



Posteriormente, 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 zeta 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) y microscopía de fuerza atómica (AFM), 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, adecuando las cantidades de enzimas y sales biliares para regímenes diluidos, como es el caso de los nanocomplejos utilizados en la presente tesis. 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 tamaño 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 retención de CLA ( $R_{CLA}$ ) 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. En base a estos resultados, 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.

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. 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.

## Abstract

### PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NANOCOMPLEXES THAT CARRY BIOACTIVE COMPOUNDS

Two nanoparticles were developed from a highly locally available protein such as OVA through controlled heat treatment to encapsulate different hydrophobic bioactive compounds: retinol (RET) and conjugated linoleic acid (CLA). The use of different pH and concentration conditions allows the development of two nanoparticles of distinct size. A biopolymeric nanoparticle (BPN) between OVA, OVA<sub>n2</sub>, and PAM was designed. When studying the photochemical stability of RET in both systems, it concluded that the BPN formed between PAM and OVA<sub>n2</sub> was superior to the system obtained with OVA, with a 42% higher photochemical protection of RET. On the other hand, given that CLA has demonstrated cytotoxic activity in different types of cancer, mainly colon cancer, a study of the nanoparticle encapsulation system (OVA<sub>n1</sub> and OVA<sub>n2</sub>) under conditions of an in vitro gastrointestinal digestion model was carried out. OVA was resistant to gastric and intestinal digestion while OVA nanoparticles were highly susceptible to hydrolysis by digestive enzymes. Moreover, the retention of CLA was 63% for OVA and around 80-90% for both nanoparticles. Finally, the cytotoxic capacity of CLA and the inclusion nanocomplexes in a colon cancer cell line (HT29) was studied. CLA was responsible for cell death since the pure protein systems were not cytotoxic for the HT29 cell line. On the other hand, the main death mechanism of the inclusion nanocomplexes and CLA was apoptosis, without finding necrosis. The OVA-CLA and OVA<sub>n1</sub>-CLA nanocomplexes were those that showed the highest cytotoxic activity and apoptosis index.