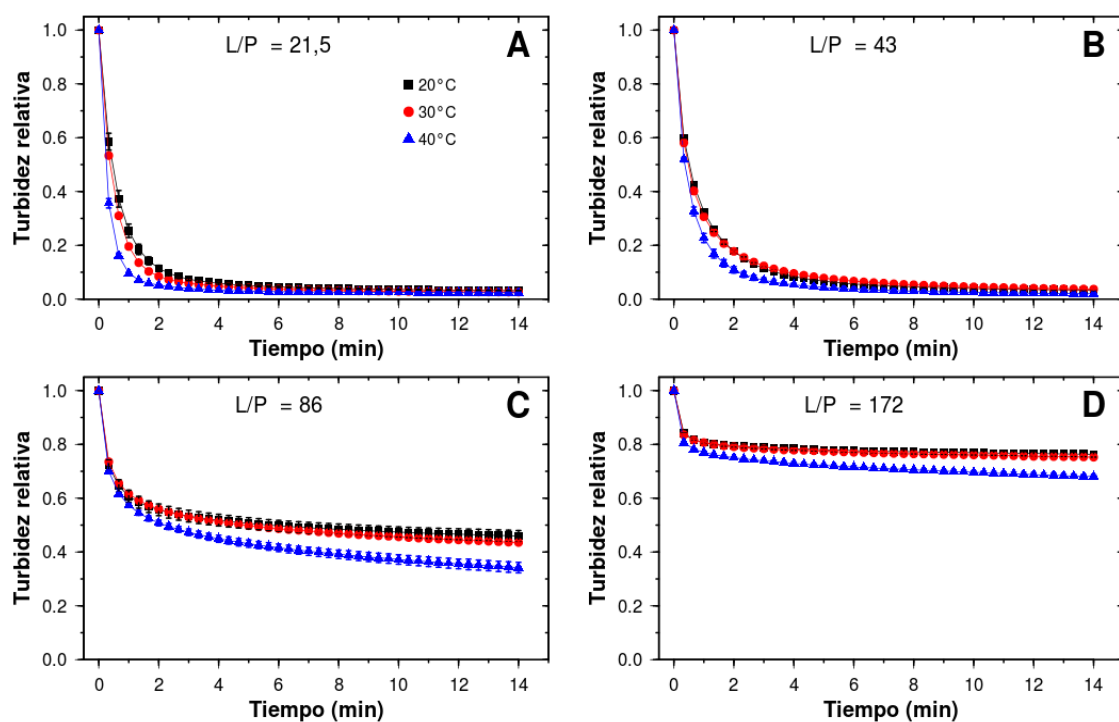


Figura 36. Turbidez relativa en función del tiempo de dispersiones de AL en presencia de OVA para diferentes temperaturas y relaciones molares (L/P): **A:** 21,5; **B:** 43; **C:** 86; **D:** 172 mol AL/mol OVA.

La Fig. 36 muestra la turbidez relativa de dispersiones de AL (1 mM) en función del tiempo para diferentes L/P (21,5-172 moles de AL/moles de OVA monomérica) y

temperaturas (20°C-40°C). Inicialmente, se observa una disminución muy rápida de la turbidez, sugiriendo un rápido proceso de adsorción. Este comportamiento podría ser explicado por la existencia de una fuerza impulsora generada por el gradiente de concentración de AL y por un gran número de sitios de unión disponibles en las OVA_n (Liu y Zhang, 2015). También puede notarse que a L/P 21,5 y 43,0 se alcanzó una turbidez constante para todas las temperaturas, lo que indicaría que se alcanzó el equilibrio de adsorción en el tiempo transcurrido durante la medición (Fig. 36A y Fig. 36B). Sin embargo, para L/P 86,0 y 172, el estado de equilibrio de adsorción pareció haberse alcanzado para 20°C y 30°C pero no para 40°C (Fig. 36C y Fig. 36D).

La Fig. 36 muestra también que, para una dada temperatura, el aumento en L/P produjo valores de turbidez más altos, indicando un exceso de AL. Además, todas las mediciones realizadas a 40°C produjeron valores de turbidez más bajos que a 20°C y a 30°C, sugiriendo que la formación de complejos AL-OVA_n sería más favorable a 40°C, para una dada relación L/P.

Por otro lado, los datos mostrados en la Fig. 36 fueron ajustados a los modelos cinéticos de pseudo-primer y pseudo-segundo orden propuestos en Materiales y métodos en la Sección 3.2.2.4.2 (Ec. 5 y Ec. 6), a fin de encontrar el mejor ajuste de los datos. La aplicación del modelo cinético de pseudo-primer orden no produjo un buen ajuste ($R^2 < 0,8$). Por lo tanto, no sería apropiado para describir la cinética de adsorción en los sistemas AL-OVA_n. Sin embargo, el modelo cinético de pseudo-segundo orden mostró el mejor ajuste de los datos experimentales ($R^2 > 0,997$) (Fig. A8, apéndice), por lo tanto se utilizó para obtener los parámetros cinéticos que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidad de AL adsorbido por unidad de masa de adsorbente en el equilibrio (q_e) (mol AL/mol OVA monomérica) y constante de velocidad de pseudo-segundo orden (k_2) (mol OVA monomérica/mol AL.s) para la formación de complejos AL-OVA_n a diferentes temperaturas y relaciones molares (L/P) (mol AL/mol OVA monomérica). Resultados expresados como promedio \pm desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

q_e (mol AL / mol OVA monomérica)				
Temperatura	L/P			
	21,5	43,0	86,0	172
20°C	21,1 \pm 0,0 (a)	42,8 \pm 0,0 (b)	48,1 \pm 1,6 (c)	41,6 \pm 1,7 (b)
30°C	21,2 \pm 0,0 (a)	42,6 \pm 0,0 (b)	50,8 \pm 0,7 (d)	43,8 \pm 1,1 (b)
40°C	21,1 \pm 0,0 (a)	42,8 \pm 0,0 (b)	59,7 \pm 1,9 (f)	57,3 \pm 1,3 (e)

k_2 (mol OVA monomérica / mol AL.s)				
Temperatura	L/P			
	21,5	43,0	86,0	172
20°C	3,98 \pm 0,56 $\times 10^{-3}$ (a)	1,07 \pm 0,06 $\times 10^{-3}$ (a)	5,58 \pm 0,19 $\times 10^{-4}$ (c)	8,79 \pm 0,92 $\times 10^{-4}$ (c)
30°C	5,32 \pm 0,16 $\times 10^{-3}$ (a)	1,01 \pm 0,76 $\times 10^{-3}$ (a)	4,04 \pm 0,16 $\times 10^{-4}$ (b)	6,64 \pm 0,00 $\times 10^{-4}$ (b)
40°C	1,32 \pm 0,16 $\times 10^{-2}$ (b)	1,77 \pm 0,23 $\times 10^{-3}$ (b)	2,78 \pm 0,20 $\times 10^{-4}$ (a)	3,28 \pm 0,20 $\times 10^{-4}$ (a)

En la Tabla 5 puede observarse que el número de moles de AL adsorbidos por unidad de OVA monomérica (q_e) para todas las temperaturas en los casos de las relaciones L/P 21,5 y 43, fueron similares a dichas relaciones molares (L/P). Esto significaría que casi la totalidad de las moléculas de AL se unieron a las OVA_n. Además, q_e no cambió significativamente con el aumento de la temperatura ($p > 0,05$), sugiriendo que ésta no tendría efectos en la adsorción del AL, en términos de cantidad. Este comportamiento podría ser explicado considerando un exceso de OVA_n respecto del AL. Si el AL se une a las OVA_n por medio de interacciones hidrofóbicas, estas

aumentarían su afinidad por el AL a temperaturas más altas (en el rango evaluado). Sin embargo, para L/P 21,5 y 43, al no existir cambios con la temperatura, significaría que la cantidad de AL en solución no sería suficiente para una adsorción adicional promovida por el aumento de la temperatura. Por otro lado, para L/P 86 y 172, el aumento de la temperatura produjo un aumento en los valores de q_e (Tabla 5). En estas condiciones, el exceso de AL respecto a OVAn, conduciría a una adsorción adicional promovida por el aumento de la temperatura.

Finalmente, el máximo valor de q_e obtenido a 20°C ($q_e = 48,1 \pm 1,6$) (Tabla 5) fue comparable con el valor de n hallado a partir de los datos de fluorescencia extrínseca ajustados al modelo de Scatchard ($n: 49 \pm 2$) (sección 4.2.2.2). Esto indicaría que ambas técnicas serían consistentes y apropiadas para obtener la estequiometría de unión (o adsorción). Además, se confirmaría el supuesto de que en el estudio por fluorescencia extrínseca, el ANS no desplaza a las moléculas de AL en las OVAn.

Las constantes de velocidad de pseudo-segundo orden (k_2) de formación de complejos AL-OVAn a diferentes relaciones molares L/P se muestran también en la Tabla 5. Para L/P 21,5 y 43, los valores de k_2 fueron mayores a 40°C que a 20°C y 30°C. Por el contrario, se registró una disminución en k_2 con el aumento de la temperatura para L/P 86 y 172. A fin de explicar este comportamiento, se aplicó el modelo de Arrhenius para obtener las energías de activación involucradas en el proceso de adsorción. La ecuación de Arrhenius viene dada por la siguiente expresión (Muench y col., 1996):

$$\ln k_{ap} = \ln A_{ap} - E_{ap}/RT$$

Ecuación 20

donde k_{ap} es la constante aparente de velocidad (en este caso $k_{app} = k_2$ obtenida del modelo de pseudo-segundo orden); A_{ap} es el factor pre-exponencial; E_{ap} es la energía de activación aparente involucrada en el proceso de adsorción; R es la constante universal de los gases; y T es la temperatura absoluta.

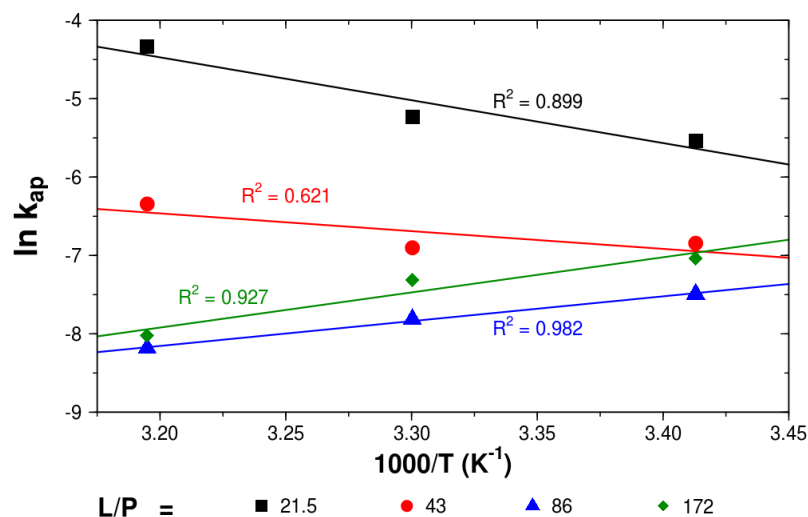


Figura 37. Aplicación del modelo de Arrhenius al proceso de adsorción AL-OVAn a diferentes relaciones molares (L/P).

De acuerdo a la Ec. 20, la energía de activación se obtiene a partir de la pendiente de la recta $\ln k_{app}$ versus $1/T$. La Fig. 37 muestra la gráfica de $\ln k_{app}$ versus $1/T$ para sistemas AL-OVAn a diferentes L/P. Se obtuvo un buen ajuste ($R^2 > 0,8$), a excepción de L/P 43. Sin embargo, éste fue incluido también como un sistema en transición. Los valores de E_{ap} (kJ/mol) obtenidos fueron: 44,1 (para L/P 21,5); 18,5 (para L/P 43); -26,4 (para L/P 86,0) y -37,3 (para L/P 172). Como se puede percibir, se produjo una disminución de E_{ap} con el aumento de L/P. Además, se obtuvieron valores positivos de E_{ap} para condiciones de exceso de OVAn (L/P 21,5 y 43), mientras que se hallaron valores negativos para condiciones de exceso de AL (L/P 86 y 172). De acuerdo a Sharma y Das (2012), valores de E_{ap} menores a 42 kJ/mol indicarían un fenómeno de adsorción física. El máximo valor obtenido de E_{ap} fue 44,1 kJ/mol, siendo

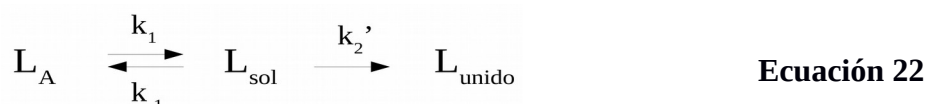
este muy próximo a 42 kJ/mol, sugiriendo que la formación de complejos AL-OVAn involucraría un proceso de adsorción de naturaleza física, que correspondería a interacciones hidrofóbicas.

A fin de explicar los valores negativos de E_{ap} , puede suponerse el siguiente mecanismo de adsorción:



donde L_{libre} es el AL no adsorbido; L_{unido} es el AL unido a la OVAn y k_{ap} es la constante de velocidad aparente (constante de pseudo-segundo orden, k_2).

De acuerdo a Muench y col. (1996), los valores negativos de E_{ap} podrían ser explicados a partir de un proceso molecular que tendría lugar en dos pasos (tres estados). En este sentido, L_{libre} podría suponerse compuesto de dos especies en equilibrio: AL autoensamblado (L_A) y AL no asociado o en solución (L_{sol}), es decir, $L_{\text{libre}} = L_A + L_{\text{sol}}$. Por lo tanto, la Ec. 21 puede ser reescrita como:



donde k_1 , k_{-1} y k_2' son constantes de velocidad.

De acuerdo a Muench y col. (1996), este modelo puede ser propuesto si $k_2' \ll k_1$ y k_{-1} . Para el primer paso de la Ec. 22, puede definirse una constante de equilibrio, K_{eq} (Muench et al., 1996):

$$K_{eq} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{k_2'}{k_{ap}} \Rightarrow k_{ap} = \frac{k_2'}{K_{eq}} \quad \text{Ecuación 23}$$

Luego, la Ec. 23 podría ser redefinida considerando la ecuación de Arrhenius para cada constante (k_{app} , k_2' and K_{eq}):

$$e^{A_{app}-E_{app}/RT} = \frac{e^{A_2'-E_2'/RT}}{e^{\Delta S-\Delta H/RT}} = e^{A_2'-\Delta S-(E_2'-\Delta H)/RT} \quad \text{Ecuación 24}$$

siendo A_2' y E_2' el factor pre-exponencial y la energía de activación, respectivamente, para el segundo paso en la Ec. 22; ΔS es el cambio de entropía y ΔH el cambio de entalpía, definido como $\Delta H = E_{-1} - E_1$ (energías de activación correspondientes al primer paso en la Ec. 22). Por lo tanto, a partir de la Ec. 22, $E_{ap} = E_2' - \Delta H$.

De esta forma, un valor negativo de E_{ap} (correspondiente a una disminución en los valores de k_2' con el aumento de la temperatura, obtenido para L/P 86 y 172) significaría que $E_2' - E_{-1} + E_1 < 0$, es decir, $E_{-1} > E_2' + E_1$. Por lo tanto, el paso $L_{sol} \square L_A$, sería más sensible a la temperatura que los pasos $L_A \square L_{sol}$ y $L_{sol} \square L_{unido}$, combinados. En este sentido, en condiciones de exceso de AL (L/P 86 y 172), un aumento de la temperatura favorecería la formación de autoensamblados, por sobre la disrupción de los mismos y la formación de complejos AL-OVAn, aunque el aumento de la temperatura haya producido un aumento en la cantidad de L_{unido} (Muench y col., 1996). Esto se confirmaría con la disminución de q_e a L/P 172 respecto de L/P 86.

En conclusión, la formación de complejos AL-OVAn podría ser caracterizada por un mecanismo de dos etapas: i) la disrupción de los autoensamblados de AL, que tomaría lugar debido a la migración de moléculas de AL desde los autoensamblados a la solución y ii) la adsorción de las moléculas de AL a la OVAn. Este mecanismo sería dependiente de la relación molar (L/P) y de la temperatura.

4.2.2.5. Análisis de los aspectos termodinámicos relativos a la formación de complejos AL-OVAn

Los estudios de la termodinámica de formación de complejos AL-OVAn involucran el conocimiento de parámetros tales como los cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG^0), entalpía (ΔH^0) y entropía estándar (ΔS^0). Estos parámetros permiten describir parcialmente la naturaleza de la interacción entre la proteína y el ligando (Joye y col., 2015). A fin de obtener los parámetros termodinámicos del proceso de adsorción, se utilizaron las siguientes ecuaciones (Khan y Singh, 1987; Liu y Zhang, 2015):

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_0 \quad \text{Ecuación 25}$$

$$\ln K_0 = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT} \quad \text{Ecuación 26}$$

$$\Delta G^0 = -T \cdot \Delta S^0 + \Delta H^0 \quad \text{Ecuación 27}$$

donde K_0 es la constante de equilibrio, calculada a partir de la regresión lineal de $\ln (C_e/q_e)$ versus C_e , siendo C_e la concentración del AL en el equilibrio (obtenida a partir de los datos de la Fig. 36 a tiempo infinito).

Esta regresión fue realizada para cada temperatura (20, 30 y 40°C), incluyendo los valores de $\ln (C_e/q_e)$ y C_e correspondientes a todas las relaciones L/P. En la regresión lineal, la intercepción corresponde al $\ln K_0$ (Fig. A9, apéndice) (Khan y Singh, 1987). Por lo tanto, la dependencia de K_0 con la temperatura brindaría información acerca del signo y magnitud de los parámetros termodinámicos del sistema (Joye y col., 2015). Además, como puede observarse en la Ec. 25, ΔH^0 y ΔS^0 pueden ser obtenidos a partir de la pendiente e intercepción, respectivamente de $\ln K_0$ versus $1/T$ (Fig. A10, apéndice). Los valores de estos parámetros y de K_0 son mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros termodinámicos para el proceso de adsorción AL-OVAn.

Temperatura	K_0 (M^{-1})	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 * (kJ/mol)	ΔS^0 * (J/mol.K)	R^2
20°C	$8,72 \times 10^5$	-33,32	12,36	155,7	0,949
30°C	$9,67 \times 10^5$	-34,72			
40°C	$1,21 \times 10^6$	-36,44			

* ΔH^0 y ΔS^0 no son dependientes de la temperatura.

Es importante remarcar que el valor de K_0 a 20°C fue similar al valor de K_a obtenido a partir de los datos de fluorescencia extrínseca aplicando el modelo de Scatchard (sección 4.2.2.2), lo cual sugeriría la complementariedad de las técnicas.

Por otro lado, se observa un leve aumento en los valores de K_0 con el aumento de la temperatura (Tabla 6). Este comportamiento explicaría los valores positivos de ΔH^0 y ΔS^0 , sugiriendo que el AL se adsorbería a las OVAn por medio de interacciones hidrofóbicas (Chen y col., 2011). Además, los valores positivos de ΔH^0 indican que la adsorción del AL a las OVAn se correspondería con un proceso endotérmico (Joye y col., 2015; Liu y Zhang, 2015; Sharma y Das, 2012); mientras que valores negativos de ΔG^0 menores a -10 kJ/mol, para todas las temperaturas sugieren la naturaleza espontánea del proceso de adsorción a través de un mecanismo físico (Liu y Zhang, 2015). Además, esta observación es consistente con lo hallado y discutido en secciones previas. Por último, cabe mencionar que el término $-T.\Delta S^0$ en la Ec. 26 fue más grande en magnitud que el término ΔH^0 , por lo que el proceso de adsorción sería conducido entrópicamente (Santos y col., 2007), es decir, que las moléculas de solvente que rodean tanto a las moléculas de AL como a las OVAn se disponen en una forma menos ordenada cuando toma lugar el proceso de adsorción vía interacciones hidrofóbicas (Joye y col., 2015).

4.2.2.6. Consideraciones prácticas derivadas de los parámetros estequiométricos, cinéticos y termodinámicos

La determinación de los parámetros estequiométricos, cinéticos y termodinámicos permiten realizar algunas consideraciones a tener en cuenta para el potencial uso de OVAn como nanovehículo del AL:

- i) Considerando una estequiometría $n = 49$, es decir, 49 moléculas de AL por unidad monomérica de OVA, la capacidad de carga de las OVAn sería de 0,320 g AL por g de OVAn. Esto significa que el 24,2 % de la masa total de los complejos AL-OVAn, corresponderían a AL. El conocimiento de este dato sería importante, por ejemplo, para la formulación de alimentos funcionales.
- ii) Otro aspecto importante que se deriva de los parámetros obtenidos es la relación L/P conveniente para la formación de complejos AL-OVAn y sus aplicaciones. Como puede verse en la Tabla 5, la máxima capacidad de adsorción (q_e) se alcanzó a L/P 86 y 40°C ($59,7 \pm 1,9$). Sin embargo, en estas condiciones habría una importante cantidad de AL libre (~30%). Esto sugeriría que la fracción de AL total podría estar sujeta al deterioro por oxidación, lo cual no sería deseable. Por lo tanto, una relación L/P apropiada para alcanzar la máxima adsorción de AL (carga máxima de AL en las OVAn), sin AL libre, estaría en el rango comprendido entre L/P 43 y 86, porque a L/P 43, casi todo el AL estaría unido a las OVAn (sección 4.2.2.4). Sin embargo, es importante considerar que no sería conveniente sobrecargar las OVAn debido a que el AL podría ser liberado durante procesos posteriores. Por lo tanto, sería preferible trabajar con una L/P un poco alejada a la correspondiente a la saturación debido a que procesos tecnológicos tales como cambios de pH, centrifugación, adición de polisacáridos, secado, etc. podrían modificar la conformación estructural de la

- proteína y la solubilidad del compuesto lipofílico, resultando en una menor carga final (Weinbreck, 2004; Zimet y Livney, 2009).
- iii) Considerando el efecto de la temperatura, si se decide trabajar a una L/P por debajo del correspondiente a la saturación, la formación de complejos AL-OVAn no se verían influenciados por la temperatura, en términos de carga, por lo que se podría trabajar a temperatura ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$).
- iv) Respecto a los aspectos cinéticos, las curvas evidenciaron que el proceso de adsorción es relativamente rápido (Fig. 36), considerando además que no se realizó con agitación (posterior a la del mezclado inicial). Por lo tanto, el proceso de adsorción podría ser realizado en un período de tiempo máximo de 1 h sin agitación.

4.2.2.7. Análisis de los aspectos estructurales y morfológicos de los complejos AL-OVAn

Para la caracterización estructural y morfológica de los complejos AL-OVAn, se llevaron a cabo determinaciones que involucran algunos de estos aspectos a través de la determinación de tamaño de partículas por DLS, mediciones de potencial Zeta y microscopía de fuerza atómica del complejo AL-OVAn. Se realizaron comparaciones respecto a las OVAn sin AL.

4.2.2.7.1. Análisis de tamaño de partícula y de potencial Zeta

La Fig. 38 muestra las PSDi de las OVAn, los complejos AL-OVAn (L/P 21,5) y los autoensamblados supramoleculares de AL. La PSDi correspondiente al AL presentó un pico de 611 ± 8 nm. Este tamaño correspondería a los autoensamblados supramoleculares que confieren turbidez a la solución, según se discutió en secciones previas. Como puede observarse en la Fig. 38, esta población no se encontró en el sistema AL-OVAn, lo cual indicaría la disrupción de los autoensamblados de AL para

dar lugar a la formación de los nanocomplejos AL-OVAn. Esta información es consistente con lo discutido en la sección 4.2.2.3 (Fontana y col., 2013).

Además, puede observarse que la PSDi del sistema AL-OVAn es aparentemente similar a la PSDi de las OVAn sin AL. Sin embargo, la PSDi de AL-OVAn presentó un pico de $87,5 \pm 1,2$ nm, que fue significativamente más grande que el pico de las OVAn ($79,4 \pm 1,8$ nm). El tamaño más grande de los complejos AL-OVAn podría explicarse por la adsorción de AL sobre las OVAn dando un leve aumento de su diámetro hidrodinámico. No obstante, el hecho de que registre superposición de las PSDi es indicativo de que el AL se uniría también a sitios internos, tal como se sugirió en la sección 4.2.2.2.

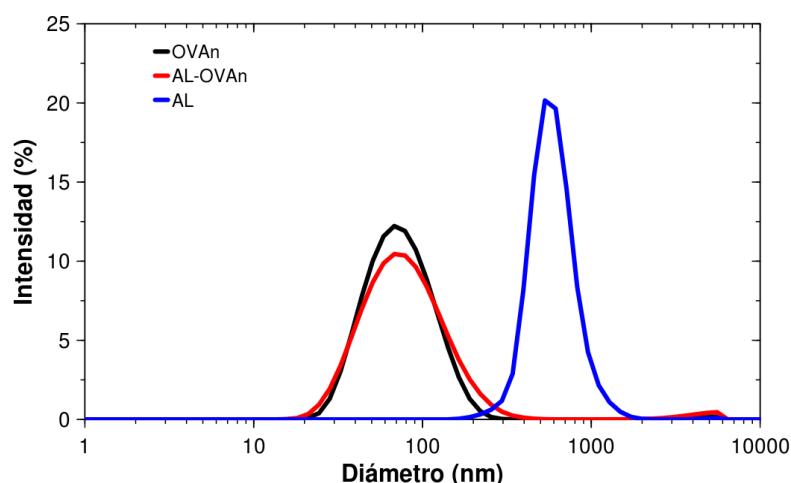


Figura 38. PSDi del AL y de las OVAn sin y con AL (L/P 21,5).

Por otro lado, también se realizaron mediciones de potencial Zeta de OVAn con y sin AL. El potencial Zeta puede ser modificado por la adsorción de especies cargadas tales como iones y agentes tensioactivos iónicos en la superficie de las partículas (Malvern Instruments Ltd, 2014). En este trabajo se realizaron las mediciones de potencial Zeta a pH 7 (buffer fosfato 50 mM). Los complejos AL-OVAn presentaron un

valor de potencial Zeta significativamente menor ($p < 0,05$) que las OVAn ($-14,8 \pm 0,4$ mV y $-18,6 \pm 0,9$ mV, respectivamente). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la molécula de AL tiene una cola apolar (cadena alifática) y una cabeza polar (grupo carboxílico) lo que confiere un carácter anfifílico. Por lo tanto, el AL se uniría a las OVAn por medio de interacciones hidrofóbicas a través de la cola apolar, quedando su cabeza polar ionizada orientada hacia la superficie del nanocomplejo, confiriendo un aumento en el número de cargas negativas sobre OVAn y, consecuentemente una disminución en el valor del potencial Zeta (King y col., 1989).

4.2.2.7.2 Análisis de la morfología de los complejos AL-OVAn evaluada por AFM

En la Fig. 39 se presentan micrografías para los sistemas AL-OVAn (Fig 39B y Fig. 39D). También se muestran micrografías de OVAn (Fig 39A y Fig. 39C) que ya fueron presentadas en la sección 4.1.2, y que se incluyen aquí con fines comparativos.

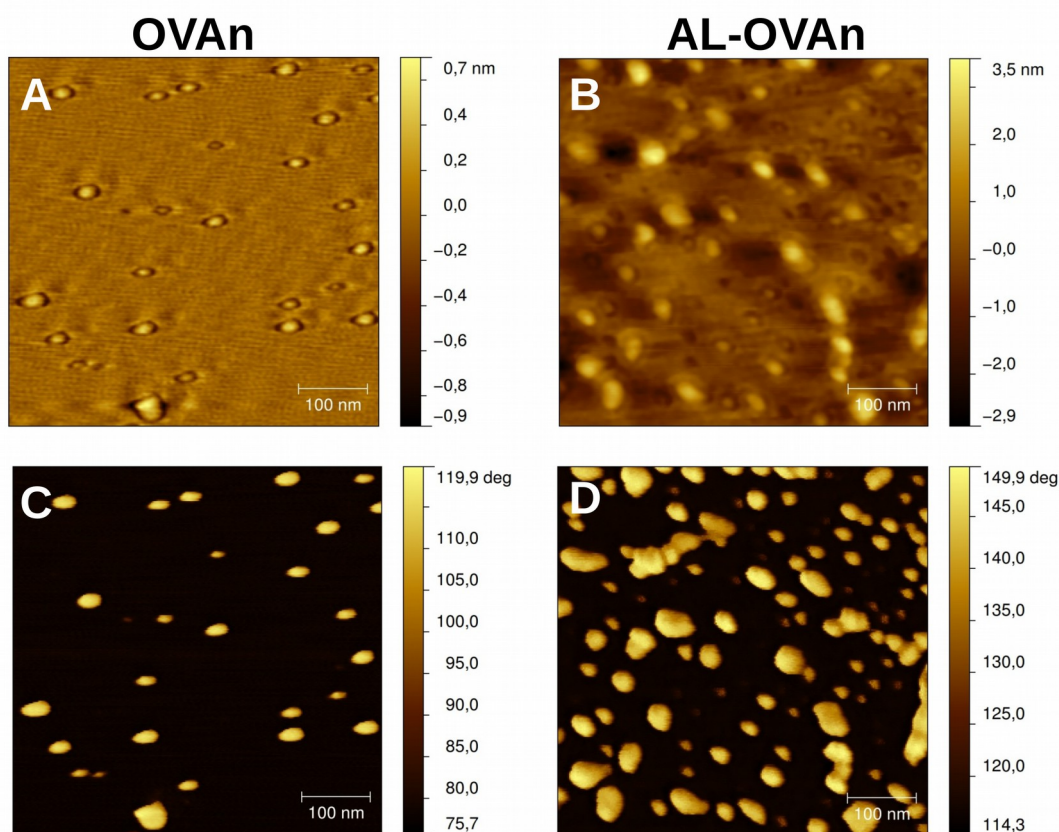


Figura 39. Imágenes topográficas y de fase correspondientes a los sistemas OVAn (A y C) y AL-OVAn (B y D) (L/P 43 mol AL/mol OVA).

Puede observarse que en las imágenes topográficas (Fig 39A y Fig. 39B), los complejos AL-OVAn presentan una alta relación diámetro/altura, tal como fue observado para las OVAn sin AL. Sin embargo, los complejos AL-OVAn presentaron una mayor altura que las OVAn sin AL, de acuerdo a la escala lateral. Teniendo en cuenta que las OVAn se aplastan sobre la superficie del soporte de mica (como se discutió en la sección 4.1.2), la mayor altura registrada para AL-OVAn puede atribuirse a la presencia de AL en el interior de los sitios hidrofóbicos de las OVAn, tal como se pudo concluir a partir de las mediciones de fluorescencia extrínseca (sección 4.2.2.2). De este modo, las moléculas de AL “rellenarían” las OVAn.

A partir de la Fig. 39D se puede observar que en el sistema AL-OVAn existiría una fracción de OVA sin agregar (diámetro < 10 nm), al igual que en la OVAn y que tampoco fueron detectadas por medidas de DLS (sección 4.1.1). También pueden observarse partículas con forma aproximadamente redondeadas aunque un poco más irregulares que las observadas para OVAn sin AL, lo cual podría atribuirse a la presencia de AL en la superficie de las partículas.

Capítulo 3

Estudio de las interacciones OVA_n-PS

4.3. Estudio de las interacciones OVAn-PS

Como se mencionó en la introducción de esta tesis (sección 1.5.3), el estudio de las interacciones entre proteínas y PS es relevante para el diseño de nanopartículas biopoliméricas que vehiculizan compuestos bioactivos. La importancia de dicho estudio radica en dos aspectos: i) la deposición del PS sobre los complejos AL-OVAn permitirían una mayor protección frente a factores externos de deterioro y ii) la interacción de AL-OVAn con PS podría utilizarse como método para separar las nanopartículas a partir de la separación de fases asociativa. En este sentido, en el presente capítulo se describe el estudio de las interacciones entre OVAn y dos PS aniónicos: pectina de alto metoxilo (PAM); y goma arábiga (GA), en un rango determinado de pH y de concentraciones de PS. A fin de realizar una caracterización de los sistemas, se realizaron mediciones de turbidez, potencial Zeta y composición de las fases de biopolímero.

4.3.1. Análisis de la turbidez y potencial Zeta de sistemas OVAn-PS

Según Wang y col. (1996), las condiciones para inducir un proceso de separación de fases por coacervación pueden ser determinadas mediante titulación turbidimétrica a diferentes fuerzas iónicas y relaciones de biopolímeros. En la presente tesis se trabajó con fuerza iónica constante variando sólo la relación proteína-PS. Las curvas de turbidez inicial (sección 3.2.3.1) en función del pH para los sistemas OVAn, OVAn-GA y OVAn-PAM se muestran en la Fig. 40.

Puede observarse en la Fig. 40 que en el rango de pH 7,0-5,5 no existen diferencias de turbidez entre los sistemas con diferentes PS. Sin embargo, a $\text{pH} < 5,5$ comienzan a observarse diferencias, siendo los valores de turbidez para $\text{OVAn-GA} > \text{OVAn-PAM} > \text{OVAn}$. Esto se debería a la formación de complejos entre las OVAn y los

PS, los cuales, al ser de mayor tamaño que la proteína, producen un aumento en la turbidez de los sistemas mixtos. Es importante remarcar que todos los sistemas con turbidez $> 0,25$ presentaron separación de fases macroscópica (Fig. 41). Esto significa que el desarrollo de turbidez no estuvo asociado a la formación de complejos solubles. En este sentido, Perez y col. (2015), demostraron la formación de sistemas coloidalmente estables con presencia de turbidez producto de la formación de complejos solubles entre β -lactoglobulina y PAM. Por el contrario, las OVAn formarían complejos lo suficientemente grandes como para no permanecer coloidalmente estables, produciéndose la precipitación. La discusión de los comportamientos observados en la Fig. 40 se hará en términos de mediciones de potencial Zeta de los sistemas.

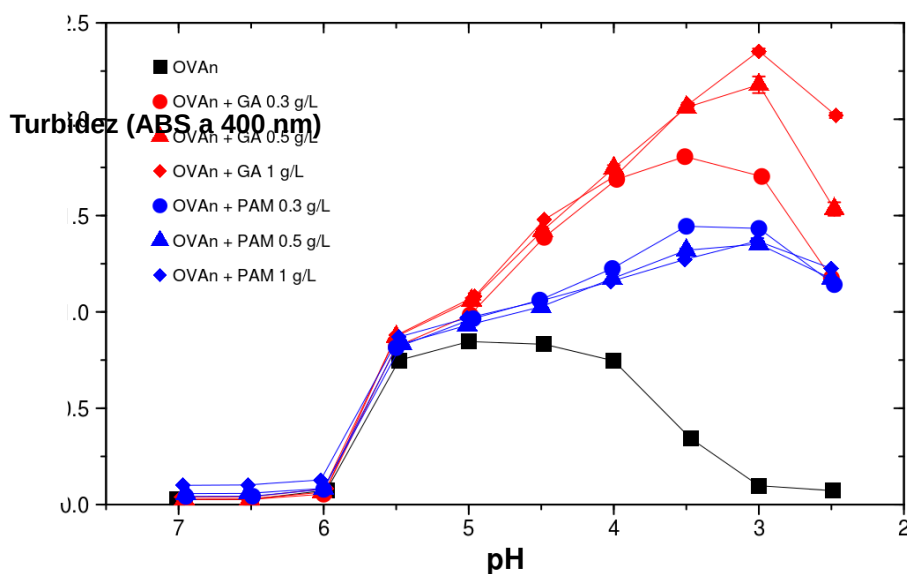


Figura 40. Turbidez inicial (ABS a 400 nm) en función del pH de sistemas de OVAn sin y con GA y PAM. Concentración de OVAn: 1 g/L.

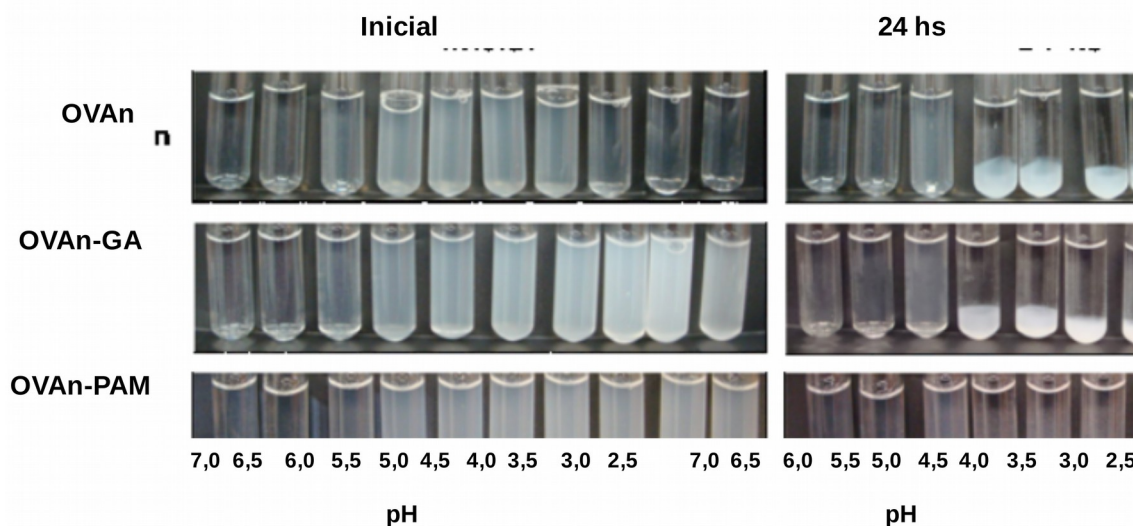


Figura 41. Apariencia visual de sistemas OVA_n (1 g/L) sin y con PS (GA y PAM, 1 g/L).

El potencial Zeta en función del pH de los sistemas OVA_n-GA y OVA_n-PAM se muestra en las Fig. 42A y 42B, respectivamente. Además se incluye la curva correspondiente al PS solo y se muestran los valores de los puntos isoeléctricos (pI) de los sistemas que presentaron cambio de signo con la disminución del pH. Los pI se obtuvieron por regresión lineal del conjunto de puntos en el rango de cambio de signo del potencial Zeta. El conocimiento del perfil de potencial Zeta *versus* pH tanto de una proteína como de un PS es muy importante para el diseño de partículas biopoliméricas ya que las interacciones electrostáticas pueden ser usadas para ensamblar una estructura de biopolímeros específica (Matalanis y col., 2011).

En el caso de OVA_n, se observa un máximo de turbidez a pH 5,0 (Fig. 40). Luego, desciende hasta alcanzar a pH 3,0 aproximadamente al mismo valor que a pH 7,0-6,0. Este comportamiento se debería a que a pH 5,5-3,5 predominaría la agregación debido a la proximidad del pI (4,73) (Fig. 42). Fuera de este rango de pH, el valor absoluto del potencial Zeta sería lo suficientemente alto como para promover la estabilidad coloidal del sistema por repulsiones electrostáticas entre las OVA_n (Fig. 41).

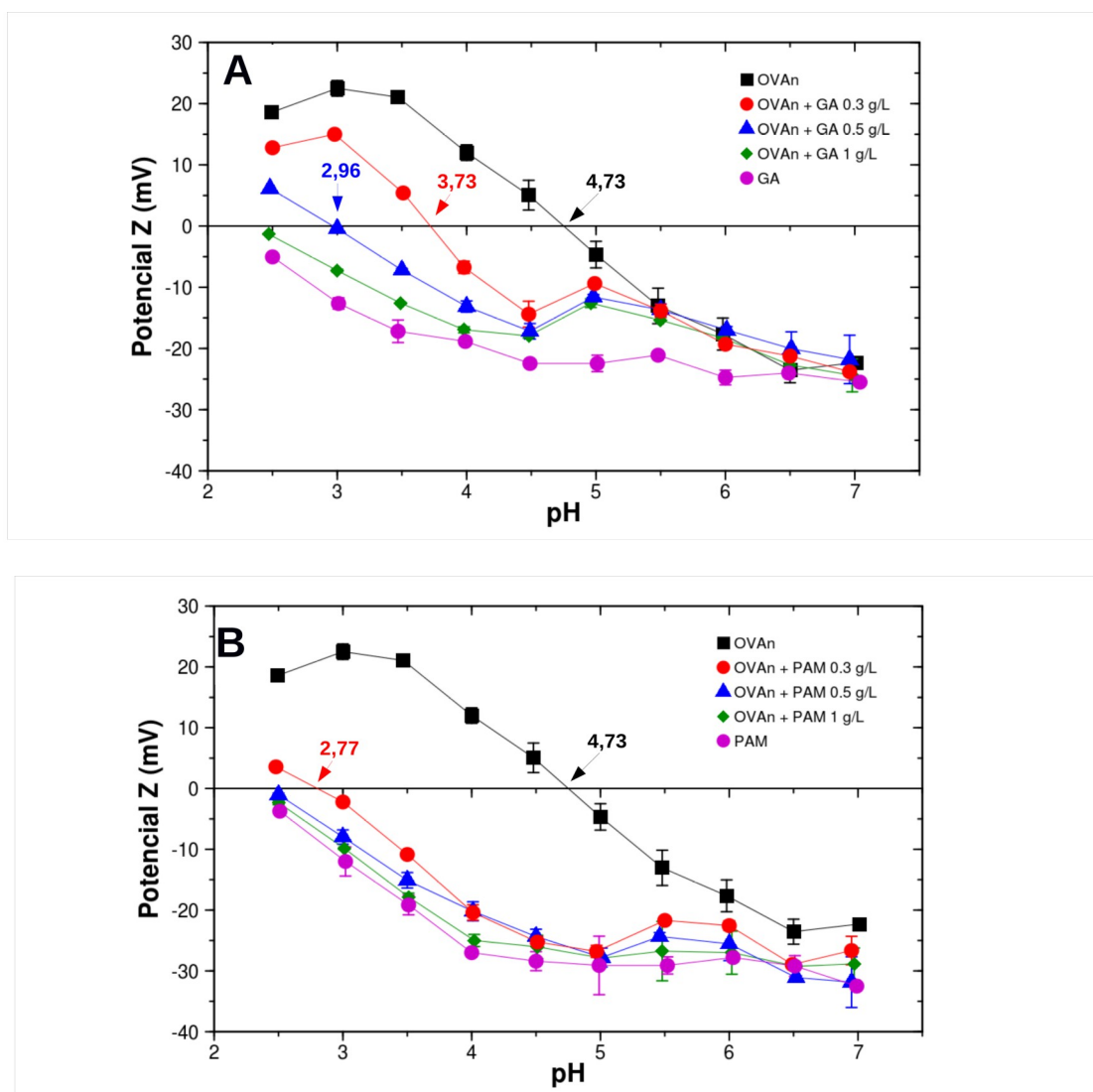


Figura 42. Potencial Zeta en función del pH de sistemas OVAn sin y con PS. **A:** GA y **B:** PAM en diferentes concentraciones. Concentración de OVAn: 1 g/L.

Por otro lado, los sistemas OVAn-GA y OVAn-PAM con 0,5 y 1,0 g/L de PS presentaron un valor máximo a pH 3,0, mientras que los sistemas mixtos formulados con 0,3 g/L de PS exhibieron un valor máximo a pH 3,5 (Fig. 40). Este corrimiento hacia un mayor valor de pH observado para mezclas con 0,3 g/L de PS puede explicarse considerando la mayor proporción de proteína (OVAn) en las mezclas. Al haber más proteína, la neutralización de las cargas negativas de los PS se produciría a un mayor valor de pH.

Además, en la Fig. 40 se observa que en el rango de pH de 7,0-4,0 los valores de turbidez fueron independientes del tipo de PS y de su concentración en el sistema mixto. Sin embargo, a $\text{pH} < 4,0$ los sistemas que contienen PAM en distintas concentraciones no difieren entre sí en la medida en que lo hacen los sistemas que contienen GA. Es decir, a $\text{pH} < 4,0$, la turbidez de los sistemas con GA es más sensible al cambio de pH que los sistemas con PAM. Un comportamiento similar puede observarse en el potencial Zeta de los sistemas mixtos (Fig. 42), solo que en el caso de OVAn-GA, la diferencia entre los sistemas con diferentes concentraciones se observa a $\text{pH} < 4,5$.

Los sistemas con GA 0,3 g/L y 0,5 g/L presentaron pI de 3,73 y 2,96, respectivamente (Fig. 42A), mientras que los sistemas con PAM, sólo el que contenía 0,3 g/L presentó pI (2,77) (Fig. 42B), el cual resultó menor a los pI de los sistemas OVAn-GA. Esto puede explicarse teniendo en cuenta las densidades de carga de los PS (número de cargas por unidad de masa). A $\text{pH} > 3,5$, PAM presentó valores de potencial Zeta más negativos que la GA. Esto indicaría que la PAM posee mayor densidad de carga que la GA, lo cual explicaría los valores más negativos encontrados en los sistemas OVAn-PAM respecto a OVAn-GA.

4.3.2. Análisis de la composición de las fases

Como puede observarse en la Fig. 41, los sistemas OVAn y OVAn-PS presentaron una separación macroscópica de fases dependiente del tiempo y fundamentalmente del pH del medio acuoso. Este comportamiento podría ser aprovechado como una estrategia de concentración de las nanopartículas ya que la fase sedimentada sería rica en el biopolímero de interés (proteína como nanovehículo del AL) (Davidov-Pardo y col., 2015). Por lo tanto, para la obtención de AL encapsulado por medio de la formación de complejos electrostáticos proteína-PS como un

ingrediente en polvo (sólido), podría proponerse una etapa de separación de fases. Esta etapa se puede realizar en base a los fenómenos de interacción electrostática entre las proteínas y polisacáridos con cargas de distinto signo que conllevan a una separación de fases asociativa o coacervación compleja (sección 1.5.3). En este sentido, resulta relevante determinar la composición de las fases del sistema a fin de evaluar cuáles serían las mejores condiciones que permitan lograr al objetivo deseado.

La Fig. 43 muestra el rendimiento de separación de OVAn tras la centrifugación (RS_{OVAn}) (sección 3.2.3.2). Puede observarse que en el rango de pH 7,0-4,0, no hay diferencias entre los sistemas sin y con PS. Sin embargo, a $pH < 4,0$ se observa que el rendimiento disminuye para la OVAn sin PS. Esto se explicaría por el aumento en el potencial Zeta de la OVAn a $pH < 3,5$, debido a la presencia de cargas positivas que promueven una mayor solubilidad favorecida por una repulsión entre dichas cargas (Fig. 42).

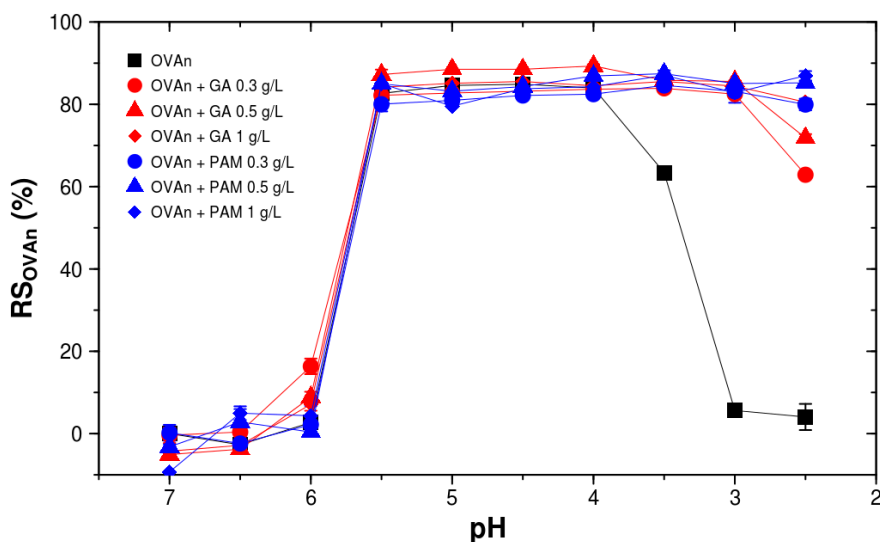


Figura 43. Rendimiento de separación de OVAn en función del pH para sistemas sin y con PS.

Por otro lado, los sistemas OVAn-PS presentan similar rendimiento en un rango más amplio de pH (7,0-3,0). A pH 2,5, los sistemas OVAn-PAM 0,5 g/L y 1 g/L poseen similar rendimiento que en rango de pH 7,0-3,0, mientras que para los sistemas OVAn-PAM 0,3 g/L y OVAn-GA 1 g/L, el rendimiento baja levemente.

Las disminuciones más pronunciadas en el rendimiento a pH 2,5 se observan en los sistemas OVAn-GA 0,3 g/L y 0,5 g/L (63 % y 72 %, respectivamente) (Fig. 43). Las disminuciones en el rendimiento se deberían a que a pH 2,5 los complejos formados poseen carga positiva, por lo cual cobran importancia fuerzas repulsivas que tienden a solubilizar los complejos (Fig. 41).

En la Fig. 43 se observa que hay un rendimiento promedio de ~85 %, lo que indicaría que un 15 % de la proteína permaneció en el sobrenadante y se perdería en el caso de que se lo separe. Esta pérdida sería un aspecto a tener en cuenta en el caso de que se desee optar por la separación de fases asociativa como etapa de concentración de OVAn en el proceso de obtención del AL nanoencapsulado en polvo.

Por otro lado, la cantidad de PS presente en el pellet por unidad de masa de OVAn (PS_p) en función del pH se muestra en la Fig. 44. Puede notarse que tanto para OVAn-GA como OVAn-PAM se registró un aumento de PS_p con el aumento de concentración de PS inicial. En el caso de los sistemas OVAn-GA, esta diferencia se percibe a pH < 5,0, donde se observa que GA a 0,5 g/L presenta valores más cercanos a GA 1 g/L que a GA 0,3 g/L. Para el caso de OVAn-PAM, en el sistema con PAM 1 g/L se observó siempre una mayor cantidad de PS en pellet que en los sistemas con 0,3 g/L y 0,5 g/L, para todo el rango de pH evaluado. La diferencia entre estos dos sistemas se observa a pH < 4,0.

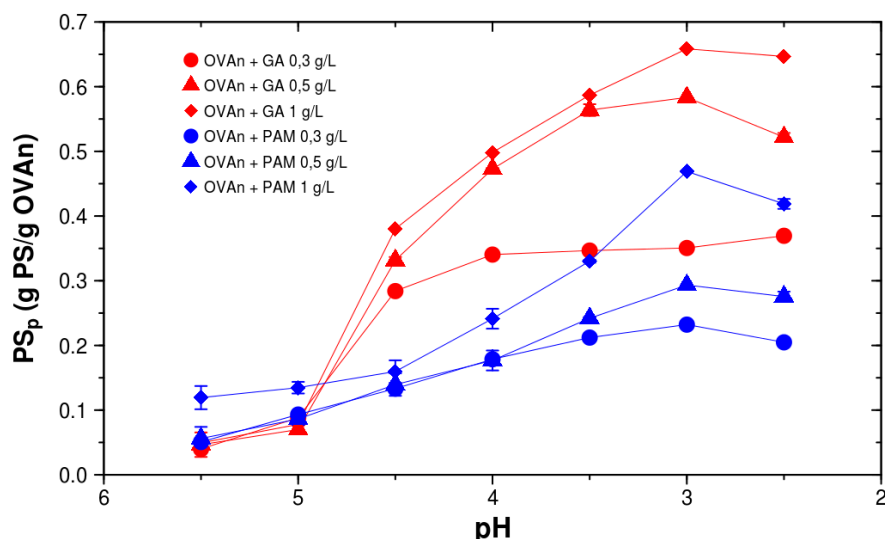


Figura 44. Cantidad de PS en pellet por unidad de masa de OVAn en función del pH.

Es importante remarcar que para una misma concentración de PS, los sistemas OVAn-GA presentaron mayor concentración de PS en pellet que la observada para los sistemas OVAn-PAM (Fig. 44). Esto puede deberse a que los complejos con GA poseen una menor carga residual que los obtenidos con PAM debido a la menor densidad de carga de la GA. Es decir, se necesitaría más cantidad de GA que de PAM para neutralizar la misma cantidad de cargas positivas de la OVAn.

Como complemento de la información mostrada en la Fig. 44, en la Fig. 45 se presenta el RS_{PS} (porcentaje del total de PS inicial, sección 3.2.3.3) en función del pH. Puede notarse, al igual que en la Fig. 44, que para una misma concentración de PS, la GA produjo una mayor separación que PAM. Para OVAn-GA, los valores máximos de cada sistema estuvieron en el rango 53-98%, mientras que para OVAn-PAM estuvieron en 34-63% (Fig. 45). Como cabría esperar, RS_{PS} resultó ser mayor con la disminución de PS total inicial. La información presentada en la Fig. 45 podría ser útil a los fines de encontrar la concentración de PS que produzca la menor pérdida del mismo en el sobrenadante. En este sentido, el sistema OVAn-GA 0,3 g/L fue el que precipitó un mayor porcentaje de PS total, perdiéndose solo un 2% de GA. Esto se explica por el

exceso de cargas positivas de la OVAn, respecto a la cantidad de cargas negativas de la GA (Fig. 42).

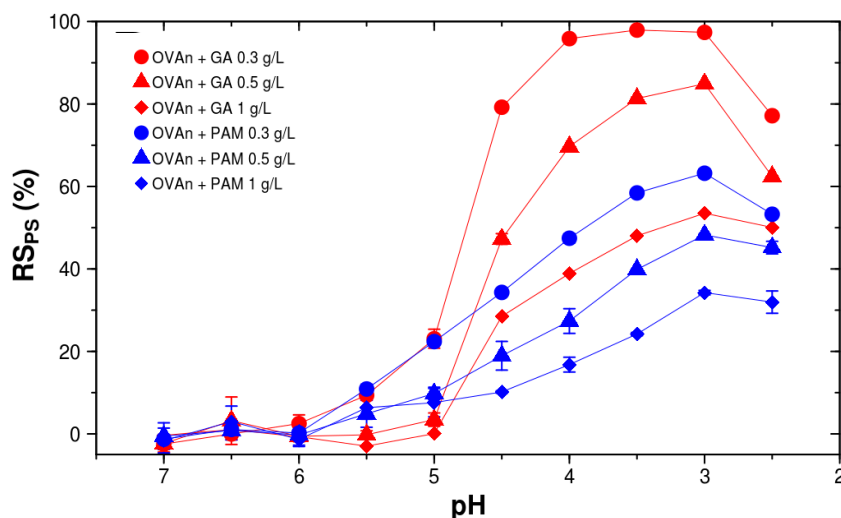


Figura 45. Fracción de PS precipitado en función del pH.

En lo que respecta a la composición del sistema en términos de porcentaje de pellet y de sobrenadante (Fig. A11, apéndice), es importante mencionar también que el sistema OVAn presentó menos del 4 % de pellet. Esto significa que mediante la centrifugación pudo eliminarse al menos el 96 % del contenido de agua del sistema, aunque, de acuerdo a lo que se discutió anteriormente, el sobrenadante consistiría en una solución diluida de OVAn soluble (teniendo en cuenta que ~ 15 % de la OVAn total permanece en el sobrenadante).

Respecto a los sistemas con PS, el pellet representó entre un 3-10% del sistema para OVAn-GA y 3-6% para OVAn-PAM (Fig. A11, apéndice). En OVAn-PAM se observó una tendencia de aumento del porcentaje de pellet con el aumento de la concentración de PAM, mientras que en OVAn-GA no se verificó dicha tendencia. Cabe mencionar que con ambos PS, no se registraron tendencias claras respecto del porcentaje de pellet con el pH.

Otro de los parámetros que resultaría útil a considerar en el caso de realizar la concentración de OVA_n por medio de un proceso de separación de fases asociativas es el factor de concentración. Los factores de concentración para los sistemas OVA_n-GA y OVA_n-PAM se muestran en las Fig. 46A y 46B, respectivamente.

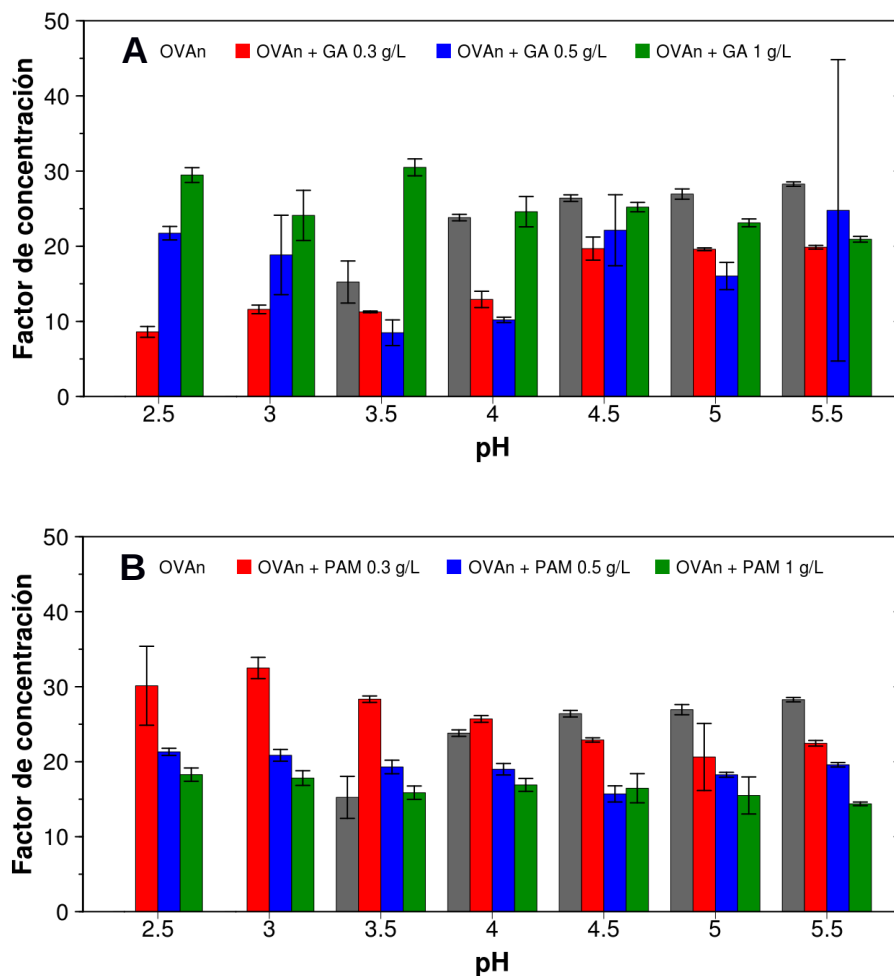


Figura 46. Factor de concentración de OVA_n para sistemas con GA (A) y PAM (B).
Concentración inicial de OVA_n: 1 g/L.

Como puede observarse, se logró concentrar entre 10 y 30 veces las soluciones. En el caso de los sistemas OVA_n-GA, los mayores valores se obtuvieron para concentraciones de GA altas, no habiendo tendencias claras ni con el pH ni con la concentración de GA (Fig. 46A). Los sistemas OVA_n-PAM no presentaron una

tendencia clara con el pH pero sí se observó una disminución del valor del factor con el aumento de la concentración de PAM (Fig. 46B). Cabe mencionar que los valores del factor de concentración estarían influenciados principalmente por los valores de porcentaje de pellet tras la centrifugación (Fig. A11, apéndice), considerando que el rendimiento de separación de OVAn (Fig. 43) fue aproximadamente el mismo para todos los sistemas. Por ello, sería lógico esperar que los sistemas que presentaron mayor cantidad de pellet sean aquellos que presenten los menores factores de concentración.

4.3.3. Relación entre PS_p y turbidez

Es importante mencionar que los sistemas con PS en concentraciones de 0,5 g/L y 1 g/L presentaron la máxima cantidad de PS en pellet a pH 3,0, es decir, al mismo valor de pH en que se alcanzó el máximo de turbidez para dichos sistemas (Fig. 40). Además, si se compara la Fig. 40 con la Fig. 44, se puede observar que ambas presentan una tendencia similar con la disminución del pH para cada sistema. Este comportamiento podría permitir plantear una correlación entre la cantidad de PS en pellet y la turbidez a fin de evaluar si la turbidez permite inferir la cantidad de PS en pellet para cada sistema tras el proceso de centrifugación. Dicha correlación se presenta en la Fig. 47, donde se muestran diagramas de dispersión para cada sistema con línea de tendencia asumiendo un modelo de regresión lineal. En general, puede percibirse un buen ajuste ($R^2 > 0,85$), lo que indicaría que más del 85 % de la variabilidad de la cantidad de PS en pellet puede ser explicada por la variabilidad en la turbidez. Es de destacar que los ajustes serían específicos para cada sistema en particular, siendo esto más notorio en los sistemas OVAn-PAM, donde se observa un aumento de la pendiente conforme aumenta la concentración de PAM inicial. En este sentido, los sistemas OVAn-GA presentaron líneas de tendencias con pendientes similares (Fig. 47).

La correlación encontrada entre PS_p (Fig. 44) y la turbidez (Fig. 40) confirmaría que la titulación turbidimétrica sería una herramienta adecuada para el estudio de las interacciones proteína-PS y, en este caso en particular, para la estimación de la cantidad de PS_p en los sistemas estudiados.

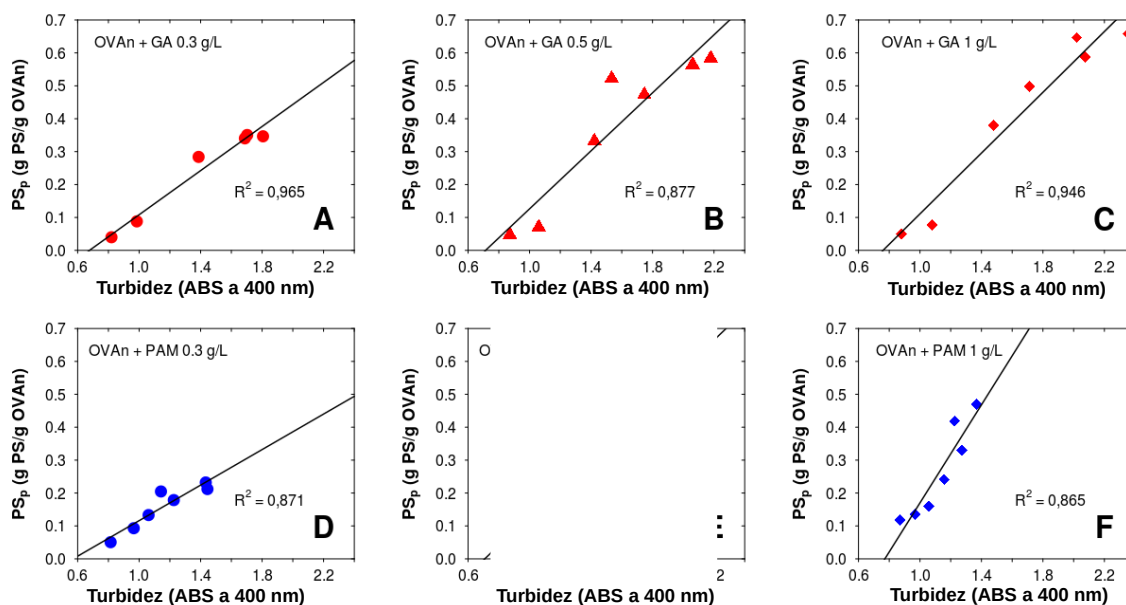


Figura 47. Diagramas de dispersión *versus* turbidez para sistemas OVAn-GA y OVAn-PAM.

4.3.4. Selección de los sistemas OVAn-PS para la obtención de los sistemas en polvo

En base al estudio realizado sobre separación de fases asociativa, sería posible seleccionar las condiciones más apropiadas (concentración de PS y pH) para la producción de sistemas en polvo luego de una etapa de concentración. Es importante remarcar que a pH entre 5,5 y 4,0, los sistemas no presentaron diferencias RS_{OVAn} (Fig. 43). Es por ello que puede afirmarse que la presencia de PS no tendría efecto alguno sobre RS_{OVAn} en el rango de pH especificado. Sin embargo, a pH entre 4,0 y 2,5, la presencia de PS aumentó RS_{OVAn} en relación al sistema sin PS. No obstante, los valores de RS_{OVAn} son los mismos que los correspondientes al sistema sin PS en el rango de pH

5,5-4,0. Por lo tanto, RS_{OVAn} no sería un parámetro apropiado para la elección de las condiciones óptimas para efectuar la concentración de OVAn por separación de fases asociativa.

No obstante, como se mencionó anteriormente, es importante remarcar que el uso del PS, si bien no contribuyó a RS_{OVAn} , sería importante debido a que el mismo confiere una protección adicional al compuesto bioactivo frente al deterioro oxidativo. Dicha protección se debería a que el PS se une a la proteína mediante interacciones electrostáticas formando una capa protectora alrededor de la proteína (Zimet y Livney, 2009). En este sentido, las mediciones de potencial Zeta ayudarían a determinar qué concentración de PS es suficiente para recubrir la proteína en su totalidad. En el caso de OVAn-GA, según se observa en la Fig. 42A, 0,3 g/L GA y 0,5 g/L GA no serían suficientes para cubrir la proteína, ya que dichos sistemas presentan valores de potencial Zeta positivos en el rango evaluado. La presencia de cargas positivas se debe a los grupos cargados positivamente en la proteína. Por lo tanto, la concentración de GA elegida es 1 g/L.

Aplicando el mismo criterio para los sistemas OVAn-PAM, la neutralización total de los grupos positivos se daría recién para 0,5 g/L (Fig. 42B) por lo que esta es la concentración de PAM que se utilizará.

En relación al pH, el criterio de selección sería PS_p (Fig. 44). Como se desea que el PS actúe como barrera frente al deterioro del AL, la cantidad máxima de PS_p es la que permitiría, en principio, la máxima protección. En este sentido, tanto para OVAn-GA 1 g/L como para OVAn-PAM 0,5 g/L, la máxima cantidad de PS_p se obtuvo a pH 3,0. Por ello, este es el valor de pH elegido. Además, se eligió el sistema OVAn sin PS a pH 5,0 como control.

Capítulo 4

Caracterización de los complejos AL-OVAn-

PS en polvo

4.4. Caracterización de los complejos AL-OVAn-PS en polvo

4.4.1. Características generales de los polvos

Como se mencionó en la parte final del capítulo anterior (sección 4.3.4), se seleccionaron las condiciones para la obtención de los complejos AL-OVAn-PS las cuales se detallan en la sección 3.2.4. De este modo, se produjeron los sistemas AL-OVAn-GA y AL-OVAn-PAM. Además, se elaboró un sistema control sin PS (AL-OVAn). Los sistemas fueron sometidos a secado por liofilización. En todos los casos se obtuvieron polvos de color blanco, siendo AL-OVAn menos compacto y más frágil que los formulados con PS. Por otro lado, las cantidades de polvo obtenidas para 1 litro de solución inicial fueron: AL-OVAn-GA 1,7801 g; AL-OVAn-PAM 1,5577 g y AL-OVAn 1,1016 g. Como puede observarse, el sistema AL-OVAn fue el que presentó el menor valor lo cual se explica por la menor cantidad de sólidos. Respecto a los sistemas con PS, la mayor cantidad para AL-OVAn-GA comparado con AL-OVAn-PAM, podría atribuirse a la mayor cantidad de GA utilizada (1 g/L *versus* 0,5 g/L) de acuerdo a lo mencionado en la sección 4.3.4.

4.4.2. Capacidad de carga, eficiencia de encapsulación y rendimiento

En la Tabla 6 se muestran los valores de capacidad de carga de AL (CC), eficiencia de encapsulación (EE) y rendimiento de encapsulación (RE) de los sistemas en polvo AL-OVAn sin y con PS. Puede observarse que la presencia de PS produjo una disminución significativa en la CC del polvo. Esto podría explicarse considerando que la presencia de PS conlleva a un aumento en el contenido de sólidos totales, disminuyendo así la concentración de AL con respecto al sistema sin PS. Además, se observa que los valores de CC para los sistemas AL-OVAn-PAM y AL-OVAn-GA

fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$), siendo esto, en principio, inesperado ya que en la formulación del sistema AL-OVAn-GA se utilizó una mayor cantidad de PS.

Tabla 6. Capacidad de carga (CC); AL libre (AL_L); AL encapsulado (AL_E); eficiencia de encapsulación (EE) y rendimiento de encapsulación (RE). Valores presentados como promedio \pm desvío estándar ($n = 3$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Sistema	CC (%)	AL _L (%)	AL _E (%)	EE (%)	RE (%)
AL-OVAn	19,10 \pm 1,34 (b)	12,20 \pm 2,04 (b)	6,90	36,11	27,09
AL-OVAn-GA	10,63 \pm 0,54 (a)	0,73 \pm 0,20 (a)	9,90	93,09	62,81
OVAn-PAM	10,83 \pm 0,01 (a)	0,70 \pm 0,15 (a)	10,13	93,58	56,29

Por otro lado, también puede observarse en la Tabla 6, que la presencia de PS produjo una disminución significativa en la concentración de AL libre y, por lo tanto, un aumento en AL_E y en EE. Es importante destacar los elevados valores de EE para los sistemas con PS (EE > 90%), lo cual puede ser atribuido a su deposición electrostática sobre los complejos AL-OVAn en el proceso de obtención de los polvos, particularmente cuando el pH se ajusta a 3,0, tal como se explicó en la sección 4.3.2. Esto produciría que el AL sea prácticamente inaccesible para ser extraído por el hexano. En el caso del sistema sin PS, más de la mitad de la cantidad de AL se encontraría en forma libre (o extraíble).

Por último, en lo que respecta al rendimiento de encapsulación, puede notarse el siguiente orden: AL-OVAn-GA > AL-OVAn-PAM > AL-OVAn. Es decir, el RE aumentó con la presencia de PS. En otras palabras, la menor pérdida fue del 38% (en el caso del sistema con GA) del AL durante el proceso de obtención del polvo. Estas pérdidas podrían ser atribuidas a la incompleta precipitación de las OVAn acomplejadas con el AL (sección 4.3.2), permitiendo que AL sea eliminado con el sobrenadante. Por otra parte, serían atribuidas a pérdidas inherentes al proceso de obtención en la etapa

que involucra el trasvase del pellet a los recipientes para la liofilización. En este sentido, este último aspecto podría ser mejorado en el caso de un posible escalamiento. Cabe mencionar que Zimet y Livney (2009) obtuvieron un RE del 64 % en la encapsulación de DHA con BLG y pectina de bajo metoxilo. Si bien ellos no produjeron los sistemas en polvo, puede notarse que hubo una pérdida inherente al proceso de centrifugación y separación de pellet del sobrenadante.

4.4.3. Reconstitución de los polvos

Se realizó la reconstitución o resuspensión de los polvos en medio acuoso. Cuando se resuspendieron los polvos en agua desionizada (0,04 g en 20 ml de agua), los valores de pH final de las dispersiones fueron 5,40, 3,76 y 3,69 para los sistemas AL-OVAn, AL-OVAn-GA y AL-OVAn-PAM, respectivamente. Es decir, fueron levemente superiores a los respectivos valores de pH de obtención del pellet para su posterior liofilización (5,0 para AL-OVAn y 3,0 para AL-OVAn-PS). Tras la reconstitución, se observó la presencia de agregados, lo cual era de esperarse en base a los resultados discutidos en la sección 4.3.1. Luego, se ajustó el pH a 7 y se evidenció un material insoluble, tal como se observa en la Fig. 48.



Figura 48. Apariencia visual de polvos resuspendidos en agua desionizada pH 7. AL-OVAn (izquierda), AL-OVAn-GA (centro) y AL-OVAn-PAM (derecha). Concentración 2 g/L.

Por otro lado, se realizó la resuspensión en medio acuoso a pH 7 directamente, para lo cual se utilizó buffer fosfato 50 mM, y se registró un comportamiento de reconstitución similar al descrito anteriormente. Cabe mencionar que en el caso de los sistemas con PS, era de esperarse que a pH 7 las interacciones repulsivas entre proteína y PS tomaran lugar y produjeran la dispersión del material insoluble.

Como puede notarse en la Fig. 48, el sistema que a simple vista presentó menos formación de material insoluble fue AL-OVAn-PAM, seguido por AL-OVAn y el sistema AL-OVAn-GA fue el que más material insoluble presentó. Es de destacar que en el caso del sistema AL-OVAn-PAM se observó una leve turbidez, lo cual indicaría una dispersabilidad parcial. Por ello, dicho sistema se centrifugó a fin de eliminar el material insoluble y se realizó la determinación de tamaño de partícula. Las distribuciones PSDv y PSDn se muestran en la Fig. 49A y 49B, respectivamente. De acuerdo a la Fig. 49A, se observaron dos poblaciones: una mayoritaria de 77 nm (83% volumen) y otra de 406 nm. El tamaño de 77 nm sería atribuible a las OVAn (sección 4.2.2.7.1), mientras que la población de mayor tamaño correspondería a agregados. Por lo tanto, estos resultados indicarían que hubo una considerable preservación del tamaño de las OVAn al ser liofilizadas con la PAM y luego reconstituida. Además, la población de 77 nm indicaría que las OVAn se encuentran sin asociación con PAM, lo cual es de esperarse debido a la prevalencia de las repulsiones electrostáticas que tomarían lugar entre ellas a pH 7 (sección 4.3.1). Estas características son importantes para el caso en que se desee utilizar AL-OVAn-PAM en sistemas líquidos a pH próximo a la neutralidad, aunque su dispersabilidad debería ser mejorada.

La limitada dispersabilidad de los polvos en medio acuoso podría explicarse considerando la formación de agregados durante la etapa de congelación y posterior secado por liofilización. Normalmente, la formación de agregados proteicos insolubles

durante la liofilización se atribuye a la formación de puentes disulfuro intermoleculares y otras reacciones de entrecruzamiento, como por ejemplo, la formación de ditirosina. Además, generalmente la cantidad de agua que cubre la superficie de la proteína en un estado completamente hidratado es $\sim 0,3$ g/g de proteína, mientras que el contenido de agua de una proteína liofilizada es usualmente menor al 10%. Por lo tanto, el proceso de secado remueve parte del agua de hidratación lo cual puede también inducir cambios conformacionales que promueven la agregación (Wang, 2005).

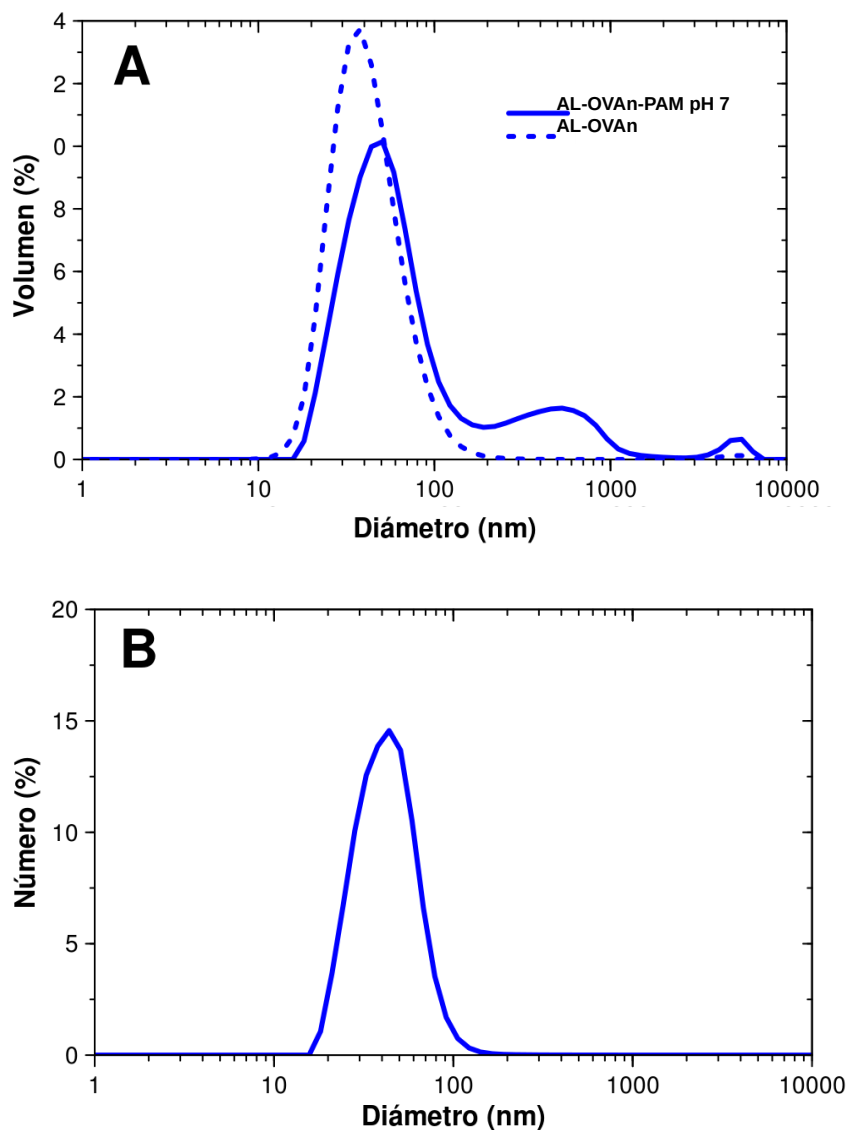


Figura 49. Distribución de tamaño de partícula (**A:** volumen y **B:** número) de AL-OVAn-PAM tras la reconstitución y centrifugación.

Para proteger de la agregación inducida por congelación y deshidratación por liofilización podría plantearse el agregado de agentes crio- y lioprotectores, los cuales suplen los requerimientos de grupos polares de la proteína al eliminarse su agua de hidratación. Además, los crioprotectores pueden aumentar la viscosidad de la dispersión restringiendo la difusión de las moléculas reactivas. Durante el congelamiento, aumenta la concentración de todos los solutos incrementando rápidamente la viscosidad (crioconcentración). Por lo tanto, la velocidad de las reacciones químicas pueden aumentar inicialmente debido a la concentración de solutos pero luego disminuye gradualmente con el aumento de la viscosidad. Por consiguiente la velocidad de las reacciones químicas es minimizada en el estado vítreo (Wang, 2000). De hecho, la formación de un sólido vítreo durante la deshidratación se ha considerado un prerequisite para la estabilización de las proteínas (Wang, 2005). Los crioprotectores aumentan la temperatura de transición vítrea (T_g), permitiendo así la formación de un sólido vítreo con la consecuente mayor estabilidad durante la liofilización (Wang, 2000).

Otro aspecto a considerar es que la rápida reconstitución con agua puede no permitir a la proteína secada hidratarse tan lentamente como lo fue en la etapa de deshidratación, no dando lugar a un adecuado proceso de hidratación, lo cual puede inducir a un fenómeno de agregación. Para reducir este inconveniente, se podría plantear el agregado de agentes redispersantes y/o estabilizantes (Wang, 2000).

Todos estos aspectos serán considerados como parte del trabajo Post-doctoral, ya que escapaban a los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

4.4.4. Estabilidad oxidativa del AL

Los resultados del ensayo de estabilidad oxidativa se presentan en la Fig 50. En el caso del sistema AL-OVAn, se encontró que el AL se mantuvo estable durante los primeros dos días, no registrándose pérdidas por oxidación. Un comportamiento similar se produjo para el sistema AL-OVAn-PAM Sin embargo, para el caso del sistema AL-OVAn-GA se observó un pronunciado descenso en el contenido de AL, perdiéndose ~30% durante el mismo período

Luego del día 2, la estabilidad del AL presentó el siguiente orden: AL-OVAn-PAM > AL-OVAn > AL-OVAn-GA. En el día 13, el sistema AL-OVAn-PAM presentó un deterioro del AL de poco más del 20%, mientras que los sistemas AL-OVAn y AL-OVAn-GA mostraron un deterioro del 70% y 95%, respectivamente. Estos resultados demuestran que la PAM confiere una considerable estabilidad oxidativa al AL, a diferencia de la GA que, por el contrario, parecería promover su deterioro.

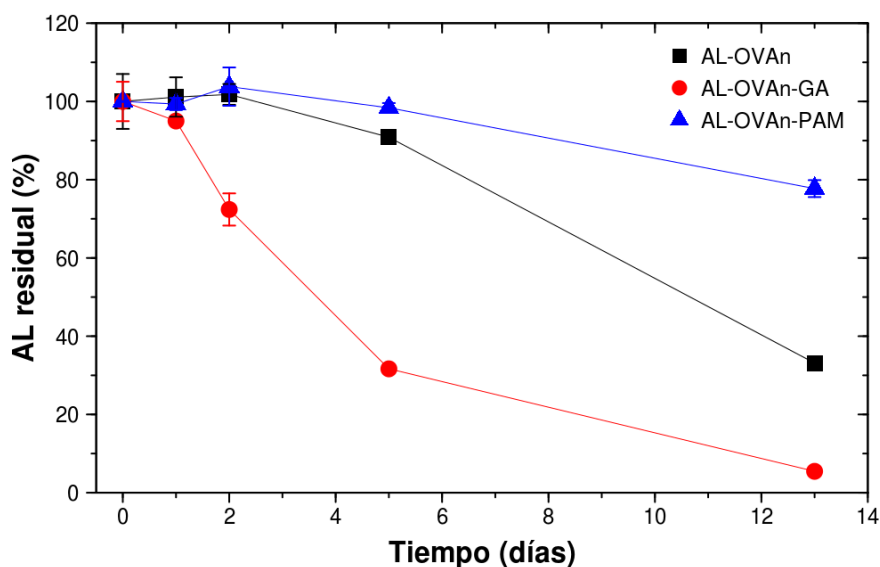


Figura 50. Contenido de AL residual (como porcentaje del AL total inicial) presente en los sistemas AL-OVAn sin y con PS en polvo en función del tiempo de almacenamiento a 40°C.

Es importante mencionar que, considerando los elevados valores de EE encontrados para los sistemas AL-OVAn-PS respecto al sistema sin PS, cabría esperar un mayor efecto protector del PS frente al deterioro del AL con respecto a AL-OVAn. Sin embargo, este comportamiento sólo se verificó para el sistema con PAM y no para la GA, lo cual induciría a pensar que el AL encapsulado en dicho sistema en realidad no estaría mucho más protegido que aquél presente en el sistema sin PS. Es decir, que si bien la GA confiere una mayor inaccesibilidad del AL durante su extracción con hexano (Tabla 6), no conferiría inaccesibilidad al oxígeno durante el almacenamiento, que junto con la temperatura constituyeron los factores de deterioro del AL en este ensayo.

Cabe mencionar también que, en todos los sistemas estudiados, los valores de CC son relativamente bajos por lo que su utilización implicaría el uso de cantidades relativamente grandes de polvo para alcanzar una concentración apropiada de AL en una matriz alimenticia. Esto puede incidir también sobre cuestiones tecnológicas.

Por último, en relación a la prevención de la oxidación del AL puede plantearse el uso de antioxidantes durante el proceso de producción del polvo. Este aspecto, junto con el uso de PAM contribuiría a la estabilización del AL por un periodo más prolongado.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En primer lugar, los resultados arrojados por el trabajo de la presente tesis doctoral permitieron evaluar la aptitud de la OVA y OVAn como nanovehículos para la encapsulación de AL. Particularmente, se demostró que es posible obtener nanopartículas de OVA por medio de tratamiento térmico. Además, se encontró que la capacidad de ligar AL de las OVAn, a través de la formación de complejos, fue considerablemente mayor que la de OVA nativa. Esto se explicó por la exposición de los grupos hidrofóbicos ocultos en la estructura globular de la proteína.

Por otro lado, se encontró que condiciones del tratamiento térmico como tiempo, y temperatura permiten regular características de las OVAn como el tamaño, hidrofobicidad superficial y capacidad de ligar AL.

También se encontró que la formación de complejos AL-OVAn responde a un mecanismo de adsorción física que toma lugar a partir de interacciones hidrofóbicas entre la proteína y el ligando. En este proceso el ligando no solo se uniría a los sitios hidrofóbicos superficiales sino también a los internos “rellenando” la nanopartícula.

Respecto a la interacción de las OVAn con los PS evaluados (GA y PAM), se encontró que a $\text{pH} < 6,0$ la OVAn precipita en igual cantidad independientemente del PS usado y su concentración. A partir de estos resultados se plantearon la separación de fases asociativa o coacervación compleja como una etapa para la concentración de AL-OVAn, previo a su obtención como ingrediente funcional en polvo. Además, esto sugiere la idea de que podría encontrar aplicaciones en alimentos sólidos. Es de destacar también la fuerte correlación lineal encontrada entre la cantidad de PS en el pellet y la turbidez inicial del sistema. Cabe mencionar que la GA, al tener una menor densidad de carga, se unió a las OVAn en una mayor proporción respecto a la PAM.

En lo que respecta a la obtención de los sistemas AL-OVAn-PS en polvo, se encontró que la presencia de PS contribuyó sustancialmente en la eficiencia de encapsulación y en el rendimiento de encapsulación. Además se encontró que PAM confiere una mejor dispersibilidad en medio acuoso y una mayor estabilidad del AL frente al deterioro oxidativo que la GA, respecto al sistema sin PS. Estos resultados indican la aptitud de la PAM para el desarrollo de nanopartículas biopoliméricas junto con OVAn para la encapsulación de PUFAs.

6. APÉNDICE

6. APÉNDICE

6.1. Lista de símbolos y abreviaturas

[L]	Concentración de ligando.
[P]	Concentración de proteína.
ΔG^0	Cambio de energía libre estándar.
ΔH^0	Cambio de entalpía estándar.
ΔS^0	Cambio de entropía estándar.
AFM	Microscopía de fuerza atómica.
AL	Ácido linoleico.
ALA	Ácido α -linolénico.
AL _E	Contenido de AL encapsulado en el polvo (%).
AL _L	Contenido de AL libre en el polvo (%).
AL _{NO}	ÁL no oxidado.
AL _T	Contenido de AL total en el polvo (%).
ANS	Ácido 1-anilino naftalen 8-sulfónico.
AO	Ácido oleico.
BLG	β -lactoglobulina.
BSA	Álbumina sérica bovina.
CC	Capacidad de carga de AL.
C _e	Concentración del AL en el equilibrio de formación de los complejos AL-OVAn.
CLA	Ácido linoleico conjugado.
CMC	Concentración micelar crítica.
CV%	Coefficiente de variación.
D	Coefficiente de difusión traslacional.

DHA	Ácido docosahexanoico.
DLS	Dispersión de luz dinámica.
EE	Eficiencia de encapsulación.
F	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en presencia de ligando.
F ₀	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en ausencia de ligando.
F _{ANS}	Pico del espectro de emisión de intensidad de fluorescencia extrínseca.
GA	Goma arábica.
IFR	Intensidad de fluorescencia intrínseca relativa.
IFR-ANS	Intensidad de fluorescencia extrínseca relativa.
K ₀	Constante de equilibrio de los complejos AL-OVAn.
k ₁ y k ₂	Constantes de velocidad de pseudo-primer- y pseudo-segundo orden, respectivamente, correspondientes al modelo de adsorción.
K _a	Constante de asociación de los complejos AL-OVAn.
L/P	Cociente entre la concentración de ligando y la de proteína.
n	Número de sitios de unión al ligando de la proteína o número de moléculas de ligando unidas.
NLC	Vehículos lipídicos nanoestructurados.
OVA	Ovoalbúmina.
OVAn	Nanopartículas de ovoalbúmina.
PAM	Pectina de alto metoxilo.
PdI	Índice de polidispersidad global.
Phe	Fenilalanina.
pI	pH correspondiente al punto isoeléctrico.

pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil.
PS	Polisacárido.
PSD	Distribución de tamaño de partículas.
PS _p	Cantidad de PS en pellet (g PS/g/OVAn)
PUFA	Ácido graso poliinsaturado.
q _e	Moles de AL adsorbidos por mol de OVA en el equilibrio.
RE	Rendimiento de encapsulación.
RS _{OVA_n}	Rendimiento de separación de OVAn
RS _{PS}	Rendimiento de separación de PS.
SH	Grupo sulfhidrilo.
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas.
SS	Enlaces disulfuro.
T	Temperatura.
T _m	Temperatura de desnaturalización térmica.
Trp	Triptofano.
Tyr	Tirosina.
Δλ	Diferencia entre la longitud de onda del pico de emisión de la OVA nativa y la OVAn. También se define como la diferencia entre la longitud de onda del pico de emisión de la OVAn con ligando y la OVAn con ligando.
Δλ _{ANS}	Diferencia entre la longitud de onda del pico de emisión de las OVAn y de la OVA nativa.
λ	Longitud de onda del pico del espectro de emisión de fluorescencia intrínseca.

λ_{ANS} Longitud de onda del pico del espectro de emisión de fluorescencia extrínseca.

6.2. Figura y Tablas

Tabla A1. Valores de índice de polidispersidad (Pdl) de soluciones de OVA tratadas térmicamente.

Tiempo (min)	Temperatura		
	75°C	80°C	85°C
3	0,279 ± 0,023	0,193 ± 0,001	0,195 ± 0,013
5	0,250 ± 0,001	0,196 ± 0,009	0,197 ± 0,006
10	0,261 ± 0,011	0,201 ± 0,009	0,208 ± 0,004
15	0,270 ± 0,006	0,194 ± 0,005	0,208 ± 0,003
20	0,268 ± 0,006	0,202 ± 0,005	0,218 ± 0,013
25	0,267 ± 0,013	0,202 ± 0,002	0,214 ± 0,006

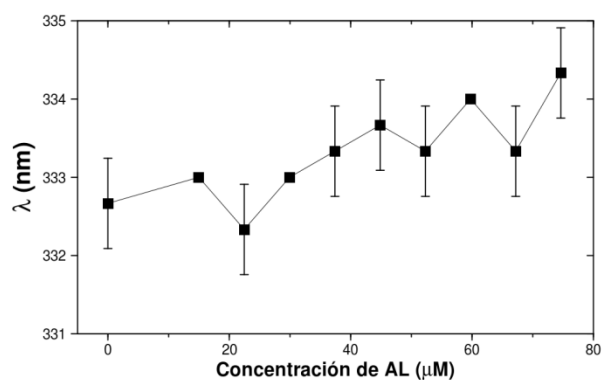


Figura A1. Longitud de onda del pico de emisión en función de la concentración de AL para la OVA nativa.

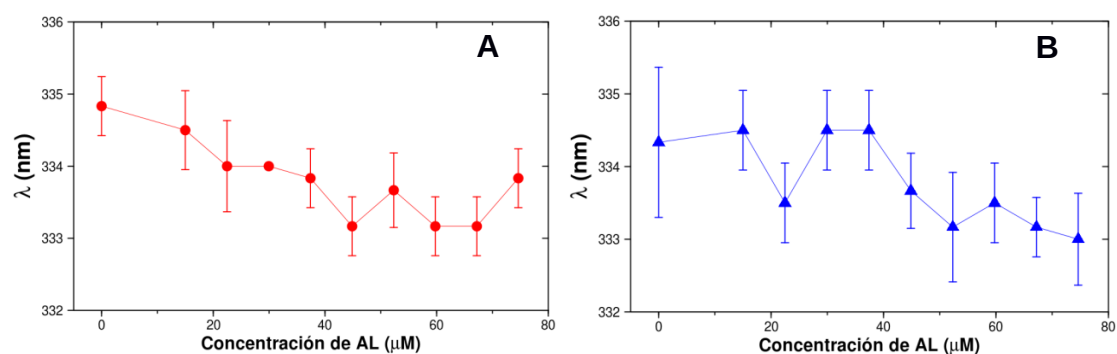


Figura A2. Longitud de onda del pico de emisión en función de la concentración de AL para la OVA calentada a 75°C por 5 (A) y 25 min (B).

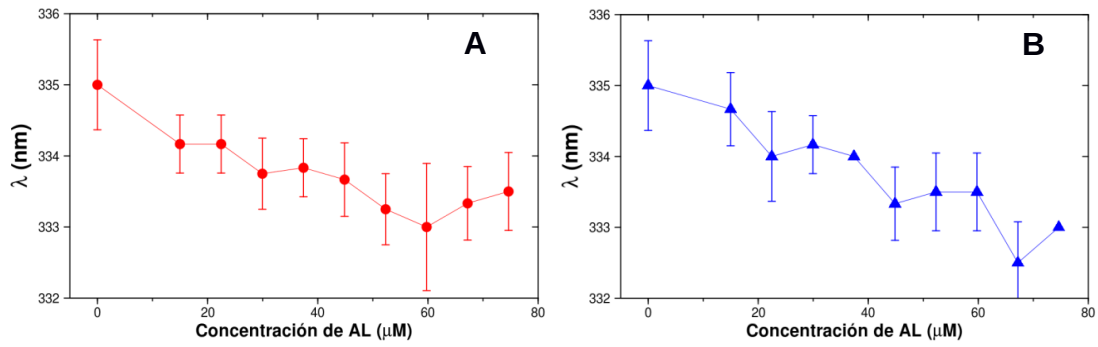


Figura A3. Longitud de onda del pico de emisión en función de la concentración de AL para la OVA calentada a 80°C por 5 (A) y 25 min (B).

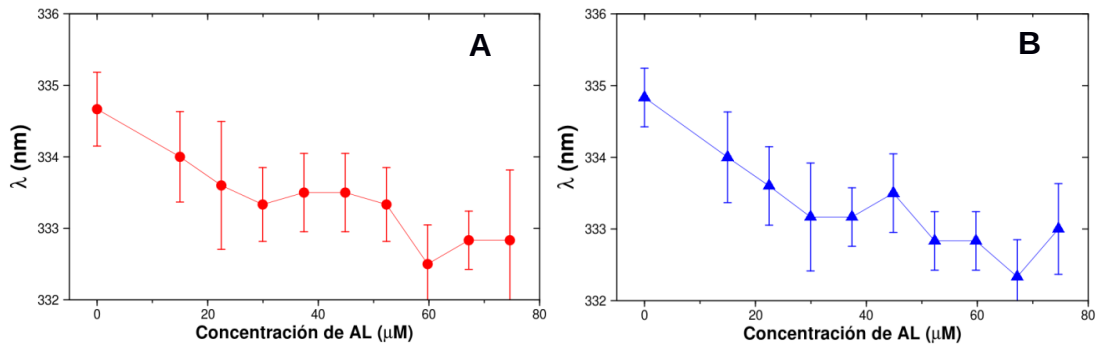


Figura A4. Longitud de onda del pico de emisión en función de la concentración de AL para la OVA calentada a 80°C por 5 (A) y 25 min (B).

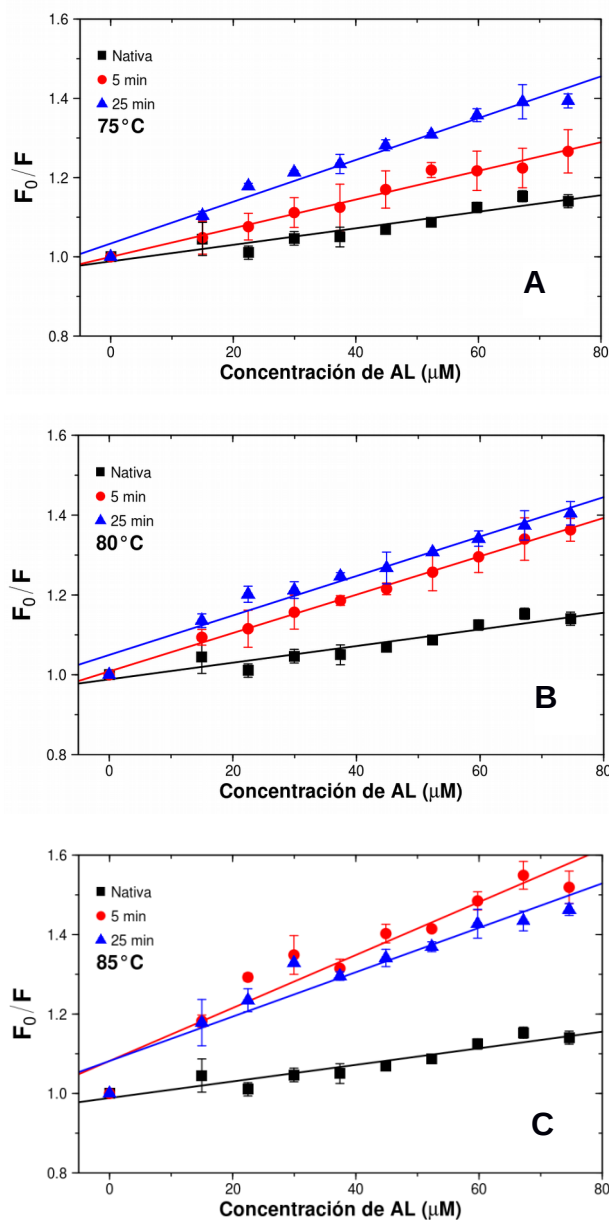


Figura A5. F_0/F en función de la concentración de AL para la obtención de K_a por regresión lineal de acuerdo al modelo de Stern-Volmer (Ec.3) de OVA_n obtenidas a: **A:** 75°C ; **B:** 80°C ; **C:** 85°C .

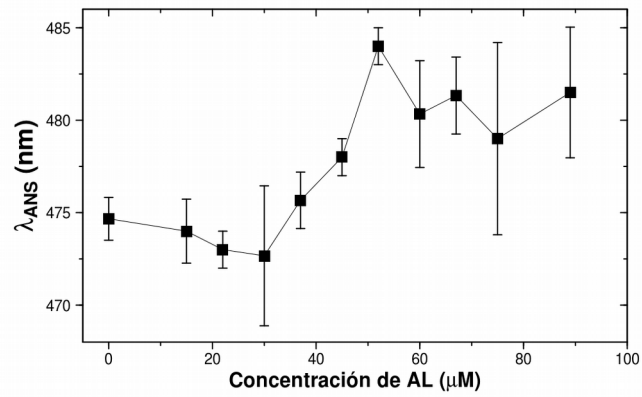


Figura A6. Longitud de onda del pico de emisión de fluorescencia extrínseca de OVA en presencia de concentraciones crecientes de AL.

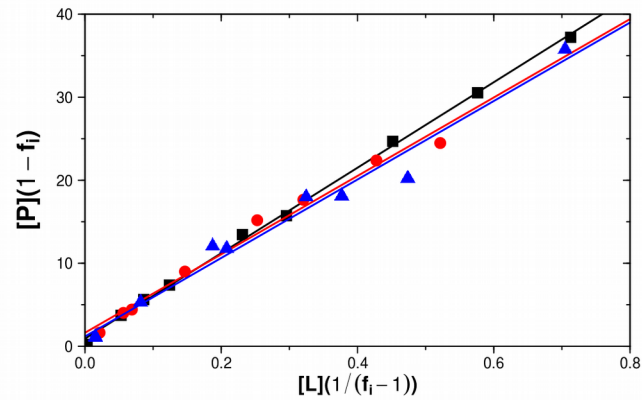


Figura A7. Ajustes de los datos de fluorescencia extrínseca al modelo de Scatchard Modificado. Se muestran los ajustes de tres réplicas.

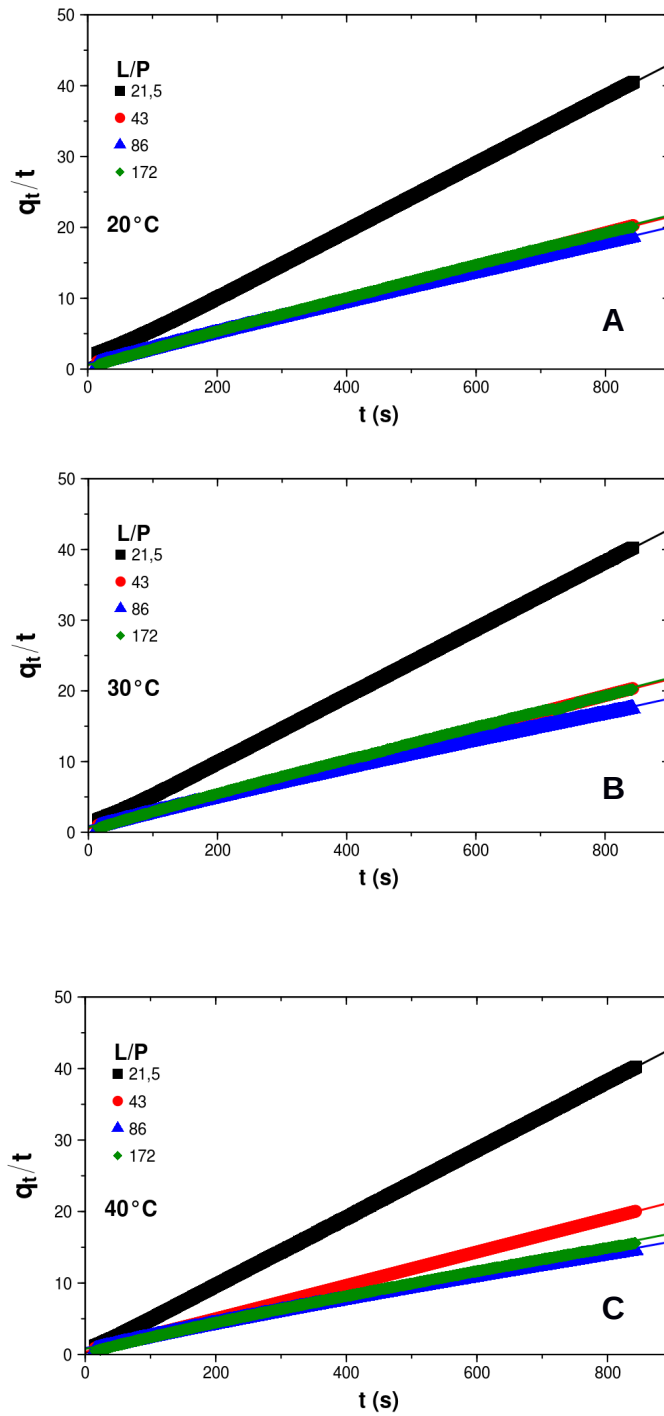


Figura A8. Ajuste de los datos experimentales al modelo cinético de pseudo-segundo orden linealizado (Ec. 7) a:

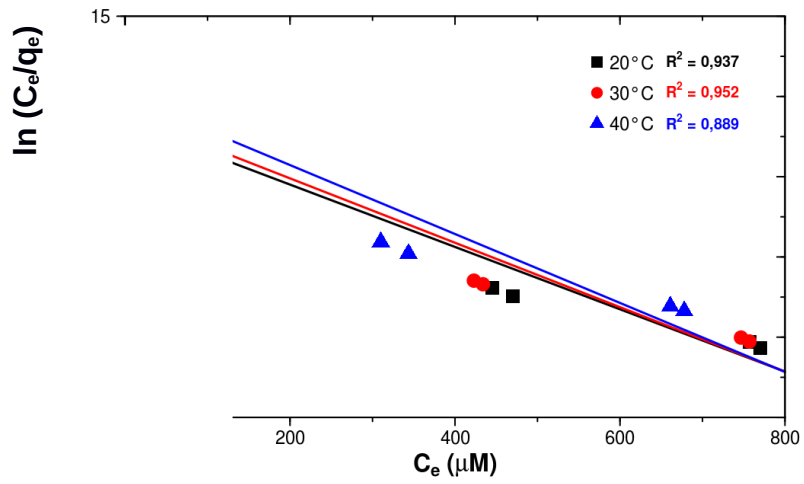


Figura A9. $\ln(C_e/q_e)$ versus C_e para diferentes temperaturas.

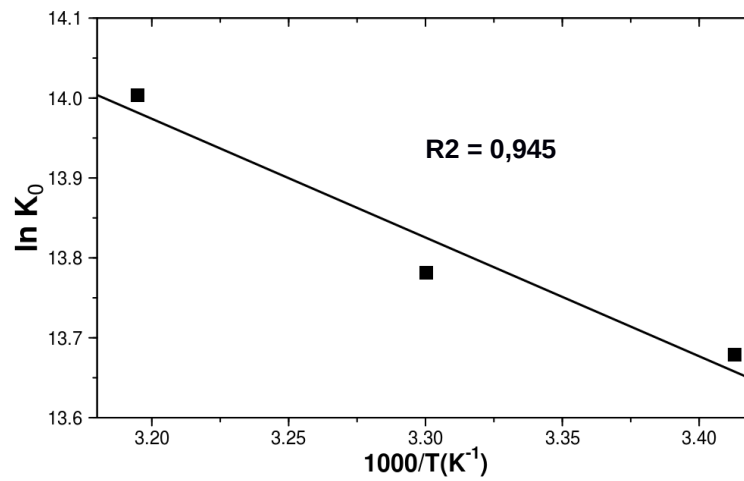


Figura A10. $\ln K_0$ versus $1/T$.

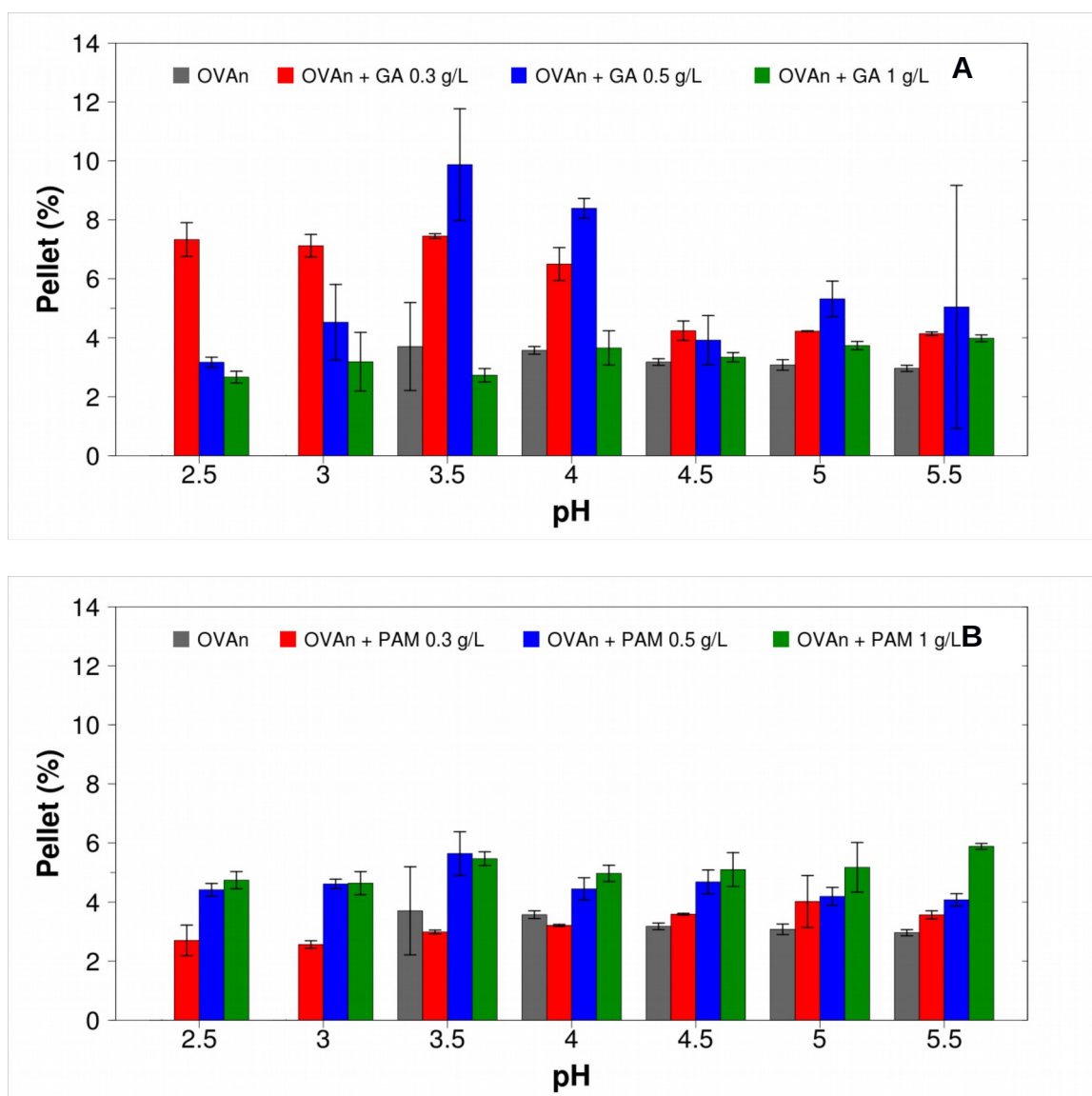


Figura A11. Porcentaje de pellet tras la centrifugación (5000 g, 15 min) en los sistemas OVA-GA (A) y OVA-PAM (B).

REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- Agilent Technologies, Inc. HPLC Basics. Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC). .
- Akoh, C. C., Min, D. B. (2002). Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology (2nd ed). New York: Marcel Dekker Inc., (Chapter 3).
- Albani, J. R. (2004). Structure a dynamics of macromolecules: Absorption and fluorescence studies, Paris: Elsevier, (Chapters 2 y 3).
- Arzeni, C., Pérez, O. E., y Pilosof, A. M. R. (2015). Power Ultrasound Assisted Design of Egg Albumin Nanoparticles. *Food Biophysics*, 10 (4), 439-446.
- Arzenšek, D, Podgornik, R., Kuzman, D. (2010). Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. Faculty of Mathematics and Physics. University of Ljubljana.
- , , (2016). . , 7 (17), 23322-23334.
- Bowman, D. M. (2007). Patently obvious: Intellectual property rights and nanotechnology. *Technology in Society*, 29, 307–315.
- Bryant, C. M., y McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science y Technology*, 9, 143-151.
- Carvalho, F. A. O., Carvalho, J. W. P., Alves, F. R., Tabak, M. (2013). pH effect upon HbGp oligomeric stability: characterization of the dissociated species by AUC and DLS studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 333-341.
- Chen, I.A., Szostak, J.W. (2004). A Kinetic Study of the Growth of Fatty Acid Vesicles. *Biophysical Journal*, 87, 988–998.

-
- Chen, T., Zhu, S., Cao, H., Shang, Y., Wang, M., Jiang, G., Shi, Y., Lu, T. (2011). Studies on the interaction of salvianolic acid B with human hemoglobin by multi-spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part A*, 78, 1295–1301.
- Croguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., Brule, G. (2000). Simple Rapid Procedure for Preparation of Large Quantities of Ovalbumin. *J. Agric. Food Chem*, 48, 4883-4889.
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J., y Pezennec, S. (2007). Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 315, 627-636.
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., Cummins, E., (2012). Nanotechnologies in the food industry - Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science y Technology*, 24, 30-46.
- , Bhattacharjee, S., , Das, R., , (2009). . , 66, 353-361.
- David, S., Zagury, Y., Livney, Y. D. (2015). Soy β -Conglycinin–Curcumin Nanocomplexes for Enrichment of Clear Beverages. , 5, 10, 2, 195–206.
- Davidov-Pardo, G., Joye, I.J., McClements, D.J. (2015). Food-Grade Protein-Based Nanoparticles and Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 98, 293-325.
- Dergal, S.B. (1999). *Química de los alimentos*. México: Editorial Alhambra Mexicana. Capítulos 2 y 4.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. Y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356.
- European Comission-a. Definition of a nanomaterial. (). Consultado el 13/05/2016.

-
- European Comission-b. Questions and Answers on the Commission Recommendation on the definition of Nanomaterial. (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/questions_answers_en.htm#8). Consultado el 20/01/2016.
- Fathi, M., Mozafari, M.R., Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science y Technology*, 23, 13-27.
- Fennema, O. R. (1996). *Food chemistry* (3rd ed.). New York: Marcel Dekker Inc. (Chapter 3).
- Fioramonti, S.A., Perez, A.A., Aringoli, E., Rubiolo, A.C., y Santiago, L.G. (2014). “Design and Characterization of Soluble Biopolymer Complexes Produced by Electrostatic Self-Assembly of a Whey Protein Isolate and Sodium Alginate”. *Food Hydrocolloids* 35, 129-136.
- Fontana, A., Spolaore, B., Polverino de Laureto, P. (2013). The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 1125-1143.
- Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A., y Dickinson, E. (1999). Interactions of ovalbumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high pressure treatment. *Food Hydrocolloids*,13, 81–88.
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M.C, Bernhardt, D, Blasco, R., Pedroza-Islas, R., Hermida, L.G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52 (2), 473-482.
- García Arellano, H, Vasquez Duhalt, R. (1998). Cuantificación de proteínas: Una revisión. *BioTecnología*, vol 3, 77-88.

-
- García, A. I., Sánchez-Rojas, J. (1985). Determinación de proteínas en hojas de Citrus. I. Métodos e interferencias.
- Ghosh, A. K., Bandyopadhyay, P. (2012). Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. En D. N. Karunaratne (Ed.). *The Complex World of Polysaccharides* pp. 395-406. InTech.
- Gill, S.C., y von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182 (2), 319-326.
- Giosafatto, C. V. L., Rigby, N. M., Wellner, N., Ridout, M., Husband, F., y Mackie, A. R. (2012). Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. *Food Hydrocolloids*, 26, 261-267.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, 276–290.
- Gonzalez, W.G., Miksovska, J.(2014). Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM. *Biochim. Biophys. Acta*, 1844, 1472–1480.
- Gutiérrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., García-Estrada, C., García-Guerra, A., y col. (2013). Methods for the nanoencapsulation of b-carotene in the food sector. *Trends in Food Science y Technology*, 32, 73-83.
- Grenha, A., Gomes, M.E., Rodrigues, M., Santo, V.E., Mano, J.F., Neves, N.M, Reis, R.L. (2009). Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1265–1272.
- Griego, E., Jait, A., Yañez, D. (2016). El futuro de las nanociencias y las nanotecnologías en Argentina. Estudio de prospectiva y vigilancia tecnológica. Dirección Nacional de Estudios. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación

-
- Productiva de la República Argentina
(<http://www.mincyt.gob.ar/adjuntos/archivos/000/046/0000046947.pdf>)
- Fathi, M., Mozafari, M.R, Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science y Technology*, 23, 13-27.
- Fontana, A., Spolaore, B., & Polverino de Laureto, P. (2013). The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834, 1125-1143.
- Guichard, E., Langourieux, S. (2000). Interactions between b-lactoglobulin and flavour compounds. *Food Chemistry*, 71, 301-308.
- Gutiérrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., García-Estrada, C., García-Guerra, A., y col. (2013). Methods for the nanoencapsulation of b-carotene in the food sector. *Trends in Food Science y Technology*, 32, 73-83.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422-427.
- Huntington, J.A., Stein, P.E. (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B*, 756, 189–198.
- Ilyasoglu, H., El, S. H. (2014). Nanoencapsulation of EPA/DHA with sodium caseinate-gum arabic complex and its usage in the enrichment of fruit juice. *Food Science and Technology*, 56, 461-468.
- Joye I.J., Davidov-Pardo G. and McClements D.J. (2016) Nanotechnology in Food Processing. In: Caballero, B., Finglas, P., and Toldrá, F. (eds.) *The Encyclopedia of Food and Health* vol. 4, pp. 49-55. Oxford: Academic Press.

-
- Joye, I.J., Davidov-Pardo, G., Ludescher, R.D., McClements, D.J. (2015). Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. *Food Chemistry*, 185, 261–267.
- Joye, I.J., McClements, D.J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid y Interface Science*, 19, 417–427.
- Kamilya, T., Pal, P., Talapatra, G.B. (2007). Interaction and incorporation of ovalbumin with stearic acid monolayer: Langmuir–Blodgett film formation and deposition. *Colloids Surf. B*, 58, 137–144.
- , (2014). Interactions between sodium oleate and α -lactalbumin: The effect of temperature and concentration on complex formation. *Food Hydrocolloids*, 34, 217-226.
- Khan, A. A., y Singh, R. P. (1987). Adsorption thermodynamics of carbofuran on Sn (IV) arsenosilicate in H + , Na + and Ca 2+ forms. *Colloids and Surfaces*, 24, 33–42.
- King, A.J., Ball, H.R., JR., Catignani, G.L., Swaisgood, H.E. (1989). Modification of Egg White Proteins with Oleic Acid. *Journal of Food Science*, 54, 6, 1639-1641.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition. Singapore (USA): Springer. Chapter 8.
- Lange, D.C., Kothari, R., Patel, R.C., Patel, S.C. (1998). Retinol and retinoic acid bind to a surface cleft in bovine b-lactoglobulin: a method of binding site determination using fluorescence resonance energy transfer. *Biophysical Chemistry*, 74, 45-51.

-
- Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., y Croguennec, T. (2013). Complexes between linoleate and native or aggregated β -lactoglobulin: interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. *Food Chemistry*, 141, 2305–2313.
- Li, Z., Gu, T., Kelder, B., Kopchick, J. J. (2001). Analysis of fatty acids in mouse cells using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 54(7/8), 463–467.
- Liu, X., y Zhang, L. (2015). Removal of phosphate anions using the modified chitosan beads: Adsorption kinetic, isotherm and mechanism studies. *Powder Technology*, 277, 112–119.
- Livney, Y. D. (2008). Complexes and conjugates of biopolymers for delivery of bioactive ingredients via food. En N. Garti (Ed.), *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals* (1st ed., pp. 234–250). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- (2012). . En , (Eds.). , (pp. 252-286). Elsevier.
- López Zerpa, D. R. (2008). Ornitofrugivoría EN *Stenocereus griseus* y *Subpilocereus repandus* (Cactaceae) en un arbustal xerófilo litoral del Noreste de la Península de Araya, Estado Sucre, Venezuela. Universidad de Oriente, Venezuela.
- Malvern Instruments Ltd. (2014) . Zeta potential - An introduction in 30 minutes (technical note)..
- Malvern Instruments Ltd.-a. Dynamic Light Scattering, Basic Theory y Practical Application (Zetasizer Nano application note).
- Malvern Instruments Ltd.-b. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes (technical note).

-
- <http://www.malvern.com/es/pdf/secure/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.pdf>
- Malvern Instruments Ltd.-c. Intensity-Volume-Number: Which size is correct? (). Consultado el 22/03/2016.
- Malvern Instruments Ltd.-d. Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography? (). Consultado el 22/03/2016.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79, 727– 47.
- Matalanis, A., Jones, O.G., McClements, D.J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25 (8), 1865-1880.
- Matsudomi, N., Takahashi, H., y Miyata, T. (2001). Some structural properties of ovalbumin heated at 80°C in the dry state. *Food Research International*, 34, (2–3), 229-235.
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24, 621–625.
- McClements, D. J., Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159, 213–228.
- Mironov, V. L. (2004). Fundamentals of scanning probe microscopy. The Russian Academy of Sciences Institute for Physics of Microstructures.
- Muench, J. L., Kruuv, J., y Lepock, J. R. (1996). A two-step reversible-irreversible model can account for a negative activation energy in an Arrhenius plot. *Cryobiology*, 33, 253–259.

-
- Niidome, 2014 Application note: The Use of Light Scattering to Study the Structure and charge of Dendritic Poly(l-Lysine), http://www.malvern.com/en/pdf/secure/AN101104ChargeDendritic_Poly_L_Lysine_.pdf (accessed 11.12.14).
- Nobbmann, U. (2014). FAQ: Peak size or z-average size – which one to pick in DLS? ().
- Nobbmann, U. What are "Z-average", "polydispersity index" and "size distribution by intensity"? (). Consultado el 22/03/2016.
- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Jardin, J., Rutherford, S. M., y Nau, F. (2014). The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. *Food Chemistry*, 157, 429–438.
- Perez, A. A., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J., Rubiolo, A., Santiago, L. G. (2012). Effect of enzymatic hydrolysis and polysaccharide addition on the lactoglobulin adsorption at the air–water interface. *Journal of Food Engineering*, 109(4), 712–720.
- Perez, A. A., Andermatten, R. B., Rubiolo, A. C., Santiago, L. G. (2014). Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 158, 66–72.
- Perez, A. A., Sponton, O. E., Andermatten, R. B., Rubiolo, A. C., Santiago, L. G. (2015). Biopolymer nanoparticles designed for polyunsaturated fatty acid vehiculization: Protein–polysaccharide ratio study. *Food Chemistry*, 188, 543–550.
- Rajendran, S. R. C. K., Udenigwe, C. C., Yada, R. Y. (2016). Nanochemistry of Protein-Based Delivery Agents. *Frontiers in Chemistry*, 4, 31, 1-9.

, , (2016). . , 13, 76-83.

Robles-García, M.A., Rodríguez-Félix, F., Márquez-Ríos, E., Aguilar, J.A., Barrera-

Rodríguez, A., Aguilar, J., Ruiz-Cruz, S., Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016).

Applications of Nanotechnology in the Agriculture, Food, and Pharmaceuticals.

Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 16, 8188–8207.

Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A., Millington, K. J. (2004). The health

benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. J

Hum Nutr Dietet, 17, 449–459.

Sánchez-Gimeno, A.C., Vercet, A., López-Buesa, P. (2006). Studies of ovalbumin

gelation in the presence of carrageenans and after manothermosonication

treatments. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 7, 270 – 274.

Sanguansri, L., y Augustin, M. A. (2010). Microencapsulation in functional food

product development. In J. Smith, y E. Charter (Eds.), Functional food product

development (pp. 1-23). Newfoundland: Wiley-Blackwell.

Santos, H. A., Manzanares, J. A., Murtomäki, L., y Kontturi, K. (2007). Thermodynamic

analysis of binding between drugs and glycosaminoglycans by isothermal

titration calorimetry and fluorescence spectroscopy. European Journal of

Pharmaceutical Sciences, 3(2), 105–114.

Schalley, C. (2007). Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. WILEY-VCH

Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim. (Capítulo 10).

Serth, J., Lautwein, A., Frech, M., Wittinghofer, A., Pingoud, A. (1991). The inhibition

of the GTPase activating protein–Ha-ras interaction by acidic lipids is due to

physical association of the C-terminal domain of the GTPase activating protein

with micellar structures. EMBO Journal, 10(6), 1325–1330.

- Shapira, A., Assaraf, Y. G., Epstein, D., Livney, Y. D. (2010). Beta-casein Nanoparticles as an Oral Delivery System for Chemotherapeutic Drugs: Impact of Drug Structure and Properties on Co-assembly. *Pharm Res*, 27, 2175–2186.
- Sharma, P., y Das, M. R., (2013). Removal of a Cationic Dye from Aqueous Solution Using Graphene Oxide Nanosheets: Investigation of Adsorption Parameters. *J. Chem. Eng. Data*, 58 (1), 151–158.
- Shaw, R. ATA Scientific-Malvern Instruments Ltd. Dynamic Light Scattering Training, Achieving reliable nano particle sizing. (). Consultado el 18/05/2016.
- , , , (...), , (2005). . *Biochimica et Biophysica Acta* 1723, 106 – 113.
- Shpigelman, A., Israeli, G., Livney, Y. (2010). Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, 24, 735-743.
- Shpigelman, A., Shoham, Y., Israeli-Lev, G., Livney, Y.D. (2014). β -Lactoglobulin-naringenin complexes: Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. *Food Hydrocolloids*, 40, 214-224.
- Sozer, N., Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27, 2, 82-89.
- Sperber, B. L. H. M., Schols, H. A., Cohen Stuart, M. A., Norde, W., Voragen, A. G. J. (2009). Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and b-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 23, 765–772.
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C. R., Santiago, L. G. (2015). Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids*, 48,165–173.

- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19 (2013) 29–43
- Tan, C., Xie, J., Zhang, X., Cai, J., Xia, S. (2016). Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. *Food Hydrocolloids*, 57, 236-245.
- van de Weert, M., y Stella, L. (2011). Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, 998, 144–150.
- Wang, Q., Allen, J. C., Swaisgood, H. E. (1999). Binding of lipophilic nutrients to β -lactoglobulin prepared by bioselective adsorption. *Journal of Dairy Science*, 82, 257–264.
- Wang, R., Yin, Y., Li, H., Wang, Y., Pu, J., Wang, R., Dou, H., Song, C., Wang, R. (2013). Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry. *Molecular Biology Reports*, 40, 3409-3418.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 203, 1–60.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 289 (1-2), 1-30.
- Weijers, M., Barneveld, P. A., Stuart, M. A. C., y Visschers, R. W. (2003). Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin a neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science*, 12, 2693–2703.
- Weijers, M., Sagis, L.M.C., Veerman, C., Sperber, B., van der Linden, E. (2002). Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 16, (3), 269-276.

-
- Weinbreck, F. (2004). Whey protein/gum arabic coacervates: Structure and dynamics (PhD thesis). The Netherlands: Utrecht University. ()
- Weinbreck, F.; de Vries, R.; Schrooyen, P.; de Kruif, C. G. (2003). Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. *Biomacromolecules*, 4 (2), 293-303.
- Weiss, J.N (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *The FASEB Journal*, 11, 11, 835-841.
- Williams, P.A., Philips, G.O., 2000. *Handbook of Hydrocolloids*. New York: CRC Press. Capítulo 9: Goma arábica y Capítulo 10: Pectinas.
- Wolfe, F.H. (1966). A quantitative study on the denaturation of Ovalbumin by shaking (PhD thesis). Graduate Faculty of Texas Technological College (USA).
- Xie, J., Wang, H., Cao, Y., Qin, M., Wang, W. (2015). Photo-synthesis of protein-based nanoparticles and the application in drug delivery. *Annals of Physics*, 358, 225–235.
- Xiong, W., Ren., C., Jin, W., Tian, J., Wang, Y., Shah, B. R., Li, J., Li, B. (2016). Ovalbumin-chitosan complex coacervation: Phase behavior, thermodynamic and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 61, 895-902.
- Yamasaki, M., Takahashi, N., Hirose, M. (2003). Crystal Structure of S-ovalbumin as a Non-loop-inserted Thermostabilized Serpin Form. 278, 37, 35524–35530.
- Yao, C., y Chen, T. (2015). A new simplified method for estimating film mass transfer and surface diffusion coefficients from batch adsorption kinetic data. *Chemical Engineering Journal*, 265, 93–99.
- Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G.K. (2005). Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 4, 298–303.

Zimet, P. y Livney, Y. D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23, 1120-1126.