

# **Nanotecnología aplicada al desarrollo de un sistema de encapsulación de vitamina A para su uso potencial en la fortificación de alimentos**

**Flavia F. Visentini**

*Instituto de Tecnología de Alimentos-FIQ-UNL, 1 de Mayo 3250, Santa Fe  
Ingeniería-Alimentos*

## **INTRODUCCIÓN**

En la industria alimentaria, la vitamina A (VA) es utilizada en la fortificación de productos lácteos, harinas, cereales, etc. Sin embargo, el empleo de la misma está limitado por su escasa solubilidad en medios acuosos y por su baja estabilidad química frente a la oxidación y a la radiación UV. Como solución a esta problemática, se han desarrollado diversos métodos de encapsulación de VA (ej.: emulsiones, nanopartículas lipídicas, liposomas, etc.), siendo los mismos de escasa aplicación en la fortificación de alimentos (Loveday y Singh, 2008). El avance en el desarrollo de sistemas de encapsulación de VA compatibles con matrices alimenticias podría hacer uso de fuentes proteicas altamente disponibles y del empleo de nuevas tecnologías. Como fuente proteica importante se destacan las proteínas de la clara de huevo, cuyas propiedades funcionales permiten su utilización en una gran variedad de alimentos. La ovoalbúmina (OVA) constituye el 54% de las proteínas de la clara del huevo, y se ha demostrado que es capaz de formar partículas de diámetro <100 nm bajo tratamiento térmico controlado. Estas nanopartículas (OVAn) poseen una elevada hidrofobicidad lo que permite la unión superficial de un gran número de moléculas de compuesto bioactivo lipofílico. Este fenómeno da origen a nanocomplejos solubles (Sponton y col., 2015). Por lo tanto, la encapsulación de VA bajo la forma de nanocomplejos podría incrementar la carga de bioactivo y, al mismo tiempo, favorecer su incorporación en medios acuosos. Finalmente, la protección frente al oxígeno y a la luz UV podría lograrse mediante la generación de una cubierta de polisacárido sobre la superficie de los nanocomplejos (Perez y col., 2015).

## **OBJETIVOS**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar un procedimiento de encapsulación de vitamina A (VA) basado en las siguientes etapas: (i) obtención de nanopartículas de ovoalbúmina (OVAn), (ii) formación de nanocomplejos OVAn-VA, (iii) deposición electrostática de un polisacárido sobre la superficie de nanocomplejos OVAn-VA y (iv) verificación de la estabilidad química de VA frente a oxígeno ambiental y luz artificial.

## **METODOLOGÍA**

### **Obtención de nanopartículas de ovoalbúmina (OVAn)**

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Sponton y col., 2015. Para ello, se preparó una solución de OVA (Sigma, USA) 10g/L en NaCl 50 mM a pH 7,5. La misma se colocó en un baño de agua a 85 °C por 5 min, posteriormente, se enfrió en baño de hielo y se almacenó a 4 °C hasta su utilización, obteniéndose de esta forma una solución de OVAn.

### **Formación de nanocomplejos OVAn-VA**

Se realizó la titulación de una solución de OVAn 1 µM con concentraciones crecientes de VA (0-197 µM). La formación de OVAn-VA se monitoreó por espectroscopía de

fluorescencia debida al Trp, excitando a 280 nm y registrando la emisión a 290-450 nm (Espectrofluorómetro Hitachi, Japón). Como control se utilizó una solución de OVA nativa. Los datos se ajustaron al modelo de Stern-Volmer (Ec. 1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [VA] \quad (\text{Ec. 1})$$

donde  $F_0$  y  $F$  corresponden a la fluorescencia inicial y máxima, respectivamente,  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer (considerada como una medida de la constante de afinidad  $K_a$ ) y  $[VA]$  es la concentración de vitamina A. Para desviaciones de la linealidad de la Ec. 1, se aplicó el modelo de Stern-Volmer modificado (Ec. 2).

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_{SV} [VA]} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde  $f_a$  es la fracción de residuos Trp accesibles a VA (Shpigelman y col., 2010), y el modelo de Scatchard modificado (Ec. 3):

$$P_{\text{total}} (1 - f_i) = \frac{VA_{\text{total}}}{n} \left( \frac{1}{f_i} - 1 \right) - \frac{1}{nK_a}; f_i = \frac{F_i - F_0}{F_{\text{máx}} - F_0} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde  $P_{\text{total}}$  es la concentración total de proteína (OVA, OVA<sub>n</sub>),  $VA_{\text{total}}$  es la concentración total de vitamina A,  $n$  es el número de moléculas de VA unidas a la proteína en la saturación,  $K_a$  es la constante de afinidad,  $f_i$  es la fracción de sitios ocupados por VA,  $F_{\text{máx}}$  es la fluorescencia a la saturación y  $F_i$  es la fluorescencia en la relación (proteína/VA)<sub>i</sub> (Le Maux y col., 2013). Debido a la existencia de un fenómeno de filtro interno, se realizó la corrección de los valores de intensidad de fluorescencia según van de Weert y Stella, 2011. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### Deposición electrostática de un polisacárido sobre la superficie de OVA<sub>n</sub>-VA

Se realizó la deposición electrostática de un polisacárido, pectina de alto metoxilo (PAM), sobre la superficie de los nanocomplejos OVA<sub>n</sub>-VA a una relación OVA<sub>n</sub>-VA:PAM 2:1. El pH adecuado para tal deposición se determinó a partir del comportamiento de fase (ausencia/presencia de precipitado) del sistema OVA<sub>n</sub>-PAM en el rango 2,5-7,0. La distribución de tamaño de partícula se determinó por dispersión de luz dinámica (NanoZetasizer ZS90, Malvern, UK). Se realizaron triplicados.

### Estabilidad química

El ensayo de estabilidad química de VA se llevó a cabo en presencia de oxígeno ambiental y en presencia/ausencia de luz artificial (lámpara fluorescente, 65 W, a 35 cm de la muestra) durante un periodo de 30 horas. La estabilidad se calculó como porcentaje de la absorbancia inicial a 330 nm (longitud de onda de máxima absorción de VA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS

La Figura 1 muestra la variación de la intensidad de fluorescencia (IF) de OVA (Fig. 1a) y OVA<sub>n</sub> (Fig. 1b) con el aumento de la concentración de VA. Se observó que la IF aumentó para OVA mientras que disminuyó para OVA<sub>n</sub>. Ambos comportamientos sugieren la formación de nanocomplejos con VA; sin embargo, su formación estaría gobernada por mecanismos de unión diferentes (Le Maux y col., 2013). La aplicación del modelo de Stern-Volmer al sistema OVA-VA arrojó un valor de  $K_{SV} = 1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . La aplicación del mismo modelo al sistema OVA<sub>n</sub>-VA no fue posible debido a una desviación de la linealidad. Consecuentemente, se aplicó el modelo de Stern-Volmer modificado el que arrojó un valor de  $K_{SV} = 3.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Estos resultados indicarían que OVA<sub>n</sub> posee una mayor afinidad por VA que OVA. Por otro lado, la aplicación del modelo de Scatchard modificado al sistema OVA<sub>n</sub>-VA arrojó los siguientes valores de  $n$  y  $K_a$ :  $n_1$ : 15,  $K_{a1}$ :  $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $n_2$ : 67,  $K_{a2}$ :  $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Los resultados indican que

OVA es capaz de unir superficialmente 82 moléculas de VA repartidas en dos tipos de sitios de unión o dominios de distinta afinidad por VA.

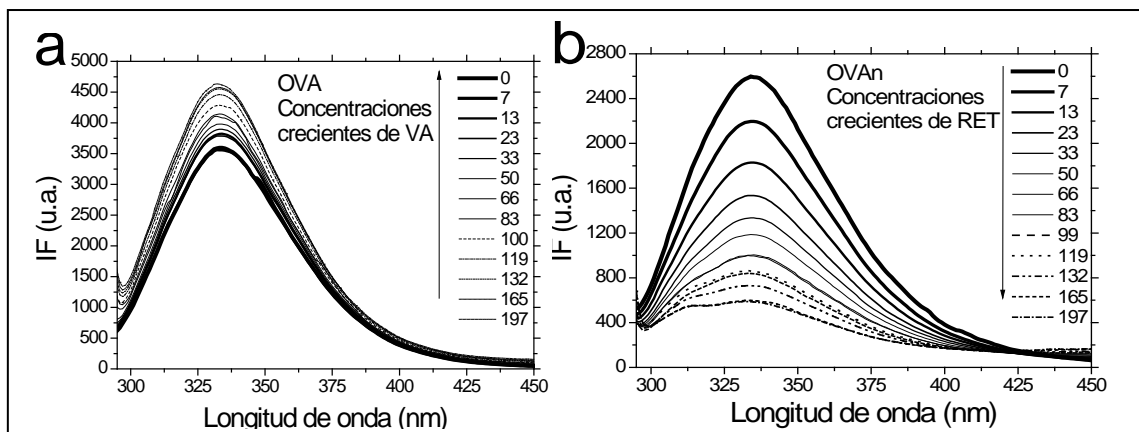
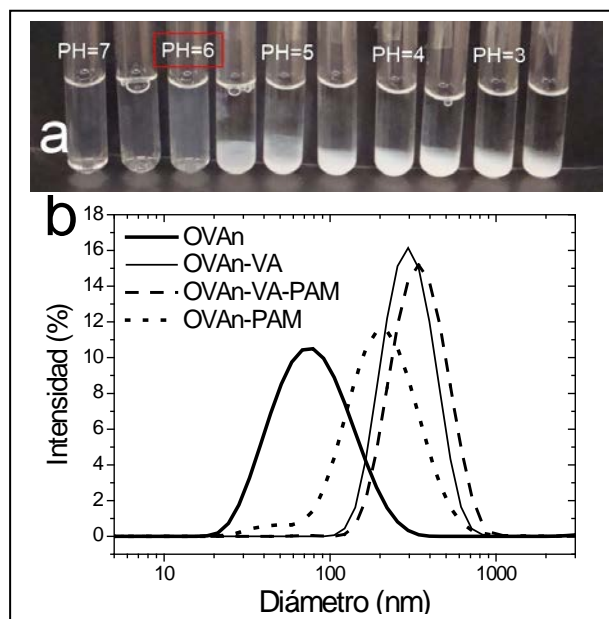


Figura 1: Intensidad de fluorescencia intrínseca (IF) en función de la longitud de onda al titular OVA (a) u OVA-VAN (b) con concentraciones crecientes de VA (0-197  $\mu$ M).

Figura 2: (a) Comportamiento de fase del sistema OVA-VAN-PAM. Incrementos de izquierda a derecha de 0,5 unidades de pH. (b) Efecto de la deposición electrostática de PAM sobre la distribución de tamaños de partícula.



Por otro lado, la Figura 2a presenta el efecto del pH sobre el comportamiento de fase del sistema OVA-VAN-PAM a relación 2:1. Se observó que pH=6 fue adecuado para la deposición electrostática de PAM sobre OVA ya que una disminución del mismo produjo la formación de precipitados. La Figura 2b muestra los resultados del análisis de distribución de tamaño de partícula, siendo los picos observados en orden creciente: OVA:  $88 \pm 1$  nm, OVA-PAM:  $231 \pm 0$  nm, OVA-VAN:  $312 \pm 10$  nm y OVA-VAN-PAM:  $366 \pm 10$  nm. Pudo deducirse que: (i) la formación del nanocomplejo OVA-VAN provocó un aumento significativo del tamaño de OVA debido a la unión de 82 moléculas de VA, (ii) la deposición electrostática de PAM produjo diferentes tamaños de partícula como consecuencia de la alteración de la superficie de OVA-VAN debido a las moléculas de VA unidas y (iii) el espesor promedio de la cubierta de PAM sobre la superficie de OVA-VAN podría estimarse en 27 nm considerando la formación de una partícula de tipo core-shell (Santipanichwong y col., 2008).

Por último, la Figura 3a muestra la evolución de la estabilidad química de VA libre y vehiculizado en los sistemas: OVA, OVA-VAN y OVA-VAN-PAM. Con VA libre se obtuvo un 83% de estabilidad en oscuridad y un 66% en presencia de luz artificial, sugiriendo que la degradación por oxidación correspondería al 17% luego de 30 horas (Fig 3b). En los sistemas los porcentajes de estabilidad fueron: 60% para OVA-VAN, 78% para OVA-VAN-PAM y 86% para OVA-VAN-PAM luego de 30 horas de exposición a luz artificial (Fig. 3b). Los resultados indican que la complejación con OVA nativa perjudicó

significativamente a la estabilidad química de VA siendo la misma menor a la obtenida con VA libre. Por otro lado, la complejación con OVA fue capaz de proteger a VA en presencia de luz pero su protección fue menor que la obtenida con VA libre en oscuridad. Finalmente, la deposición electrostática de PAM sobre la superficie del nanocomplejo OVA-VA produjo un aumento significativo de la estabilidad química de VA siendo esta mayor que la estabilidad de VA libre en oscuridad, lo que sugiere que la cubierta de PAM mejoró la estabilidad química tanto al oxígeno ambiental como a la exposición a la luz artificial.

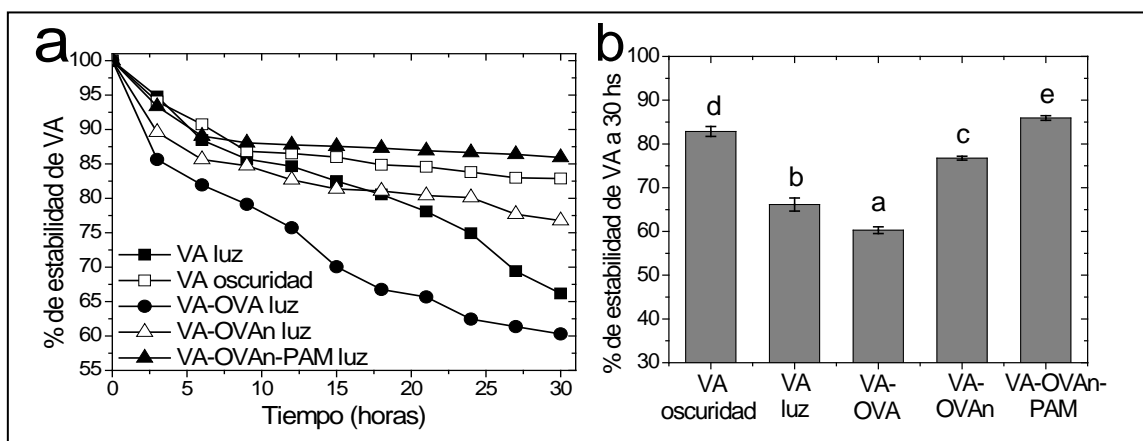


Figura 3: (a) Evolución de la estabilidad química de VA para los diferentes sistemas. (b) Estabilidad química de VA a las 30 horas. Se informan los valores promedios con su correspondiente desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas, ANOVA simple, test LSD ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo confirmarían el éxito del desarrollo de un sistema de encapsulación de VA basado en la formación de nanocomplejos OVA-VA y posterior deposición electrostática de PAM sobre la superficie de los mismos. La información obtenida contribuiría a solucionar una problemática de la industria alimentaria empleando fundamentos simples de nanotecnología y con la potencialidad de ser aplicada a la fortificación de diversas matrices alimenticias.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Loveday S. M. y Singh H. 2008. Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 657-668.
- Le Maux S., Bouhallab S., Giblin L., Brodkorb A. y Croguennec T. 2013. Complexes between linoleate and native or aggregated  $\beta$ -lactoglobulin: Interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. *Food Chemistry*, 141, 2305-2313.
- Perez A., Sponton O. E., Andermatten R. B., Rubiolo A. C. y Santiago L. G. 2015. Biopolymer nanoparticles designed for polyunsaturated fatty acid vehiculization: Protein-polysaccharide ratio study. *Food Chemistry*, 188, 543-550.
- Santipanichwong R., Suphantharika M., Weiss J. y McClements D. J. 2008. Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat denatured beta-lactoglobulin aggregates. *Journal of Food Science*, 73 (6), 23-30.
- Sponton O. E., Perez A. A., Carrara C. y Santiago L. G. 2015. Linoleic acid binding properties of ovalbumin nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 219-226.
- Shpigelman A., Israeli G. y Livney Y. D. 2010. Thermally induced protein polyphenol co-assemblies: betalactoglobulin based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*, 24, 735-743.
- van de Weert M. y Stella L. 2011. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, 998, 144-150.