

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctora en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE NANOCOMPLEJOS QUE VEHICULIZAN COMPUESTOS BIOACTIVOS

Flavia Fátima Visentini

Directora de Tesis: Msc. Liliana G. Santiago

Co-director de Tesis: Dr. Adrián A. Perez

Lugar de realización: Área de Biocoloides- Instituto de
Tecnología de Alimentos- Facultad de Ingeniería Química- UNL

-2019-

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Liliana Santiago por la orientación y guía para el desarrollo de la presente tesis y por su ayuda en aspectos personales.

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

Al financiamiento de los siguientes proyectos:

- PICT-2017-1823 (2018-2021): “Impacto de la matriz alimentaria y la nanoencapsulación sobre la bioaccesibilidad y actividad antidiabética de compuestos bioactivos”. Organismo Financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina (ANPCyT). Investigador Responsable: MSc. Liliana G. Santiago.
- PICT-2014-2636 (2015-2018): “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). Investigador Responsable: MSc. Liliana G. Santiago.
- PIO-CONICET-UNER (2015-2017): “Incorporación de nanopartículas biopoliméricas con actividad antimicrobiana en películas biodegradables”. Organismo Financiador: Consejo Nacional de investigaciones científicas y técnicas (CONICET). Investigador Responsable: Dr. Adrián A. Pérez.
- CAI+D-2013-50120110100-171-LI (2013-2015): “Estrategias de nano y microencapsulación de agentes bioactivos relevantes en salud humana”. Organismo Financiador: Universidad Nacional del Litoral (UNL). Investigador Responsable: MSc. Liliana G. Santiago.

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 (PRELINE) por la adquisición de las imágenes de AFM, su buena predisposición y asesoramiento.

A Hugo Ortega, M. Eugenia Baravalle, Florencia Olmos y M. Sol Renna del Centro de Medicina Comparada (CMC-ICIVET) por los ensayos de citotoxicidad realizados y la colaboración entre los grupos.

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 la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por la formación de posgrado.

A mis compañeros de laboratorio Osvaldo, Laura, Joana, Marianela, Martin por toda la ayuda brindada, su buena predisposición y los innumerables momentos compartidos.

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

A Andrea, Laura, Dafne, Maggi, Macarena, Nacho, Matías, Jarmo, Vicky, Agustín, por estar siempre presentes en los difíciles momentos que la vida me puso adelante.

A Marina, Nicolas, María, Diego y Rodrigo por permitirme disfrutar de sus pequeños y compartir la rutina de la vida.

A mi familia, a mis amigos del ITA y de la vida por los momentos laborales y extralaborales compartidos.

A Franco, Alan, Flor por los momentos de risas y llantos siempre juntos y a Diego y Juanfra porque la vida nos vuelva a encontrar...

A mis padres Alejandra y Miguel, por estar siempre presentes, por los principios de trabajo y de vida que me han inculcado y por nunca dejarme bajar los brazos.

A mi compañero de vida Cesar, por ser parte de esta etapa de mi vida, por su ayuda y por alentarme en todo momento a seguir hacia adelante.

PUBLICACIONES

- Visentini, F. F., Ferrado, J. B., Perez, A. A. y Santiago L. G. (2019). Simulated gastrointestinal digestion of inclusion complexes based on ovalbumin nanoparticles and conjugated linoleic acid. *Food and Function*, 10 (5), 2630-2641.
- Visentini, F. F., Perez, A. A. y Santiago L. G. (2019). Self-assembled nanoparticles from heat treated ovalbumin as nanocarriers for polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 93, 242-252.
- Visentini, F. F., Sponton, O. E., Perez, A. A. y Santiago, L. G (2017). Biopolymer nanoparticles for vehiculization and photochemical stability preservation of retinol. *Food Hydrocolloids*, 70, 363-370.
- Visentini, F. F.; Sponton, O. E.; Perez, A. A. y Santiago L. G. (2017). Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. *Food Hydrocolloids*, 130–138.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Nanotecnología y su aplicación en alimentos.....	12
1.2. Nanoencapsulación aplicada a alimentos	13
1.3. Nanopartículas para la encapsulación de compuestos bioactivos hidrofóbicos.....	14
1.4. Métodos de producción de nanopartículas	16
1.5. Caracterización de nanopartículas	21
1.6. Materiales utilizados para la producción de nanopartículas para alimentos.....	23
1.7. Proteínas	24
1.8. Ovoalbúmina: características generales.....	25
1.9. Antecedentes de desnaturalización y agregación térmica de ovoalbúmina	26
1.10. Compuestos bioactivos.....	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo general	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. CAPÍTULO 1	35
3.1. INTRODUCCIÓN	36
3.1.1. Vitaminas.....	36
3.1.2. Vitamina A o retinol: características generales y función biológica.....	36
3.1.3. Metabolismo de retinol.....	38
3.1.4. Encapsulación de retinol.....	41
3.2. OBJETIVOS.....	42
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.3.1. Materiales.....	43
3.3.2. Formación de nanopartículas de ovoalbúmina y sus nanocomplejos con retinol.....	43
3.3.2.1. Formación de nanopartículas de OVA	43
3.3.2.2. Formación de nanocomplejos proteína-RET	44
3.3.3. Caracterización de nanopartículas de ovoalbúmina y de sus nanocomplejos con retinol.....	44
3.3.3.1. Estudio de interacción proteína-RET por espectroscopía de fluorescencia	44
3.3.3.1.1. Principios de fluorescencia	44
3.3.3.1.2. Determinación de la interacción proteína-RET por fluorescencia intrínseca.....	47
3.3.3.1.3. Determinación de la interacción proteína-RET por fluorescencia extrínseca.....	48
3.3.3.2. Estudio de estabilidad coloidal de proteínas	49
3.3.3.2.1. Determinación de tamaño de partículas por dispersión dinámica de luz	49
3.3.3.2.2. Determinación de la carga eléctrica superficial por medidas de potencial ζ	53
3.3.4. Ensayo de estabilidad fotoquímica de retinol	56
3.3.5. Determinación de oxígeno disuelto.....	57
3.3.6. Análisis estadístico	57
3.4. RESULTADOS	58
3.4.1. Formación de nanocomplejos proteína-retinol.....	58
3.4.1.1. Fluorescencia intrínseca.....	58
3.4.1.2. Fluorescencia extrínseca.....	60
3.4.2. Estudio de estabilidad coloidal.....	62
3.4.2.1. Proteínas.....	62
3.4.2.2. Nanocomplejos de inclusión proteína-RET.....	64

3.4.3. Estabilidad fotoquímica de retinol.....	66
3.5. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	68
4. CAPÍTULO 2.....	70
4.1. INTRODUCCIÓN.....	71
4.1.1. Polisacáridos y sus partículas biopoliméricas.....	71
4.1.2. Pectina de alto metoxilo.....	72
4.1.3. Interacciones proteína-polisacárido.....	73
4.1.4. Formación de nanopartículas biopoliméricas para encapsulación de compuestos hidrofóbicos.....	76
4.2. OBJETIVOS.....	78
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
4.3.1. Materiales.....	78
4.3.2. Formación de nanopartículas biopoliméricas.....	79
4.3.2.1. Obtención del nanocomplejo OVA _{n2} -RET.....	79
4.3.2.2. Obtención de la NPB OVA _{n2} -RET-PAM.....	79
4.3.3. Comportamiento de fase.....	79
4.3.4. Determinación de tamaño y potencial ζ	80
4.3.5. Ensayo de estabilidad fotoquímica de retinol.....	80
4.3.6. Determinación de oxígeno disuelto.....	80
4.3.7. Análisis estadístico.....	81
4.4. RESULTADOS.....	81
4.4.1. Comportamiento de fase de sistemas mixtos de biopolímero.....	81
4.4.2. Distribución de tamaño y potencial ζ de NPB para la vehiculización de retinol.....	83
4.4.3. Estabilidad fotoquímica de retinol.....	88
4.5. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	91
5. CAPÍTULO 3.....	92
5.1. INTRODUCCIÓN.....	93
5.1.1. Ácidos grasos poliinsaturados.....	93
5.1.2. Deterioro de los ácidos grasos poliinsaturados.....	94
5.1.3. Características del ácido linoleico y del ácido linoleico conjugado.....	96
5.1.4. Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados y del ácido linoleico conjugado.....	97
5.1.5. Antecedentes de encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados.....	99
5.2. OBJETIVOS.....	101
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	101
5.3.1. Materiales.....	101
5.3.2. Producción y caracterización fisicoquímica y morfológica de las nanopartículas de ovoalbúmina.....	101
5.3.2.1. Producción de nanopartículas de OVA.....	101
5.3.2.2. Características fisicoquímicas y morfológicas de nanopartículas de OVA.....	102
5.3.2.2.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas y SDS-PAGE.....	102
5.3.2.2.2. Distribución de tamaño y potencial ζ	103
5.3.2.2.3. Microscopía de fuerza atómica.....	103
5.3.2.2.4. Fluorescencia intrínseca y extrínseca.....	104
5.3.3. Formación y caracterización de nanocomplejos proteína-ácidos grasos poliinsaturados.....	105
5.3.3.1. Formación de nanocomplejos proteína-PUFA.....	105
5.3.3.2. Caracterización de nanocomplejos proteína-PUFA.....	105
5.3.3.2.1. Distribución del tamaño y potencial ζ	105
5.3.3.2.2. Microscopía de fuerza atómica.....	105
5.3.3.2.3. Fluorescencia intrínseca.....	106
5.3.3.2.4. Fluorescencia extrínseca.....	106
5.3.3.3. Ensayos de turbidez.....	107

5.3.4. <i>Análisis estadístico</i>	107
5.4. RESULTADOS	107
5.4.1. <i>Características fisicoquímicas y morfológicas de nanopartículas de ovoalbúmina</i> . 107	
5.4.1.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas y SDS-PAGE.....	107
5.4.1.2. Distribución de tamaño y potencial ζ	109
5.4.1.3. Microscopía de fuerza atómica.....	110
5.4.1.4. Fluorescencia intrínseca y extrínseca	111
5.4.2. <i>Formación y caracterización de nanocomplejos proteína-ácidos grasos poliinsaturados</i>	112
5.4.2.1. Distribución de tamaño y potencial ζ	112
5.4.2.2. Microscopía de fuerza atómica.....	115
5.4.2.3. Fluorescencia intrínseca.....	117
5.4.2.4. Fluorescencia extrínseca.....	120
5.4.3. <i>Ensayo de turbidez</i>	122
5.5. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	124
6. CAPÍTULO 4	125
6.1. INTRODUCCIÓN	126
6.1.1. <i>Alimentos funcionales</i>	126
6.1.2. <i>Tracto digestivo humano</i>	126
6.1.3. <i>Modelos de digestión gastrointestinal in vitro</i>	130
6.1.4. <i>Antecedentes de digestión in vitro de ovoalbúmina y sus agregados por tratamiento térmico</i>	132
6.2. OBJETIVOS.....	134
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS	134
6.3.1. <i>Materiales</i>	134
6.3.2. <i>Formación de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado</i>	134
6.3.2.1. Obtención de nanopartículas de OVA	134
6.3.2.2. Obtención de nanocomplejos proteína-CLA.....	135
6.3.3. <i>Diseño de experimentos</i>	135
6.3.4. <i>Caracterización fisicoquímica y estructural de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado</i>	135
6.3.4.1. Distribución de tamaño y potencial ζ	135
6.3.4.2. Microscopía confocal láser de barrido.....	135
6.3.4.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación.....	137
6.3.5. <i>Digestión gastrointestinal in vitro de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado y su caracterización</i>	138
6.3.5.1. Actividades enzimáticas	138
6.3.5.2. Digestión gastrointestinal in vitro: método estático consenso.....	140
6.3.5.3. Retención de CLA en los nanocomplejos luego de la digestión gastrointestinal	141
6.3.5.4. Medición de péptidos solubles liberados	142
6.3.5.5. Microscopía confocal láser de barrido.....	142
6.3.6. <i>Análisis estadístico</i>	142
6.4. RESULTADOS	142
6.4.1. <i>Caracterización fisicoquímica y estructural de los nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado</i>	142
6.4.1.1. Distribución de tamaño y potencial ζ	142
6.4.1.2. Microscopía confocal láser de barrido.....	146
6.4.1.3. Eficiencia de encapsulación.....	147
6.4.2. <i>Digestión gastrointestinal in vitro de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado y su caracterización</i>	148
6.4.2.1. Apariencia macroscópica	148
6.4.2.2. Retención de CLA en los nanocomplejos luego de la digestión gastrointestinal	151
6.4.2.3. Péptidos solubles liberados	152
6.4.2.4. Microscopía confocal láser de barrido.....	153
6.5. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	155

7. CAPÍTULO 5.....	156
7.1. INTRODUCCIÓN.....	157
7.1.1. <i>Cáncer</i>	157
7.1.2. <i>Antecedentes en el desarrollo de fármacos citotóxicos basados en compuestos bioactivos y/o albuminas</i>	159
7.1.3. <i>Cultivo de líneas celulares tumorales</i>	161
7.1.4. <i>Ácido linoleico conjugado en cáncer de colon</i>	164
7.2. OBJETIVOS.....	167
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	167
7.3.1. <i>Materiales</i>	167
7.3.2. <i>Formación de nanocomplejos de inclusión proteína-ácido linoleico conjugado</i>	167
7.3.2.1. <i>Obtención de nanopartículas de OVA</i>	167
7.3.2.2. <i>Obtención de nanocomplejos de inclusión proteína-CLA</i>	167
7.3.3. <i>Digestión gastrointestinal in vitro utilizando un modelo reducido a partir del modelo consenso</i>	168
7.3.4. <i>Caracterización de los sistemas luego de la digestión in vitro</i>	169
7.3.4.1. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE</i>	169
7.3.4.2. <i>Determinación de tamaño y potencial ζ</i>	169
7.3.4.3. <i>Retención de CLA en los nanocomplejos luego de la digestión gastrointestinal in vitro</i>	169
7.3.5. <i>Evaluación de citotoxicidad de los nanocomplejos de inclusión</i>	170
7.3.5.1. <i>Determinación de viabilidad celular sobre cultivo de células HT-29</i>	170
7.3.5.2. <i>Determinación de muerte celular mediante citometría de flujo</i>	172
7.3.6. <i>Análisis estadístico</i>	175
7.4. RESULTADOS.....	176
7.4.1. <i>Caracterización de los nanocomplejos de inclusión luego de la digestión gastrointestinal in vitro reducida</i>	176
7.4.1.1. <i>Características macroscópicas</i>	176
7.4.1.2. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE</i>	177
7.4.1.3. <i>Determinación de tamaño y potencial ζ</i>	180
7.4.1.4. <i>Retención de CLA en los nanocomplejos</i>	185
7.4.2. <i>Evaluación de la citotoxicidad de ácido linoleico conjugado y de los nanocomplejos de inclusión</i>	186
7.4.2.1. <i>Determinación de viabilidad celular sobre cultivo de células HT-29</i>	186
7.4.2.2. <i>Determinación de muerte celular mediante citometría de flujo</i>	189
7.5. CONCLUSIÓN PARCIAL.....	191
8. CONCLUSIÓN.....	193
9. APÉNDICE.....	197
9.1. <i>Efecto de filtro interno en los sistemas proteína-retinol</i>	198
9.2. <i>Espectros de fluorescencia para los nanocomplejos proteína-ácidos grasos poliinsaturados</i>	198
9.2.1. <i>Fluorescencia intrínseca</i>	198
9.2.2. <i>Fluorescencia extrínseca</i>	199
9.3. <i>Actividades enzimáticas</i>	200
9.3.1. <i>Pepsina</i>	200
9.3.2. <i>Pancreatina</i>	201
9.4. <i>SDS-PAGE utilizando el sistema de digestión in vitro consenso</i>	202
10. BIBLIOGRAFIA.....	204

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ΔG^0	Cambio de energía libre estándar
ΔH^0	Cambio de entalpía estándar
ΔS^0	Cambio de entropía estándar
ϵ	Constante dieléctrica
λ	Longitud de onda
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
η	Viscosidad
ζ	Potencial Zeta
AA	Ácido araquidónico
ABS	Absorbancia
ABS ₂₄₇	Pendiente de la parte lineal (unidades de ABS/min) para la pancreatina
ABS _{247blanco}	Pendiente de la parte lineal (unidades de ABS/min) para el blanco de pancreatina
ABS ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm para la pepsina
ABS _{280blanco}	Absorbancia a 280 nm para el blanco de pepsina
ABS ₀	Absorbancia inicial o a tiempo cero
ABS _t	Absorbancia a un determinado tiempo
ABS _{muestra}	Absorbancia de las células tratadas con diferentes sistemas
ABS _{medio}	Absorbancia de las células en medio de cultivo
A _{em}	Absorbancia a la λ de emisión
A _{ex}	Absorbancia a la λ de excitación
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AG	Ácidos grasos
ALA	Ácido α -linolénico
ANS	Ácido 1-anilino naftalen 8-sulfónico
AR	Ácido retinoico
BLG	B-lactoglobulina
BSA	Albumina sérica bovina
CB	Compuesto bioactivo
CLA	Ácido linoleico conjugado
CLA _f	Cantidad de CLA libre en la fase acuosa luego de la encapsulación
CLA _{liberado}	Cantidad de CLA liberado en la fase acuosa luego de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>
CLA _t	Cantidad utilizada de CLA para la formación de los nanocomplejos
CLSM	Microscopía confocal láser de barrido
CMC	Concentración micelar crítica
COX	Ciclooxigenasa
D	Coeficiente de difusión traslacional
d _{em}	Longitud de la cubeta de medición en cm en la dirección de emisión
d _{ex}	Longitud de cubeta de medición en cm en la dirección de excitación
d _H	Diámetro hidrodinámico
DHA	Ácido docosahexaenoico
DLS	Dispersión de luz dinámica

DM	Grado de metil-esterificación o metoxilación
DMEM F12	Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium y Ham's F-12
EE	Eficiencia de encapsulación
EE _{CLA}	Eficiencia de encapsulación de CLA
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FGS	Fluido gástrico simulado
F _i	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión a la relación proteína-ligando i
FIS	Fluido intestinal simulado
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
F _{máx}	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión en la saturación de la proteína por el ligando
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
FSS	Fluido salival simulado
GA	Goma arábica
HSA	Albumina sérica humana
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IF	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en presencia de ligando considerando la emisión de Trp y Tyr
IF ₀	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en ausencia de ligando considerando la emisión de Trp y Tyr
IF _{0ANS}	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de ANS de la proteína pura
IF _{0Trp}	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en ausencia de ligando considerando la emisión de Trp
IF _{ANS}	Pico del espectro de emisión de intensidad de fluorescencia extrínseca
IF _{corr}	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en presencia o no de ligando corregida por el efecto de filtro interno
IF _{obs}	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en presencia o no de ligando medido experimentalmente
IF _{Trp}	Pico intensidad de fluorescencia de espectro de emisión de la proteína en presencia de ligando considerando la emisión de Trp
IFR	Intensidad de fluorescencia intrínseca relativa considerando la emisión de Trp y Tyr
IFR _{ANS}	Intensidad de fluorescencia extrínseca relativa
IFR _{Trp}	Intensidad de fluorescencia intrínseca relativa considerando la emisión de Trp
IP	Ioduro de propidio
K	Constante de Boltzmann
K _a	Constante de asociación
LA	Ácido linoleico
LOX	Lipooxigenasa
L _{total}	Concentración total de ligando
MDX	Maltodextrina

MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MTX	Metotrexato
n	Número de sitios de unión al ligando de la proteína o número de moléculas de ligando unidas
n-3/omega 3	Familia de ácidos grasos cuya primera insaturación se encuentra entre el C3 y el C4
n-6/omega 6	Familia de ácidos grasos cuya primera insaturación se encuentra entre el C6 y el C7
NLC	Lípidos nanoestructurados
NPB	Nanopartícula biopolimérica
OD	Oxígeno disuelto en mg/L
OVA	Ovoalbúmina
OVA _{n1}	Nanopartícula de ovoalbúmina 1 (pH 11,4 y 30 g/L)
OVA _{n2}	Nanopartícula de ovoalbúmina 2 (pH 7,5 y 10 g/L)
PAM	Pectina de alto metoxilo
PBM	Pectina de bajo metoxilo
PdI	Índice de polidispersidad global
PSD	Distribución del tamaño de partícula
PSDi	Distribución del tamaño de partícula en intensidad
PSDn	Distribución del tamaño de partícula en número
PSDv	Distribución del tamaño de partícula en volumen
Phe	Fenilalanina
pI	pH correspondiente al punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PS	Polisacárido
P _{total}	Concentración total de proteína
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RBP	Proteína de unión a RET
R _{CLA}	Retención de CLA
RET	Retinol
RET _{luz}	Control donde el RET se expuso a la luz y el oxígeno
RET _{oscuridad}	Control donde el RET se mantuvo en oscuridad
R _{prot:Ps}	Relación proteína-polisacárido
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SH	Grupo sulfhidrilo
SLN	Nanopartículas sólidas lipídicas
SLS	Dispersión de luz estática
SS	Enlace o puente disulfuro
TAG	Triacilglicéridos
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGI	Tracto gastrointestinal
T _m	Temperatura de desnaturalización
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U _E	Movilidad electroforética
WPC	Proteínas del suero lácteo concentradas
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2-h-tetrazolium-5- carboxanilida

RESUMEN

En los últimos años se han desarrollado numerosos sistemas de encapsulación de compuestos bioactivos (CB), entre ellos nanopartículas proteicas y biopoliméricas (NPB). En estas nanopartículas, los CB se unen a la proteína y en el caso de las NPB se produce una deposición electrostática de un polisacárido (PS) que brinda mayor protección del CB frente a condiciones ambientales injuriantes. En este sentido, varias proteínas globulares han sido examinadas (β -lactoglobulina, albúmina sérica bovina, α -lactoalbúmina, entre otras). Sin embargo, una proteína altamente disponible en la región como la ovoalbúmina (OVA), principal fracción proteica de la clara del huevo, ha sido poco estudiada. Por otro lado, una de las estrategias para potenciar la capacidad de tales proteínas de unir CB es el calentamiento de sus soluciones, a fin de producir su desnaturalización y agregación. Estos sistemas de nanoencapsulación son ampliamente empleados en aplicaciones dermatológicas, farmacéuticas y, en la actualidad, comienzan a emplearse para el diseño de alimentos funcionales. En este sentido, conocer el comportamiento de los mismos frente a las condiciones gastrointestinales humanas es necesario para determinar la biodisponibilidad del CB y su potencial efecto benéfico sobre la salud.

En este contexto, en la presente tesis se propone la obtención de nanopartículas de OVA (OVA_n) por tratamiento térmico para la vehiculización de CB hidrofóbicos como vitamina A o retinol (RET) y ácido linoleico conjugado (CLA) y, para este último, su evaluación bajo un sistema de digestión gastrointestinal *in vitro*.

En primer lugar, se obtuvo OVA_{n2} mediante tratamiento térmico controlado (85°C, 5 min), cuyo tamaño fue de $92,0 \pm 0,2$ nm. Seguidamente, se obtuvieron y caracterizaron nanocomplejos de inclusión formados por interacciones atractivas no covalentes entre OVA y OVA_{n2} con RET. La formación de nanocomplejos se examinó mediante espectroscopia de fluorescencia intrínseca y extrínseca. Los resultados sugirieron que OVA fue más efectiva para unir RET que OVA_{n2} , posiblemente debido a que la formación de agregados podría emplear algunos aminoácidos hidrofóbicos necesarios para la unión de RET. Además, se estudió la estabilidad coloidal de los nanocomplejos mediante absorbancia (ABS) a 400 nm, distribución de tamaño de partícula (PSD) y determinación de potencial ζ a valores de pH típicos de alimentos (4,0 y 7,0). Se concluyó que la estabilidad fotoquímica en el tiempo frente a la luz y el O_2 de los nanocomplejos de inclusión proteína-RET dependió del pH de la solución y de la agregación de las proteínas. A pH 7,0, el sistema de encapsulación basado en OVA_{n2} mejoró la estabilidad fotoquímica de RET en relación al sistema con OVA alrededor de un 40%.

Posteriormente, se estudió la formación de NPB mediante la deposición electrostática de pectina de alto metoxilo (PAM) sobre la superficie de los nanocomplejos OVA/OVA_{n2}-RET para determinar si las mismas poseían ventajas en cuanto a la protección fotoquímica de RET. Mediante el estudio de ABS a 400 nm, PSD y medición de potencial ζ se determinaron las condiciones adecuadas para la formación de NPB coloidalmente estables. Se halló que para la relación proteína:PAM 2:1, los valores de pH más apropiados para obtener NPB fueron: 4,0 para OVA-PAM y 6,0 para OVA_{n2}-PAM. Al estudiar la descomposición fotoquímica de RET en estas NPB se observó que la deposición de PAM sobre la superficie del nanocomplejo de inclusión proteína-RET mejoró la estabilidad fotoquímica del mismo. La NPB OVA_{n2}-RET-PAM formada a pH 6,0 promovió una descomposición fotoquímica de RET inferior (14,1%) en comparación con la registrada para OVA-RET-PAM formada a pH 4,0 (25,0%), lo que implica una mejora del 42% en la estabilidad de RET.

Como se obtuvieron resultados promisorios en cuanto a solubilización y protección fotoquímica de RET por parte de OVA_{n2}, se decidió desarrollar otra nanopartícula de diferente tamaño a fin de evaluar su influencia tanto en la capacidad de unión del CB hidrofóbico como en un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Así, modificando las condiciones de pH y concentración se obtuvo una segunda nanopartícula (OVA_{n1}) de $24,63 \pm 0,04$ nm mediante el mismo tratamiento térmico (85°C, 5 min). Para evaluarlas se estudiaron dos CB hidrofóbicos, el ácido linoleico (LA) y su isómero, el ácido linoleico conjugado (CLA), ambos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) esenciales para el ser humano. La PSD mostró que la unión de ambos PUFA promovió un aumento en el tamaño de las nanopartículas. Además, el examen por microscopía de fuerza atómica (AFM) para nanopartículas y nanocomplejos de inclusión mostró una forma redondeada y un aumento en las dimensiones de los nanocomplejos que se atribuyó a la unión de LA y CLA. Por otro lado, la formación de nanocomplejos se examinó mediante espectroscopia de fluorescencia intrínseca y extrínseca. Los resultados destacaron que ambas nanopartículas unieron LA y CLA en mayor cantidad que OVA. Además, ambas nanopartículas fueron capaces de unirse a una mayor cantidad de LA que de CLA. Los resultados sugieren que el conocimiento de las diferencias en las propiedades de las nanopartículas de OVA y la estructura molecular de los PUFA es un requisito relevante para el diseño de nanocomplejos con propiedades coloidales específicas.

Finalmente, dado que el CLA es un CB con comprobada actividad citotóxica en diferentes tipos de cáncer, principalmente en cáncer de colon, se propuso estudiar al sistema de encapsulación de nanopartículas (OVA_{n1} y OVA_{n2}) bajo condiciones de un sistema de digestión gastrointestinal *in vitro* a fin de evaluar su comportamiento y

posible liberación del CB. Para ello, en primer lugar, los nanocomplejos de inclusión con CLA se examinaron en términos de tamaño y potencial ζ a pH 3,0 y 7,0 (que corresponden al pH estomacal e intestinal respectivamente). La caracterización morfológica se realizó mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM), encontrando que OVA y sus nanopartículas derivadas tenían una forma redondeada. Además, se estudió la eficiencia de encapsulación de CLA (EE_{CLA}) para OVA y sus nanopartículas derivadas, con valores de EE_{CLA} superiores al 90% para las nanopartículas y del 75% para OVA. Finalmente, los nanocomplejos se analizaron sometiéndolos a un modelo consenso de digestión gastrointestinal *in vitro* que consistió en un paso gástrico y uno intestinal. La apariencia macroscópica, las imágenes de CLSM y la cuantificación de la retención de CLA (R_{CLA}) por HPLC se evaluaron después de la digestión. Todos los sistemas mostraron la formación de agregados macroscópicos tanto en la fase gástrica como intestinal, lo que se evidenció como un precipitado visible. En todos los sistemas, CLSM confirmó la presencia de numerosos agregados de forma indefinida. Finalmente, se encontró una R_{CLA} alta (alrededor del 97%) para la proteína nativa y para las nanopartículas luego de la etapa intestinal. Esto permitió proponer a este sistema de encapsulación de nanopartículas para el *delivery* de CLA (y posiblemente de otros CB hidrofóbicos) a colon de manera de que ejerza allí una acción local.

Sin embargo, con el protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* aplicado se utilizó una gran relación enzima:sustrato, por lo que se diseñó un protocolo reducido basado en el protocolo consenso. El mismo consistió en adecuar las cantidades de enzimas y sales biliares para regímenes diluidos, como es el caso de los nanocomplejos utilizados en la presente tesis. Con este nuevo ensayo, se observó que la OVA fue resistente a la digestión gástrica e intestinal y las nanopartículas de OVA fueron muy susceptibles a la hidrólisis por las enzimas digestivas, resultados acordes con la literatura. El estudio de PSD para OVA mostró la presencia de la misma a lo largo de todo el proceso digestivo o de un fragmento de tamaño muy similar, mientras que los resultados para las nanopartículas no fueron concluyentes debido a la precipitación del sistema. Finalmente, la R_{CLA} fue 63% para OVA, siendo este sistema muy promisorio para *delivery* de CB hidrofóbicos como el CLA a colon. En el caso de las nanopartículas se obtuvieron R_{CLA} altas (alrededor del 80-90%) a pesar de estar digeridas, esto podría explicarse considerando que los péptidos resultantes de la digestión conservaran la capacidad de unir CLA.

Finalmente se estudió la capacidad citotóxica del CLA y los nanocomplejos de inclusión en una línea celular de cáncer de colon (HT-29). A partir de estos ensayos se observó que el CLA fue el responsable de la muerte celular dado que los sistemas

proteicos puros no fueron citotóxicos para dicha línea celular. Por otro lado, se determinó que el principal mecanismo de muerte de los nanocomplejos de inclusión y CLA fue apoptosis, sin hallarse necrosis. Los nanocomplejos OVA-CLA y OVA_{n1}-CLA fueron los que mostraron la mayor actividad citotóxica e índice de apoptosis.

En síntesis, la presente tesis realizó un abordaje básico que abarcó desde el estudio de los sistemas de encapsulación proteicos o biopoliméricos para tres CB hidrofóbicos hasta la evaluación de la liberación de uno de ellos en el tracto gastrointestinal y su potencial acción antitumoral.

ABSTRACT

Nowadays, encapsulation systems for bioactive compounds (BC) have been developed, including protein and biopolymeric nanoparticles (BPN). In these nanoparticles, BC bind to the protein and in the case of BNP ones, there is an electrostatic deposition of a polysaccharide onto the protein surface providing greater protection of BC against injurious environmental conditions. In this sense, several proteins have been examined (β -lactoglobulin, bovine serum albumin, α -lactoalbumin, among others). However, a highly available protein in the region such as ovalbumin (OVA) has been little studied. On the other hand, one of the strategies to enhance the ability of proteins to bind BC is heating their solutions in order to produce their denaturation and aggregation. These nanoencapsulation systems are widely used in dermatological and pharmaceutical applications and they are currently being used for the design of functional foods. Therefore, knowledge about their behaviour against human gastrointestinal conditions is necessary to determine BC bioavailability and its potential beneficial effect on health.

In this context, obtention of OVA nanoparticles (OVA_n) by heat treatment for vehiculization of hydrophobic BC such as vitamin A or retinol (RET) and conjugated linoleic acid (CLA) and its evaluation under an *in vitro* gastrointestinal digestion was proposed.

First, OVA_{n2} were obtained by controlled heat treatment (85°C, 5 min), these had a size of 92.0 ± 0.2 nm. Next, nanocomplexes formed by attractive non-covalent interactions between OVA and OVA_{n2} with RET were obtained and characterized. The formation of inclusion nanocomplexes was monitored by intrinsic and extrinsic fluorescence spectroscopy. Results suggest that OVA was more effective for binding RET than OVA_{n2} , possibly because aggregate formation could employ some hydrophobic aminoacids necessary for binding RET. In addition, nanocomplexes colloidal stability was studied by absorbance (ABS) at 400 nm, particle size distribution (PSD) and ζ potential determination at typical food pH values (4.0 and 7.0). It was concluded that photochemical stability over time against light and oxygen of protein-RET nanocomplexes mainly depends on pH of solution and aggregation of proteins. At pH 7.0, OVA_{n2} -based encapsulation nanocomplex improved photochemical stability of RET in relation to OVA nanocomplex by around 40%.

Subsequently, the formation of BPN was studied by electrostatic deposition of high methoxyl pectin (HMP) onto the surface of OVA/ OVA_{n2} -RET nanocomplexes in order to determine if these BPN had advantages on the photochemical protection of RET. By means of ABS at 400 nm, PSD and ζ potential measurement, suitable

conditions for formation of colloiddally stable BPN were determined. It was found that for protein:HMP 2:1 ratio, the most appropriate pH values to obtain NPB were: 4.0 for OVA-HMP and 6.0 for OVA_{n2}-HMP. Examination of photochemical decomposition of RET in these BPN, highlighted that HMP deposition onto the surface of the protein-RET nanocomplex improved its photochemical stability. OVA_{n2}-RET-HMP formed at pH 6.0 promoted a lower RET photochemical decomposition (14.1%) compared to OVA-RET-HMP formed at pH 4.0 (25.0%), which implies an improvement of 42% in RET stability when comparing these systems.

As promising results were obtained in terms of solubilization and photochemical protection of RET by OVA_{n2}, development of another nanoparticle of different size was decided in order to evaluate its influence both in the binding capacity of hydrophobic BC and in an in vitro gastrointestinal digestion. Thus, by modifying the pH and concentration conditions, a second nanoparticle (named OVA_{n1}) of 24.63±0.04 nm was obtained, applying the same heat treatment (85°C, 5 min). To evaluate them, two hydrophobic BC, linoleic acid (LA) and its isomer, conjugated linoleic acid (CLA), both polyunsaturated fatty acids (PUFA) essential for humans were studied. Size measurements showed that bind of both PUFAs promoted an increase in size of nanoparticles. In addition, atomic force microscopy (AFM) examination for nanoparticles and inclusion nanocomplexes showed a rounded shape and an increase in nanocomplexes dimensions attributed to bind of LA and CLA. On the other hand, nanocomplex formation was monitored by intrinsic and extrinsic fluorescence spectroscopy. In addition, both nanoparticles were able to bind greater amount of LA than CLA. Results highlighted that both nanoparticles bind LA and CLA in a greater quantity in comparison with OVA. Results suggested that knowledge of differences in the properties of OVA nanoparticles and PUFAs molecular structure are relevant aspects for nanocomplexes design with specific colloidal properties.

Finally, since CLA is a compound showing cytotoxic activity on different types of cancers, mainly in colon cancer, OVA nanoparticles (OVA_{n1} and OVA_{n2}) were assayed under an in vitro gastrointestinal digestion system in order to evaluate its behaviour and possible release of BC. For this, firstly, inclusion nanocomplexes were examined in terms of size and ζ potential at pH 3.0 and 7.0 (corresponding to stomach and intestinal pH respectively). Morphological characterization was performed by confocal scanning laser microscopy (CLSM) and it was found that OVA and OVA nanoparticles had a rounded shape. In addition, CLA encapsulation efficiency (EE_{CLA}) for OVA and OVA nanoparticles was studied, obtaining EE_{CLA} values greater than 90% for nanoparticles and 75% for OVA. Finally, nanocomplexes were analysed under a consensus in vitro gastrointestinal digestion model, consisting in a gastric and an intestinal phase.

Macroscopic appearance, CLSM images and quantification of CLA retention (R_{CLA}) by HPLC were evaluated after digestion. All systems showed the formation of macroscopic aggregates in both gastric and intestinal phases, which was evidenced as a visible precipitate. In all systems, CLSM confirmed the presence of numerous undefined shape aggregates. Finally, a high R_{CLA} (about 97%) was found for OVA and nanoparticles after intestinal stage. Because of these results, nanoparticle encapsulation system could be proposed as a delivery system for CLA (and possibly for other hydrophobic BC) exerting local action at colon.

However, with the applied in vitro gastrointestinal digestion protocol, a large enzyme:substrate ratio was used, so a reduced protocol based on the consensus protocol was performed. The new protocol consisted in adapting amounts of enzymes and bile salts for dilute regimens, as is the case of nanocomplexes used in this thesis. What it, it was observed that OVA was resistant to gastric and intestinal digestion and OVA nanoparticles were very susceptible to hydrolysis by digestive enzymes, these results are consistent with literature. PSD for OVA showed its presence throughout the entire digestive process or a fragment of very similar size, while the results for nanoparticles were inconclusive due to precipitation of system. Finally, R_{CLA} was 63% for OVA, so this system would be very promising for colon delivery. In the case of nanoparticles, high R_{CLA} (around 80-90%) were obtained despite being digested, so that the peptides resulting from digestion could retain the ability to bind CLA.

Finally, cytotoxicity of CLA and inclusion nanocomplexes in a colon cancer cell line (HT-29) was studied. From these assays, it was observed that CLA was responsible for cell death since pure protein systems were not cytotoxic for HT-29. On the other hand, it was determined that main mechanism of cell death for CLA and inclusion nanocomplexes was apoptosis, without necrosis being found. OVA-CLA and OVA_{n1}-CLA nanocomplexes showed the highest cytotoxic activity and apoptosis index.

In this thesis, a basic approach was carried out, ranging from the study of protein or biopolymer encapsulation systems for three hydrophobic BC to the evaluation of release of one of them in gastrointestinal tract and its potential antitumor action.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología y su aplicación en alimentos

La nanotecnología es entendida como la capacidad de observar, manipular y controlar las propiedades de la materia a escala nanométrica. Las definiciones más aceptadas giran en torno a la escala de tamaño. Entre ellas podemos mencionar:

(i) La *Royal Society* define la escala nanométrica en el rango desde los 100 nanómetros (nm) hasta el tamaño de los átomos (aproximadamente 0.2 nm). En esa escala las propiedades de los materiales pueden ser muy diferentes que las de aquellos a gran escala. Se define nanociencia como el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de las de mayor escala. Mientras que la nanotecnología es el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y el tamaño a escala nanométrica [1].

(ii) 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 1 a 100 nm [2].

Sin embargo, no existe justificación científica para la elección de dicho rango, sino, más bien, se debe a las propiedades específicas de los nanomateriales que se encuentran en el mismo. 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 [3].

Por otro lado, la nanotecnología encuentra aplicaciones en numerosas áreas como informática, electrónica, comunicación, producción de energía, medicina, industria farmacéutica, industria alimentaria, entre otras.

Los científicos especializados en alimentos utilizan la nanotecnología para crear una variedad de sistemas de *delivery* para la encapsulación, protección y liberación controlada de micronutrientes. Estos consisten típicamente en micronutrientes atrapados dentro de nanopartículas (radio < 500 nm) que pueden fabricarse a partir de materiales tales como surfactantes, lípidos, proteínas y/o polisacáridos (PS). El pequeño tamaño de las partículas en estos sistemas tiene una serie de ventajas sobre los sistemas de *delivery* convencionales: mayor estabilidad a la agregación y separación gravitacional, mayor claridad óptica y biodisponibilidad mejorada [4].

La aplicación de la nanotecnología, relacionada con productos alimenticios, está involucrada en dos aspectos: envases y alimentos en sí mismos. En lo que respecta a envases, la nanotecnología encuentra aplicaciones tales como: i) mejoramiento de los mismos como barreras de gases y humedad, ii) extensión de la vida útil vía mediante utilización de envases activos, iii) envasado inteligente, iv) envases antimicrobianos o autolimpiantes, v) monitoreo de las condiciones del producto durante su transporte, etc. 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 frente a la oxidación, y vi) *delivery* de nutraceuticos nanoencapsulados [5].

En lo que respecta a nanomedicina, el objetivo general es el mismo que se persigue en medicina: diagnosticar enfermedades de la manera más precisa y temprana posible, tratar enfermedades de la manera más eficaz sin efectos secundarios y evaluar la eficacia del tratamiento de manera no invasiva. La promesa que aporta la nanotecnología es multifacética ya que ofrece no solo mejoras a las técnicas actuales, sino que también proporciona herramientas y capacidades innovadoras. Al manipular drogas y otros materiales a escala nanométrica, se pueden alterar las propiedades fundamentales y la bioactividad de los materiales. Estas herramientas pueden permitir el control sobre las características de los fármacos como la solubilidad, los tiempos de vida media en sangre, la liberación controlada durante periodos cortos o largos, la liberación controlada provocada por condiciones del medio ambiente, etc. [6]. Dentro de la medicina, la nanotecnología ha encontrado aplicación en numerosos campos como el diagnóstico por imágenes [7], *delivery* controlado de drogas [8], terapias sitio-dirigidas, tratamiento de diferentes tipos de cáncer [9], etc.

1.2. Nanoencapsulación aplicada a alimentos

En general, la encapsulación se define como un proceso de atrapamiento de una sustancia (agente activo) en otra sustancia (material de pared), produciendo partículas en la escala nanométrica (nanoencapsulación), micrométrica (microencapsulación) y hasta milimétrica [10].

Actualmente, la encapsulación constituye una de las aplicaciones más importantes de las micro y nanopartículas en el sector alimentario. En este sentido, la vehiculización de compuestos bioactivos (CB) a través del uso de nanopartículas presenta 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 bioactividad, ii) minimización de efectos adversos sobre algunas características sensoriales tales como la transparencia en ciertas bebidas y el enmascaramiento de atributos desagradables [5], [11], iii) mejor biodisponibilidad debido a las propiedades de liberación, solubilidad y tiempo de residencia prolongada en el tracto gastrointestinal (TGI) y absorción celular eficiente de los nutrientes [11], iv) capacidad de solubilizar CBs hidrofóbicos [9], v) liberación controlada de la sustancia encapsulada, lo que mejoraría la efectividad de los CBs y aseguraría una dosificación óptima mejorando la rentabilidad del producto [12], vi) capacidad de modificar las propiedades de superficie (por ejemplo, mediante recubrimientos) que pueden permitir el suministro sitio-dirigido de los CBs [13], etc.

En lo que respecta a ingredientes, se pueden distinguir dos tipos: CBs y células bioactivas (es decir, probióticos). Una amplia variedad de diferentes CBs puede ser encapsulados, incluyendo vitaminas, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), carotenoides, fitoesteroles y péptidos bioactivos. La eficacia de los CBs es fuertemente dependiente de su biodisponibilidad. Los factores que afectan negativamente a la biodisponibilidad son la desestabilización fisicoquímica durante el procesamiento, la baja solubilidad y/o absorción en el TGI, y la degradación/metabolismo en el mismo [14].

Por otro lado, ha habido un creciente interés dentro de la industria alimentaria por el desarrollo de sistemas de *delivery* basados en coloides para encapsular, proteger y liberar CBs de carácter hidrofóbico [15]. Dicho interés radica en que existen algunos nutrientes y CBs hidrofóbicos que no pueden ser sintetizados por el ser humano y, por lo tanto, deben ser incorporados en la dieta. Entre ellos se encuentran los aminoácidos, compuestos fenólicos, vitaminas y PUFAs. Sin embargo, su escasa solubilidad en agua y elevada susceptibilidad al deterioro frente a condiciones como la luz y el O₂ conlleva a la necesidad del desarrollo de diferentes sistemas de encapsulación.

1.3. Nanopartículas para la encapsulación de compuestos bioactivos hidrofóbicos

En la Fig. 1 se muestran diferentes sistemas de encapsulación para CBs hidrofóbicos. Si bien existen numerosas clasificaciones, una de ellas podría realizarse en base al tipo de material de pared. Así, podemos distinguir nanosistemas basados en lípidos y surfactantes, en PSs y en proteínas. Los primeros incluyen

nanoliposomas, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), lípidos nanoestructurados (NLC), micelas y nanosuspensiones. Los basados en PSs contienen nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas y complejos de inclusión, mientras que los basados en proteínas incluyen micelas de caseína y varios complejos de proteínas como las albúminas, gelatina, proteínas del suero, proteínas de la soja, proteínas de la leche y zeína [16].

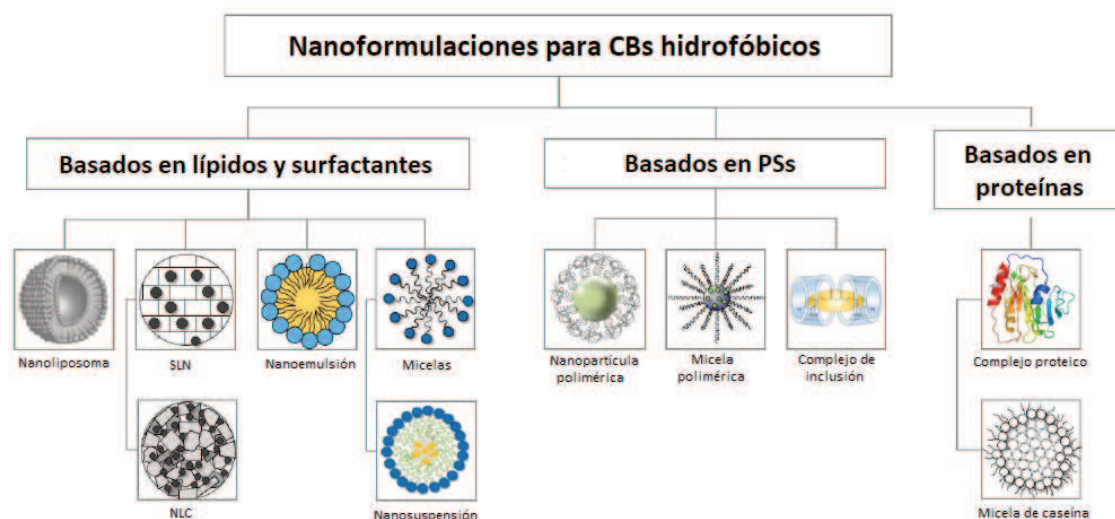


Figura 1. Clasificación de nanosistemas para la encapsulación de CBs hidrofóbicos (Figura modificada de Shin y col., 2015 [16]).

Nanoliposomas: son vesículas concéntricas que consisten en bicapas lipídicas y su estructura se inspira en la de las membranas celulares. Los liposomas pueden incorporar componentes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Los componentes hidrofílicos pueden atraparse en el espacio acuoso interno, mientras que los componentes hidrofóbicos pueden incorporarse entre las bicapas lipídicas. Su diámetro varía entre decenas de nm y decenas de μm [4], [16].

Nanoemulsiones: son dispersiones coloidales termodinámicamente inestables formadas a partir de agua, aceite y un emulsionante. Las nanoemulsiones aceite en agua consisten en nanopartículas lipídicas esféricas dispersadas en el seno de un medio acuoso donde la nanopartícula tiene una estructura de tipo núcleo-cubierta. El núcleo hidrofóbico consiste en las moléculas de aceite y en la parte no polar del surfactante, mientras que la cubierta polar consiste en la parte polar del surfactante. Típicamente, el CB hidrofóbico se mezcla con la fase oleosa previo a la homogeneización, aunque también puede ser incorporado luego de la formación de la nanoemulsión [4].

Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN): son nanopartículas que contienen gotas de lípido que están completamente cristalizadas y poseen una estructura

cristalina altamente ordenada con el CB formando parte de la misma. Las SLN son producidas a partir de un lípido sólido o una mezcla de lípidos sólidos. La liberación del CB puede ser controlada a través del estado físico de la matriz lipídica [16], [17].

Lípidos nanoestructurados (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. En general, este tipo de sistema posee una alta capacidad de carga y liberación controlada. La matriz sólida constituye una barrera que puede proteger al CB sensible a factores de deterioro en la fase acuosa [16], [17].

Micelas: son sistemas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente cuando un surfactante y otros componentes son agregados al agua bajo condiciones adecuadas. Las micelas ($d < 20$ nm) están compuestas solo de surfactantes [4].

Nanopartículas poliméricas: son nanopartículas formadas por polímeros que pueden ser biodegradables como alginato, celulosa, quitosano, dextrano, pectinas, etc. o no biodegradables como poli (ácido láctico), poli (ácido glutámico), etc. En general, muestran una eficiencia de carga mayor, mejor estabilidad y liberación controlada del CB que los sistemas de *delivery* basados en lípidos [16], [18].

Micelas poliméricas: son nanopartículas poliméricas que se forman a partir del autoensamblaje de polímeros anfifílicos a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica (CMC), produciendo nanopartículas que pueden encapsular fármacos poco solubles en agua [19]. Sus principales ventajas son una alta capacidad de carga de fármacos, una buena solubilidad en agua, baja toxicidad y tamaño pequeño apropiado para circulación prolongada en sangre [16].

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”. Las interacciones pueden ser tanto específicas como no específicas, siendo las fuerzas involucradas: puente de hidrógeno, van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Esta metodología se ha empleado para la encapsulación de moléculas orgánicas volátiles, enmascaramiento de olores y sabores, y en la preservación de aromas y CBs hidrofóbicos como resveratrol y ácidos grasos (AG) [14], [11], [15], [20], [21].

1.4. Métodos de producción de nanopartículas

Para muchas aplicaciones es importante diseñar partículas de biopolímeros de modo que su composición permita obtener las características fisicoquímicas y

funcionales deseadas. Por ejemplo, si uno estuviera creando una partícula de biopolímero para administrar un componente de sabor, entonces debería estar diseñado para descomponerse en la boca y allí liberar las moléculas de sabor encapsuladas [15]. Existen numerosas técnicas para la producción de nanopartículas, las cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos: de arriba hacia abajo (*top-down*) y de abajo hacia arriba (*bottom-up*) dependiendo del enfoque fisicoquímico en cuestión (Fig. 2, [14]).

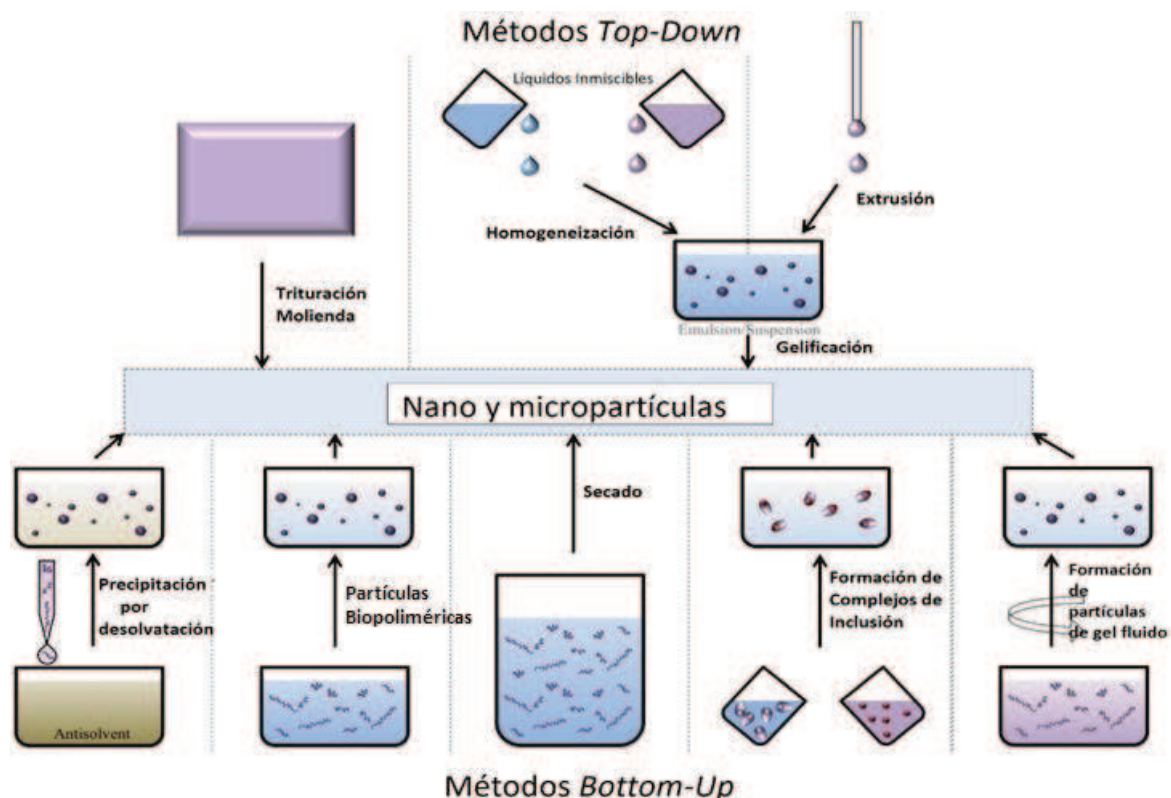


Figura 2. Representación esquemática de diferentes técnicas *bottom-up* y *top-down* usadas en la producción de micro y nanopartículas (Figura modificada de Joye y McClements, 2014 [14]).

Dentro de los métodos *Top-Down* se encuentran la trituración, molienda y homogeneización y consisten en romper el material sólido o líquido en partículas de menor tamaño. Por lo general, estos enfoques se basan en tres tipos de fuerzas disruptivas para descomponer las partículas: cizallamiento, impacto y compresión. La principal desventaja es la dificultad para crear partículas con propiedades estructurales y de tamaño bien definidas [14].

Homogeneización: este método implica la formación de una emulsión al mezclar dos líquidos inmiscibles. Luego de formada la emulsión, la fase interna es gelificada mediante tratamiento térmico o agentes gelificantes. Existen distintos tipos de

emulsión; agua en agua: mezclando dos soluciones de biopolímeros; agua en aceite: mezclando un aceite con una fase acuosa que posee el biopolímero soluble; etc.

Extrusión: consiste en tomar la solución de biopolímero con una jeringa y forzarla a pasar a través de una aguja goteando sobre una solución gelificante.

Los métodos *Bottom-Up* consisten en la construcción de partículas por autoensamblado de las moléculas individuales, inducido por cambios en las condiciones del medio (como pH, fuerza iónica, temperatura o concentración). La energía requerida para estos métodos es menor que para los de *Top-Down* y permiten controlar diferentes propiedades de las partículas obtenidas como su tamaño, morfología y estado físico [14].

Precipitación por desolvatación: Consiste en la agregación de moléculas del biopolímero en solución (solute) inducida por una disminución de la polaridad 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 [14], [15]. Comúnmente, esto se logra mediante la adición de un alcohol a una solución acuosa (biopolímeros polares) o viceversa en caso de biopolímeros no polares. Cuando se alcanza cierto contenido crítico de alcohol las moléculas proteicas en solución tienden a autoensamblarse espontáneamente conduciendo a la formación de agregados [15], [22]. 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 evitar la agregación adicional. Es una técnica ampliamente utilizada para producir nanopartículas con fines farmacéuticos [14].

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 [14], [22]. Esta técnica será descrita con más detalle en el Capítulo 2 de la presente tesis.

Secado: El secado *spray* es ampliamente utilizado en la industria alimentaria para la encapsulación de sabores, vitaminas, minerales, colores y aceites. Las soluciones y suspensiones de CBs y biopolímeros se atomizan en finas gotas que se introducen en una corriente de aire caliente que genera la evaporación rápida del solvente lo que finalmente conduce a la formación de microesferas o microgeles [22]. Los diámetros de partícula obtenidos varían entre 1 y 10 μm . Las propiedades de las partículas pueden controlarse mediante la manipulación de la velocidad de flujo de aire, concentración de solutos, temperatura y método de atomización. El secado *spray* utiliza dispersiones a base de agua y, por lo tanto, evita el uso de solventes orgánicos.

Otra técnica de secado es la liofilización, siendo adecuada para la deshidratación de materiales y aromas sensibles al calor. Es una técnica de varios pasos que implica congelación, sublimación y desorción. En general, las muestras liofilizadas son fáciles de reconstituir y tienen una larga vida útil. Sin embargo, los principales inconvenientes son la gran cantidad de energía requerida y el tiempo de secado prolongado. Además, la liofilización generalmente conduce a muestras secas con una porosidad razonablemente alta, lo que afecta significativamente la estabilidad del componente encapsulado y la eficiencia de encapsulación (EE) y retención [14].

Formación de geles fluidos: las partículas de gel fluidas se forman mediante la aplicación de fuerzas de corte en una solución de biopolímero que se somete a gelificación [23], lo que dificulta su clasificación como un método puro *top-down* o *bottom-up*. El proceso de gelificación debe ocurrir de manera uniforme en todo el sistema para producir partículas con una distribución estrecha de tamaño. Las partículas producidas pueden deformarse fácilmente y tener una forma irregular. Estas suspensiones de partículas a menudo encuentran aplicación como sustitutos de grasa, ya que muestran propiedades reológicas específicas que pueden estar relacionadas con la microestructura e interacción de las partículas [14].

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 se produce 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 [15], [24]. 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 su 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 punto isoeléctrico (pI) de la proteína y una fuerza iónica baja. Luego se promueve la asociación proteica mediante el ajuste de pH hacia un valor cercano al pI o añadiendo contraiones mono o divalentes como NaCl y CaCl₂, respectivamente. El componente hidrofóbico a encapsular se puede mezclar con la solución de proteína desnaturalizada térmicamente, antes o después de la formación de las partículas [15].

El empleo de agregados proteicos obtenidos térmicamente para el desarrollo de nanovehículos resulta interesante debido a que la capacidad de unir CBs hidrofóbicos

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 del CB por unidad de masa de proteína [25]. En este sentido, un estudio de la unión de linoleato y β -lactoglobulina (BLG) en forma nativa, como dímero y como nanopartícula reveló que el número de moléculas de linoleato unidas por monómero de BLG (n) aumentó con el grado de agregación (nativa < dímero < nanopartícula), aunque la constante de asociación (K_a) para cada conjunto de sitios de unión permaneció similar. Los dímeros covalentes fueron producidos por calentamiento a 80°C durante 30 min de una solución de BLG (5 g/L) en buffer Bis-Tris pH 6,7 en presencia de CuCl_2 . Por otro lado, las nanopartículas fueron producidas por calentamiento a 85°C durante 15 min de una solución de BLG (10 g/L) pH 5,9 [25]. Sin embargo, en otro trabajo, los agregados de BLG se obtuvieron a 85°C variando el tiempo de calentamiento (0-60 min) y el pH de la solución proteica (6,5-7,5). Los agregados obtenidos a pH 6,5 mostraron los mayores valores de hidrofobicidad superficial, por lo que se esperaba una mayor unión del CB ácido linoleico (LA). Sin embargo, la unión de los agregados de BLG a LA mostró un comportamiento complejo dependiendo de las condiciones de producción del agregado (pH, tiempo de calentamiento y/o la combinación de ambos). Las propiedades de unión del agregado de BLG a LA no se vinculó a sus características hidrofóbicas, lo que sugirió que la conjugación podría requerir cierto grado de preservación estructural del sitio de unión a LA [26]. Otro ejemplo es la producción de nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) por calentamiento térmico [27]. En este trabajo se estudió la formación de nanopartículas de BSA usando dos concentraciones diferentes: 0,1 g/L y 0,4 g/L, dos temperaturas de calentamiento: 70 y 85°C por 5 min y dos condiciones de pH: 9,0 y 11,0. Los autores determinaron que el aumento en la temperatura de calentamiento generó nanopartículas de mayor tamaño y peso molecular (PM); en cuanto al pH, observaron que a mayor pH las nanopartículas poseían menor tamaño. Posteriormente, estudiaron la capacidad de unir el CB crisina mediante el cálculo del número de moléculas de crisina unidas a las nanopartículas y hallaron que cuanto mayor era n , mayor era la EE, siendo la mayor EE para la nanopartícula producida a pH 9,0 y 85°C [27].

1.5. Caracterización de nanopartículas

Las características fisicoquímicas y morfológicas de las nanopartículas determinan su comportamiento y estabilidad dentro de las matrices alimentarias y del TGI. Por lo tanto, un aspecto importante de las investigaciones sobre la producción de partículas de biopolímeros sería caracterizar e informar respecto de sus propiedades. Los métodos analíticos para caracterizar adecuadamente las partículas se detallan a continuación [14].

Tamaño: El tamaño es una de las características más importantes de las nanopartículas y es determinado por métodos como la dispersión de luz estática (SLS) o dinámica (DLS) y por diferentes técnicas de microscopía [14]. Típicamente, la SLS es adecuada para partículas que son relativamente grandes ($d > 100$ nm), mientras que la DLS es adecuada para partículas que son relativamente pequeñas ($d < 10.000$ nm). La microscopía óptica convencional es adecuada para el análisis de partículas relativamente grandes ($d > 1.000$ nm), mientras que la microscopía electrónica y de fuerza atómica (AFM) son más adecuadas para partículas más pequeñas, en escala nanométrica. Generalmente se utilizan dos modos diferentes de microscopía electrónica: microscopía electrónica de barrido (SEM), donde las muestras son típicamente congeladas, secadas o fracturadas y recubiertas con una fina capa de metal; y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde la preparación de la muestra es generalmente más suave, aunque los sistemas de biopolímeros normalmente son tratados con un agente de contraste. En el caso de AFM, generalmente se requieren métodos de preparación de muestras más suaves que reducen sustancialmente el riesgo de dañar o alterar las mismas [22].

Carga eléctrica: La carga de las partículas a menudo se informa como el potencial ζ , que se mide mediante la aplicación de un campo eléctrico y el análisis de la movilidad electroforética resultante de las partículas cargadas [22]. El potencial ζ es altamente sensible al pH y a la fuerza iónica. La carga de las partículas de biopolímeros es un parámetro crucial para predecir su estabilidad coloidal. La carga eléctrica en partículas individuales influye fuertemente en la agregación de las mismas o en si se mantienen separadas. Si la carga es suficientemente grande, habrá una alta repulsión electrostática entre ellas que puede evitar su agregación. La carga de las partículas también influye en cómo interactúan con otras especies cargadas en el medio circundante. Si una partícula de biopolímero tiene una carga opuesta a la de otro biopolímero dentro de un alimento, entonces puede formar un complejo electrostático que puede precipitar y sedimentar. La carga también determina cómo

interactúan las partículas de biopolímeros con las diferentes superficies del sistema digestivo humano. Una partícula de biopolímero catiónico puede unirse a la superficie aniónica de la lengua, causando así una astringencia que puede ser percibida [15].

Morfología: La morfología de las partículas y el estado de agregación generalmente se estudian usando alguna forma de microscopía. Como se describió anteriormente, la microscopía óptica convencional se puede usar para estudiar micropartículas ($d > 1000$ nm). Las subestructuras de las partículas se pueden visualizar mediante tintes o sondas fluorescentes que se asocian selectivamente con un componente en la suspensión de partículas o que se han unido covalentemente a uno de los componentes antes de la producción de las partículas. La microscopía confocal láser de barrido (CLSM) también se puede utilizar en muestras fluorescentes y generalmente proporciona una imagen de mejor calidad. En el caso de SEM se puede obtener información sobre las características de la superficie, como la composición y el relieve, mientras que la morfología interna de las partículas se puede estudiar con TEM después de la fijación, deshidratación y corte. En el caso de AFM, es útil para observar la topología superficial de nanopartículas y micropartículas, su resolución es en el rango de los nm y se puede obtener información tridimensional [14], [22].

Composición y estado físico: Resulta un desafío determinar la composición de las partículas y la distribución del CB 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 [14], [22]. La espectroscopia Raman puede también proveer información sobre la presencia del CB u otro componente dentro de las partículas. 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 [14], [22].

Propiedades ópticas: la apariencia es uno de los atributos más importantes de las partículas cuando se considera agregarlas en un producto alimenticio. Dado que las partículas de biopolímero a menudo interactúan con la luz, la incorporación de estas partículas en los alimentos puede afectar sus propiedades ópticas. La apariencia general de un alimento se puede separar en dos atributos principales: (i) opacidad, que se determina principalmente por la dispersión de la luz; y (ii) color, que se

determina principalmente por la absorción selectiva de determinadas longitudes de onda (λ) de la luz. El impacto general de las partículas de biopolímero en las propiedades ópticas de un alimento depende de su concentración, tamaño e índice de refracción [28]. En general la turbidez u opacidad aumentará a medida que aumente el tamaño de las partículas en solución y a medida que aumente el contraste del índice de refracción entre la partícula y su medio circundante. El impacto de las partículas de biopolímero en las propiedades ópticas tiene importantes consecuencias cuando se considera su uso en diferentes tipos de alimentos. Por ejemplo, algunos productos como las bebidas transparentes deben ser transparentes, mientras que otros productos como el yogur y los aderezos cremosos deben ser opacos. Al controlar el tamaño y el índice de refracción de las partículas de biopolímero, éstas se pueden incorporar a los alimentos sin afectar las propiedades ópticas. Por lo tanto, pequeñas partículas de biopolímero ($r < 25$ nm) deben usarse para alimentos y bebidas transparentes, ya que estas partículas no dispersan en gran medida la luz, mientras que las partículas de biopolímero más grandes (r en el rango de 200-1.000 nm) deben usarse para productos opacos dado que estas partículas dispersan la luz fuertemente [15].

Capacidad de carga, EE y retención: Cuando se evalúa la aptitud de las nanopartículas biopoliméricas (NPB) como sistemas de encapsulación para un CB específico, los factores de interés más importantes son la capacidad de carga y la EE. La capacidad de carga se define como el porcentaje de masa de CB contenido en las partículas en relación a la masa total del sistema; mientras que la EE se define como el porcentaje de masa del CB contenido en las partículas en relación a la masa total de CB en el sistema (dentro y fuera de las partículas). La retención se define como el porcentaje de CB contenido en la partícula en un tiempo determinado en relación al tiempo inicial o luego de someterlo a algún proceso como digestión enzimática [14], [22]. Los mecanismos más comunes por los cuales se produce la liberación del CB son: difusión, hinchamiento, disociación, erosión y/o degradación. Por lo general, las partículas se rompen o comienzan a desintegrarse bajo ciertos factores externos, por ejemplo, cambios de pH, fuerza iónica y temperatura, actividad enzimática o fuerzas mecánicas [14], [22].

1.6. Materiales utilizados para la producción de nanopartículas para alimentos

La selección de proteínas, PSs y otros componentes particulares para formar NPB depende de varios factores: (i) la capacidad de los componentes para

ensamblarse en partículas, (ii) el requisito funcional para las partículas (por ejemplo, tamaño, carga y estabilidad frente a determinadas condiciones ambientales), (iii) estado legal para su uso, costo, facilidad de uso y consistencia de los ingredientes y las operaciones de procesamiento [15]. Adicionalmente, 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 PSs serían particularmente útiles. Las proteínas pueden ser usadas en forma nativa o modificada física, química o enzimáticamente para modular sus atributos funcionales. Las mismas pueden ser de fuentes animales o vegetales. Dentro de las animales se destacan las albúminas, caseína, gelatina, proteínas del suero lácteo, entre otras; mientras que en las de origen vegetal, las gliadinas, zeínas, proteínas de la soja, etc. [15], [22]. Los PSs al igual que las proteínas pueden modificarse. Dentro de ellos se destacan las pectinas, alginato, quitosano, diferentes gomas, entre otros [15], [22].

1.7. Proteínas

Las proteínas son biopolímeros lineales compuestos de aminoácidos en configuración α -L unidos entre sí por enlaces peptídicos. En la naturaleza, se encuentran comúnmente 20 aminoácidos diferentes que se pueden clasificar de acuerdo con las propiedades de sus grupos laterales como alifáticos, aromáticos, cargados (positivos o negativos) o polares [22]. La estructura molecular de una proteína dependerá de la secuencia de aminoácidos y de las condiciones ambientales como exposición a diferentes temperaturas, presión, presencia de solventes, pH y fuerza iónica. Las proteínas tienden a adoptar una estructura tal que minimice la energía libre global del sistema [15]. Para la utilización de las proteínas en la producción de sistemas de *delivery* deben conocerse algunas características fisicoquímicas como su T_m , pI , perfil de potencial ζ versus pH, sensibilidad a iones mono o multivalentes y susceptibilidad a las enzimas. Estas características permitirán establecer condiciones que promuevan la asociación de moléculas proteicas entre sí o con otras moléculas no proteicas [15].

Las proteínas presentan grandes ventajas sobre otros materiales para ser utilizadas como sistemas de encapsulación en alimentos, entre ellas, su biocompatibilidad, no toxicidad, biodegradabilidad, abundancia y bajo costo [16]. Otra característica importante de las proteínas es que son anfifílicas (resultado de la

distribución de los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en su secuencia), lo que permite la formación de complejos de inclusión con ligandos hidrofóbicos, permitiendo la vehiculización de los mismos [29]. Mediante el ensamblaje y el atrapamiento de ligandos hidrofóbicos dentro de un biopolímero anfifílico como las proteínas, un CB pobremente soluble en agua se solubiliza de manera efectiva, ya que los dominios hidrofílicos del polímero tienden a apuntar hacia el agua y el CB hidrofóbico es adsorbido en dominios hidrofóbicos del polímero. Además de la solubilización, el atrapamiento dentro de una partícula anfifílica confiere una protección significativa al CB atrapado [29]. Dentro de las proteínas más estudiadas en la unión a ligandos hidrofóbicos se encuentra la BLG [30], [31] y la BSA [32], entre otras, ya sea en su forma nativa o formando nanopartículas. Sin embargo, una de las proteínas que no ha sido extensamente estudiada en este sentido es la ovoalbúmina (OVA), la cual es objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

1.8. Ovoalbúmina: características generales

La OVA es la proteína más abundante de la clara de huevo y la que contribuye principalmente 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 [33], [34] y es la principal responsable de las propiedades funcionales de la clara, tales como la capacidad gelificante, espumante, emulsionante y de retención de agua [34]. 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 [35].

La OVA es una proteína globular (Fig. 3) que está constituida por 385 aminoácidos, de los cuales la mitad son hidrofóbicos y la tercera parte son cargados, mayormente ácidos, confiriéndole un pI de 4,5. Posee un PM de 43 kDa y diámetro hidrodinámico (d_H) 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 macromolécula [35]. 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) [36], [34]. Los sitios de fosforilación son Ser68 y Ser344. La proteína posee, además, una cadena hidrocarbonada simple que representa un 3% del peso y está covalentemente unida al nitrógeno amido de Asn292 [33]. Casi toda la cadena polipeptídica está implicada en una estructura secundaria bien definida, con tres láminas β , nueve hélices α y tres segmentos helicoidales cortos de tres a cuatro residuos [37].

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, por ejemplo, térmicamente. A su vez, la especie nativa puede estar formada por una fracción N1 y otra N2. Esta última puede desnaturizarse, pero no agregarse. La cantidad de S-OVA dependerá del tiempo de almacenamiento y del pH interno de los huevos [38]. Debido a aspectos estructurales, la OVA se incluye en la superfamilia de las serpinas (inhibidoras de serin-proteasas), la cual incluye más de 300 miembros homólogos que comparten una estructura terciaria común, aunque la OVA no presenta efecto inhibidor de proteasas [36], [39].

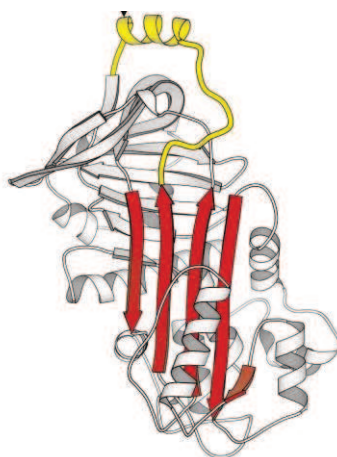


Figura 3. Estructura terciaria de la OVA (Figura modificada de [Huntington y Stein, 2001 \[40\]](#)).

1.9. Antecedentes de desnaturización y agregación térmica de ovoalbúmina

Como se mencionó anteriormente, a partir de proteínas globulares se pueden formar nanopartículas simplemente calentando sus soluciones. Estas proteínas se despliegan por arriba de su T_m , exponiendo así los grupos hidrofóbicos normalmente ocluidos en su interior. Como resultado, las proteínas comienzan a agregarse a través de interacciones hidrofóbicas y formación de SS [41]. El proceso de agregación es irreversible y puede detenerse reduciendo rápidamente la temperatura. La fuerza iónica, el pH y la temperatura influyen fuertemente en la desnaturización y agregación de las proteínas globulares y, por lo tanto, en el tamaño de las partículas producidas. El tamaño de partícula generalmente aumenta al aumentar la fuerza iónica, la concentración de proteínas, la temperatura y el tiempo de calentamiento. Las partículas tienden a ser más pequeñas cuando se producen a un pH alejado del pI de la proteína [22].

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 [35]. 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 agregación [34]. Debido a la desnaturalización, pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas y exposición de SH, los cuales pueden formar SS, a través de una reacción irreversible [38].

La siguiente ecuación se detalla para describir el proceso de desnaturalización térmica irreversible de una proteína [38]:



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 [38]. Se sabe que la temperatura de desnaturalización de OVA es 80,1°C [42].

En lo que respecta al proceso de desnaturalización térmica de OVA se sabe, en base a diferentes estudios, que la cinética de desnaturalización (tiempo medio de reacción) es independiente de la concentración de proteína (en el rango de 0,1-60 g/L) y de NaCl (3-100 mM), pero fuertemente dependiente de la temperatura. A 80°C, el 50% de la proteína se desnaturaliza y agrega en menos de 2 min, mientras que a 68,5°C este proceso tarda aproximadamente 6 h [38]. Además, se encontró 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. Es importante aclarar que los autores encontraron que la OVA preparada a partir de diferentes lotes de huevos dio como resultado diferentes cantidades de SI-OVA, pudiendo esto relacionarse con el tiempo de almacenamiento, ya que el aumento del tiempo de almacenamiento da como resultado un incremento de la fracción SI [38].

Según las condiciones del medio, la agregación proteica inducida por tratamiento térmico puede dar lugar a la formación de un gel. Por ejemplo, las soluciones de OVA a pH 7,0 calentadas a 78°C durante 20 h y a baja fuerza iónica (NaN_3 3,0 mM) gelifican a una concentración mayor a 60 g/L, mientras que para alta fuerza iónica

(NaCl 0,1 M) gelifican a una concentración mayor a 12 g/L [34]. Calentando por debajo de la concentración de formación del gel pueden formarse agregados de diferentes tamaños y morfologías, dependiendo de las condiciones del medio [43]. En este sentido, se sabe que al calentar soluciones de OVA (20 g/L) a 80°C por 6 h a diferentes pH y fuerzas iónicas se obtienen diferentes morfologías, entre ellas: agregados lineales (utilizando pH 9,0 y NaCl 0,03 M con un tamaño medio resultante de 33 nm), lineales ramificados (a pH 7,0 y NaCl 0,03 M con un tamaño medio de 16 nm), esféricos (pH 7,0 y NaCl 0,3 M cuyo tamaño medio fue 30 μ m) y esféricos aglomerados (pH 5,0 y NaCl 0,8 M con tamaño medio de 80 μ m). Este comportamiento se puede explicar por efecto de la fuerza iónica y el pH sobre las interacciones electrostáticas y la carga neta, respectivamente. A pH cercano al pI, la carga neta se aproxima a cero 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 menores tamaños [43]. Croguennec y col. (2007) [35], produjeron agregados de OVA en un rango de tamaño de 67-272 nm al calentar soluciones de OVA (10 g/L; pH 7,0; NaCl 50 mM) durante 5, 10, 20 y 40 min a 80°C. Los autores hallaron que a mayor tiempo de calentamiento mayor era el tamaño de los agregados obtenidos. 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 mediante fluorescencia extrínseca, destacándose que luego de 5 min de calentamiento, un aumento en el tiempo de calentamiento no generó un aumento adicional en la fluorescencia extrínseca [35]. Al estudiar los SH libres, los autores observaron que luego de 5 min de calentamiento, el 65% de los SH de la proteína habían sido expuestos, mientras que luego de 40 min este porcentaje aumentaba a 75%. Esto hace concluir a los autores que en muestras de OVA tratadas térmicamente, la polimerización de las moléculas de OVA es impulsada principalmente por reacciones de intercambio SH/SS que conducen a grandes estructuras macromoleculares en comparación con las moléculas de OVA nativa [35]. En el mismo sentido, otro estudio donde se calentó la OVA a 80°C por un periodo de 0-10 días mostró que el número total de grupos SH decreció gradualmente al aumentar el tiempo de calentamiento, mientras que los grupos SH en la superficie de OVA aumentaron gradualmente. Estos resultados sugieren que la exposición de grupos SH en la superficie de OVA y el posterior intercambio de grupos SH/SS puede suceder simultáneamente durante el calentamiento lo que resulta en una polimerización debido a la formación de SS junto con interacciones hidrofóbicas [42].

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha realizado estudios relacionados al diseño y producción de nanopartículas basadas en OVA. En este

sentido, se obtuvieron agregados de OVA inducidos por tratamiento térmico controlado a diferentes temperaturas (60, 70 y 80°C), tiempos de calentamiento (3, 5 y 10 min), pH del medio acuoso (5,5; 6,0 y 6,5) y concentración de proteínas (5, 10 y 14,2 g/L) [24]. A partir de los mismos, se sabe que el tamaño de los agregados de OVA aumentó tanto con el aumento del tiempo como con la temperatura de calentamiento. Cabe resaltar que para la temperatura de 60°C no se observó la formación de agregados para ningún tiempo de calentamiento. El pH del medio acuoso durante el calentamiento también es un factor clave en el tamaño de partícula y en la morfología de los agregados proteicos, porque modulan la magnitud de las interacciones intermoleculares entre las proteínas [43]. A pH 5,5; se observaron agregados en el orden micrométrico (2.107-4.077 nm), esto podría deberse a que las macromoléculas de OVA están cercanas a su pI (4,5) con una carga neta baja y, en consecuencia, una repulsión electrostática reducida entre las mismas. Esta condición induce a las macromoléculas de proteínas a acercarse y, en consecuencia, promover agregados de OVA de altos tamaños moleculares. Por otro lado, el pH 6,5 generó agregados del orden nanométrico (76-192 nm). Este pH está más alejado del pI de la proteína, por lo que la repulsión electrostática entre macromoléculas de OVA sería mayor y promovería la formación de agregados de menor tamaño [24]. Otra variable importante en la formación de agregados proteicos es la concentración de proteína. En general, se observó que un aumento en la concentración de proteína causaba agregados de mayor tamaño. Este resultado se atribuyó a que el tamaño del agregado proteico estaría influenciado por el número inicial de moléculas de proteína durante el tratamiento térmico. Otra determinación fue la hidrofobicidad superficial mediante medidas de fluorescencia extrínseca utilizando la sonda ácido 1-anilino naftalen 8-sulfónico (ANS). Se encontró que los agregados producidos a 80°C y 5 min de calentamiento, presentaron la mayor hidrofobicidad superficial lo que podría implicar una mayor unión a CBs hidrofóbicos [24]. Finalmente, se estudió la capacidad de unir un CB hidrofóbico modelo, como el LA, mediante la absorbancia (ABS) a 400 nm (turbidez). La capacidad de unión de LA por OVA fue alrededor del 34%, mientras que la capacidad de unión de LA para las diferentes nanopartículas de OVA obtenidas estuvo en el rango de 49-69%, es decir, 1,4-2,0 veces mayor que la capacidad de unión de OVA. La menor capacidad de unión de LA por OVA se explicó en términos de los grupos hidrofóbicos ocluidos, menos disponibles para la unión de LA. La capacidad de unión más alta fue para la nanopartícula de OVA de menor tamaño, atribuyéndose esto al área superficial específica de la nanopartícula, es decir, un tamaño mayor generaría un área superficial específica menor para la unión de LA y, por el contrario,

un tamaño más pequeño produciría una superficie específica más alta y una mayor unión de LA [24].

Posteriormente, en base a los resultados anteriores, una solución de OVA de 10 g/L en NaCl 50 mM y pH 7,5 se trató térmicamente a 75, 80 y 85°C durante 0, 5, 10, 15 y 25 min, obteniéndose nanopartículas proteicas en el orden de 100 nm [20]. En este trabajo se observó que la mayor hidrofobicidad superficial se hallaba para los agregados formados a 80°C y 5 min de calentamiento, seguido de aquellos formados a 85°C y 5 min de calentamiento. Además, se determinó la K_a mediante fluorescencia intrínseca para las nanopartículas producidas y el LA, obteniéndose el mayor valor para aquellas producidas a 85°C y 5 min. En base a esto, se concluyó que la capacidad de las nanopartícula de OVA para unir LA dependería no solo de la hidrofobicidad superficial, sino también de características estructurales de la nanopartícula, como puede ser la disponibilidad de sitios hidrofóbicos en la superficie o en la estructura interna de los agregados, capaces de acomodar las moléculas de LA [20].

Finalmente, se estudió la cinética de unión de LA a la nanopartícula de OVA obtenida a pH 7,5 por tratamiento térmico a 85°C durante 5 min [21]. El estudio de curvas de turbidez en función del tiempo para diferentes relaciones nanopartícula de OVA/LA, y su ajuste a un modelo cinético de pseudo-segundo orden permitió establecer un modelo para la formación de los nanocomplejos de inclusión de dos etapas: i) la disrupción de las estructuras supramoleculares de LA que tendría lugar debido a la migración de las moléculas de LA de dichas estructuras al medio y ii) la adsorción de los monómeros de LA a la nanopartícula de OVA [21]. Más aun, el estudio de los parámetros termodinámicos como energía libre (ΔG^0), entalpía (ΔH^0) y entropía (ΔS^0) permiten describir la naturaleza de las interacciones entre la nanopartícula y el LA. Los valores positivos de ΔH^0 hallados por los autores indican que la adsorción del LA a la nanopartícula corresponde a un proceso endotérmico, mientras que los valores negativos de ΔG^0 y menores a -10 kJ/mol, para diferentes temperaturas, sugieren la naturaleza espontánea del proceso de adsorción a través de un mecanismo físico. Más aun, los valores positivos de ΔH^0 y ΔS^0 sugieren que el LA se absorbe a la nanopartícula de OVA por interacciones hidrofóbicas. Además, al evaluar el término $\text{Temperatura} \cdot \Delta S^0$, fue más grande en magnitud que el término ΔH^0 , por lo que el proceso de adsorción sería conducido entrópicamente, es decir, que las moléculas de solvente que rodean tanto a las moléculas de LA cómo a las de nanopartícula se disponen en una forma menos ordenada cuando toma lugar el proceso de adsorción vía interacciones hidrofóbicas [21].

En otro estudio, se llevó a cabo una caracterización extensa del mecanismo de unión e interacción entre la OVA y el CB curcumina encontrando una gran mejora en la solubilidad en agua y en la actividad antioxidante del CB después de la formación del nanocomplejo de inclusión. Además, la degradación fotoquímica fue 30% menor para el nanocomplejo con OVA respecto a la curcumina libre [44], [45]. Esto demuestra que la proteína nativa también tiene la capacidad de solubilizar/vehicular CBs hidrofóbicos y no solamente sus nanopartículas agregadas.

1.10. Compuestos bioactivos

Un CB es un compuesto que tiene la capacidad y la habilidad de interactuar con uno o más componentes del tejido vivo al presentar una amplia gama de posibles efectos sobre la salud. El origen de estas sustancias puede ser natural: terrestre o acuático; una fuente vegetal, animal u otra (por ejemplo, microorganismos) o sintética: parcial o totalmente [46]. Como se deduce de esta definición existe un enorme número de CBs, entre ellos podemos nombrar diferentes vitaminas, PUFAs, compuestos fenólicos (como flavonoides, taninos, ácidos fenólicos entre otros), etc. Dentro de esta gama de compuestos con acciones sobre la salud humana son de particular interés aquellos compuestos hidrofóbicos o insolubles en agua que muchas veces son sensibles a diferentes factores ambientales como la luz y el O₂ haciendo necesaria su encapsulación tanto para solubilizarlos como para protegerlos. A continuación, se describen algunos de ellos y se dan ejemplos de compuestos que han sido estudiados en relación a su capacidad de formar nanocomplejos con proteínas.

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 protegidas frente a la temperatura, la luz, los radicales libres y el O₂. La encapsulación también puede favorecer una mayor eficiencia de administración, permitiendo dosis más pequeñas y disminuyendo así posibles síndromes de hipervitaminosis y efectos secundarios [47]. Existen numerosos estudios de unión entre proteínas globulares y diferentes vitaminas, un ejemplo es la vitamina D que es una hormona esteroide y está involucrada en el metabolismo del Ca. Se han

desarrollado nanopartículas entre quitosano y proteínas de soja con una alta eficiencia (superior al 95%) para encapsular vitamina D3 y permitir su liberación controlada [48]. Otro ejemplo son las nanopartículas de zeína con quitosano obtenidas para la encapsulación de Vitamina D3 [49].

Polifenoles: Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas que generalmente están involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta (UV) o la agresión de patógenos. Su estructura molecular consta de varios anillos fenólicos. 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 estrés oxidativo, procesos inflamatorios, cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas [50]. Por lo tanto, existe un interés considerable en el uso de estos CBs como ingredientes nutraceuticos en productos alimenticios y bebidas. Sin embargo, la incorporación de estos CBs en productos comerciales actualmente está limitada por su baja solubilidad en agua, inestabilidad a cambios de pH, sensibilidad a la radiación UV y baja biodisponibilidad oral. En este sentido, se ha desarrollado una nanopartícula por tratamiento térmico de BLG a 70°C por 20 min con una EE de antocianinas del 45%. Las mismas mostraron una gran capacidad antioxidante y una protección de las antocianinas frente a la digestión gastrointestinal [51]. Otro ejemplo es la formación de nanopartículas de zeína por un método de precipitación para la encapsulación de timol y carvacrol, dos monoterpenos con actividad antimicrobiana. Las nanopartículas mostraron eficiencias de encapsulación muy altas (mayores al 92%) para ambos compuestos luego de 90 días de ser almacenadas a 20°C [52]. Ambos compuestos encapsulados mostraron una elevada actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* al desintegrar sus membranas plasmáticas [52].

Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs): Los PUFAs son AG que presentan más de una insaturación (C=C) en su cadena carbonada. Una descripción más detallada sobre ellos se desarrollará en el Capítulo 3 de la presente tesis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Reunir conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, que permitan la obtención y caracterización estructural de nanocomplejos de inclusión para el *delivery*, protección y liberación de compuestos bioactivos (CB) hidrofóbicos a partir de nanopartículas de ovoalbúmina (OVA) que puedan ser utilizados como potenciales agentes bioactivos.

2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudiar y caracterizar la formación de nanocomplejos de inclusión obtenidos por ensamblaje de OVA y sus nanopartículas derivadas con retinol (RET).

Objetivo 2: Estudiar y caracterizar la formación de nanopartículas biopoliméricas (NPB) entre los nanocomplejos de inclusión con RET y la pectina de alto metoxilo (PAM).

Objetivo 3: Caracterizar estructural y fisicoquímicamente los nanocomplejos de inclusión obtenidos por ensamblaje de OVA y sus nanopartículas derivadas con ácido linoleico (AL) y ácido linoleico conjugado (CLA).

Objetivo 4: Evaluar el comportamiento de los nanocomplejos de inclusión con CLA en condiciones gastrointestinales simuladas (*in vitro*).

Objetivo 5: Evaluar el comportamiento de los nanocomplejos de inclusión con CLA bajo un sistema de digestión gastrointestinal *in vitro* adecuado para regímenes diluidos y estudiar la actividad antitumoral *in vitro* de los mismos.

3. CAPÍTULO 1

Formación de nanocomplejos de inclusión entre ovoalbúmina y retinol: caracterización y estabilidad fotoquímica de retinol

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo dispar de compuestos, tienen poco en común químicamente o en sus funciones metabólicas. Nutricionalmente, forman un grupo cohesivo de compuestos orgánicos que se requieren en la dieta en pequeñas cantidades (μg o mg por día) para mantener la salud normal y la integridad metabólica [53]. Para que un compuesto se considere una vitamina, se debe demostrar que es un componente esencial de la dieta. Su eliminación, debe dar como resultado una enfermedad por deficiencia claramente definida, y la restauración debe curar o prevenir esa enfermedad. [53].

Existen dos grandes grupos de vitaminas: las solubles en agua (B_1 o tiamina, B_2 o riboflavina, B_3 o niacina, B_5 o ácido pantoténico, B_6 o piridoxina, B_8 o biotina, B_9 o ácido fólico, B_{12} o cianocobalamina y C) y las solubles en lípidos (A, D, E y K). Cada vitamina cumple una función determinada en el organismo humano y tanto su deficiencia como su exceso generan diferentes patologías.

3.1.2. Vitamina A o retinol: características generales y función biológica

El retinol (RET) o la vitamina A (Fig. 4) se encuentra sólo en el reino animal, principalmente en el hígado, así como en la leche, el huevo, el pescado, etc. En los vegetales no existe como tal, pero sí como sus provitaminas o precursores carotenoides, siendo el β -caroteno el más importante. En el proceso de conversión del β -caroteno en vitamina A sólo se alcanza el 50% de transformación, por esto el β -caroteno, que es la provitamina más activa, sólo tiene el poder del 50% de la vitamina A. La recomendación de consumo diario, corresponde a 0,3 mg de vitamina A o a 0,6 mg de β -caroteno [54] aunque este valor depende del sexo y la edad y varía según la recomendación de diferentes países [53]. La Organización Mundial de la Salud recomienda una ingesta diaria de 0,6 mg de vitamina A para hombres y mujeres entre 10 y 65 años siendo este valor mayor para mujeres embarazadas o adultos mayores a 65 años [53].

Químicamente, el RET está compuesto de tres dominios estructurales: un anillo β -ionona, una cola isoprenoide y un grupo polar final. La estructura de dobles enlaces conjugados lo hace susceptible a la isomerización, oxidación y degradación. El RET es biológicamente inerte y ejerce sus funciones biológicas dando lugar a metabolitos activos [55]. Es un compuesto soluble en grasa que es crítico para el desempeño

correcto de muchos procesos biológicos, incluyendo la visión, el crecimiento fetal, la respuesta inmune, la diferenciación y proliferación celular, y desempeña un papel importante en diferentes patologías [56], [57]. Es el precursor inmediato de dos importantes metabolitos activos o retinoides: el retinal, que desempeña un papel clave en la visión; y el ácido retinoico (AR), que sirve como un mensajero intracelular en la transcripción de genes [55]. *In vitro*, y en animales de experimentación, el RET tiene una acción anticancerígena relacionada con su papel en la modulación de la expresión génica y la diferenciación de tejidos. Retrasa el inicio y el crecimiento de algunos tumores, sin embargo, solo muestra estos efectos antitumorales a niveles tóxicos para el ser humano [58].

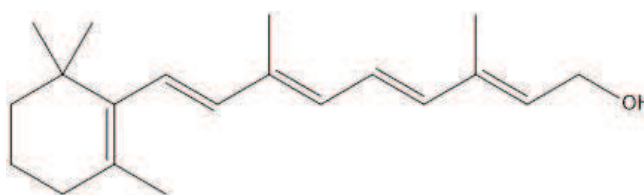


Figura 4. Estructura de RET o vitamina A (Figura modificada de Dergal, 2006 [54]).

Aunque no se conoce totalmente su función biológica, su carencia inhibe el crecimiento, produce endurecimiento de epitelios en diferentes partes del cuerpo, principalmente de los sistemas respiratorio, visual, reproductivo y urinario, y afecta las estructuras ósea y dental [55]. La deficiencia de RET es un problema grave de nutrición en salud pública y es probablemente la causa más importante de ceguera prevenible entre los niños en los países en desarrollo. Su deficiencia es un factor significativo en la susceptibilidad infantil a la infección y, por lo tanto, en la morbilidad y mortalidad en los países en desarrollo [58]. La deficiencia leve resulta en una adaptación deteriorada a la oscuridad, pero a medida que la deficiencia progresa produce ceguera nocturna. Una deficiencia más prolongada y grave conduce a la xerosis conjuntival: metaplasia escamosa y queratinización de las células epiteliales de la conjuntiva con pérdida de células caliciformes en la mucosa conjuntival, lo que provoca sequedad, arrugas y engrosamiento de la córnea (xeroftalmia). A medida que la deficiencia progresa, se produce queratinización de la córnea. En esta etapa, la condición aún es reversible, aunque puede haber cicatrices residuales. La siguiente etapa es la ulceración de la córnea debido al aumento de la acción proteolítica, causando ceguera irreversible. Además de la conjuntiva, otros epitelios se ven afectados por una deficiencia moderada o leve de RET como por ejemplo una mayor permeabilidad intestinal a los disacáridos, seguido de una reducción en el número de células caliciformes y, consecuentemente, una reducción en la secreción de moco.

También se produce atrofia del epitelio respiratorio, nuevamente con pérdida de células caliciformes, seguido de queratinización, lo que deriva en una mayor susceptibilidad a las infecciones [58].

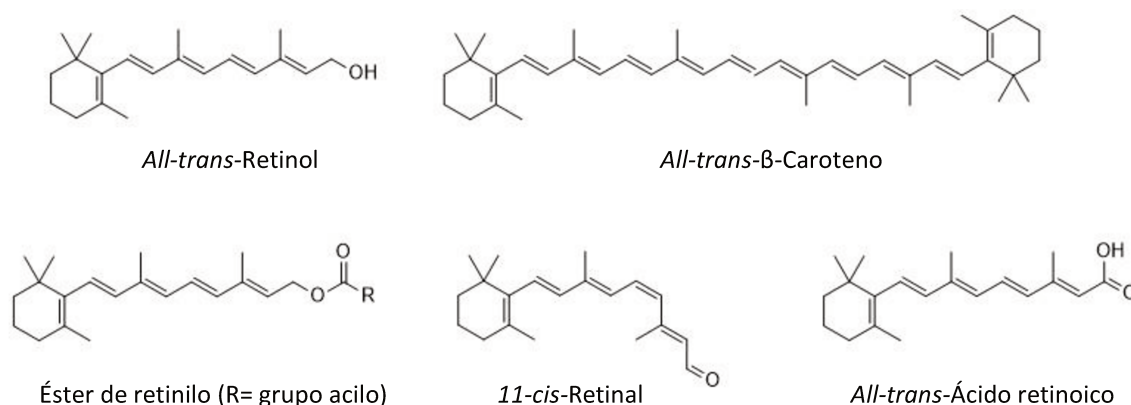
El exceso de RET puede generar toxicidad aguda y crónica. Agudamente, grandes dosis de RET (más de 300 mg en una sola dosis para adultos) causan náuseas, vómitos y dolor de cabeza, con aumento de la presión en el líquido cefalorraquídeo, signos que desaparecen en pocos días. La toxicidad crónica de RET es un motivo de preocupación más general. La ingesta prolongada y regular de más de 9,0 mg por día en adultos causa signos y síntomas de toxicidad que afectan la piel causando sequedad excesiva, descamación y agrietamiento; el sistema nervioso central generando dolor de cabeza, náuseas, ataxia y anorexia, todos asociados con un aumento de la presión del líquido cefalorraquídeo; el hígado causando hepatomegalia, hiperlipidemia y cambios histológicos en el hígado, incluido el aumento de la formación de colágeno; y los huesos provocando dolores articulares, engrosamiento de los huesos largos, hipercalcemia y calcificación de tejidos blandos, pero con densidad mineral ósea reducida [58].

Dado que el RET posee efectos benéficos sobre la piel, ya que es un factor en el control de la queratinización de la piel normal, ha sido utilizado principalmente en cosmética para el tratamiento tanto de arrugas, acné y discromía [59] como para el tratamiento de diferentes afecciones. Existen numerosas formulaciones y patentes sobre estos productos cosméticos. Algunos de ellos son: Accutane® basado en AR utilizado para el tratamiento de acné y psoriasis [58], cremas solares dado que absorbe radiación UV, cremas post-solares para la hidratación de la piel (Retinol Plus LACA®) y *serums* para el tratamiento de arrugas ya que influye en la correcta formación y desarrollo de células epiteliales y estimula la producción de colágeno manteniendo la turgencia, elasticidad y grosor cutáneo (Ultra Retinol Lidherma®). La mayoría de estas tecnologías se han desarrollado para aplicaciones cosméticas o farmacéuticas y su aplicación en productos alimenticios está poco caracterizada [60].

3.1.3. Metabolismo de retinol

La vitamina A tiene diferentes formas químicas en el organismo dependiendo de su ubicación y función: RET, ésteres de retinilo, retinal y AR (Fig. 5) [47]. El RET y los ésteres de retinilo son las formas retinoides más abundantes en el cuerpo. *All-trans*-RET es, por definición, vitamina A. Cuando un grupo acilo se esterifica en el extremo hidroxilo de RET, se forma éster de retinilo que es la forma de almacenamiento de RET. Los ésteres de retinilo no tienen actividad biológica conocida

aparte del almacenamiento de RET y como sustrato para la formación del cromóforo visual *11-cis*-retinal. El RET es una forma de transporte y una forma precursora, que se convierte mediante una enzima en AR a través de un proceso de oxidación de dos etapas. El papel principal del retinal es en el ojo para la formación de pigmento visual. En los tejidos, el retinal sirve como intermediario en la síntesis de AR a partir de RET [61].



5. Estructura química de RET, AR, retinal, éster de retinilo y β -caroteno (Figura modificada de O'Byrne y Blaner, 2013 [61]).

La vitamina A se ingiere principalmente como RET, ésteres de retinilo o moléculas pro-RET como β -caroteno (Fig. 5) [47]. Los ésteres de retinilo se hidrolizan en RET en el intestino, se incluyen en micelas mixtas y luego se absorben en los enterocitos mediante difusión pasiva o mediante el transportador específico *scavenger receptor class B type 1*. El RET se esterifica en los enterocitos antes de su inclusión en quilomicrones. Los ésteres de retinilo son la forma circulante de RET hasta los sitios de almacenamiento, que son principalmente hígado, riñones, tejido adiposo y células pulmonares. Cuando el RET se libera de los sitios de almacenamiento, forma un complejo con la proteína de unión a RET (RBP). El complejo RET-RBP es la forma circulante de RET. El RET se puede convertir en retinal, que participa en la visión nocturna. Su oxidación es catalizada por la retinal reductasa y produce AR. El AR regula la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis. También es un agente terapéutico utilizado para el tratamiento de leucemia, cáncer de piel y otras enfermedades [47].

Los seres humanos no pueden sintetizar RET, por lo que su ingesta debe realizarse a través del consumo de verduras y frutas (por ejemplo, batata, zanahoria, verduras de hojas verdes oscuras, calabaza, lechuga, melón, pimiento y frutas tropicales) ricos en carotenoides pro-RET [62]. Dado que los casos de deficiencia de RET generalmente se reportan en países en desarrollo es importante implementar

estrategias de fortificación de alimentos [63]. Sin embargo, la incorporación de RET en los mismos presenta dos desventajas: (i) su escasa solubilidad en agua, que lo hace generalmente incompatible con las matrices acuosas, y (ii) su alta sensibilidad a la luz y al O₂, lo que conduce a su descomposición fotoquímica, y en consecuencia, al deterioro de sus propiedades biológicas [64], [65], [66].

El mecanismo de descomposición de RET no está dilucidado completamente, pero se sabe que la λ y la intensidad de la luz con la que interactúa determina la velocidad de la reacción fotoquímica [67]. Un estudio mostró que el RET es más susceptible a la fotodegradación cuando se expone a λ menores de 400 nm, con una degradación máxima que se produce entre 330 y 350 nm [64]. Dichas λ se encuentran comúnmente en la luz natural del día. Se ha determinado que el RET es más sensible a la luz UV-A (315-400 nm) que a la luz UV-B (280-315 nm). Si bien los productos detectados después de la irradiación con luz UV-A y UV-B fueron los mismos, aparecieron con diferentes dosis de luz UV, en un orden diferente y en diferentes cantidades. La presencia de O₂ promueve la fotodegradación de RET y conduce a rutas fotoquímicas específicas [65]. Dentro de los compuestos hallados en la degradación frente a luz UV-A y UV-B se encuentran: kitol (Fig. 6a), que es un fotodímero de RET; anhidrovitamina A (Fig. 6b), que se forma tanto en presencia como en ausencia de O₂; compuesto desconjugado I (Fig. 6c), cuya formación no necesita la presencia de O₂ y es un derivado cíclico de RET; y compuestos desconjugados II (Fig. 6d-g), que dependen de la presencia de O₂ y son un derivado epóxido o peróxido de RET. Algunos de estos derivados pueden ser tóxicos, por ello la importancia de la preservación de RET [65].

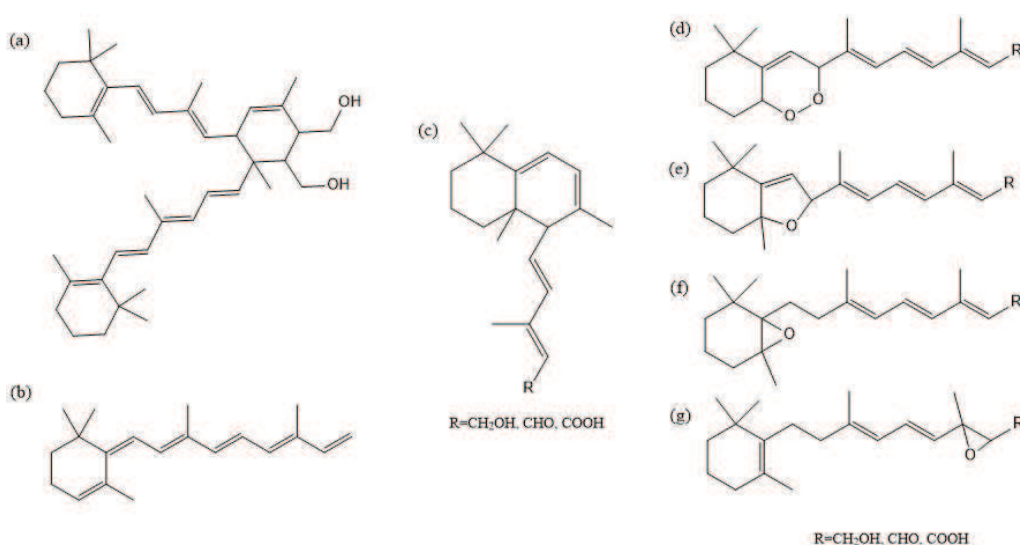


Figura 6. Estructura de los diferentes compuestos de descomposición de RET: kitol (a), anhidrovitamina A (b), compuesto desconjugado I (c) y compuestos desconjugados II (d-g) (Figura modificada de Failloux y col., 2004 [65]).

3.1.4. Encapsulación de retinol

Para evitar la degradación y favorecer la solubilidad de RET, se han implementado, por ejemplo, el desarrollo de emulsiones [68], micelas [30], SLN [69], liposomas [70], sistemas de polímero [71], etc. Estas tecnologías se han aplicado ampliamente en la industria cosmética/farmacéutica [60].

La capacidad para unir ligandos hidrofóbicos que muestran algunas proteínas globulares puede usarse como una estrategia para introducir RET en matrices alimenticias. En este sentido, las albuminas son las principales candidatas y han sido muy estudiadas. Entre ellas, la principal proteína del suero de la leche, la BLG muestra capacidad para unirse a RET. Esta unión se debe a fuerzas atractivas no covalentes, que involucran dominios particulares de la proteína. La proteína BLG tiene dos bolsillos hidrofóbicos que son potencialmente capaces de unirse a ligandos hidrofóbicos: uno en el cáliz y el otro en la superficie [72], [73]. Mediante estudios espectroscópicos y de *docking* se determinó que el RET y el AR comparten sitios de unión similares en el cáliz central de la BLG. Se observaron interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas en la complejación BLG-retinoide. Esta unión altera la estructura secundaria de la proteína principalmente de la lámina β y la estructura de giro que conduce a una desestabilización parcial de la proteína [72]. En este sentido se observó que el AR o el RET unido a la BLG se degradó más lentamente que los retinoides no unidos a la BLG durante 6 h de irradiación UV. En este estudio se comparó el nivel de descomposición frente a radiación UV durante 6 h para los complejos formados entre el RET y el AR con la BLG y la BSA. El nivel de descomposición de cada complejo se incrementó gradualmente con la irradiación de luz, siendo significativamente mayor para BSA-AR que para los otros complejos (30% vs. 10% de descomposición); además BLG-RET tuvo una descomposición un poco más baja que BLG-AR y BSA-RET. Estos valores obtenidos para los complejos fueron mucho más bajos que para la solución de RET libre que se descompuso aproximadamente un 55% después de 6 h. Es decir, el RET y el AR se volvieron más estables a la degradación fotoquímica formando complejos con BLG o BSA [74]. Por otro lado, se informó que la BLG protegió el RET durante la irradiación y la exposición a altas temperaturas o a pH ácido. La estabilidad de RET fue superior al 60% después de 5 h a 60°C (en comparación con 30% sin BLG). Más del 80% del RET inicial se mantuvo estable después de 5 h a 37°C y en un rango de pH de 3,0 a 9,0 [75].

Otra albumina ampliamente estudiada es la BSA y la albumina sérica humana (HSA) que poseen la capacidad de unirse al RET y al AR y mejorar significativamente su estabilidad durante el almacenamiento [76], [32]. De hecho, un estudio reveló que el

RET y el AR se unen fuertemente a las albúminas séricas formando complejos más estables con la BSA que con la HSA. La interacción de los retinoides con la BSA altera la estructura secundaria de la proteína, lo que conduce al desplegamiento de la proteína, mientras que la conformación de la HSA se estabiliza mediante la complejación con el RET y el AR [32]. Otro trabajo estudió la degradación luego del almacenamiento de RET y del complejo BSA-RET por HPLC. Los autores hallaron que en el caso del almacenamiento de RET solo, su contenido disminuyó rápidamente, alcanzando aproximadamente el 3% después de 7 h, y se observó una pérdida completa después de 28 h. Al unirse a la BSA, la estabilidad de RET mejoró significativamente con el tiempo de almacenamiento, más aún a medida que aumentaba la concentración de proteína. Cuando las concentraciones de BSA fueron de 3, 15 y 30 μM , los contenidos de RET fueron aproximadamente de 23%, 50% y 66%, respectivamente, después del almacenamiento durante 52 h y fueron de aproximadamente 1%, 6% y 9%, respectivamente, después del almacenamiento durante 628 h [76].

Con el fin de ampliar la aplicación de las estrategias de vehiculización de RET basadas en nanocomplejos de inclusión proteína-ligando, el presente capítulo se basa en la investigación de una proteína globular altamente disponible, la OVA como potencial vehículo de RET. La capacidad de la OVA para unirse al RET no ha sido estudiada previamente. De acuerdo a lo antes expuesto, el objetivo del primer capítulo es estudiar la obtención de nanocomplejos de inclusión formados por interacciones atractivas no covalentes entre el RET y la OVA o su nanopartícula inducida por tratamiento térmico. Además, se estudió el efecto de la formación de estos agregados nanométricos de OVA sobre la estabilidad fotoquímica de RET.

3.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

Objetivo 1: Estudiar la formación de nanocomplejos de inclusión de OVA y su nanopartícula derivada con RET.

Objetivo 2: Caracterizar mediante parámetros fisicoquímicos los nanocomplejos de inclusión obtenidos.

Objetivo 3: Evaluar la estabilidad fotoquímica de RET en los nanocomplejos de inclusión obtenidos frente a la luz y el oxígeno disuelto.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Materiales

Para los estudios desarrollados en la presente tesis se utilizó ovoalbúmina (OVA) como proteína globular modelo (producto A5503, pureza del 98% según electroforesis en gel de agarosa) y retinol (RET, producto 17772, pureza 95% según HPLC) adquiridos en Sigma-Aldrich (EE.UU.). El RET se mantuvo almacenado a -18°C bajo atmósfera de N_2 para evitar su oxidación. El ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) fue obtenido de Fluka Chemie AG (Suiza). Los reactivos analíticos adicionales fueron suministrados por Cicarelli (Argentina).

3.3.2. Formación de nanopartículas de ovoalbúmina y sus nanocomplejos con retinol

3.3.2.1. Formación de nanopartículas de OVA

Como se mencionó anteriormente se sabe que el tratamiento térmico induce la formación de agregados de OVA y, dependiendo de la magnitud de las variables del proceso, como el pH, la temperatura, la concentración y la fuerza iónica, muestran diferentes características conformacionales [38], [24]. Para el tratamiento térmico, se seleccionó una temperatura en torno a la temperatura de desnaturalización de OVA ($80,1^{\circ}\text{C}$) [42] en base a ensayos previos [24] con el fin de permitir la exposición de los residuos hidrofóbicos ocluidos que tiene lugar durante la desnaturalización térmica [35].

Se procedió de la siguiente manera para obtener la nanopartícula de OVA, llamada a partir de aquí OVA_{n2} en base al protocolo desarrollado por Sponton y col. (2015) [20]. Se preparó una solución de OVA de 10 g/L en NaCl 50 mM. Esta solución proteica se hidrató durante toda la noche a 4°C . Posteriormente, el pH se ajustó a 7,5 con NaOH 0,1 M. Luego, el sistema fue filtrado con una membrana de celulosa cuyo tamaño de poro fue $0,22\ \mu\text{m}$ (Merck Millipore, Alemania) con el fin de eliminar la existencia de posibles agregados proteicos. La concentración de proteína se verificó por espectroscopía de ABS a 280 nm (Jenway 7305, Reino Unido) usando un coeficiente de extinción molar de $0,712\ \text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [35]. Se dispensaron alícuotas de 2 mL en tubos de vidrio y se calentaron en un baño de agua a 85°C durante 5 min. Finalmente, se retiraron los tubos y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Los tubos que contenían las nanopartículas se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

Adicionalmente, la proteína nativa fue utilizada como control. Para lo cual, se preparó una solución de OVA 10 g/L en NaCl 50 mM. Esta solución proteica se hidrató durante toda la noche a 4°C. El sistema se filtró con membrana de celulosa con tamaño de poro de 0,22 µm, se determinó su concentración y se almacenó a 4°C hasta su posterior análisis.

3.3.2.2. Formación de nanocomplejos proteína-RET

Los nanocomplejos de inclusión OVA-RET y OVA_{n2}-RET se obtuvieron en base a la capacidad intrínseca de OVA y su nanopartícula derivada para unirse a compuestos hidrofóbicos [20], [21]. Los nanocomplejos se formaron mezclando una solución de OVA o de OVA_{n2} con una solución etanólica de RET 20 mM en buffer fosfato pH 7,0 50 mM y dejándolos reposar en oscuridad durante 2 h para alcanzar el equilibrio. La concentración final de etanol en estos sistemas fue inferior al 1% v/v, por lo que no cabría esperar alteración de la estructura proteica [77].

3.3.3. Caracterización de nanopartículas de ovoalbúmina y de sus nanocomplejos con retinol

3.3.3.1. Estudio de interacción proteína-RET por espectroscopía de fluorescencia

3.3.3.1.1. Principios de fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de luz de cualquier sustancia y se produce a partir de estados electrónicos excitados. Se divide en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, según la naturaleza del estado excitado [78], [79]. 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 excitación al estado basal [78]. El tiempo promedio en el que el fluoróforo retorna de su estado excitado a su estado basal es alrededor de 10 ns, 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 [78], [79].

Los fluoróforos se dividen en dos clases principales: intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son aquellos que ocurren naturalmente. Los fluoróforos extrínsecos son aquellos que se agregan a una muestra que no posee las propiedades espectrales de fluorescencia deseadas. La fluorescencia intrínseca de las proteínas se origina en los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe). Los grupos indol de los residuos de Trp son la fuente dominante de ABS UV y emisión en proteínas. La Tyr tiene un rendimiento cuántico similar al Trp, pero su espectro de emisión está más estrechamente distribuido en la escala de λ . Esto da la impresión de un mayor rendimiento cuántico para la Tyr. En proteínas nativas la emisión de Tyr está a menudo *quencheada*, lo que puede deberse a su interacción con la cadena peptídica o a la transferencia de energía al Trp. La emisión de Phe se observa solo cuando la proteína carece de residuos de Tyr y Trp. La emisión de Trp es altamente sensible a su entorno local y, por lo tanto, a menudo se utiliza para detectar cambios conformacionales en las proteínas [79]. También existen fluoróforos extrínsecos como el ANS. Este tipo de fluoróforos son frecuentemente débiles o no fluorescentes en agua, pero presentan una fuerte fluorescencia cuando se unen a proteínas o membranas [78], [79]. El ANS es anfifílico, por lo que la región no polar prefiere adsorberse a las regiones no polares de las macromoléculas. Dado que el ANS en fase acuosa no contribuye a la emisión, la señal observada se debe a la unión de la sonda con la macromolécula. Ambos tipos de fluoróforos permiten realizar caracterizaciones estructurales y de interacción proteína-ligando [79].

La fluorescencia puede ser cuantificada a partir de la obtención de espectros de emisión usando un espectrofotómetro de fluorescencia. Un espectro de emisión de fluorescencia es un gráfico de la intensidad de la fluorescencia en función de la λ de emisión (λ_{em}) medida a una λ de excitación (λ_{ex}) constante [79]. Un espectrofotómetro de fluorescencia consta básicamente de una fuente de luz, un monocromador de excitación (M1) o filtro, un monocromador de emisión (M2) o filtro, una celda donde se coloca la muestra, un detector y un procesador de datos (Fig. 7) [80]. La señal de fluorescencia de una muestra en solución diluida es proporcional a la intensidad de la luz incidente. Por lo tanto, la fuente de luz para la espectroscopia de fluorescencia debe tener una salida intensa y estable. En las mediciones de fluorescencia es necesario restringir el ancho de banda de la luz de excitación. Para ello, se puede utilizar un filtro de interferencia o monocromador de rejilla (M1). Un monocromador consiste típicamente en una rendija de entrada en la que se enfoca la fuente de luz, una rejilla de reflexión holográfica y una rendija de salida. Casi todos los espectrómetros con un monocromador de excitación también incluyen un sistema de haz de referencia. El primer componente esencial de dicha unidad es un divisor del

haz colocado entre la rendija de salida de M1 y la muestra, que de manera independiente de la λ desvía una pequeña fracción (alrededor de 5%) del haz de excitación a un contador cuántico. Este último contiene una solución concentrada de un fluoróforo de λ larga cuidadosamente seleccionado, y emite una señal de fluorescencia que es proporcional a la intensidad de la luz que cae sobre él, independientemente de la λ de este último. Esta emisión del contador cuántico cae en un fotodetector secundario. La salida de este último se compara con la del detector principal del espectrómetro lo que permite cancelar las fluctuaciones de la fuente de luz y los espectros de excitación se "corrigen" para que los resultados de diferentes instrumentos sean comparables [80].

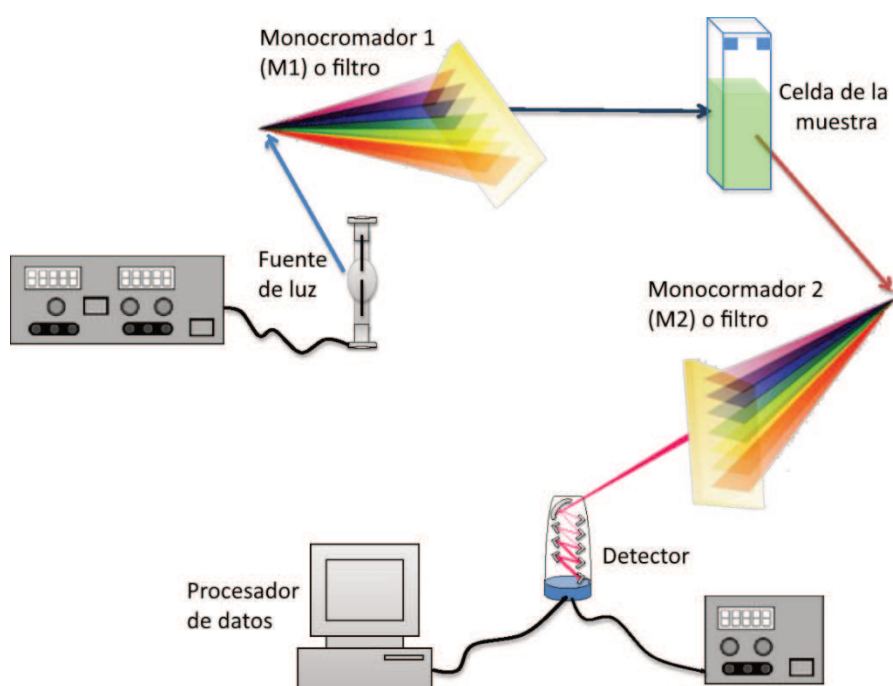


Figura 7. Principales componentes de un espectrómetro de fluorescencia (Figura modificada de D'Á-García y Badía-Laíño, 2019 [80]).

La luz que sale del monocromador M1 se dirige por la ranura de salida y/o una lente hacia la muestra en una celda adecuada. Muchos instrumentos proporcionan un obturador entre M1 y la muestra, para protegerla de los efectos de calentamiento y fotodegradación hasta el momento en que comienzan las mediciones. En las mediciones de soluciones convencionales, las muestras se colocan en cubetas de sílice, vidrio o plástico desechable con cuatro caras pulidas y longitudes de trayectoria de 10 mm o menos. Como la muestra emite fluorescencia en todas las direcciones, solo el 5%-10% de los fotones emitidos se detectan en la práctica en un instrumento convencional. Después de abandonar el compartimento de la muestra, las señales de fluorescencia y luz dispersada no deseadas ingresan al monocromador de emisión

(M2) antes de pasar al detector. La función de M2 es aislar la señal del fluoróforo deseado y minimizar las señales de dispersión Rayleigh y Raman y la fluorescencia de fondo. Como en el caso de M1, esto es posible usando un monocromador de rejilla o uno o más filtros. El espectro de fluorescencia (espectro de emisión) de una muestra se obtiene escaneando M2 mientras se mantiene la λ_{ex} constante [80].

Como la óptica de emisión normalmente recoge una pequeña fracción de la fluorescencia emitida por una muestra en un espectrómetro, es claramente esencial que el instrumento tenga un detector sensible y estable con una buena respuesta en todo el rango de λ . El detector es casi siempre un tubo fotomultiplicador que consiste en un tubo de cuarzo o vidrio al vacío conteniendo un fotocátodo. Cuando un fotón cae sobre este cátodo, emite un electrón. Este electrón está enfocado a una serie de multiplicadores de electrones (dinodos) colocados para aumentar las diferencias de potencial, causando una lluvia de electrones amplificadora, que eventualmente llegará al ánodo y producirá una corriente medible [80].

3.3.3.1.2. Determinación de la interacción proteína-RET por fluorescencia intrínseca

Cuando una proteína se une a un ligando (*binding*), su fluorescencia intrínseca puede disminuir, fenómeno que se conoce como apagamiento o *quenching* de la fluorescencia [81]. Esto sucede porque los complejos proteína-ligando absorben luz pero retornan inmediatamente al estado basal sin emisión de fotones [79].

Se examinó la formación de los nanocomplejos de inclusión OVA-RET y OVA_{n2}-RET por espectroscopia de fluorescencia intrínseca. Para esto, OVA y OVA_{n2} se dispersaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM a una concentración final de proteína de 1 μ M. Por otra parte, una solución stock de RET fue preparada a una concentración de 20 mM en etanol. Luego, 3 mL de proteína (OVA u OVA_{n2}) se titularon con volúmenes crecientes (0-30 μ L) de solución stock de RET. Los nanocomplejos proteína-RET se almacenaron en oscuridad durante 2 h para alcanzar el equilibrio. Los experimentos de fluorescencia intrínseca se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi F-2000 (Japón), usando una λ_{ex} de 280 nm (excitación de Trp y Tyr) y registrando los espectros de emisión entre 300 y 425 nm.

El efecto de filtro interno se refiere a la ABS de la luz en la λ_{ex} o λ_{em} por los compuestos presentes en la solución. Por lo general, la óptica de los fluorímetros comerciales enfoca la luz excitante y recoge la emisión desde el centro de la cubeta. Por lo tanto, cuando la ABS en la λ_{ex} es significativa, menor cantidad de luz alcanza el centro de la muestra y, por lo tanto, se reduce la fluorescencia del fluoróforo, mientras

que la ABS en la λ_{em} reduce la luz emitida que llega al detector. Esto es un problema si el ligando utilizado en una titulación absorbe en la λ_{ex} y/o λ_{em} [82] (Apéndice, Sección 9.1). Los datos de intensidad de fluorescencia (IF) se corrigieron por el efecto de filtro interno debido a la ABS de RET en el rango 250-400 nm, según van de Weert y Stella (2011) [82] (Ecuación 2).

$$IF_{corr} = IF_{obs} \times 10^{\frac{A_{ex}d_{ex} + A_{em}d_{em}}{2}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde IF_{corr} es la intensidad de fluorescencia corregida por el efecto de filtro interno, IF_{obs} es la intensidad de fluorescencia observada o medida, A_{ex} y A_{em} son el valor de ABS a la λ_{ex} y λ_{em} , respectivamente, causada por la adición del ligando, y d_{ex} y d_{em} son la longitud de la cubeta (cm) en la dirección de excitación y emisión, respectivamente. Los espectros de ABS para OVA-RET y OVA_{n2}-RET se recogieron de 250 a 450 nm usando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV/Vis (EE.UU.). Los valores de IF_{corr} máximos a la λ_{em} fueron expresados en términos de intensidad de fluorescencia relativa (IFR), siendo $IFR = IF_{corr}/IF_0$, donde IF_{corr} es la intensidad de fluorescencia máxima intrínseca del nanocomplejo proteína-RET corregida e IF_0 corresponde a la intensidad de fluorescencia máxima intrínseca de la proteína pura (OVA u OVA_{n2}) en solución. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 25°C.

IF_{corr} se utilizó para calcular los parámetros de unión: número de moléculas de RET unidas (n) y constante de asociación (K_a), para lo cual se aplicó el método de Scatchard modificado (Ecuación 3; [25]).

$$P_{total} (1 - f_i) = \frac{L_{total}}{n} \left(\frac{1}{f_i} - 1 \right) - \frac{1}{nK_a}; f_i = \frac{F_i - IF_0}{F_{máx} - IF_0} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde P_{total} es la concentración total de proteína, L_{total} es la concentración de ligando (RET en este caso), n es el número de moléculas de ligando unidos a la proteína en la saturación, f_i es la fracción de sitios ocupada por el ligando; IF_0 , $F_{máx}$ y F_i son la fluorescencia inicial, a saturación y a la relación proteína/ligando i.

3.3.3.1.3. Determinación de la interacción proteína-RET por fluorescencia extrínseca

El modo de unión de RET a las proteínas (OVA y OVA_{n2}) fue examinado por espectroscopia de fluorescencia extrínseca. Los experimentos extrínsecos se llevaron a cabo utilizando ANS como sonda fluorescente. La sonda ANS tiene la propiedad de aumentar su fluorescencia cuando se une de manera no covalente a regiones hidrofóbicas expuestas sobre la superficie de la proteína [35]. OVA y OVA_{n2} se dispersaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM a una concentración final de proteína de

1 μM . A continuación, se prepararon los nanocomplejos de inclusión proteína-RET como se describió previamente. Posteriormente, se añadieron 9 μL de solución ANS 15 mM a cada nanocomplejo. Se obtuvieron espectros de emisión de 420 a 600 nm usando una λ_{ex} de 390 nm en un espectrofotómetro Hitachi F-2000 (Japón). Del pico de cada espectro se registró la intensidad de emisión de fluorescencia máxima (IF_{ANS}) y la λ correspondiente. Los valores de fluorescencia extrínseca se expresaron en términos de intensidad de fluorescencia relativa de ANS (IFR_{ANS}), siendo $IFR_{\text{ANS}}=IF_{\text{ANS}}/IF_{0\text{ANS}}$, donde IF_{ANS} es la intensidad de fluorescencia de emisión de ANS de los nanocomplejos proteína-RET y $IF_{0\text{ANS}}$ corresponde a la emisión de fluorescencia de ANS de la proteína pura (OVA u OVA_{n2}). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 25°C.

3.3.3.2. Estudio de estabilidad coloidal de proteínas

En este trabajo, se planteó la hipótesis de que la estabilidad coloidal de los nanocomplejos de inclusión proteína-ligando podría regirse por el comportamiento de la proteína a diferentes valores de pH. De acuerdo con esto, se prepararon soluciones de OVA y OVA_{n2} como se mencionó anteriormente, y el pH del medio acuoso se redujo de 7,5 a 2,5 utilizando HCl 1 M. Se asumió que los cambios en el pH no alteraron significativamente la fuerza iónica de las soluciones de proteínas. La ABS a 400 nm se determinó tan pronto como se prepararon los sistemas, y se consideró como una medida de la turbidez del sistema [9]. Las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido). Posteriormente, se realizaron mediciones de potencial ζ , tal como se describirá en la siguiente sección. Las soluciones de proteínas a diferentes valores de pH se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente (25°C) y finalmente, se registró el aspecto visual de las dispersiones a las 24 h de preparación por medio de una cámara de fotos (Cyber-shot 12.1 mpx, Sony, USA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 25°C.

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

La dispersión de luz dinámica (DLS, del 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 [83]. Un sistema DLS típico consta de los componentes principales observados en la Fig. 8. En primer lugar, un láser que

proporciona una fuente de luz para iluminar las partículas de la muestra dentro de una celda. Dado que la intensidad de la luz dispersada debe estar dentro de un rango específico para que el detector pueda medirla con éxito, se utiliza un atenuador para reducir/aumentar la intensidad del láser. La mayor parte del rayo láser pasa a través de la muestra, pero una parte es dispersada por las partículas dentro de la misma. Un detector, que es utilizado para medir la intensidad de dicha luz dispersada se posiciona en un ángulo de 90° o 173° respecto del láser dependiendo del modelo del equipo usado. Esta intensidad pasa a un procesador de señal digital llamado correlador. La información del correlador pasa luego a una computadora, donde el software analizará los datos y obtendrá información sobre el tamaño de las partículas presentes en la muestra [84], [85].

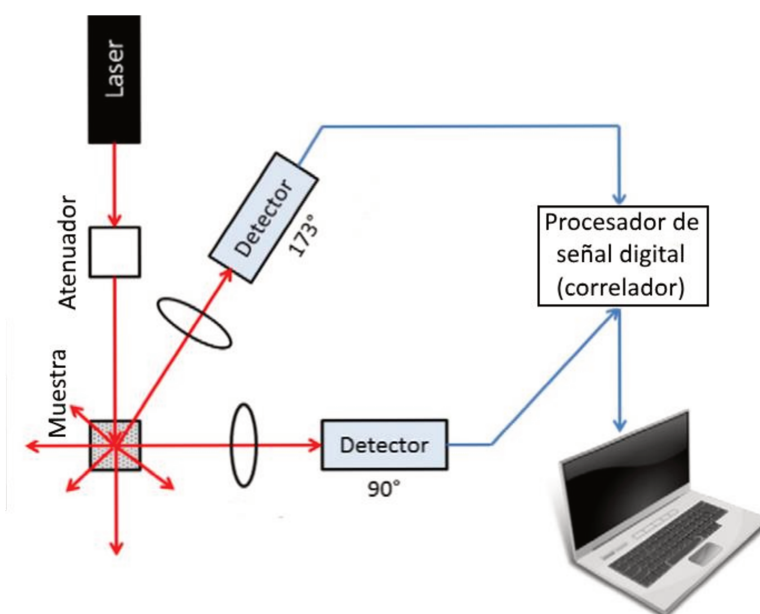


Figura 8. Esquema básico de los componentes de un equipo de DLS (Figura modificada de Bhattacharjee, 2016 [85]).

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, un movimiento aleatorio producto de la colisión de las moléculas de solvente con las partículas bajo análisis. Cuando la viscosidad y la temperatura son constante, la velocidad del movimiento Browniano dependerá del tamaño de partícula [84]. 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). Como consecuencia del movimiento Browniano la luz dispersada del conjunto de partículas fluctuará con el tiempo. La fluctuación de la luz dispersada con el tiempo es procesada por el

correlador que es básicamente un comparador de señales. El equipo de DLS, mide el grado de similitud de una señal consigo misma a intervalos de tiempo fijos, t , $t+\Delta t$, $t+2\Delta t$, etc., donde Δt es del orden de los ns o μs . El correlador permanentemente suma y multiplica fluctuaciones en una escala corta de tiempo a partir de la señal de intensidad de luz dispersada y así genera la función de correlación de la muestra (Fig. 9) [84].

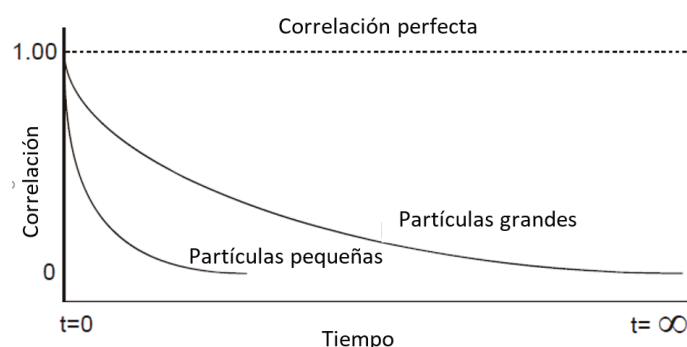


Figura 9. Función de correlación representativa de partículas con diferentes tamaños (Figura modificada de [Malvern Instruments: Zetasizer Nano user manual \[84\]](#)).

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 hasta algún punto en que la señal final 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. 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. 9).

A partir de la deconvolución de la función de correlación se obtiene la distribución de tamaño de partículas (PSD). La PSD obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varios tamaños y es conocida como distribución de tamaño en intensidad (PSDi) [83]. Cuando la curva de correlación es ajustada a un algoritmo cumulante exponencial simple, es posible obtener un único valor de D representativo del conjunto de partículas, a partir del cual es posible calcular un único valor de d_H (asumiendo que las partículas tienen forma esférica) usando la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 4):

$$d_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde, D es el coeficiente de difusión traslacional ($m^2 \cdot s^{-1}$); k es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N} \cdot m \cdot K^{-1}$); T es la temperatura (K) y η es la viscosidad del solvente ($N \cdot s \cdot m^{-2}$) [83]. El d_H medido por DLS 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) [85].

Por otro lado, el análisis de cumulantes de la función de correlación permite obtener un índice de polidispersidad global (Pdl), el cual es indicativo del ancho de una distribución de tamaño global asumiendo un único valor medio. El término polidispersidad se utiliza para describir el grado de "no uniformidad" de una distribución de tamaño. Distribuciones con $Pdl < 0,1$ se denominan monodispersas, mientras que valores de $Pdl > 0,1$ caracterizan muestras polidispersas pudiendo ser de polidispersidad moderada (0,1-0,4) o amplia ($> 0,4$) [85]. 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 pequeñas será extremadamente baja en comparación con las de mayor tamaño cuando ambas están presentes en la solución.

En la Fig. 10 se observan dos poblaciones de partículas con igual cantidad o número. Sin embargo, en la distribución en volumen, el porcentaje relativo resulta mil veces mayor para la población de partículas más grandes (dado que el volumen de una esfera es proporcional al radio al cubo), mientras que el porcentaje de intensidad de luz dispersada es un millón de veces mayor respecto a la población de partículas pequeñas (dado que como se dijo anteriormente la luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro según la teoría de Rayleigh) [84]. Si bien la DLS permite obtener la PSDi, es posible realizar las transformaciones a partir de ella a fin de obtener las PSD en volumen (PSDv) y en número (PSDn) aplicando la teoría de Mie, donde son empleadas las propiedades ópticas del analito (índice de refracción y absorción).

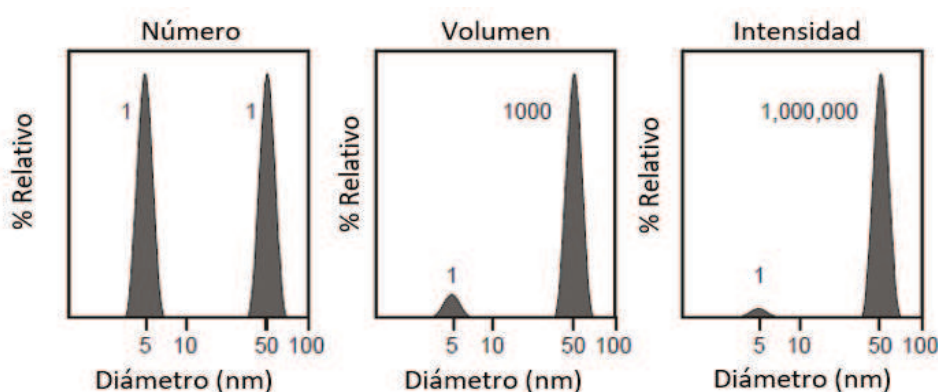


Figura 10. PSD en número, volumen e intensidad (Figura modificada de [Malvern Instruments: Zetasizer Nano user manual](#) [84]).

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 λ de salida de 632,8 nm. Este equipo permite medir tamaños de partículas en un rango de 0,6 a 6.000 nm. En las mediciones realizadas, los valores de d_H que se informan se obtuvieron a partir del pico de PSDi. El Pdl y la PSDv también se consideraron en el análisis. Los índices de refracción de disolvente y proteína fueron 1,33 y 1,50 respectivamente [35]. En la presente tesis, siempre que se realizaron ensayos de PSD, la concentración de proteína de la muestra fue de 1 g/L para que la misma cumpliera con los parámetros de calidad del equipo. En cuanto a la concentración del ligando, fue en condiciones de saturación de los sitios de unión de la proteína. Las mediciones se realizaron al menos por triplicado a 25°C.

3.3.3.2.2. Determinación de la carga eléctrica superficial por medidas de potencial ζ

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en el aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a su superficie. Así, se genera una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (Fig. 11). La capa de líquido que rodea a la partícula está comprendida por dos partes: una región interna (capa de Stern) donde los iones están fuertemente unidos, y una región externa (capa difusa) donde los iones están unidos más débilmente. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula conforman una distribución estable (doble capa eléctrica) [86]. Cuando una partícula se mueve, lo hace con los iones que conforman la capa de Stern y la difusa, pero los iones que se encuentran fuera del límite no se mueven con la partícula. El potencial correspondiente a este límite (plano de deslizamiento) se conoce como potencial ζ (Fig. 11). La magnitud del potencial ζ es un indicador de la estabilidad coloidal del sistema en estudio. Las partículas con potencial ζ más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV se consideran estables [84].

Por lo tanto, el potencial ζ , es el potencial en el plano de deslizamiento/corte de una partícula coloidal que se mueve bajo un campo eléctrico y refleja la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica de las partículas electroforéticamente móvil y la capa de dispersante que las rodea en el plano de deslizamiento [87].

Cuando se aplica un campo eléctrico, las partículas cargadas suspendidas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. Durante este movimiento, la resistencia

viscosa del medio se opondrá a la fuerza del campo eléctrico que actúa sobre las partículas cargadas. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante [84]. La velocidad de una partícula por unidad de campo eléctrico es llamada movilidad electroforética (U_E). El potencial ζ está relacionado con la U_E por la ecuación de Henry (Ecuación 5):

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3 \eta} \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde ε es la constante dieléctrica, ζ es el potencial ζ , $f(ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad. Para partículas pequeñas en medio acuoso y con baja concentración de electrolitos, se usa $f(ka)=1$ según la aproximación de Smoluchowski [86], [87].

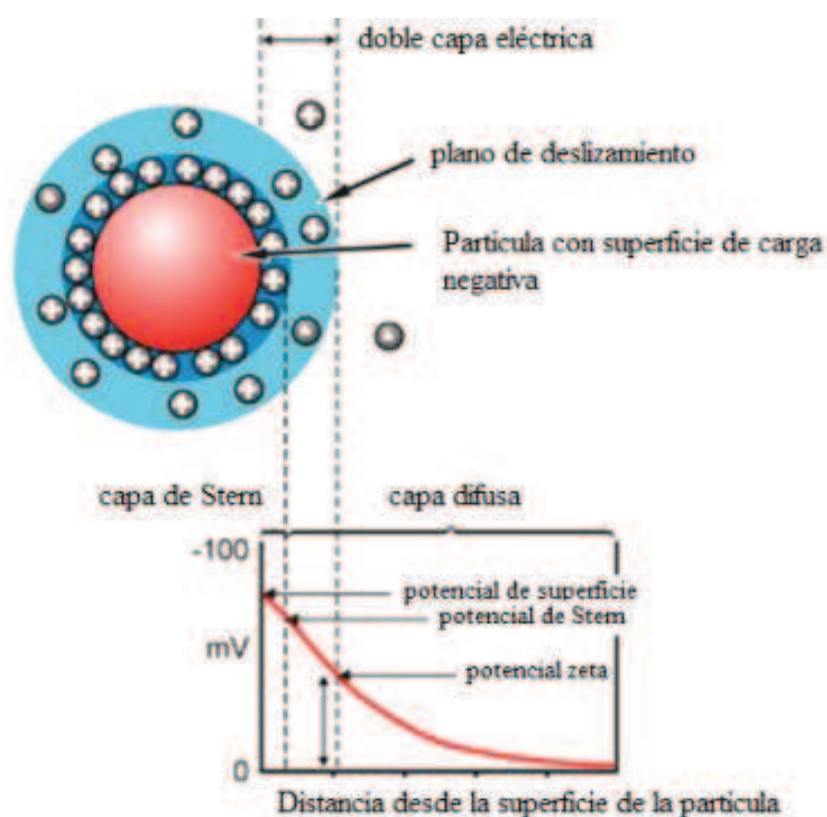


Figura 11. Representación esquemática del potencial ζ (Figura modificada de Malvern Instruments: Zetasizer Nano user manual [84])

La serie Zetasizer Nano calcula el potencial ζ determinando la U_E y luego aplicando la ecuación de Henry. La U_E se obtiene realizando un experimento de electroforesis en la muestra y midiendo la velocidad de las partículas utilizando velocimetría por láser Doppler. La esencia de un sistema de microelectroforesis clásico es una celda con electrodos en cada extremo al que se aplica un potencial (Fig. 12). Las partículas se mueven hacia el electrodo de carga opuesta, su velocidad se mide y se expresa como U_E [87].

En la presente tesis, el equipo utilizado para las mediciones de potencial ζ fue un Zetasizer Nano ZS90 - Malvern Instruments Ltd. (Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne con una λ de salida de 632,8 nm. En la presente tesis, siempre que se realizaron mediciones de potencial ζ , la concentración de proteína de la muestra fue de 1 g/L para que la misma cumpliera con los parámetros de calidad del equipo. En cuanto a la concentración del ligando, fue en condiciones de saturación de los sitios de unión de la proteína.

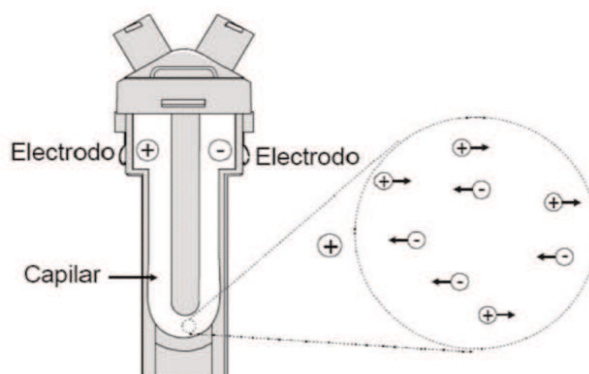


Figura 12. Celda para medición de potencial ζ (Figura modificada de [Malvern Instruments: Zetasizer Nano user manual \[84\]](#)).

El sistema de medición de potencial ζ consta de diferentes componentes principales (Fig. 13). 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. El haz láser incidente pasa a través del centro de la celda, y la luz dispersada se detecta en un ángulo de $12,8^\circ$. El haz de luz dispersado es combinado con el haz de referencia. De este modo se crea un haz resultante cuyas variaciones en intensidad son registradas por el detector. Esta información se pasa a un procesador de señal digital y luego a una computadora. La intensidad de la luz dispersada dentro de la celda debe estar dentro de un rango específico para que el detector pueda medirla con éxito. Si se detecta demasiada luz, el detector se sobrecargará. Para superar esto, se utiliza un atenuador para reducir la intensidad del láser y, por lo tanto, reducir la intensidad de la dispersión. Para muestras que no dispersan mucha luz, como partículas muy pequeñas o muestras de baja concentración, la cantidad de luz dispersada debe incrementarse. El atenuador permitirá automáticamente que pase más luz a la muestra. 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 óptica [84], [87].

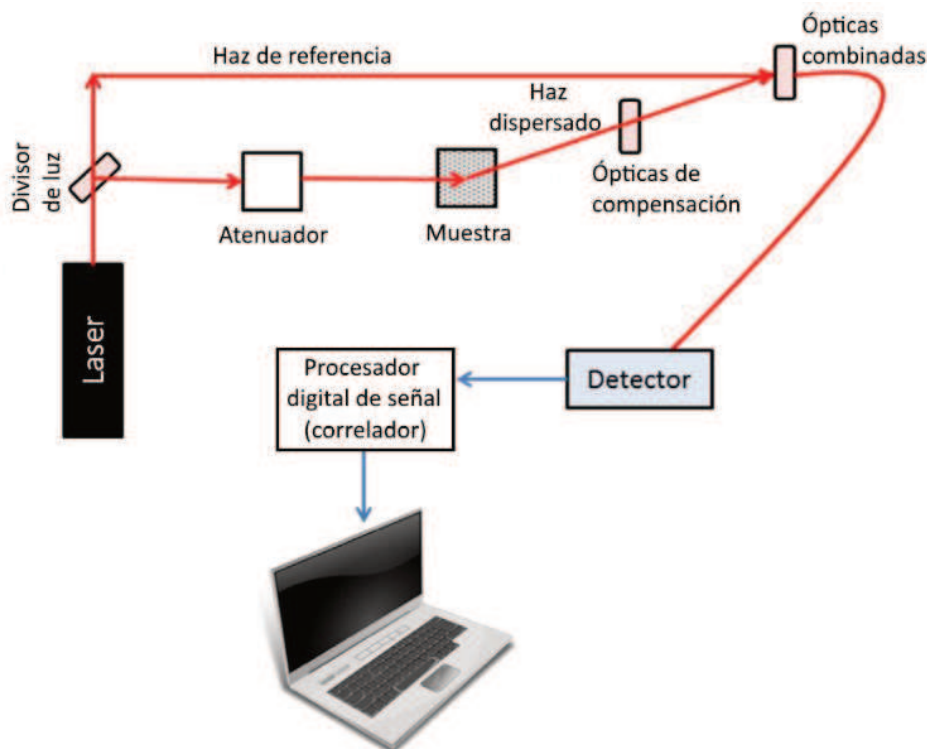


Figura 13. componentes principales de un equipo de medición de potencial ζ por movilidad electroforética (Figura modificada de [Bhattacharya y Mukhopadhyay, 2012 \[87\]](#)).

3.3.4. Ensayo de estabilidad fotoquímica de retinol

El efecto de las nanopartículas de OVA, utilizadas como vehículo de RET, sobre su descomposición química en solución acuosa se evaluó de acuerdo con [Shimoyamada y col. \(1996\) \[74\]](#). Para ello, la descomposición química de RET se determinó como un porcentaje de la ABS inicial a 330 nm (ABS_0) durante 30 h. Así, el nivel de descomposición RET se calculó de la siguiente manera (Ecuación 6):

$$\text{Descomposición RET (\%)} = \frac{ABS_0 - ABS_t}{ABS_0} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde ABS_t es la ABS de RET en un tiempo dado en el intervalo de 0 y 30 h. Los experimentos se realizaron añadiendo solución etanólica de RET a 3 mL de solución de proteína (OVA u OVA_{n2}), en condiciones de saturación de los sitios de unión de la proteína. Posteriormente, se alcanzó el pH correspondiente con la adición de HCl 1 M en base al estudio de estabilidad coloidal de las proteínas (OVA a pH 4,0 y 7,0 y OVA_{n2} a pH 7,0). Estos sistemas se colocaron a 35 cm (posición arbitraria) bajo una lámpara fluorescente compacta (BAW, 65 W, 750 lm, 6400 K). También se ensayaron dos tipos de controles: (i) solución de RET puro mantenida en la oscuridad, que se

consideró como una medida de la descomposición fotoquímica de RET debido a la presencia de oxígeno disuelto (OD) en solución acuosa ($RET_{oscuridad}$), y (ii) solución de RET puro que se mantuvo bajo exposición a luz y se consideró como una medida de la descomposición fotoquímica de RET como consecuencia de la acción combinada de OD y luz (RET_{luz}). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25°C) por triplicado.

3.3.5. Determinación de oxígeno disuelto

Para realizar un análisis más completo de los resultados obtenidos en el ensayo de descomposición fotoquímica de RET, se determinó la concentración inicial de OD. Para esto, el mismo se determinó en sistemas sin RET para conocer la concentración de OD a la que el RET estaría expuesto inicialmente. Por lo tanto, las mediciones se realizaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM y en los sistemas proteicos (OVA u OVA_{n2}) al pH determinado en base al estudio de estabilidad coloidal de las proteínas (OVA a pH 4,0 y 7,0 y OVA_{n2} a pH 7,0). La solución buffer sin RET se utilizó como control. Se aplicó una prueba iodométrica estándar modificada con azida [88]. Las muestras se colocaron en frascos Winkler de 250 mL, se añadió 1 mL de solución de $MnSO_4$, seguido por 1 mL de solución alcalina de yoduro con azida. Con el fin de excluir las burbujas de aire, los frascos se taparon cuidadosamente y se mezclaron invirtiendo unas cuantas veces. Los frascos permanecieron en reposo hasta que el precipitado/floculo se asentó lo suficiente. A continuación, se añadió 1 mL de H_2SO_4 concentrado y se mezcló invirtiendo varias veces hasta que se completó la disolución del precipitado. Se tituló un volumen de 200 mL de muestra con solución de $Na_2S_2O_3$ 0,025 M. Se añadieron unas gotas de solución de almidón (como indicador). El punto final de titulación se consideró a la desaparición del color azul. Para la titulación de 200 mL de muestra, 1 mL de $Na_2S_2O_3$ 0,025M es equivalente a 1 mg OD/L. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado a temperatura ambiente (25°C).

3.3.6. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software StatGraphics Plus 3.0. Para esto, se aplicó el método de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Formación de nanocomplejos proteína-retinol

3.4.1.1. Fluorescencia intrínseca

La fluorescencia intrínseca puede aplicarse para estudiar la interacción proteína-ligando [81]. Como se mencionó previamente, la OVA posee tres residuos de aminoácidos fluorescentes en su estructura molecular Trp, Tyr y Phe, sin embargo, utilizando una λ_{ex} de 280 nm, se excitan los residuos Tyr y Trp [81]. Una molécula de OVA posee tres residuos de Trp y diez de Tyr [89]. Cuando las proteínas o sus agregados se unen a ligandos, su fluorescencia intrínseca puede variar. Por ello, se estudió la formación de nanocomplejos de inclusión monitoreando los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca luego de la adición de RET a las soluciones proteicas (OVA u OVA_{n2}). Dichos nanocomplejos se formarían mediante un proceso en el que los sitios de unión de la proteína se saturan gradualmente con moléculas de RET. Para confirmar esta suposición, se evaluó el efecto de la concentración de RET (0-198 μM) en la emisión de fluorescencia intrínseca para OVA y OVA_{n2}, los resultados se observan en las Fig. 14a y c, respectivamente. A partir de estos espectros, se obtuvieron los valores de IFR (Fig. 14b y d). Se puede deducir que:

(i) Para OVA, el aumento en la concentración de RET causó un aumento en la IF intrínseca, y no se detectaron cambios en la λ_{em} máxima (Fig. 14a). Este comportamiento se observa mejor considerando los valores de IFR en la Fig. 14b. Los resultados podrían explicarse considerando que el RET está unido a dominios OVA alejados de los residuos de Trp y/o Tyr, lo que podría inducir cambios conformacionales leves en la proteína [90], [91]. Se observaron conductas de fluorescencia similares para la unión de linoleato [25] o LA [26], [92] a la BLG. Además, se observó que los valores de IFR aumentaron alcanzando una meseta a aproximadamente 100 μM de RET, lo que podría indicar la saturación de los sitios de unión de RET en la OVA. El ajuste de los datos de IF al modelo de Scatchard modificado permitió calcular el número de moléculas de RET unidas a la proteína (n) y la K_a obteniéndose los siguientes resultados: $n=108\pm 16$ y $K_a=(7\pm 4) \times 10^5 \text{M}^{-1}$. De acuerdo con esto, una unidad monomérica de OVA es capaz de unir 108 moléculas de RET con una afinidad apreciable.

(ii) Para OVA_{n2}, el aumento en la concentración de RET promovió una disminución gradual de la IF intrínseca, y de la misma manera que para OVA, no se registraron cambios en la λ_{em} máxima (Fig. 14c). Los valores de IFR se muestran en la Fig. 14d, donde se observa el fenómeno conocido como *quenching* de la

fluorescencia. Suponiendo un mecanismo de *quenching* estático, las moléculas de RET se unirían en las cercanías de los residuos de Trp y/o Tyr, por lo que la fluorescencia de emisión se reduciría gradualmente como consecuencia de la formación del nanocomplejo [79]. Por lo tanto, la magnitud del decrecimiento de la IFR podría ser proporcional a la concentración de nanocomplejos de inclusión OVA_{n2}-RET en solución [20], [93]. Los valores n y K_a se obtuvieron aplicando el modelo previamente descrito, dando los siguientes resultados: $n_1=16\pm 10$ y $K_{a1}=(7\pm 2) \times 10^4 M^{-1}$, $n_2=67\pm 9$ y $K_{a2}=(2\pm 1) \times 10^5 M^{-1}$. Según Le Maux y col. (2013) [25], estos resultados de estequiometría de unión se refieren a la unidad monomérica de OVA. Por lo tanto, podría deducirse que una unidad monomérica de OVA en OVA_{n2} es capaz de unir 83 moléculas RET (n_1+n_2) en dos tipos de sitios de unión a RET, siendo uno de ellos de mayor afinidad ($10^5 M^{-1}$). La disminución en el número total de moléculas de RET unidas por unidad monomérica de OVA podría explicarse teniendo en cuenta que la formación de OVA_{n2} requeriría algunos aminoácidos hidrofóbicos de OVA que podrían implicar sitios de unión a RET.

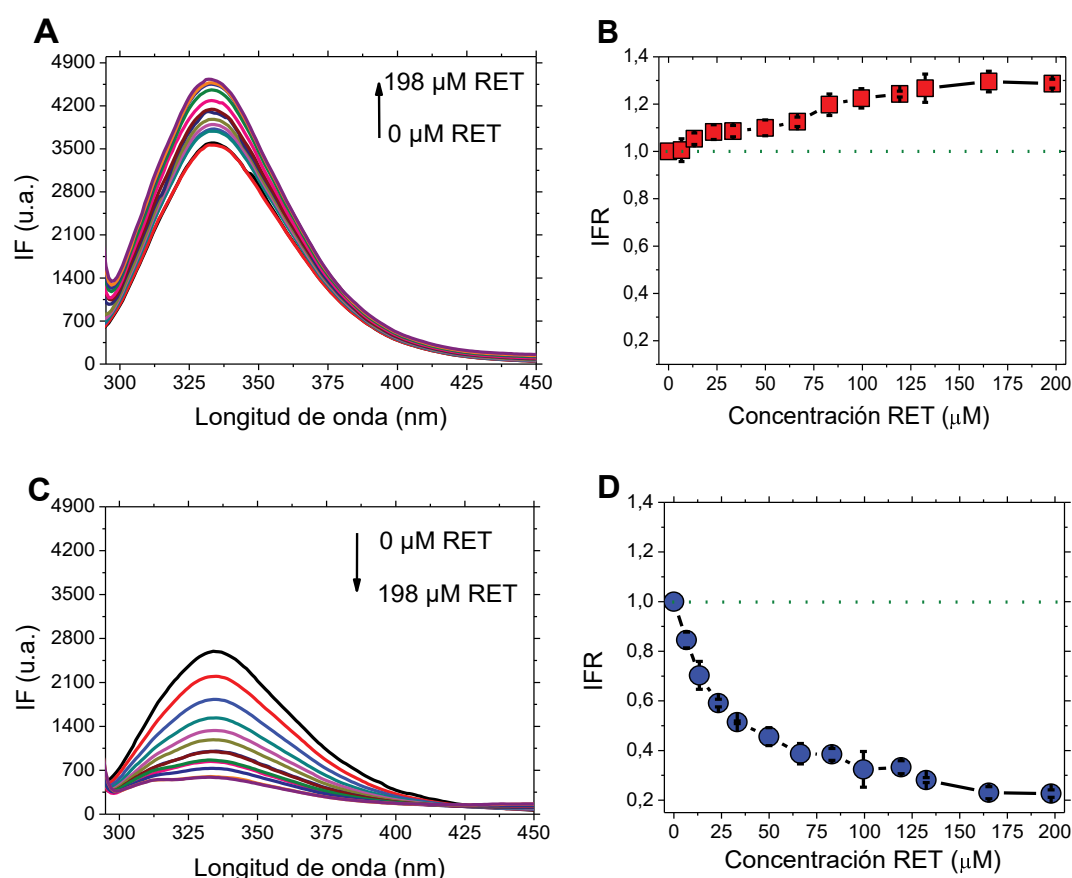


Figura 14. Efecto de la concentración de RET (0-198 μM) en la intensidad de fluorescencia intrínseca (IF) para OVA (A) y OVA_{n2} (C); y en la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) para (■) OVA (B), y (●) OVA_{n2} (D). Condiciones: concentración de proteína: 1 μM , buffer fosfato pH 7,0 50 mM, temperatura: 20°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar.

(iii) Las diferencias en la formación de los nanocomplejos de inclusión OVA-RET y OVA_{n2}-RET podrían estar directamente relacionados con el estado conformacional de la proteína. El proceso de obtención de OVA_{n2} implicó fenómenos de desnaturalización/agregación debido al tratamiento térmico [20]. Esta condición fue superior a la temperatura de desnaturalización de OVA (~80,1°C) según Matsudomi y col. (2001) [42], lo que podría dar lugar a cambios conformacionales significativos en la estructura de OVA. Estos cambios se pueden deducir de los espectros de fluorescencia de OVA y OVA_{n2} (mostrados en la Fig. 14a y c, respectivamente). La obtención de OVA_{n2} causó una reducción del 28% de la IF de OVA. Este fenómeno de *autoquenching* sería promovido por interacciones hidrofóbicas y formación de SS, y en general, es consistente con la existencia de cambios conformacionales considerables en la proteína [25], [26].

3.4.1.2. Fluorescencia extrínseca

Para obtener algún conocimiento sobre el modo de unión de RET a las proteínas (OVA y OVA_{n2}), se realizaron experimentos de fluorescencia extrínseca. La Fig. 15a y c muestra el efecto de la concentración de RET (0-198 μM) sobre el comportamiento de emisión de fluorescencia de la sonda ANS para OVA y OVA_{n2}, respectivamente. Para obtener una mejor comprensión, se calcularon los valores de IFR_{ANS} y se incluyeron en la Fig. 15b y d. Se observó que:

(i) Para OVA, el aumento en la concentración de RET no causó prácticamente ninguna diferencia en IF_{ANS} y, en consecuencia, no hubo cambios significativos en los valores de IFR_{ANS} (Fig. 15a y b). Además, no se observaron cambios en la λ_{em} máxima de ANS (inserto en la Fig. 15a), lo que sugiere que no habría cambios en la polaridad ambiental de los sitios de unión a ANS. Estos resultados se explican considerando que una cantidad constante de ANS está unida a OVA posiblemente debido a que: (i) la sonda se une a dominios hidrofóbicos particulares en la superficie de la proteína, diferentes a los sitios de unión a RET, y/o (ii) la adición de ANS provoca el desplazamiento de RET de la superficie de OVA.

(ii) Para OVA_{n2}, el aumento en la concentración de RET promovió una disminución gradual en IF_{ANS} y en IFR_{ANS} (Fig. 15c y d). 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 [78]. Sin embargo, el RET también se uniría a dichos sitios, por lo que, cuando se forman los nanocomplejos OVA_{n2}-RET, habría menor cantidad de sitios hidrofóbicos disponibles para la unión del ANS a la proteína y, consecuentemente la fluorescencia

del ANS disminuiría [94]. Además, hubo un corrimiento hacia el rojo significativo en la λ_{em} máxima del ANS (inserto en la Fig. 15c), lo cual sugiere que el ANS es desplazado de los sitios hidrofóbicos hacia un ambiente cada vez más polar conforme aumenta la concentración de RET [79]. Estos resultados ponen de relieve que el modo de unión de RET a OVA_{n2} podría responder a un mecanismo de saturación en el que los sitios internos se ocuparían primero. Sponton y col. (2016) [95] informó un comportamiento similar para evaluar el modo de unión del LA a la OVA_{n2}.

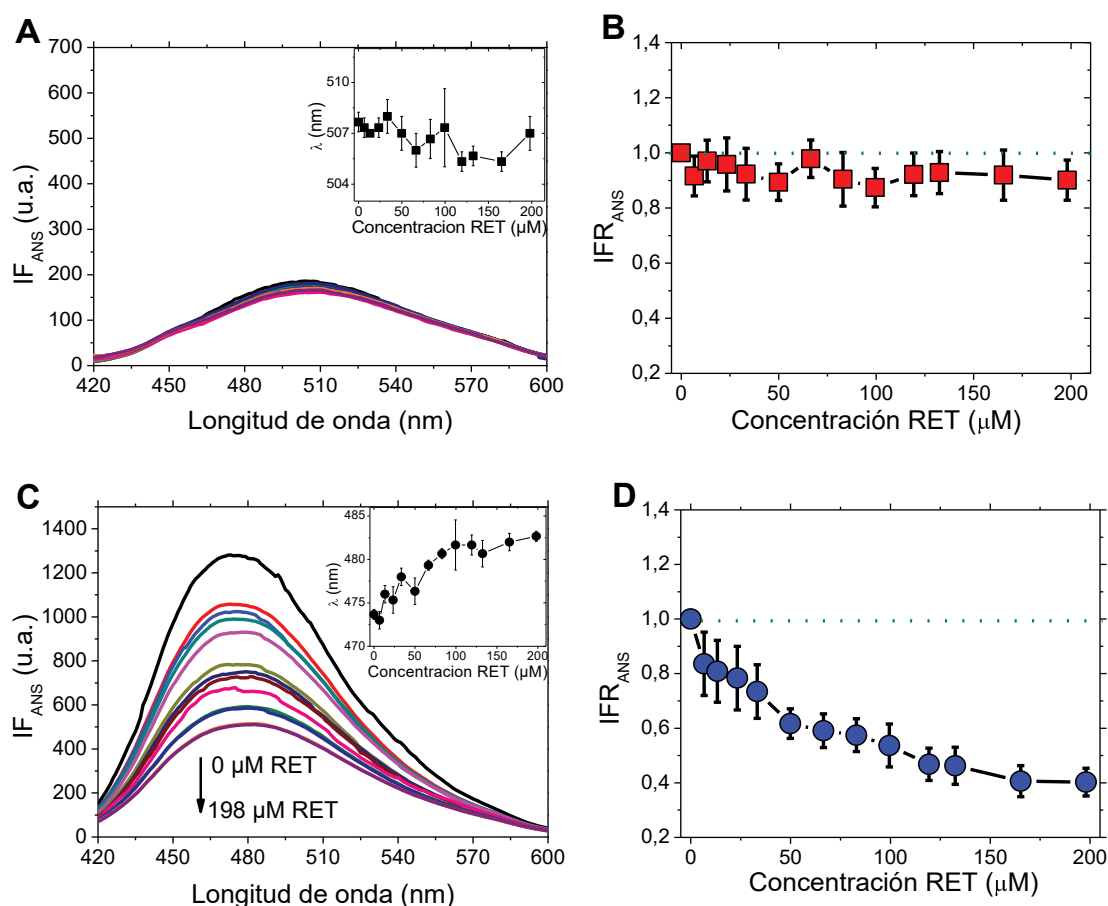


Figura 15. Efecto de la concentración de RET (en el rango 0-198 μM) en la intensidad de fluorescencia extrínseca de ANS (IF_{ANS}) para OVA (A) y OVA_{n2} (C); y en la intensidad de fluorescencia relativa de ANS (IFR_{ANS}) para (■) OVA (B) y (●) OVA_{n2} (D). Las inserciones en (A) y (B) corresponden a la longitud de onda (λ , nm) en el máximo de IF_{ANS} . Condiciones: concentración de proteína: 1 μM , buffer fosfato pH 7,0 50 mM, concentración de ANS: 45 μM , temperatura: 20°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar.

(iii) Las diferencias en el modo de unión de RET a las proteínas (OVA y OVA_{n2}) podrían vincularse directamente con los cambios conformacionales implicados en el proceso de formación de OVA_{n2}. El tratamiento térmico provocó un aumento de 7 veces en la IF_{ANS} de OVA (como se puede observar en las Fig. 15a y c), lo que sugiere la existencia de una gran disponibilidad de aminoácidos hidrofóbicos para la unión de ANS, como consecuencia de la desnaturalización de la proteína [24]. Sin embargo, el

aumento de la hidrofobicidad superficial no causó un aumento en la capacidad de unión a RET, porque OVA_{n2} unió una cantidad de RET más baja (en términos de unidad monomérica) en comparación con OVA. Esta observación sugiere que el mecanismo de unión de RET a las proteínas parece requerir cierto nivel de especificidad en los sitios de unión, resultados similares fueron reportados por otros autores [25], [26].

3.4.2. Estudio de estabilidad coloidal

3.4.2.1. Proteínas

La estabilidad coloidal de los nanocomplejos de inclusión proteína-ligando podría estar fuertemente influenciada por el comportamiento de la proteína en diferentes condiciones de pH. Por lo tanto, se estudió el comportamiento en fase acuosa dependiente del pH para OVA y OVA_{n2} considerando la ABS a 400 nm como una medida de la turbidez del sistema [9]. La Fig. 16a muestra el efecto del pH sobre la ABS a 400 nm para las soluciones de OVA y OVA_{n2} . Para OVA, la disminución del pH no causó prácticamente ningún cambio en los valores de ABS y en la apariencia visual del sistema (Fig. 16c). Para OVA_{n2} , no se produjo ninguna modificación en el valor de la ABS desde pH 7,0 hasta aproximadamente pH 6,0; a partir del cual la ABS aumentó alcanzando un máximo a pH 5,0-4,5. Luego, el valor de ABS disminuyó hasta aproximadamente pH 3,0 y se mantuvo constante hasta pH 2,5.

El alto valor de ABS para la solución de OVA_{n2} observado a pH 5,5-4,0 podría explicarse considerando un aumento en el tamaño de partícula como consecuencia de una reducción en la carga neta de OVA_{n2} . La reducción de la carga neta generalmente promueve una disminución de la repulsión electrostática entre las proteínas, por lo que se potencian las interacciones coloidales atractivas (por ejemplo, van der Waals y fuerzas hidrofóbicas), lo que lleva a un aumento en el tamaño de las partículas de proteína por agregación. Este fenómeno también podría explicar la sedimentación de OVA_{n2} observada entre pH 5,5-4,0 (Fig. 16d). Por otro lado, este fenómeno no ocurre para las dispersiones de OVA posiblemente debido a un tamaño mucho menor.

El valor del pH a la cual la carga neta de la proteína es cero se conoce como pI. Para estimar los valores de pI para OVA y OVA_{n2} , se realizaron mediciones de potencial ζ a diferentes valores de pH, y los resultados se muestran en la Fig. 16b. Se observó que la disminución de pH (partiendo de pH 7,0) causó una reducción en los potenciales ζ negativos, alcanzando el valor de cero a pH ~4,8. Este valor de pH corresponde a la estimación del pI tanto para OVA como para OVA_{n2} . A partir de aquí,

la disminución del pH del medio acuoso provocó un aumento en los potenciales ζ positivos para ambas proteínas. En general, se podría concluir que los perfiles de carga dependientes del pH para OVA y OVA_{n2} fueron similares, lo que sugiere que el tratamiento térmico no alteraría la carga neta de OVA.

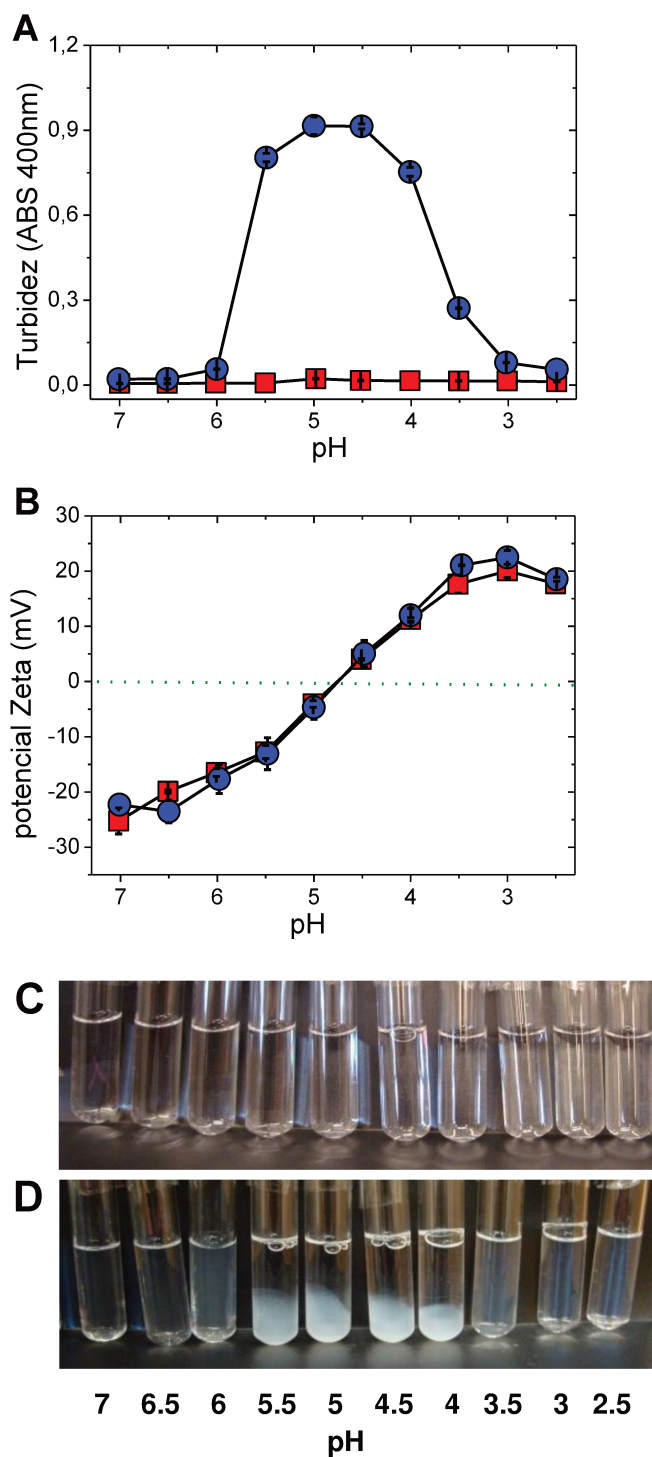


Figura 16. Comportamiento de fase de las proteínas en función del pH del medio acuoso: ABS a 400 nm como medida de la turbidez del sistema (A) y potencial ζ (B) para OVA (■) y OVA_{n2} (●); y apariencia visual para OVA (C) y OVA_{n2} (D). Condiciones: Concentración de proteína: 23 μ M. Los valores en (A) y (B) se muestran como media \pm desviación estándar.

Los resultados para OVA_{n2} confirmarían que la disminución de la magnitud de carga neta de la proteína (derivada de los valores de potencial ζ) podría ser responsable de los altos valores de ABS observados alrededor del pI. En estas condiciones, las diferencias en la estabilidad coloidal de las soluciones de OVA y OVA_{n2} podrían atribuirse a las diferencias en el tamaño de las partículas y al estado conformacional de la proteína, nativa frente a desnaturalizada/agregada, respectivamente.

3.4.2.2. Nanocomplejos de inclusión proteína-RET

Se sabe que un tamaño pequeño y valores de potencial ζ altos son características necesarias de las partículas para obtener una alta estabilidad coloidal en medios acuosos [96], [97]. Por ello, se estudió la estabilidad coloidal de los nanocomplejos de inclusión OVA-RET y OVA_{n2}-RET teniendo en cuenta la PSD a valores de pH de 4,0 y 7,0 (elegidos de acuerdo con los resultados de estabilidad coloidal de proteínas discutida anteriormente). Por lo tanto, el efecto del pH en la PSDi y en la PSDv para los nanocomplejos OVA-RET y OVA_{n2}-RET se muestra en la Fig. 17, junto con los datos para OVA y OVA_{n2}. Se observó que:

(i) Para OVA, a pH 4,0 se observaron dos picos en el perfil de PSDi cuyos d_H fueron 10 ± 1 nm y 61 ± 2 nm (Fig. 17a); sin embargo, según los resultados en la PSDv, estos representaron 92 y 8%, respectivamente (Fig. 17b). A pH 7,0, se observó un comportamiento en la PSD similar, se registró un primer pico cuyo d_H fue 9 ± 1 nm (94%) y un segundo de 52 ± 2 nm (6%). Kang y col. (2014) informaron que no se registraron cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de OVA como consecuencia de los cambios de pH [98]. Por lo tanto, en términos generales, se podría concluir que los primeros picos observados para ambos valores de pH corresponderían al d_H de la OVA [35], y el segundo posiblemente a trazas de proteína agregada. Para los nanocomplejos OVA-RET, fue evidente un aumento en el tamaño de OVA después de la complejación con RET, siendo el d_H de los nanocomplejos OVA-RET de 203 ± 17 nm (92%) y 176 ± 4 nm (100%) a pH 4,0 y 7,0, respectivamente. El mayor tamaño del nanocomplejo OVA-RET registrado a pH 4,0 podría explicarse considerando una disminución en la repulsión electrostática entre las especies macromoleculares. Para pH 4,0, se observó que el nanocomplejo con RET no alteraba significativamente el potencial ζ de OVA ($p > 0.05$) (Tabla 1) siendo $+11 \pm 0$ mV para OVA y $+12 \pm 1$ mV para OVA-RET; mientras que a pH 7,0 los nanocomplejos OVA-RET mostraron un ligero aumento ($p < 0.05$) en la carga negativa en comparación con el de

OVA, de -21 ± 0 mV a -25 ± 2 mV (Tabla 1). Considerando el valor absoluto de los potenciales ζ a ambos pH, el de pH 4,0 es inferior al de pH 7,0 por lo que se espera una menor repulsión debido a las cargas netas y ello explicaría el tamaño mayor hallado para el nanocomplejo de inclusión OVA-RET a pH 4,0. En general, estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la estabilidad coloidal de los nanocomplejos OVA-RET se rige principalmente por las propiedades eléctricas de OVA.

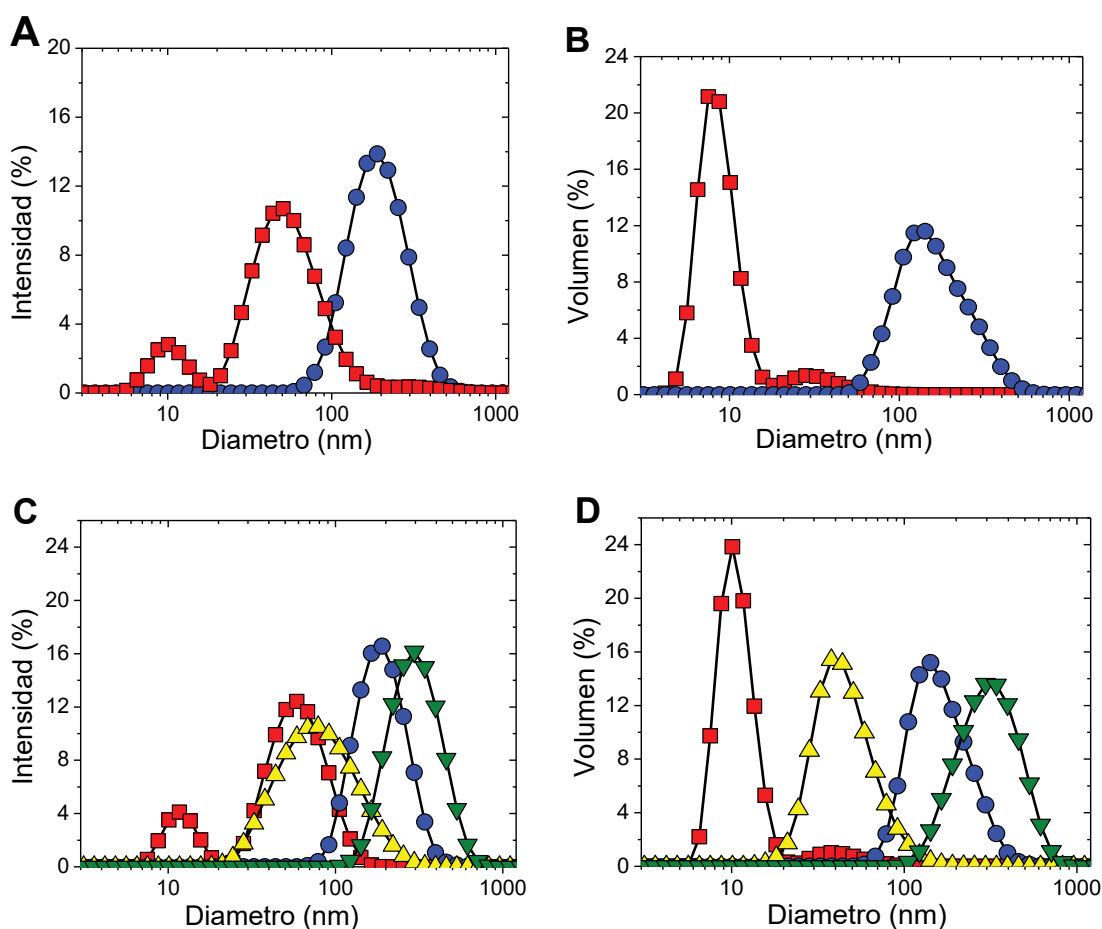


Figura 17. Distribución de tamaño de partícula (PSD) en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%): (A) y (B): (■) OVA y (●) OVA-RET a pH 4,0; (C) y (D): (■) OVA, (●) OVA-RET, (▲) OVA_{n2} y (▼) OVA_{n2} -RET a pH 7,0. Condiciones: concentración de proteína: 23 μ M, concentración de RET: 2,3 mM, temperatura: 25°C.

(ii) Para OVA_{n2} y el nanocomplejo OVA_{n2} -RET a pH 4,0, el análisis de PSD no fue posible debido a la sedimentación gradual de partículas en la parte inferior de la celda de medición. Sin embargo, como se observa en las Fig. 17c y d, se realizó el análisis de PSD a pH 7,0 para OVA_{n2} y OVA_{n2} -RET. Para OVA_{n2} se observó un pico en el perfil de PSDi cuyo d_H fue 88 ± 1 nm (100%), corroborando que el tratamiento térmico realizado permitió la obtención de un agregado de OVA nanométrico. Para el

nanocomplejo OVA_{n2}-RET, se halló un d_H de 312 ± 11 nm (100%), lo que indicó un gran aumento de tamaño de la nanopartícula debido a su unión con RET. Con respecto a las propiedades eléctricas de los nanocomplejos OVA_{n2}-RET, se puede deducir de la [Tabla 1](#) que la complejación no modificó significativamente el valor de potencial ζ de OVA_{n2}, a pH 4,0 y 7,0 lo que sugiere que la estabilidad coloidal de los nanocomplejos OVA_{n2}-RET se rige por el comportamiento de la proteína agregada.

Tabla 1. Efecto de la complejación proteína-RET sobre el potencial ζ (mV) de OVA y OVA_{n2} como una función del pH del medio acuoso. Condiciones: concentración de proteína: 23 μ M, concentración de RET: 2,3 mM, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como desviación estándar \pm media y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

pH	Sistemas	potencial ζ (mV)
4,0	OVA	$+11 \pm 0^c$
	OVA-RET	$+12 \pm 1^{c,d}$
	OVA _{n2}	$+12 \pm 1^{c,d}$
	OVA _{n2} -RET	$+14 \pm 0^d$
7,0	OVA	-21 ± 0^b
	OVA-RET	-25 ± 2^a
	OVA _{n2}	-25 ± 1^a
	OVA _{n2} -RET	-26 ± 2^a

3.4.3. Estabilidad fotoquímica de retinol

Por lo general, la luz y el O₂ ambiental promueven la descomposición de RET mediante la formación de especies inactivas [65]. Por lo tanto, se investigó la hipótesis de que la vehiculización de RET bajo la forma de nanocomplejos de inclusión podría evitar su deterioro frente a la luz y la presencia de OD. Para esto, se realizó un ensayo de descomposición fotoquímica del RET a pH 4,0 y 7,0 durante 30 h. El efecto del pH del medio acuoso en la descomposición fotoquímica de RET (%) para los nanocomplejos OVA-RET y OVA_{n2}-RET se muestra en la [Fig. 18](#). Además, las concentraciones iniciales de OD se informan en la [Tabla 2](#).

i) Para los controles RET_{oscuridad} y RET_{luz}, la descomposición de RET aumentó linealmente hasta las 9 h. Luego, para el control RET_{oscuridad}, la cantidad de RET prácticamente no aumentó hasta las 30 h ($17,0 \pm 1,0$ %), mientras que para el control RET_{luz}, la descomposición progresó hasta llegar a $33,0 \pm 1,0$ %. Para estos controles, se debe considerar el mismo contenido inicial de OD ($4,1 \pm 0,0$ mg OD/L). Por lo tanto, se puede deducir que hasta las 9 h, la descomposición de RET estaría controlada por el OD, y luego se podría observar el efecto catalítico de la luz [65].

(ii) Para los nanocomplejos OVA-RET a pH 4,0 (Fig. 18a), se observó que la descomposición de RET fue similar a RET_{luz} , hasta aproximadamente 24 h, a partir de la cual tuvo lugar una descomposición de RET menos pronunciada hasta llegar a $27,1 \pm 0,2$ %. Este resultado sugiere que la ligera protección de RET (a partir de las 24 h) se debería principalmente a la complejación con OVA. Por otro lado, el perfil de descomposición para el nanocomplejo OVA-RET a pH 7,0 se muestra en la Fig. 18b. Se observó un aumento en la descomposición de RET durante todo el período de prueba hasta llegar a $39,7 \pm 0,7$ % a las 30 h. Una posible explicación radica en la relación área/volumen más grande (tamaño más pequeño) de los nanocomplejos OVA-RET a pH 7,0 en comparación con pH 4,0 (Fig. 17), lo que podría promover una mayor accesibilidad a factores de deterioro fotoquímicos. Por lo tanto, parecería que los factores que controlan el comportamiento coloidal OVA-RET también podrían desempeñar un papel en la estabilidad fotoquímica de RET.

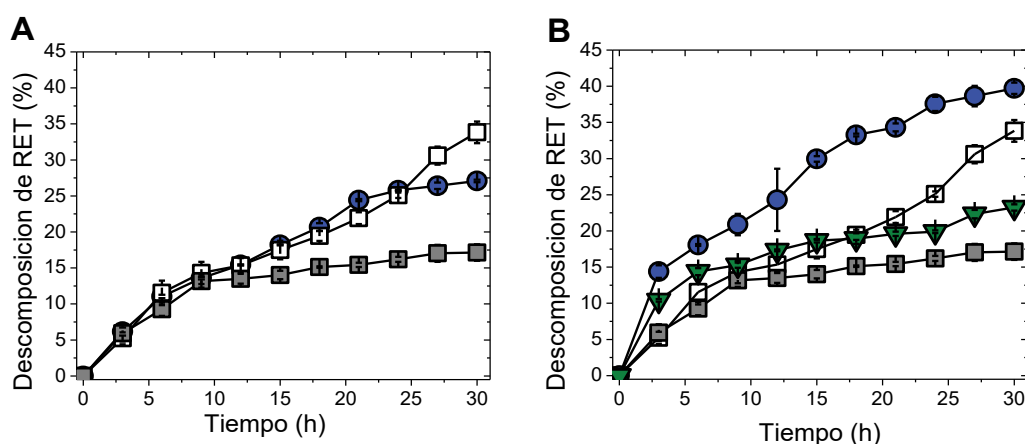


Figura 18. Descomposición fotoquímica de RET (%) en función del tiempo (h): (A) OVA-RET (●) a pH 4,0; (B) OVA-RET (●) y OVA_{n2}-RET (▼) a pH 7,0. Controles: (■) RET puro en oscuridad ($RET_{oscuridad}$), (□) RET puro en luz (RET_{luz}). Condiciones: Concentración de proteína: 6.7 μ M, concentración de RET: 670 μ M, temperatura: 25°C. Los experimentos se realizaron con una lámpara fluorescente (BAW, 65 W, 750 lm, 6400 K), con la excepción del control $RET_{oscuridad}$. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar.

(iii) Para los nanocomplejos de inclusión OVA_{n2}-RET a pH 7,0 (Fig. 18b), se observó un aumento en la descomposición de RET con respecto a los controles a tiempos cortos, lo que sugeriría que algunas moléculas de RET expuestas en la superficie de OVA_{n2} se deterioraron en primer lugar. Luego, el perfil de descomposición fue similar al control RET_{luz} hasta las 18 h de almacenamiento, a partir del cual se observó una reducción significativa en la descomposición de RET ($23,3 \pm 0,4$ %).

En el caso del nanocomplejo de inclusión OVA-RET a pH 7,0, se obtuvo un contenido de OD significativamente mayor con respecto a los controles de RET (p

<0.05). Por lo tanto, el mayor contenido de OD en este sistema podría explicar la mayor descomposición de RET observada. Sin embargo, como puede observarse en la [Tabla 2](#), no se observó una relación clara entre la descomposición fotoquímica de RET y la concentración de OD, destacando que el efecto protector de RET observado se atribuiría principalmente a la complejación con OVA_{n2}. Por ejemplo, a partir de una comparación entre la descomposición de RET y los valores de concentración de OD para OVA a pH 4,0 y OVA_{n2} a pH 7,0 la mayor descomposición de RET no correspondió a la mayor concentración de OD. Es evidente que el nanocomplejo OVA_{n2}-RET fue más efectivo que los nanocomplejos OVA-RET para la preservación de la estabilidad fotoquímica de RET.

Tabla 2. Concentración inicial de oxígeno disuelto (OD, mg/L) y descomposición fotoquímica de RET (%) a 30 h para buffer fosfato pH 7,0 50 mM, OVA pH 4,0, OVA pH 7,0 y OVA_{n2} pH 7,0. Condiciones: concentración de proteína: 6,7 μM, concentración de RET: 670 μM, Temperatura: 25°C. Los valores se muestran como desviación estándar ± media y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Sistemas	Descomposición fotoquímica de RET a 30 h (%)	OD (mg/L)
Buffer	33 ± 1 ^c	4,1 ± 0 ^b
OVA pH 4,0	27,1 ± 0,2 ^b	3,9 ± 0,1 ^a
OVA pH 7,0	39,7 ± 0,7 ^d	5,4 ± 0,2 ^c
OVA _{n2} pH 7,0	23,3 ± 0,4 ^a	4,1 ± 0,1 ^b

3.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

Los resultados derivados de este capítulo permiten concluir que las propiedades de unión de RET a OVA dependen en gran medida de la agregación de la proteína. La nanopartícula de OVA (OVA_{n2}) fue capaz de unir una cantidad menor de RET en comparación con OVA, posiblemente debido a su formación (mediada por interacciones hidrofóbicas y SS) que podría involucrar algunos sitios hidrofóbicos necesarios para la unión de RET. Además, la agregación de OVA influyó en la estabilidad coloidal de los nanocomplejos de inclusión con RET, los tamaños de las partículas y las propiedades eléctricas.

Todos estos factores parecen desempeñar un papel importante y particular en la preservación de la estabilidad fotoquímica de RET en medios acuosos. En el caso de los nanocomplejos OVA-RET, el pH del medio acuoso (4,0 o 7,0) fue crítico para la estabilidad fotoquímica de RET; mientras que en el caso de los nanocomplejos OVA_{n2}-RET, su modo especial de unión fue determinante de una mayor preservación de RET a pH 7,0. Finalmente, los nanocomplejos formados con OVA_{n2} promovieron una mayor

estabilidad fotoquímica de RET que los formados con OVA. Estos hallazgos podrían ser de interés práctico en la formulación de alimentos o productos cosméticos fortificados con RET.

4. CAPÍTULO 2

Obtención y caracterización de nanopartículas biopoliméricas entre ovoalbúmina y pectina de alto metoxilo y su influencia en la estabilidad fotoquímica de retinol

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Polisacáridos y sus partículas biopoliméricas

Las interacciones proteína-PS encuentran varias aplicaciones en muchos sectores de investigación y desarrollo, por ejemplo, alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, etc. En la industria alimentaria, estas interacciones se han aprovechado ampliamente para mejorar la funcionalidad de los biopolímeros en alimentos complejos y para obtener estructuras supramoleculares a fin de controlar la textura y la estabilidad de sistemas coloidales dispersos [99], [100]. Más recientemente, los estudios sobre las interacciones de los biopolímeros se han centrado en la creación de NPB que se pueden utilizar como sistemas de *delivery* para la vehiculización y protección de CBs [96], [101], [102], [103]. Este desafío implica conocer las condiciones del medio acuoso (por ejemplo: pH, fuerza iónica, concentración relativa de biopolímeros, presencia de cosolutos, etc.) que promueven el autoensamblado apropiado del biopolímero [104], [105], [106], [107]. Este fenómeno está gobernado por diferentes fuerzas intermoleculares, por ejemplo, electrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals, puentes de hidrógeno, etc., que se producen en ciertas condiciones ambientales en estrecha relación con las características fisicoquímicas de las macromoléculas involucradas.

Los PS son polímeros formados por monosacáridos unidos mediante distintos enlaces glucosídicos. La mayoría de los PS naturales poseen cientos y hasta miles de unidades monoméricas [108]. 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 están formados por diferentes tipos de monosacáridos. Los PS difieren entre sí en términos de tipo, número de monosacáridos, secuencia, y enlace en la cadena polimérica. Esta diversidad lleva a diferencias en las propiedades moleculares y fisicoquímicas, tales como el PM, grado de ramificación, estructura, flexibilidad, carga eléctrica e interacciones con otras moléculas. Dichas diferencias moleculares conducen a cambios en las propiedades funcionales tales como solubilidad, espesamiento o viscosidad, gelificación, capacidad de retención de agua, actividad superficial, emulsificación y digestibilidad [15].

La bibliografía reporta que distintos PS se han utilizado para el desarrollo de nanopartículas, entre ellos la pectina de alto metoxilo [96], [11] que será utilizada en la presente tesis.

4.1.2. Pectina de alto metoxilo

Las pectinas comerciales usadas como aditivos son heteropolisacáridos que contienen al menos un 65% p/p de unidades de ácido galacturónico, el cual puede estar presente como ácido libre (sal de Na, K, Ca o NH_4^+), metil éster (esterificado naturalmente con metanol) o, conteniendo grupos amida, tal como es el caso de pectinas aminadas (Fig. 19). Contienen una columna vertebral lineal de unidades de ácido galacturónico interrumpidas por residuos de azúcares neutros como la ramnosa y la xilosa, entre otros [109]. Las unidades de ácido galacturónico están unidas entre sí por enlaces α 1-4. Las pectinas son derivadas de la ruptura de protopectinas más complejas que están presentes en el tejido vegetal (laminilla media de la pared celular) y también contienen un rango de azúcares neutros incluyendo ramnosa en la cadena principal; galactosa, arabinosa y cantidades menores de otros azúcares como cadenas laterales de azúcares neutros unidos a la ramnosa [110].

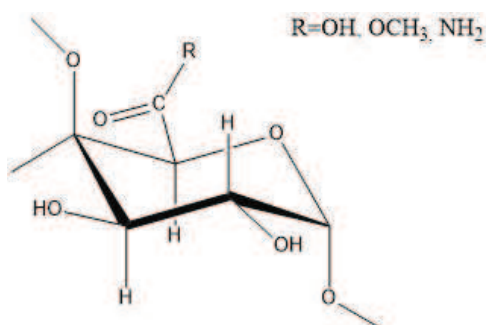


Figura 19. Unidades de ácido galacturónico (-OH), Ester (-OCH₃) y amida (-NH₂) encontradas en pectinas (Figura modificada de [Endreß y Christensen, 2009](#) [110]).

La mayor fuente de obtención de pectinas son las cáscaras de los cítricos, que se producen como residuo de la extracción de jugos y aceites esenciales y la pulpa de manzana. 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. Mayormente la obtención de pectinas se realiza a partir del material crudo mediante una extracción con ácido mineral caliente seguido de un proceso de purificación [110]. 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%) [111].

La PAM se emplea ampliamente en la industria alimentaria como agente gelificante en mermeladas de frutas en el rango de pH 3,0 a 3,3; como estabilizante de dispersiones de proteínas a pH ácido como en yogur o bebidas de jugo de frutas,

leche y análogos de lácteos como los preparados a partir de soja; también en jaleas de pastelería [110].

4.1.3. Interacciones proteína-polisacárido

Cuando se encuentran presentes en solución biopolímeros de diferente naturaleza (como proteínas y PS) pueden ocurrir diferentes interacciones entre ellos bajo determinadas condiciones [15]. La comprensión de estas interacciones resulta de relevante importancia para el diseño de NPB destinadas a la vehiculización de CBs. En particular, porque el PS puede conferir i) estabilidad coloidal al nanocomplejo proteína-ligando y ii) mayor protección del CB frente a agentes injuriantes de deterioro [11]. Estas ventajas que ofrece el PS se basan en la formación de una capa protectora y/o diferentes estructuras cuando interacciona con proteínas en el seno de la solución acuosa. 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, de van der Waals y puentes de hidrógeno que estabilizan los híbridos macromoleculares proteína-PS formados [101].

Las interacciones electrostáticas se explican en consideración de la carga neta que lleva cada biopolímero en las condiciones en que se produce el sistema mixto. En el caso de las proteínas, estas poseen grupos que confieren carga tanto positiva (grupos amonio, $-NH_3^+$) como negativa (grupos carboxilato, $-COO^-$) a la macromolécula. La carga neta total de la proteína dependerá del pH del medio acuoso. Existe un pH en el que la proteína posee idéntica cantidad de cargas positivas y negativas, resultando en una carga eléctrica neta igual cero. Este valor de pH se conoce como pI de una proteína. Aunque la carga neta en una proteína es cero en su pI , la proteína todavía tiene regiones positivas y negativas en su superficie y, por lo tanto, puede estar involucrada en interacciones electrostáticas atractivas y/o repulsivas. 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 [15].

Para un PS, su carga eléctrica depende de la naturaleza de los grupos iónicos que constituyen su cadena biopolimérica, como también de las condiciones de la solución acuosa. Algunos PS son neutros (como el almidón y la celulosa), otros aniónicos (como el alginato, goma arábica (GA) y pectinas) y otros catiónicos (como el quitosano). La magnitud de la carga eléctrica de los PS iónicos depende del pH en relación al pK_a de los grupos funcionales cargados. Los PS aniónicos tienden a ser neutros a valores de pH suficientemente menores al pK_a , pero manifiestan una carga

negativa por arriba del mismo; mientras que los PS catiónicos tienden a ser neutros a valores de pH suficientemente por arriba de su pK_a , pero positivos por debajo del mismo. En las pectinas el grupo cargado es el grupo carboxilato (COO^-), cuyo valor de pK_a es aproximadamente 3,5 [15].

Cuando se mezclan dos biopolímeros diferentes pueden formar una fase o dos fases dependiendo de la naturaleza de los biopolímeros involucrados, la composición de la solución y las condiciones ambientales (Fig. 20). En un sistema de una fase, los dos biopolímeros pueden coexistir como moléculas individuales (cosolubilidad) o como híbrido macromolecular proteína-PS soluble. En un sistema de dos fases, la solución se separa en dos fases distintas que poseen diferente composición biopolimérica. La separación de fases puede ocurrir por dos mecanismos fisicoquímicos diferentes: asociativo o segregativo [15].

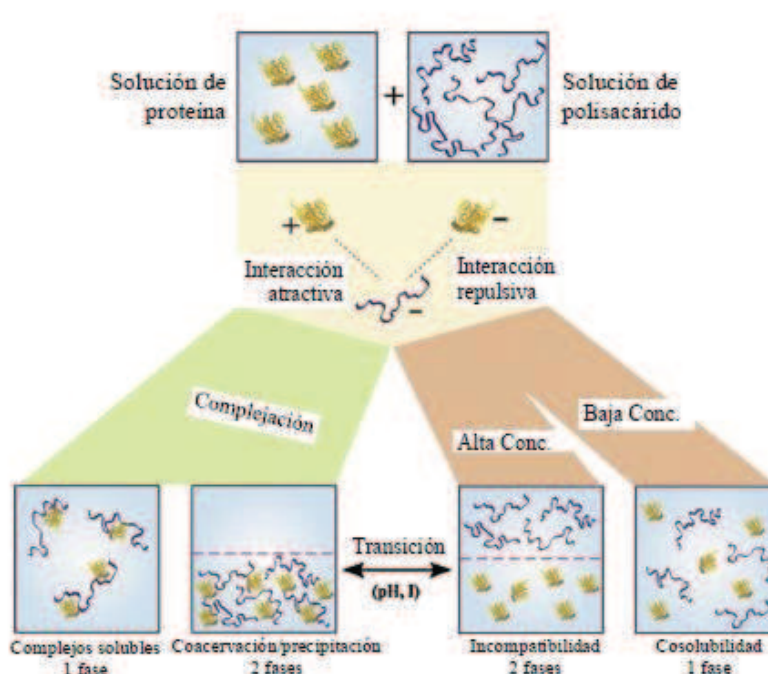


Figura 20. Interacciones posibles en un sistema de dos componentes biopoliméricos, por ejemplo, una mezcla de proteínas y PS (Figura modificada de Matalanis y col., 2011 [15]).

En la separación asociativa (o coacervación compleja), se produce una atracción electrostática fuerte entre dos biopolímeros diferentes, lo que genera una asociación entre ellos. Esto resulta en un sistema de dos fases, una rica en ambos biopolímeros y otra mayormente enriquecida en solvente acuoso. La fase rica en biopolímeros puede formar un coacervado o un precipitado dependiendo de la fuerza de atracción y de la naturaleza de los biopolímeros involucrados. En la separación de fase segregativa (o incompatibilidad termodinámica) existe una fuerte repulsión entre los biopolímeros (también debido a un efecto de exclusión estérica). Cuando la concentración de los

biopolímeros es baja, los dos biopolímeros se mezclan y forman una única fase. Una vez que la concentración de los biopolímeros excede cierto nivel ocurre la separación de fases segregativa y se forman dos fases, donde cada fase es rica en un biopolímero y empobrecida en el otro [15].

A partir de lo expuesto anteriormente, se pueden obtener nanopartículas o micropartículas a partir de una proteína y un PS mediante el control de las fuerzas atractivas entre biopolímeros. Para ello, es necesario tener en cuenta que el pH de la solución es crítico en la formación de estas estructuras y que las cargas superficiales en las moléculas de proteína y PS se pueden modular controlando el pH. Describamos la formación de NPB basadas en las interacciones de una proteína con un PS aniónico (Fig. 21). Cuando el pH está muy por encima del pI de la proteína, los dos biopolímeros tienen cargas negativas y, por lo tanto, se repelen fuertemente entre sí, lo que evita la formación de partículas. Cuando el pH está solo ligeramente por encima del pI de la proteína, el PS aniónico se une a grupos catiónicos en la superficie de la proteína y conduce a la formación de híbridos macromoleculares proteína-PS solubles. Cuando el pH se reduce aún más (por debajo del pI), los híbridos macromoleculares proteína-PS solubles pueden ensamblarse entre sí y formar complejos electrostáticos conocidos como "coacervados". Inicialmente, los coacervados se presentan como pequeñas gotitas ricas en biopolímeros suspendidas en la fase acuosa, pero son muy propensas a la coalescencia debido a su baja carga neta y el sistema tiende a la separación de fases asociativas. Si el pH se reduce demasiado, los biopolímeros se empaquetan tan estrechamente que forman estructuras de gran tamaño que finalmente sedimentan. Por último, si el pH se baja muy por debajo del valor de pK_a del PS aniónico, no se produce formación de complejos debido a la disminución de carga del PS [112].

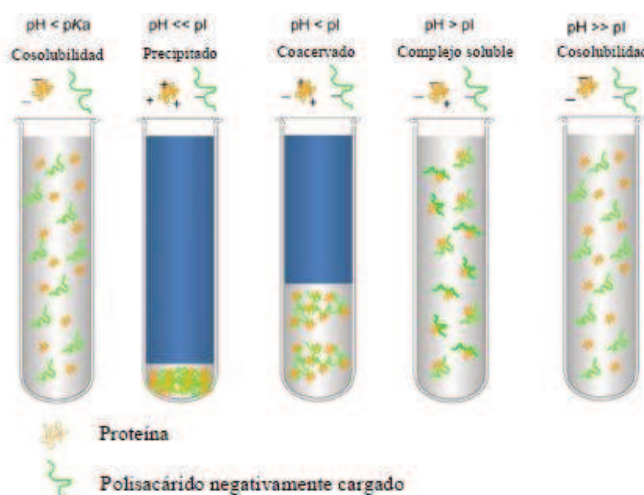


Figura 21. Representación esquemática del mecanismo para producir partículas de proteína y PS en términos del pH del sistema (Figura modificada de Davidov-pardo y col., 2015 [112]).

4.1.4. Formación de nanopartículas biopoliméricas para encapsulación de compuestos hidrofóbicos

Teniendo en cuenta dicho marco teórico se han desarrollado sistemas proteína-PS para la encapsulación de diferentes CBs. En este sentido, se han desarrollado NPB mediante la deposición electrostática de pectina sobre agregados de BLG [113]. Más aun, las NPB formadas entre BLG y pectina, que encapsulan moléculas de ácido docosahexaenoico (DHA), mostraron una muy buena estabilidad coloidal y un tamaño de partícula promedio de 100 nm. Además, estas NPB confirieron protección eficaz al DHA contra la oxidación durante una prueba en la cual los sistemas fueron sometidos a 40°C durante 100 h, encontrándose que la pérdida de DHA fue inferior al 10% en el sistema BLG-pectina, mientras que fue de 60% en el sistema con BLG solo. [11]. Otro ejemplo es el desarrollo de NPB por deposición electrostática que se realizó con zeína y pectina a pH 4,0 para la encapsulación de curcumina [114]. Su tamaño fue de 250 nm, de morfología esférica y con EE de curcumina superiores al 85% dependiendo del % de curcumina usado en la preparación de las NPB [114]. Otro ejemplo es la formación de NPB entre OVA y celulosa a pH 4,4 para la encapsulación de resveratrol. Los tamaños obtenidos fueron entre 200 y 300 nm dependiendo de si el complejo electrostático se sometió a un tratamiento térmico o no a 90°C por 30 min. El estudio de descomposición de resveratrol frente a la radiación UV mostro que después de 60 min, más del 70% del resveratrol se isomerizó en el sistema sin protección, mientras que en los sistemas OVA-celulosa la descomposición fue del 45% y 65% dependiendo de si la NPB se había sometido a tratamiento térmico o no [115]. Zimet y Livney (2010) [116] desarrollaron NPB entre BLG y PBM en un rango de pH de 3,5 a 4,5 para la encapsulación de vitamina D obteniendo tamaños entre 50 y 70 nm. Un estudio de la estabilidad frente al O₂ a temperatura ambiente por 7 días mostro que el sistema BLG-PBM proporcionaba una mejor protección a la vitamina D contra la degradación que la BLG sola, y la estabilidad fue, en ambos casos, significativamente mejor que la de la vitamina D sin encapsular [116]. En otro trabajo, se desarrollaron NPB mediante la deposición electrostática de PAM sobre complejos BLG-LA. Aquí, se estudiaron diferentes relaciones proteína-PS ($R_{\text{prot:PS}}$) siendo las mismas 1:1, 2:1, 4:1 y 6:1 [96]. Mediante ensayos de comportamiento de fase se seleccionó el pH 4,0 para la formación de NPB. A dicho pH se obtuvieron NPB estables a una $R_{\text{prot:PS}}$ 1:1 y 2:1, con tamaños alrededor de 337-364 nm y potenciales ζ comprendidos entre -25 y -28 mV. A pH 4,0, las $R_{\text{prot:PS}}$ 4:1 y 6:1 formaron un precipitado visible a los 30 min. La $R_{\text{prot:PS}}$ 2:1 generó un mínimo en la IF de la NPB, que podría deberse a la deposición

electrostática de PAM sobre el complejo BLG-LA, disminuyendo la accesibilidad de los fluoróforos para la emisión de fluorescencia. Esto podría generar una mayor protección del LA por la cubierta de PAM en las NPB [96].

Sponton y col., 2017 [117], desarrollaron NPB entre nanopartículas de OVA y PAM, estudiando diferentes $R_{\text{prot:PS}}$. Como se mencionó previamente, la protección de las NPB se debería a que el PS se une a la proteína mediante interacciones electrostáticas formando una capa protectora a su alrededor [11]. En este sentido, las mediciones de potencial ζ ayudarían a determinar qué concentración de PS es suficiente para recubrir la superficie de la proteína en su totalidad. En la Fig. 22 se observan las curvas de potencial ζ vs. pH para OVA_{n2} , PAM y las relaciones 1:1, 2:1 y 3,3:1 de OVA_{n2} -PAM. Tal como puede notarse PAM posee carga negativa en todo el rango de pH estudiado, mientras que la nanopartícula posee un pl de 4,73.

En el caso de OVA_{n2} -PAM, según se observa en la Fig. 22 la $R_{\text{OVA}_{n2}:\text{PAM}}$ 3,3:1 no sería suficiente para cubrir la superficie de la nanopartícula, ya que dicho sistema presenta valores de potencial ζ positivos en el rango evaluado. La presencia de cargas positivas se debe a los grupos cargados positivamente en la nanopartícula proteica. La neutralización total de los grupos positivos se produciría para las $R_{\text{OVA}_{n2}:\text{PAM}}$ 2:1 y 1:1 [117], siendo la relación 2:1 la que presenta una mayor cantidad de nanopartícula (y por lo tanto mayor capacidad de carga del CB hidrofóbico) y fue la seleccionada para el desarrollo de la presente tesis.

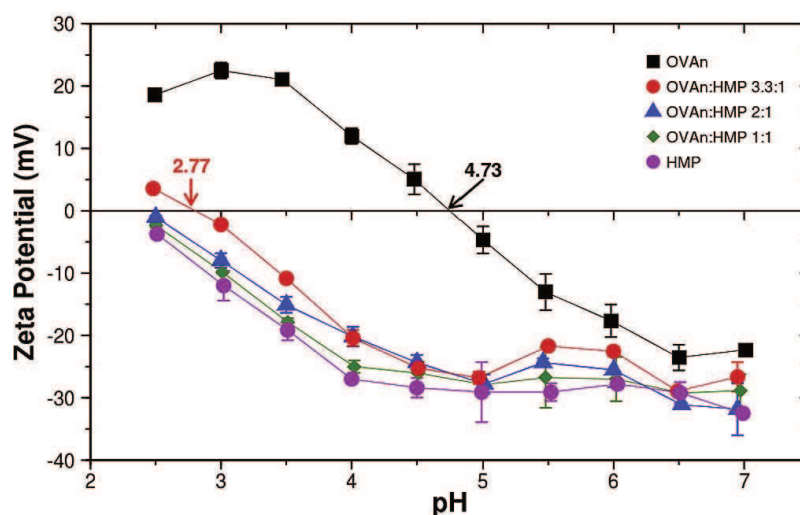


Figura 22. Potencial ζ vs. pH para diferentes relaciones OVA_{n2} -PAM (Figura modificada de Sponton y col., 2017 [117]).

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, el desarrollo de NPB para el *delivery* de CB hidrofóbicos se llevó a cabo aplicando las siguientes propiedades funcionales: (i) unión funcional del ligando (RET) a los sistemas proteicos (OVA u

OVA_{n2}) para obtener nanocomplejos de inclusión [14], [26]. Como se observó en el Capítulo 1 de la presente tesis los sitios hidrofóbicos en dominios específicos de los sistemas proteicos conducen principalmente a la unión molecular, además, la protección del CB hidrofóbico puede aumentarse si la conformación de la proteína se altera mediante un proceso de desnaturalización/agregación por tratamiento térmico controlado y (ii) deposición de un PS sobre la superficie del nanocomplejo previamente formado [96]. Las fuerzas electrostáticas gobiernan principalmente este fenómeno, dependiendo de la naturaleza química del PS y el estado de conformación de la proteína [101]. Esto conduce a la formación de una cubierta que promueve la protección del ligando hidrofóbico contra varios factores ambientales injuriantes [96], [11].

Si bien se han desarrollado NPB por deposición electrostática entre diferentes proteínas y PS para encapsular diferentes compuestos como AG, polifenoles, vitaminas; el estudio y caracterización de la formación de NPB basadas en OVA y PAM para la encapsulación y protección de RET no se ha abordado. En este marco, el presente capítulo tiene como objetivo obtener información experimental sobre las condiciones adecuadas para la interacción entre OVA (y su nanopartícula derivada OVA_{n2}) y PAM para producir NPB para la encapsulación y protección de RET frente a la exposición de luz y O₂.

4.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

Objetivo 1: Estudiar la interacción entre OVA y PAM y definir las condiciones adecuadas para la obtención de NPB.

Objetivo 2: Caracterizar las NPB OVA-PAM obtenidas y el sistema OVA-RET-PAM.

Objetivo 3: Evaluar la estabilidad fotoquímica de RET en dichas NPB.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Materiales

La ovoalbúmina (OVA), el retinol (RET) y el ácido 1-anilino-8-naftalen sulfónico (ANS) utilizados fueron descritos en el Capítulo 1. Se empleó una muestra de pectina de alto metoxilo (PAM, DM 66-70%) cuya composición en % b.s. fue la siguiente: fibra 74,7; azúcares 20,9; proteína 2,20; cenizas 2,20; grasa 0,0. La misma fue provista por

CargillTM (Argentina). Los reactivos analíticos adicionales fueron suministrados por Cicarelli (Argentina).

4.3.2. Formación de nanopartículas biopoliméricas

4.3.2.1. Obtención del nanocomplejo OVA_{n2}-RET

La obtención de nanocomplejos de inclusión OVA-RET y OVA_{n2}-RET se realizó de igual manera que en el Capítulo 1. En resumen, se prepararon soluciones de OVA y OVA_{n2} (23 mM) en buffer fosfato pH 7,0 50 mM. Por otro lado, se preparó una solución stock de RET 250 mM en etanol. Luego, se mezclaron la solución de proteína (OVA u OVA_{n2}) y la solución etanólica de RET en condiciones de saturación de los sitios de unión de la proteína. Las soluciones de nanocomplejos proteína-RET se almacenaron en oscuridad durante 2 h para alcanzar el equilibrio.

4.3.2.2. Obtención de la NPB OVA_{n2}-RET-PAM

La estrategia utilizada para la obtención de NPB consistió en explotar: (i) la capacidad de las proteínas (OVA u OVA_{n2}) para unirse a RET, con el fin de obtener nanocomplejos de inclusión proteína-RET, y (ii) la deposición electrostática de PAM sobre los nanocomplejos previamente formados para la obtención de NPB. Para ello, fue necesario conocer las condiciones adecuadas de pH para la formación de los híbridos macromoleculares proteína-PS solubles por lo que se aplicaron un conjunto de técnicas complementarias que se describirán a continuación.

4.3.3. Comportamiento de fase

Para obtener información sobre las interacciones proteína-PS que promueven la formación de NPB coloidalmente estables, se realizó un estudio del comportamiento de fase del sistema mixto de biopolímeros. Se prepararon sistemas mixtos de biopolímeros (sistemas OVA-PAM u OVA_{n2}-PAM) a una concentración relativa $R_{\text{prot:Ps}}$ de 2:1 [96], [117]. Para esto, se prepararon soluciones de proteína (OVA u OVA_{n2}) y de PAM en buffer fosfato pH 7,0 50 mM. La solución de PAM se dejó en agitación 24 h para promover la adecuada hidratación del PS. En todos los sistemas, la concentración de proteína fue 23 mM (0,1% p/p, concentración de proteína utilizada para la obtención de nanocomplejos de inclusión proteína-RET) y la concentración de PAM fue de 0,05% p/p. Los sistemas mixtos se obtuvieron por mutua dilución

mezclando el volumen apropiado de cada solución de biopolímero concentrado al doble hasta la concentración final requerida. El comportamiento de fase en solución acuosa se evaluó considerando dos enfoques experimentales: (i) medidas de ABS a 400 nm, y (ii) apariencia visual de los sistemas de biopolímeros a las 24 h después de la preparación. Para ello, se prepararon sistemas mixtos de biopolímeros a diferentes valores de pH en el rango de 7,0 a 2,5. El pH se ajustó con solución de HCl 1M. La ABS a 400 nm se determinó tan pronto como se prepararon los sistemas, usando un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido). Posteriormente, los sistemas mixtos de biopolímero a diferentes valores de pH se mantuvieron en reposo a temperatura ambiente (25°C) durante 24 h, y su aspecto visual se registró mediante una cámara fotográfica (Cyber-shot 12.1 mpx, Sony, USA). De acuerdo a los resultados de comportamiento de fase obtenidos, se seleccionaron los valores de pH más apropiados para la formación de NPB solubles. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado a 25° C.

4.3.4. Determinación de tamaño y potencial ζ

El efecto de la complejación de RET sobre el tamaño de partícula y las propiedades eléctricas para las NPB se examinó por medio de la distribución de tamaño de partícula (PSD) y el análisis de potencial ζ . Para ello, se utilizó el mismo equipamiento y condiciones previamente descritas en el Capítulo 1.

4.3.5. Ensayo de estabilidad fotoquímica de retinol

La descomposición fotoquímica del RET en dispersiones acuosas de NPB se realizó tal como fue descrito en el Capítulo 1. Los sistemas proteína-RET y proteína-RET-PAM se prepararon como se describió en las secciones anteriores. En todos los sistemas, las concentraciones de proteína (OVA y OVA_{n2}), RET y HMP fueron: 6,7 mM (0,028% p/p), 670 mM y 0,014% p/p, respectivamente.

4.3.6. Determinación de oxígeno disuelto

Para obtener una mejor comprensión de los resultados derivados del ensayo de descomposición fotoquímica de RET, se evaluó la concentración inicial de OD tanto en los sistemas proteicos como en los híbridos macromoleculares proteína-PS. El OD se determinó en sistemas sin RET para conocer la concentración de OD a la que el RET

estaría inicialmente expuesto. Por lo tanto, las mediciones se realizaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM (incluido como control) y en los siguientes sistemas: OVA a pH 4,0; OVA-PAM a pH 4,0 y a pH 6,0; OVA_{n2} a pH 6,0 y OVA_{n2}-PAM a pH 6,0. La metodología utilizada fue la misma que la descrita en el Capítulo 1.

4.3.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado a temperatura ambiente. El análisis estadístico se realizó de igual manera que en el Capítulo 1.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Comportamiento de fase de sistemas mixtos de biopolímero

El estudio de las interacciones proteína-PS en solución acuosa permitió conocer las condiciones experimentales en las que se producen NPB coloidalmente estables para la vehiculización de RET. La Fig. 23 muestra el comportamiento de fase dependiente del pH para los sistemas mixtos OVA-PAM y OVA_{n2}-PAM. El comportamiento de fase se describió en términos de ABS a 400 nm (Fig. 23a) y apariencia visual de los sistemas mixtos (Fig. 23b y c), incluyéndose como controles el comportamiento de los sistemas proteicos OVA y OVA_{n2} puros (ya discutido en la Sección 3.4.2.1).

Para OVA, la ABS a 400 nm fue prácticamente cero en todo el rango de pH del ensayo, sugiriendo un tamaño pequeño de la proteína nativa. Para el sistema OVA-PAM, la ABS fue similar al control hasta un valor de pH de alrededor de 4,5 a partir del cual los valores de ABS aumentaron abruptamente y alcanzaron un máximo en el rango de pH 3,5-3,0. Como se puede observar en la Fig. 23b, los sistemas mixtos permanecieron translúcidos hasta un pH de 4,5 a las 24 h de observación. Una disminución en el pH del medio acuoso provocó el desarrollo de turbidez. A pH 4,0 se registró una turbidez apreciable, lo que sugiere la existencia de especies macromoleculares más grandes. El pI para OVA fue ~4.8 (Fig. 16b; Capítulo 1) y el valor de pK_a para PAM se asumió en 3,5 debido a la disociación del grupo COOH [118]. Por lo tanto, a pH 4,0 se podría suponer la prevalencia de interacciones electrostáticas atractivas entre los grupos catiónicos de OVA y los grupos aniónicos de PAM. Este hecho también podría explicarse considerando los valores de potencial ζ para OVA (+11±1 mV) y PAM (-27±0 mV) a pH 4,0 (Tabla 3). Estas interacciones dieron como resultado la formación de híbridos macromoleculares proteína-PS

solubles debido a que el sistema se mantuvo coloidalmente estable en el tiempo. La estabilidad coloidal para el sistema OVA-PAM también se refleja por su alto valor de potencial ζ (-23 ± 0 mV), el que podría estar fuertemente influenciado por el carácter aniónico del PS. A pH 3,5 se observó una gran turbidez (Fig. 23b) que sugiere la presencia de grandes híbridos macromoleculares proteína-PS. Luego, una nueva disminución en el pH promovió la coacervación compleja o separación de fases asociativa, posiblemente debido a la disminución de cargas negativas de PAM, y la formación de coacervados biopoliméricos que precipitan [96].

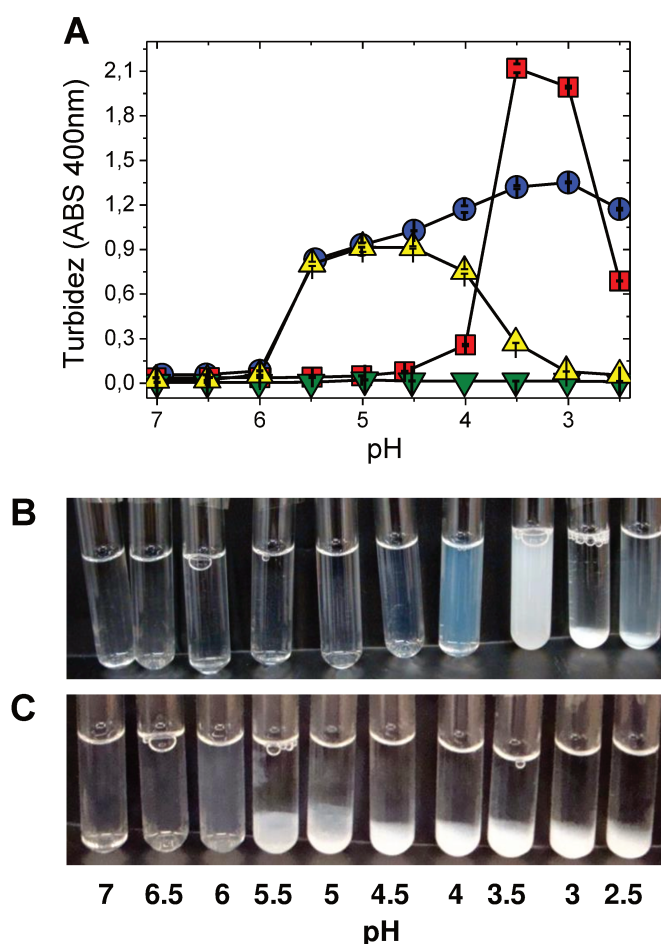


Figura 23. Comportamiento de fase de proteínas puras y de sistemas proteína-PAM en función del pH del medio acuoso: ABS a 400 nm como medida de la turbidez del sistema (A) para (▼) OVA, (■) OVA-PAM, (▲) OVA_{n2} y (●) OVA_{n2}-PAM y apariencia visual para OVA-PAM (B) y OVA_{n2}-PAM (C). Condiciones: concentración de proteína: 23 μ M (0,1% p/p), concentración de PAM: 0,05% p/p. Los valores en A se muestran como media \pm desviación estándar.

Para OVA_{n2}, la disminución del pH causó un máximo de ABS a pH 5,0-4,5, lo que podría explicarse por un aumento en el tamaño de partícula debido a la reducción de la carga neta de OVA_{n2}, cuyo pI se estimó en $\sim 4,8$ (Fig. 16b; Capítulo 1). Para el sistema OVA_{n2}-PAM, se observó que los valores de ABS fueron similares a los

obtenidos para OVA_{n2} hasta pH 5,0 a partir del cual la ABS se incrementó gradualmente hasta alcanzar un máximo a pH 3,0 (Fig. 23a). Para este sistema, se observó el desarrollo de una leve turbidez a partir de pH 6,5 (Fig. 23c, como también se puede observar en la Fig. 23a). Luego, una disminución en el pH hasta 6,0 causó un aumento apreciable en la turbidez, pero el sistema permaneció coloidalmente estable durante 24 h (Fig. 23c). La Tabla 3 muestra los valores de potencial ζ para el sistema OVA_{n2}, PAM y OVA_{n2}-PAM a pH 6,0. Se puede observar que ambos biopolímeros puros tienen una carga neta negativa (-18 ± 3 mV para OVA_{n2} y -28 ± 1 mV para PAM). Sin embargo, para el sistema OVA_{n2}-PAM, se registró un valor de potencial ζ de -25 ± 1 mV, que fue significativamente mayor que el obtenido para PAM ($p < 0.05$). A pesar de que a un valor de pH 6,0 las interacciones repulsivas fueron predominantes, podría ocurrir alguna neutralización de carga negativa de PAM por medio de aminoácidos positivos expuestos sobre la superficie de OVA_{n2}. Estas débiles interacciones asociativas podrían conducir a la formación de entidades híbridas supramoleculares solubles [119], y podrían ser particularmente favorecidas cuando la conformación de las proteínas se altera por agregación térmica [120]. Para un pH entre 6,0 y 5,0 la separación de fases podría explicarse debido a una agregación inducida por una reducción de la carga neta, especialmente cercana al pI de OVA_{n2}. Por debajo de pH 5,0, las interacciones electrostáticas fuertes y atractivas podrían promover la formación de híbridos macromoleculares proteína-PS y de coacervados que precipitan como consecuencia de su gran tamaño [101] (Fig. 23c).

De acuerdo con estos resultados, las condiciones más apropiadas para obtener NPB para la vehiculización RET son pH 4,0 y 6,0. Las partículas generadas en estas condiciones se caracterizaron en términos de su tamaño y propiedades eléctricas, como se discutirá en la siguiente sección.

4.4.2. Distribución de tamaño y potencial ζ de NPB para la vehiculización de retinol

Las Fig. 24, 25 y 26 muestran el efecto de la unión de RET sobre el perfil de PSDi y de PSDv para los sistemas OVA-PAM y OVA_{n2}-PAM. Para una mejor comprensión, los resultados también se muestran en la Tabla 3, donde el d_H se obtuvo a partir de la PSDi y se muestra el % en volumen que corresponde a cada pico.

Para OVA nativa a pH 4,0, se observaron dos picos en el perfil de PSDi, el primero a 10 ± 1 nm y el segundo 61 ± 2 nm (Fig. 24a), que representan 92 y 8%, en volumen respectivamente (Fig. 24b). Al igual que en el Capítulo 1, el primer pico

correspondería al d_H de OVA [35], y el segundo posiblemente a trazas de proteína agregada. Para los nanocomplejos de inclusión OVA-RET, se registró un tamaño de 203 ± 17 nm (correspondiente al 92% en volumen) después de la formación del nanocomplejo con RET. Con respecto a esto, también se informó que una unidad monomérica de OVA es capaz de unir 108 moléculas de RET con una K_a de $10^5 M^{-1}$. Por lo tanto, el aumento en el tamaño de partícula para el nanocomplejo de inclusión OVA-RET podría relacionarse con la capacidad de OVA de unir RET. Como se deduce de la [Tabla 3](#), a este valor de pH, la complejación de RET no alteró significativamente la magnitud del potencial ζ de OVA ($p > 0.05$), lo que respalda la idea de que la estabilidad coloidal del nanocomplejo de inclusión OVA-RET se rige principalmente por las propiedades eléctricas de OVA.

Tabla 3. Efecto de la complejación proteína-RET y proteína-RET-PAM en el potencial ζ (mV), diámetro hidrodinámico (d_H , nm) y Volumen (%) de OVA y OVA_{n2} en función del pH del medio acuoso. Condiciones: Concentración de proteína: $23 \mu M$ (0,1% p/p), concentración de RET: 2,3 mM, concentración de PAM: 0,05%. Temperatura: $25^\circ C$. Los valores se muestran como la desviación estándar \pm media y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

pH	Sistemas	d_H (nm)	Volumen (%)	potencial ζ (mV)
4,0	OVA	10 ± 1^a	92 ± 2	$+11 \pm 1^g$
		61 ± 2^c	8 ± 2	
	OVA-RET	203 ± 17^d	92 ± 1	$+12 \pm 0^g$
	OVA-PAM	253 ± 5^f	100 ± 0	-23 ± 0^d
	OVA-RET-PAM	286 ± 18^g	100 ± 0	-21 ± 1^e
	PAM	990 ± 65^k	100 ± 0	-27 ± 0^a
6,0	OVA	9 ± 1^a	94 ± 0	-17 ± 1^f
		$52 \pm 2^{b,c}$	6 ± 0	
	OVA-RET	239 ± 0^e	100 ± 0	-22 ± 1^e
	OVA-PAM	46 ± 4^b	88 ± 1	-28 ± 1^a
	OVA-RET-PAM	535 ± 16^j	10 ± 2	-27 ± 1^b
6,0	OVA_{n2}	197 ± 3^d	98 ± 0	-18 ± 3^f
	OVA_{n2} -RET	353 ± 9^h	96 ± 1	-17 ± 0^f
	OVA_{n2} -PAM	231 ± 0^e	91 ± 4	-25 ± 1^c
	OVA_{n2} -RET-PAM	376 ± 10^i	99 ± 1	-23 ± 1^d
	PAM	-	-	-28 ± 1^a

Para completar la formación de NPB, se realizó la deposición electrostática de PAM sobre la superficie del nanocomplejo OVA-RET a pH 4,0. Se observó que la deposición de PAM sobre la superficie de OVA pura provocó la formación de NPB con d_H de 253 ± 5 nm, que corresponde a un tamaño de partícula intermedio entre OVA (10 ± 1 nm) y PAM (990 ± 65 nm), lo que puso en evidencia el autoensamblaje electrostático entre biopolímeros [96]. Como se mencionó en la sección anterior, los valores de potenciales ζ para los sistemas OVA, PAM y OVA-PAM respaldan este

resultado (Tabla 3). Además, se observó que la unión de RET causó un aumento significativo en el d_H final para el sistema OVA-PAM, siendo este de 286 ± 18 nm ($p < 0,05$). Por otro lado, al observar la diferencia en el valor del potencial ζ para los sistemas OVA-PAM (-23 ± 0 mV) y OVA-RET-PAM (-21 ± 1 mV) si bien es significativa ($p < 0,05$), no hubo grandes diferencias entre estas magnitudes, lo que sugeriría que la unión de RET no influyó prácticamente en las propiedades eléctricas del sistema OVA-PAM.

El análisis de los perfiles de PSD para OVA_{n2} y los nanocomplejos de inclusión OVA_{n2} -RET a pH 4,0 no pudo realizarse debido a la sedimentación gradual de partículas en la parte inferior de la celda de medición. Sin embargo, como se puede observar en la Fig. 25, el análisis de PSD se realizó a pH 6,0 obteniéndose los siguientes datos de d_H : 197 ± 3 nm (98%) y 353 ± 9 nm (96%), para OVA_{n2} y los nanocomplejos de inclusión OVA_{n2} -RET, respectivamente. Como se informó en el Capítulo 1, OVA_{n2} fue capaz de unir ~ 83 moléculas de RET por unidad monomérica de OVA en dos tipos de sitios de unión, siendo uno de ellos de mayor orden de afinidad ($10^5 M^{-1}$). Por lo tanto, el aumento del tamaño de partícula observado para los nanocomplejos OVA_{n2} -RET estaría directamente relacionado con la capacidad de OVA_{n2} para unir RET. Con respecto a las propiedades eléctricas de los nanocomplejos OVA_{n2} -RET, a partir de la Tabla 3 pudo deducirse que la unión de RET no modificó significativamente el valor de potencial ζ para OVA_{n2} ($p > 0,05$; -17 ± 0 mV vs. -18 ± 3 mV), lo que sugiere que la estabilidad coloidal de los nanocomplejos OVA_{n2} -RET estaría gobernada principalmente por el comportamiento eléctrico de los agregados proteicos. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, las NPB para la vehiculización RET se obtuvieron mediante deposición de PAM sobre la superficie de los nanocomplejos OVA_{n2} -RET. Como se discutió en la sección anterior, a pH 6,0, el sistema OVA_{n2} -PAM podría caracterizarse como una entidad supramolecular híbrida soluble formada a través de interacciones electrostáticas débiles entre los grupos aniónicos de PAM y algunos aminoácidos catiónicos presentes en la superficie de OVA_{n2} . Para el sistema OVA_{n2} -PAM, se registró un d_H de 231 ± 0 nm (91%), siendo este un tamaño intermedio entre OVA_{n2} (197 ± 3 nm) y PAM (990 ± 65 nm). Este resultado respalda la idea de que alguna interacción electrostática entre los biopolímeros se produciría en el sistema OVA_{n2} -PAM a pH 6,0 [119], [120]. Además, este resultado está soportado por la magnitud del potencial ζ , como se puede deducir de la Tabla 3 y fue discutido en la sección anterior. Para el sistema OVA_{n2} -RET-PAM, el análisis de PSD produjo un d_H de 376 ± 10 nm, que fue significativamente más alto que el registrado para el sistema OVA_{n2} -PAM ($p < 0,05$). Además, se observó que la unión de

RET prácticamente no alteró el potencial ζ de OVA_{n2}-PAM (el potencial ζ cambió de -25 ± 1 mV a -23 ± 1 mV al agregar RET al nanocomplejo OVA_{n2}-PAM; [Tabla 3](#)).

Por otro lado, una pregunta que surge del análisis de los sistemas OVA_{n2}-PAM a pH 6,0 sería si la agregación de OVA (formación de OVA_{n2}) podría ser responsable del comportamiento de interacción biopolimérica observada. Para verificar esta hipótesis, se determinó el perfil de PSD y el potencial ζ para los sistemas OVA-PAM y OVA-RET-PAM a pH 6,0 tal como se muestra en la [Fig. 26](#) y en la [Tabla 3](#), respectivamente. Para OVA, a pH 6,0 se observó un comportamiento en la PSD similar al registrado a pH 4,0 registrando un primer pico a 9 ± 1 nm (94%) y un segundo a 52 ± 2 nm (6%). Este resultado podría sugerir que no habría cambios conformacionales en la estructura secundaria y terciaria de OVA como consecuencia de los cambios de pH [\[98\]](#). Para el sistema OVA-RET, se registró una d_H de 239 ± 0 nm, destacando el aumento del tamaño de partícula como consecuencia de la complejación con RET. A pH 6,0 los nanocomplejos OVA-RET mostraron un ligero aumento en la carga negativa en comparación con OVA (de -17 ± 1 mV aumentó a -22 ± 1 mV [Tabla 3](#)). Para los sistemas OVA-PAM y OVA-RET-PAM, el análisis del perfil de PSD arrojó los siguientes datos de d_H : 46 ± 4 nm (88%) y 252 ± 6 nm (96%), respectivamente, lo que sugeriría que la adición de PAM causó un aumento significativo en el tamaño de OVA y de los nanocomplejos de inclusión OVA-RET. Estos hallazgos indicarían la existencia de algunas interacciones entre los biopolímeros. Sin embargo, de acuerdo con la [Tabla 3](#) para estos sistemas, los valores de potenciales ζ fueron de -28 ± 1 y -27 ± 1 mV, respectivamente, lo que podría indicar que las propiedades eléctricas de estos estarían fuertemente determinadas por el carácter aniónico de PAM (-28 ± 1 mV). Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, podría deducirse que a pH 6,0 las interacciones electrostáticas en los sistemas OVA-PAM y OVA-RET-PAM serían más débiles que las observadas para los sistemas OVA_{n2}-PAM y OVA_{n2}-RET-PAM, debido a que la carga neta de PAM no se modificó bajo interacción. Por lo tanto, es correcto pensar que la agregación de OVA podría alterar el modo en que la proteína interactúa electrostáticamente con PAM a pH 6,0.

En resumen, de acuerdo con los resultados de potenciales ζ y de PSD, podría concluirse que la unión de RET promovió un ligero aumento en la magnitud del d_H , pero no alteró significativamente las propiedades eléctricas de las NPB, que parecerían estar fuertemente influenciadas por el carácter aniónico de PAM. Estos hallazgos están de acuerdo con los discutidos en la sección anterior y, en general, podrían ser relacionados con la mayor estabilidad coloidal observada para estos sistemas de vehiculización de RET [\[96\]](#), [\[97\]](#).

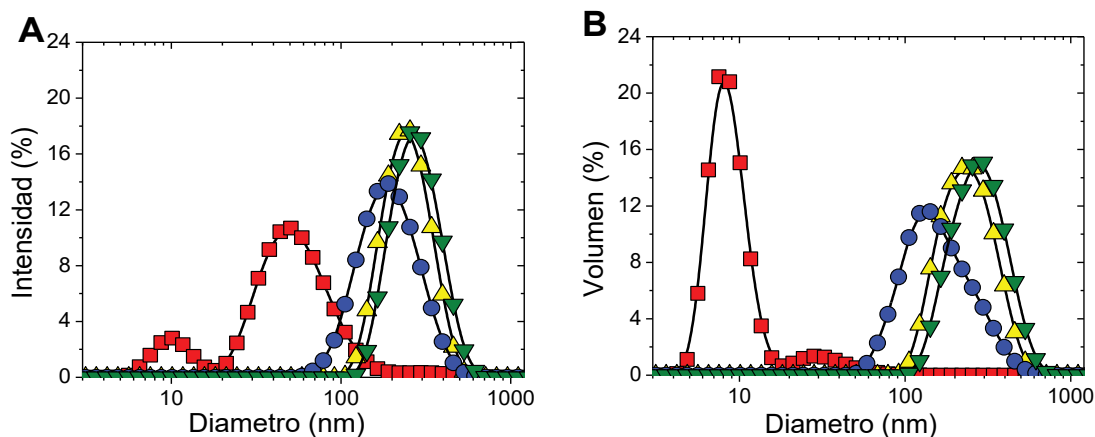


Figura 24. Distribución de tamaño de partícula (PSD) basada en el porcentaje de Intensidad y Volumen (%) a pH 4: (A) y (B): (■) OVA, (●) OVA-RET, (▲) OVA-PAM y (▼) OVA-RET-PAM. Condiciones: Concentración de proteína: 23 μ M (0,1% p/p), concentración de RET: 2,3 mM, concentración de PAM: 0,05%. Temperatura: 25°C.

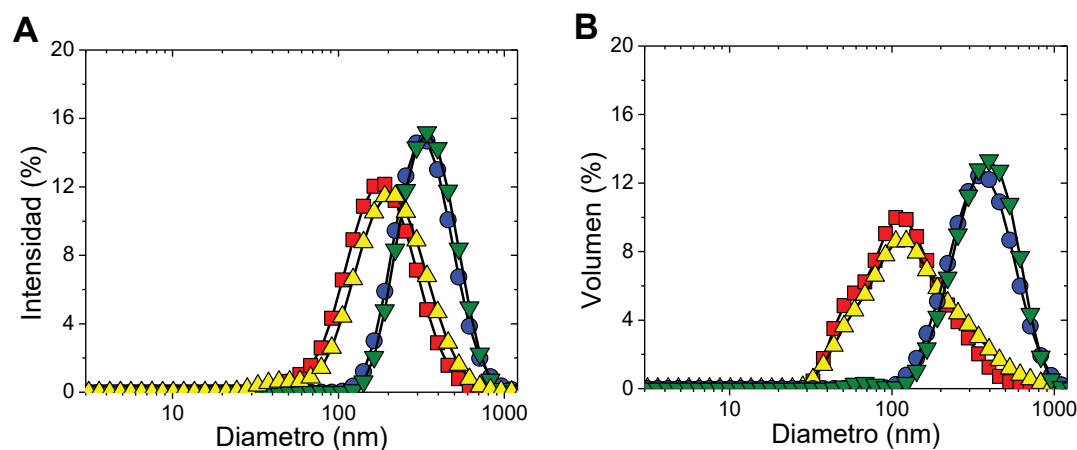


Figura 25. Distribución de tamaño de partícula (PSD) en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%) a pH 6: (A) y (B): (■) OVA_{n2}, (●) OVA_{n2}-RET, (▲) OVA_{n2}-PAM y (▼) OVA_{n2}-RET-PAM. Condiciones: Concentración de proteína: 23 μ M (0,1% p/p), concentración de RET: 2,3 mM, concentración de PAM: 0,05%. Temperatura: 25°C.

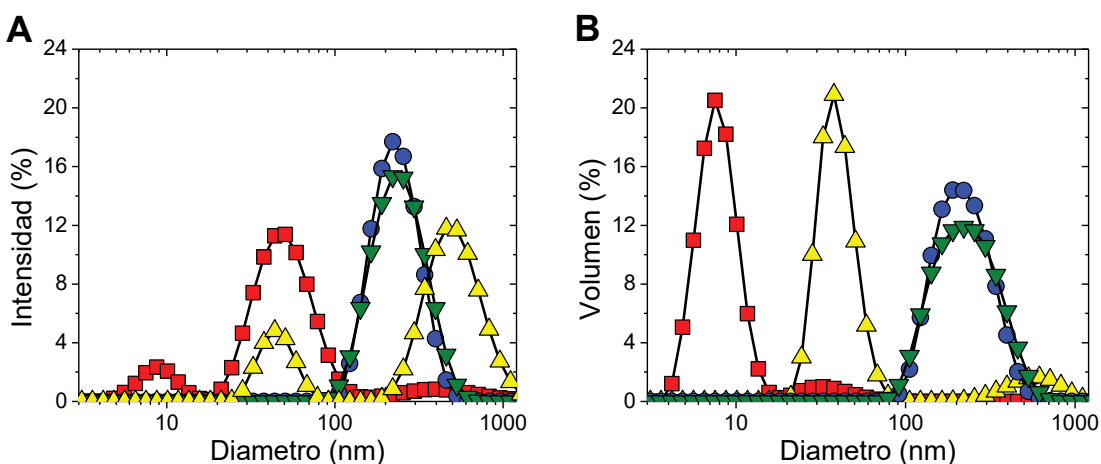


Figura 26. Distribución del tamaño de partícula (PSD) en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%) a pH 6: (A) y (B): (■) OVA, (●) OVA-RET, (▲) OVA-PAM y (▼) OVA-RET-PAM. Condiciones: Concentración de proteína: 23 μ M (0,1% p/p), concentración de RET: 2,3 mM, concentración de PAM: 0,05%. Temperatura: 25°C.

4.4.3. Estabilidad fotoquímica de retinol

Basándonos en la hipótesis de que la adición de un PS podría mejorar la estabilidad fotoquímica de RET a través de interacciones favorables con OVA y OVA_{n2} se realizó un estudio de la estabilidad fotoquímica de RET vehiculizado en NPB.

El efecto de la adición de PAM sobre la degradación fotoquímica de RET (%) para los nanocomplejos OVA-RET (a pH 4,0) y los nanocomplejos OVA_{n2}-RET (a pH 6,0) se muestra en la Fig. 27a y b, respectivamente. Además, los resultados para la degradación fotoquímica de RET a 30 h de almacenamiento y los valores iniciales de OD (mg OD/L) se informan en la Tabla 4. Como se analizó en el Capítulo 1, para el control RET_{oscuridad}, se observó que la descomposición de RET aumentó linealmente hasta las 9 h, desde la cual permaneció prácticamente constante hasta las 30 h (17,0±1,0 %). Del mismo modo, para el control RET_{luz}, la descomposición de RET aumentó linealmente hasta 9 h, y luego la descomposición de RET progresó a una velocidad más baja hasta llegar a 33,0±1,0 %. Para estos controles se debe considerar el mismo contenido de OD (4,1±0,0 mg OD/L). Por lo tanto, la descomposición de RET está controlada en primer lugar por el OD, y en segundo lugar por la luz como catalizador de la degradación. Este hallazgo está de acuerdo con un reporte anterior, destacando que el O₂ promueve la fotodegradación de RET [65].

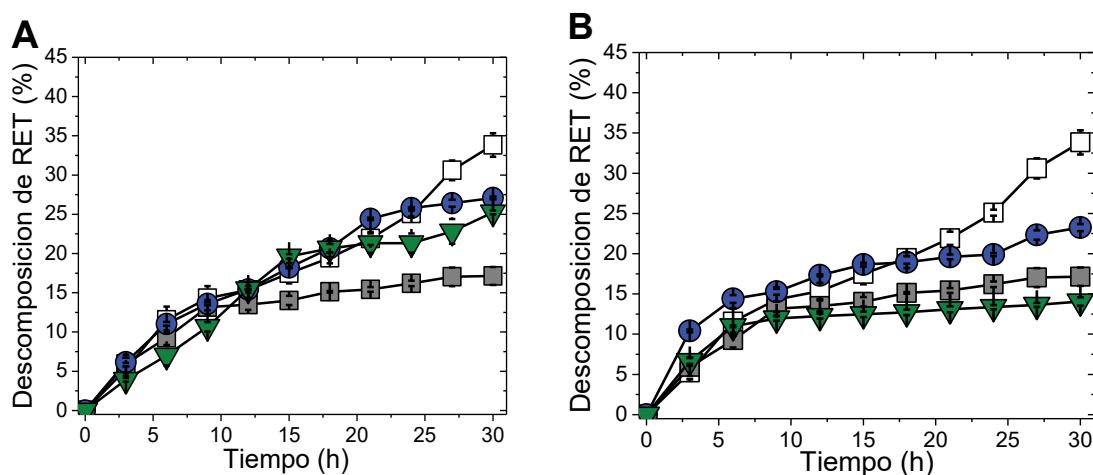


Figura 27. Descomposición fotoquímica de RET (%) en función del tiempo (h): (A) OVA-RET (●) y OVA-RET-PAM (▼) a pH 4; (B) OVA_{n2}-RET (●) y OVA_{n2}-RET-PAM (▼) a pH 6,0. Controles: (■) RET puro en oscuridad (RET_{oscuridad}), (□) RET puro en luz (RET_{luz}). Condiciones: Concentración de proteína: 6,7 μM (0,028% p/p), concentración de RET: 670 μM, concentración de PAM: 0,014% p/p, temperatura: 25°C. Los experimentos se realizaron usando una lámpara fluorescente (BAW, 65 W, 750 lm, 6400 K), con la excepción del control RET_{oscuridad}. Los valores se muestran como media ± desviación estándar.

Como se mencionó en el Capítulo 1 y puede observarse a partir de la Fig. 27a, la degradación de RET para los nanocomplejos OVA-RET a pH 4,0 fue bastante similar a RET_{luz} hasta aproximadamente 24 h, a partir de la cual tiene lugar una descomposición menos pronunciada hasta llegar a $27,1 \pm 0,2$ %. Para este sistema, se registró $3,9 \pm 0,1$ mg OD/L. Este contenido de OD fue similar al obtenido para $RET_{oscuridad}$ ($p > 0,05$), lo que sugeriría que el ligero efecto protector se debe principalmente a la complejación OVA-RET.

Para la nanopartícula OVA-RET-PAM a pH 4,0 se observó que la degradación de RET fue menor que la observada para $RET_{oscuridad}$ hasta 9 h de análisis, a partir de la cual progresó de la misma manera que RET_{luz} hasta las 16 h. Luego, al final de la prueba, se observó una ligera disminución ($p < 0,05$) en la degradación de RET ($25,0 \pm 0,2$ %), en comparación con el nanocomplejo OVA-RET ($27,1 \pm 0,2$ %). La determinación de OD para el sistema OVA-RET-PAM arrojó valores de $4,6 \pm 0,5$ mg OD/L, siendo esto significativamente más alto que para los controles. A pesar de esto, la deposición de PAM sobre la superficie de los nanocomplejos OVA-RET parecería mejorar ligeramente la protección de RET contra el OD y la luz.

Por otro lado, como puede deducirse de la Fig. 27b, los nanocomplejos de inclusión OVA_{n2} -RET a pH 6,0 produjeron un aumento en la degradación de RET a tiempos cortos, lo que sugeriría que algunas moléculas de RET expuestas sobre la superficie de OVA_{n2} podrían deteriorarse en primer lugar. Luego, la degradación de RET fue similar al control RET_{luz} hasta las 18 h, a partir del cual se registró una reducción significativa en la descomposición de RET ($23,2 \pm 0,4$ %). El valor de OD para este sistema fue de $4,3 \pm 0,1$ mg OD/L, siendo este similar al obtenido para $RET_{oscuridad}$ ($p > 0,05$), sugiriendo que la estabilidad de RET podría atribuirse principalmente a la complejación con OVA_{n2} . Finalmente, para la NPB OVA_{n2} -RET-PAM se registró que el perfil de degradación de RET hasta 9 h fue similar al control $RET_{oscuridad}$, a partir del cual se registró una reducción significativa en la degradación de RET hasta las 30 h de examinación ($14,1 \pm 0,5$ %). Para este sistema, se obtuvo un valor de $4,7 \pm 0,3$ mg OD/L, siendo este valor más alto que el obtenido para el control. Por lo tanto, este hallazgo soporta fuertemente la hipótesis de que la deposición electrostática de PAM sobre la superficie del nanocomplejo de inclusión OVA_{n2} -RET mejoró significativamente la estabilidad fotoquímica de RET frente al OD y la luz. Además, a pH 6,0 el sistema OVA_{n2} -RET-PAM fue más efectivo que el sistema OVA-RET-PAM ($28,4 \pm 1,2$ %) para la preservación fotoquímica de RET (como puede deducirse de la Tabla 4). Este resultado podría interpretarse considerando el modo particular de OVA_{n2} para unir RET e interactuar con PAM para la obtención de NPB. Además, estas propiedades de OVA_{n2} estarían directamente relacionadas con su

estado desnaturalizado/agregado. Es claramente evidente que el nanocomplejo de inclusión OVA_{n2}-RET-PAM fue el sistema más efectivo para preservar la estabilidad fotoquímica de RET, lo que lo convertiría en un sistema prometedor para la vehiculización de RET en solución acuosa a pH 6,0.

Tabla 4. Concentración inicial de oxígeno disuelto (OD mg/L) y descomposición fotoquímica de RET (%) a las 30 h para buffer fosfato pH 7,0 50 mM, OVA y OVA-PAM pH 4,0; OVA-PAM, OVA_{n2} y OVA_{n2}-PAM a pH 6,0. Condiciones: concentración de proteína: 6,7 μM (0,028% p/p), concentración de RET: 670 μM, concentración de PAM: 0,014% p/p, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media ± desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Sistemas	Descomposición RET a 30 h (%)	OD (mg OD/L)
RET _{oscuridad}	17,2±1,2 ^b	4,1±0,0 ^a
RET _{luz}	33,8±1,5 ^f	4,1±0,0 ^a
OVA-pH 4	27,1±0,2 ^e	3,9±0,1 ^a
OVA-PAM-pH 4	25,0±0,2 ^d	4,6±0,5 ^b
OVA-PAM-pH 6	28,4±1,2 ^e	5,1±0,1 ^c
OVA _{n2} -pH 6	23,2±0,4 ^c	4,3±0,1 ^{a,b}
OVA _{n2} -PAM-pH 6	14,1±0,5 ^a	4,7±0,3 ^{b,c}

Al analizar el contenido de OD en las muestras, se observó que los sistemas mixtos con PAM tienen un mayor contenido de OD que los sistemas proteicos y los controles de RET (Tabla 4), lo que podría explicarse teniendo en cuenta la mayor incorporación de O₂ durante la preparación de los sistemas. Como se puede observar en la Tabla 4 y en la Fig. 28, no hubo una relación clara entre la degradación fotoquímica de RET y la concentración de OD, remarcando que el efecto protector obtenido sobre el RET podría atribuirse principalmente a su vehiculización en las NPB.

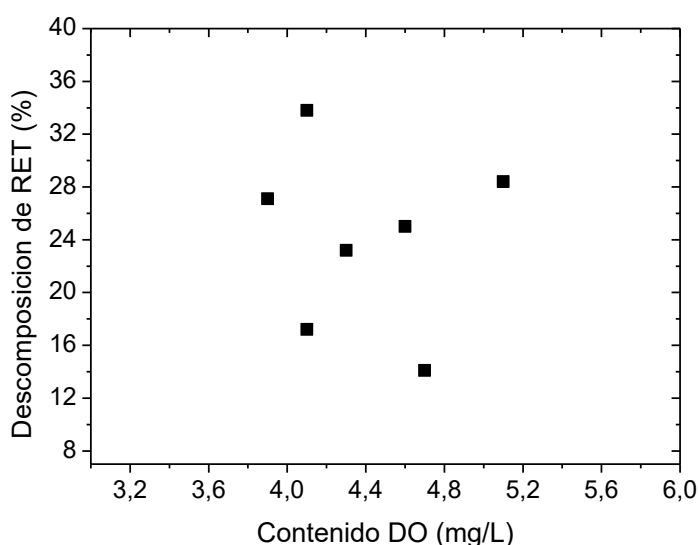


Figura 28. Descomposición fotoquímica de RET a las 30 h (%) en función del contenido inicial de OD (mg/L).

4.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En este capítulo se abordó la hipótesis de que la deposición electrostática de un PS sobre la superficie del nanocomplejo de inclusión proteína-RET podría mejorar su vehiculización y estabilidad fotoquímica en medio acuoso. El supuesto fue confirmado, destacando una serie de consideraciones relevantes desde el punto de vista práctico. Las NPB coloidalmente estables para el *delivery* de RET se pueden producir a medida controlando el pH del medio acuoso y el estado de agregación de la proteína. Así, OVA_{n2} promovió la obtención de NPB coloidalmente estables con PAM a pH 6,0, con mejores propiedades para vehiculizar y preservar fotoquímicamente el RET en comparación con la OVA nativa.

Sin embargo, las NPB basadas en OVA nativa podrían encontrar aplicaciones adecuadas a pH 4,0. La información derivada de este capítulo podría ser útil para el desarrollo de formulaciones de alimentos o cosméticos fortificados con RET y estrategias para la vehiculización y protección de otros compuestos hidrofóbicos sensibles a la luz y el O₂.

5. CAPÍTULO 3

Estudio y caracterización de nanopartículas de ovoalbúmina como sistemas de *delivery* de ácidos grasos poliinsaturados

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. Ácidos grasos poliinsaturados

Los AG son cadenas de hidrocarburos que presentan un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro. Las propiedades biológicas de los AG se determinan por la longitud de la cadena de carbono y por el número y la posición de cualquier doble enlace presente. Mientras que los AG saturados no contienen dobles enlaces dentro de la cadena carbonada, los AG insaturados contienen al menos un doble enlace. Cuando se presentan dos o más dobles enlaces, los AG insaturados se denominan AG poliinsaturados (PUFA) [121].

Las moléculas de PUFA son moléculas anfifílicas, fundamentalmente de naturaleza lipídica, formadas por una larga cadena de hidrocarburos lineales (cola hidrofóbica) en cuyo extremo hay un grupo carboxilo (cabeza hidrofílica) [122]. Las colas hidrofóbicas les confieren una alta hidrofobicidad y, por lo tanto, una muy baja solubilidad en agua [38]. En solución acuosa, cuando la concentración de PUFA excede un valor crítico, conocido como concentración micelar crítica (CMC), toma lugar el autoensamblaje de las moléculas de AG, formando estructuras supramoleculares, tales como micelas, bicapas y vesículas que confieren turbidez a la solución. Dichas especies están en equilibrio con la especie no ensamblada o en solución (monómero) [9]. Es importante remarcar que el autoensamblaje se debe a que las moléculas de AG se asocian a través de la aproximación de sus colas mediante interacciones hidrofóbicas, mientras que las cabezas polares permanecen en la superficie en contacto con las moléculas de agua.

Tomando el extremo metilo terminal (-CH₃) de la molécula como C1, si la primera insaturación se encuentra entre el C3 y el C4, el PUFA se denomina 'omega-3' o 'n-3', mientras que si la primera insaturación se encuentra entre el C6 y el C7 el PUFA se designa 'omega-6' o 'n-6'. El cuerpo humano puede producir todos menos dos de los AG que requiere: el ácido linoleico (LA, C18:2 n-6; precursor de la serie n-6 de AG) y el ácido α -linolénico (ALA, C18:3 n-3; precursor de la serie n-3 de AG) [121]. Se los denomina AG esenciales dado que el ser humano no puede sintetizarlos ya que no posee enzimas capaces de crear dobles enlaces en las cadenas de AG en un lugar más alejado que el carbono C9 [123]. A partir de ALA, se pueden producir por diferentes vías de desaturación, elongación y β -oxidación los diferentes miembros de la familia n-3 como el DHA (22:6) con 6 insaturaciones y el eicosapentaenoico (EPA, 20:5) con 5 insaturaciones. A partir del LA se obtienen por diferentes vías enzimáticas los miembros de la familia n-6 como el ácido araquidónico (AA, 20:4) con 4 insaturaciones [123].

5.1.2. Deterioro de los ácidos grasos poliinsaturados

En la naturaleza, los PUFA normalmente no se encuentran como AG libres, sino esterificados con glicerol formando triacilglicéridos (TAG). Los TAG sufren transformaciones químicas, conocidas comúnmente como rancidez, que además de reducir su valor nutritivo, producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables [124]. Entre estas transformaciones se encuentra principalmente la lipólisis y la autooxidación, existiendo un tercer mecanismo menos importante que es la inversión [125]. Cabe mencionar que los PUFA experimentaran autooxidación y son más sensibles a ella en estado libre que como TAG [126].

Lipólisis: Esta reacción es catalizada por lipasas que hidrolizan el enlace éster de los TAG y de esta manera se liberan AG. Un ejemplo es la liberación de PUFA a partir de aceites ricos en TAG que sucede en el TGI bajo la acción de la lipasa intestinal [127].

Autooxidación: Es el deterioro más común de las grasas y aceites y se refiere a la oxidación de los AG insaturados, pero también se presenta con otros CB de interés biológico, como RET y carotenoides. La oxidación ocurre cuando un átomo cede un electrón a otro átomo distinto mediante un proceso de reducción. Existen agentes promotores de la oxidación como por ejemplo temperaturas altas, presencia de metales, presencia de peróxidos de grasas oxidadas, presencia de O₂, luz UV/azul, poliinsaturaciones [124].

La autooxidación de lípidos es una reacción con O₂ molecular por medio de un mecanismo autocatalítico y constituye la principal reacción involucrada en el deterioro oxidativo de lípidos. Se denomina autooxidación 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 PM que le confieren el olor característico a las grasas oxidadas. A medida que aumenta el número de insaturaciones la oxidación se produce más rápido [126].

Se conoce que el mecanismo de la autooxidación opera a través de la producción de radicales libres y que posee un gran número de rutas de reacción, aunque en términos prácticos se considera que se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Fig. 29). 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 AG (RH en la Fig. 29) con O₂ es termodinámicamente difícil de producirse ya que el O₂ en su estado normal es muy poco electrofílico y por sí solo no actúa sobre los dobles enlaces C=C. La producción de los primeros radicales (iniciación) necesarios para iniciar la reacción de

propagación debe ser catalizada. Se ha propuesto que el inicio de la oxidación puede tener lugar por descomposición de hidroperóxidos, por catálisis con metales o por exposición a la luz [124], [126].

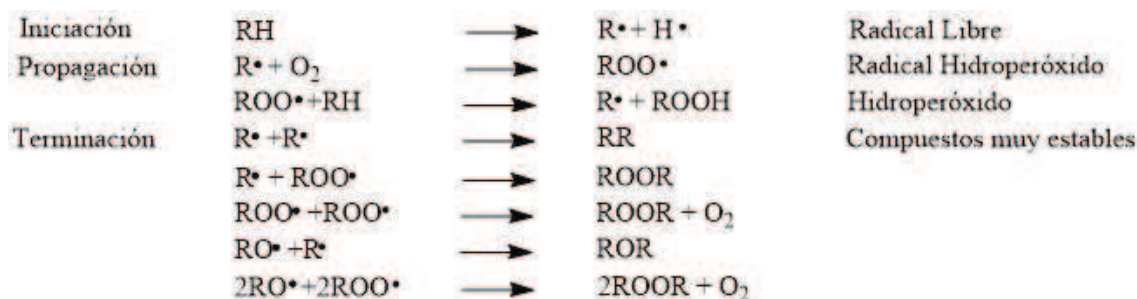


Figura 29. Mecanismo de autooxidación de lípidos y PUFA. RH: ácido graso insaturado (Figura modificada de Dergal, 2006 [124]).

Después de la iniciación, la oxidación se propaga por extracción de átomos de hidrógeno en las posiciones de los dobles enlaces de los AG, produciendo especies de radicales libres ($\text{R}\cdot$). En la propagación, la adición de O_2 se produce en estas ubicaciones, lo que da como resultado la producción de radicales hidroperóxidos, y estos a su vez extraen hidrógeno de grupos metilo de otras moléculas de AG insaturados (RH) para producir hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales libres. Los nuevos radicales libres reaccionan con el O_2 y se repite la secuencia de reacciones que se acaba de describir. Los hidroperóxidos son reactivos, producen nuevos radicales que promueven la reacción, interaccionan con otras moléculas, se polimerizan e incrementan la viscosidad, se oxidan, sintetizan epóxidos, su ruptura genera aldehídos, cetonas, ácidos y otros compuestos de bajo PM que confieren olores, se deshidratan y sintetizan cetoglicéridos, se ciclan, etc. Los productos finales de la autooxidación incluyen polímeros de alto PM, aldehídos, cetonas, ácidos, cetoglicéridos y epóxidos [124].

Reversión: Este tipo de deterioro se presenta con menor frecuencia y en ciertos aceites refinados ricos en ALA, como el de soja, que producen olores indeseables en el almacenamiento mediante un mecanismo que no se conoce totalmente. La reacción ocurre en aceites con índice de peróxido muy bajo, y puede ser el inicio de la autooxidación. En aceites revertidos se han identificado aldehídos y cetonas, que se perciben antes de que aparezcan olores característicos de la oxidación. A pesar de que se desconocen los detalles de la reacción, las temperaturas altas, las radiaciones electromagnéticas y algunos metales, la favorecen; se requiere de pequeñas cantidades de O_2 ya que los aceites envasados con un gas inerte o al vacío no la desarrollan [124].

5.1.3. Características del ácido linoleico y del ácido linoleico conjugado

El LA (C18:2 *cis9, cis12*) es un AG esencial n-6 que contiene 18 átomos de carbono y dos enlaces dobles en configuración *cis* (Fig. 30). Esta configuración estructural da como resultado dos enlaces simples que separan los dobles enlaces [128]. El ácido linoleico conjugado (CLA) es el isómero posicional y geométrico del LA, que contiene un sistema de doble enlace conjugado, con los enlaces separados por un enlace C-C simple en lugar de un grupo metileno normal. Cada uno de los dos dobles enlaces puede estar en configuración *cis* o *trans*, y en diferentes posiciones a lo largo de la cadena de 18 carbonos, desde el carbono 6 al carbono 15 (Fig. 30) [129].

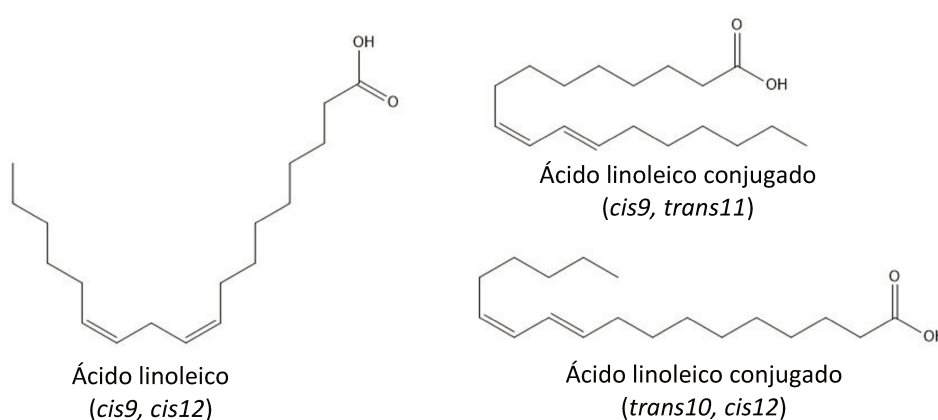


Figura 30. Estructura del LA y dos de sus isómeros CLA: *cis9, trans11* y *trans10, cis12* (Figura modificada de Viladomiu y col., 2016 [130]).

Tanto el LA como el CLA son AG esenciales ya que el cuerpo no puede sintetizarlos y, por lo tanto, deben incorporarse a partir de la dieta [131]. Las principales fuentes dietéticas de LA incluyen los aceites vegetales como los aceites de girasol y maíz, pero también están presentes en cereales, grasa animal y pan integral [121]. Los diferentes isómeros del CLA se producen como intermediarios de la biohidrogenación de PUFA, específicamente del LA y del ALA por las bacterias del rumen, por lo que están naturalmente presentes en alimentos derivados de rumiantes como carne y leche [128] [132]. Las concentraciones de CLA en productos lácteos generalmente varían de 2,5 a 15,0 mg de CLA/g de lípidos, de los cuales el isómero *cis9, trans11* representa entre el 75 y el 95% del CLA total [133], [134]. En contraste con la leche y los alimentos derivados de la carne, el CLA preparado sintéticamente contiene una mezcla con proporciones similares de los isómeros *cis* y *trans 9,11* y *10,12* [132].

La ingesta dietética óptima de CLA aún no se ha establecido. En la actualidad existen grandes variaciones en las ingestas diarias sugeridas. Se planteó la hipótesis

de que 95 mg de CLA/día es suficiente para mostrar efectos positivos en la reducción de cáncer de mama en mujeres; sin embargo, los cálculos se basaron en datos epidemiológicos que vinculan el aumento del consumo de leche con la reducción del cáncer de mama. Por otro lado, se han extrapolado estudios en ratas sugiriendo una ingesta de 3,5 g de CLA/día para promover efectos beneficiosos sobre la salud humana. Sin embargo, todos estos valores representan estimaciones aproximadas y se basan principalmente en extrapolaciones de datos obtenidos *in vivo* a partir de animales de experimentación [135]. Si bien, no hay una ingesta diaria recomendada por organismos oficiales, se ha estimado en la bibliografía científica que se requeriría una ingesta de 3,0 g de CLA/día para observar beneficios en la salud humana análogos a los observados para los ensayos en animales [136], [137].

5.1.4. Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados y del ácido linoleico conjugado

Los PUFA juegan un papel importante en la composición de todas las membranas celulares donde mantienen la homeostasis para el correcto funcionamiento de las proteínas de membrana e influyen en su fluidez, regulando así los procesos de señalización celular, las funciones celulares y la expresión génica [121]. Los PUFA n-3 y n-6 desempeñan funciones definidas en el organismo y aún se están descubriendo nuevas funciones. Los eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) son productos del metabolismo del AA y EPA. El AA mediante las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) se convierte en: prostaglandina E₂, que es un mediador inflamatorio; prostaciclina I₂, responsable de la dilatación de los vasos sanguíneos; tromboxano A₂ que activa la agregación plaquetaria y el vasoespasmo; y leucotrienos de la serie 4, que juegan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inflamatoria. El EPA se metaboliza de manera similar con la participación de las mismas enzimas; sin embargo, sus productos metabólicos son diferentes: prostanoides de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5 de diferentes propiedades, en su mayoría antiinflamatorias, antiagregantes y vasodilatadoras [123]. Dado que ambas vías de metabolismo usan las mismas enzimas se ha discutido mucho la relación n6/n3 adecuada para una buena salud cardiovascular, respuesta inflamatoria, etc. [138], [139].

A diferencia de lo anterior, como se mencionó, el CLA no puede ser sintetizado a partir de ningún precursor y debe ser ingerido a partir de la dieta debido a que posee

numerosos efectos benéficos para la salud como propiedades anticancerígenas, antiobesidad (control de peso), antidiabéticas, antiinflamatorias y antihipertensivas.

En cuanto al efecto antiobesidad, la evidencia en estudios *in vivo* e *in vitro* sugiere que podría ser atribuido a la reducción del almacenamiento de lípidos y a la mayor utilización de grasa en el músculo a través de la β -oxidación de AG [140]. Además, se informó que suprime la síntesis de AG en hígado. Varios ensayos clínicos informaron correlaciones positivas entre la administración de suplementos con CLA y una mejora en el índice de masa corporal, peso corporal, masa de grasa corporal, adiposidad abdominal y masa corporal magra [140]. Existen varios mecanismos propuestos para explicar este cambio en la composición corporal, entre ellos la reducción de la proliferación y diferenciación de preadipocitos, disminución de la esterificación de AG en TAG, aumento del gasto energético, aumento de la lipólisis, alteración de las enzimas carnitina palmitoiltransferasa y lipoproteína lipasa y la concentración de leptina, entre otros [141]. La propiedad antiobesidad del CLA se ha atribuido principalmente al isómero *trans10, cis12*. En un estudio clínico, se informó que la suplementación dietaria con CLA redujo la grasa corporal, en particular la grasa abdominal, cambió los lípidos totales en suero y disminuyó la absorción de glucosa [142]. Esta fue una de las primeras funciones elucidadas del CLA y que ha recibido gran atención, haciendo que al presente existan numerosos suplementos dietarios que lo contengan.

En cuanto al efecto antihipertensivo, el CLA podría modular la producción de adipocitoquinas fisiológicamente activas, como la adiponectina, leptina y angiotensinógeno. La propiedad antihipertensiva de CLA también se informó en un estudio clínico. En sujetos hipertensos se observó que las presiones sanguíneas sistólica y diastólica disminuyeron significativamente al tomar 4,5 g de CLA (conteniendo igual cantidad de los isómeros *cis9, trans11* y *trans10, cis12*) durante 8 semanas. Los resultados sugirieron que el efecto dependiente de CLA se atribuiría a los niveles en sangre de adipocitoquinas [143].

Se ha informado que el CLA exhibe propiedades antiinflamatorias tanto *in vivo* como en cultivos celulares mediante la inhibición de la enzima COX-2, lo que conduce a una disminución en la liberación de prostaglandina E2 y en la producción de citoquinas proinflamatorias posteriores. Además, el CLA mejora la producción de inmunoglobulinas (Ig) protectoras, IgA, IgG e IgM, al tiempo que reduce la producción de IgE. Un estudio en humanos en el que se ha realizado una suplementación con una mezcla de CLA condujo a una reducción significativa de las citoquinas proinflamatorias interleuquina-1 β y factor de necrosis tumoral- α y de IgE, en comparación con el grupo placebo [144]. Sin embargo, existen informes limitados respecto a las respuestas

inmunes mejoradas en humanos, que incluyen suprimir las respuestas alérgicas, mejorar la producción de anticuerpos después de la vacunación, reducir los síntomas de la dermatitis atópica y de la infección por rinovirus [140].

Se ha encontrado que la suplementación dietaria con CLA, tanto con mezclas como con isómeros individuales, reduce las lesiones ateroscleróticas, las lipoproteínas plasmáticas y el estado inflamatorio local en conejos, ratones y hámsters. En estudios en humanos, se ha demostrado que el CLA en la dieta mejora los perfiles de lípidos en plasma en sujetos obesos, diabéticos y normolipidémicos, con reducciones en TAG, lipoproteína de baja densidad, colesterol, colesterol total y lipoproteína de muy baja densidad [144].

Se ha demostrado que el CLA mejora la formación ósea y previene la resorción ósea tanto en la ovariectomía como en la pérdida ósea asociada a la edad en modelos de experimentación de animales. Actualmente, existen estudios en humanos sobre CLA y salud ósea con mujeres posmenopáusicas, donde se informó el efecto beneficioso de CLA en la dieta sobre la densidad mineral ósea [140]. El efecto de CLA en cáncer será descrito en el Capítulo 5 de la presente tesis.

5.1.5. Antecedentes de encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados

Como se mencionó previamente, los PUFAs en general tienen una solubilidad en agua muy baja y son susceptibles al deterioro oxidativo, lo que disminuye su valor nutricional [145], [146]. El CLA, en particular, exhibe una estabilidad química muy pobre, presentando autooxidación e isomerización [147], además de su baja solubilidad en agua. Para superar estos problemas, se han desarrollado diferentes sistemas de encapsulación de PUFAs y aceites ricos en ellos: partículas proteicas [145], microemulsiones [148], liposomas [149], [150], hidrogeles [151] y sistemas basados en polímeros [152], entre otros.

Como se mencionó en Capítulos anteriores muchas proteínas globulares tienen la capacidad intrínseca de unirse a compuestos hidrofóbicos y esta ventaja podría usarse como una estrategia para proteger a los PUFAs e introducirlos en matrices alimenticias. En este sentido, se han investigado diferentes proteínas como portadoras de LA o CLA: BLG [26], [31], proteínas vegetales [145], proteínas del suero lácteo concentradas (WPC) [146], etc. En este sentido, Jiang y Liu (2003) [31] estudiaron la unión entre el CLA y la BLG mediante fluorescencia intrínseca y hallaron que esta proteína era capaz de unir 2,5 moléculas de CLA con una K_a de $3,7 \times 10^6 M^{-1}$, formando un complejo de inclusión cuyo d_H fue $170,7 \pm 0,8$ nm. Un estudio de absorción intestinal de CLA solo o formado nanocomplejos con BLG a través de una monocapa de células

Caco-2 reveló que la absorción fue prácticamente el doble al estar formando el nanocomplejo de inclusión [31]. Los autores hallaron dos explicaciones: por un lado, la BLG tiene la capacidad de cruzar la membrana de la monocapa de células Caco-2 y por el otro lado, la BLG tiene receptores de membrana específicos para el transporte transcelular [31]. En otro trabajo se utilizó harina de soja desgrasada sometida a calentamiento a 70°C por 2 h y posterior centrifugación. El sobrenadante se ajustó a pH 5,0 y se calentó durante 15 min a 55°C, luego se centrifugó y el precipitado se consideró la fracción de proteína lipofílica (LP). Se preparó una solución de LP en buffer fosfato pH 7,0 50 mM y posteriormente se unió con CLA mediante mezcla y aplicación de ultrasonido; finalmente se agregó una solución de caseinato de sodio para mejorar la estabilidad de las partículas LP-CLA. Este sistema mostró tamaños en el rango de 150-170 nm con EE superiores al 85%. Además, al estudiar la concentración de O₂ y el valor de hidroperóxidos de este sistema al someterse por 84 h a 50°C, se observó una mejor estabilidad oxidativa de CLA en estos sistemas frente a CLA puro en etanol [145]. En otro estudio, se realizaron microcápsulas mediante secado *spray* utilizando WPC solo o un sistema WPC-maltodextrina (WPC-MDX) o GA [146]. Los autores hallaron que la mayor EE y retención de CLA luego del secado *spray* fue para el sistema WPC. Al estudiar la estabilidad oxidativa de CLA en los tres sistemas luego del almacenamiento a 35°C por 4 meses y en diferentes actividades de agua, los autores llegaron a la conclusión de que el sistema WPC puro es mejor que los otros dos para la estabilidad oxidativa de CLA, atribuyendo esto a una mayor permeabilidad al O₂ en los sistemas WPC-MDX y GA debido a la presencia de poros y rupturas en las microcápsulas [146].

Como se mencionó previamente, OVA es una proteína globular de alta disponibilidad con capacidad de unir compuestos hidrofóbicos como el LA [20], [21]; sin embargo, la capacidad de OVA para unirse a CLA no es conocida aún. Por ello, el objetivo del presente capítulo fue la producción y caracterización de dos nanopartículas preparadas por tratamiento térmico de OVA en condiciones de pH y concentración diferentes (pH 7,50 y concentración 1%, y pH 11,4 y concentración 3%) para obtener así dos nanopartículas de diferente tamaño, a fin de poder evaluar como el tamaño influye en la capacidad de unión al ligando y posteriormente (Capítulo 4) en la liberación del CB al someter el sistema a un protocolo consenso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Además, se estudió la influencia de la diferente estructura química de dos PUFA (LA y CLA) en la formación de nanocomplejos de inclusión con las nanopartículas proteicas obtenidas.

5.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

Objetivo 1: Producción y caracterización de dos nanopartículas de OVA en dos condiciones de pH y concentración diferentes.

Objetivo 2: Obtención y caracterización fisicoquímica de nanocomplejos de inclusión entre dos PUFAs (LA y CLA) y las nanopartículas de OVA obtenidas.

Objetivo 3: Evaluar la influencia de la diferencia estructural de ambos PUFAs en la formación de los nanocomplejos de inclusión.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Materiales

La ovoalbúmina (OVA) y el ANS empleados fueron previamente descritos en el Capítulo 1. El ácido linoleico conjugado (CLA, producto O5507, pureza 98% según cromatografía de gases (GC), siendo una mezcla de los isómeros *cis* y *trans* 9,11 y 10,12) y el ácido linoleico (LA, producto L1376, pureza 99% según GC) se obtuvieron de Sigma (EE.UU.). Ambos PUFAs, CLA y LA, se mantuvieron en oscuridad bajo atmósfera de N₂ a -18°C según las recomendaciones del fabricante. Los reactivos analíticos adicionales fueron suministrados por Cicarelli (Argentina).

5.3.2. Producción y caracterización fisicoquímica y morfológica de las nanopartículas de ovoalbúmina

5.3.2.1. Producción de nanopartículas de OVA

En base a los antecedentes descritos en la [Sección 1.9](#) se eligieron dos pH y concentraciones diferentes para la formación de nanopartículas proteicas de manera de obtener dos tamaños distintos a fin de evaluar cómo ello afecta la unión al ligando. En el siguiente Capítulo (Capítulo 4) se evaluará además como el tamaño influye sobre la digestión gastrointestinal *in vitro* de estos nanocomplejos.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, se produjeron dos nanopartículas:

- (i) Se preparó una solución de OVA a una concentración de 30 g/L en NaCl 50 mM y el pH se ajustó a 11,4 utilizando NaOH 1M. Esta solución se hidrató durante la noche a 4°C. Al día siguiente, el pH se reajustó nuevamente a 11,4 de ser necesario utilizando NaOH 0,1M. Finalmente, se dispensaron alícuotas de 2 mL en tubos de vidrio y se calentaron en un baño de agua a 85°C durante 5 min.

Posteriormente, se retiraron los tubos y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Los tubos que contenían la nanopartícula 1 (OVA_{n1}) se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

- (ii) Esta nanopartícula fue la misma a la utilizada en los Capítulos 1 y 2. Brevemente, la solución de OVA se preparó a 10 g/L en NaCl 50 mM, se hidrató durante la noche a 4°C, el pH se ajustó a 7,5 y luego se dispensaron alícuotas de 2 mL en tubos de vidrio y se calentaron en un baño de agua a 85°C durante 5 min y se enfriaron inmediatamente en baño de hielo [20]. Los tubos que contenían la nanopartícula 2 (OVA_{n2}) se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis.

Adicionalmente, la proteína nativa fue utilizada como control. Para lo cual, se preparó una solución de OVA de 10 g/L en NaCl 50 mM. Esta solución se hidrató durante toda la noche a 4°C. El sistema se filtró con membrana de celulosa con tamaño de poro de 0,22 µm y se almacenó a 4°C hasta su posterior análisis.

En todos los casos, la concentración de proteína se verificó por espectroscopía de ABS a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 0,712 L.g⁻¹.cm⁻¹ [35].

5.3.2.2. Características fisicoquímicas y morfológicas de nanopartículas de OVA

5.3.2.2.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas y SDS-PAGE.

Para OVA_{n1} y OVA_{n2} se realizó un análisis de PM mediante cromatografía de filtración por gel utilizando una columna Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare). La columna se conectó a un dispositivo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (Akta Basic, GE Healthcare) y se equilibró con buffer fosfato pH 7,0 50 mM conteniendo NaCl 150 mM. El equipo se calibró con marcadores de PM (Kit de calibración de filtración de gel-GE Healthcare) y se obtuvo una curva de calibrado para el cálculo del PM de la muestra.

Además, las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% adicionado con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), lo que permitió una separación de proteínas en el rango de PM de 12-100 kDa. Cada muestra se mezcló con buffer de muestra que consistió en Tris-HCl pH 6,8 50 mM, glicerol y azul de bromofenol. Las muestras se prepararon en condiciones no reductoras (en ausencia de β-mercaptoetanol) y reductoras (en presencia de β-mercaptoetanol). La proteína se visualizó mediante tinción con plata.

5.3.2.2.2. Distribución de tamaño y potencial ζ

Las mediciones de tamaño y potencial ζ se realizaron de igual manera que las descritas en el Capítulo 1.

5.3.2.2.3. Microscopía de fuerza atómica

Los componentes básicos de un AFM son un láser diodo, un fotodetector que funciona como un escáner, un *cantilever* y una plataforma de muestra capaz de moverse en las direcciones x-y-z (Fig. 31). En AFM, una sonda que consiste en una punta afilada (*tip*) está montada en un brazo flexible (*cantilever*). Típicamente, la muestra se monta sobre un cristal piezoeléctrico. El *cantilever* explora la muestra al sentir la fuerza entre la superficie y la punta. Cuando la punta se acerca a la superficie, las fuerzas atractivas de van der Waals entre la punta del *cantilever* y la muestra desvían el *cantilever* hacia la superficie de la muestra. Cuando la punta se pone en contacto con la superficie de la muestra, se desarrolla una fuerza repulsiva, que desvía el *cantilever* en la dirección opuesta. Estas desviaciones, hacia o lejos de la superficie de la muestra, son detectadas por un rayo láser. El rayo láser golpea la parte superior del *cantilever* y se refleja en un fotodetector sensible a la posición. La desviación en el *cantilever* es registrada por el fotodetector. Durante el escaneo, la punta de AFM se mueve continuamente hacia adelante y hacia atrás a lo largo de la superficie y el detector registra las desviaciones resultantes. La adquisición de la topografía de la superficie de la muestra se realiza mediante el registro de las pequeñas desviaciones del *cantilever*. El cambio de fase de la oscilación en el *cantilever* también se registra como imagen de contraste de fase [153], [154].

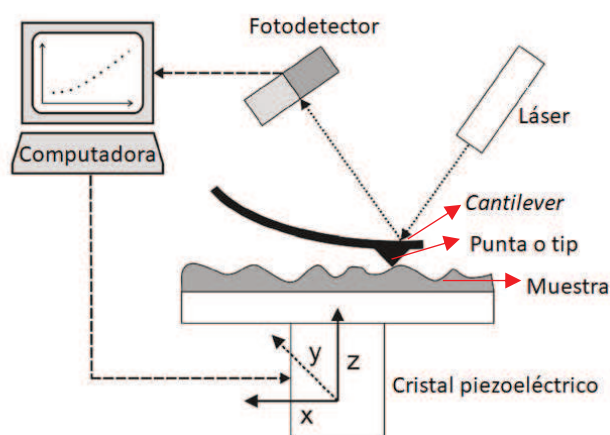


Figura 31. Principales componentes de AFM (Figura modificada de Brandl y col., 2007 [155]).

El AFM generalmente está equipado para trabajar en tres modos diferentes denominados modo de contacto, sin contacto y *tapping*. Estos modos utilizan diferentes fuerzas de contacto en el *cantilever* dependiendo de la interacción entre la punta y la muestra. En el modo de contacto, la sonda experimenta fuerzas repulsivas. Sin embargo, en el modo sin contacto, la punta se aleja más de la superficie y se desarrollan fuerzas atractivas. En el modo de *tapping* (golpeteo) la punta se pone en contacto con la muestra durante un período de tiempo muy corto. El *cantilever* vibra ligeramente por debajo de su frecuencia de resonancia en rangos de amplitud de 20 a 100 nm. La punta solo toca la superficie de la muestra durante el escaneo y entra en contacto con la superficie en la parte inferior de su oscilación. El contacto del *cantilever* es por un período de tiempo muy corto en el cual la fuerza lateral de contacto disminuye. Este modo proporciona los mejores resultados para materiales blandos o películas dado que la punta toca la superficie de la muestra durante un período de tiempo muy corto [153], [154].

La AFM permitió estudiar las características morfológicas de OVA_{n1} y OVA_{n2}. Para ello, alícuotas de la muestra se adsorbieron a una superficie de mica (1cm², pegada a discos de acero) por medio de secado en cámara de vacío a temperatura ambiente. Las imágenes de AFM se realizaron en modo *tapping* con un microscopio Agilent 5400 (EE.UU.). Se utilizaron *cantilevers* de AFM recubiertos de aluminio (modelo OPUS: 160AC-NA) con las siguientes especificaciones: longitud: 160 μm; radio del tip: <7 nm; ancho medio: 40±2 μm; espesor: 4±0,5 μm; altura del tip: 14 μm; fuerza de resorte: 26 N.m⁻¹. Se empleó una frecuencia de oscilación de 280 kHz. Las muestras fueron escaneadas a 1 línea/s. Para el procesamiento de imágenes, se utilizó el software Gwyddion 2.44. Las imágenes topográficas y de fase se presentarán para mostrar una mejor definición de las partículas.

5.3.2.2.4. Fluorescencia intrínseca y extrínseca

Con el fin de obtener conocimientos sobre cómo el tratamiento térmico afecta a la proteína nativa, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia intrínseca y extrínseca. OVA y sus dos nanopartículas se dispersaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM a una concentración final de proteína de 1 μM. Los experimentos de fluorescencia intrínseca se realizaron con una λ_{ex} de 295 nm (excitación de Trp [81]) y se registraron los espectros de emisión entre 300 y 425 nm. Los experimentos extrínsecos se realizaron utilizando ANS como sonda fluorescente, agregando 9 μL de solución de ANS 15 mM a soluciones de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} en buffer fosfato pH 7,0 50 mM. Los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca se obtuvieron de 420 a 600 nm

utilizando como λ_{ex} 390 nm. En ambos experimentos, la temperatura se controló utilizando un baño de circulación de agua y fijándola en 25°C. Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Hitachi F-7000 (Japón).

5.3.3. Formación y caracterización de nanocomplejos proteína-ácidos grasos poliinsaturados

5.3.3.1. Formación de nanocomplejos proteína-PUFA

Los nanocomplejos de inclusión proteína-PUFA se produjeron sobre la base de la capacidad intrínseca de OVA y sus nanopartículas derivadas de unir compuestos hidrofóbicos [20], [21]. Los nanocomplejos se formaron mezclando una solución de OVA o de sus nanopartículas derivadas con una solución etanólica de PUFA 0,1 M en buffer fosfato pH 7,0 50 mM y dejándolos reposar en oscuridad durante 2 h. La concentración final de etanol en estos sistemas fue inferior al 1% v/v; por lo tanto, podría suponerse que no se indujeron modificaciones estructurales en las proteínas [77].

5.3.3.2. Caracterización de nanocomplejos proteína-PUFA.

5.3.3.2.1. Distribución de tamaño y potencial ζ

El efecto de la complejación de LA y CLA sobre el tamaño de partícula y las propiedades eléctricas de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} se estudiaron a pH 7,0 empleando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). El análisis se llevó a cabo de la misma manera que se detalló en el Capítulo 1.

5.3.3.2.2. Microscopía de fuerza atómica

Las características morfológicas de los nanocomplejos de inclusión formados entre OVA_{n1} y OVA_{n2} con LA y CLA se estudiaron mediante AFM. La preparación de las muestras y el análisis de las imágenes se realizaron como se describió previamente en este capítulo (Sección 5.3.2.2.3). Durante el secado de las muestras en cámara de vacío, las mismas fueron protegidas de la luz para evitar la degradación de los PUFAs.

5.3.3.2.3. Fluorescencia intrínseca

La formación de nanocomplejos de inclusión de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} con LA o CLA se examinó mediante espectroscopia de fluorescencia intrínseca. La OVA y sus dos nanopartículas se dispersaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM a una concentración final de proteína de 1 μ M. Por otro lado, se preparó una solución stock de LA o CLA a una concentración de 20 mM en etanol. Luego, se titularon 3 mL de solución de proteína con volúmenes crecientes (0-30 μ L) de soluciones stock de PUFA o una dilución de las mismas.

Con el fin de evitar el decaimiento de la fluorescencia debido a la turbidez del sistema, la concentración final de PUFA a utilizar se determinó previamente. Para esto, se determinó la concentración de proteína-PUFA para la cual la turbidez del sistema (medida como ABS a 400 nm [9]) comenzó a aumentar, y se usó dicha concentración para las mediciones de fluorescencia. Esta concentración fue de 20 μ M para OVA, mientras que para OVA_{n1} fue de 30 μ M y para OVA_{n2} fue de 50 μ M.

Los nanocomplejos de inclusión proteína-PUFA se almacenaron en oscuridad durante 2 h para alcanzar el equilibrio. Los experimentos de fluorescencia intrínseca se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi F-7000 (Japón) excitando a una λ_{ex} de 295 nm (excitación del Trp [81]) y registrando los espectros de emisión entre 300 y 425 nm. La temperatura se mantuvo en 25°C utilizando un baño de circulación de agua. Los valores de intensidad de fluorescencia del Trp (IF_{Trp}) en la λ_{em} máxima se expresaron en términos de intensidad de fluorescencia relativa del Trp (IFR_{Trp}), siendo $IFR_{Trp} = IF_{Trp}/IF_{0Trp}$, donde IF_{Trp} es la intensidad de fluorescencia intrínseca del Trp de los nanocomplejos proteína-PUFA e IF_{0Trp} corresponde a la intensidad de fluorescencia intrínseca del Trp de los sistemas proteicos puros [26], [92]. Además, los datos de IF_{Trp} se utilizaron para calcular los parámetros de unión: estequiometría o número de moléculas de PUFA unidas por unidad monomérica de OVA (n) [21] y K_a . Para ello, se aplicó el modelo de Scatchard modificado (Capítulo 1, Sección 3.3.3.1.2, Ecuación 3). Las mediciones de fluorescencia y ABS se realizaron por triplicado.

5.3.3.2.4. Fluorescencia extrínseca

El modo de unión entre los PUFAs y los sistemas proteicos (OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}) se examinó mediante espectroscopia de fluorescencia extrínseca. Los experimentos extrínsecos se realizaron utilizando ANS como sonda fluorescente. La OVA y sus nanopartículas derivadas se dispersaron en buffer fosfato pH 7,0 50 mM a una concentración final de proteína de 1 μ M. Luego, se prepararon soluciones de

nanocomplejos proteína-PUFA como se describió en la Sección anterior. Posteriormente, se agregaron 9 μ L de solución de ANS 15 mM a cada sistema. Los espectros de emisión de fluorescencia extrínseca se obtuvieron de 420 a 600 nm a una λ_{ex} de 390 nm utilizando un espectrofotómetro Hitachi F-7000 (Japón) y ajustando la temperatura de la cubeta a 25°C. Los valores de fluorescencia de emisión extrínseca se expresaron en términos de intensidad de fluorescencia relativa de ANS (IFR_{ANS}), siendo $IFR_{ANS} = IF_{ANS}/IF_{0ANS}$, donde IF_{ANS} es la intensidad de fluorescencia de emisión de ANS de los nanocomplejos proteína-PUFA y IF_{0ANS} corresponde a la intensidad de fluorescencia de emisión de ANS de los sistemas proteicos puros.

5.3.3.3. Ensayos de turbidez

Para la medición de la turbidez, se agregaron volúmenes crecientes (0-35 μ L) de LA o CLA 100 mM en solución etanólica a 2,5 mL de soluciones de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} . La concentración de proteína fue de 0,5 g/L en buffer de fosfato pH 7,0 50 mM [20]. También se prepararon sistemas controles conteniendo LA o CLA puros. Luego, la ABS a 400 nm se midió como un índice de turbidez en un espectrofotómetro Jenway 7305 (Reino Unido) [9]. Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente (25°C).

5.3.4. Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron al menos por triplicado. Los promedios y desviaciones estándar se calcularon a partir de estas mediciones. El tratamiento estadístico de los datos se realizó de igual manera que en los Capítulos anteriores.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Características fisicoquímicas y morfológicas de nanopartículas de ovoalbúmina.

5.4.1.1. Cromatografía líquida rápida de proteínas y SDS-PAGE.

Con el fin de caracterizar las nanopartículas OVA_{n1} y OVA_{n2} en términos de su PM, se realizó un ensayo de FPLC (Fig. 32). En los cromatogramas, se observaron dos picos para OVA_{n1} y dos para OVA_{n2} . Para OVA_{n1} , los PM calculados fueron 1.000 ± 200 kDa y 53 ± 5 kDa, y para OVA_{n2} fueron 1.100 ± 200 kDa y 47 ± 4 kDa. En ambos casos, los PM mayores corresponderían a las nanopartículas y los más

pequeños a la proteína OVA nativa (43 kDa según Croguennec y col. (2007) [35]). Fue posible determinar el grado de agregación de OVA a partir del área bajo los picos normalizados. Este parámetro fue de 89% y 90% para OVA_{n1} y OVA_{n2} , respectivamente, lo que indicó un alto grado de agregación debido al tratamiento térmico aplicado. Weijers y col. (2003) [38] determinaron que parte de la OVA podía desnaturalizarse pero no agregarse. Por lo tanto, se podría sugerir que alrededor del 10% de OVA permaneció sin agregar. A partir de estos datos, es posible calcular el número de unidades OVA que forman cada nanopartícula como la relación entre el PM de la nanopartícula y el PM de OVA nativa. Este cálculo indicó que OVA_{n1} estaría formada por 23 unidades y OVA_{n2} por 26 unidades monoméricas de OVA.

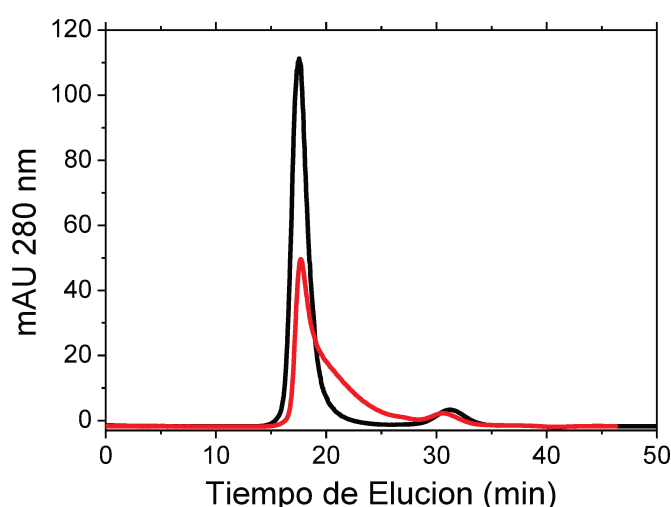


Figura 32. Cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida rápida de proteínas para OVA_{n1} (—) y OVA_{n2} (—).

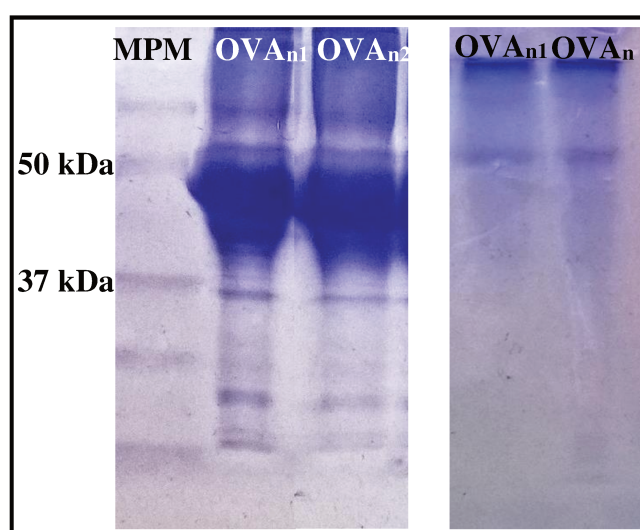


Figura 33. SDS-PAGE para OVA_{n1} y OVA_{n2} . Izquierda: en presencia de β -mercaptoetanol. Derecha: en ausencia de β -mercaptoetanol. MPM: marcador de peso molecular.

Además, para obtener algún conocimiento sobre la naturaleza de las fuerzas de interacción involucradas en la formación de las nanopartículas, se realizó un experimento de SDS-PAGE (Fig. 33). En ausencia de β -mercaptoetanol, se observó para ambas nanopartículas una banda que no ingresó al gel, indicando que las partículas fueron demasiado grandes y que permanecieron retenidas en el gel de apilamiento. En presencia del agente reductor, se observó una banda aproximadamente en 45 kDa. Esto fue consistente con el PM de la proteína nativa. Considerando ambos resultados, fue posible concluir que el tratamiento térmico promovió la formación de SS intermoleculares durante la producción de las nanopartículas de OVA [35], [42].

5.4.1.2. Distribución de tamaño y potencial ζ

El tamaño y las características eléctricas para OVA y ambas nanopartículas se determinaron a pH 7,0 (Tabla 5, Fig. 36). En el caso de OVA, se observaron dos picos en el perfil de PSDi, cuyos d_H fueron 12 ± 2 nm y 62 ± 3 nm; sin embargo, de acuerdo con los resultados hallados en la PSDv, estos representaron 97,5 y 2,5%, respectivamente (Fig. 36a y b). El primer pico correspondería al d_H de OVA y el segundo a trazas de la proteína agregada (discutido previamente en la Sección 3.4.2.2). El potencial ζ fue -15 ± 2 mV para OVA.

Para OVA_{n1}, el potencial ζ y el d_H fueron $24,63\pm 0,04$ nm (100%) y $-15,9\pm 0,1$ mV, respectivamente (Tabla 5, Fig. 36c y d). Mientras que dos picos cuyos d_H fueron $92,0\pm 0,2$ nm (98,2%) y 16 ± 2 nm (1.7%) y un potencial ζ de -15 ± 2 mV se registraron para OVA_{n2} (Tabla 5, Fig. 36e y f). En el caso de las nanopartículas, toda o casi toda la OVA se agregó con tamaños característicos que se pueden deducir de los valores de PSDv. Los resultados de DLS estuvieron de acuerdo con los hallazgos de FPLC para OVA_{n2} donde se encontraron dos poblaciones en la PSDi y la PSDv. Sin embargo, en el caso de OVA_{n1} en FPLC se detectaron dos poblaciones (OVA y OVA_{n1}), y solo una se detectó mediante la medición de DLS (OVA_{n1}). Una explicación podría ser que, en la técnica de DLS, las partículas pequeñas pueden no ser registradas debido a que las partículas más grandes dispersan la luz con mayor intensidad que las más pequeñas [156]. Como se puede observar, no hubo diferencias significativas ($p>0.05$) entre los potenciales ζ de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} a pH 7,0; lo que indica que el tratamiento térmico y la agregación tuvieron poca influencia sobre la carga neta de la proteína.

Tabla 5. Efecto de la complejación con LA y CLA sobre el potencial ζ (mV), el diámetro hidrodinámico (d_H , nm) y el volumen (%) de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} a pH 7,0. Condiciones: Concentración de proteína: 23 μ M, concentración de LA/CLA: 1 mM, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

	Sistema	d_H (nm)	Volumen (%)	potencial ζ (mV)
Proteína	OVA	12 \pm 2 ^a	97,5 \pm 0,4	-15 \pm 2 ^e
		62 \pm 3 ^c	2,5 \pm 0,4	
	OVA _{n1}	24,63 \pm 0,04 ^a	100	-15,9 \pm 0,1 ^e
	OVA _{n2}	92,0 \pm 0,2 ^d	98,2 \pm 0,9	-15 \pm 2 ^e
LA		16 \pm 2 ^a	1,7 \pm 0,9	
	LA	748 \pm 27 ^h	100	-44 \pm 2 ^a
	OVA-LA	51 \pm 1 ^{b,c}	43 \pm 5	-26,6 \pm 0,9 ^b
		270 \pm 6 ^g	50 \pm 5	
	OVA _{n1} -LA	30 \pm 1 ^b	99,9 \pm 0,1	-29 \pm 2 ^b
		284 \pm 10 ^g	0,1 \pm 0,1	
CLA	OVA _{n2} -LA	123 \pm 6 ^e	92 \pm 5	-18,2 \pm 0,6 ^d
		29 \pm 5 ^b	6 \pm 5	
	CLA	289 \pm 3 ^e	99,5 \pm 0,7	-56 \pm 8 ^a
	OVA-CLA	93 \pm 18 ^{b,c}	44 \pm 11	-26 \pm 2 ^b
		288 \pm 8 ^e	55 \pm 11	
	OVA _{n1} -CLA	28,79 \pm 0,05 ^b	99,8 \pm 0,1	-27,9 \pm 0,9 ^b
OVA _{n2} -CLA		224 \pm 24 ^d	0,2 \pm 0,1	
		237 \pm 43 ^{d,e}	83 \pm 5	-19,4 \pm 0,3 ^c
		31 \pm 20 ^b	16 \pm 5	

5.4.1.3. Microscopía de fuerza atómica

Los aspectos morfológicos de las nanopartículas se estudiaron utilizando AFM (Fig. 34a-d). Cabe señalar que las partículas observadas por esta técnica tienen una relación diámetro/altura muy alta como se observa en las imágenes. Esto podría deberse a que durante el paso de secado de la preparación de la muestra, las partículas se aplastaron sobre la superficie de mica [156]. Las imágenes topográficas (Fig. 34a y c) y de fase (Fig. 34b y d) para OVA_{n1} y OVA_{n2} mostraron partículas con una forma redondeada. Para ambas nanopartículas, se observaron dos tipos de poblaciones: una de tamaño mayor con diámetros de aproximadamente 30 nm para OVA_{n1} (Fig. 34a y b) y 90 nm para OVA_{n2} (Fig. 34c y d) y otra con diámetros de alrededor de 10 nm. Esta población de menor tamaño podría corresponder a la proteína OVA nativa. Como se discutió anteriormente, parte de OVA puede desnaturalizarse pero no agregarse [38] y podría corresponder a la población de menor tamaño en las imágenes de AFM. Los resultados de AFM están de acuerdo con la distribución de tamaño para OVA_{n2} donde se encontraron dos poblaciones en la PSDi y en la PSDv. Sin embargo, en el caso de OVA_{n1}, la población de alrededor de

10 nm observada por AFM y FPLC no se detectó con la técnica de medición de DLS. Como se dijo antes, una explicación podría ser que, en la técnica de DLS las partículas más pequeñas pueden no ser registradas [156].

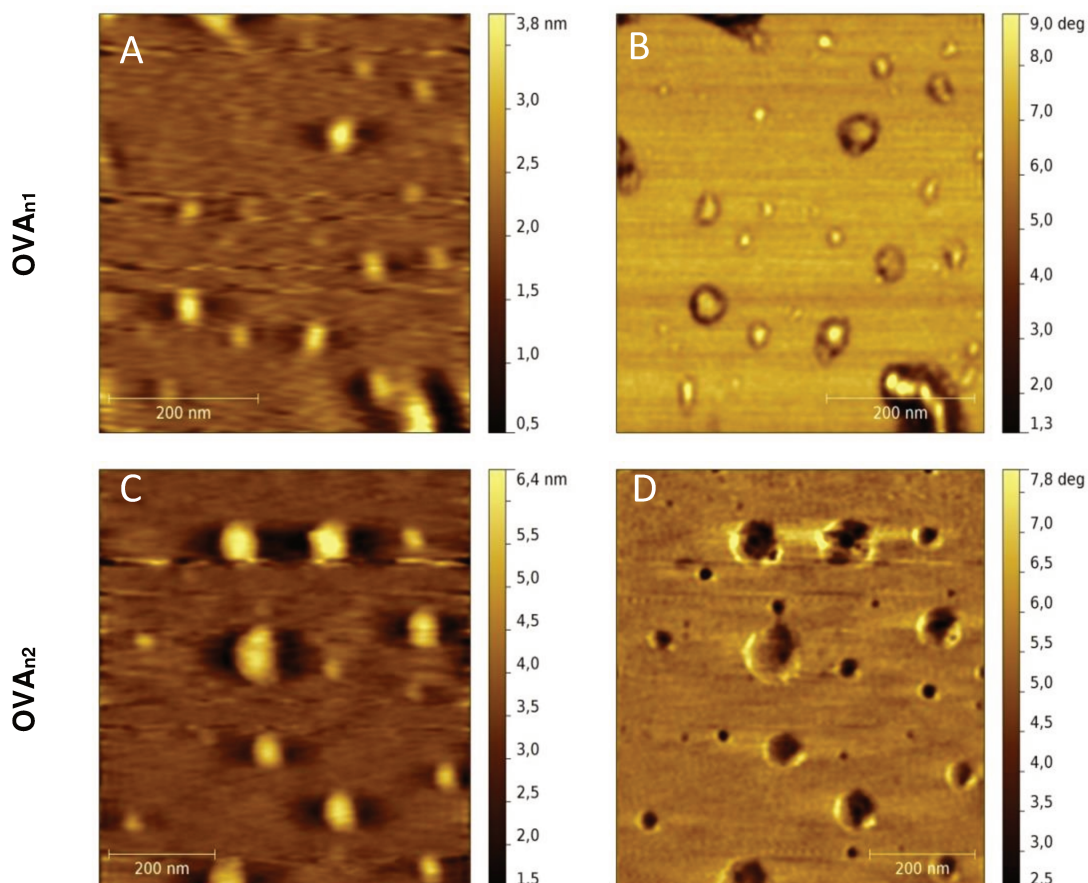


Figura 34. Imágenes de AFM topográficas y de fase para OVA_{n1} (A-B) y OVA_{n2} (C-D).

5.4.1.4. Fluorescencia intrínseca y extrínseca

Se realizaron experimentos de fluorescencia para proporcionar conocimiento respecto de las propiedades conformacionales y de superficie de las nanopartículas derivadas de OVA. La Fig. 35a muestra la IF_{Trp} para OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}. La IF_{Trp} de ambas nanopartículas fue un 30% menor que la IF_{Trp} para OVA. Este fenómeno de *autoquenching* puede ser promovido por interacciones hidrofóbicas y SS, y en general, es consistente con la existencia de cambios conformacionales considerables en la proteína [25], [26].

La Fig. 35b muestra la IF_{ANS} para OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} como una medida de la hidrofobicidad superficial. Los valores de IF_{ANS} para OVA_{n2} y OVA_{n1} son 6,5 y 7,5 veces más altos, respectivamente, que para OVA. Este comportamiento sugeriría la

existencia de una gran disponibilidad de dominios hidrofóbicos de unión a ANS, los que quedaron expuestos debido a la desnaturalización de las proteínas, siendo la hidrofobicidad superficial de OVA_{n1} mayor que la de OVA_{n2} [24]. Las propiedades observadas, especialmente la diferencia en la hidrofobicidad superficial entre las nanopartículas y la OVA, podría tener importantes repercusiones en la unión de compuestos hidrofóbicos.

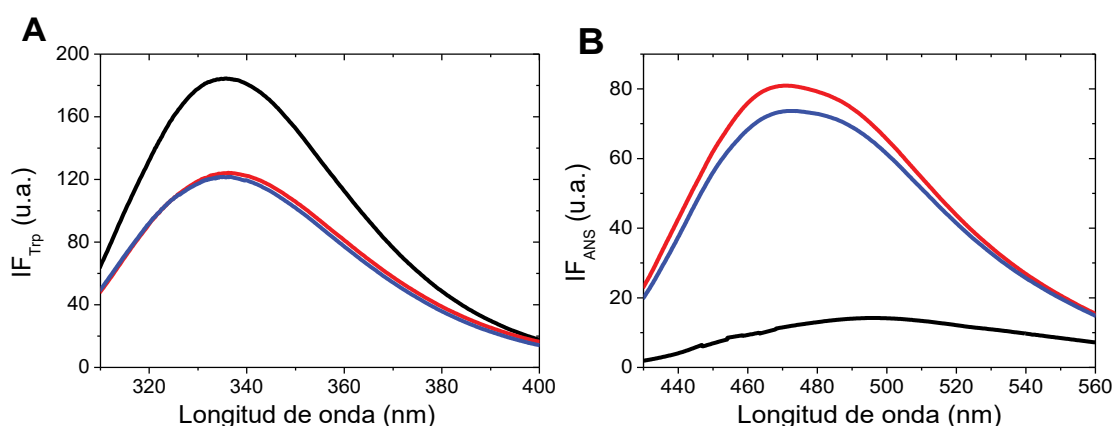


Figura 35. Intensidad de fluorescencia intrínseca del Trp (IF_{Trp}) para OVA (—), OVA_{n1} (—) y OVA_{n2} (—) (A) e intensidad de fluorescencia extrínseca (IF_{ANS}) para OVA (—), OVA_{n1} (—) y OVA_{n2} (—) (B). Condiciones: Concentración de proteína: 1 μ M, buffer fosfato pH 7,0 50 mM, concentración de ANS: 45 μ M, Temperatura: 25°C.

5.4.2. Formación y caracterización de nanocomplejos proteína-ácidos grasos poliinsaturados

5.4.2.1. Distribución de tamaño y potencial ζ

Se sabe que los tamaños de partícula pequeños y los altos potenciales ζ son requisitos necesarios para obtener una alta estabilidad coloidal en medios acuosos alimentarios [96], [97]. Por ello, se estudiaron el tamaño y las propiedades eléctricas de los sistemas proteicos OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} complejados con LA o CLA a pH 7,0 (Fig. 36 y Tabla 5). La Fig. 36 muestra la evolución de los perfiles de PSDi y de PSDv para OVA, OVA-LA y OVA-CLA (Fig. 36a y b); OVA_{n1}, OVA_{n1}-LA y OVA_{n1}-CLA (Fig. 36c y d) y OVA_{n2}, OVA_{n2}-LA y OVA_{n2}-CLA (Fig. 36e y f).

Como puede verse en la Tabla 5, LA y CLA forman estructuras supramoleculares cuyos d_H fueron 748 ± 27 nm y 289 ± 3 nm, respectivamente. El potencial ζ fue -44 ± 2 mV para LA y -56 ± 8 mV para CLA, indicando que estos PUFA forman suspensiones muy estables a pH 7,0.

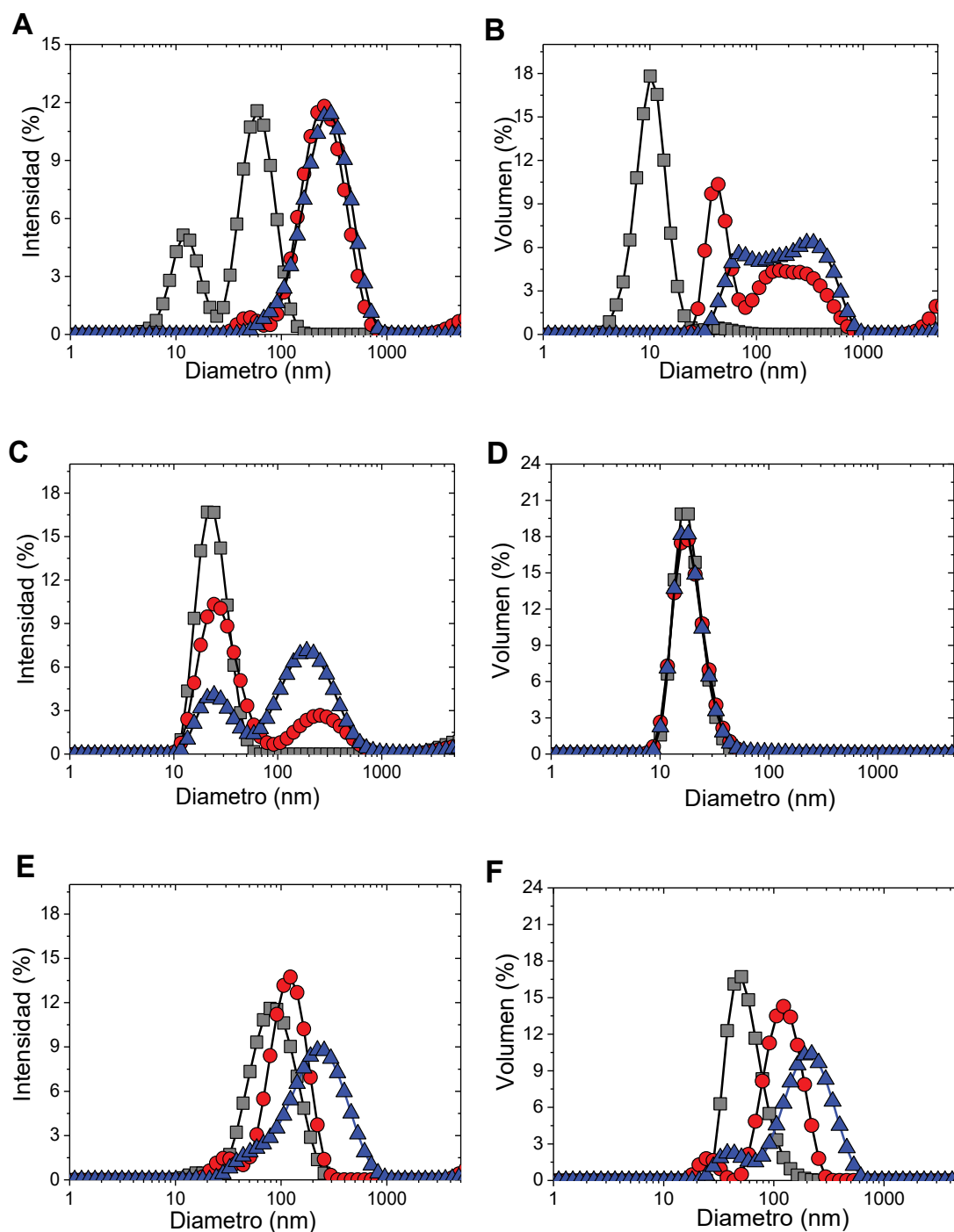


Figura 36. Distribución del tamaño de partícula (PSD) a pH 7,0 en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%): (A) y (B): OVA (■), OVA-LA (●) y OVA-CLA (▲); (C) y (D): OVA_{n1} (■), OVA_{n1}-LA (●) y OVA_{n1}-CLA (▲); (E) y (F): OVA_{n2} (■), OVA_{n2}-LA (●) y OVA_{n2}-CLA (▲). Condiciones: concentración de proteína: 23 μ M, concentración de PUFA: 1 mM, temperatura: 25°C.

Como se mencionó anteriormente (Sección 5.4.1.2), OVA tiene dos picos en el perfil de PSDi a 12 ± 2 nm y 62 ± 3 nm. Los nanocomplejos de inclusión OVA-LA y OVA-CLA mostraron dos picos principales que pueden observarse claramente en el perfil de PSDv (Fig. 36b). En el caso de OVA-LA, los d_H fueron 51 ± 1 nm (43,0%) y

270±6 nm (50%), mientras que para OVA-CLA, los d_H hallados fueron 93±18 nm (44%) y 288±8 nm (55%) (Tabla 5; Fig. 36a y b). Se podría deducir que los picos de menor tamaño correspondieron a los nanocomplejos OVA-LA u OVA-CLA y los picos más grandes corresponderían a estructuras supramoleculares del PUFA que permanecieron sin unirse a los sistemas proteicos. Teniendo en cuenta que el potencial ζ fue -15±2 mV para OVA, la formación del nanocomplejo de inclusión provocó un aumento de la carga negativa, siendo -26,6±0,9 mV para OVA-LA y -26±2 mV para el nanocomplejo OVA-CLA. Este aumento de la carga negativa podría explicarse teniendo en cuenta la formación del nanocomplejo, donde la unión del PUFA a la proteína podría generar un aumento en el valor del potencial ζ negativo del nanocomplejo.

Mientras que OVA_{n1} tuvo un d_H de 24,63±0,04 nm (100%) (Sección 5.4.1.2), ambos nanocomplejos de inclusión, OVA_{n1} -LA y OVA_{n1} -CLA, presentaron dos picos en el perfil de PSDi cuyos d_H fueron 30±1 nm (99.9%) y 284±10 nm (0.1%) y 28,79±0,05 nm (99.8%) y 224±24 nm (0.2%), respectivamente (Tabla 5; Fig. 36c y d). Como se puede observar, la unión de ambos PUFAs produjo un aumento en el tamaño de OVA_{n1} ($p < 0,05$) y casi todo el volumen correspondió a los nanocomplejos de inclusión (Fig. 36d), lo que indicó que la cantidad de PUFA libre podría considerarse despreciable. Teniendo en cuenta que el potencial ζ para OVA_{n1} fue de -15,9±0,1 mV, la complejación entre OVA_{n1} y ambos PUFA produjo un aumento de la carga negativa en este valor, siendo de -29±1 mV para OVA_{n1} -LA y -27,9±0,9 mV para OVA_{n1} -CLA. De la misma manera que para OVA, el aumento en la carga negativa podría explicarse considerando la formación del nanocomplejo de inclusión.

Para OVA_{n2} se registraron dos picos cuyos d_H fueron 92,0±0,2 nm (98.2%) y 16±2 nm (1.7%) (Sección 5.4.1.2). Para los nanocomplejos de inclusión con PUFA, los d_H hallados a partir de los perfiles de PSDi y PSDv fueron 123±6 nm (92%) y 29±5 nm (6%) en el caso de OVA_{n2} -LA y 237±43 nm (83%) y 31±20 nm (16%) en el caso de OVA_{n2} -CLA (Tabla 5; Fig. 36e y f). La unión de ambos PUFA produjo un aumento en el tamaño de OVA_{n2} ($p < 0,05$) que indicaría la formación de nanocomplejos de inclusión. El potencial ζ para OVA_{n2} fue -15±2 mV, mientras que fue -18,2±0,6 mV para OVA_{n2} -LA y -19,4±0,3 mV para OVA_{n2} -CLA. Al igual que para OVA y OVA_{n1} , el aumento en la carga negativa podría explicarse considerando la formación del nanocomplejo. Sin embargo, en el caso de esta nanopartícula más grande, la unión de los PUFA produjo un aumento en la carga negativa, pero la magnitud fue mucho menor que en el caso de la complejación de los PUFA con OVA u OVA_{n1} .

5.4.2.2. Microscopía de fuerza atómica

Los aspectos morfológicos de los nanocomplejos de inclusión se determinaron mediante AFM (Fig. 37 y 38). La Fig. 37 muestra las imágenes topográficas (a, c y e) y de fase (b, d y f) para OVA-LA, OVA_{n1}-LA y OVA_{n2}-LA. Según lo observado en la escala lateral en nm, la altura para OVA_{n1}-LA y OVA_{n2}-LA fue mayor que la altura para OVA_{n1} y OVA_{n2} (Fig. 34a-d; Sección 5.4.1.3).

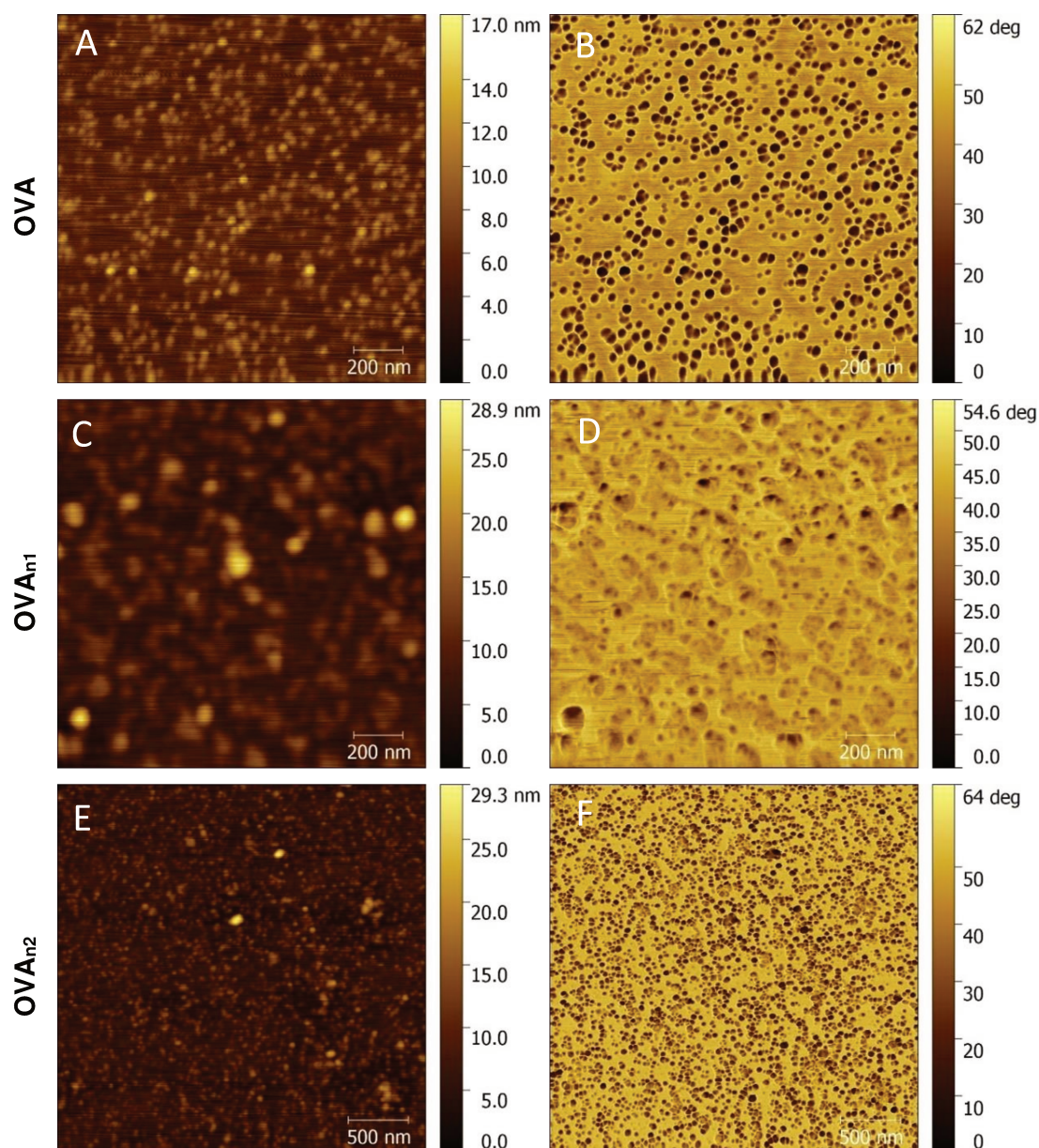


Figura 37. Imágenes de AFM topográficas y de fase para OVA-LA (A-B), OVA_{n1}-LA (C-D) y OVA_{n2}-LA (E-F), respectivamente.

Esta comparación no se pudo realizar con OVA, porque las imágenes de AFM obtenidas para OVA con el equipo de AFM usado no presentaron la resolución adecuada. Para OVA-LA (Fig. 37a y b) y OVA_{n2}-LA (Fig. 37e y f) se observaron

nanocomplejos con una forma definida, aproximadamente redonda. Sin embargo, en el caso de OVA_{n1}-LA (Fig. 37c y d) no se comprobó una morfología definida observando partículas tanto redondeadas como amorfas.

Analizando las imágenes topográficas (Fig. 38 a, c y e) y de fase (Fig. 38 b, d y f) para los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA, se llegó a las mismas conclusiones que para los nanocomplejos formados con LA. Las alturas de los nanocomplejos fueron mayores que la de las nanopartículas de OVA (Fig. 34 a-d; Sección 5.4.1.3). Mientras que los nanocomplejos OVA-CLA (Fig. 38a y b) y OVA_{n2}-CLA (Fig. 38e y f) mostraron una forma redondeada definida, para OVA_{n1}-CLA (Fig. 38 c y d) no se registró una morfología definida.

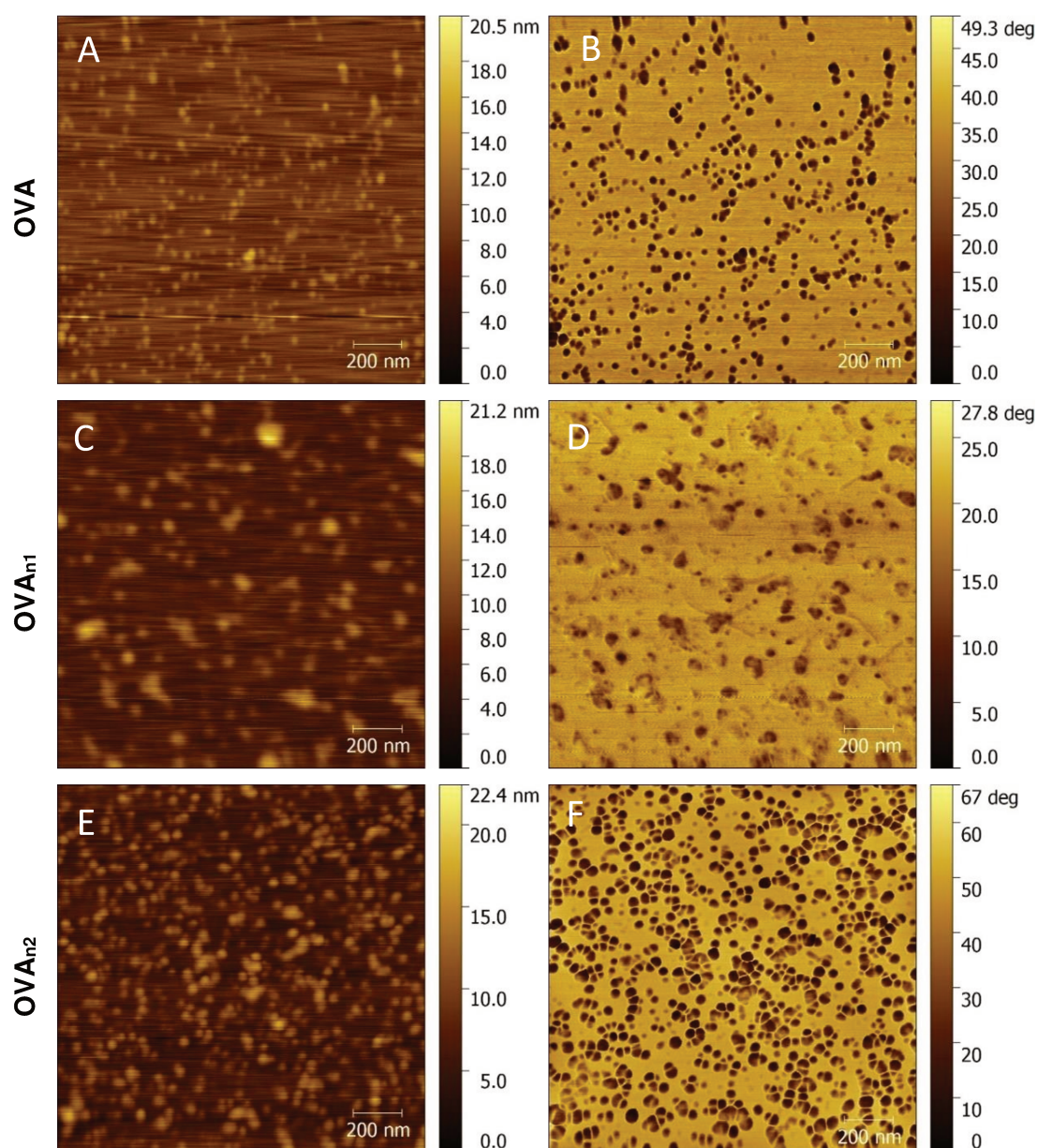


Figura 38. Imágenes de AFM topográficas y de fase para OVA-CLA (A-B), OVA_{n1}-CLA (C-D) y OVA_{n2}-CLA (E-F) respectivamente.

La mayor altura de los nanocomplejos de inclusión con respecto a las nanopartículas puras podría indicar que las moléculas de PUFA están efectivamente unidas a la nanopartícula promoviendo un aumento en su volumen. Esta hipótesis está de acuerdo con un mecanismo de saturación en el que los sitios de unión internos son ocupados en primer lugar por los ligandos hidrofóbicos. Dicho mecanismo fue propuesto en trabajos previos [95] y en el modo de unión de RET a OVA_{n2} en el Capítulo 1 (Sección 3.4.1.2) de la presente tesis.

Los tamaños de las nanopartículas y los nanocomplejos de inclusión no se correspondieron completamente con las mediciones realizadas mediante DLS. Al respecto, es importante señalar que las muestras fueron sometidas a una etapa de secado y las partículas pudieron haberse aplastado sobre la superficie de mica, siendo este fenómeno el responsable de las diferencias de tamaño halladas [156].

5.4.2.3. Fluorescencia intrínseca

Se siguió la formación de nanocomplejos de inclusión, monitoreando los cambios en la intensidad de fluorescencia intrínseca luego de la adición del PUFA (LA o CLA) a las soluciones de los sistemas proteicos (OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}). El efecto de la concentración de PUFA en los espectros de IFR_{Trp} se evaluó para OVA y ambas nanopartículas de OVA (Apéndice, Sección 9.2.1) y, posteriormente, se obtuvieron de ellos los valores de IFR_{Trp} (Fig. 39a-c). A partir de ellos, puede observarse que:

(i) Para OVA, el aumento en la concentración de CLA o LA (0-20 μ M) prácticamente no produjo cambios en la IFR_{Trp} (Fig. 39a) ni cambios en la λ_{em} máxima (inserto en la Fig. 39a). Debido a que no hubo disminución en la IFR_{Trp}, no fue posible aplicar el modelo de Scatchard modificado para calcular los valores de n y K_a para OVA. Con este comportamiento, podrían sugerirse dos hipótesis para explicar los resultados obtenidos. Por un lado, podría ser que las moléculas de PUFA estén unidas a dominios de OVA lejanos de los residuos de Trp, de modo que las mediciones de fluorescencia no detecten cambios conformacionales o podría ser que los PUFAs se unan en una proporción muy baja a OVA y, por lo tanto, mediante esta técnica no podría registrarse un cambio significativo en los valores de IFR_{Trp}.

(ii) Para OVA_{n1}, el aumento en la concentración de ambos PUFAs evaluados promovió una disminución gradual en la IFR_{Trp} (Fig. 39b), y no se registraron cambios en la λ_{em} máxima (inserto en la Fig. 39b). Como se dijo anteriormente, esta disminución de la IFR_{Trp} corresponde a un fenómeno conocido como *quenching* de la fluorescencia. Suponiendo un mecanismo de *quenching* estático, las moléculas de

PUFA podrían estar unidas en sitios cercanos al Trp, por lo que la emisión de fluorescencia se reduciría gradualmente debido a la formación del nanocomplejo de inclusión entre PUFA y OVA_{n1} [79]. Por lo tanto, la magnitud de la disminución de la IFR_{Trp} podría ser proporcional a la concentración del nanocomplejo OVA_{n1}-PUFA en solución [20], [93]. Los parámetros de unión, n y K_a , se obtuvieron mediante el ajuste de los datos de IFR_{Trp} al modelo de Scatchard modificado [25] y se obtuvieron los siguientes resultados: i) para el LA se obtuvo un valor de $n=75\pm 10$ y una $K_a=(9\pm 2) \times 10^4 M^{-1}$ y ii) para el CLA los valores hallados fueron los siguientes $n=50\pm 2$ y $K_a=(5\pm 3) \times 10^5 M^{-1}$ (Tabla 6). Estos resultados indicarían que OVA_{n1} se une a una cantidad menor de CLA con respecto a LA ($p<0,05$), sin una diferencia significativa en la K_a para ambos PUFAs ($p>0,05$) (Tabla 6).

(iii) Para OVA_{n2}, de la misma manera que para OVA_{n1}, el aumento en la concentración de ambos PUFAs promovió una disminución gradual en la IFR_{Trp} (Fig. 39c) y no se registraron cambios en la λ_{em} máxima (inserto en la Fig. 39c). Además, los valores de IFR_{Trp} disminuyeron alcanzando una meseta a aproximadamente 40 μM para el CLA, lo que podría indicar la saturación de los sitios en OVA_{n2} para la unión de CLA. Sin embargo, en el caso del LA, la IFR_{Trp} no mostró este comportamiento, en el rango de concentración estudiado. La aplicación del modelo Scatchard modificado arrojó un valor de n de 60 ± 8 y de K_a de $(3,9\pm 1) \times 10^5 M^{-1}$ para el LA y un valor de n de 49 ± 5 y de K_a de $(1,3\pm 1) \times 10^6 M^{-1}$ para el CLA (Tabla 6). Por lo tanto, OVA_{n2} pudo unirse a una cantidad menor de CLA en comparación con LA ($p<0,05$) sin una diferencia significativa en la K_a ($p>0,05$) (Tabla 6), tal como se observó para OVA_{n1}.

Teniendo en cuenta el número de monómeros OVA que forman cada nanopartícula, 23 y 26 para OVA_{n1} y OVA_{n2}, respectivamente, y el número de PUFA (LA o CLA) unidos por monómero (n), se podría deducir que:

(i) Fue posible calcular el número de moléculas de PUFA que se unen por nanopartícula de proteína (como el producto entre n y el número de unidades de OVA que forman cada nanopartícula).

(ii) Ambas nanopartículas unieron más moléculas de LA que de CLA, pero OVA_{n1} unió más cantidad de LA con respecto a OVA_{n2} ($p < 0,05$). Además, OVA_{n1} y OVA_{n2} se unieron a la misma cantidad de CLA ($p>0,05$) (Tabla 6).

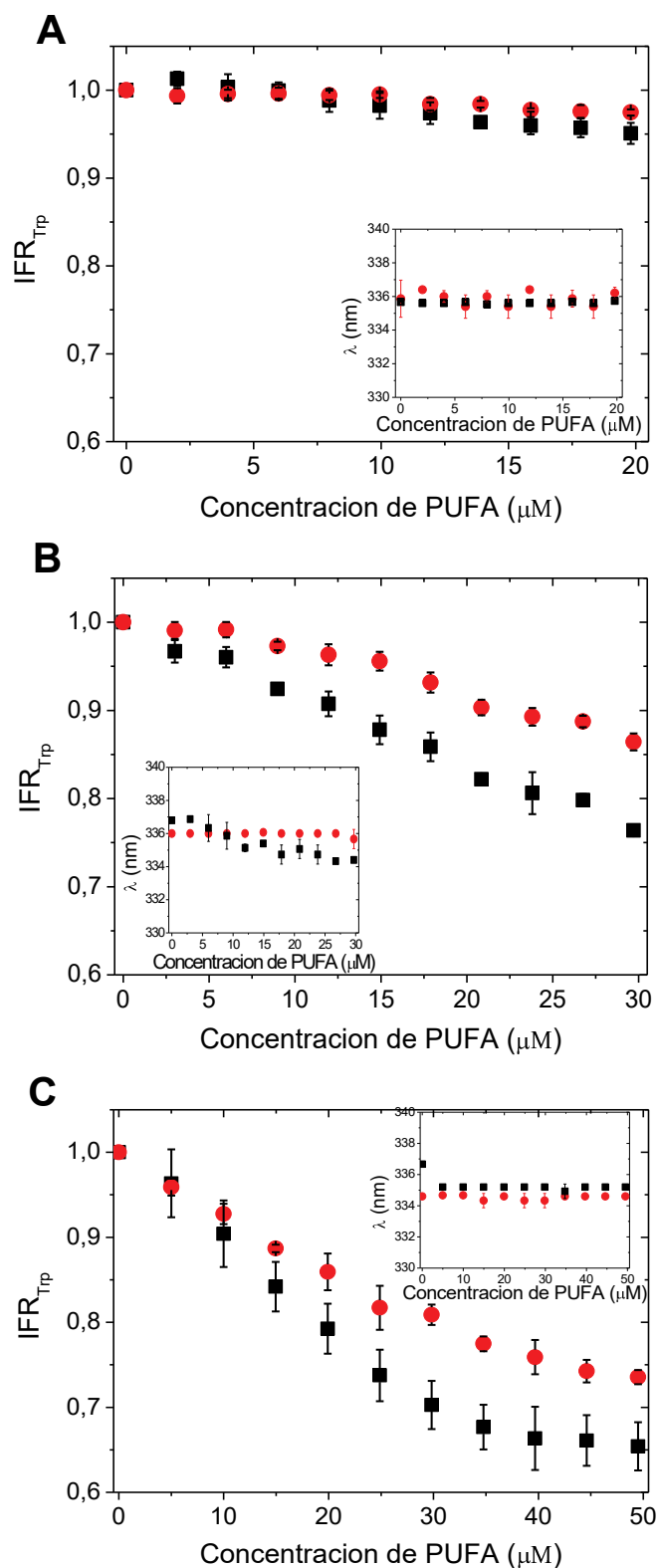


Figura 39. Efecto de la concentración de LA (●) o CLA (■) en la intensidad de fluorescencia relativa del Trp (IFR_{Trp}) para OVA (A), OVA_{n1} (B) y OVA_{n2} (C). Las inserciones corresponden a la longitud de onda (λ , nm) para la IFR_{Trp} máxima. Condiciones: Concentración de proteína: 1 μM , buffer fosfato pH 7,0 50 mM, temperatura: 20°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar.

Tabla 6. Parámetros de unión: número de moléculas de LA o CLA que se unen a la nanopartícula por unidad monomérica de OVA (n monómero) o por nanopartícula (n nanopartícula) y constante de asociación (K_a) para OVA_{n1} y OVA_{n2} . Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Sistema	n (monómero)	K_a (M^{-1})	n (nanopartícula)
OVA_{n1} -LA	75 ± 10^c	$(9 \pm 2) \times 10^4^a$	1.725 ± 23^c
OVA_{n1} -CLA	50 ± 2^a	$(5 \pm 3) \times 10^5^{a,b}$	1.150 ± 46^a
OVA_{n2} -LA	60 ± 8^b	$(3,9 \pm 1) \times 10^5^{a,b}$	1.560 ± 208^b
OVA_{n2} -CLA	49 ± 5^a	$(1,3 \pm 1) \times 10^6^b$	1.274 ± 130^a

5.4.2.4. Fluorescencia extrínseca

Con el fin de obtener algún conocimiento sobre el modo de unión de los PUFA a los sistemas proteicos (OVA , OVA_{n1} y OVA_{n2}), se realizaron experimentos de fluorescencia extrínseca. Se evaluó el efecto de la concentración de PUFA sobre la IF_{ANS} para OVA y sus nanopartículas derivadas (Apéndice, Sección 9.2.2). A partir de estos espectros, se obtuvieron los valores de IFR_{ANS} que se presentan en la Fig. 40 (a-c). Se observó que:

(i) Para OVA , el aumento en la concentración tanto de CLA como de LA no causó diferencias en los valores de IFR_{ANS} (Fig. 40a). Estos resultados podrían sugerir que una cantidad constante de ANS estaría unida a OVA posiblemente debido a: (i) la sonda se une a dominios hidrofóbicos particulares sobre la superficie de la proteína, diferentes a los sitios donde se unen los PUFAs, y/o (ii) los PUFA se unieron a OVA en muy baja proporción. Este resultado está de acuerdo con lo observado para las mediciones de fluorescencia intrínseca. Se observó un ligero cambio en la λ_{em} máxima de ANS (deducida del inserto en la Fig. 40a), lo que sugeriría un pequeño cambio en la polaridad ambiental de los sitios de unión de ANS [157].

(ii) Para OVA_{n1} y OVA_{n2} , el aumento en la concentración de ambos PUFAs promovió una disminución gradual en la IFR_{ANS} (Fig. 40b y c). Este comportamiento indica que se formaron menores cantidades de nanocomplejos OVA_{n1} -ANS u OVA_{n2} -ANS en solución. Esto podría deberse a que los PUFA se unen a sitios hidrofóbicos de las nanopartículas formando nanocomplejos OVA_{n1} -PUFA u OVA_{n2} -PUFA, desplazando de esta manera al ANS y disminuyendo la magnitud de la IFR_{ANS} . Además, hubo un desplazamiento al rojo significativo en la λ_{em} máxima de ANS (observada en el inserto en las Fig. 40b y c), lo que podría sugerir que la sonda estaría unida en un entorno cada vez más polar conforme aumentó la concentración de ambos PUFAs [79]. Esto sugeriría que el modo de unión de los PUFA a las nanopartículas podría responder a un mecanismo en el cual los sitios internos se ocuparían primero. Los valores iniciales de IFR_{ANS} para OVA_{n1} disminuyeron un 50%

cuando se agregaron 30 μM de CLA o LA mientras que el valor inicial de IFR_{ANS} para $\text{OVA}_{\text{n}2}$ se redujo en un 65% con la adición de 35 μM de CLA o 50 μM de LA.

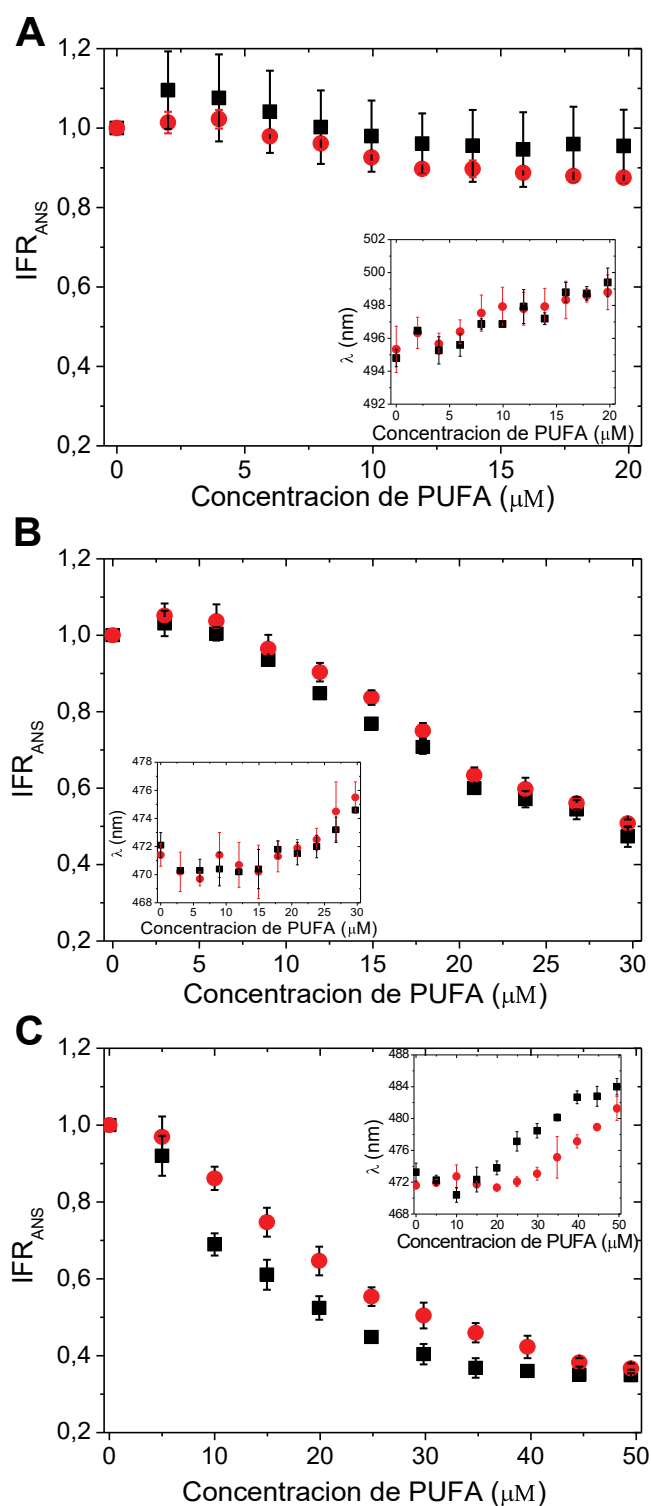


Figura 40. Efecto de la concentración de LA (●) o CLA (■) en la intensidad de fluorescencia relativa del ANS (IFR_{ANS}) para OVA (A), $\text{OVA}_{\text{n}1}$ (B) y $\text{OVA}_{\text{n}2}$ (C). Las inserciones corresponden a la longitud de onda (λ , nm) para la IF_{ANS} máxima. Condiciones: Concentración de proteína: 1 μM , buffer fosfato pH 7,0 50 mM, concentración de ANS: 45 μM , Temperatura: 20°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar.

5.4.3. Ensayo de turbidez

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, las moléculas de PUFAs son moléculas anfifílicas que en medio acuoso, por arriba de la CMC, se ensamblan para formar estructuras supramoleculares estables (micelas, vesículas, etc.) que confieren turbidez apreciable a la solución acuosa [9]. Este proceso de autoensamblaje puede seguirse mediante mediciones de turbidez a 400 nm [9].

Como se indicó anteriormente, muchas proteínas tienen la capacidad intrínseca de unirse a compuestos hidrofóbicos, tales como los PUFAs. Muchos estudios han demostrado que, en presencia de una proteína, las estructuras supramoleculares de los PUFAs no se forman y la solución se vuelve transparente. Spolaore y col. (2010) [158] informaron que cuando se agregó una solución de α -lactoalbúmina a una solución turbia de ácido oleico, esta se volvió transparente. Los autores explicaron este comportamiento considerando que la adición de la proteína produce la disrupción de las estructuras supramoleculares autoensambladas del ácido oleico y la formación de complejos de inclusión [158]. De igual manera, en otro estudio, se observó que a medida que se aumentó la concentración de LA aumentó la turbidez de la solución, sin embargo, cuando se agregó LA a una solución de nanopartículas de OVA la turbidez disminuyó y esta solución se volvió transparente. Esto se atribuyó a la ruptura de las estructuras supramoleculares del LA y a la formación de nanocomplejos de inclusión entre la nanopartícula de OVA y el LA [20].

Teniendo en cuenta estas consideraciones previas, se midió la turbidez (ABS a 400 nm) de LA y CLA en presencia y ausencia de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} (0,5 g/L) (Fig. 41a y b). La Fig. 41a muestra la turbidez en función de la concentración de LA. En el caso de LA puro, la turbidez aumentó linealmente con la concentración. En presencia de 0,5 g/L de OVA, la solución acuosa de LA permaneció transparente (ABS a 400 nm cercana a cero) hasta 291 ± 11 μ M de LA, sin embargo, en los casos de OVA_{n1} y OVA_{n2} permaneció transparente hasta 710 ± 3 μ M y 669 ± 10 μ M de LA, respectivamente. Se encontró un comportamiento similar para CLA (Fig. 41b). Para CLA puro, la turbidez aumentó linealmente con la concentración, mientras que en presencia de 0,5 g/L de OVA, la solución acuosa de CLA se mantuvo transparente (ABS a 400 nm cercana a cero) hasta 445 ± 12 μ M de CLA y en los casos de OVA_{n1} y OVA_{n2} permaneció transparente hasta 923 ± 4 μ M y 837 ± 30 μ M de CLA, respectivamente.

La turbidez de ambas soluciones, LA puro y CLA puro, aumentó linealmente con la concentración de PUFA, lo que podría sugerir la formación de estructuras supramoleculares autoensambladas por arriba de la CMC. Estas soluciones tienden a ser de apariencia opaca porque las dimensiones de las estructuras supramoleculares

de los PUFAs estarían en el mismo orden de la λ de la luz, de modo que la dispersión de la luz es relativamente fuerte [28]. A partir de la Fig. 41 fue posible calcular la pendiente de la línea recta para cada PUFA puro, siendo $(15,2 \pm 0,4) \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1}$ para el LA y $(9,0 \pm 0,5) \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1}$ para el CLA. Estos valores podrían tomarse como una medida de la capacidad para formar autoensamblados supramoleculares. La pendiente es más alta para LA que para CLA, lo que sugeriría que las diferencias estructurales entre ambos PUFA podrían manifestar cierta influencia en el proceso de autoensamblaje.

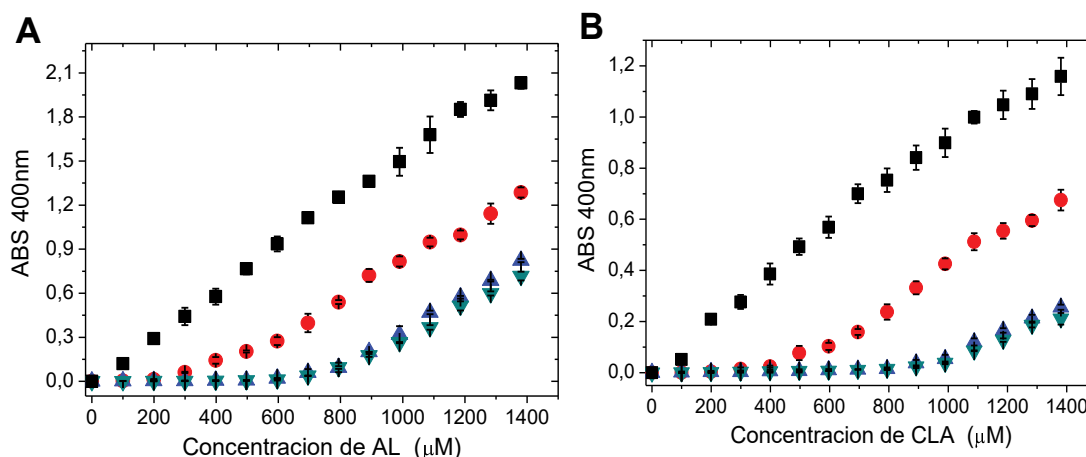


Figura 41. ABS a 400 nm versus concentración de LA (A) o CLA (B) sin proteína (■), con OVA (●), con OVA_{n1} (▼) y con OVA_{n2} (▲). Condiciones: Concentración de proteína: 0,5 g/L, buffer fosfato pH 7,0 50 mM, temperatura: 20°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar.

Por otro lado, en presencia de OVA o sus nanopartículas derivadas, la turbidez de la solución acuosa de los PUFAs se mantuvo baja y constante hasta cierta concentración de LA o CLA a partir de la cual comenzó a aumentar. Este comportamiento podría explicarse considerando que las estructuras supramoleculares de los PUFAs se rompen y las moléculas de PUFA comienzan a unirse a las nanopartículas de OVA hasta que se alcanza una concentración en la cual todos los sitios de unión de las nanopartículas se hallan ocupados por las moléculas de PUFA (saturación) y a partir de la cual las moléculas de PUFA residuales comienzan a asociarse entre sí para formar autoensamblados supramoleculares, que confieren turbidez a la solución [20]. La turbidez de los nanocomplejos OVA-PUFA comenzó a aumentar antes que la de los nanocomplejos nanopartículas-PUFA, lo que indicaría que las moléculas de PUFA se unen a OVA en una proporción más baja. Estos resultados fueron consistentes con las mediciones de fluorescencia, donde los PUFA se unieron a OVA en menor proporción con respecto a las nanopartículas.

5.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En el presente trabajo, se obtuvieron y caracterizaron dos nanopartículas en términos de su PM, tamaño, propiedades eléctricas y aspectos morfológicos. La capacidad de OVA_{n1} y OVA_{n2} para unirse a dos PUFAs (LA y CLA) se estudió mediante experimentos de fluorescencia, cambios en el tamaño de partícula y potencial ζ , y mediante AFM.

En primer lugar, es posible concluir que el pH y la concentración con que se realizó el proceso térmico tuvo un impacto importante en el tamaño de las nanopartículas obtenidas; sin embargo, no hubo efecto en sus propiedades eléctricas. En segundo lugar, ambas nanopartículas unieron LA/CLA en mayor cantidad que OVA. Por otro lado, el número de moléculas de LA unidas a ambas nanopartículas fue mayor con respecto al de CLA, lo que indica que las características estructurales de ambos PUFAs fueron importantes para la unión con las nanopartículas de OVA.

Las diferencias estructurales entre ambos PUFAs (especialmente debido a la conjugación del doble enlace) podrían promover diferentes conformaciones tridimensionales que influyen en la cantidad del CB unido a las nanopartículas. La conformación tridimensional podría hacer que el CLA se uniera en cierta cantidad independientemente de la nanopartícula utilizada, mientras que, en el caso del LA, su estructura le permitió unirse en diferentes cantidades dependiendo del tamaño de la nanopartícula.

6. CAPÍTULO 4

**Estudio de la digestión gastrointestinal *in vitro*
de nanocomplejos de inclusión entre
nanopartículas de ovoalbúmina y ácido linoleico
conjugado**

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. Alimentos funcionales

En las últimas décadas, la demanda de los consumidores en el campo de la producción de alimentos ha cambiado considerablemente. Los consumidores creen cada vez más que los alimentos contribuyen directamente sobre su salud. Hoy en día, los alimentos no solo tienen como objetivo proporcionar los nutrientes necesarios, sino también prevenir enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental de los consumidores. En este sentido, los alimentos funcionales desempeñan un papel destacado [159].

La Acción Concertada de la Comisión Europea sobre la Ciencia de Alimentos Funcionales en Europa, coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de Europa definió los alimentos funcionales de la siguiente manera: “un producto alimenticio solo puede considerarse funcional si junto con el impacto nutricional básico posee un efecto beneficioso en una o más funciones del organismo humano ya sea mejorando las condiciones generales y físicas y/o disminuyendo el riesgo de evolución de enfermedades. La cantidad de ingesta y la forma del alimento funcional deben ser como se espera normalmente para fines dietarios. Por lo tanto, no podría ser una forma de píldora o cápsula como una forma de alimento normal” [160].

Diferentes países poseen diferentes definiciones de alimento funcional y regulaciones al respecto. En este sentido Argentina aún no incluye a los alimentos funcionales en su código alimentario. La mayoría de las definiciones concuerdan en que para que un alimento pueda ser considerado funcional, debe demostrar que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, que mejora el estado de salud y de bienestar, o que reduce el riesgo de una enfermedad. Esto significa que estos alimentos deben contener, necesariamente, alguno de los llamados ingredientes funcionales o CB, entre los cuales pueden mencionarse vitaminas, antioxidantes, minerales, fibras, etc.

6.1.2. Tracto digestivo humano

El TGI representa una de las interfaces más grandes entre nuestro cuerpo y el medio ambiente y, cuando funciona correctamente, absorbe nutrientes al tiempo que brinda protección contra componentes dañinos. Según la definición más amplia, el TGI se extiende desde la boca hasta el ano y puede dividirse en los tractos superior e inferior. El TGI superior consiste en la cavidad oral, el esófago, el estómago y el

intestino delgado que se divide en tres partes: duodeno, yeyuno e íleon. El TGI inferior comprende el intestino grueso que consiste en ciego, colon (que se divide en ascendente, transverso y descendente), recto y canal anal (Fig. 42). En el proceso de la digestión, también son importantes las secreciones de las glándulas salivales, el páncreas y el sistema biliar hepático [161], [162], [163].

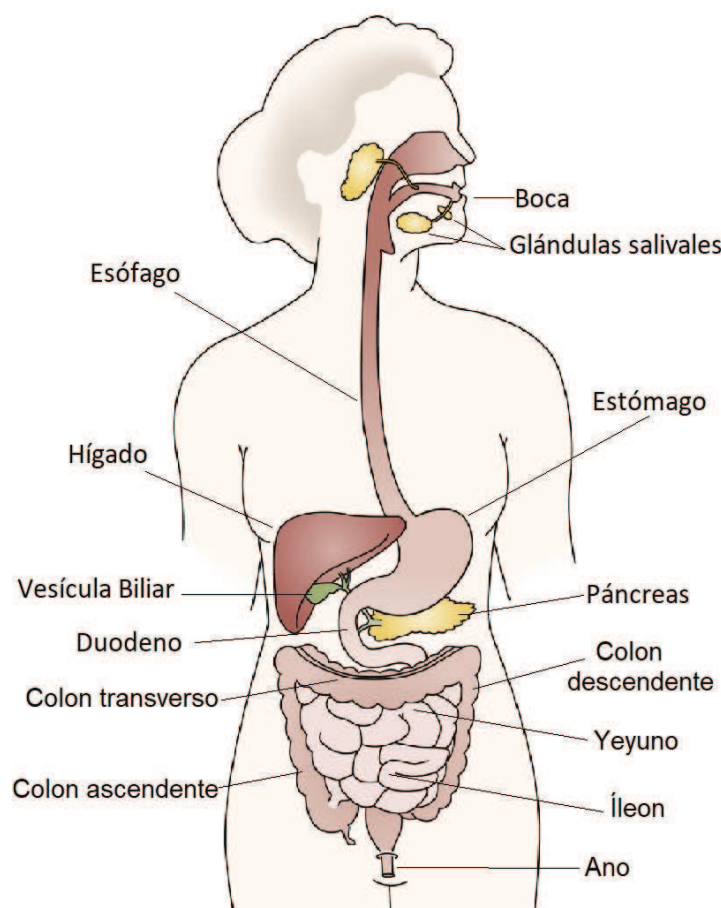


Figura 42. Órganos que componen el sistema digestivo humano (Figura modificada de Carlson, 2019 [161]).

La boca es responsable de la masticación y la mezcla de los alimentos con la saliva, que contiene una variedad compleja de componentes, incluida la amilasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de almidón en azúcares. Después de la formación del bolo alimenticio, la comida se transporta a través del esófago hasta el estómago, donde se procesa aún más. El bolo alimenticio se mezcla con enzimas como la pepsina y la lipasa, que descomponen proteínas y lípidos, respectivamente. El ácido también se secreta en el estómago y esto disminuye gradualmente el pH del contenido y ayuda a la hidrólisis del bolo alimenticio. Normalmente, el pH estomacal comienza en 5,0 debido a la capacidad buffer de los alimentos y disminuye hasta 1,0-2,0. El bolo alimenticio se descompone en quimo, que se transporta gradualmente al intestino

delgado. En el duodeno, el pH bajo del estómago es neutralizado por el bicarbonato y los jugos digestivos del páncreas (que contiene enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina y lipasa) y de la vesícula biliar (que aporta sales biliares). Normalmente, el pH en el duodeno es de 5,0-5,5 llegando a 7,5 en el íleon. Las enzimas digestivas descomponen aún más las proteínas, los lípidos y el almidón, mientras que los ácidos biliares ayudan a emulsionar los productos de la hidrólisis lipídica para formar micelas mixtas (entre los lípidos de la digestión, las sales biliares y el colesterol). La etapa final de la digestión de carbohidratos y proteínas de la dieta ocurre directamente sobre la superficie de los enterocitos del intestino delgado involucrando enzimas presentes en las microvellosidades. Estas enzimas, que incluyen maltasa, sacarosa-isomaltasa, lactasa y peptidasas, son proteínas integrales de membrana que están presentes en los enterocitos. Los nutrientes producidos son absorbidos principalmente por los enterocitos del yeyuno y, en menor medida, en el íleon. Una de las funciones principales del intestino grueso es la absorción de agua. Además, aunque se sabe que el TGI contiene una gran población microbiana, la concentración de esta población es mayor en el intestino grueso. Muchos de estos microorganismos contribuyen a la digestión de componentes de los alimentos mediante sus propias enzimas, incluidos prebióticos y PS complejos que no pueden ser digeridos por las enzimas humanas. Luego de la absorción de nutrientes por parte de los enterocitos, los compuestos, especialmente los péptidos, pueden degradarse aún más por las proteasas intracelulares antes de que ingresen al torrente sanguíneo o al sistema linfático. Los nutrientes solubles en agua se liberan principalmente en el torrente sanguíneo y terminan en el hígado a través de la vena porta hepática. Los nutrientes solubles en grasa se transportan hacia la linfa después del ensamblaje en quilomicrones. Después del procesamiento, estos compuestos también terminan en la sangre [161], [162], [163].

Dado que el objetivo de los alimentos funcionales es que los CB ejerzan su función benéfica en el organismo, es importante conocer su biodisponibilidad a través del TGI al ser ingeridos. La biodisponibilidad de los CBs puede definirse en base a su bioaccesibilidad, absorción y transformación dentro del TGI [164]. A continuación, describiremos brevemente estos conceptos:

Bioaccesibilidad: Conformar un grupo de factores limitantes relacionado con la accesibilidad del CB dentro de los fluidos del TGI, dado que éstos deben estar presentes en una forma física adecuada para su absorción. Los principales factores que la limitan son: (i) liberación del CB de la matriz alimenticia o sistema de encapsulación, (ii) solubilidad en los fluidos gastrointestinales (por ejemplo, un CB hidrofóbico tiene baja solubilidad en agua y debe ser incorporado en micelas mixtas en

el intestino delgado antes de que pueda absorberse) y (iii) interacción con otros componentes en los fluidos gastrointestinales [164], [165].

Absorción: Consisten en factores relacionados con la absorción del CB a partir del fluido gastrointestinal, es decir, la fracción que viaja a través de la capa mucosa, a través de las células epiteliales y dentro de la circulación sistémica. Existen diferentes mecanismos de absorción, entre ellos: (i) transporte a través de la capa mucosa: las células epiteliales que revisten el TGI están cubiertas por una capa de moco que sirve como protección limitando el paso de determinadas sustancias, de hecho, los poros de la capa mucosa son de 400 nm aproximadamente, (ii) permeabilidad de la bicapa lipídica: uno de los principales factores que influye en el transporte pasivo de los CBs a través de las células epiteliales es su habilidad para pasar a través de la bicapa de fosfolípidos no polares que es relativamente hidrofóbica y, por ello, cuanto mayor sea la hidrofobicidad del CB, mayor será la permeabilidad a la membrana, (iii) transporte a través de las uniones estrechas: las uniones estrechas ocurren en la región que une las células epiteliales vecinas y consiste en canales angostos que permite que las moléculas suficientemente pequeñas pasen a través de ellas (tienen un radio < 30 nm), (iv) transporte activo: consiste en una única proteína o conjunto de proteínas insertadas en la membrana de las células epiteliales que son capaces de transportar tipos o clases específicas de moléculas [164], [165].

Transformación: Los CBs pueden transformarse a una forma inactiva dentro del TGI por diferentes mecanismos: (i) degradación química: algunos CBs pueden sufrir transformaciones químicas dentro de la matriz alimenticia o luego de ser ingeridos pueden alterar su actividad biológica por oxidación, reducción o reacciones de hidrólisis, (ii) algunos CBs son metabolizados por sistemas enzimáticos específicos dentro del TGI [164], [165].

De acuerdo a esto, la biodisponibilidad oral de un CB definida como la fracción del CB ingerido que realmente alcanza la circulación sistémica en forma activa puede estimarse como $\text{biodisponibilidad} = \text{bioaccesibilidad} \times \text{absorción} \times \text{transformación}$, donde bioaccesibilidad es la fracción del CB ingerido que sobrevive el paso a través del TGI y que es liberado de la partícula en los fluidos gastrointestinales, absorción es la fracción del CB bioaccesible que es realmente absorbido por el enterocito y transformación es la fracción del CB absorbido que está en forma activa luego del metabolismo [4], [164], [165].

6.1.3. Modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*

La digestión es un proceso complejo que proporciona nutrientes al cuerpo y libera moléculas en el TGI que pueden tener un efecto beneficioso o perjudicial para la salud humana. Por lo tanto, comprender el destino de los alimentos en el TGI es importante no solo para conocer el efecto de los alimentos sobre la salud, sino también para diseñar sistemas de *delivery* que potencien los efectos beneficiosos de diferentes CBs. El destino de los alimentos en el TGI puede estudiarse utilizando varios métodos o modelos, incluyendo modelos *in vitro* estáticos o dinámicos, diversos cultivos celulares y *ex vivo*, animales y humanos [166], [167].

Dentro de los modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* encontramos los de tipo estático y dinámico. Los métodos estáticos comprenden las técnicas más simples e incluyen dos o tres pasos de digestión (oral, gástrico e intestinal) cuyos productos permanecen en gran medida inmóviles en un solo biorreactor estático. Estos métodos simulan un número limitado de parámetros de digestión fisiológica [163]. Son muy utilizados, pero se han propuesto una gran cantidad de protocolos que difieren en las condiciones experimentales (pH y duración de los diferentes pasos, cantidad de enzimas digestivas y bilis, etc.) haciendo imposible la comparación de resultados entre estudios [167]. Por ello, recientemente, se alcanzó un consenso internacional dentro del *COST Action Infogest* (<http://www.cost-infogest.eu>) y se publicó un protocolo consenso [168], que desde entonces ha sido utilizado internacionalmente. Los modelos estáticos son particularmente útiles cuando la digestión es limitada (por ejemplo, pasos gástricos y/o intestinales), pero son menos aplicables en estudios de digestión total, incluida la fermentación colónica. Estos métodos se pueden utilizar para evaluar la influencia de las condiciones de digestión y para realizar estudios sobre el efecto positivo o negativo de la estructura, composición y procesamiento de alimentos sobre la bioaccesibilidad de nutrientes y CBs, a fin de establecer el valor nutricional de los alimentos y mejorar la formulación/diseño de los mismos. En conclusión, los modelos estáticos se utilizan predominantemente para estudios de digestión en alimentos simples y componentes de alimentos aislados o purificados. Son relativamente reproducibles, rápidos y simples, ya que solo necesitan materiales que están disponibles habitualmente en el laboratorio y, por lo tanto, económicos [163]. Sin embargo, a pesar de su potencial y su amplia aplicabilidad, ninguno de los modelos estáticos reproduce el entorno dinámico del TGI. Son modelos que carecen de la barrera mucosa compleja con todos sus procesos reguladores, carecen de la complejidad de los movimientos peristálticos, del vaciado gástrico o de los cambios continuos en el pH y las tasas de flujo de secreción, de los efectos de la microflora

intestinal y del metabolismo hepático; y tanto las enzimas como las sales biliares se agregan al inicio y permanecen constantes durante todo el experimento [163], [166].

Debido a las limitaciones de los modelos estáticos se han desarrollado modelos de digestión *in vitro* dinámicos. En ellos, las condiciones dentro de los diferentes compartimentos cambian con el tiempo para simular los procesos de digestión que ocurren *in vivo*. Los modelos de digestión dinámicos generalmente poseen varias secreciones digestivas diferentes que se agregan a los compartimentos del modelo a lo largo del tiempo. Esta adición puede seguir una velocidad de secreción constante o puede seguir un patrón preprogramado permitiendo que la velocidad cambie con el tiempo o puede programarse para cambiar en respuesta a otros parámetros, como el volumen de llenado. El pH a menudo se controla en tiempo real dentro de los modelos dinámicos y se usa para controlar la velocidad de adición de HCl, permitiendo que la acidificación del alimento dentro del compartimento gástrico siga una curva predeterminada. En los modelos dinámicos que incorporan un paso duodenal, en esta etapa el pH del quimo se neutraliza mediante la adición controlada de solución de NaHCO_3 , y se agregan secreciones biliares y pancreáticas [163]. Además, dado que el TGI humano consta de compartimentos distintos de diferentes formas, tamaños y orientaciones, estos también tratan de imitarse. Finalmente, los alimentos son sometidos a diferentes fuerzas físicas, así como a la presión ejercida por los movimientos peristálticos en el estómago e intestino, por lo tanto, la geometría de algunos modelos dinámicos ha sido diseñada de tal manera que simule estas fuerzas físicas [163]. Existen muchos modelos de digestión dinámicos pudiendo ser mono o multicompartimentados, entre ellos se encuentra el modelo gástrico dinámico (DGM), el simulador gástrico humano, el modelo gastrointestinal TNO (TIM), sistema DIDGI®, SHIME®, etc. [163], [169]. Cada sistema tiene sus ventajas y desventajas, pero aún ninguno de ellos ha logrado imitar completamente los procesos generales que ocurren *in vivo*, particularmente el control hormonal y nervioso, los mecanismos de retroalimentación, la actividad de las células de la mucosa, la complejidad de los movimientos peristálticos y la participación del sistema inmunitario local.

Además de los modelos *in vitro*, existen cultivos de células como las monocapas celulares de Caco-2 utilizadas para estudios de absorción ya que desarrollan microvellosidades y uniones estrechas similares a las de los enterocitos del intestino delgado, los cultivos de células HT-29 de carcinoma de colon humano que cultivadas bajo determinadas condiciones son capaces de secretar mucina y formar una capa mucosa y se utilizan como un sistema para imitar la capa mucosa del intestino delgado, etc. Además, pueden realizarse estudios *in vivo*, principalmente en animales, pero ello conlleva elevados costos, mayor dificultad en los experimentos, instalaciones

adecuadas para su tratamiento y manipulación, y en la actualidad estos protocolos son cuestionados éticamente [163], [166].

6.1.4. Antecedentes de digestión *in vitro* de ovoalbúmina y sus agregados por tratamiento térmico

En la actualidad existen numerosos estudios de digestión gastrointestinal *in vitro* ya sea usando el protocolo consenso o no para evaluar la digestión de diferentes alimentos [170], la influencia de las interacciones entre los componentes de la matriz alimentaria sobre la digestión [171], [172] y la liberación de CBs de diferentes sistemas de encapsulación [173].

Existen estudios de digestión de OVA y de sus agregados. En la [Sección 1.9](#) se describió la formación de agregados de OVA de diferente morfología al calentar soluciones de OVA (20 g/L) a 80°C por 6 h a diferentes pH y fuerzas iónicas, obteniéndose agregados lineales, lineales ramificados, esféricos y esféricos aglomerados [43]. Al realizar la digestión *in vitro*, se observó que todos los agregados de OVA inducidos por calor fueron más susceptibles a la digestión por enzimas gastrointestinales en comparación con la OVA. Mas del 60% de OVA permaneció intacta luego de la digestión gástrica y del 37% después de la digestión intestinal. En cuanto a la digestión del agregado esférico aglomerado, luego de la digestión intestinal, solo se observó un 30% de monómeros de OVA mientras que para las otras morfologías la digestión fue total. Mediante el análisis SDS-PAGE se observó que, para todas las estructuras agregadas de OVA, los péptidos aparecieron muy temprano en la fase gástrica, mientras que para OVA se observaron muy pocos péptidos. Además, después de la digestión intestinal de OVA, se observaron una serie de péptidos relativamente grandes (14-30 kDa). En contraste, los agregados lineales, lineales ramificados y esféricos parecían estar ampliamente digeridos observándose un número creciente de péptidos pequeños. Se observó una proteólisis limitada para los agregados esféricos aglomerados con un número considerable de polipéptidos relativamente grandes (10-30 kDa) al final del período de digestión. Los autores sugirieron que la modificación estructural (desnaturalización y agregación) inducida por el tratamiento térmico de OVA, aumentó la accesibilidad de los sitios de clivaje de las enzimas digestivas [43].

En otro trabajo, se observó que la OVA fue muy resistente a la acción de la pepsina a valores de pH iguales o superiores a 2,0. En estas condiciones, la proteína intacta y su principal producto de degradación, un fragmento de 40 kDa resultante de

la escisión del extremo N-terminal, persistió durante al menos 2 h de digestión; también se observó un fragmento de 10 kDa. A este pH la proteína adopta una conformación muy estable, desprovista de interacciones de estructura terciaria, resistiendo la acción de la pepsina [174]. Posteriormente, se sometió a una digestión con tripsina y quimotripsina, en la que los autores hallaron que tanto la OVA intacta como su fragmento de 40 kDa resistieron la hidrólisis durante al menos 60 min [174].

De manera similar, en otro estudio, la digestión gástrica *in vitro* de OVA condujo a un patrón de SDS-PAGE con dos fragmentos de hidrólisis de 40 y 4 kDa. Las muestras obtenidas después de 60 min de digestión gástrica *in vitro* con pepsina se sometieron a digestión duodenal, en este caso, la banda de OVA nativa disminuyó rápidamente, mientras que el fragmento de 40 kDa persistió durante al menos 60 min. Cuando OVA se calentó a 90°C durante 15 min fue mucho más propensa a la degradación. Los productos de PM de alrededor de 4 kDa detectados después de la digestión gástrica desaparecieron por completo durante la digestión duodenal *in vitro* [175].

En otro trabajo se utilizó clara de huevo que posee OVA, ovotransferrina y lisozima sin calentar y calentada a 60 y 80°C por 10 min. Al realizar la digestión con pepsina a pH 1,5 se observó una banda débil a 40 kDa que se derivaba casi exclusivamente de OVA. Además, aparecieron otras bandas en 27, 17, 14 y 12 kDa atribuidas a la digestión de OVA. El tratamiento térmico a 60°C no mostró casi ningún efecto sobre la susceptibilidad de la ovotransferrina, la OVA y la lisozima a la pepsinólisis. Pero el calentamiento a 80°C aumentó significativamente la susceptibilidad de OVA a la digestión enzimática, no hallándose bandas luego de la digestión. El calentamiento intenso dio como resultado un aumento de la digestibilidad de las proteínas de la clara del huevo, incluida la OVA, pudiendo deberse a cambios estructurales de la proteína inducidos por calor exponiendo más sitios de clivaje previamente inaccesibles a las enzimas digestivas [176].

Además de los trabajos mencionados, existen muchos más que tratan la digestión de OVA y de otras proteínas [177], [178] pero la comparación de resultados es compleja dado que cada uno de ellos sigue un protocolo diferente (ya sea en el pH usado, el tiempo de digestión, la cantidad de enzima usada, los medios en que se realiza la reacción, entre otros factores). Hasta el presente, no se encontraron estudios de OVA ni de sus nanopartículas con el protocolo consenso publicado por Minekus y col. (2014) [168].

6.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

Objetivo 1: Estudiar el comportamiento de los nanocomplejos de inclusión entre OVA y sus nanopartículas derivadas con CLA bajo el pH del TGI (3,0 y 7,0).

Objetivo 2: Estudiar el comportamiento de los nanocomplejos sometidos al protocolo de digestión gastrointestinal estático *in vitro* consenso.

Objetivo 3: Evaluar la liberación de CLA a partir de los nanocomplejos de inclusión bajo condiciones de digestión gastrointestinal.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1. Materiales

La ovoalbúmina (OVA) y el ácido linoleico conjugado (CLA) fueron descritos en capítulos anteriores. La pepsina de la mucosa gástrica porcina (P7000), la pancreatina del páncreas porcino (P7545), el extracto de bilis porcino (B8631), la hemoglobina (H2500), el clorhidrato de éster metílico de N α -p-Tosyl-L-arginina (TAME, T4626) y el inhibidor de proteasas (P2714) se adquirieron de Sigma (EE.UU.). Estos materiales se almacenaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los reactivos analíticos adicionales fueron suministrados por Cicarelli (Argentina) o Merck.

6.3.2. Formación de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado

6.3.2.1. Obtención de nanopartículas de OVA

Las nanopartículas utilizadas en este capítulo son las mismas que las descritas en el Capítulo 3 (OVA_{n1} y OVA_{n2}). Brevemente, se preparó una solución de OVA en NaCl 50 mM, y los valores de pH se ajustaron a 11,4 y 7,5 utilizando NaOH 1M. Estas soluciones de proteínas se hidrataron durante la noche a 4°C. En caso de ser necesario, el pH se reajustó utilizando NaOH 0,1M al día siguiente. Luego, se dispersaron alícuotas de 2 mL en tubos de vidrio, y se calentaron en un baño de agua a 85°C durante 5 min. Posteriormente, se retiraron los tubos y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Los tubos que contenían las nanopartículas de OVA se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis. La nanopartícula 1 de OVA (OVA_{n1}) se preparó a 30 g/L y a pH 11,4. Para la nanopartícula 2 de OVA (OVA_{n2}), se usó una solución de 10 g/L y el pH se ajustó a 7,5 [20].

6.3.2.2. Obtención de nanocomplejos proteína-CLA

La obtención de los nanocomplejos de inclusión entre las nanopartículas de OVA y el CLA se realizó de la misma manera que en el Capítulo 3. Brevemente, las soluciones de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} en buffer fosfato pH 7,0 50 mM se mezclaron con una solución etanólica de CLA 0,1 M en condiciones de saturación de los sitios de unión de la proteína. Para alcanzar el equilibrio se dejaron en oscuridad durante 2 h y se utilizaron de inmediato.

6.3.3. Diseño de experimentos

En primer lugar, se evaluó el efecto del pH estomacal e intestinal (3,0 y 7,0 respectivamente) sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de OVA, sus nanopartículas y los nanocomplejos con CLA. Para esto, se prepararon los diferentes sistemas a pH 7,0 y luego el pH se redujo a 3,0 usando HCl 1/0,1 M.

En segundo lugar, tanto los sistemas proteicos puros como los nanocomplejos de inclusión se evaluaron mediante un ensayo de digestión gastrointestinal *in vitro* simulado que consta de una fase gástrica y una fase intestinal [168]. Este ensayo se dividió en dos experimentos: i) fluido gástrico simulado (FGS) sin enzimas y fluido intestinal simulado (FIS) sin enzimas y ii) FGS + enzimas y FIS + enzimas. El objetivo de este ensayo fue estudiar la influencia del pH y la composición salina de los fluidos simulados en los aspectos macroscópicos y en la retención de CLA de los nanocomplejos

6.3.4. Caracterización fisicoquímica y estructural de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado

6.3.4.1. Distribución de tamaño y potencial ζ

La PSD y el potencial ζ para los sistemas proteicos puros y los nanocomplejos de inclusión se determinaron mediante DLS a 25°C, utilizando un Zeta-Sizer (Nano-ZS 90, Malvern Instruments Ltd, Reino Unido) como se describió en los Capítulos anteriores.

6.3.4.2. Microscopía confocal láser de barrido

La CLSM se basa en el análisis de la fluorescencia emitida por una muestra después de la irradiación con un rayo láser (Fig. 43). Parte de la luz procedente de la

fuentes de iluminación atraviesan un primer filtro o diafragma, es reflejada mediante un espejo dicróico y se enfoca en un punto de la muestra mediante la lente de un objetivo. La señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) retorna por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicróico y es enfocada en un detector, un segundo diafragma o *pinhole* es colocado delante del detector para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco. El principio del funcionamiento del microscopio confocal se basa en la existencia de dos diafragmas, uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector. Ambos diafragmas deben estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal. La luz reflejada o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. La mayoría de los sistemas cuentan con varios fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger en cada uno de ellos diferentes λ [179], [180].

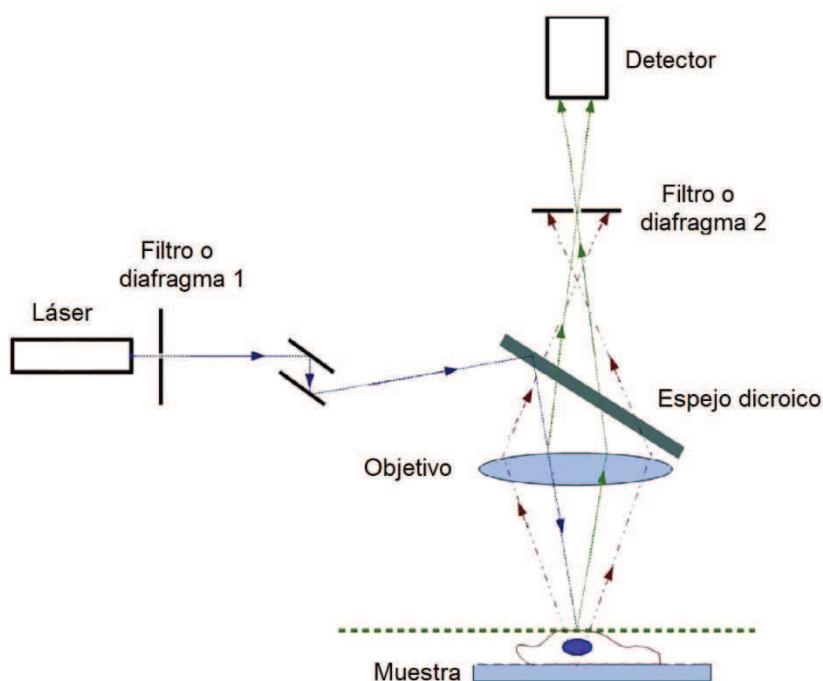


Figura 43. Principales componentes de CLSM (Figura modificada de Canette y Briandet, 2014 [179]).

En el presente trabajo se utilizó rodamina B para teñir los nanocomplejos de inclusión proteína-CLA. Para este propósito, se preparó una solución de rodamina B (0,2 %p/v) y se mezcló con las soluciones de los nanocomplejos a pH 7,0. Estas muestras se transfirieron a un portaobjetos para microscopio y se cubrieron con un cubreobjetos. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio invertido (Leica TCS

SP8, Alemania). El objetivo utilizado fue 63x/NA1,2 lente de inmersión en agua. La λ_{ex} para la rodamina B fue de 514 nm. Para el procesamiento de imágenes, se aplicó el software Fiji [181].

6.3.4.3. Determinación de la eficiencia de encapsulación.

Para cuantificar la cantidad de CLA no unido a la proteína (CLA libre), se realizó un paso de precipitación de OVA o sus nanopartículas derivadas (con el CLA unido) ajustando el pH a 4,8 (pl de OVA) utilizando HCl 1M [182]. Luego, se aplicó una etapa de centrifugación a 10.000 g durante 20 min. Para extraer el CLA libre, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos falcon limpios y se mezclaron durante 1 min con 1 mL de hexano en vórtex. Luego, se aplicó una etapa de centrifugación a 10.000 g durante 15 min, y se evaporaron 0,5 mL de fase hexano bajo una corriente de N_2 . Se añadió metanol, y las soluciones resultantes se inyectaron en un cromatógrafo modelo Prominence Serie 20A (Shimadzu, Japón) equipado con un inyector manual modelo 7725i (Rheodyne, EE.UU.) y un detector de matriz de fotodiodos modelo SPD-M20A (Shimadzu, Japón). El contenido de CLA se cuantificó por RP-HPLC, utilizando una columna Symmetry300™ AC18 (ODS) (Waters Corp., EE.UU.) de 250 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, 5 μ m de tamaño de partícula y 30 nm de tamaño de poro. Las condiciones experimentales de RP-HPLC se definieron de acuerdo a Sponton y col. (2018) [117]; Li y col. (2001) [183] y Murru y col. (2003) [184]. La separación se realizó mediante un gradiente lineal de 30% de agua/70% de acetonitrilo (fase A) a 100% de acetonitrilo (fase B) durante 15 min. Posteriormente, se mantuvo un 100% de acetonitrilo durante 5 min. Se añadió solución de ácido acético (0,12% v/v) a ambas fases móviles, para ajustar el pH y prevenir el efecto secundario de intercambio iónico. El caudal de solvente fue de 1 mL/min. La detección de CLA se realizó a una λ de 234 nm debido a la absorción del enlace dieno conjugado [185]. Se realizó una curva de calibrado usando CLA en solución de metanol (0-150 mg/L). A partir de la curva de calibrado, se obtuvieron las concentraciones de CLA libre y se calculó la eficiencia de encapsulación de CLA en los nanocomplejos (EE_{CLA}) como la relación entre la cantidad encapsulada de CLA (en las nanopartículas) y la cantidad total de CLA.

$$EE_{CLA} = \frac{CLA_T - CLA_f}{CLA_T} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 7})$$

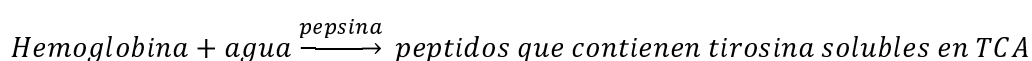
donde CLA_T es la cantidad utilizada de CLA para la formación de los nanocomplejos, y CLA_f es la cantidad de CLA libre en la fase acuosa luego de la encapsulación.

6.3.5. Digestión gastrointestinal *in vitro* de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado y su caracterización

6.3.5.1. Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas fueron determinadas según lo recomendado por Minekus y col. (2014) [168] en el material suplementario correspondiente.

(i) **Pepsina gástrica:** La actividad de la pepsina de la mucosa gástrica porcina se determinó según lo descrito por Anson y Mirsky (1932) [186] y Anson (1938) [187]. El ensayo para determinar la actividad de dicha enzima se basa en la siguiente reacción,



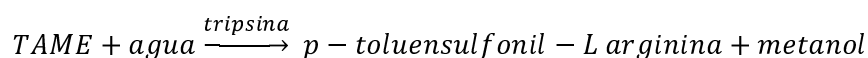
según la cual una unidad de enzima produce una variación de ABS a 280 nm de 0,001 por min a pH 2,0 y 37°C, medido como productos solubles en ácido tricloroacético (TCA). Para realizar el ensayo se utilizó como sustrato enzimático hemoglobina 2% p/v a pH 2,0. Se preparó una solución stock de pepsina (1 mg/mL) disolviendo el polvo en NaCl 150 mM-Tris 10 mM ajustado a pH 6,5 justo antes del ensayo y se la mantuvo a 4°C. Antes del ensayo se preparó un rango de 5 a 10 concentraciones de pepsina en HCl 10 mM.

Para realizar el ensayo, se seteó el espectrofotómetro en 280 nm y 20°C utilizando para ello un baño con recirculación de agua. Por otro lado, se pipetearon 1.000 µL de hemoglobina en un tubo Eppendorf y se incubó en estufa a 37°C por 3-4 min para obtener una temperatura homogénea en el sustrato. Se adicionaron 200 µL de la solución de pepsina para cada concentración a ser testeada y se incubó 10 min a 37°C de manera de que se produzca la reacción enzimática. Para detener la reacción se agregaron 2 mL de TCA 5% p/v en cada tubo. Se centrifugó para obtener una solución clara (6.000 g por 30 min). La fase acuosa fue traspasada a un eppendorf nuevo y se estabilizó a 20°C. Finalmente se midió la ABS a 280 nm de la fase acuosa. Se realizó un blanco del ensayo usando el mismo procedimiento, pero agregando la pepsina a las diferentes concentraciones usadas luego del TCA. El cálculo de la actividad enzimática se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad Enzimatica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{(ABS_{280} - ABS_{280\text{blanco}})}{t * C} \times 1000 \quad \text{Ecuación 8}$$

donde t es el tiempo de la reacción, C es la concentración de pepsina en la cubeta (mg/mL) y ABS₂₈₀ y ABS_{280blanco} corresponden a la ABS a 280 nm de las diferentes concentraciones de enzima y blanco respectivamente. Es necesario obtener la misma actividad enzimática para las diferentes concentraciones ensayadas.

(ii) **Actividad Tripsina de la pancreatina:** La actividad tripsina de pancreatina del páncreas porcino se midió según [Hummel \(1959\) \[188\]](#). El ensayo para determinar la actividad tripsina de dicha enzima se basa en la siguiente reacción,



según la cual una unidad de enzima hidroliza 1 μmol de p-toluensulfonyl-L-arginina metil éster (TAME) por min a 25°C y pH 8,1. Para realizar el ensayo se preparó el sustrato de la enzima TAME 10 mM y el buffer de reacción que consistió en buffer Tris/HCl 46 mM conteniendo CaCl_2 11,5 mM. Se ajustó el pH a 8,1 a 25°C. Se preparó una solución stock de enzima (1 mg/mL) disolviendo la pancreatina en HCl 1mM. Antes de realizar el ensayo se prepararon al menos dos concentraciones en HCl 1 mM y se la mantuvo a 4°C.

Para realizar el ensayo, se seteó el espectrofotómetro en 247 nm y 25°C para lo cual se utilizó un baño con recirculación de agua. Se pipeteó directamente en la cubeta de cuarzo de medición 2,6 mL del buffer de reacción y 0,3 mL de TAME. Se mezcló por inversión y se incubó a 25°C por 3-4 min de manera de obtener una temperatura homogénea en la solución. Seguidamente, se adicionaron 100 μL de tripsina a cada concentración a testear y se homogeneizó suavemente. Inmediatamente después, se comenzó a medir la ABS a 247 nm durante 10 min (durante el análisis de datos se determina la pendiente en la parte lineal de la curva, unidades de ABS/min). Se realizó un blanco para el ensayo aplicando el mismo protocolo sin agregar enzima y midiendo la ABS a 247 nm por 10 min (para el blanco la pendiente debe ser cercana a cero). La actividad tripsina de la pancreatina se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{(ABS_{247} - ABS_{247\text{blanco}})}{540 * X} \times 1000 \times 3 \quad \text{Ecuación 9}$$

donde ABS_{247} corresponde a la pendiente de la parte lineal (unidades de ABS/min) para la enzima, $ABS_{247\text{blanco}}$ es la pendiente de la parte lineal (unidades de ABS/min) para el blanco, el factor 3 corresponde a los mL de la mezcla de reacción, 540 es el coeficiente de extinción molar del TAME ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y X son los mg de pancreatina en la mezcla de reacción.

Una vez determinada las actividades enzimáticas, las enzimas se usaron por un periodo máximo de 6 meses y luego la actividad se volvió a determinar. Esto se debe a que las enzimas pueden ir perdiendo actividad durante el almacenamiento. Las actividades halladas se describen en el [Apéndice, Sección 9.3](#). Las actividades halladas fueron usadas para calcular la cantidad de enzima a agregar en el proceso digestivo según lo establecido en el protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* utilizado en la presente tesis y descripto a continuación [\[168\]](#).

6.3.5.2. Digestión gastrointestinal *in vitro*: método estático consenso

Se llevó a cabo una simulación del proceso gastrointestinal, que consistió en una fase gástrica y una fase intestinal *in vitro*, basadas en un método consenso internacional [168]. El mismo consta de una fase oral, una gástrica y una intestinal, donde el alimento es sometido a un fluido salival simulado (FSS), FGS y FIS, los cuales consisten en una mezcla de electrolitos, enzimas, CaCl_2 , sal biliar para el FIS y agua. En el presente trabajo la fase oral no se realizó, dado que los líquidos poseen un tiempo de residencia muy corto en la cavidad bucal y, por lo tanto, este paso puede eliminarse [168].

(i) Fase gástrica

Durante esta fase el alimento es digerido e hidrolizado en el estómago por la acción de enzimas, HCl y movimientos peristálticos. En primer lugar, 5 partes del alimento líquido (equivalente al bolo alimenticio) se mezclaron con 4 partes de la solución stock de electrolitos de FGS 1,25X (Tabla 7), para obtener una relación final alimento:FGS de 50:50 v/v. Luego, se adicionó el CaCl_2 (0,3 M) para alcanzar una concentración final de 0,075 mM. Posteriormente, se ajustó el pH a 3,0 utilizando HCl 1/0,1 M. La pepsina porcina se adicionó a continuación para obtener una actividad de 2.000 U/mL en la mezcla de reacción final y, finalmente, se adicionó la cantidad adecuada de agua para la correcta dilución del FGS. Se chequeó el pH y se corrigió de ser necesario. Se procedió inmediatamente a colocar los tubos en las condiciones de digestión: 2 h a 37°C con agitación. La agitación se realizó colocando el agitador (Agitador Rotativo Múltiple RS-24, BOECO) dentro de una estufa a 37°C a una velocidad de rotación orbital de 60 rpm.

Tabla 7. Volumen de cada solución electrolito necesario para preparar 400 mL de FGS 1,25X.

Solución	Concentración Stock		Volumen Stock (mL)	Concentración en el FGS (mmol/l)
	g/L	mol/l		
KCl	37,3	0,5	6,9	6,9
KH_2PO_4	68	0,5	0,9	0,9
NaHCO_3	84	1	12,5	25
NaCl	117	2	11,8	47,2
$\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$	30,5	0,15	0,4	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	48	0,5	0,5	0,5

(ii) Fase intestinal

En el intestino delgado se produce la degradación de proteínas, grasas y carbohidratos de manera de que puedan ser absorbidos por el organismo. Para ello, 5 partes del quimo gástrico provenientes de la etapa anterior se mezclaron con 4 partes

de la solución stock de electrolitos de FIS 1,25X (Tabla 8), para obtener una relación final quimo gástrico:FIS de 50:50 v/v. Luego, se adicionó la sal biliar para obtener una concentración de 10 mM y el CaCl₂ (0,3M) para alcanzar una concentración de 0,3 mM en la mezcla de reacción final. Posteriormente, se adicionó la cantidad necesaria de NaOH 1/0,1 M para neutralizar la mezcla a pH 7,0. A continuación se agregó la pancreatina porcina disuelta en la solución stock de FIS 1,25X; la cantidad se basó en la actividad tripsina que fue 100 U/mL en la mezcla final de reacción. Finalmente, se agregó la cantidad adecuada de agua para la correcta dilución del FIS. Se chequeó el pH y se corrigió de ser necesario. Inmediatamente, los tubos fueron sometidos a las condiciones de digestión intestinal: 2 h a 37°C con agitación orbital (60 rpm).

Tabla 8. Volumen de cada solución electrolito necesario para preparar 400 mL de FIS 1,25X.

Solución	Concentración Stock		Volumen Stock (mL)	Concentración en el FIS (mmol/L)
	g/L	mol/L		
KCl	37,3	0,5	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	0,8	0,8
NaHCO ₃	84	1	42,5	85
NaCl	117	2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	1,1	0,33

Una vez finalizada la digestión, la actividad enzimática se detuvo a fin de analizar los diferentes parámetros en las muestras. Para ello, se utilizó un inhibidor de proteasas en una concentración final de 2mM y las muestras fueron analizadas inmediatamente o almacenadas a 4°C hasta su análisis.

6.3.5.3. Retención de CLA en los nanocomplejos luego de la digestión gastrointestinal

Se tomaron muestras de la fase de digestión gástrica e intestinal *in vitro* para cuantificar la cantidad de CLA liberado a partir de los sistemas proteicos OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}. Para ello, se utilizaron los métodos de extracción y RP-HPLC descritos en la Sección 6.3.4.3. A partir de la curva de calibrado, se obtuvo la cantidad de CLA liberado en cada sistema luego de la digestión gástrica e intestinal. La cantidad de CLA que permaneció retenido (R_{CLA}) en OVA o en sus nanopartículas derivadas luego de la digestión se calculó mediante la Ecuación 10.

$$R_{CLA} = \frac{CLA_T - CLA_{liberado}}{CLA_T} \times 100\% \quad (\text{Ecuación 10})$$

donde CLA_T es la cantidad utilizada de CLA para la formación de los nanocomplejos de inclusión, y $CLA_{liberado}$ es la cantidad de CLA liberado en la fase acuosa luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

6.3.5.4. Medición de péptidos solubles liberados

Luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*, las soluciones se ajustaron a pH 4,8 para precipitar los nanocomplejos y, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min. La cantidad de péptidos solubles en el sobrenadante se midió a 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Visible (Jenway 7305, Reino Unido) [189]. Para este experimento, se utilizaron el FGS y el FIS como blancos.

6.3.5.5. Microscopía confocal láser de barrido

La rodamina B se utilizó para teñir los nanocomplejos previo al procedimiento de digestión gastrointestinal *in vitro* [190]. El experimento se realizó como se describió en la Sección 6.3.4.2. Las muestras fueron examinadas por CLSM luego de las fases gástrica e intestinal.

6.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó de la misma manera que en los Capítulos anteriores. Las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Caracterización fisicoquímica y estructural de los nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado

6.4.1.1. Distribución de tamaño y potencial ζ

El comportamiento coloidal de los nanocomplejos de inclusión bajo digestión gastrointestinal *in vitro* constituye un conocimiento esencial para formular nuevos alimentos funcionales [14], [191]. En este sentido, la digestión ocurre principalmente en el estómago (fase gástrica) a un pH promedio de 3,0 y en el intestino delgado (fase intestinal) a un pH promedio de 7,0. Por lo tanto, el efecto del pH (3,0 y 7,0) y la unión de CLA sobre el tamaño y las propiedades eléctricas de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} se presentan en la Fig. 44 y la Tabla 9.

La Fig. 44 muestra el perfil de PSDi para OVA y OVA-CLA a pH 7,0 (A) y a pH 3,0 (B); para OVA_{n1} y OVA_{n1}-CLA a pH 7,0 (C) y a pH 3,0 (D) y para OVA_{n2} y OVA_{n2}-CLA a pH 7,0 (E) y a pH 3,0 (F). Como puede deducirse de la Tabla 9, a pH 7,0, CLA forma estructuras supramoleculares con un d_H de 289 ± 3 nm (99,5% en volumen) y un potencial ζ de -57 ± 9 mV, indicando que forma suspensiones coloidales estables (discutido en la Sección 5.4.2.1). Sin embargo, a pH 3,0, hubo un aumento considerable en el d_H a 2.117 ± 201 nm. Esto podría explicarse considerando que el pH 3,0 está cerca del pK_a del grupo carboxílico (pK_a del grupo COOH $\sim 3,5$ [15]) del AG y, por lo tanto, la carga y las repulsiones electrostáticas podrían disminuir, permitiendo la formación de estructuras más grandes. Esta explicación está de acuerdo con el valor de potencial ζ encontrado de 0 ± 1 mV. Es importante mencionar que después de 24 h no se observó la formación de precipitado, lo que indica que las estructuras supramoleculares de CLA formadas a pH 7,0 y 3,0 son coloidalmente estables.

Tabla 9. Efecto de la complejación con CLA sobre el diámetro hidrodinámico (d_H , nm), volumen (%) y potencial ζ (mV) de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} en función del pH del medio acuoso. Condiciones: Concentración de proteínas: 23 μ M, concentración de CLA: 1 mM, temperatura: 25°C. El ANOVA para el d_H se realizó para cada sistema (por ejemplo, OVA y OVA-CLA a pH 7,0 y 3,0). El ANOVA para potencial ζ se hizo para todos los sistemas juntos. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Sistema	pH	d_H (nm)	Volumen (%)	potencial ζ (mV)
CLA	7	289 ± 3^a	$99,5 \pm 0,7$	-57 ± 9^a
	3	2117 ± 201^b	100	0 ± 1^e
OVA	7	12 ± 2^a 62 ± 3^c	$97,5 \pm 0,4$ $2,5 \pm 0,4$	-15 ± 2^d
	3	$10,3 \pm 0,4^a$ 58 ± 3^c	$97,15 \pm 0,07$ $2,85 \pm 0,07$	19 ± 1^h
OVA-CLA	7	93 ± 18^d 288 ± 8^f	44 ± 11 55 ± 11	-26 ± 2^b
	3	44 ± 4^b 207 ± 14^e	$23,4 \pm 0,1$ $74,9 \pm 0,4$	$10,0 \pm 0,5^f$
OVA _{n1}	7	$24,63 \pm 0,04^a$	100	$-15,9 \pm 0,1^d$
	3	$23,1 \pm 0,8^a$	100	$15,2 \pm 0,6^g$
OVA _{n1} -CLA	7	$28,79 \pm 0,05^b$ 224 ± 24^c	$99,8 \pm 0,07$ $0,2 \pm 0,07$	-28 ± 1^b
	3	231 ± 2^c	100	$26,2 \pm 1,5^i$
OVA _{n2}	7	$92,0 \pm 0,2^b$ 16 ± 2^a	$98,2 \pm 0,9$ $1,7 \pm 0,9$	-15 ± 2^d
	3	103 ± 1^b $21,22 \pm 2^a$	98 ± 2 2 ± 2	$14,7 \pm 0,3^g$
OVA _{n2} -CLA	7	237 ± 43^c 31 ± 20^a	83 ± 5 16 ± 5	$-19,4 \pm 0,3^c$
	3	Precipitación		$13,9 \pm 0,4^g$

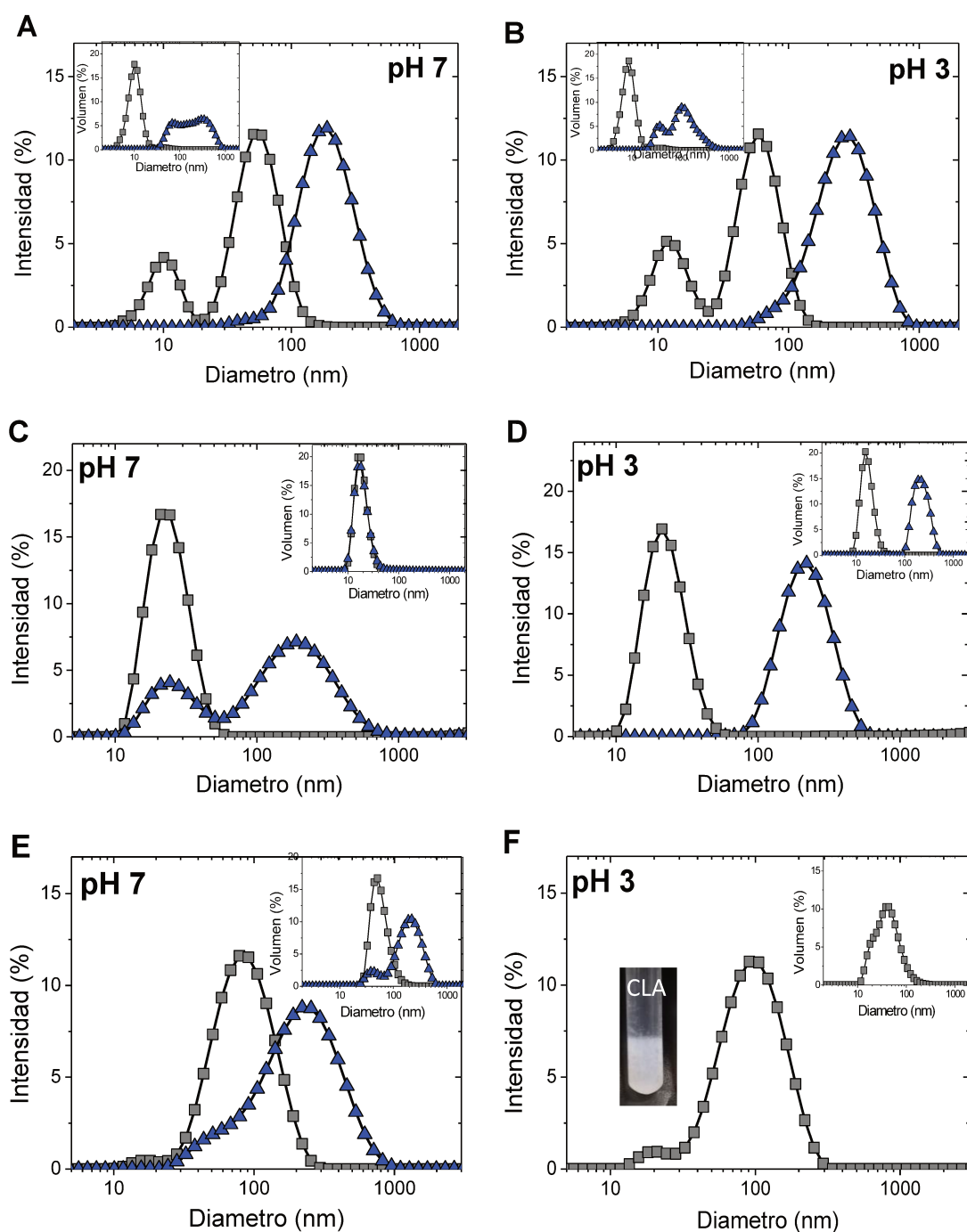


Figura 44. Distribución del tamaño de partícula (PSD) basada en el porcentaje de intensidad (%) para OVA (■), OVA-CLA (▲) a pH 7,0 (A) y pH 3,0 (B); OVA_{n1} (■), OVA_{n1}-CLA (▲) a pH 7,0 (C) y pH 3,0 (D) y OVA_{n2} (■), OVA_{n2}-CLA (▲) a pH 7,0 (E) y pH 3,0 (F, la fotografía del tubo muestra el aspecto del precipitado OVA_{n2}-CLA). Los gráficos insertados en cada distribución de intensidad corresponden a la distribución en volumen. Condiciones: concentración de proteína: 23 μ M, concentración de PUFA: 1 mM, temperatura: 25°C.

Las mediciones de DLS para OVA presentaron dos picos en el perfil de PSDi a pH 7,0 y 3,0 (Fig. 44); el primero correspondió a un d_H de 12 ± 2 nm (97.5%) y $10,3 \pm 0,4$ nm (97%), y el segundo a un d_H de 62 ± 3 nm (2.5%) y 58 ± 3 nm (3%), respectivamente. Kang y col. (2014) [98] informaron que no registraron cambios conformacionales en la

estructura secundaria y terciaria de OVA frente a cambios en el pH. Por lo tanto, en términos generales, podría concluirse que los primeros picos observados para ambos valores de pH (7,0 y 3,0) corresponderían al d_H de OVA y los segundos a trazas de proteína agregada (tal como fue discutido previamente en la [Sección 3.4.2.2](#)). A pH 7,0 los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA mostraron dos picos principales cuyos d_H fueron 93 ± 18 nm (44%) y 288 ± 8 nm (55%) ([Tabla 9](#); [Fig. 44a](#)). Por lo tanto, podría deducirse que el pico más pequeño corresponde a la formación de nanocomplejos de inclusión OVA-CLA y el más grande a las estructuras supramoleculares de CLA (formadas a partir del CLA no unido a la proteína). El potencial ζ para OVA fue de -15 ± 2 mV, pudiendo atribuirse a la carga negativa de los grupos carboxilo, mientras que la formación del nanocomplejo causó un aumento en la carga negativa siendo -26 ± 2 mV. Este aumento en la carga negativa podría explicarse por la formación del nanocomplejo. El potencial ζ puede modificarse mediante la adsorción de especies cargadas, como iones y surfactantes iónicos, sobre la superficie de las partículas [\[84\]](#). Las moléculas de CLA tienen una cadena alifática (cola apolar) en un extremo y un grupo carboxílico (cabeza polar) en el otro. Por lo tanto, si el CLA está unido a la OVA a través de interacciones hidrofóbicas por medio de su cadena alifática, la cabeza polar ionizada se orientaría hacia el exterior sobre la superficie de la proteína en contacto con el medio acuoso, lo que aumentaría la carga negativa de OVA al formarse el nanocomplejo. El perfil de PSD para los nanocomplejos OVA-CLA a pH 3,0, fue similar al observado a pH 7,0 mostrando dos picos: a 44 ± 4 nm (23%) y a 207 ± 14 nm (75%) ([Tabla 9](#); [Fig. 44b](#)). El potencial ζ para OVA a pH 3,0 fue de 19 ± 1 mV, debido a la presencia de grupos amonio en la proteína, mientras que para el nanocomplejo OVA-CLA fue de $10,0\pm 0,5$ mV. Esto podría explicarse considerando que el CLA tiene una carga ligeramente negativa y que al unirse a la OVA podría disminuir el potencial ζ del nanocomplejo formado.

Para OVA_{n1} a pH 7,0 el d_H fue de $24,63\pm 0,04$ nm (100%), mientras que para el nanocomplejo OVA_{n1} -CLA fueron registrados dos picos: a $28,79\pm 0,05$ nm (99.8%) y a 224 ± 24 (0.2%) nm ([Tabla 9](#), [Fig. 44c](#)). Como se puede observar, la unión de CLA produjo un aumento en el tamaño de OVA_{n1} ($p < 0,05$) y casi todo el volumen del sistema correspondería a la presencia de los nanocomplejos, siendo la cantidad de PUFA libre despreciable. El valor de potencial ζ para OVA_{n1} fue $-15,9\pm 0,1$ mV. La complejación entre OVA_{n1} y CLA produjo un aumento en la carga negativa siendo el nuevo valor de potencial ζ -28 ± 1 mV. A pH 3,0 el perfil de PSDi para OVA_{n1} mostró un d_H de $23,1\pm 0,8$ nm (100% en PSDv) y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con pH 7,0. Para el nanocomplejo OVA_{n1} -CLA, solo se detectó un pico cuyo

d_H fue 231 ± 2 nm (100%) (Tabla 9; Fig. 44d). Además, la solución del nanocomplejo OVA_{n1}-CLA presentó una ligera turbidez, que podría deberse a que el tamaño de los nanocomplejos es del orden de la λ de la luz [127]. La OVA_{n1} tuvo un valor de potencial ζ de $15,2 \pm 0,6$ mV, mientras que la formación del nanocomplejo OVA_{n1}-CLA produjo un aumento en el valor de potencial ζ a 26 ± 1 mV.

Para OVA_{n2} a pH 7,0, se registraron dos picos cuyos d_H fueron $92,0 \pm 0,2$ nm (98.2%) y 16 ± 2 nm (1,7%), siendo el primero representativo de la nanopartícula. Además, para el nanocomplejo OVA_{n2}-CLA, también aparecieron dos picos a 237 ± 43 nm (83%) y 31 ± 20 nm (16%) (Tabla 9; Fig. 44e). La unión de CLA produjo un aumento en el tamaño de OVA_{n2} que indicaría la formación del nanocomplejo. El valor del potencial ζ para esta nanopartícula fue -15 ± 2 mV, y para el nanocomplejo OVA_{n2}-CLA fue $-19,4 \pm 0,3$ mV. A pH 3,0 OVA_{n2} tuvo un d_H de 103 ± 1 nm (98%) (Tabla 9; Fig. 44f), y no se encontró una diferencia significativa con pH 7,0 ($p > 0,05$). Sin embargo, el d_H para el nanocomplejo de inclusión OVA_{n2}-CLA no se pudo determinar debido a la formación de un precipitado (Inserto en la Fig. 44f). Este fenómeno podría deberse a la formación de grandes agregados de nanocomplejos que precipitan como consecuencia de la fuerza gravitatoria. El valor de potencial ζ para el nanocomplejo OVA_{n2} y OVA_{n2}-CLA fue de $14,7 \pm 0,3$ mV y $13,9 \pm 0,4$ mV, respectivamente, lo que indicó que a pH 3,0 no hubo influencia en los valores de potencial ζ ($p > 0,05$).

En resumen, los valores de potencial ζ no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para OVA y sus nanopartículas derivadas a pH 7,0, y fueron similares a pH 3,0 lo que sugiere que el tratamiento térmico tuvo poca influencia en la carga neta de la proteína. De la misma manera, no hubo diferencias significativas entre los tamaños de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}, a pH 3,0 y 7,0. Por otro lado, el aumento en el tamaño de partícula para todos los nanocomplejos con CLA indicó la formación de nanocomplejos de inclusión proteína-CLA.

6.4.1.2. Microscopía confocal láser de barrido

La Fig. 45 muestra las micrografías de CLSM para los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA (Fig. 45a), OVA_{n1}-CLA (Fig. 45b) y OVA_{n2}-CLA (Fig. 45c) teñidos con rodamina B. Para los tres nanocomplejos, se observó una forma circular y tamaños en concordancia con los reportados en la Sección 6.4.1.1. En primer lugar, para el nanocomplejo OVA-CLA (Fig. 45a) se observó una única población de tamaño muy pequeño. Para ambas nanopartículas, se pudieron observar dos poblaciones: una correspondiente a un tamaño alrededor de 30 nm para el nanocomplejo OVA_{n1}-CLA

(Fig. 45b) o alrededor de 90 nm para el nanocomplejo OVA_{n2}-CLA (Fig. 45c), y otra población de menor tamaño que podría corresponder a una fracción de OVA no agregada. Las imágenes de CLSM indicaron que OVA y sus nanopartículas derivadas se distribuyeron uniformemente a través de la solución de la muestra, es decir, no se evidenció la existencia de un fenómeno de agregación de partículas (Fig. 45).

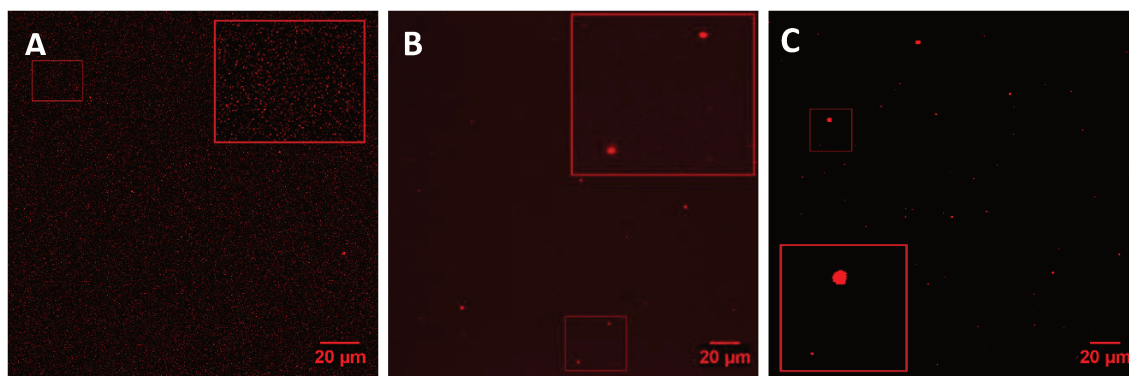


Figura 45. Imágenes de CLSM de OVA-CLA (A), OVA_{n1}-CLA (B) y OVA_{n2}-CLA (C) teñidas con rodamina B. El recuadro muestra un zoom X3. El objetivo utilizado fue de 63x.

6.4.1.3. Eficiencia de encapsulación

La EE o porcentaje de CLA encapsulado (EE_{CLA}) en los sistemas proteicos puros OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} se muestra en la Fig. 46. Ambas nanopartículas tuvieron una EE_{CLA} más alta ($p < 0,05$) que la observada para OVA (93% para OVA_{n1} y 91% para OVA_{n2} frente a 75% para OVA). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores de EE_{CLA} entre ambas nanopartículas ($p > 0,05$). Se podría deducir que el tamaño de partícula no tuvo influencia en el porcentaje de CLA encapsulado. Sin embargo, el tratamiento térmico y la formación de nanopartículas generó una EE_{CLA} mayor que para la proteína nativa; la mayor hidrofobicidad superficial hallada en las nanopartículas por los ensayos de fluorescencia extrínseca (Sección 5.4.1.4) podría ser responsable de esta mayor encapsulación. En este sentido, un estudio de producción de nanopartículas de OVA a diferentes pH encontró que cuanto mayor era el pH de producción de la nanopartícula, mayor era la relación hidrofobicidad superficial/área y mayor era el número de moléculas de LA unidas a la nanopartícula [192]. Si bien la diferencia entre nanopartículas no fue significativa, OVA_{n1} posee un porcentaje levemente mayor de EE_{CLA} que OVA_{n2} (93% vs. 91%), lo que concuerda con el valor de n hallado en la Sección 5.4.2.3 que es levemente superior para OVA_{n1} (50 vs. 49).

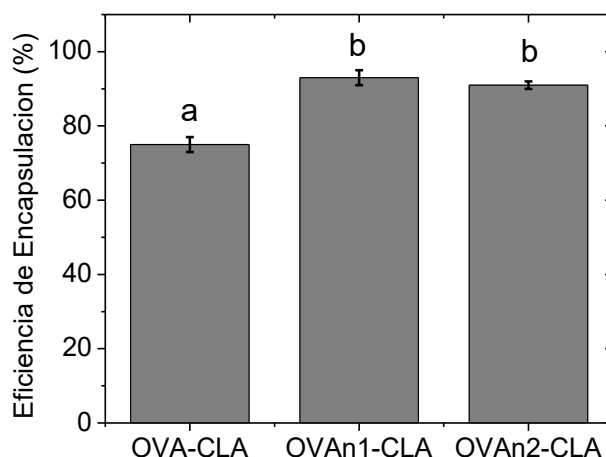


Figura 46. Eficiencia de encapsulación de CLA (EE_{CLA} , %) para OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}, expresada como porcentaje. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

6.4.2. Digestión gastrointestinal *in vitro* de nanocomplejos proteína-ácido linoleico conjugado y su caracterización

6.4.2.1. Apariencia macroscópica

La Fig. 47 muestra la apariencia macroscópica de los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA bajo digestión gastrointestinal *in vitro*. En primer lugar, los nanocomplejos fueron analizados en fase gástrica e intestinal, pero solo con FGS (sin pepsina) y FIS (sin pancreatina y sales biliares) durante 2 h a 37°C bajo agitación orbital a los pH correspondientes (3,0 y 7,0 respectivamente). El objetivo de este ensayo fue estudiar la influencia del pH y la composición salina de los fluidos simulados en los aspectos macroscópicos y en la retención de CLA de los nanocomplejos. Como se observa, todos presentaron turbidez y presencia de pequeñas partículas en el FGS y en el FIS. Para entender lo que sucedió, es necesario analizar las variables del protocolo de digestión *in vitro*, como la agitación, la temperatura y la presencia de sales. Todas las soluciones se sometieron a agitación orbital a 60 rpm, calor a 37°C y adición de sales (como CaCl₂) durante 2 h. Se sabe que las proteínas se desnaturalizan y se agregan mediante agitación, y la OVA es sensible a la misma [193], [194], [195]. Además, hay evidencia de que la presencia de iones Ca²⁺ (como CaCl₂) acelera la agregación de las proteínas en general [196], [197] y de OVA en particular [198]. Cheng y col. (2019) [172] estudiaron la digestión de nanopartículas de zeína y observaron que si la digestión se realizó sin sales y con pepsina, las nanopartículas se digirieron, pero en presencia de sales esto no ocurrió y se observó la formación de precipitado. Esto indicó que los iones aumentaron la agregación de las nanopartículas de zeína y limitaron la acción enzimática. Los

autores atribuyeron esto a que los iones agregados aumentarían la cantidad de proteína no dispersa y la tendencia de las mismas a autoensamblarse en estructuras más grandes que precipitan [172]. Aunque para la mayoría de las proteínas usadas en estos ensayos, las condiciones utilizadas fueron más extremas que las utilizadas en el protocolo de digestión *in vitro*, en este ensayo se aplicó la combinación de todos los factores durante un período prolongado. Esta combinación podría explicar la apariencia macroscópica de los agregados en los sistemas, cuando se sometieron al FGS. En el FIS, se evidenciaron pequeñas partículas en suspensión y menos turbidez, lo que podría sugerir que los agregados formados en condiciones gástricas permanecieron intactos en el intestino. Cabe mencionar que todos los sistemas precipitaron luego de unas pocas horas de reposo.















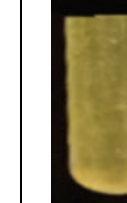
	Sin Enzimas		Con Enzimas		Con sal biliar
	FGS	FIS	FGS + Pepsina	FIS + Pancreatina	FIS + Pancreatina+ Sal Biliar
OVA-CLA					
OVA_{n1}-CLA					
OVA_{n2}-CLA					

Figura 47. Fotografías de la apariencia macroscópica de OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA cuando se someten a digestión gastrointestinal *in vitro*.

Posteriormente, los nanocomplejos de inclusión se sometieron a digestión *in vitro* con enzimas. Al FGS, se le añadió pepsina a 2.000 U/mL de actividad final, y al FIS, se le añadió pancreatina a 100 U/mL de actividad final [168]. Al mismo tiempo, para completar el modelo *in vitro*, se sometieron a una fase intestinal en presencia de pancreatina y sales biliares. Al igual que lo ocurrido anteriormente, todos los nanocomplejos mostraron turbidez y pequeñas partículas en suspensión, tanto en la

fase gástrica como en la intestinal. Los tamaños de partícula no se pudieron determinar debido a la presencia de precipitado. La presencia de enzimas parece no tener influencia en el aspecto macroscópico.

En los sistemas de pepsina + FGS, la presencia de partículas en suspensión podría indicar que los agregados formados en las condiciones analizadas anteriormente no fueron hidrolizados por la pepsina, o si se hidrolizaran, los péptidos resultantes podrían agregarse debido a las condiciones gástricas. [Martos y col. \(2010\) \[174\]](#) estudiaron la digestión de OVA y descubrieron que era muy resistente a la acción de la pepsina a valores de pH alrededor de 2,0 debido a que la OVA adopta un estado *molten globe* que mantiene un alto grado de estabilidad conformacional y resiste la acción de la pepsina. Por otro lado, el grado de hidrólisis enzimática depende de las condiciones de calentamiento utilizadas durante la formación de las nanopartículas y de su morfología, ya que esto podría hacer que los sitios de clivaje de las enzimas estuvieran más o menos expuestos a la pepsina [\[43\]](#), [\[199\]](#). Por otro lado, la agregación podría proteger a las nanopartículas de OVA de la escisión enzimática. En este sentido, [Castillo-Santaella y col. \(2016\) \[199\]](#) encontraron que cuando la HSA se entrecruza con glutaraldehído, la formación de grandes agregados hace que el sistema sea muy resistente a la acción de la pepsina. La pepsina es una enzima soluble en agua y su actividad es limitada si los sustratos peptídicos no están bien dispersos en el medio [\[172\]](#).

Al realizar el ensayo con pancreatina + FIS, el nanocomplejo OVA_{n2}-CLA tuvo mayor turbidez y precipitó inmediatamente, mientras que las muestras OVA-CLA y OVA_{n1}-CLA requirieron más tiempo para precipitar. En presencia de sales biliares, el comportamiento fue el mismo, pero se observó un color amarillo (propio de las sales biliares). [Nyemb y col. \(2014\) \[43\]](#) informaron que solo el 37% de OVA resistía la digestión con pancreatina, y que solo el 30% de los agregados esféricos de OVA resistían la digestión intestinal. Se requerirían estudios complementarios para determinar si las nanopartículas permanecen intactas formando agregados o si se rompen en péptidos. En este sentido, [Chen y col. \(2015\) \[200\]](#), encontraron que las nanopartículas aisladas de proteína de soja cargadas con curcumina formaban agregados cuando se sometían a digestión gastrointestinal *in vitro*. En el FGS y el FIS, la agregación de las nanopartículas se atribuyó a la hidrólisis de las proteínas que podría promover la exposición de parches hidrofóbicos hacia la fase acuosa, o la liberación de péptidos hidrofóbicos capaces de promover la agregación.

6.4.2.2. Retención de CLA en los nanocomplejos luego de la digestión gastrointestinal

La retención de CLA (R_{CLA}) después de la digestión gastrointestinal *in vitro* se evaluó para los sistemas proteicos OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} (Tabla 10). Se observó que:

(i) En primer lugar, se calculó la R_{CLA} para los nanocomplejos sometidos a fase gástrica sin enzimas. Como se observa, no hubo diferencias significativas entre la R_{CLA} para OVA y para ambas nanopartículas de OVA ($p > 0,05$, letra e). Cuando se agregó pepsina, la R_{CLA} fue diferente para cada sistema ($p < 0,05$). La OVA fue la que menos CLA retuvo (65%), seguido de OVA_{n2} que retuvo 92,9% y el que más retuvo fue OVA_{n1} con 96%. Cabe destacar que los valores de R_{CLA} para OVA_{n1} y OVA_{n2} fueron muy superiores al de OVA. Al analizar los resultados en ausencia y presencia de enzima se observa que: (i) para OVA la adición de la pepsina generó una gran disminución de la cantidad de R_{CLA} pudiendo deberse esto a la hidrólisis de la proteína por la pepsina; (ii) Para OVA_{n1} no hubo diferencia ($p > 0,05$); (iii) para OVA_{n2} hubo una mayor liberación de CLA en presencia de la enzima, aunque la diferencia es pequeña (96% vs. 93%). Estos resultados fueron consistentes con la presencia de partículas dispersas, ya que, si las proteínas no se hidrolizaran, podrían retener la mayor parte de CLA encapsulado. Además, si se produjera hidrólisis, posiblemente los péptidos resultantes podrían conservar la capacidad de unirse a CLA [172]. En resumen, en presencia de pepsina OVA retuvo CLA en una proporción mucho menor en comparación con ambas nanopartículas ($p < 0,05$). Además, OVA_{n1} retuvo una cantidad ligeramente mayor de CLA que OVA_{n2} ($p < 0,05$) después de FGS.

(ii) Después de la fase gástrica, los sistemas se sometieron a una fase FIS sin enzimas para evaluar cómo influyó la condición intestinal en R_{CLA} . Como se observa en la Tabla 10, los valores fueron muy similares entre los tres nanocomplejos al someterlos al FIS sin enzimas. Además, estos valores no fueron diferentes a los obtenidos para FGS sin enzimas, la única diferencia se observó para OVA siendo ésta muy pequeña. Esto podría sugerir que los agregados de proteínas formados en condiciones gástricas permanecieron intactos después de las condiciones intestinales. Por otro lado, cuando se digirieron con pancreatina o pancreatina + sales biliares, no se encontraron diferencias estadísticas en R_{CLA} entre las muestras de OVA y OVA_{n1} ($p > 0,05$) con valores de alrededor del 98%. Sin embargo, la R_{CLA} para OVA_{n2} fue levemente inferior, alrededor de 97%. Los valores de R_{CLA} en fase intestinal fueron iguales o superiores en la mayoría de los casos en comparación con la fase gástrica. Este resultado podría explicarse suponiendo que los agregados formados en la fase gástrica a pH 3,0 podrían permanecer intactos, y la pancreatina en el intestino no

podría romperlos, o si la pancreatina los hidroliza, los péptidos resultantes podrían formar nuevos agregados con la capacidad de unir CLA y por ello los valores de R_{CLA} serían mayores. En este sentido Cheng y col. (2019) [172] llegan a la misma conclusión luego de analizar la digestión gastrointestinal de nanopartículas de zeína en presencia de sales o de sales + enzimas.

Tabla 10. Porcentaje retenido de CLA (R_{CLA}) en OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Gástrico: fila FGS: representa el R_{CLA} cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* sin enzimas. Gástrico: fila FGS + pepsina: representa el R_{CLA} cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* con pepsina. Intestino: fila FIS: representa el R_{CLA} cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* sin enzimas. Intestino: fila FIS + pancreatina: representa el R_{CLA} cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* con pancreatina. Intestino: fila FIS + pancreatina + sal biliar: representa el R_{CLA} cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* con pancreatina y sal biliar. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

	R_{CLA} (%)		
	OVA-CLA	OVA_{n1} -CLA	OVA_{n2} -CLA
Gástrico: FGS	96,6 \pm 0,3 ^{e,f}	96,1 \pm 0,7 ^{d,e}	96,1 \pm 0,7 ^{d,e}
Gástrico: FGS + pepsina	65 \pm 2 ^a	96,0 \pm 0,1 ^{d,e}	92,9 \pm 0,1 ^b
Intestino: FIS	95,0 \pm 0,3 ^c	96,1 \pm 0,7 ^{d,e}	95,3 \pm 0,7 ^{c,d}
Intestino: FIS + pancreatina	98,1 \pm 0,2 ^{g,h}	98,1 \pm 0,3 ^h	96,8 \pm 0,4 ^{e,f}
Intestino: FIS + pancreatina + sal biliar	98,4 \pm 0,3 ^h	97,8 \pm 0,2 ^{g,h}	97,2 \pm 0,7 ^{f,g}

6.4.2.3. Péptidos solubles liberados

Para confirmar los resultados anteriores, los péptidos liberados de las proteínas después de la digestión simulada se determinaron espectroscópicamente por medio de ABS a 280 nm (Fig. 48) [189]. En el FGS (con pepsina), la cantidad de péptidos liberados fue mayor que la registrada en el FIS (con pancreatina y sal biliar) para todos los nanocomplejos. OVA-CLA en el FGS liberó una mayor cantidad de péptidos que cuando el CLA estaba unido a ambas nanopartículas de OVA ($p < 0,05$). Estos resultados podrían explicarse considerando que la agregación de OVA y una mayor complejación con CLA promovieron la oclusión de los sitios de clivaje de la pepsina, por lo que se liberó una menor cantidad de péptidos en las nanopartículas respecto de OVA o bien, que los péptidos generados fueron capaces de interactuar entre sí formando agregados que precipitaron y no fueron cuantificados. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la cantidad de péptidos liberados para OVA o sus nanopartículas derivadas en el FIS ($p > 0,05$). Como es notorio, la cantidad de péptidos liberados en el FIS es inferior a los liberados en el FGS, esto podría indicar que las condiciones en el FIS hacen que los péptidos interactúen entre sí y probablemente se agreguen y precipiten.

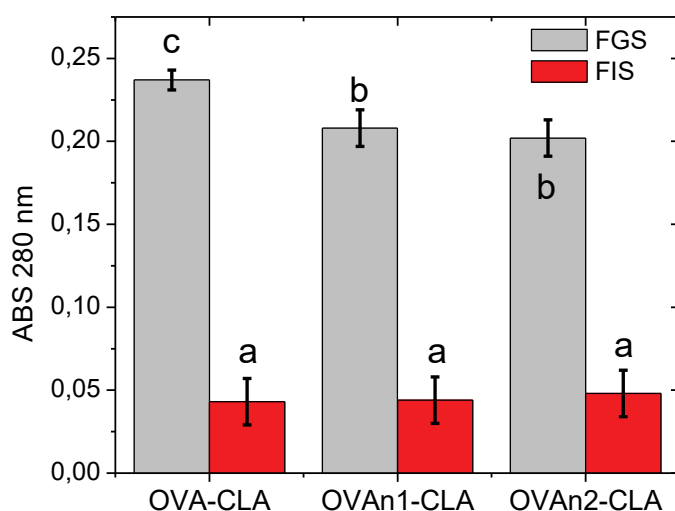


Figura 48. ABS a 280 nm como una medida de los péptidos liberados de OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA después de la digestión *in vitro* gástrica (■, pepsina) o intestinal (■, pancreatina y sal biliar). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

6.4.2.4. Microscopía confocal láser de barrido

Todos los nanocomplejos de inclusión se tiñeron con rodamina B y se analizaron por CLSM (Fig. 49). Las micrográficas para OVA-CLA en presencia de FGS + pepsina (Fig. 49a) mostraron grandes agregados amorfos y otras estructuras pequeñas y esféricas. En FIS + pancreatina (Fig. 49b), se pudieron observar agregados esféricos más grandes. Para los nanocomplejos OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA en FGS + pepsina (Fig. 49c y e, respectivamente) y en FIS + pancreatina (Fig. 49d y f, respectivamente), se observaron grandes agregados amorfos. Estos resultados están de acuerdo con la precipitación observada macroscópicamente (Fig. 47), la que podría ser promovida por los agregados observados. Por otro lado, se podría suponer que los agregados están formados por el ensamblaje de nanopartículas individuales. Esta observación podría confirmar que las nanopartículas se agregan en las condiciones del FGS a pH 3,0 y no se disuelven ni son atacadas por las enzimas. El CLA podría mantenerse fuertemente unido en las nanopartículas debido a la formación de estos grandes agregados. Como se mencionó anteriormente, se requerirían estudios complementarios para confirmar si las nanopartículas permanecieron intactas formando agregados o si se rompieron en péptidos que posteriormente se agregaron y conservaron su capacidad de unir CLA.

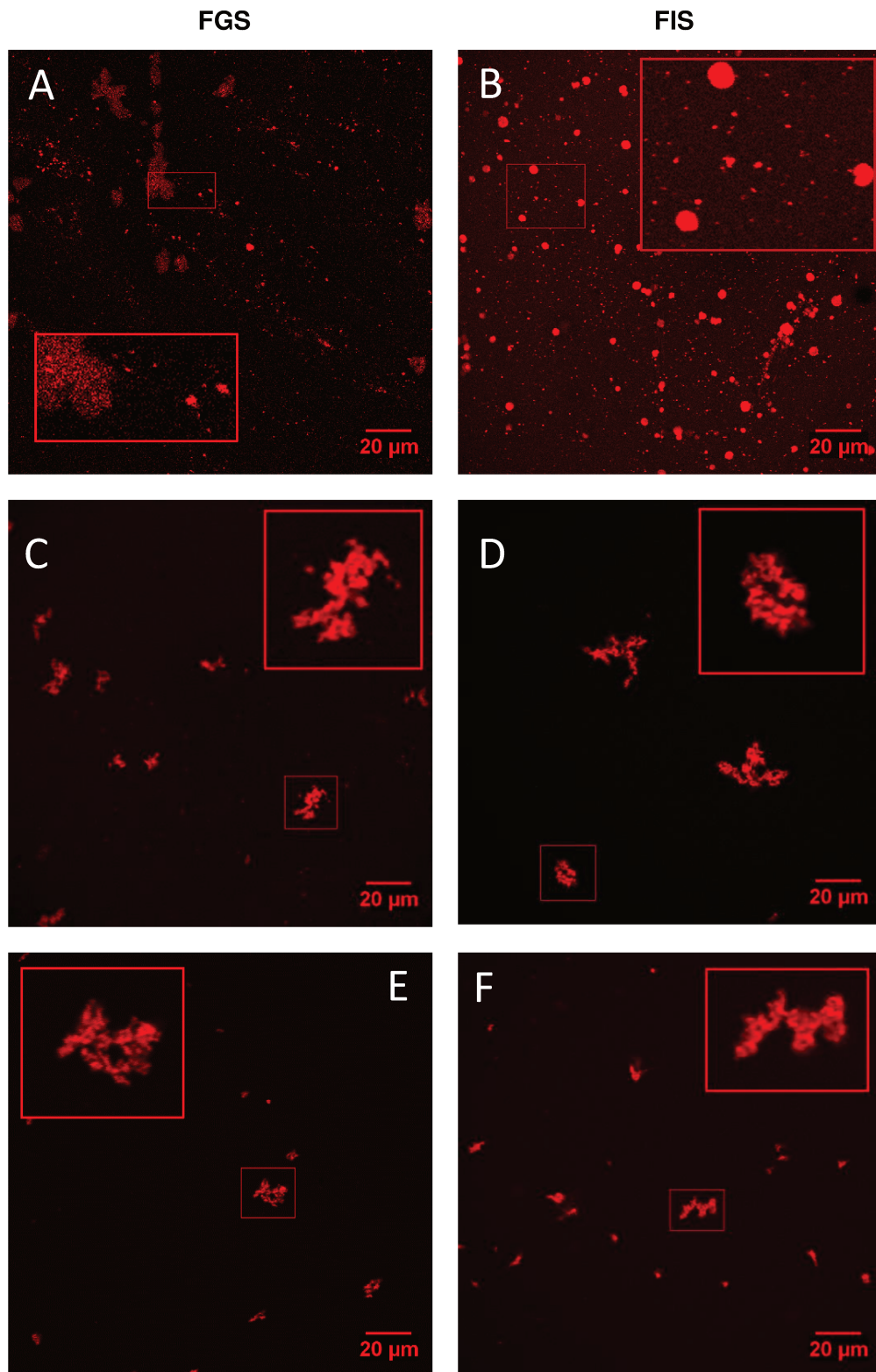


Figura 49. Imágenes de CLSM de OVA-CLA (A, B), OVA_{n1}-CLA (C, D) y OVA_{n2}-CLA (E, F) teñidas con rodamina B después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. FGS: los sistemas se sometieron a un fluido gástrico simulado que contenía pepsina. FIS: los sistemas se sometieron a un fluido intestinal simulado que contenía pancreatina y sales biliares. El recuadro muestra un zoom X3. Objetivo utilizado: 63x.

6.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En el presente capítulo, se caracterizaron dos nanopartículas y sus nanocomplejos de inclusión con CLA en términos de tamaño de partícula, propiedades eléctricas y características morfológicas a los pH correspondientes a un protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro*. La complejación entre OVA y sus nanopartículas con CLA mostró un aumento en el tamaño de partícula, además las imágenes de CLSM confirmaron una forma redondeada para los nanocomplejos obtenidos. La eficiencia de OVA_{n1} y OVA_{n2} para encapsular CLA fue muy elevada (93 y 91%, respectivamente). Si bien la eficiencia de OVA fue menor a la de sus nanopartículas (75%), también fue apreciable. Finalmente, los nanocomplejos de inclusión fueron sometidos a una digestión gastrointestinal *in vitro*. La apariencia macroscópica de todos los sistemas mostró la presencia de agregados de proteínas y partículas dispersas que precipitaron después de un tiempo de reposo. Para todos los sistemas, las imágenes CLSM resaltaron la presencia de agregados amorfos. Para OVA y ambas nanopartículas, se obtuvo una gran retención de CLA después de la digestión con enzimas en las fases gástrica e intestinal. Los resultados obtenidos sugerirían que estos nanocomplejos de inclusión podrían aplicarse como sistemas de *delivery* oral para el CLA y otros CB hidrofóbicos en el TGI. La mayor retención gastrointestinal demostrada por este sistema podría explotarse en el diseño de nuevos alimentos funcionales para la prevención/tratamiento, por ejemplo, de cáncer de colon.

7. CAPÍTULO 5

Estudio de la digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando un modelo reducido y de la actividad citotóxica de nanocomplejos de inclusión

7.1. INTRODUCCIÓN

7.1.1. Cáncer

El cáncer no representa una sola enfermedad, más bien, un conjunto de innumerables patologías con tantas manifestaciones diferentes como tejidos y tipos de células posee el cuerpo humano. Estas patologías tienen en común ciertas propiedades biológicas de las células que componen los tumores, tales como el crecimiento celular no regulado (clonal), la diferenciación celular alterada, la invasividad y el potencial metastásico. El cáncer, en su forma más simple, es una enfermedad genética o, más precisamente, una enfermedad caracterizada por una expresión génica anormal. Las diferentes formas de cáncer comparten mecanismos moleculares comunes que gobiernan la proliferación celular incontrolada, implicando la pérdida, mutación o desregulación de genes que controlan positiva y negativamente la proliferación, migración y diferenciación celular (oncogenes y genes supresores de tumores) [201].

La palabra neoplasia se deriva de la palabra griega que significa "nuevo crecimiento", y la descripción se usa como sinónimo del término más familiar, cáncer. La neoplasia se caracteriza por una proliferación anormal de células, en un tejido o un órgano, que continúan dividiéndose independientemente de los estímulos de crecimiento externos. Estos estímulos de crecimiento pueden ser hormonas y factores de crecimiento, o estímulos como la inflamación crónica que pueden estimular la liberación de factores de crecimiento [202]. En general, las neoplasias se clasifican en benignas y malignas. Las neoplasias benignas están localizadas y tienen infiltración limitada en el tejido circundante. Histológicamente, están bien circunscritas y pueden estar delimitadas por una capa circundante de tejido fibroso. Pueden causar daño al comprimir o desplazar tejidos circundantes. Las neoplasias malignas exhiben una invasión del tejido normal circundante y finalmente se propagan, a través del sistema vascular o linfático, a órganos distantes de su origen a través de un proceso conocido como metástasis [202].

La enfermedad neoplásica se desarrolla en pacientes durante largos períodos de tiempo y generalmente está precedida por el desarrollo de una o más lesiones preneoplásicas que incluyen hiperplasia, metaplasia y displasia [203]. La hiperplasia refleja un aumento en el número de células en un órgano o tejido, lo que típicamente resulta en un aumento en el volumen (o tamaño) del órgano o tejido afectado. La mayoría de las formas de hiperplasia son el resultado de una estimulación hormonal o de crecimiento excesiva (anormal). La proliferación celular anormal se controla en la medida en que al cesar el estímulo (eliminación del factor de crecimiento u hormona)

la proliferación celular se detendrá y el tejido hiperplásico retrocederá. La metaplasia representa un cambio reversible en los tejidos caracterizado por la sustitución de un tipo de célula adulta por otro tipo de célula adulta. La metaplasia es una condición reactiva, que refleja un reemplazo adaptativo de células que son sensibles al estrés por células que son resistentes a las condiciones adversas a las que se enfrenta el tejido. La displasia es una lesión proliferativa que se caracteriza por la pérdida en la uniformidad de las células individuales y la pérdida en la orientación arquitectónica de las células en el tejido. Las células displásicas muestran muchas alteraciones que sugieren su carácter preneoplásico, incluido el pleomorfismo celular, núcleos hiper cromáticos, alta relación nuclear-citoplasmática y un mayor número de figuras mitóticas. Las lesiones caracterizadas por cambios displásicos extensos que involucran todo el grosor del epitelio pero que permanecen confinadas dentro del tejido normal se clasifican como carcinoma *in situ*. En muchos casos, la displasia y/o el carcinoma *in situ* se consideran precursores inmediatos de los cánceres invasivos. Se deduce que los cambios displásicos a menudo se encuentran adyacentes a los cánceres invasivos. Sin embargo, no todas las lesiones displásicas se convertirán en una neoplasia maligna [201], [203].

Un carcinógeno es un agente que causa neoplasia en un organismo multicelular. Los carcinógenos pueden ser químicos, virales, hormonales, radiaciones ionizantes o materiales sólidos. Todos estos agentes producen cáncer modificando el ADN genómico en una célula y luego haciendo que esta célula modificada prolifere. Para que se desarrolle el cáncer, se requieren dos eventos en una secuencia temporal: (i) la formación de una mutación en el ADN y (ii) la proliferación selectiva de esa célula. Las etapas de la carcinogénesis son tres: iniciación, promoción y progresión (Fig. 50) [204]. La iniciación implica la formación de una célula mutada estable y heredable, y es un evento irreversible. Diferentes agentes químicos y físicos pueden generar cambios genéticos, incluidas mutaciones y deleciones, o pueden unirse al ADN (aducto de ADN), lo que puede dar como resultado un apareamiento inadecuado de bases o lesiones en el ADN. Una vez que se forman las células iniciadas, su destino tiene múltiples resultados: (i) pueden mantenerse en un estado inactivo no divisivo a través de mecanismos de control de crecimiento; (ii) puede desencadenarse la inducción de apoptosis u otros mecanismos de muerte celular que conducen a la eliminación de la célula iniciada; y (iii) puede sufrir división celular dando como resultado el crecimiento y la proliferación de la célula iniciada. Una segunda etapa del proceso es la promoción que implica la expansión clonal selectiva de la célula iniciada para formar un grupo genéticamente similar de células preneoplásicas. Es esta etapa se observa un aumento en el número de células, ya sea a través de una mayor proliferación celular o

una disminución de la apoptosis. Este es un evento reversible, ya que, si se elimina el estímulo de crecimiento endógeno o exógeno, las células preneoplásicas pueden permanecer en un estado estable o aumentar la tasa apoptótica, lo que disminuirá el número de células dentro de la población clonal promovida. La etapa de progresión implica la conversión de lesiones preneoplásicas benignas en un cáncer neoplásico. En esta etapa pueden ocurrir eventos adicionales que resultan en daño adicional del ADN, incluido el daño cromosómico que incluye aberraciones y translocaciones. Estos eventos dan como resultado la transformación de poblaciones celulares preneoplásicas a poblaciones celulares neoplásicas. Con la formación de neoplasia, se logra un crecimiento autónomo o falta de control del crecimiento. Por definición, la etapa de progresión es irreversible, ya que se produce la formación de neoplasias, ya sean benignas o malignas [204].

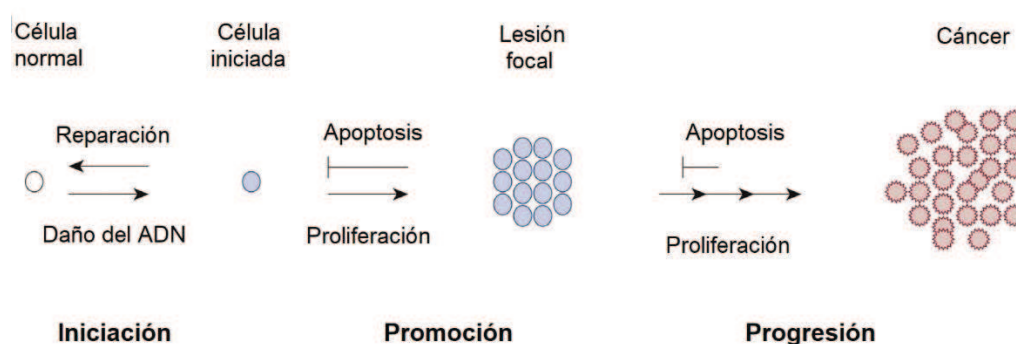


Figura 50. Etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión (Figura modificada de Klaunig y col., 2018 [204]).

Las alteraciones genéticas involucradas en el cáncer pueden activar procesos inductivos (protooncogenes) o bloquear vías negativas (genes supresores). Los protooncogenes son inductores del crecimiento y, por lo tanto, sus mutaciones (oncogenes) activan una función promotora, mientras que los genes supresores de tumores son supresores del crecimiento y sus mutaciones inactivan una función inhibitoria [205]. Se pueden nombrar cuatro categorías principales de oncogenes: (i) genes de factores de crecimiento, (ii) genes de receptores de factores de crecimiento, (iii) genes de transducción de señales y (iv) genes reguladores nucleares [202].

7.1.2. Antecedentes en el desarrollo de fármacos citotóxicos basados en compuestos bioactivos y/o albuminas

Si bien existen diferentes terapias para combatir el cáncer, entre ellas cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, hormonoterapia y terapia dirigida, es

aceptado plenamente por la medicina actual que la mejor forma de afrontar la batalla contra el cáncer es atacándolo desde distintos ángulos, usando terapias y tratamientos sinérgicos en los que se combina la acción simultánea de diferentes agentes antitumorales. Son numerosas las publicaciones que proponen que esta es la mejor forma de atacar una enfermedad tan difícil y compleja como el cáncer: hacerlo desde diferentes frentes de modo simultáneo. Además, son numerosas igualmente las publicaciones y los informes que defienden que la mejor forma de luchar contra esta patología es a través de la prevención, cambiando hábitos de vida y de alimentación por otros más saludables [206], [207]. Según el Instituto Americano de Investigación en Cáncer y el Fondo Mundial para la Investigación en Cáncer, hasta un 30-40% de los casos a nivel mundial podrían prevenirse a través de la dieta [207]. Es por ello que, actualmente, el rol de los compuestos naturales de la alimentación en la prevención y la progresión del cáncer es un área de enorme y creciente interés clínico y científico [207], [208], [209].

En particular, los compuestos naturales que muestran actividad anticancerígena pueden ser útiles tanto para la prevención (incorporándolos en la dieta) como para el tratamiento de la enfermedad. Su biocompatibilidad y baja toxicidad los hacen adecuados tanto para ser combinados entre ellos (o con fármacos) para un ataque sinérgico a la enfermedad, como para ser introducidos en la alimentación y así ayudar a evitarla. Existe una multitud de moléculas de origen natural que presentan actividad anticancerígena, como, por ejemplo, curcumina [210], resveratrol [211], genisteína [212], PUFAs, etc.

Existen nanopartículas proteicas que se usan como transportadores de fármacos. Un ejemplo es Abraxane®, una nanopartícula de albúmina y paclitaxel, en la que el fármaco hidrofóbico y la HSA forman una nanopartícula de 130 nm. Es soluble en agua, se administra por infusión intravenosa y fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) en 2005 para el tratamiento de cáncer de mama metastásico, además ya ha sido aprobado en 41 países [213]. Ejemplos similares son ABI 008 que se basa en nanopartículas basadas en HSA y la droga docetaxel o el conjugado de HSA con metotrexato (MTX) que se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos para diferentes cánceres como ser de mama, vejiga o páncreas [214].

Más aun, existen estudios que demuestran las acciones biológicas que presentan los nanocomplejos de inclusión formados por proteínas globulares y CBs hidrofóbicos. En este sentido, el sistema HAMLET (*Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells* por sus siglas en inglés) se define como un complejo de α -lactoalbúmina y ácido oleico parcialmente desplegado, que se forma a pH bajo y del

cuál se sabe que el ácido oleico es el responsable de la actividad antitumoral mientras que la proteína actúa como transportador del mismo [9], [215]. La eficacia de HAMLET se ha comprobado clínicamente en glioblastoma, papiloma de piel y cáncer de vejiga [9].

7.1.3. Cultivo de líneas celulares tumorales

Existen diferentes modos de estudiar la citotoxicidad de compuestos o drogas ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los métodos *in vivo* incluyen el uso de animales lo que aumenta no solo los costos sino también el entrenamiento del personal, el equipamiento necesario, entre otras cosas. Por ello, los métodos *in vitro* son ampliamente usados. El método más usado para determinar citotoxicidad de compuestos es mediante el cultivo de líneas celulares tumorales. Los ensayos basados en células a menudo se usan para determinar si los compuestos de interés tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a la muerte celular. Independientemente del tipo de ensayo basado en células que se utilice, es importante saber cuántas células viables quedan al final del experimento. Se pueden nombrar una variedad de ensayos que pueden usarse para estimar el número de células viables [216]. Estos ensayos se pueden clasificar en cuatro clases principales: (i) tasa de síntesis de ADN, (ii) actividad metabólica de las células, (iii) antígenos asociados con la proliferación celular y (iv) variaciones en la concentración de adenosina trifosfato [217].

Dentro de los ensayos que miden la actividad metabólica de las células se encuentra el ensayo de hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio o XTT. El ensayo de XTT se basa en la capacidad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas para reducir el sustrato XTT (amarillo) a formazán (azul oscuro/púrpura), que es soluble en agua. Cuando las células mueren, pierden la capacidad de convertir XTT en formazán, por lo que la formación de color sirve como un marcador único de células viables. La cantidad de formazán producida es directamente proporcional al número de células vivas, y se determina registrando los cambios en la ABS [217].

Existen numerosas líneas celulares que pueden cultivarse y usarse para determinar citotoxicidad. Las principales ventajas del cultivo de células son la capacidad de controlar el entorno fisicoquímico, como pH, temperatura, presión osmótica y tensión de O₂ y CO₂; y las condiciones fisiológicas como la concentración de hormonas y nutrientes específicos necesarios. Las líneas celulares cultivadas asumen una constitución homogénea y, por lo tanto, en cada subcultivo, las muestras

replicadas son idénticas entre sí, y las características de la línea pueden perpetuarse durante varias generaciones, o incluso indefinidamente si la línea celular se almacena en nitrógeno líquido. Se pueden analizar muchas variables y hacer muchas réplicas de manera económica, evitando de esta manera cuestiones bioéticas propias de la experimentación con animales. Los nuevos desarrollos de ensayos en placas de 96 pocillos y de robótica han introducido importantes disminuciones de tiempo y escala [218]. Las desventajas de los cultivos celulares son que las técnicas de cultivo deben llevarse a cabo bajo estrictas condiciones que implican un nivel de habilidad y comprensión por parte del operador para apreciar los requisitos del sistema y diagnosticar los problemas a medida que surgen. También se debe tener cuidado para evitar el problema recurrente de contaminación. Por lo tanto, el cultivo de células requiere un entrenamiento adecuado, un control estricto de los procedimientos y un entorno controlado. Otro problema es la desdiferenciación, si se pierden propiedades diferenciadas, por cualquier razón, es difícil relacionar las células cultivadas con las células funcionales en el tejido del que derivaron [218]. La mayoría de las diferencias en el comportamiento celular entre las células cultivadas y sus contrapartes *in vivo* provienen de la disociación de las células de una geometría tridimensional y su propagación en un sustrato bidimensional. Se pierden las interacciones celulares específicas características de la histología del tejido. El ambiente de cultivo también carece de varios componentes sistémicos involucrados en la regulación homeostática *in vivo*, principalmente los del sistema nervioso y endócrino. El reconocimiento de este hecho ha llevado a la incorporación de diferentes hormonas en los medios de cultivo. La baja tensión de O₂, debido a la falta de transportador de O₂ (hemoglobina), da como resultado un metabolismo energético *in vitro* que se produce principalmente por glucólisis, aunque el ciclo del ácido cítrico sigue siendo funcional, juega un papel menor. Es difícil encontrar muchas más diferencias entre las condiciones ambientales de una célula *in vitro* e *in vivo*. Aunque no se puede negar la existencia de tales diferencias, muchas vías específicas y funciones especializadas se expresan en cultivo, y siempre que se aprecien los límites del modelo, el cultivo de tejidos puede ser una herramienta muy valiosa [218].

Una línea celular ampliamente usada para evaluar citotoxicidad de compuestos en cáncer de colon es la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 que fue aislada de un tumor primario de una mujer caucásica de 44 años en 1964 por Fogh y Trempe (1975) [219]. Estas células fueron capaces de expresar las características de las células intestinales maduras, como los enterocitos o las células calciformes productoras de moco. En condiciones de crecimiento estándar, es decir, en presencia de glucosa 25 mM y suero fetal bovino al 10%, estas células muestran un fenotipo

indiferenciado; crecen como una multicapa de células no diferenciadas no polarizadas, y funcionalmente no expresan ninguna característica típica de las células epiteliales intestinales, y expresan bajas cantidades de hidrolasas. Desde el descubrimiento de que el reemplazo de glucosa por galactosa en el medio de cultivo indujo una diferenciación enterocítica reversible, las células HT-29 se han convertido en un modelo único para estudiar los mecanismos moleculares de diferenciación celular intestinal. Cuando estas células se cultivan en condiciones de cultivo apropiadas o después del tratamiento con diferentes inductores, como butirato o HCl 0,1 M (para alcanzar un pH de 5,0), se pueden modular para expresar diferentes vías de diferenciación de enterocitos. Por esta razón, HT-29 se considera una línea celular intestinal pluripotente que puede usarse para el estudio de los eventos estructurales y moleculares implicados en la diferenciación celular [163]. El fenotipo diferenciado se caracteriza por la formación de una monocapa con uniones estrechas entre las células y un borde en cepillo apical. El borde en cepillo de estas células diferenciadas contiene proteínas que normalmente están presentes en las microvellosidades intestinales y expresan hidrolasas asociadas al borde en cepillo típicas del intestino delgado. En estas condiciones de crecimiento en medio libre de glucosa, la diferenciación celular es muy similar a la observada en las células Caco-2. Sin embargo, una de las principales diferencias entre esta línea celular y Caco-2 es que las células HT-29 pueden producir mucina a un nivel relativamente alto. La adaptación gradual de las células HT-29 que crecen exponiéndose a concentraciones crecientes de MTX resultó en su transformación en células diferenciadas que secretan moco. Curiosamente, las células adaptadas a dosis bajas de MTX consisten en una población doble de células columnares absorbentes y secretoras de moco y, a una dosis más alta, las células son casi exclusivamente de fenotipo secretora de moco [163].

Dada su pluripotencialidad según las condiciones de cultivo, las células HT-29 se han empleado ampliamente para evaluar el posible efecto anticancerígeno de diferentes compuestos alimenticios o drogas, sobre la base del origen de carcinoma de colon de esta línea celular. Otras actividades se han estudiado ampliamente en células HT-29 como propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes o de barrera. Si bien no es un modelo particularmente adecuado para estudios de transporte, se ha utilizado para comparar con otras líneas o como co-cultivo. Las monocapas de células HT-29-MTX se han utilizado como modelo de permeabilidad, por ejemplo, para estudiar el efecto del moco en la permeación de fármacos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los estudios de transporte se realizan con co-cultivos de Caco-2 y HT-29-MTX como un modelo preciso para tener en cuenta la capa mucosa. También se usa para estudios sobre el apego, adherencia y/o internalización de varios patógenos.

7.1.4. Ácido linoleico conjugado en cáncer de colon

Existen numerosos estudios sobre el CLA y distintos tipos de cáncer. En primer lugar, se demostró que posee actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares *in vitro* como células de cáncer de próstata, mama, colon, etc. [144]. Por ejemplo, en un estudio, se realizaron ensayos de viabilidad sobre células HT-29 para cuatro isómeros de CLA, siendo solo el isómero *trans9, trans11* el que generó una reducción en la viabilidad del 40% luego de 72 h y a una concentración de 100 μ M. Los autores mostraron que este isómero provocó una reducción en la expresión de la proteína Bcl-2 que suprime la muerte celular programada [220]. Otro ensayo sobre las mismas células mostró que 20 μ M de CLA fue capaz de disminuir la viabilidad en un 55% luego de 4 días de exposición [221]. En otro estudio, se determinó la concentración de CLA necesaria para reducir el crecimiento de las células en cultivo en 50% (IC₅₀) para los isómeros *cis9, trans11; trans10, cis12* y la mezcla de los mismos, hallando valores de IC₅₀ de 118, 103 y 135 μ M respectivamente, frente a la línea celular HT-29. Además, estudiaron diferentes derivados ésteres, alcoholes y acetatos de CLA, hallando que todos tienen valores de IC₅₀ similares al de CLA excepto los derivados ésteres que mostraron muy baja capacidad citotóxica [222]. Es importante destacar que en estos ensayos el CLA se disolvió en etanol y luego esta solución etanólica se adicionó al medio de cultivo para realizar las determinaciones de citotoxicidad. Si bien son numerosas las publicaciones sobre citotoxicidad de isómeros del CLA, son pocos los trabajos que evalúen la capacidad citotóxica del CLA encapsulado en nanopartículas proteicas. Un ejemplo es la formación de nanocomplejos de inclusión entre BLG y *cis9, trans11* CLA cuyo tamaño fue 171 nm. Los estudios de citotoxicidad mediante ensayos con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT, mostraron que el tratamiento con 100 μ M de *cis9, trans11* CLA tuvo un efecto inhibitor muy bajo (menor al 20%) luego de 72 h respecto del control. Sin embargo, el tratamiento con 100 μ M de *cis9, trans11* CLA-BLG produjo una tasa de inhibición de 62% a las 72 h, en comparación con el control [31].

Además, existen numerosos estudios en animales basados en la administración de CLA. En un estudio se investigó el efecto del aceite de semilla de granada que contiene más de 70% de *cis9, trans11* CLA. Para inducir tumores de colon, las ratas macho F344 de 6 semanas de edad fueron inyectadas subcutáneamente con la droga azoximetano (la cual es utilizada para desarrollar cáncer de colon en animales de experimentación). Una semana antes del tratamiento con la droga, se comenzó con una dieta que contenía dicho aceite o CLA durante 32 semanas. La administración tanto de aceite como de CLA en la dieta inhibió significativamente la incidencia de

adenocarcinomas de colon [223]. En otro trabajo, el cáncer de colon se indujo en ratas Sprague-Dawley machos de 6 semanas de edad inyectando la droga carcinogénica 1,2-dimetilhidrazina dos veces por semana durante 6 semanas. Las ratas fueron alimentadas con 1% de CLA o con una dieta control *ad libitum* durante 30 semanas. El CLA en la dieta disminuyó significativamente la incidencia de tumores en el colon [224]. En comparación con una gran cantidad de evidencia científica sobre los efectos anticancerígenos del CLA en estudios en animales, solo se han informado un pequeño número de estudios en humanos que involucran CLA. El primer estudio de CLA y cáncer fue realizado por Knekt y col. (1996) [225], aunque ésta fue una evidencia indirecta en la que se observó una relación inversa entre la ingesta de leche y la incidencia de cáncer de mama. En este estudio, el CLA fue sugerido como uno de los componentes bioactivos potenciales en la leche [225]. Desde entonces, se han publicado algunos estudios que examinan el efecto del CLA sobre el cáncer de mama donde en algunos se observaron efectos preventivos mientras que en otros no se encontraron correlación entre el CLA y el riesgo de cáncer de mama [226], [227]. Por otro lado, en un estudio con mujeres, durante 15 años, de cáncer colorrectal se determinó una correlación inversa entre dietas con alto contenido de grasa (con alta proporción de CLA) y la incidencia de cáncer colorrectal. De hecho, por cada incremento diario de 2 porciones de alimentos con alto contenido de CLA, el riesgo de cáncer colorrectal disminuyó en un 13% y el riesgo de cáncer de colon distal disminuyó en un 34% [228].

Por otro lado, se conoce que el CLA es un inhibidor eficiente de todas las etapas de la carcinogénesis; iniciación, promoción y metástasis, así como neovascularización o angiogénesis. Si bien no se encuentra totalmente elucidado el mecanismo de citotoxicidad del CLA, se sabe que el mismo depende del isómero usado, como así también del tipo de tumor y órgano afectado. Los mecanismos propuestos son complejos e involucran diferentes cascadas de señalización y activación de genes [134], [144], [229], [230].

Como se mencionó previamente en el presente capítulo, el cáncer en su forma más simple, es una enfermedad caracterizada por una expresión génica anormal y una proliferación celular incontrolada. Esta proliferación incontrolada puede ser el resultado del aumento del número de células por división celular y/o la disminución de apoptosis. Uno de los mecanismos de acción del CLA consiste en inducir la expresión de proteínas codificadas por genes supresores de tumores p53, p21 y p27 [231], [232]. La proteína p53 participa en un punto de control del ciclo celular que causa la detención del mismo en la fase G1 o la muerte celular por apoptosis si hay daño en el ADN y no pudo repararse. La proteína p53 estimula la producción de p21, esta última se une al

complejo ciclina dependiente de quinasa 2 (CDK2)-ciclina E inhibiéndola. El complejo CDK2-ciclina E es importante en el paso de la Fase G1 a S del ciclo celular. En resumen, el CLA estimula la producción de la proteína codificada por el gen p21 inhibiendo la progresión del ciclo celular. Por otro lado, p27 induce la progresión de las células a la fase de reposo G0 [233]. Algunos estudios mostraron que cuando diferentes líneas celulares de cáncer de colon son tratadas con CLA, hubo un aumento de la actividad de las proteínas caspasas, principalmente, la caspasa-3 y 9 [234], [235]. Estas proteínas son claves durante la apoptosis, ya que, por ejemplo, son responsables mediante la activación de otras vías de señalización de la desintegración del material genético y de las membranas nucleares. Otros mecanismos de acción del CLA se basan en la inhibición de la expresión del gen ErbB2 y 3 y Bcl-2. ErbB es una familia de receptores de membrana que al ser activados por unión a su ligando interactúan con diversas vías de señalización que finalmente conducen a la supervivencia, división y diferenciación celular. Se observó que el CLA es capaz de disminuir la expresión del gen ErbB2 y 3, inhibiendo de esta manera la proliferación celular [236], [221]. Bcl-2 es una gran familia de genes con miembros proapoptóticos (como Bax, Bak y Bok) o antiapoptóticos (como Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w) y juntos regulan las vías principales que activan la apoptosis [237]. Un modelo del mecanismo apoptótico de Bcl-2 sugiere que su proteína forma heterodímeros con Bax para neutralizar la actividad proapoptótica de este último, y que la fosforilación de Bcl-2 estabiliza funcionalmente la heterodimerización de Bcl-2-Bax. Por lo tanto, la relación Bax/Bcl-2 puede funcionar como un controlador para modular el destino celular [238]. En este sentido, diferentes estudios determinaron que el CLA fue capaz de disminuir la expresión del gen Bcl-2 pero no tuvo efecto sobre Bax, incrementando la relación Bax/Bcl-2 e induciendo la apoptosis de las células [235], [238]. Otro mecanismo por el que CLA actúa sobre células tumorales está relacionado al metabolismo del AA. Se observó, en diferentes estudios con CLA, que la producción de prostaglandina E2 y tromboxano A2 se ve disminuida como consecuencia de una menor expresión de la enzima COX2 [144], [238]. La evidencia indica que COX2 y la prostaglandina E2 promueven el crecimiento y la agresividad del tumor, sin embargo, el mecanismo molecular por el que esto ocurre no está claro [239]. Estos son los principales mecanismos en los que el CLA está involucrado en diferentes tipos de cáncer incluido el de colon, sin embargo, existen otros que dependen del tipo de célula/órgano donde se desarrolla.

7.2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del capítulo son:

Objetivo 1: Estudiar el comportamiento de los nanocomplejos de inclusión entre nanopartículas de OVA y CLA bajo un sistema de digestión gastrointestinal estático *in vitro* reducido. Dicho sistema se basa en la adecuación del sistema de digestión consenso, principalmente en la modificación de la relación enzima:sustrato, de manera que el mismo sea adecuado para nanocomplejos en regímenes diluidos, como es el caso de la presente tesis.

Objetivo 2: Estudiar la capacidad citotóxica del CLA y sus nanocomplejos de inclusión con OVA y sus nanopartículas derivadas.

7.3. MATERIALES Y MÉTODOS

7.3.1. Materiales

La ovoalbúmina (OVA), el ácido linoleico conjugado (CLA), la pepsina de la mucosa gástrica porcina (P7000), la pancreatina del páncreas porcino (P7545), el extracto de bilis porcino (B8631), la hemoglobina (H2500), el TAME (T4626) y el inhibidor de proteasas (P2714) fueron descritos en los Capítulos anteriores. Los reactivos analíticos adicionales fueron suministrados por Cicarelli (Argentina) o Merck.

7.3.2. Formación de nanocomplejos de inclusión proteína-ácido linoleico conjugado

7.3.2.1. Obtención de nanopartículas de OVA

Las nanopartículas utilizadas en este capítulo son las mismas que las descritas en el Capítulo 3 y 4 (OVA_{n1} y OVA_{n2}).

7.3.2.2. Obtención de nanocomplejos de inclusión proteína-CLA

La obtención de los nanocomplejos de inclusión formados entre nanopartículas de OVA y CLA se realizó de la misma manera que el Capítulo 4.

7.3.3. Digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando un modelo reducido a partir del modelo consenso

El modelo consenso utilizado en el Capítulo 4 recomienda usar las enzimas de los medios simulados en base a su actividad en U/mL de medio simulado. Respetar esta recomendación, resultó en la utilización de una gran cantidad de las enzimas correspondientes en g para alcanzar la actividad especificada en el protocolo. Sin embargo, este protocolo suele aplicarse a alimentos y no a sistemas individuales en régimen diluido, tal como es el caso de dispersiones de nanopartículas. Por otro lado, hay diferentes trabajos que enfatizan el uso de una correcta relación enzima:sustrato, dado que ante un exceso de enzima los resultados pueden ser erróneos o difíciles de interpretar [174]. Más aun, la digestión de OVA depende en gran medida de la relación enzima:sustrato usada, lo que puede conllevar a la ausencia de digestión o a una digestión total o parcial [240], [241]. En base a esto, se realizó una reducción del protocolo consenso según la Tabla 11, por ejemplo, dado que para 5 g de sustrato se requieren 2.000 U/mL de pepsina y el volumen de fase final será 20 mL, esto genera un total de 40.000 U de pepsina para 5 g de sustrato, o lo que es lo mismo, 8 U de pepsina por mg de sustrato.

Tabla 11. Cálculos realizados para adecuar el protocolo consenso en base a la recomendación de 5g de sustrato para las actividades enzimáticas finales recomendadas y la concentración de sal biliar teniendo en cuenta el volumen final de las fases simuladas.

	Sustrato (mg)	Vol fase (mL)	U de enzima/ mL	U totales	U de E/mg de sustrato
Pepsina	5000	20	2000	40000	8
Tripsina	5000	40	100	4000	0,8

	Sustrato (mg)	Vol fase (mL)	Concentración sal biliar mM	mmol/40 mL	mmol SB/mg sustrato
Sal Biliar	5000	40	10	0,4	0,00008

Teniendo en cuenta este protocolo y el utilizado en el Capítulo 4, se realizó el cálculo de la relación enzima:sustrato p/p aproximada (dado que las U/mg de actividad enzimática varían con el tiempo de almacenamiento). Para el protocolo del Capítulo 4, la relación pepsina:sustrato fue de 3:1 y la de pancreatina:sustrato fue 8:1, es decir, siempre se trabajó en exceso de enzima. Para este nuevo protocolo reducido la relación pepsina:sustrato fue de 1:20 y la de pancreatina:sustrato fue 1:8, es decir, se trabajó en exceso de sustrato, siendo esto último lo recomendado por diferentes autores y más representativo de la condición fisiológica [174].

En este nuevo protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* reducido la modificación fue entonces la cantidad de enzimas y sal biliar utilizada, manteniéndose el resto del procedimiento igual.

7.3.4. Caracterización de los sistemas luego de la digestión *in vitro*

7.3.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

Una vez finalizada la digestión gastrointestinal *in vitro* reducida, se tomaron muestras luego de transcurrido el tiempo correspondiente a la fase gástrica e intestinal de los sistemas proteicos puros y de los nanocomplejos de inclusión y se analizaron mediante SDS-PAGE (Sección 5.3.2.2.1) en condiciones no reductoras. Como control, se realizó el mismo análisis de SDS-PAGE para FGS + pepsina y FIS + pancreatina + sal biliar de manera de poder identificar las bandas en el gel correspondientes a los mismos. La proteína se visualizó mediante tinción con plata.

7.3.4.2. Determinación de tamaño y potencial ζ

Una vez finalizada la digestión, las distribuciones de tamaño y el potencial ζ para los sistemas proteicos puros y los nanocomplejos de inclusión fueron determinados de igual manera que en los Capítulos anteriores de la presente tesis. Sin embargo, algunos nanocomplejos en el FIS + pepsina + sal biliar mostraron la formación macroscópica de precipitado, y, por lo tanto, no pudieron determinarse por DLS. En tales casos, se realizó un paso previo de filtración usando una membrana de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (Merck Millipore, Alemania) y luego se procedió a ensayar la muestra cómo se describió en los capítulos anteriores.

7.3.4.3. Retención de CLA en los nanocomplejos luego de la digestión gastrointestinal *in vitro*

La determinación de la cantidad de R_{CLA} en OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} luego de la digestión en el FGS + pepsina y en el FIS + pancreatina + sal biliar se realizó de igual manera que en la Sección 6.3.5.3, mediante la Ecuación 10.

7.3.5. Evaluación de citotoxicidad de los nanocomplejos de inclusión

Se llevaron a cabo dos ensayos para determinar la citotoxicidad de los nanocomplejos de inclusión. Las puestas a punto y el desarrollo de las metodologías detalladas a continuación fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Cultivos celulares del Centro de Medicina Comparada (ICIVET-Litoral UNL-CONICET).

Por un lado, se determinó el % de viabilidad celular mediante ensayo de XTT y por el otro, el mecanismo de muerte celular mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizó la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (ATCC® HTB38™). La misma, se cultivó en el medio de cultivo DMEM F12 (Gibco, es una mezcla de Dulbecco Modified Eagles Minimal Essential Medium y Ham's F-12 por sus siglas en inglés) suplementado con 10% de Suero fetal bovino (Gibco), 1X Antibiótico-antimicótico (Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B (Gibco)) y 1X Glutamina (Gibco). La línea celular utilizada fue evaluada mediante PCR frente a infección con *Mycoplasma*, siendo negativo el resultado.

Dichos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica clase II. La incubación de los sistemas y nanocomplejos con el medio de cultivo completo (por triplicado: 3 pocillos) se llevó a cabo a 37°C (5% CO₂) en incubadora durante el tiempo detallado en cada ensayo.

7.3.5.1. Determinación de viabilidad celular sobre cultivo de células HT-29

Como se mencionó, en la presente tesis, se evaluó la citotoxicidad de los nanocomplejos de inclusión sobre la línea celular HT-29 mediante el ensayo de XTT [242], [243]. Los sistemas ensayados fueron los nanocomplejos OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA. Adicionalmente, se utilizaron los sistemas proteicos puros OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} como controles para determinar si poseían citotoxicidad o no y el CLA para evaluar las diferencias en la citotoxicidad con los nanocomplejos de inclusión. Además, se realizaron controles adicionales con etanol y buffer fosfato pH 7,0 50 mM. La cantidad de etanol o buffer usada en los ensayos fue la máxima utilizada durante la preparación de los sistemas. Ninguna de estas dos sustancias, en las cantidades utilizadas influyó sobre la viabilidad celular, ya que hubo un 100% de supervivencia para ambas.

En primer lugar, se realizaron ensayos para determinar la concentración óptima de CLA a utilizar. A partir de ellos, se decidió testear cuatro concentraciones finales de CLA preparado en medio de cultivo completo: 100, 250, 500 y 1.000 µM. Se preparó

una solución stock de CLA 100 mM en etanol y se mezcló con soluciones stock de proteína 10 g/L en buffer fosfato pH 7,0 50 mM de manera que la concentración final de CLA fue 4 mM y de proteína 4 g/L. Esta solución se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0,22 μm para asegurar esterilidad y se realizaron diluciones en el medio de cultivo descrito para lograr las cuatro concentraciones testeadas. En los casos donde se usó la proteína sola, se procedió de igual manera, pero sin el agregado del CLA. Para el caso del CLA puro, la solución stock de 100 mM se preparó en etanol, luego se filtró por 0,22 μm y se realizaron diluciones en medio de cultivo para lograr las concentraciones testeadas.

Para el ensayo de XTT se procedió de la siguiente manera:

(i) Preparación de las células en cultivo: Se tripsinizó la monocapa de células HT-29 y se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo completo. Se cuantificó en cámara de Neubauer el número de células/mL mediante coloración con azul de tripán. Una alícuota de 20 μL de la suspensión celular se adicionó a 20 μL del colorante azul de tripán. La lectura de las células viables y no viables se realizó por microscopía óptica y el cálculo del número de células/mL se determinó según la Ecuación 11:

$$\frac{\text{número de células}}{\text{mL}} = V \times FN \times FT \quad (\text{Ecuación 11})$$

donde V es el número de células viables contadas (promedio de los cuatro cuadrantes externos), FN es el factor de la cámara de Neubauer (10^4) y FT es el factor de dilución del azul de tripán. Se preparó la cantidad de células necesaria para una suspensión de 50.000 células/mL en medio de cultivo completo y se colocó 100 μL /pocillo en una placa de 96 pocillos (5.000 células/pocillo), de modo que las células formen una monocapa semi-confluyente. Se incubó la placa 24 h en incubadora de CO_2 (5%) a 37°C . Este período de incubación garantiza la recuperación celular, la adherencia y progresión al crecimiento en fase exponencial.

(ii) Incubación de las muestras a evaluar con las células HT-29: se prepararon las diferentes concentraciones de las muestras y los controles. Se aspiró el medio de cultivo en todos los pocillos y se adicionaron las muestras por triplicado (3 pocillos para cada concentración). El volumen final de medio de cultivo en cada pocillo fue de 100 μL . Se incubó 72 h en incubadora a 37°C y 5% CO_2 . Se incluyeron como controles adicionales: buffer, etanol, medio de cultivo (control positivo de viabilidad) y fenol al 0,1% v/v (control negativo de viabilidad).

(iii) Determinación de viabilidad celular (%): se utilizó el kit XTT (Cell Viability Kit Biotium) según la recomendación del fabricante. Se homogeneizaron 25 μL de reactivo de activación con 5 mL de solución XTT. Se agregaron 50 μL de la solución XTT activada a cada pocillo y se incubó en estufa durante 4 h. Se agitó suavemente la

placa para homogeneizar el color en todos los pocillos y se midió la ABS de las muestras en un espectrofotómetro a una λ de 450 nm, y a 690 nm como ABS *background* la cual es luego restada. Se determinó la viabilidad celular (%), según la Ecuación 12.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{ABS_{\text{muestra}}}{ABS_{\text{medio}}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 12}$$

donde ABS_{muestra} corresponde a la ABS de las células tratadas con los diferentes sistemas y ABS_{medio} corresponde a la ABS de las células en el medio de cultivo (control positivo de viabilidad). Posteriormente, se construyó la curva de % viabilidad celular vs. concentración de CLA y se obtuvo la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), que corresponde a la concentración de un compuesto necesaria para reducir *in vitro* en un 50% el crecimiento poblacional de las células en cultivo [218], realizando un ajuste de los datos a una curva sigmoideal dosis-respuesta. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

7.3.5.2. Determinación de muerte celular mediante citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que se emplea para el análisis cualitativo y cuantitativo de células. En la citometría de flujo, las células en suspensión se hacen pasar alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La interacción de las mismas con el rayo de luz genera señales que son colectadas por el sistema de detección, amplificadas, digitalizadas y almacenadas para ser luego procesadas utilizando un software adecuado. Los principales componentes de un citómetro de flujo son: sistema de inyección de muestra, cámara de flujo, fuente de luz, sistema óptico, detectores, amplificador/convertidor y sistema informático [244] (Fig. 51).

En la cámara de flujo, el sistema de líquidos está constituido, básicamente, por dos compartimentos: el del líquido que contiene la suspensión celular y el del líquido envolvente, que se utiliza para rodear el líquido que contiene la muestra. Empujados por un sistema de presión, los líquidos de ambos compartimentos entran en contacto en la boquilla o cámara de flujo. Esta cámara es el centro del citómetro, ya que en ella se genera el flujo laminar de células que luego atraviesan el rayo luminoso. En la cámara de flujo, las células se introducen mediante un sistema de presión en el centro del líquido envolvente, que se impulsa a gran velocidad a través de un orificio estrecho. Durante el trayecto, las células han de permanecer en el centro de un caudal de líquido isotónico y deben cruzar perpendicularmente, alineadas y de una en una, el rayo luminoso. En las cámaras la boquilla cónica termina en un orificio cuyo diámetro está comprendido entre 50 y 100 μm . Estas características, junto con el

ajuste de la concentración de células de la muestra, permiten que haya un flujo secuencial de células individuales a través de la corriente.

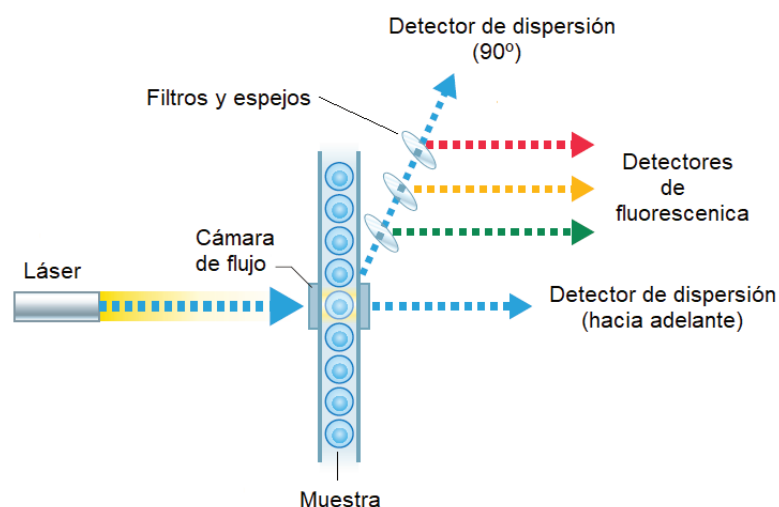


Figura 51. Principales componentes de un citómetro de flujo. (Figura modificada de Fleisher y Oliveira, 2019 [245]).

En los citómetros de flujo, la fuente de luz es un rayo láser. La mayoría de los citómetros de flujo poseen cinco sistemas ópticos de medida: dos de dispersión de luz, uno hacia delante y otro a 90° , y tres de fluorescencia. Mediante el sistema de dispersión hacia delante se determina el tamaño de las células, y con el de dispersión a 90° la granulosidad celular, esto es, la complejidad interna de la célula. Los sistemas de fluorescencia se sitúan en ángulo recto y con ellos se determinan las células marcadas con fluorocromos. La luz correspondiente a las diferentes emisiones fluorescentes se recoge a ángulos cercanos a los 90° . Por ello, se hace necesario un sistema óptico que permita separar la luz fluorescente. Los fotones con diferente longitud de onda se seleccionan por medio de un sistema óptico compuesto por filtros y espejos dicróicos, y se envían a un detector específico. Cada detector genera una señal electrónica que es proporcional a la cantidad de luz dispersada o a la intensidad de la fluorescencia. Esta señal se amplifica y se lleva a un convertidor analógico/digital que genera una señal digital que puede operarse mediante una computadora. La cantidad de fluorescencia emitida por una célula es proporcional a la cantidad de fluorocromo asociado a ella, la que, a su vez, es proporcional a la señal producida sobre el detector fluorescente. Así, el tamaño de la señal electrónica producida por una célula es una medida cuantitativa de la cantidad de fluorocromo que hay sobre su superficie. Los perfiles de intensidad celular de un citómetro de flujo se presentan normalmente en forma de histogramas de frecuencia. Cada punto representa una célula concreta que muestra su tamaño y la fluorescencia asociada. De esta forma,

puede relacionarse cualquier pareja de parámetros medidos. Este tipo de representación se llama de puntos o *dot plot* [244], [245].

Esta técnica es ampliamente usada para obtener información respecto del mecanismo de muerte celular. Existen dos tipos fundamentales de muerte celular, la apoptosis y la necrosis. En la necrosis ocurre una desnaturalización de las proteínas intracelulares y digestión enzimática de la célula con daños letales. Las células necróticas son incapaces de mantener la integridad de la membrana y sus contenidos se extravasan, siendo un proceso capaz de estimular la inflamación en el tejido circundante. Las enzimas que digieren las células necróticas derivan de los lisosomas de las células moribundas y de los lisosomas de los leucocitos que son atraídos como parte de la reacción inflamatoria. La apoptosis es una vía de muerte celular inducida mediante un programa regulado de forma muy estrecha en el que las células destinadas a morir activan una serie de enzimas responsables de degradar el ADN nuclear y las proteínas nucleares y citoplasmáticas propias. Las células apoptóticas se rompen en fragmentos, llamados cuerpos apoptóticos, que contienen parte del citoplasma y el núcleo. La membrana plasmática de las células y los cuerpos apoptóticos queda intacta, pero su estructura sufre alteraciones tales que se convierte en blanco para los macrófagos. Las células muertas y sus fragmentos son eliminados con rapidez mediante fagocitosis mediada principalmente por macrófagos, antes de que su contenido se extravase y por eso la muerte por este mecanismo no induce una reacción inflamatoria. La muerte por apoptosis es un fenómeno normal que permite eliminar las células que ya no se necesitan y mantener un número estable de diversas poblaciones en los tejidos [246].

Las células vivas tienen fosfolípidos distribuidos asimétricamente en las membranas plasmáticas interna y externa, con fosfatidilcolina y esfingomielina en la superficie externa y fosfatidilserina en el lado interno. Al inicio de la apoptosis las células pierden asimetría, exponiendo fosfatidilserina en el exterior. La anexina V es una proteína que se une preferentemente a los fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina, y por ello, es un reactivo útil para la detección específica de células apoptóticas. Sin embargo, no posee la capacidad de emitir fluorescencia, por lo que normalmente se halla conjugada a un fluorocromo, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otra característica de las membranas plasmáticas asociadas con células vivas es que excluyen fluorocromos catiónicos como el ioduro de propidio (IP). En consecuencia, solo las células en una etapa tardía de apoptosis, con membranas celulares permeables, tomarán este colorante que es capaz de unirse al ADN. Así, el uso combinado de colorantes anexina V-FITC/IP permite la discriminación entre células vivas (anexina V-FITC/IP-), células en apoptosis temprana (anexina V-

FITC+/IP-), células en apoptosis tardía (anexina V-FITC+/IP+) y células necróticas (anexina V-FITC-/IP+) [245].

En base a los resultados de viabilidad celular, se seleccionaron los nanocomplejos de inclusión y CLA para realizar la determinación de muerte celular mediante citometría de flujo en la concentración 500 μ M. Se llevaron a cabo controles adicionales, los cuales se incubaron en las mismas condiciones que el sistema bajo estudio: un control positivo de apoptosis en el que se adicionó al medio de cultivo 5% de H₂O₂ y un control basal en el que las células fueron cultivadas en el medio de cultivo descripto.

Para realizar la citometría de flujo se procedió de la siguiente manera:

(i) Preparación de las células en cultivo: se procedió de igual manera que en la [Sección 7.3.5.1](#).

(ii) Incubación de las muestras a evaluar con las células HT-29: se procedió de igual manera que en la [Sección 7.3.5.1](#), con la diferencia de que la placa se incubó durante 48 h. El control H₂O₂ se adicionó 6 h antes de cumplirse las 48 h.

(iii) Medición de muerte celular por apoptosis y/o necrosis: Se levantó el sobrenadante de cada pocillo y se conservó en un tubo Eppendorf. Se tripsinizó la monocapa de células HT-29 y se resuspendió en 150 μ L de medio de cultivo completo. Se adicionó al tubo con el sobrenadante de cultivo. Se centrifugaron las células a 800 g por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se utilizó el kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD). Se adicionó 100 μ L de buffer *binding* conteniendo 1 μ L de Anexina V-FITC y 0,5 μ L de IP a cada muestra. Se incubó 15 min en oscuridad y las muestras se adquirieron en el Citómetro de flujo Attune NxT (Acoustic Focusing Cytometer, A24860, Life Technology). Se determinó el % de células vivas, el % de células en apoptosis temprana, el % de células en apoptosis tardía y el % de necrosis utilizando el software FlowJo software (TreeStar Inc., Ashland, USA). Se calculó el % de apoptosis total como la suma de los % de apoptosis temprana y tardía; y un índice de apoptosis según la Ecuación 13.

$$\text{índice de apoptosis} = \frac{\% \text{ apoptosis para el tratamiento}}{\% \text{ apoptosis basal}} \quad \text{Ecuación 13}$$

7.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó de la misma manera que en los Capítulos anteriores. Las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Caracterización de los nanocomplejos de inclusión luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* reducida

7.4.1.1. Características macroscópicas

La Fig. 52 muestra el aspecto macroscópico de los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA bajo el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* reducido en presencia de las enzimas correspondientes. Cuando los nanocomplejos se digirieron con FGS + pepsina, todos mostraron turbidez, pero fueron estables durante 24 h, al final de las cuales no se observó la formación de precipitado. En el caso de la digestión con FIS + pancreatina + sal biliar solo el nanocomplejo OVA-CLA fue estable por 24 h, mientras que los nanocomplejos OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA formaron aglomerados en suspensión que al permanecer en reposo precipitaron rápidamente. Es importante mencionar que, el CLA puro fue estable por 24 h en ambas condiciones; mientras que los sistemas proteicos puros tuvieron el mismo comportamiento que su correspondiente nanocomplejo. Todos los sistemas proteicos puros fueron estables en FGS + pepsina por 24 h, mientras que solo OVA lo fue en FIS + pancreatina + sal biliar (OVA_{n1} y OVA_{n2} precipitaron rápidamente al permanecer en reposo). Esto sugiere que el comportamiento de los nanocomplejos de inclusión durante la digestión gastrointestinal *in vitro* estaría principalmente gobernado por el comportamiento del sistema proteico puro.

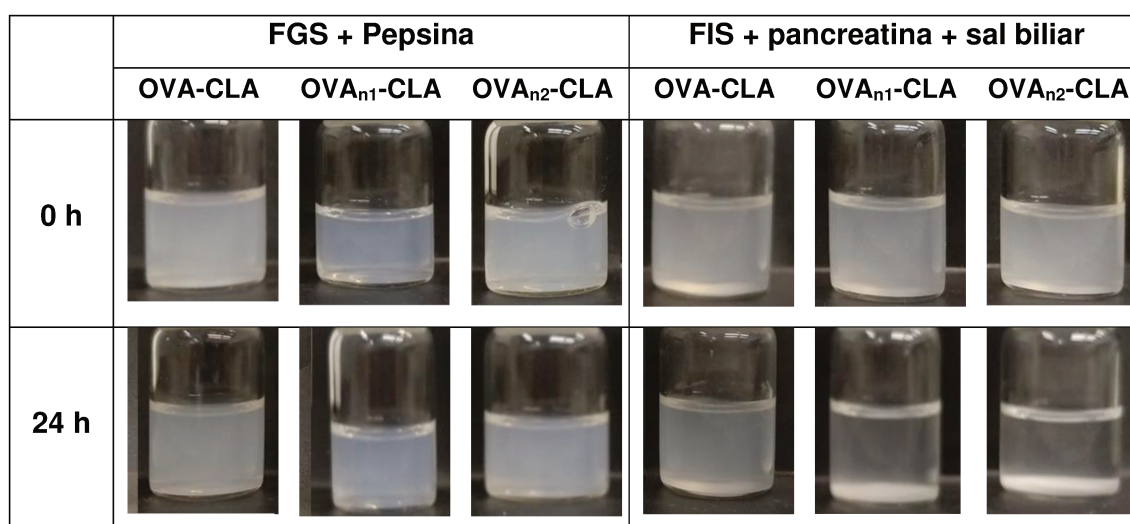


Figura 52. Aspecto macroscópico de los sistemas OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA bajo el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* reducido.

A diferencia de lo observado para el protocolo consenso utilizado en el Capítulo 4 (Sección 6.4.2.1 y Fig. 47) en el que todos los nanocomplejos de inclusión

precipitaron, con este nuevo protocolo todos los sistemas fueron estables en las condiciones gástricas y solo OVA-CLA lo fue en condiciones intestinales luego de 24 h.

7.4.1.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

Una vez finalizado el proceso de digestión gastrointestinal reducido de los nanocomplejos, se realizó una SDS-PAGE. La Fig. 53 muestra los geles de SDS-PAGE previa y posteriormente a la digestión con FGS + pepsina y FIS + pancreatina + sal biliar para los sistemas proteicos puros OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} y los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA. Además, se agregó como control el FGS + pepsina y el FIS + pancreatina + sal biliar.

En el control FGS + pepsina (calle FGS en el gel de la Fig. 53) se observó una banda muy tenue alrededor de 40 kDa, que correspondería a la pepsina. Para el control FIS + pancreatina + sal biliar (calle FIS en la Fig. 53), se observó una banda de 60 kDa que correspondería a la pancreatina. Es importante resaltar que el uso de este protocolo permitió distinguir las bandas proteicas (correspondientes a OVA o a fragmentos de su digestión) de las bandas correspondientes a las enzimas pepsina y pancreatina. Contrariamente, cuando se utilizó el protocolo consenso (Capítulo 4), el exceso de enzimas hizo imposible distinguir las bandas correspondientes a las enzimas de las bandas proteicas (Apéndice, Sección 9.4). Este resultado fue similar al obtenido por Martos y col. (2010) al trabajar en relaciones enzima:sustrato muy parecidas a las aquí ensayadas [174].

Como se observa en la Fig. 53, la OVA, previo a su digestión, mostró una banda mayoritaria a 45 kDa y una pequeña banda de mayor PM alrededor de 90 kDa. La primera correspondería al PM de OVA nativa y la segunda a un dímero de la proteína según Nyemb y col. (2014) [43], y Shukolyukov (2009) [247]. Para el nanocomplejo OVA-CLA, se halló el mismo comportamiento que para el sistema proteico puro. Luego de la digestión con el FGS + pepsina, la OVA no mostró diferencia respecto a lo obtenido sin digerir, es decir, se observaron las bandas a 45 kDa (monómero) y 90 kDa (dímero). Para el nanocomplejo OVA-CLA bajo digestión gástrica, se halló el mismo comportamiento que para el sistema proteico puro. Estos hallazgos están de acuerdo con Nyemb y col. (2014) [43], donde más del 60% de OVA resistió la digestión con pepsina o Martos y col. (2010) [174] donde se halló un fragmento de 40,1 kDa que resistió la digestión gástrica. La OVA fue capaz de resistir en gran medida la digestión gástrica y esto podría deberse a que a pH 2,0 la OVA adopta un estado *molten globe* manteniendo un alto grado de estabilidad conformacional que le permitiría resistir la

acción de la pepsina [174]. Cuando la OVA fue sometida a digestión con pancreatina, se observó la presencia de tres bandas en el gel: una tenue en torno a los 60 kDa que podría corresponder a la pancreatina, otra alrededor de 40 kDa y una más pequeña en torno a 20 kDa. Para el nanocomplejo OVA-CLA bajo digestión intestinal, se halló el mismo comportamiento que para el sistema proteico puro. [Martos y col. \(2010\) \[174\]](#), [Jimenez-Saiz y col. \(2011\) \[175\]](#) y [Nyemb y col. \(2014\) \[43\]](#) observaron un fragmento de 40,1 kDa resistente a la digestión intestinal. Sin embargo, en el ensayo aquí realizado, se observó una banda alrededor de 20 kDa que solo reportó [Nyemb y col. \(2014\) \[43\]](#) como un fragmento de la digestión proteica de OVA. Estos resultados podrían indicar que la pancreatina fue capaz de digerir OVA clivándola en sitios específicos lo que generaría fragmentos característicos, siendo uno de ellos de un PM muy cercano al de la proteína nativa.

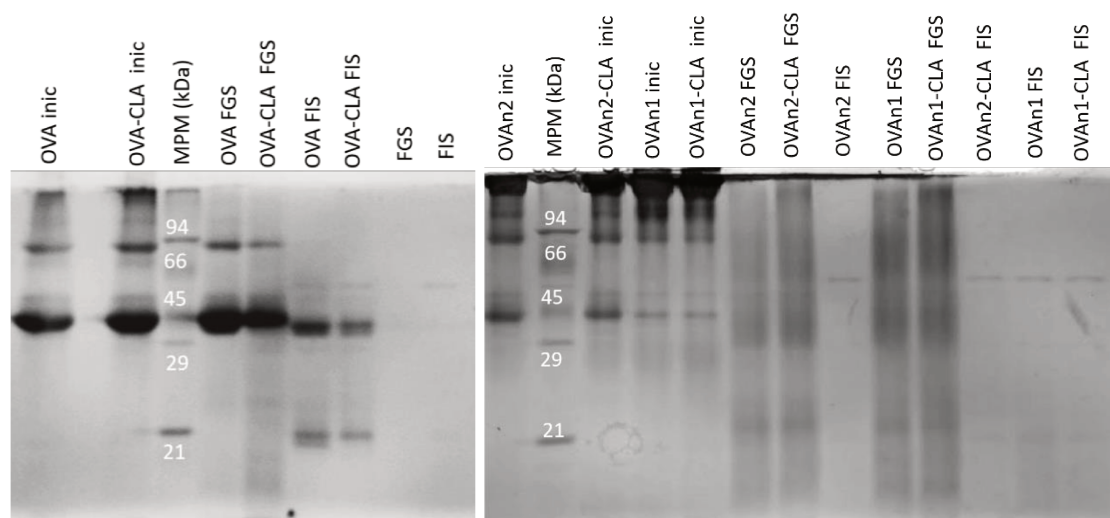


Figura 53. Geles de SDS-PAGE para OVA, OVA-CLA, OVA_{n1}, OVA_{n1}-CLA, OVA_{n2} y OVA_{n2}-CLA antes y luego de la digestión gástrica e intestinal, además de las enzimas pepsina (FGS) y pancreatina + sal biliar (FIS). Inic: sistema inicial previo a la digestión, MPM: marcador de peso molecular.

OVA_{n1} y OVA_{n2} tuvieron un comportamiento muy similar antes de ser sometidas a digestión gastrointestinal: se observó una banda tenue a 45 kDa y 90 kDa (que corresponderían a monómero y dímero de OVA que no se agregó) y una banda mayoritaria que no ingresó al gel, indicando que la partícula fue demasiado grande y permaneció retenida en el gel de apilamiento. Esto fue previamente analizado en la [Sección 5.4.1.1](#). Para el caso de los nanocomplejos de inclusión OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA previo a la digestión, estos se comportaron de igual manera que los sistemas proteicos puros. Cuando OVA_{n1} y OVA_{n2} fueron sometidas a la digestión con pepsina, no se observaron bandas definidas a lo largo del gel, indicando que hubo una hidrólisis

parcial de las nanopartículas. Como se observa en la Fig. 53, la digestión gástrica produjo fragmentos proteicos de muchos PMs diferentes. Para los nanocomplejos de inclusión se observó el mismo comportamiento que para el sistema proteico puro correspondiente. Cuando OVA_{n1} y OVA_{n2} fueron digeridas en FIS + pancreatina + sal biliar se observó una banda tenue a 60 kDa que correspondería a la pancreatina y la ausencia de fragmentos proteicos, lo que indicaría que la hidrólisis fue total o que se generaron péptidos muy pequeños que no fueron retenidos en el gel usado en este ensayo (<12 kDa). Nuevamente, para los nanocomplejos de inclusión OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA se obtuvo el mismo comportamiento que el observado para su sistema proteico puro. Nyemb y col. (2014) [43] informaron que los agregados de OVA de diferentes morfologías (descritos en la Sección 6.1.4) fueron más susceptibles a la degradación por enzimas tanto gástricas como intestinales que la proteína nativa. Dependiendo de la morfología, la digestión fue parcial o total en la fase gástrica o en la intestinal [43]. Según los autores, la modificación estructural (desnaturalización y agregación) inducida por el tratamiento térmico de la proteína, aumentaría la accesibilidad a los sitios de corte de las enzimas digestivas. Además, la mayor parte de la proteólisis ocurrió durante la fase de digestión gástrica. La digestión gástrica de las proteínas globulares por la pepsina fue descrita como un mecanismo de dos etapas: el desplegamiento de la proteína debido a las condiciones ácidas, seguido de la pepsinólisis, donde se cree que la primera etapa es la más lenta y, por lo tanto, limita la hidrólisis proteica [43]. Las nanopartículas OVA_{n1} y OVA_{n2} tendrían un alto grado de desplegamiento de la estructura proteica debido a las condiciones de calentamiento a la que fueron sometidas, por lo que no existiría la etapa limitante durante la hidrólisis, propuesta en el mecanismo de digestión. Liu y col. (2017) [176], reportaron que la SDS-PAGE de OVA tratada térmicamente a 80°C por 10 min y digerida con pepsina no generó bandas correspondientes a la proteína intacta o a péptidos derivados de la hidrólisis enzimática.

Los resultados hallados en este ensayo para los sistemas proteicos puros concuerdan con los reportados por otros autores. La OVA fue resistente en gran medida tanto a la degradación gástrica como intestinal cuando fue sometida a las enzimas correspondientes. Por el contrario, es de destacar que las nanopartículas obtenidas por tratamiento térmico fueron susceptibles a la degradación tanto gástrica como intestinal. Esto podría explicarse debido al desplegamiento de la estructura proteica que ocurre durante la desnaturalización por calor, lo que generaría que los sitios de corte de las enzimas estén más expuestos y, por ello, sean más fácilmente digeridas. Para los nanocomplejos de inclusión, los resultados hallados fueron los

mismos que para los sistemas proteicos puros correspondientes, indicando que el CLA no tendría influencia sobre la digestión proteica por las enzimas digestivas.

7.4.1.3. Determinación de tamaño y potencial ζ

Al analizar los resultados obtenidos en esta sección y compararlos con los obtenidos por SDS-PAGE (Sección 7.3.1.2) fue necesario tener en cuenta las diferencias entre ambas metodologías. En el caso de DLS, las muestras se ensayaron luego de la digestión, por lo que las muestras gástricas se encontraban a pH 3,0 y las intestinales a pH 7,0. En estas condiciones pudieron producirse diferentes interacciones tanto electrostáticas como hidrofóbicas entre los diferentes componentes de la muestra. Para el caso de los geles de SDS-PAGE, la muestra se mezcló con el buffer de muestra que contenía Tris-HCl pH 6,8 50mM y SDS. El SDS es un detergente que debilita las interacciones hidrofóbicas, desnaturalizando las proteínas y uniéndose a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1,4 g de SDS por 1,0 g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos. Esta unión bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Por lo tanto, en los geles de SDS-PAGE las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas no podrían ser estimadas.

Las Fig. 54, 55 y 56 muestran el perfil de PSDi y PSDv para OVA y OVA-CLA; OVA_{n1} y OVA_{n1}-CLA; OVA_{n2} y OVA_{n2}-CLA luego de la fase gástrica e intestinal, respectivamente. Mientras que la Tabla 12 presenta los d_H , volúmenes (%) y potenciales ζ para dichos sistemas.

La Fig. 54 muestra la PSD para OVA y el nanocomplejo OVA-CLA luego de la digestión gastrointestinal. Cuando la OVA fue sometida a digestión con FGS + pepsina, el perfil de PSDi mostró un d_H de $6,3 \pm 0,1$ nm (Tabla 12) que podría corresponder al tamaño de OVA nativa [35]. Esto estuvo en concordancia con el resultado hallado por SDS-PAGE, donde la banda mayoritaria correspondió al PM de OVA nativa (45 kDa; Sección 7.4.1.2). En base a estos resultados, puede suponerse que OVA no estaría siendo digerida o sería digerida en baja proporción por la pepsina en el estómago. Mientras que para el caso del nanocomplejo OVA-CLA, se observó un pico cuyo d_H fue 319 ± 1 nm y otro de 100 ± 2 nm (en la Fig. 54, la presencia de ambos picos no fue clara en PSDi, pero sí en PSDv; Tabla 12). Los tamaños hallados,

superiores al de OVA, podrían indicar que los nanocomplejos de inclusión formados resisten la digestión gástrica y/o la existencia de estructuras supramoleculares de CLA.

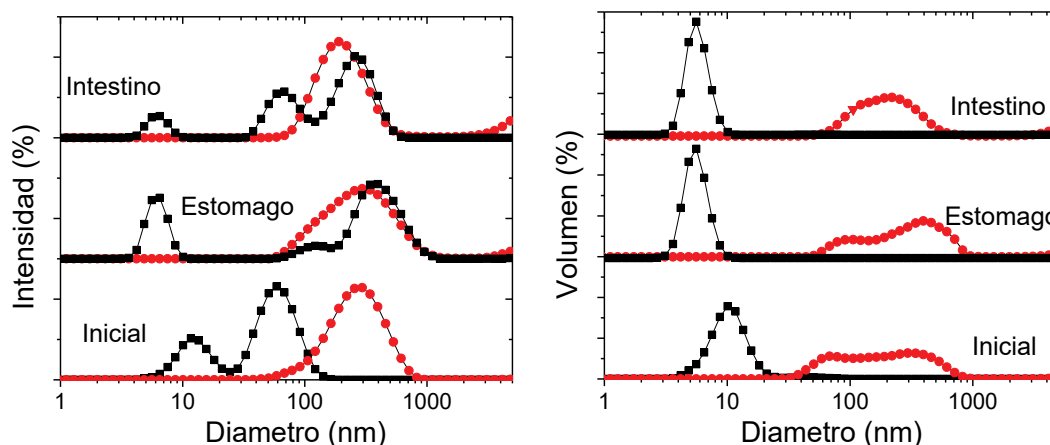


Figura 54. Distribución del tamaño de partícula (PSD) en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%) para OVA (■) y OVA-CLA (●) antes de la digestión (Inicial), luego de la digestión en FGS + pepsina (Estomago) y en FIS + pancreatina+ sal biliar (Intestino). Condiciones: concentración de proteína: 23 μ M, concentración de CLA: 1 mM, temperatura: 25°C.

Quando OVA se digirió en FIS + pancreatina + sal biliar se observó en PSDi y PSDv un d_H de $6,3 \pm 0,3$ nm que correspondería al tamaño de OVA nativa (Tabla 12). En el gel de SDS-PAGE se observó una banda de un tamaño levemente menor al de OVA nativa (40 kDa) y otra banda en 21 kDa (Sección 7.4.1.2). Si se compara con el d_H hallado para OVA a pH 7,0 de 12 ± 2 nm (Sección 6.4.1.1, Tabla 9), luego de la digestión intestinal el tamaño se redujo. Estos resultados indicarían que la pancreatina hidrolizó parcialmente la OVA, posiblemente produciendo el corte de un fragmento de la proteína que generó estas dos bandas bien definidas. OVA-CLA bajo digestión intestinal generó un d_H de 217 ± 7 nm (Tabla 12), esto podría indicar que los nanocomplejos de inclusión formados resisten la digestión con pancreatina.

La Fig. 55 muestra la PSD para OVA_{n1} y OVA_{n1}-CLA luego de las fases gástrica e intestinal. Cuando OVA_{n1} se sometió a digestión gástrica, en el perfil de PSDi se observó un d_H de 41 ± 1 nm (Tabla 12). Sin embargo, en el gel SDS-PAGE para OVA_{n1} no se observaron bandas definidas (Sección 7.4.1.2). Esto podría explicarse teniendo en cuanto lo detallado al principio de esta sección. La presencia de un único pico en la PSDi podría deberse a asociaciones de fragmentos peptídicos, principalmente mediante interacciones hidrofóbicas, que podrían evidenciarse bajo las condiciones empleadas en las determinaciones de DLS. En cambio, la presencia de SDS en la electroforesis no permitiría el desarrollo de dichas interacciones y, por lo tanto, cada fragmento migraría en el gel según su PM, sin posibilidad de asociarse a los demás.

Para el nanocomplejo de inclusión OVA_{n1} -CLA, se observó un pico cuyo d_H fue 179 ± 3 nm (Tabla 12); el que resultó mayor al hallado para el sistema proteico puro, esto podría deberse a la formación de ensamblados entre péptidos proteicos, a estructuras supramoleculares de CLA o a la formación de complejos agregados entre los mismos.

En el caso de OVA_{n1} digerida con FIS+ pancreatina + sal biliar, dado que el sistema precipitó, se debió realizar un paso previo de filtración usando una membrana cuyo tamaño de poro fue $0,45 \mu\text{m}$. Se observó un pico en el perfil de PSDi de d_H 272 ± 10 nm (Tabla 12). En el gel de SDS-PAGE correspondiente, no se observaron bandas (Sección 7.4.1.2). En base a esto, es posible suponer que los péptidos formados son de un tamaño pequeño (dado que el gel puede resolver adecuadamente hasta fragmentos de 12 kDa). Sin embargo, en las condiciones de DLS, es posible que los fragmentos peptídicos interactúen (ya sea de manera electrostática y/o hidrofóbica) y se formen asociaciones de mayor tamaño que precipitan. Para OVA_{n1} -CLA se realizó el mismo proceso de filtración y se observó un pico mayoritario en 393 ± 1 nm (97% en PSDv; Tabla 12). El comportamiento del nanocomplejo fue muy similar al del sistema proteico puro, sin embargo, el tamaño hallado en DLS fue mayor al de OVA_{n1} .

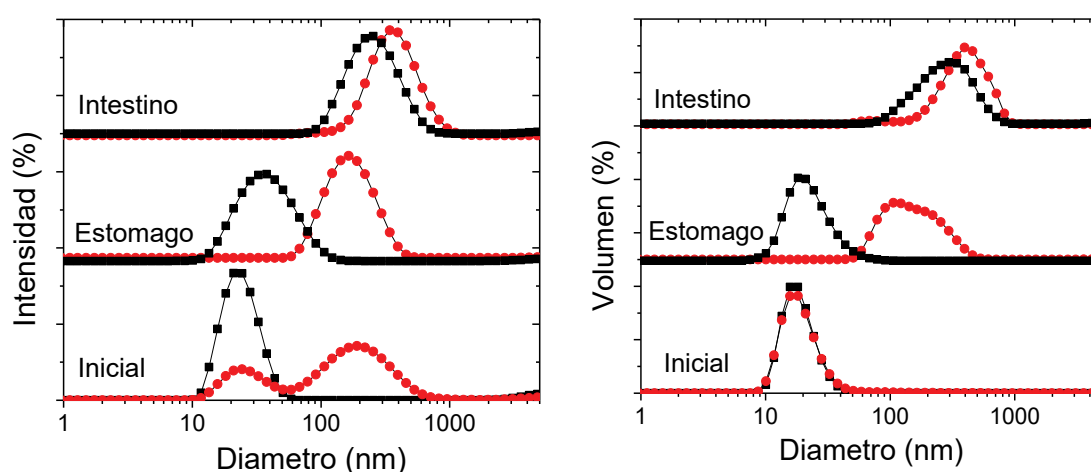


Figura 55. Distribución del tamaño de partícula (PSD) en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%) para OVA_{n1} (■) y OVA_{n1} -CLA (●) antes de la digestión (Inicial), luego de la digestión en FGS + pepsina (Estomago) y en FIS + pancreatina+ sal biliar (Intestino). Condiciones: concentración de proteína: $23 \mu\text{M}$, concentración de CLA: 1mM , temperatura: 25°C .

La Fig. 56 muestra la PSD para OVA_{n2} y OVA_{n2} -CLA luego de la fase gástrica e intestinal. Cuando OVA_{n2} fue sometida a digestión con FGS + pepsina se observó un pico cuyo d_H fue $65,6 \pm 0,1$ nm (40% en PSDv) y otro con d_H de 13 ± 1 nm (60% en PSDv; Tabla 12). Estos tamaños diferentes podrían ser el resultado de la digestión parcial de la nanopartícula. Sin embargo, en el gel SDS-PAGE para OVA_{n2} no se

observaron bandas definidas (Sección 7.4.1.2). La presencia de dos picos definidos en PSDi podría deberse a asociaciones de fragmentos peptídicos, principalmente mediante interacciones hidrofóbicas, que podrían ocurrir en las condiciones utilizadas en DLS, pero no en las condiciones de SDS-PAGE. Para OVA_{n2}-CLA luego de la fase gástrica, se observaron dos picos en el perfil de PSDi: 456±1 nm y 72±13 nm (Tabla 12). Los tamaños hallados, diferentes al del sistema proteico puro, podrían indicar la formación de ensamblados entre péptidos proteicos, estructuras supramoleculares de CLA o de complejos entre los mismos.

Durante la digestión de OVA_{n2} con FIS + pancreatina + sal biliar, luego del proceso de filtración, se observó un pico en el perfil de PSDi cuyo d_H fue 225±5 nm (Tabla 12). En el gel de SDS-PAGE correspondiente, no se observaron bandas (Sección 7.4.1.2). Al igual que para OVA_{n1}, en las condiciones de DLS, los fragmentos peptídicos podrían interactuar de manera electrostática y/o hidrofóbica y formar asociaciones de mayor tamaño que precipitan. Cuando OVA_{n2}-CLA se digirió, luego del proceso de filtración, se halló un pico de d_H 292±4 nm (Tabla 12). El tamaño encontrado para el nanocomplejo de inclusión fue mayor que para el sistema proteico puro.

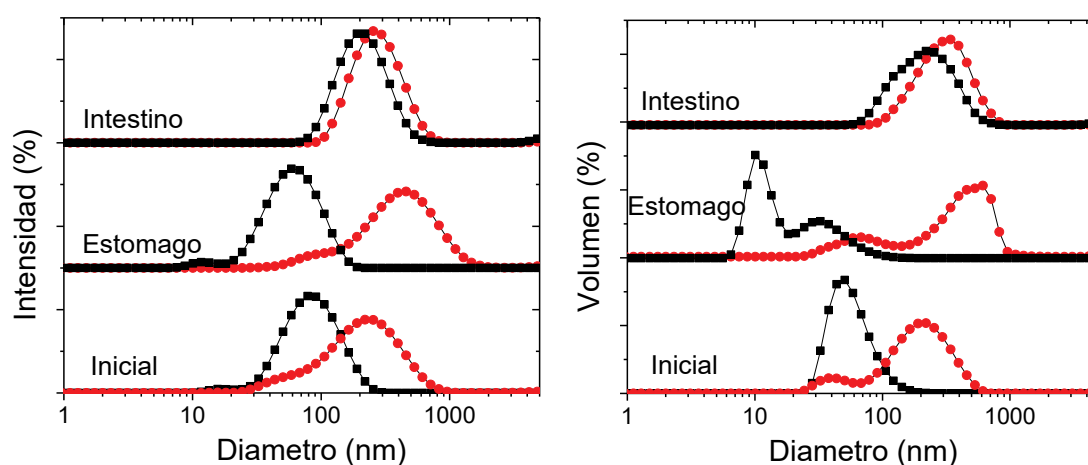


Figura 56. Distribución del tamaño de partícula (PSD) en función del porcentaje de Intensidad y Volumen (%) para OVA_{n2} (■) y OVA_{n2}-CLA (●) antes de la digestión (Inicial), luego de la digestión en FGS + pepsina (Estomago) y en FIS + pancreatina+ sal biliar (Intestino). Condiciones: concentración de proteína: 23 μM, concentración de CLA: 1 mM, temperatura: 25°C.

A partir de estos resultados fue posible concluir que OVA fue muy resistente a la digestión en estómago y que gran parte pudo, además, resistir la digestión intestinal, hallándose relación entre los resultados de SDS-PAGE y la distribución de tamaño por DLS. En el caso de las nanopartículas, fue difícil relacionar los resultados de SDS-PAGE y de distribución de tamaño por DLS. Es importante destacar que en el

caso de la digestión con FIS+ pancreatina + sal biliar, los sistemas fueron filtrados y, por lo tanto, en las determinaciones solo aparecieron tamaños por debajo del tamaño de poro de la membrana (0,45 μm) y probablemente muchas poblaciones fueron excluidas en esta determinación. Sin embargo, los resultados permitieron suponer que las nanopartículas tuvieron una digestión parcial e inespecífica a nivel gástrico y total a nivel intestinal, generando péptidos de bajo PM. Posiblemente, los péptidos pequeños resultantes, posean la capacidad de unirse mediante interacciones no covalentes de tipo electrostática y/o hidrofóbica y formar grandes asociaciones que finalmente precipitaron macroscópicamente.

Tabla 12. Diámetro hidrodinámico (d_H , nm), volumen (%) y potencial ζ (mV) de los sistemas OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} en presencia o ausencia de CLA al ser sometidos a digestión gástrica (FGS + pepsina) e intestinal (FIS + pancreatina + sal biliar). Filt: indica que el sistema precipitaba y fue filtrado por una membrana con tamaño de poro de 0,45 μm . Condiciones: Concentración de proteína: 23 μM , concentración de CLA: 1 mM, temperatura: 25°C. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El ANOVA para el d_H se realizó para cada sistema (Por ejemplo, OVA y OVA-CLA en FGS y FIS). El ANOVA para potencial ζ se hizo para todos los sistemas juntos.

	Sistema	d_H (nm)	V (%)	potencial ζ (mV)
FGS	OVA	6,3 \pm 0,1 ^a	99,9 \pm 0	7,2 \pm 0,4 ^d
	OVA-CLA	319 \pm 1 ^d	74,6 \pm 0,1	27,5 \pm 0,2 ^h
		100 \pm 2 ^b	23,3 \pm 0,5	
FIS	OVA	6,3 \pm 0,3 ^a	99,5 \pm 0,00	-13,3 \pm 0,4 ^c
	OVA-CLA	217 \pm 7 ^c	94 \pm 2	-27,6 \pm 0,4 ^a
		4438 \pm 222 ^e	6 \pm 2	
FGS	OVA _{n1}	41 \pm 1 ^a	100 \pm 0	11,2 \pm 0,1 ^e
	OVA _{n1} -CLA	179 \pm 3 ^c	100 \pm 0	16,0 \pm 0,1 ^g
	OVA _{n1} (filt)	272 \pm 10 ^d	99,3 \pm 0,3	-13,1 \pm 0,8 ^c
FIS	OVA _{n1} -CLA (filt)	393 \pm 1 ^e	97 \pm 1	-17,9 \pm 0,4 ^b
		79 \pm 4 ^b	3 \pm 1	
FGS	OVA _{n2}	65,6 \pm 0,1 ^b	40 \pm 4	13,95 \pm 0,07 ^f
	OVA _{n2} -CLA	13 \pm 1 ^a	60 \pm 4	
		456 \pm 1 ^e	78 \pm 1	
FIS	OVA _{n2} (filt)	72 \pm 13 ^b	21 \pm 1	-13,3 \pm 0,6 ^c
		225 \pm 5 ^c	98,7 \pm 0,6	
	OVA _{n2} -CLA (filt)	292 \pm 4 ^d	100 \pm 0	

En cuanto al análisis de potencial ζ , en primer lugar, se observó que los potenciales ζ hallados corresponden con la carga del sistema proteico puro OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} a pH 3,0 y 7,0. Para la digestión con FGS + pepsina, los valores de potencial ζ hallados fueron positivos; mientras que para la fase de FIS + pancreatina + sal biliar, los valores de potencial ζ fueron negativos, indicando que la proteína gobernó la carga eléctrica del sistema en digestión. Por otro lado, en la digestión

gástrica tanto para OVA como para OVA_{n1} y OVA_{n2}, la unión de CLA generó un aumento en el potencial ζ . En la digestión intestinal, la unión de CLA generó un aumento en el potencial ζ negativo de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}.

7.4.1.4. Retención de CLA en los nanocomplejos

La R_{CLA} luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* utilizando el protocolo reducido, se evaluó para los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA (Tabla 13). Para la OVA, la R_{CLA} fue $82 \pm 1\%$ luego de la digestión con FGS + pepsina y $63 \pm 3\%$ luego de la digestión con FIS + pancreatina + sal biliar. Durante la digestión gástrica, gran parte de la proteína permaneció intacta como se observó en el gel de SDS-PAGE y en la distribución de tamaño por DLS (Sección 7.4.1.2 y 7.4.1.3), lo que podría ser responsable de que gran parte de CLA permanezca retenido en el nanocomplejo. Durante la digestión intestinal, se produjo una digestión parcial de OVA generando dos fragmentos, uno de PM y tamaño muy cercano a la proteína nativa (40 kDa) y otro de alrededor de 20 kDa (Sección 7.4.1.2 y 7.4.1.3). Como se mencionó en la Sección 7.4.1.2, Martos y col. (2010) [174], hallaron un fragmento de 40,1 kDa luego de la digestión de OVA y determinaron que el mismo correspondía a la secuencia de la OVA donde se habían escindido 22 aminoácidos del extremo N-terminal. Además, este fragmento mantenía similares propiedades fisicoquímicas y conformacionales que OVA, lo que explicaría la capacidad de retener CLA luego de la digestión intestinal [248], [249].

Tabla 13. Porcentaje retenido de CLA (R_{CLA}) en OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} después de la digestión gastrointestinal *in vitro* usando un modelo reducido. FGS: representa el porcentaje retenido de CLA cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* con FGS + pepsina. FIS: representa el porcentaje retenido de CLA cuando el sistema se somete a una digestión *in vitro* con FIS + pancreatina + sal biliar. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

	R_{CLA} (%)		
	OVA-CLA	OVA _{n1} -CLA	OVA _{n2} -CLA
FGS+ pepsina	82 ± 1^c	$94,7 \pm 0,5^e$	$94,9 \pm 0,5^e$
FIS + pancreatina + sal biliar	63 ± 3^a	90 ± 1^d	$79,6 \pm 0,6^b$

Las nanopartículas OVA_{n1} y OVA_{n2} fueron capaces de retener igual cantidad de CLA luego de la digestión en FGS + pepsina, alrededor de 95% ($p > 0,05$). En la fase intestinal OVA_{n1} retuvo una mayor cantidad de CLA que OVA_{n2} (90% vs. 79,6%). Estos valores de R_{CLA} fueron llamativos, dado que las nanopartículas se digirieron parcial y totalmente en la fase gástrica e intestinal, respectivamente, por lo que cabría esperar

una retención baja y la liberación parcial o total de CLA. Las hipótesis para explicar los resultados hallados podrían ser: i) es probable que los péptidos generados durante la digestión enzimática fueran capaces de interactuar entre ellos (de manera electrostática y/o hidrofóbica), precipitar y retener la capacidad de unir CLA. En este sentido Cheng y col. (2019) [172] llegaron a la misma conclusión luego de analizar la digestión gastrointestinal de nanopartículas de zeína, con alta capacidad de retención de luteína. De hecho, esto podría sustentarse en la observación macroscópica de los sistemas (Sección 7.4.1.1), donde OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA luego de 24 h de digeridos con FIS + pancreatina + sal biliar precipitaron y se observó una desaparición de la turbidez, lo que podría indicar que en el sobrenadante transparente hubo baja cantidad de CLA; ii) otra explicación podría ser que, durante la etapa de centrifugación para la extracción y cuantificación de CLA, los péptidos fueron capaces de unir CLA y precipitarlo durante el centrifugado; iii) también podría suceder que dado que durante la fase intestinal se encuentran presentes sales biliares, las mismas podrían formar micelas mixtas con CLA, siendo este un paso necesario para el transporte de los AG a través de la capa mucosa y posterior absorción por las células intestinales [162]. Por lo tanto, el CLA podría haber formado estas micelas mixtas con las sales biliares y precipitado con las mismas durante la centrifugación. Es necesario hacer ensayos complementarios para poder poner en evidencia el comportamiento que posee el CLA durante la digestión gastrointestinal.

7.4.2. Evaluación de la citotoxicidad de ácido linoleico conjugado y de los nanocomplejos de inclusión

7.4.2.1. Determinación de viabilidad celular sobre cultivo de células HT-29

La Fig. 57 y Tabla 14 muestran el porcentaje de viabilidad de las células HT-29 luego de la adición de los sistemas proteicos puros OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}; CLA y sus nanocomplejos de inclusión OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA.

Al analizar la viabilidad celular de los controles proteicos puros OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}, se observó que el % de viabilidad celular fue alrededor de 100%, indicando que OVA o sus nanopartículas derivadas no tuvieron actividad citotóxica sobre las células HT-29 en las concentraciones aquí ensayadas (Fig. 57a, Tabla 14). Cabe mencionar que, para OVA y OVA_{n2} (en la concentración que vehiculiza una concentración de CLA de 250 µM), se halló un % de viabilidad mayor. Si bien no se hallaron estudios de citotoxicidad de OVA en líneas celulares de cáncer de colon, sí se han encontrado para otras albúminas globulares como BLG. En este sentido, en un

estudio de nanopartículas de BLG con tamaños en un rango de 98-192 nm, no se observaron diferencias significativas en la tasa de supervivencia de células Caco-2, lo que indicó que no poseían citotoxicidad sobre esta línea celular [250], tampoco BLG nativa tuvo actividad citotóxica en Caco-2 [251]. En otro ensayo BLG no mostró actividad citotóxica sobre la línea celular HT-29 en el rango de concentraciones 5-50 g/L [252]. Los resultados hallados por estos autores respaldarían los aquí encontrados, donde OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} no mostraron actividad citotóxica sobre la línea celular HT-29.

La Fig. 57b y la Tabla 14 muestran el % de viabilidad de células HT-29 al ser tratadas con 100, 250, 500 y 1.000 μM de CLA o de los nanocomplejos de inclusión formados entre OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} con CLA en las diferentes concentraciones. Al analizar el efecto de CLA puro en el rango de concentraciones de 100 a 1.000 μM , se observó una disminución del % de viabilidad celular de 100% (para 100 μM) a 10% (para 1.000 μM) (Tabla 14, Fig. 57b). Un comportamiento similar se observó para los nanocomplejos OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA, donde la viabilidad celular fue cercana al 100% para los nanocomplejos cuya concentración de CLA fue 100 μM y alrededor de un 10% cuando la concentración de CLA bajo la forma de nanocomplejo fue 1.000 μM . No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los % de viabilidad para los tres nanocomplejos de inclusión y CLA en las concentraciones 100, 250 y 1.000 μM ($p > 0,05$) (Tabla 14). Estos resultados junto con la ausencia de citotoxicidad de los sistemas proteicos puros, indicarían que CLA fue el responsable de la actividad citotóxica y no la OVA o sus nanopartículas derivadas.

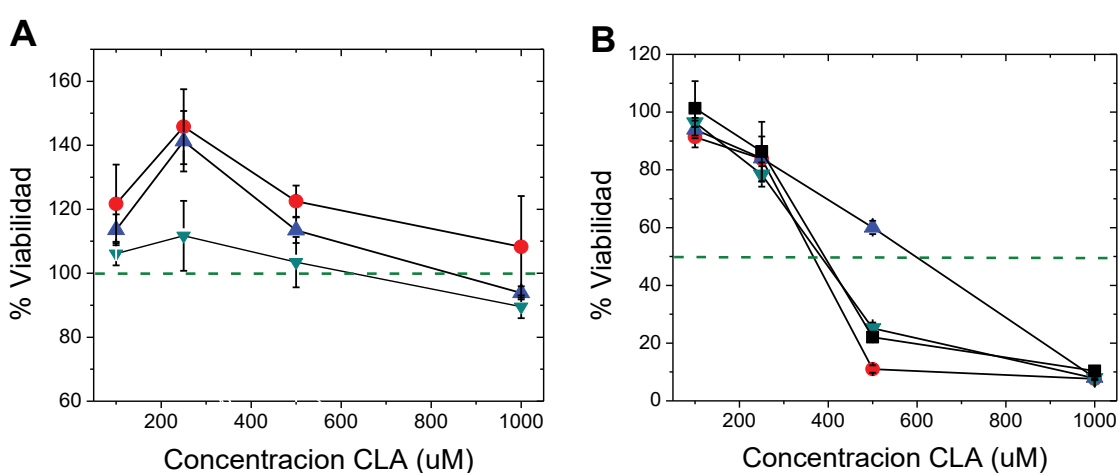


Figura 57. Porcentaje de viabilidad de células HT-29 en función de la concentración de CLA cuando son sometidas a OVA (●), OVA_{n1} (▼) y OVA_{n2} (▲) (A) o a CLA (■), OVA-CLA (●), OVA_{n1}-CLA (▼) y OVA_{n2}-CLA (▲) (B). La línea punteada verde indica un 50% de viabilidad celular.

Al analizar la Fig. 57b, se observó, en primer lugar, que todos los sistemas mostraron una respuesta dosis dependiente, donde al aumentar la concentración de CLA, disminuyó el % de viabilidad celular. Además, se observó una curva de tipo sigmoideal para los sistemas CLA, OVA-CLA y OVA_{n1}-CLA, mientras que para OVA_{n2}-CLA se halló una disminución de viabilidad celular con la concentración de CLA, pero no de forma sigmoide. En general, esta forma de curva sigmoide suele indicar que un porcentaje de la población fue resistente al compuesto citotóxico (en el ensayo aquí desarrollado, entre 500 y 1.000 μM de CLA, la disminución de la viabilidad no fue grande y parecería que llegó a una meseta) [218]. A partir de la curva fue posible calcular el valor de IC₅₀ para CLA y los nanocomplejos de inclusión, siendo $383 \pm 28 \mu\text{M}$ para CLA, $365 \pm 17 \mu\text{M}$ para OVA-CLA, $380 \pm 14 \mu\text{M}$ para OVA_{n1}-CLA y $568 \pm 13 \mu\text{M}$ OVA_{n2}-CLA. Los valores de IC₅₀ de CLA, OVA-CLA y OVA_{n1}-CLA fueron iguales ($p > 0,05$), mientras que para OVA_{n2}-CLA fue mayor ($p < 0,05$). Esto indicaría que la capacidad citotóxica de CLA al formar nanocomplejos con OVA u OVA_{n1} fue igual a la del compuesto puro. En el caso de OVA_{n2}, la capacidad citotóxica de CLA disminuyó, pudiendo esto deberse a que OVA_{n2} tuvo un tamaño mayor que OVA y OVA_{n1}, lo que podría generar una liberación más lenta del CB y dado que el ensayo se realizó a las 72 h de exposición, si el CLA no fue liberado totalmente de esta nanopartícula cabría esperar una citotoxicidad menor.

Tabla 14. Porcentaje de viabilidad de células HT-29 en función de la concentración de CLA puro o formando nanocomplejos de inclusión con OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2}. OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} se usaron como controles para ver si las mismas generaban pérdida de viabilidad celular. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

	Concentración de CLA (μM)			
	100	250	500	1000
OVA	122 \pm 12 ^d	146 \pm 12 ^c	123 \pm 5 ^e	108 \pm 15 ^c
OVA_{n1}	106 \pm 4 ^{b,c}	112 \pm 11 ^b	103 \pm 8 ^d	90 \pm 4 ^b
OVA_{n2}	114 \pm 5 ^{c,d}	141 \pm 10 ^c	113 \pm 4 ^e	94 \pm 2 ^b
CLA	101 \pm 9 ^{a,b}	86 \pm 10 ^a	22,1 \pm 0,6 ^b	10,4 \pm 0,1 ^a
OVA-CLA	91 \pm 4 ^a	84 \pm 8 ^a	11 \pm 1 ^a	7,6 \pm 0,1 ^a
OVA_{n1}-CLA	96 \pm 2 ^{a,b}	78 \pm 4 ^a	25 \pm 2 ^b	7,9 \pm 0,6 ^a
OVA_{n2}-CLA	94 \pm 3 ^a	84 \pm 3 ^a	60 \pm 3 ^c	8,0 \pm 0,9 ^a

Otros autores hallaron valores de IC₅₀ para CLA menores a los hallados en la presente tesis. Beppu y col. (2006) estudiaron la capacidad citotóxica sobre células HT-29 de cuatro isómeros de CLA: *cis9*, *cis11*; *cis9*, *trans11*; *trans9*, *trans11* y *trans10*, *cis12*, hallando que solo el isómero *trans9*, *trans11* generó una reducción en la viabilidad del 40% luego de 72 h a una concentración de 100 μM [220]. Otro ensayo sobre las mismas células mostró que 20 μM de CLA (cuya composición en isómeros

fue 50,7% *trans*₁₀, *cis*₁₂; 47,2% *cis*₉, *trans*₁₁ y 1,2% *trans*, *trans*) fue capaz de disminuir la viabilidad en un 55% luego de 96 h de exposición [221]. En otro estudio, se determinó el valor de IC₅₀ para los isómeros *cis*₉, *trans*₁₁; *trans*₁₀, *cis*₁₂ y la mezcla de los mismos hallando valores de IC₅₀ de 118, 103 y 135 μM respectivamente frente a la línea celular HT-29 luego de 72 h de exposición [222]. El CLA utilizado en la presente tesis es una mezcla de los isómeros *cis* y *trans* 9,11 y 10,12, sin conocer la proporción de cada isómero presente. Las diferencias en los valores de IC₅₀ comparado con otros estudios podría deberse a las diferentes composiciones en los isómeros de CLA ensayados.

7.4.2.2. Determinación de muerte celular mediante citometría de flujo

A partir de los resultados hallados en el ensayo de citotoxicidad sobre células HT-29, se decidió examinar el CLA y los nanocomplejos de inclusión (OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA) por citometría de flujo a fin de obtener conocimiento respecto del mecanismo de muerte celular. Para ello, se utilizó la concentración de 500 μM de CLA, dado que fue en la que se encontró diferencias significativas del % de viabilidad celular para CLA y alguno de los nanocomplejos de inclusión. Dado que los sistemas proteicos puros no mostraron citotoxicidad, no se realizó este ensayo con los mismos.

Como se describió en la Sección 7.2.5.2, se utilizó una doble marcación de las células HT-29 con Anexina V-FITC e IP, lo que permitió distinguir cuatro poblaciones celulares: células vivas (Anexina V-FITC-/IP-), células en apoptosis temprana (Anexina V-FITC+/IP-), células en apoptosis tardía (Anexina V-FITC+/IP+) y células en necrosis (Anexina V-FITC-/IP+) (Fig. 58, Tabla 15).

Como se observa en la Tabla 15, el control basal mostró un alto porcentaje de células vivas (87,5%) y una baja cantidad de células en apoptosis (<10%) y necrosis (3%). En el caso del CLA, solo el 31% de las células permanecieron vivas, un 66% fueron células en apoptosis y un 3,1% en necrosis. Para el nanocomplejo OVA-CLA, 19% de las células permanecieron vivas, 76% en apoptosis y 4% en necrosis. En el caso de OVA_{n1}-CLA, se halló 14 % de células vivas, 83% de apoptóticas y 3 % de necróticas. Para el nanocomplejo OVA_{n2}-CLA, las células vivas fueron 54%, mientras que las apoptóticas fueron 44% y las necróticas 1,5%.

Estos resultados estuvieron en concordancia con los hallados para citotoxicidad mediante ensayo de XTT, donde el nanocomplejo OVA_{n2}-CLA mostró la menor citotoxicidad para la concentración aquí ensayada. Es importante resaltar, que no hubo diferencias entre los valores de necrosis para CLA y los nanocomplejos de inclusión

respecto del control basal. Esto indicaría que los nanocomplejos no provocaron muerte celular por necrosis, considerado como un mecanismo indeseado debido a la extravasación de material celular y consiguiente inflamación del tejido circundante. Tanto CLA como los nanocomplejos de inclusión indujeron muerte celular activando mecanismos de apoptosis, siendo OVA_{n1}-CLA el nanocomplejo que indujo el mayor % de apoptosis (83 %), con la menor cantidad de células vivas (14%). Por último, el índice de apoptosis representa una relación entre el porcentaje de apoptosis generada por el CLA o los nanocomplejos de inclusión respecto del porcentaje de apoptosis basal. Como se observa en la [Tabla 15](#), el menor índice lo presentó OVA_{n2}-CLA y esto podría explicarse debido a una menor liberación de CLA dado que esta nanopartícula presentó el mayor tamaño. OVA-CLA y OVA_{n1}-CLA mostraron los mayores índices de apoptosis ($p > 0,05$), incluso superiores al hallado para CLA. Más aun, el nanocomplejo OVA-CLA, que presentó un elevado índice de apoptosis fue resistente a las condiciones del TGI, por lo que dicho sistema sería muy prometedor como sistema de *delivery* a colon para ejercer allí sus propiedades antitumorales.

Es importante destacar que estos resultados están de acuerdo con los mecanismos de citotoxicidad propuestos para CLA por diferentes autores y descritos en la [Sección 7.1.4](#), donde CLA induciría la muerte celular por apoptosis, por ejemplo, inhibiendo la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 o estimulando la expresión de los genes p53 y p21, o influyendo en la actividad de diferentes caspasas.

Tabla 15. Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y en necrosis para CLA, OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA. Además, se muestra el índice de apoptosis calculado para cada uno de los sistemas ensayados. Los valores se muestran como media \pm desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

	Células vivas (Q4)	Apoptosis temprana (Q1)	Apoptosis tardía (Q2)	Necrosis (Q3)	Índice de apoptosis
Basal	87,5 \pm 0,4 ^d	5 \pm 1 ^a	4,4 \pm 0,5 ^a	3 \pm 2 ^{a,b}	-
CLA	31 \pm 1 ^b	35 \pm 2 ^c	31 \pm 2 ^c	3,1 \pm 0,2 ^{a,b}	7,10 \pm 0,01 ^b
OVA-CLA	19 \pm 5 ^a	39 \pm 3 ^d	37 \pm 3 ^d	4 \pm 1 ^b	8,2 \pm 0,6 ^c
OVA_{n1}-CLA	14 \pm 2 ^a	32 \pm 3 ^c	51 \pm 1 ^e	3 \pm 0,5 ^{a,b}	8,8 \pm 0,2 ^c
OVA_{n2}-CLA	54 \pm 5 ^c	22 \pm 2 ^b	22 \pm 2 ^b	1,5 \pm 0,9 ^a	4,7 \pm 0,5 ^a

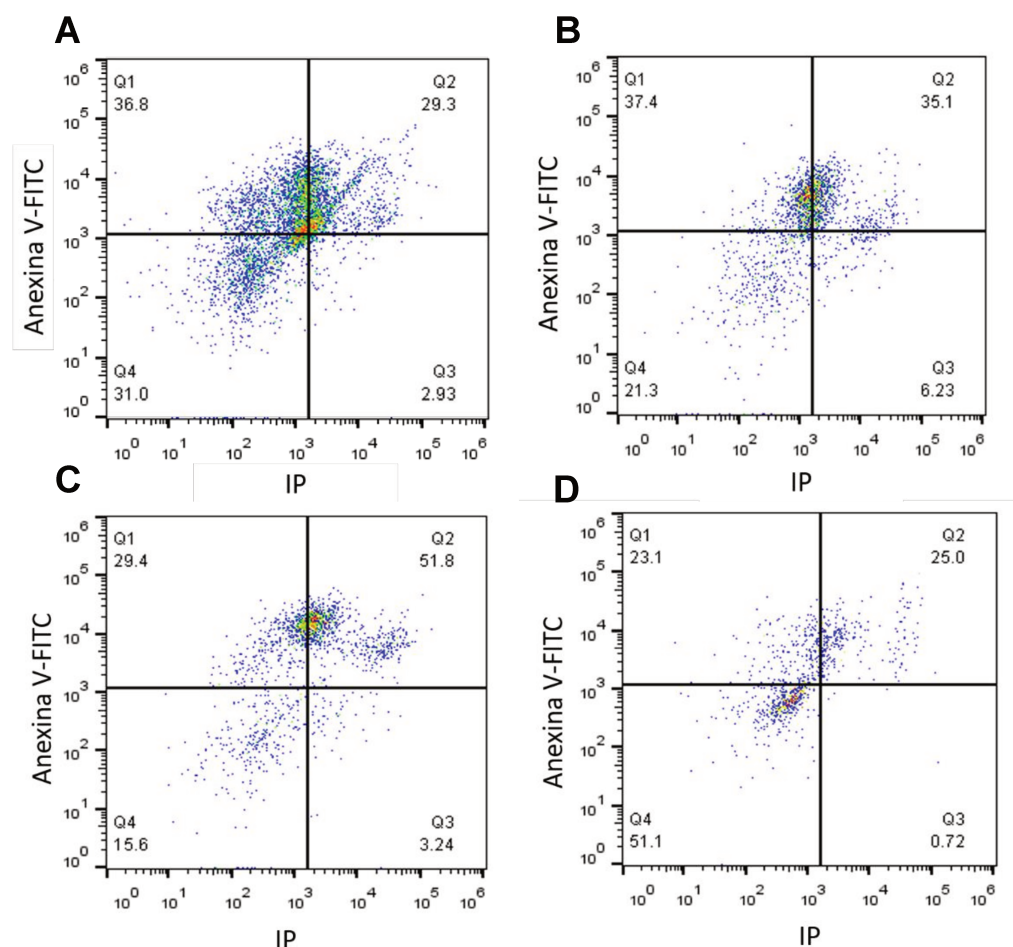


Figura 58. Gráficos *dot plot* representativos de la determinación de muerte celular por apoptosis y/o necrosis mediante citometría de flujo utilizando los marcadores Anexina V-FITC e IP para CLA (A), OVA-CLA (B), OVA_{n1}-CLA (C) y OVA_{n2}-CLA (D). En cada imagen Q1 representa células en apoptosis tempranas (Anexina V-FITC⁺/IP⁻), Q2 células en apoptosis tardía (Anexina V-FITC⁺/IP⁺), Q3 células en necrosis (Anexina V-FITC⁻/IP⁺) y Q4 células vivas (Anexina V-FITC⁻/IP⁻).

7.5. CONCLUSIÓN PARCIAL

En el presente capítulo, se estudió la digestión de OVA y sus nanopartículas derivadas utilizando un sistema de digestión gastrointestinal *in vitro* reducido. A partir del mismo, se observó que OVA fue resistente a la digestión estomacal con pepsina a pH 3,0 y que durante la digestión intestinal a pH 7,0 sufrió una hidrólisis específica generando un fragmento de 40 kDa. A diferencia de esto, las nanopartículas experimentaron un alto grado de hidrólisis a nivel estomacal por acción de la pepsina, lo que podría deberse a la exposición de sitios de clivaje específicos para dicha enzima. A nivel intestinal, las nanopartículas sufrieron una hidrólisis total. Sin embargo, sería posible que los péptidos resultantes posean la capacidad de interactuar entre

ellos y precipitar, hecho que se confirmó por la apariencia macroscópica de los sistemas digeridos.

Al analizar la R_{CLA} , se observó que OVA, altamente resistente a la digestión, fue capaz de retener 82% luego de la digestión gástrica y 63% luego de la intestinal, pudiendo proponerse como un sistema de *delivery* capaz de resistir las condiciones del TGI y generar una acción local a nivel de colon. En cuanto a las nanopartículas, éstas fueron capaces de retener alrededor de 95% de CLA luego de la digestión gástrica y 90% en el caso de OVA_{n1} u 80% en el caso de OVA_{n2} luego de la digestión intestinal. Sin embargo, estas nanopartículas fueron hidrolizadas y, posiblemente, la elevada retención de CLA se debió a su precipitación junto con los péptidos. A pesar de ello, su capacidad de solubilizar CLA, los hace prometedores como sistemas de *delivery* intestinales. Allí, CLA podría formar micelas mixtas que serían absorbidas por el enterocito, y finalmente formar parte de los quilomicrones y ser transportado a la circulación para cumplir diferentes funciones.

Finalmente, la capacidad citotóxica de sistemas proteicos puros y nanocomplejos de inclusión fue probada en la línea celular HT-29 de carcinoma de colon humano mediante ensayo XTT. Los sistemas proteicos puros no mostraron efectos citotóxicos sobre dicha línea celular. Además, CLA y los nanocomplejos de inclusión OVA-CLA y OVA_{n1} -CLA mostraron una curva de inhibición sigmoidea con valores de IC_{50} entre 360 y 380 μM , mientras que el sistema OVA_{n2} -CLA mostró un valor de IC_{50} de 570 μM , pudiendo atribuirse esto a la menor liberación de CLA por parte de OVA_{n2} (posiblemente debido a su mayor tamaño). Es importante resaltar, que el efecto citotóxico se debió al CLA y que tanto OVA como sus nanopartículas actuarían como sistemas de *delivery* con una gran capacidad de solubilizar este compuesto hidrofóbico. Los ensayos de citometría de flujo permitieron determinar que el principal mecanismo de muerte tanto para CLA como para los nanocomplejos de inclusión fue por apoptosis, siendo la necrosis igual al control basal. Esto resulta de gran interés ya que la apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada y no genera una reacción inflamatoria como lo hace la necrosis. El nanocomplejo OVA_{n1} -CLA fue el que mostró el mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis. Sin embargo, este nanocomplejo no mantuvo su integridad bajo condiciones de digestión gastrointestinal. Por otro lado, el índice de apoptosis para OVA-CLA fue igual que para OVA_{n1} -CLA, pero resistió en gran medida la digestión gastrointestinal, lo que lo hace un buen candidato para el *delivery* de CLA a colon de manera de ejercer allí una función local.

8. CONCLUSIÓN

En la presente tesis doctoral, se logró reunir conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, para la obtención de nanocomplejos de inclusión y nanopartículas biopoliméricas (NPB) para el *delivery*, protección y liberación de compuestos bioactivos (CB) hidrofóbicos. Se logró encapsular con nanopartículas de ovoalbúmina (OVA) los CBs retinol (RET), ácido linoleico (LA) y su isómero ácido linoleico conjugado (CLA), ambos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) esenciales.

Se desarrollaron dos nanopartículas a partir de una proteína de gran disponibilidad local como OVA mediante tratamiento térmico controlado. Utilizando condiciones de pH y concentración diferentes se obtuvieron dos nanopartículas de diferentes tamaños (OVA_{n2} de 92 nm y OVA_{n1} de 24,6 nm).

En primer lugar, se estudió la unión entre RET, OVA y OVA_{n2}. Si bien OVA_{n2} unió una menor cantidad de RET que OVA, lo protegió frente a la luz y el O₂ en mayor medida. Posteriormente, se diseñó una NPB entre OVA, OVA_{n2} y PAM. Al estudiar la estabilidad fotoquímica de RET en ambos sistemas se concluyó que la NPB formada entre PAM y OVA_{n2} era superior al sistema formado con OVA, con una protección 42% mayor.

Posteriormente, se estudió la capacidad de OVA_{n1} y OVA_{n2} de unir LA y su isómero estructural CLA. Se demostró que ambas nanopartículas fueron capaces de unir más cantidad de ambos PUFAs que OVA y, además, fueron capaces de unir más LA que CLA. Este último resultado indicaría que la estructura del PUFA sería muy importante en el mecanismo de unión con las nanopartículas. Desde un punto de vista molecular, la estructura específica de cada PUFA, podría promover diferentes conformaciones tridimensionales que impactarían en la cantidad de PUFA unida a las nanopartículas.

Finalmente se estudió la capacidad de OVA, OVA_{n1} y OVA_{n2} de transportar CLA en el tracto gastrointestinal. El estudio de los sistemas bajo un protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* consenso resultó en que más del 97% del CLA permaneció retenido en las nanopartículas luego de la etapa intestinal. No obstante, dado que la relación enzima:sustrato utilizada fue muy alta, no se pudo realizar el análisis de la digestión proteica mediante SDS-PAGE, ni la determinación de la distribución de tamaño de los sistemas debido a la existencia de un fenómeno de precipitación.

Por ello, en una etapa posterior, se utilizó un protocolo de digestión gastrointestinal *in vitro* reducido, adecuando la relación enzima:sustrato para sistemas en regímenes diluidos como es el caso de los nanocomplejos de inclusión examinados. En este caso, se observó que OVA fue muy resistente a la digestión gástrica y durante la digestión intestinal se liberó un fragmento de 40 kDa que mantendría similares características a las de OVA. Posiblemente, esto fue responsable

de la alta retención de CLA (63%) luego de la fase intestinal. El nanocomplejo OVA-CLA sería muy promisorio para la solubilización y *delivery* de CLA a colon para que ejerza allí una función local. Por el contrario, las nanopartículas mostraron una gran susceptibilidad a la digestión tanto gástrica como intestinal. Sin embargo, estos nanocomplejos de inclusión podrían potencialmente ser empleados como sistemas de *delivery* de CLA, ya que poseen una gran capacidad de solubilización del mismo. Por otro lado, si las nanopartículas liberasen el CLA en el intestino delgado podrían favorecer su absorción por el enterocito y de esa manera cumplir una función sistémica. Esto remarca la importancia de la comprensión del sistema de digestión gastrointestinal *in vitro* y la capacidad de adecuar el protocolo consenso para el sistema en estudio, de manera de obtener resultados más representativos.

Finalmente se estudió la capacidad citotóxica de los nanocomplejos de inclusión, mediante ensayos de XTT y citometría de flujo sobre la línea celular de cáncer de colon HT-29. Se observó que los sistemas proteicos puros no fueron citotóxicos y que tanto los nanocomplejos de inclusión como CLA mostraron una respuesta dosis-dependiente. En ambos ensayos, OVA_{n2}-CLA generó el mayor % de viabilidad celular, pudiendo esto atribuirse a su mayor tamaño y por ello una menor liberación de CLA. Además, el mecanismo de muerte celular para estos nanocomplejos de inclusión fue por apoptosis, siendo esto muy importante ya que no se generaría una reacción inflamatoria en el entorno del tumor. Además, el sistema OVA-CLA mostró el mayor índice de apoptosis y, dado que el mismo fue resistente a la digestión gastrointestinal, sería promisorio como sistema de *delivery* a colon de manera que el CLA cumpla allí su acción local.

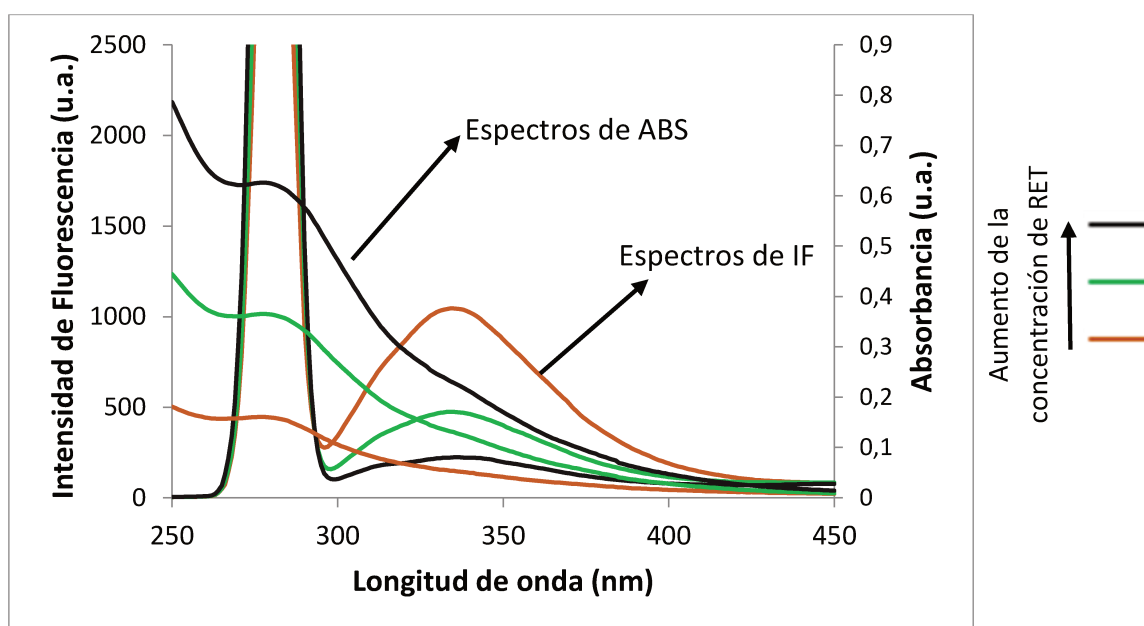
Por último, es importante remarcar que estos sistemas de encapsulación con gran capacidad de solubilización y unión de CBs hidrofóbicos, podrían utilizarse como estrategia para diseñar nanoingredientes funcionales para alimentos. Una vez incorporados en un producto alimenticio y al ser ingerido podrían transportar el CB encapsulado a diferentes sitios de acción para cumplir su función benéfica. En el caso del RET, la encapsulación lo solubilizó y protegió frente a condiciones como el O₂ y la luz, lo que lo hace un sistema muy prometedor para su inclusión en alimentos como un ingrediente funcional que podría ayudar a suplir los problemas de deficiencia de esta vitamina. También estos sistemas podrían ser de utilidad en la industria cosmética por la capacidad de proteger al RET. Por otro lado, el CLA es un CB de capacidad citotóxica comprobada. Los sistemas de encapsulación aquí desarrollados mostraron una gran capacidad de solubilización y potencialmente la capacidad de protegerlo frente a condiciones injuriantes como el O₂ y la luz. La incorporación de estos sistemas de encapsulación en alimentos como ingredientes funcionales, permitirían el *delivery*

de CLA ya sea a colon, para ejercer una función local, o a intestino, para cumplir posiblemente una función sistémica en la prevención de cáncer de colon u otras patologías en las que el mismo estaría involucrado.

9. APÉNDICE

9.1. Efecto de filtro interno en los sistemas proteína-retinol

En el siguiente gráfico se muestra un ejemplo de filtro interno, donde se observa el espectro de IF para el nanocomplejo OVA_{n2} -RET y de ABS para RET vs. λ . Este gráfico en particular es para la titulación de OVA_{n2} con tres concentraciones de RET. El mismo color en la curva de ABS e IF indican la misma concentración de RET. Como se observa, el RET mostró ABS a 280 nm y continuó absorbiendo hasta los 400 nm aproximadamente. Dado que 280 nm fue la λ usada para excitar el Trp en los experimentos de fluorescencia se produjo efecto de filtro interno, ya que el RET absorbió y la cantidad de luz que llegó a la muestra se vio reducida por este efecto. El espectro de emisión del Trp mostró un pico entre 300 y 400 nm que también se superpuso con la ABS del RET generando un efecto de filtro interno ya que la emisión del Trp fue en parte absorbida por el RET y se redujo la cantidad de luz que llegó al detector. Esta superposición de los espectros de IF y ABS hizo necesario realizar la corrección por el efecto de filtro interno al trabajar con RET.

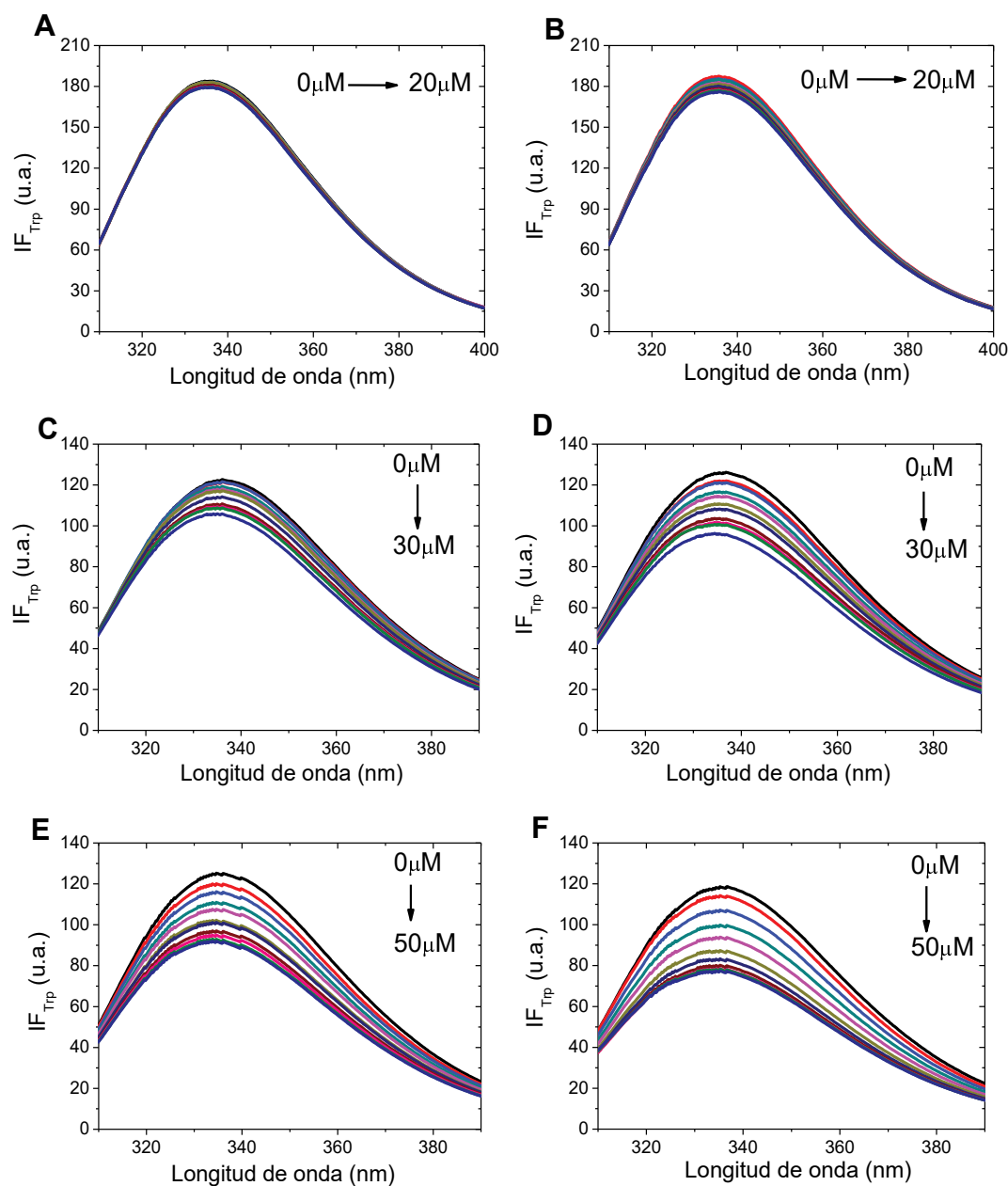


9.2. Espectros de fluorescencia para los nanocomplejos proteína-ácidos grasos poliinsaturados

9.2.1. Fluorescencia intrínseca

En la siguiente figura se observa el efecto sobre la intensidad de la IF_{Trp} para OVA causada por LA (A) y CLA (B), para OVA_{n1} causada por LA (C) y CLA (D) y para

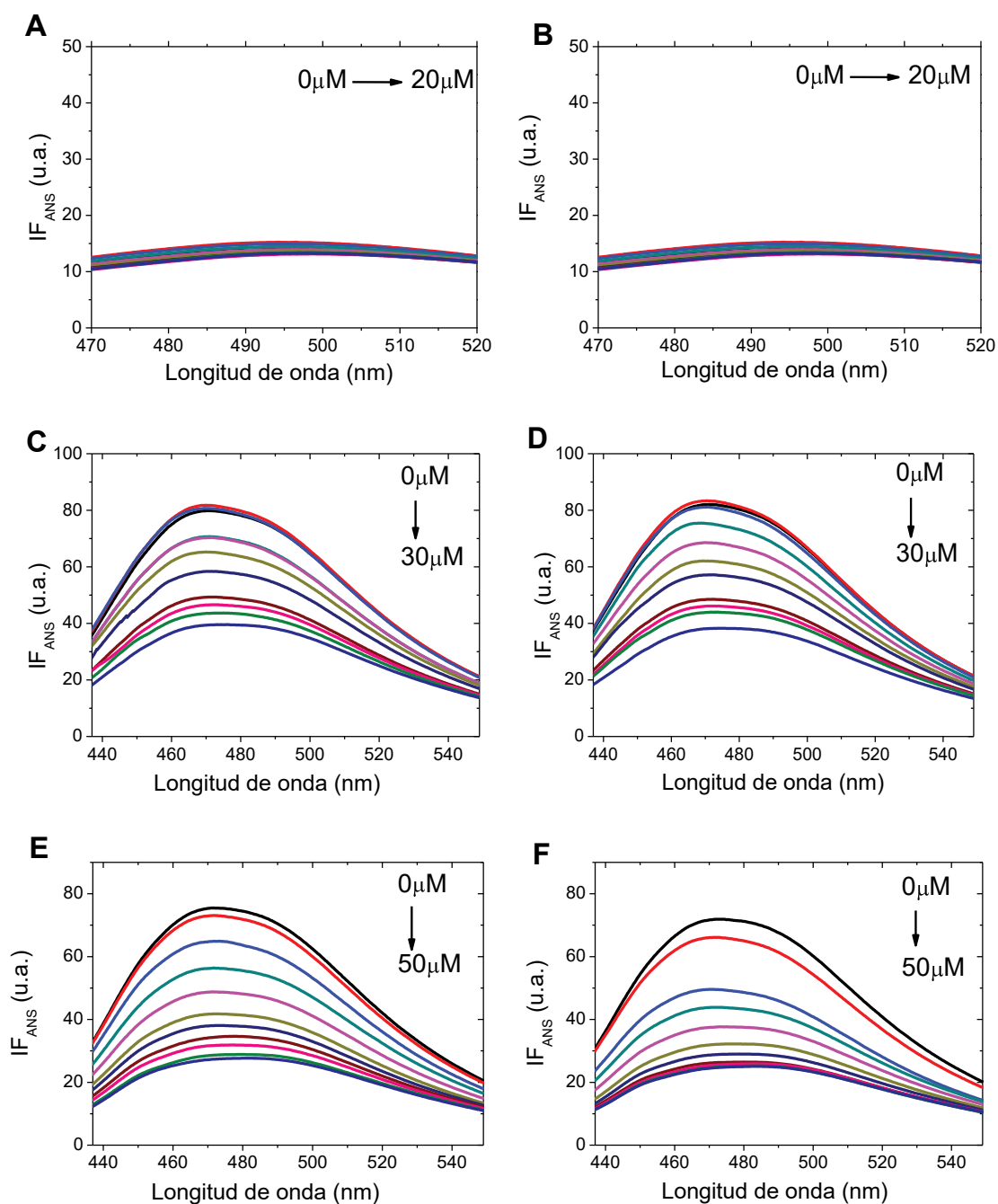
OVA_{n2} causada por LA (E) y CLA (F). La concentración de LA y CLA fue 20 μM para OVA, 30 μM para OVA_{n1} y 50 μM para OVA_{n2}. Condiciones: Concentración de proteína: 1 μM , buffer fosfato pH 7,0 50 mM, temperatura: 20°C.



9.2.2. Fluorescencia extrínseca

En la siguiente figura se observa el efecto sobre la IF_{ANS} para OVA causada por LA (A) y CLA (B), para OVA_{n1} por LA (C) y CLA (D) y para OVA_{n2} por LA (E) y CLA (F). La concentración de LA y CLA fue 20 μM para OVA, 30 μM para OVA_{n1} y 50 μM para

OVA_{n2}. Condiciones: Concentración de proteína: 1 μM , buffer fosfato pH 7,0 50 mM, concentración de ANS: 45 μM , temperatura: 20°C.

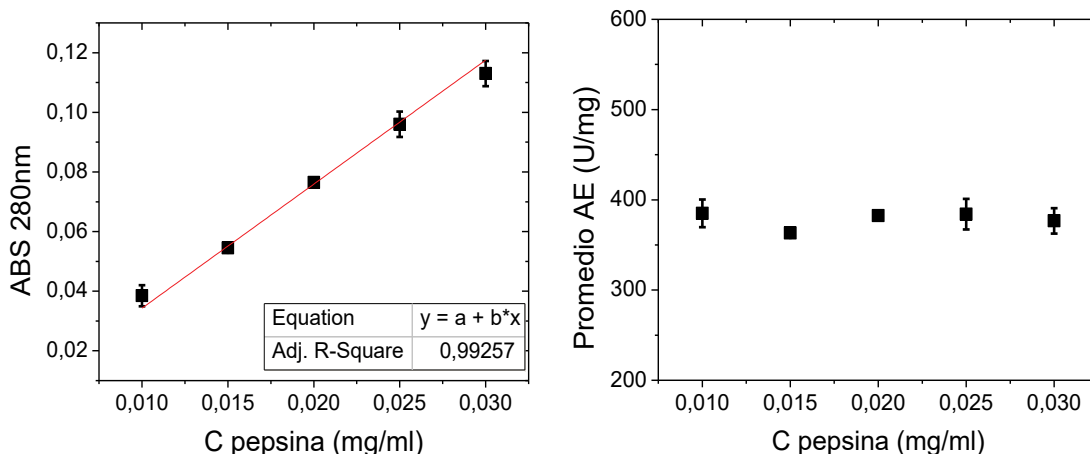


9.3. Actividades enzimáticas

9.3.1. Pepsina

En la siguiente imagen se muestra a modo de ejemplo los resultados para una determinación de actividad enzimática de la pepsina. En la imagen de la izquierda se observó un aumento lineal de la ABS a 280 nm a medida que aumentó la

concentración de pepsina. Para determinar la actividad enzimática a partir de estos datos de ABS fue necesario que se cumpla esta linealidad. A partir de ellos se calculó la AE, la cual debe ser igual para todas las concentraciones de enzima usadas en el ensayo (al menos 5 concentraciones), esto se observa en la imagen de la derecha donde se obtiene una recta.

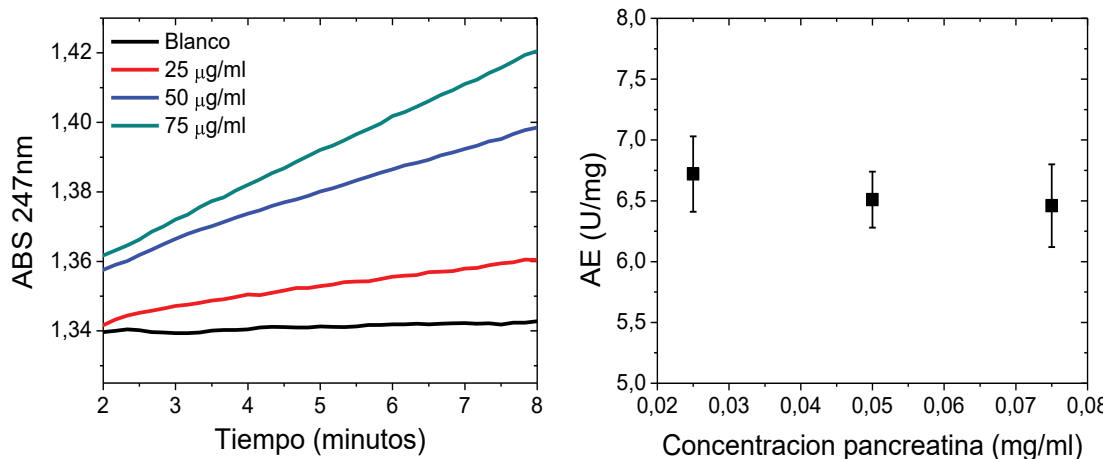


En la siguiente tabla se muestra la variación de la actividad de la pepsina en el tiempo. Si bien la misma no se determinó cada 6 meses, la enzima no fue usada si estaba fuera de este período. Como puede observarse al cabo de 2 años la AE cayó 25 U/mg, lo que corresponde a que la enzima mantiene un 93,5% de la AE inicial.

Fecha	Actividad Pepsina (U/mg)
05/2017	403 ± 15
02/2018	392 ± 12
10/2018	385 ± 15
06/2019	378 ± 8

9.3.2. Pancreatina

En la siguiente imagen se muestra a modo de ejemplo los resultados para una determinación de actividad enzimática tripsina de la pancreatina. Como se observa en la imagen de la izquierda la pendiente para el blanco de reacción fue prácticamente cero y a medida que aumentó la concentración de enzima usada, aumentó la pendiente de la recta. Cada una de estas determinaciones se realizó por triplicado. A partir de esta pendiente se calculó la AE. La AE hallada para al menos dos concentraciones debe ser igual, como se observa en la figura de la derecha.



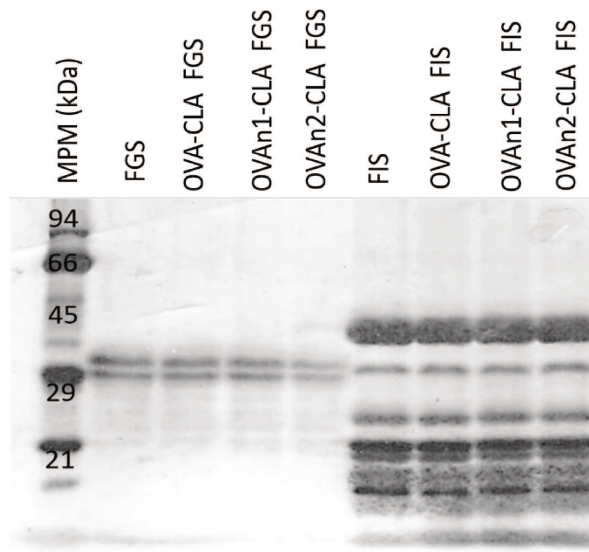
En la siguiente tabla se muestra la variación de la actividad tripsina de la pancreatina en el tiempo. Si bien la misma no se determinó cada 6 meses, la enzima no fue usada si estaba fuera de este período. Como puede observarse al cabo de 2 años la AE cayó 1,3 U/mg, lo que corresponde a que la enzima mantiene un 83,5% de la AE inicial.

Fecha	Act Tripsina (U/mg)
05/2017	7.9 ± 0.4
02/2018	7.2 ± 0.8
10/2018	6.9 ± 0.5
06/2019	6.6 ± 0.3

9.4. SDS-PAGE utilizando el sistema de digestión *in vitro* consenso

En la siguiente imagen se muestra el gel SDS-PAGE para los sistemas OVA-CLA, OVA_{n1}-CLA y OVA_{n2}-CLA luego de la digestión gástrica con FGS + pepsina (FGS) y FIS + pancreatina + sal biliar (FIS). También se muestran como controles los medios simulados FGS + pepsina y FIS + pancreatina + sal biliar. En el control FGS + pepsina, se observaron dos bandas alrededor de 35 y 31 kDa y en el control FIS + pancreatina + sal biliar se observaron muchas bandas de 45 kDa hacia menores PM. Muchas de las bandas observadas, correspondieron a los PM de las enzimas presentes en los medio simulados, las que coincidieron con lo informado por otros autores [172], [174], [253]. Como se observa, no se encontró diferencia entre las bandas que corresponden a los medios simulados con las enzimas y las calles donde se encuentran los sistemas proteína-CLA. Esto indica que solo se observó la composición de los medios simulados y no fue posible detectar bandas proteicas o

productos de la digestión de los sistemas proteicos de OVA, posiblemente debido a una gran proporción de enzima respecto del sustrato proteico.



10. BIBLIOGRAFIA

- [1] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering (2004), What are nanoscience and nanotechnologies?, En *Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties* 5-7.
- [2] European Commission (2011), Recommendation on the Definition of a Nanomaterial, En *Official Journal of the European Union: Legislation*, L 275: 38-40.
- [3] M Cushen, J Kerry, M Morris, M Cruz-Romero and E Cummins (2012) Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends Food Sci. Techn.* 24 (1): 30-46.
- [4] IJ Joye, G Davidov-Pardo and DJ McClements (2014) Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends Food Sci. Tech.* 40 (2): 168-182.
- [5] MA Robles-García, F Rodríguez-Félix, E Márquez-Ríos, JA Aguilar, A Barrera-Rodríguez, J Aguilar, S Ruiz-Cruz and CL Del-Toro-Sánchez (2016) Applications of Nanotechnology in the Agriculture, Food, and Pharmaceuticals. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16 (8): 8188-8207.
- [6] SD Caruthers, SA Wickline and GM Lanza (2007) Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (1): 26-30.
- [7] JH Sakamoto, BR Smith, B Xie, SI Rokhlin, SC Lee and M Ferrari (2005) The Molecular Analysis of Breast Cancer Utilizing Targeted Nanoparticle Based Ultrasound Contrast Agents. *Technol. Cancer Res. Treat.* 4 (6): 627-636.
- [8] WJ Gradishar (2006) Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin. Pharmacother.* 7 (8): 1041-1053.
- [9] A Fontana, B Spolaore and P Polverino de Laureto (2013) The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochim Biophys Acta* 1834 (6): 1125-1143.
- [10] S Ray, U Raychaudhuri and R Chakraborty (2016) An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci* 13: 76-83.
- [11] P Zimet and YD Livney (2009) Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocoll* 23 (4): 1120-1126.
- [12] C Anandharamakrishnan (2014), Capítulo 1, Nanoencapsulation of Food Bioactive Compounds En *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*, (RW Hartel, JP Clark, JW Finley, D Rodriguez-Lazaro and D Topping), New York, Springer: 1-6.
- [13] F Yu, Y Li, CS Liu, Q Chen, GH Wang, W Guo, XE Wu, DH Li, WD Wu and XD Chen (2015) Enteric-coated capsules filled with mono-disperse micro-particles containing PLGA-lipid-PEG nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int J Pharm* 484 (1-2): 181-191.
- [14] IJ Joye and DJ McClements (2014) Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Curr Opin Colloid In Sci* 19 (5): 417-427.
- [15] A Matalanis, OG Jones and DJ McClements (2011) Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocoll* 25 (8): 1865-1880.
- [16] GH Shin, JT Kim and HJ Park (2015) Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends Food Sci. Tech.* 46 (1): 144-157.
- [17] F Tamjidi, M Shahedi, J Varshosaz and A Nasirpour (2013) Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Inno Food Sci Emerg Technol* 19: 29-43.
- [18] X Xie, Q Tao, Y Zou, F Zhang, M Guo, Y Wang, H Wang, Q Zhou and S Yu (2011) PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms. *J Agric Food Chem* 59 (17): 9280-9289.
- [19] N Kamaly, Z Xiao, PM Valencia, AF Radovic-Moreno and OC Farokhzad (2012) Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* 41 (7): 2971-3010.

- [20] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara and LG Santiago (2015) Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 128: 219-226.
- [21] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara and LG Santiago (2016) Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chem* 211: 819-826.
- [22] G Davidov-Pardo, IJ Joye and DJ McClements (2015) Food-grade protein-based nanoparticles and microparticles for bioactive delivery: fabrication, characterization, and utilization. *Adv Protein Chem Struct Biol* 98: 293-325.
- [23] IT Norton, DA Jarvis and TJ Foster (1999) A molecular model for the formation and properties of fluid gels. *Int. J. Biol. Macromol.* 26 (4): 255-261.
- [24] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara and LG Santiago (2015) Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocoll* 48: 165-173.
- [25] S Le Maux, S Bouhallab, L Giblin, A Brodkorb and T Croguennec (2013) Complexes between linoleate and native or aggregated beta-lactoglobulin: interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. *Food Chem* 141 (3): 2305-2313.
- [26] AA Perez, RB Andermatten, AC Rubiolo and LG Santiago (2014) beta-Lactoglobulin heat-induced aggregates as carriers of polyunsaturated fatty acids. *Food Chem* 158: 66-72.
- [27] JB Ferrado, AA Perez, FF Visentini, GA Islan, GR Castro and LG Santiago (2019) Formation and characterization of self-assembled bovine serum albumin nanoparticles as chrysin delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* 173: 43-51.
- [28] DJ McClements (2002) Theoretical prediction of emulsion color. *Adv Colloid Interface Sci* 97 (1): 63-89.
- [29] YD Livney (2012), Capítulo 10, Biopolymeric amphiphiles and their assemblies as functional food ingredients and nutraceutical delivery systems, En *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, (N Garti and DJ McClements), Woodhead Publishing: 252-286.
- [30] C Blayo, S Marchal, R Lange and E Dumay (2014) Retinol binding to β -lactoglobulin or phosphocasein micelles under high pressure: Effects of isostatic high-pressure on structural and functional integrity. *Food Res Int* 55: 324-335.
- [31] HR Jiang and N Liu (2010) Self-assembled beta-lactoglobulin-conjugated linoleic acid complex for colon cancer-targeted substance. *J Dairy Sci* 93 (9): 3931-39.
- [32] A Belatik, S Hotchandani, J Bariyanga and HA Tajmir-Riahi (2012) Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins. *Eur J Med Chem* 48: 114-123.
- [33] CVL Giosafatto, NM Rigby, N Wellner, M Ridout, F Husband and AR Mackie (2012) Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. *Food Hydrocoll* 26 (1): 261-267.
- [34] M Weijers, LMC Sagis, C Veerman, B Sperber and E van der Linden (2002) Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocoll* 16 (3): 269-276.
- [35] T Croguennec, A Renault, S Beaufiles, JJ Dubois and S Pezenec (2007) Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *J Colloid Interface Sci* 315 (2): 627-36.
- [36] H Shinohara, T Iwasaki, Y Miyazaki, K Matsuo, T Aoki, M Matsumoto, T Oka, J Kurisaki, K Mizumachi, T Kusakabe, K Koga and Y Sugimoto (2005) Thermostabilized ovalbumin that occurs naturally during development accumulates in embryonic tissues. *Biochim Biophys Acta* 1723 (1-3): 106-113.
- [37] PE Stein, AGW Leslie, JT Finch and RW Carrell (1991) Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 221 (3): 941-959.
- [38] M Weijers, PA Barneveld, MA Cohen Stuart and RW Visschers (2003) Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Sci.* 12 (12): 2693-2703.

- [39] M Yamasaki, N Takahashi and M Hirose (2003) Crystal structure of S-ovalbumin as a non-loop-inserted thermostabilized serpin form. *J Biol Chem* 278 (37): 35524-35530.
- [40] JA Huntington and PE Stein (2001) Structure and properties of ovalbumin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 756 (1): 189-198.
- [41] OG Jones, EA Decker and DJ McClements (2009) Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocoll* 23 (5): 1312-1321.
- [42] N Matsudomi, H Takahashi and T Miyata (2001) Some structural properties of ovalbumin heated at 80°C in the dry state. *Food Res Int* 34 (2): 229-235.
- [43] K Nyemb, C Guerin-Dubiard, D Dupont, J Jardin, SM Rutherford and F Nau (2014) The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. *Food Chem* 157: 429-438.
- [44] Y Liu, Y Cai, D Ying, Y Fu, Y Xiong and X Le (2018) Ovalbumin as a carrier to significantly enhance the aqueous solubility and photostability of curcumin: Interaction and binding mechanism study. *Int. J. Biol. Macromol.* 116: 893-900.
- [45] Y Liu, D Ying, Y Cai and X Le (2017) Improved antioxidant activity and physicochemical properties of curcumin by adding ovalbumin and its structural characterization. *Food Hydrocoll* 72: 304-311.
- [46] A Guaadaoui, S Benaicha, N Elmajdoub, M Bellaoui and A Hamal (2014) What is a Bioactive Compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 3 (3): 174-179.
- [47] M Gonnet, L Lethuaut and F Boury (2010) New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J Control Release* 146 (3): 276-290.
- [48] Z Teng, Y Luo and Q Wang (2013) Carboxymethyl chitosan–soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chem* 141 (1): 524-532.
- [49] Y Luo, Z Teng and Q Wang (2012) Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. *J Agr Food Chem* 60 (3): 836-843.
- [50] C Manach, A Scalbert, C Morand, C Rémésy and L Jiménez (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79 (5): 727-747.
- [51] A-M Oancea, I Aprodu, IO Ghinea, V Barbu, E Ioniță, G Bahrim, G Râpeanu and N Stănciuc (2017) A bottom-up approach for encapsulation of sour cherries anthocyanins by using β -lactoglobulin as matrices. *J. Food Eng.* 210: 83-90.
- [52] CG da Rosa, MV de Oliveira Brisola Maciel, SM de Carvalho, APZ de Melo, B Jummes, T da Silva, SM Martelli, MA Villetti, FC Bertoldi and PLM Barreto (2015) Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. *Colloid and Surf A: Physicochem Eng Asp* 481: 337-344.
- [53] DA Bender (2003), Capítulo 1, The Vitamins, En *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, (DA Bender), Cambridge, Cambridge University Press: 1-29.
- [54] SB Dergal (2006), Capítulo 6, Vitaminas y nutrientes inorgánicos, En *Química de los alimentos*, (SB Dergal), Mexico, Pearson Educacion: 363-400.
- [55] N Noy (2015) Signaling by retinol and its serum binding protein. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 93: 3-7.
- [56] CB Stephensen (2001) Vitamin a, infection, and immune function. *Annu. Rev. Nutr* 21 (1): 167-192.
- [57] H Sun and R Kawaguchi (2011) The membrane receptor for plasma retinol-binding protein, a new type of cell-surface receptor. *Int Rev Cell Mol Biol* 288: 1-41.
- [58] DA Bender (2003), Capítulo 3, Vitamin A: Retinoids and Carotenoids, En *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*, (DA Bender), Cambridge, Cambridge University Press: 30-76.

- [59] A Akhavan and J Levitt (2008) Assessing retinol stability in a hydroquinone 4%/retinol 0.3% cream in the presence of antioxidants and sunscreen under simulated-use conditions: a pilot study. *Clin Ther* 30 (3): 543-547.
- [60] SM Loveday and H Singh (2008) Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends Food Sci. Tech.* 19 (12): 657-668.
- [61] SM O'Byrne and WS Blaner (2013) Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res* 54 (7): 1731-43.
- [62] JJM Castenmiller and CE West (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu. Rev. Nutr* 18 (1): 19-38.
- [63] A Sommer and FR Davidson (2002) Assessment and Control of Vitamin A Deficiency: The Anney Accords. *J. Nutr* 132 (9): 2845-2850.
- [64] MC Allwood and JH Plane (1986) The wavelength-dependent degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation. *Int. J. Pharm.* 31 (1): 1-7.
- [65] N Failloux, I Bonnet, E Perrier and M-H Baron (2004) Effects of light, oxygen and concentration on vitamin A1. *J. Raman Spectrosc* 35 (2): 140-147.
- [66] N Vilanova and C Solans (2015) Vitamin A Palmitate-beta-cyclodextrin inclusion complexes: characterization, protection and emulsification properties. *Food Chem* 175: 529-535.
- [67] TI Ferguson, S Emery, R Price-Davies and AG Cosslett (2014) A review of stability issues associated with vitamins in parenteral nutrition. *Eur J Clinical Nut Metab* 9 (2): 49-53.
- [68] ME Carlotti, V Rossatto and M Gallarate (2002) Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *Int. J. Pharm.* 240 (1): 85-94.
- [69] V Jennings and SH Gohla (2001) Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J Microencapsul* 18 (2): 149-158.
- [70] SC Lee, YH Fau, DH Lee, LD Fau, KE Lee, LK Fau, Y-I Hwang, HY Fau, RD Ludescher and RD Ludescher (2002) Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *J Biochem Mol Biol* 35 (4): 358-363.
- [71] YJ Hwang, C Oh and SG Oh (2005) Controlled release of retinol from silica particles prepared in O/W/O emulsion: the effects of surfactants and polymers. *J Control Release* 106 (3): 339-349.
- [72] A Belatik, CD Kanakis, S Hotchandani, PA Tarantilis, MG Polissiou and HA Tajmir-Riahi (2012) Locating the binding sites of retinol and retinoic acid with milk β -lactoglobulin. *J Biomol Struct Dyn* 30 (4): 437-447.
- [73] S Khorsand Ahmadi, M Mahmoodian Moghadam, P Mokaberi, M Reza Saberi and J Chamani (2015) A comparison study of the interaction between β -lactoglobulin and retinol at two different conditions: spectroscopic and molecular modeling approaches. *J Biomol Struct Dyn* 33 (9): 1880-1898.
- [74] M Shimoyamada, H Yoshimura, K Tomida and K Watanabe (1996) Stabilities of bovine beta-lactoglobulin/retinol or retinoic acid complexes against tryptic hydrolysis, heating and light-induced oxidation. *LWT - Food Sci Technol* 29 (8): 763-766.
- [75] M Hattori, A Watabe and K Takahashi (1995) β -Lactoglobulin Protects β -Ionone Related Compounds from Degradation by Heating, Oxidation, and Irradiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (12): 2295-2297.
- [76] Y Wu, H Cheng, Y Chen, L Chen, Z Fang and L Liang (2017) Formation of a Multiligand Complex of Bovine Serum Albumin with Retinol, Resveratrol, and (-)-Epigallocatechin-3-gallate for the Protection of Bioactive Components. *J Agric Food Chem* 65 (14): 3019-3030.
- [77] CU Fau, M Kopelman, KM Fau, S Mokady, MS Fau, M Shinitzky and M Shinitzky (1976) Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur J Biochem* 65: 71-78.
- [78] JR Albani (2004). *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies*. Amsterdam, Elsevier Science.

- [79] JR Lakowicz (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Singapore, Springer Science & Business Media.
- [80] ME DÍa-García and R Badía-Laiño (2019), Capítulo 3, Fluorescence: Instrumentation, En *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, (P Worsfold, C Poole, A Townshend and M Miró), Oxford, Academic Press: 292-300.
- [81] A Shpigelman, G Israeli and YD Livney (2010) Thermally-induced protein–polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocoll* 24 (8): 735-743.
- [82] M van de Weert and L Stella (2011) Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *J. Mol. Struct.* 998 (1-3): 144-150.
- [83] D Arzenšek (2010) Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. *Seminar University of Ljubljana*: 1-18.
- [84] Malvern Instruments (2013). *Zetasizer Nano User Manual English MAN0485-1.1*. United Kingdom.
- [85] S Bhattacharjee (2016) DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release* 235: 337-351.
- [86] Malvern Instruments Worldwide (2015), Zeta potential: An introduction in 30 minutes, Zetasizer Nano Series Technical Note MRK654–01: 1-6.
- [87] M Bhattacharya and S Mukhopadhyay (2012) Structural and dynamical insights into the molten-globule form of ovalbumin. *J Phys Chem B* 116 (1): 520-531.
- [88] RB Baird, AD Eaton, EW Rice, LL Bridgewater (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation.
- [89] SR Nisbet AD, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE. (1981) The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *Eur J Biochem* 115: 335-345.
- [90] Q Wang, JC Allen and HE Swaisgood (1999) Binding of Lipophilic Nutrients to β -Lactoglobulin Prepared by Bioselective Adsorption1. *J Dairy Sci* 82 (2): 257-264.
- [91] D Frapin, DE Fau, T Haertle and T Haertle (1993) Probing the fatty acid binding site of beta-lactoglobulins. *J. Protein Chem.* 12 (4): 443-449.
- [92] OE Sponton, AA Perez, C Carrara and LG Santiago (2014) Effect of limited enzymatic hydrolysis on linoleic acid binding properties of beta-lactoglobulin. *Food Chem* 146: 577-582.
- [93] RQ Wang, YJ Yin, H Li, Y Wang, JJ Pu, R Wang, HJ Dou, CJ Song and RY Wang (2013) Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by spectrofluorimetry. *Mol Biol Rep* 40 (4): 3409-3418.
- [94] WG Gonzalez and J Miksovska (2014) Application of ANS fluorescent probes to identify hydrophobic sites on the surface of DREAM. *Biochim Biophys Acta* 1844 (9): 1472-1480.
- [95] OE Sponton, AA Perez, CR Carrara and LG Santiago (2016) Complexes between ovalbumin nanoparticles and linoleic acid: Stoichiometric, kinetic and thermodynamic aspects. *Food Chem* 211: 819-826.
- [96] AA Perez, OE Sponton, RB Andermatten, AC Rubiolo and LG Santiago (2015) Biopolymer nanoparticles designed for polyunsaturated fatty acid vehiculization: Protein-polysaccharide ratio study. *Food Chem* 188: 543-550.
- [97] U Lesmes and DJ McClements (2009) Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci Tech* 20 (10): 448-457.
- [98] D Kang, SR Ryu, Y Park, B Czarnik-Matusiewicz and YM Jung (2014) pH-induced structural changes of ovalbumin studied by 2D correlation IR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 1069: 299-304.
- [99] SA Fioramonti, MJ Martinez, AMR Pilosof, AC Rubiolo and LG Santiago (2015) Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: Effect of pH and alginate concentration. *Food Hydrocoll* 43: 8-17.

- [100] AA Perez, CC Sánchez, JM Rodríguez Patino, AC Rubiolo and LG Santiago (2012) Foaming characteristics of β -lactoglobulin as affected by enzymatic hydrolysis and polysaccharide addition: Relationships with the bulk and interfacial properties. *J Food Eng* 113 (1): 53-60.
- [101] SA Fioramonti, AA Perez, EE Aríngoli, AC Rubiolo and LG Santiago (2014) Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate. *Food Hydrocoll* 35: 129-136.
- [102] C Zhang, W Xu, W Jin, BR Shah, Y Li and B Li (2015) Influence of anionic alginate and cationic chitosan on physicochemical stability and carotenoids bioaccessibility of soy protein isolate-stabilized emulsions. *Food Re Int* 77: 419-425.
- [103] M Noshad, M Mohebbi, F Shahidi and A Koocheki (2015) Effect of layer-by-layer polyelectrolyte method on encapsulation of vanillin. *Int J Biol Macromol* 81: 803-808.
- [104] W Chanasattru, OG Jones, EA Decker and DJ McClements (2009) Impact of cosolvents on formation and properties of biopolymer nanoparticles formed by heat treatment of β -lactoglobulin–Pectin complexes. *Food Hydrocoll* 23 (8): 2450-2457.
- [105] Y Li and DJ McClements (2013) Influence of non-ionic surfactant on electrostatic complexation of protein-coated oil droplets and ionic biopolymers (alginate and chitosan). *Food Hydrocoll* 33 (2): 368-375.
- [106] C Qiu, Y Qin, S Jiang, C Liu, L Xiong and Q Sun (2017) Preparation of active polysaccharide-loaded maltodextrin nanoparticles and their stability as a function of ionic strength and pH. *LWT - Food Sci Technol* 76: 164-171.
- [107] B Zeeb, C Stenger, J Hinrichs and J Weiss (2016) Formation of concentrated particles composed of oppositely charged biopolymers for food applications – impact of processing conditions. *Food Struct* 10: 10-20.
- [108] SEV Martínez (2006), Capítulo 2, Hidratos de carbono, En *Química de los alimentos*, (SB Dergal), Mexico Pearson Educacion 19-118.
- [109] CD May (1990) Industrial pectins: Sources, production and applications. *Carbohydr Polym* 12 (1): 79-99.
- [110] HU Endreß and SH Christensen (2009), Capítulo 12, Pectins, En *Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)*, (GO Phillips and PA Williams), Woodhead Publishing: 274-297.
- [111] WGT Willats, JP Knox and JD Mikkelsen (2006) Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol* 17 (3): 97-104.
- [112] G Davidov-Pardo, IJ Joye and DJ McClements (2015), Capítulo 9, Food-Grade Protein-Based Nanoparticles and Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, and Utilization, En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, (R Donev), Academic Press, 98: 293-325.
- [113] R Santipanichwong, M Supphantharika, J Weiss and DJ McClements (2008) Core-Shell Biopolymer Nanoparticles Produced by Electrostatic Deposition of Beet Pectin onto Heat-Denatured β -Lactoglobulin Aggregates. *J Food Sci.* 73 (6): 23-30.
- [114] K Hu, X Huang, Y Gao, X Huang, H Xiao and DJ McClements (2015) Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food Chem* 182: 275-281.
- [115] W Xiong, C Ren, J Li and B Li (2018) Enhancing the photostability and bioaccessibility of resveratrol using ovalbumin-carboxymethylcellulose nanocomplexes and nanoparticles. *Food Funct* 9 (7): 3788-3797.
- [116] N Ron, P Zimet, J Bargarum and YD Livney (2010) Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *Int Dairy J* 20 (10): 686-693.
- [117] OE Sponton, AA Perez and LG Santiago (2017) Protein-polysaccharide associative phase separation applied to obtain a linoleic acid dried ingredient. *Food Hydrocoll.* 71: 158-167.

- [118] KNP Humblet-Hua, G Scheltens, E van der Linden and LMC Sagis (2011) Encapsulation systems based on ovalbumin fibrils and high methoxyl pectin. *Food Hydrocoll* 25 (4): 569-576.
- [119] A Benichou, A Aserin, R Lutz and N Garti (2007) Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocoll* 21 (3): 379-391.
- [120] AA Perez, CR Carrara, CC Sánchez, JM Rodríguez Patino and LG Santiago (2009) Interactions between milk whey protein and polysaccharide in solution. *Food Chem* 116 (1): 104-113.
- [121] E Patterson, R Wall, GF Fitzgerald, RP Ross and C Stanton (2012) Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab* 12: 539426.
- [122] M Kohlmeier (2015), Capítulo 5, Fatty Acids, En *Nutrient Metabolism (Second Edition)*, (M Kohlmeier), San Diego, Academic Press: 111-186.
- [123] A Wiktorowska-Owczarek, M Berezinska and JZ Nowak (2015) PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med* 24 (6): 931-941.
- [124] SB Dergal (2006), Capítulo 4, Lipidos, En *Química de los alimentos. Cuarta Edición* (EQ Duarte), Mexico, Pearson Educación: 245-300.
- [125] WW Nawar (1996), Capítulo 5, Lipids, En *Food Chemistry, Third Edition*, (OR Fennema), Taylor & Francis.
- [126] OR Fennema (1996). *Food Chemistry (Third Edition)* Taylor & Francis, CRC Press.
- [127] DJ McClements and Y Li (2010) Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci* 159 (2): 213-228.
- [128] GS Kelly (2001) Conjugated linoleic acid: a review. *Altern med rev* 6 (4): 367-382.
- [129] HS Moon, HG Lee, CS Chung, YJ Choi and CS Cho (2008) Physico-chemical modifications of conjugated linoleic acid for ruminal protection and oxidative stability. *Nutr Metab (Lond)* 5 (1): 16.
- [130] M Viladomiu, R Hontecillas and J Bassaganya-Riera (2016) Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *Eur J Pharmacol* 785: 87-95.
- [131] B Choque, D Catheline, V Rioux and P Legrand (2014) Linoleic acid: between doubts and certainties. *Biochimie* 96: 14-21.
- [132] MA de la Fuente, P Luna and M Juárez (2006) Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. *Trends Anal. Chem.* 25 (9): 917-926.
- [133] SY Moya-Camarena, JPV Heuvel, SG Blanchard, LA Leesnitzer and MA Belury (1999) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J. Lipid Res.* 40 (8): 1426-1433.
- [134] NS Kelley, NE Hubbard and KL Erickson (2007) Conjugated Linoleic Acid Isomers and Cancer. *J Nutr* 137 (12): 2599-2607.
- [135] A Schmid, M Collomb, R Sieber and G Bee (2006) Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Sci* 73 (1): 29-41.
- [136] E Mohammadi, E Nasserri and GK Ahari (2016) Functions and Health Benefits of Conjugated Linoleic Acid A Review of Controlled Clinical Trials. *Int. J. Med. Rev* 3 (2): 439-446.
- [137] JG Ens, MD Fau, KS Cole, CK Fau, CJ Field, FC Fau, MT Clandinin and MT Clandinin (2001) An assessment of c9,t11 linoleic acid intake in a small group of young Canadians. *Nutr. Res.* 21 (7): 955-960.
- [138] S Marventano, P Kolacz, S Castellano, F Galvano, S Buscemi, A Mistretta and G Grosso (2015) A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter? *Int J Food Sci Nutr* 66 (6): 611-22.

- [139] B Lands, D Bibus and KD Stark (2018) Dynamic interactions of n-3 and n-6 fatty acid nutrients. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 136: 15-21.
- [140] JH Kim, Y Kim, YJ Kim and Y Park (2016) Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annu Rev Food Sci Technol* 7: 221-244.
- [141] G Fuke and JL Nornberg (2017) Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57 (1): 1-7.
- [142] K Koba and T Yanagita (2014) Health benefits of conjugated linoleic acid *Obes Res Clin Pract* 8 (6): 525-532.
- [143] W-S Zhao, J-J Zhai, Y-H Wang, P-S Xie, X-J Yin, L-X Li and K-L Cheng (2009) Conjugated Linoleic Acid Supplementation Enhances Antihypertensive Effect of Ramipril in Chinese Patients With Obesity-Related Hypertension. *Am. J. Hypertens* 22 (6): 680-686.
- [144] B Yang, H Chen, C Stanton, RP Ross, H Zhang, YQ Chen and W Chen (2015) Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *J. Funct. Foods* 15: 314-325.
- [145] ZM Gao, LP Zhu, XQ Yang, XT He, JM Wang, J Guo, JR Qi, LJ Wang and SW Yin (2014) Soy lipophilic protein nanoparticles as a novel delivery vehicle for conjugated linoleic acid. *Food Funct* 5 (6): 1286-1293.
- [146] M Jimenez, HS García and CI Beristain (2006) Spray-dried encapsulation of Conjugated Linoleic Acid (CLA) with polymeric matrices. *J. Sci. Food Agric* 86 (14): 2431-2437.
- [147] C Fernandez-Avila, E Arranz, A Guri, AJ Trujillo and M Corredig (2016) Vegetable protein isolate-stabilized emulsions for enhanced delivery of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Food Hydrocoll* 55: 144-154.
- [148] K Kishita, K Ibaraki, S Itakura, Y Yamasaki, N Nishikata, K Yamamoto, M Shimizu, K Nishiyama and M Yamasaki (2016) Preparation of Conjugated Linoleic Acid Microemulsions and their Biodistribution. *J Oleo Sci* 65 (11): 949-954.
- [149] T Ghorbanzade, SM Jafari, S Akhavan and R Hadavi (2017) Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chem* 216: 146-152.
- [150] B Rasti, A Erfanian and J Selamat (2017) Novel nanoliposomal encapsulated omega-3 fatty acids and their applications in food. *Food Chem* 230: 690-696.
- [151] L Salcedo-Sandoval, S Cofrades, C Ruiz-Capillas, A Matalanis, DJ McClements, EA Decker and F Jiménez-Colmenero (2015) Oxidative stability of n-3 fatty acids encapsulated in filled hydrogel particles and of pork meat systems containing them. *Food Chem* 184: 207-213.
- [152] MG Semenova, DV Zelikina, AS Antipova, EI Martirosova, NV Grigorovich, RA Obushaeva, EA Shumilina, NS Ozerova, NP Palmina, EL Maltseva, VV Kasparov, NG Bogdanova and AV Krivandin (2016) Impact of the structure of polyunsaturated soy phospholipids on the structural parameters and functionality of their complexes with covalent conjugates combining sodium caseinate with maltodextrins. *Food Hydrocoll* 52: 144-160.
- [153] MK Khan, QY Wang and ME Fitzpatrick (2016), Capítulo 1, Atomic force microscopy (AFM) for materials characterization, En *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, (G Hübschen, I Altpeter, R Tschuncky and H-G Herrmann), Woodhead Publishing: 1-16.
- [154] D Johnson, DL Oatley-Radcliffe and N Hilal (2017), Capítulo 7, Atomic Force Microscopy (AFM), En *Membrane Characterization*, (N Hilal, AF Ismail, T Matsuura and D Oatley-Radcliffe), Elsevier: 115-144.
- [155] F Brandl, F Sommer and A Goepperich (2007) Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials* 28 (2): 134-146.
- [156] C Arzeni, OE Pérez and AMR Pilosof (2015) Power Ultrasound Assisted Design of Egg Albumin Nanoparticles. *Food Biophys* 10 (4): 439-446.

- [157] B Klajnert and M Bryszewska (2002) Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry* 55 (1): 33-35.
- [158] B Spolaore, O Pinato, M Canton, M Zambonin, P Polverino de Laureto and A Fontana (2010) alpha-Lactalbumin forms with oleic acid a high molecular weight complex displaying cytotoxic activity. *Biochem* 49 (39): 8658-8667.
- [159] I Siró, E Kápolna, B Kápolna and A Lugasi (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite* 51 (3): 456-467.
- [160] A.T. Diplock, M. Ashwel, F. Bornet, E.B. Fern, M.B. Roberfroid (1999) Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document *Br J Nutr* 81 (1): 1-27.
- [161] BM Carlson (2019), Capítulo 12, The Digestive System, En *The Human Body*, (BM Carlson), Academic Press: 321-355.
- [162] KE Barrett, SM Barman, S Boitano and HL Brooks (2010). *Ganon- Fisiología Médica-23 edición* España, Mc Graw Hill.
- [163] K Verhoeckx, P Cotter, I Lopez-Exposito, T Lea, A Mackie, T Requena, D Swiatecka and HJ Wichers (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, Springer International Publishing.
- [164] DJ McClements, F Li and H Xiao (2015) The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. *Annu Rev Food Sci Technol* 6: 299-327.
- [165] M Yao, DJ McClements and H Xiao (2015) Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. *Curr Opin Food Sci* 2: 14-19.
- [166] D Dupont, M Alric, S Blanquet-Diot, G Bornhorst, C Cueva, A Deglaire, S Denis, M Ferrua, R Havenaar, J Lelieveld, AR Mackie, M Marzorati, O Menard, M Minekus, B Miralles, I Recio and P Van den Abbeele (2019) Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Crit Rev Food Sci Nutr* 59 (10): 1546-1562.
- [167] T Bohn, F Carriere, L Day, A Deglaire, L Egger, D Freitas, M Golding, S Le Feunteun, A Macierzanka, O Menard, B Miralles, A Moscovici, R Portmann, I Recio, D Remond, V Sante-Lhoutellier, TJ Wooster, U Lesmes, AR Mackie and D Dupont (2018) Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Crit Rev Food Sci Nutr* 58 (13): 2239-2261.
- [168] M Minekus, M Alminger, P Alvito, S Ballance, T Bohn, C Bourlieu, F Carriere, R Boutrou, M Corredig, D Dupont, C Dufour, L Egger, M Golding, S Karakaya, B Kirkhus, S Le Feunteun, U Lesmes, A Macierzanka, A Mackie, S Marze, DJ McClements, O Menard, I Recio, CN Santos, RP Singh, GE Vegarud, MS Wickham, W Weitschies and A Brodkorb (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 5 (6): 1113-1124.
- [169] A Guerra, L Etienne-Mesmin, V Livrelli, S Denis, S Blanquet-Diot and M Alric (2012) Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol* 30 (11): 591-600.
- [170] S Denis, T Sayd, A Georges, C Chambon, S Chalancon, V Sante-Lhoutellier and S Blanquet-Diot (2016) Digestion of cooked meat proteins is slightly affected by age as assessed using the dynamic gastrointestinal TIM model and mass spectrometry. *Food Funct* 7 (6): 2682-2691.
- [171] B Cervantes-Paz, JJ Ornelas-Paz, S Ruiz-Cruz, C Rios-Velasco, V Ibarra-Junquera, EM Yahia and AA Gardea-Bejar (2017) Effects of pectin on lipid digestion and possible implications for carotenoid bioavailability during pre-absorptive stages: A review. *Food Res Int* 99 (Pt 2): 917-927.
- [172] CJ Cheng, M Ferruzzi and OG Jones (2019) Fate of lutein-containing zein nanoparticles following simulated gastric and intestinal digestion. *Food Hydrocoll* 87: 229-236.
- [173] S Le Maux, A Brodkorb, T Croguennec, AA Hennessy, S Bouhallab and L Giblin (2013) beta-Lactoglobulin-linoleate complexes: In vitro digestion and the role of protein in fatty acid uptake. *J Dairy Sci* 96 (7): 4258-4268.

- [174] G Martos, P Contreras, E Molina and R Lopez-Fandino (2010) Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *J Agric Food Chem* 58 (9): 5640-5648.
- [175] R Jimenez-Saiz, J Belloque, E Molina and R Lopez-Fandino (2011) Human immunoglobulin E (IgE) binding to heated and glycated ovalbumin and ovomucoid before and after in vitro digestion. *J Agric Food Chem* 59 (18): 10044-10051.
- [176] YF Liu, I Oey, P Bremer, P Silcock and A Carne (2017) In vitro peptic digestion of ovomucin-depleted egg white affected by pH, temperature and pulsed electric fields. *Food Chem* 231: 165-174.
- [177] M Lassé, S Deb-Choudhury, S Haines, N Larsen, JA Gerrard and JM Dyer (2015) The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. *J. Food Compos. Anal* 38: 42-48.
- [178] F Shen, F Niu, J Li, Y Su, Y Liu and Y Yang (2014) Interactions between tea polyphenol and two kinds of typical egg white proteins—ovalbumin and lysozyme: Effect on the gastrointestinal digestion of both proteins in vitro. *Food Res Int* 59: 100-107.
- [179] A Canette and R Briandet (2014) Microscopy: Confocal Laser Scanning Microscopy. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Vol 2, 2nd Edition), Elsevier Ltd. Academic Press, 676-683.
- [180] SJ Wright, VE Centonze, SA Stricker, PJ DeVries, SW Paddock and G Schatten (1993), Capítulo 1, Introduction to Confocal Microscopy and Three-Dimensional Reconstruction, En *Methods in Cell Biology*, (B Matsumoto), Academic Press: 1-45.
- [181] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, J-Y Tinevez, DJ White, V Hartenstein, K Eliceiri, P Tomancak and A Cardona (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682.
- [182] K Pan, H Chen, PM Davidson and Q Zhong (2014) Thymol nanoencapsulated by sodium caseinate: physical and antilisterial properties. *J Agric Food Chem* 62 (7): 1649-1657.
- [183] Z Li, T Gu, B Kelder and JJ Kopchick (2001) Analysis of fatty acids in mouse cells using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 54 (7): 463-467.
- [184] E Murru, E Angioni, G Carta, MP Melis, S Spada and S Banni (2003), Capítulo 7, Reversed-Phase HPLC Analysis of Conjugated Linoleic Acid and Its Metabolites, En *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research, Volume 2*, (JL Sébédio, WW Christie and R Adlof), Champaign, Illinois, AOCS Press: 94-100.
- [185] E Angioni, G Lercker, NG Frega, G Carta, MP Melis, E Murru, S Spada and S Banni (2002) UV spectral properties of lipids as a tool for their identification. *Eur J Lipid Sci Technol* 104 (1): 59-64.
- [186] ML Anson and AE Mirsky (1932) The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 16 (1): 59-63.
- [187] ML Anson (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22 (1): 79-89.
- [188] BCW Hummel (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (12): 1393-1399.
- [189] G Koutina, CA Ray, R Lametsch and R Ipsen (2018) The effect of protein-to-alginate ratio on in vitro gastric digestion of nanoparticulated whey protein. *Int Dairy J* 77: 10-18.
- [190] S Mun, J Kim, DJ McClements, YR Kim and Y Choi (2017) Fluorescence imaging of spatial location of lipids and proteins during digestion of protein-stabilized oil-in-water emulsions: A simulated gastrointestinal tract study. *Food Chem* 219: 297-303.
- [191] H Singh, A Ye and MJ Ferrua (2015) Aspects of food structures in the digestive tract. *Curr Opin Food Sci* 3: 85-93.

- [192] OE Sponton, AA Perez, JV Ramel and LG Santiago (2017) Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity. *Food Hydrocoll* 73: 67-73.
- [193] HB Bull and H Neurath (1937) The denaturation and hidration of proteins II. Surface denaturation of egg albumin. *J. Biol. Chem.* 118: 163-175.
- [194] M Halwer (1954) Disulfide Cross-links in Denatured Ovalbumin2. *J Am Chem Soc* 76 (1): 183-186.
- [195] ET Reese and FM Robbins (1981) Denaturation of β -lactoglobulin by shaking and its subsequent renaturation. *J Colloid Interface Sci* 83 (2): 393-400.
- [196] SM Loveday, XL Wang, MA Rao, SG Anema, LK Creamer and H Singh (2010) Tuning the properties of β -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl₂. *Int Dairy J* 20 (9): 571-579.
- [197] SM Loveday, J Su, MA Rao, SG Anema and H Singh (2011) Effect of calcium on the morphology and functionality of whey protein nanofibrils. *Biomacromolecules* 12 (10): 3780-3788.
- [198] J-N Wei, X-A Zeng, T Tang, Z Jiang and Y-Y Liu (2018) Unfolding and nanotube formation of ovalbumin induced by pulsed electric field. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 45: 249-254.
- [199] T Del Castillo-Santaella, J Maldonado-Valderrama, JA Molina-Bolivar and F Galisteo-Gonzalez (2016) Effect of cross-linker glutaraldehyde on gastric digestion of emulsified albumin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 145: 899-905.
- [200] FP Chen, BS Li and CH Tang (2015) Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: influence on curcumin stability/bioaccessibility and in vitro protein digestibility. *J Agric Food Chem* 63 (13): 3559-3569.
- [201] WB Coleman (2018), Capítulo 4, Neoplasia, En *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*, (W Coleman and G Tsongalis), Academic Press, 71-97.
- [202] JR Foster (2018), Capítulo 1, Introduction to Neoplasia, En *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*, (CA McQueen), Oxford, Elsevier: 1-10.
- [203] V Kumar, AK Abbas, N Fausto and JC Aster (2010), Capítulo 7, Neoplasia, En *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional - Octava Edición* Barcelona, España, Elsevier: 259-330.
- [204] JE Klaunig and Z Wang (2018), Capítulo 9.16, Carcinogenicity, En *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*, (Charlene A. McQueen), Elsevier: 233-254.
- [205] LA Liotta and ET Liu (2001), Capítulo 2, Essentials of Molecular Biology: Genomics and Cancer, En *Cancer: Principles and Practice of Oncology 6th edition* (VT Devita, S Hellman and SA Rosenberg), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- [206] CM Friedenreich and MR Orenstein (2002) Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr.* 132 (11): 3456–3464.
- [207] LH Kushi, C Doyle, M McCullough, CL Rock, W Demark-Wahnefried, EV Bandera, S Gapstur, AV Patel, K Andrews and T Gansler (2012) American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA Cancer J Clin.* 62 (1): 30-67.
- [208] RH Liu (2004) Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *J. Nutr* 134 (12): 3479-3485.
- [209] CA Gonzalez and E Riboli (2010) Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 46 (14): 2555-2562.
- [210] P Anand, C Sundaram, S Jhurani, AB Kunnumakkara and BB Aggarwal (2008) Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett* 267 (1): 133-164.

- [211] X Gao, YX Xu, G Divine, N Janakiraman, RA Chapman and SC Gautam (2002) Disparate In Vitro and In Vivo Antileukemic Effects of Resveratrol, a Natural Polyphenolic Compound Found in Grapes. *J. Nutr* 132 (7): 2076-2081.
- [212] W Win, Z Cao, X Peng, MA Trush and Y Li (2002) Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 513 (1): 113-120.
- [213] B Elsadek and F Kratz (2012) Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon. *J Control Release* 157 (1): 4-28.
- [214] F Kratz (2008) Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 132 (3): 171-83.
- [215] JCS Ho, A Nadeem and C Svanborg (2017) HAMLET - A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochem Biophys Res Commun* 482 (3): 454-458.
- [216] TL Riss, RA Moravec, AL Niles, S Duellman, HA Benink, TJ Worzella and L Minor (2004). *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- [217] K Yadav, N Singhal, V Rishi and H Yadav (2014). *Cell Proliferation Assays*, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- [218] RI Freshney (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- [219] J Fogh and G Trempe (1975), Capítulo 5, New Human Tumor Cell Lines, En *Human Tumor Cells in Vitro*, (J Fogh), Boston, MA, Springer US: 115-159.
- [220] F Beppu, M Hosokawa, L Tanaka, H Kohno, T Tanaka and K Miyashita (2006) Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 17 (12): 830-836.
- [221] HJ Cho, WK Kim, EJ Kim, KC Jung, S Park, HS Lee, AL Tyner and JHY Park (2003) Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284 (6): 996-1005.
- [222] N Niezgodá, A Gliszczyńska, K Kempieńska, J Wietrzyk and C Wawrzeńczyk (2017) Synthesis and evaluation of cytotoxic activity of conjugated linoleic acid derivatives (esters, alcohols, and their acetates) toward cancer cell lines. *Eur J Lipid Sci Tech* 119 (10): 1600470.
- [223] H Kohno, R Suzuki, Y Yasui, M Hosokawa, K Miyashita and T Tanaka (2004) Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 95 (6): 481-486.
- [224] HS Park, JH Ryu, YL Ha and JH Park (2001) Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr* 86 (5): 549-55.
- [225] P Knekt, R Järvinen, R Seppänen, E Pukkala and A Aromaa (1996) Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br. J. Cancer* 73 (5): 687-691.
- [226] A Aro, MS Fau, I Salminen, SI Fau, ML Ovaskainen, OM Fau, V Kataja, KV Fau, M Uusitupa and M Uusitupa (2000) Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr Cancer* 38 (2): 151-157.
- [227] V Chajès, F Lavillonnière, P Ferrari, M-L Jourdan, M Pinault, V Maillard, J-L Sébédio and P Bougnoux (2002) Conjugated Linoleic Acid Content in Breast Adipose Tissue Is Not Associated with the Relative Risk of Breast Cancer in a Population of French Patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 (7): 672-673.
- [228] SC Larsson, L Bergkvist and A Wolk (2005) High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am J Clin Nutr* 82 (4): 894-900.
- [229] MA Belury (2002) Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 22: 505-531.
- [230] MA Belury (2002) Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid: Potential Mechanisms of Action. *J. Nutr* 132 (10): 2995-2998.

- [231] HJ Cho, EJ Kim, SS Lim, MK Kim, M-K Sung, J-S Kim and JHY Park (2006) Trans-10,cis-12, Not cis-9,trans-11, Conjugated Linoleic Acid Inhibits G1-S Progression in HT-29 Human Colon Cancer Cells1. *J. Nutr.* 136 (4): 893-898.
- [232] MQ Kemp, BD Jeffy and DF Romagnolo (2003) Conjugated Linoleic Acid Inhibits Cell Proliferation through a p53-Dependent Mechanism: Effects on the Expression of G1-Restriction Points in Breast and Colon Cancer Cells. *J. Nutr* 133 (11): 3670-3677.
- [233] MB Kastan and SX Skapek (2001), Capítulo 6, Molecular Biology of Cancer: The Cell Cycle, En *Cancer: Principles and Practice of Oncology 6th edition* (VT Devita, S Hellman and SA Rosenberg), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers.
- [234] JD Palombo, A Ganguly, BR Bistran and MP Menard (2002) The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 177: 162-172.
- [235] A Miller, C Stanton and R Devery (2002) Cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12- conjugated linoleic acid isomers induce apoptosis in cultured SW480 cells. *Anticancer Res* 22 (6C): 3879-3887.
- [236] HJ Cho, WK Kim, JI Jung, EJ Kim, SS Lim, DY Kwon and JHY Park (2005) Trans-10,cis-12, not cis-9,trans-11, conjugated linoleic acid decreases ErbB3 expression in HT-29 human colon cancer cells. *World J Gastroenterol.* 11 (33): 5142-5150.
- [237] SJ Parsons, JO DaSilva and J Thomas Parsons (2016), Capítulo 3, Cell division/death: cell cycle, En *Encyclopedia of Cell Biology*, (R Bradshaw and P Stahl), 3: 411-422.
- [238] HS Park, HY Cho, YL Ha and JH Park (2004) Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *J Nutr Biochem* 15 (4): 229-235.
- [239] K Stamatakis, M Jimenez-Martinez, A Jimenez-Segovia, I Chico-Calero, E Conde, J Galan-Martinez, J Ruiz, A Pascual, B Barrocal, R Lopez-Perez, ML Garcia-Bermejo and M Fresno (2015) Prostaglandins induce early growth response 1 transcription factor mediated microsomal prostaglandin E2 synthase up-regulation for colorectal cancer progression. *Oncotarget.* 6 (37): 39941-39959.
- [240] T-J Fu, UR Abbott and C Hatzos (2002) Digestibility of Food Allergens and Nonallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal FluidA Comparative Study. *J Agr Food Chem* 50 (24): 7154-7160.
- [241] FJ Moreno (2007) Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomed Pharmacother* 61 (1): 50-60.
- [242] MV Berridge, AS Tan, KD McCoy and R Wang (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* (4): 14-19.
- [243] MV Berridge, PM Herst and AS Tan (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11: 127-152.
- [244] JM González-Buitrago (2010), Capítulo 21, Citometría de Flujo, En *Técnicas y métodos de laboratorio clínico- 3er Edición*, España, Elsevier: 307-316.
- [245] TA Fleisher and JB Oliveira (2019), Capítulo 92, Flow Cytometry, En *Clinical Immunology (Fifth Edition)*, (RR Rich, TA Fleisher, WT Shearer, HW Schroeder, AJ Frew and CM Weyand), London, Elsevier: 1239-1251.
- [246] V Kumar, AK Abbas, N Fausto and JC Aster (2010), Capítulo 1, Respuestas celulares ante el estrés y las agresiones por tóxicos: adaptación, lesión y muerte, En *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional - Octava Edición*, Barcelona, España, Elsevier: 3-42.
- [247] SA Shukolyukov (2009) Aggregation of frog rhodopsin to oligomers and their dissociation to monomer: application of BN- and SDS-PAGE. *Biochem (Mosc)* 74 (6): 599-604.
- [248] E Doi, T Koseki and N Kitabatake (1987) Effects of limited proteolysis on functional properties of ovalbumin. *J. Am. Oil Chem.' Soc.* 64 (12): 1697-1703.

- [249] N Kitabatake, K Indo and E Doi (1988) Limited proteolysis of ovalbumin by pepsin. *J Agr Food Chem* 36 (3): 417-420.
- [250] HK Ha, JW Kim, MR Lee, W Jun and WJ Lee (2015) Cellular Uptake and Cytotoxicity of beta-Lactoglobulin Nanoparticles: The Effects of Particle Size and Surface Charge. *Asian-Australas J Anim Sci* 28 (3): 420-427.
- [251] S Le Maux, L Giblin, T Croguennec, S Bouhallab and A Brodkorb (2012) beta-Lactoglobulin as a molecular carrier of linoleate: characterization and effects on intestinal epithelial cells in vitro. *J Agric Food Chem* 60 (37): 9476-9483.
- [252] N Bijari, S Ghobadi and K Derakhshandeh (2019) β -lactoglobulin-irinotecan inclusion complex as a new targeted nanocarrier for colorectal cancer cells. *Res. Pharm. Sci.* 14 (3): 216-227.
- [253] L Egger, P Schlegel, C Baumann, H Stoffers, D Guggisberg, C Brugger, D Durr, P Stoll, G Vergeres and R Portmann (2017) Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. *Food Res Int* 102: 567-574.