

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANO Y FOSFITINA,
CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES
EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

PALOMA LEIRO ESCRIBANO

JULIO, 2022



AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar el trabajo, me gustaría dedicar unas palabras a aquellas personas que han estado presentes a lo largo de la realización de este trabajo.

En primer lugar, agradecer a mis tutores, Ismael Marcet y Manuel Rendueles, por transmitirme vuestros conocimientos para la elaboración de este trabajo, haberme guiado y estado siempre disponible para cualquier duda y por el tiempo que habéis dedicado a la supervisión de este trabajo.

Gracias también al resto de miembros del grupo de investigación de Tecnología de Bioprocesos y Reactores de la Universidad de Oviedo, especialmente a Florencia por haberme ayudado en todo lo posible, por ser tan resolutiva y por tu continuo apoyo y cercanía. Y al resto de compañeros del grupo por ser un ejemplo como investigadores y hacer esta estancia muy amena y agradable en el día a día del laboratorio.

Agradecer a mis compañeras de clase, que compartimos las alegrías, preocupaciones, dilemas de TFM, frustraciones y confidencias, por hacer tan fácil trabajar junto a ellas diariamente.

Y sin duda, dar también las gracias a mi familia; mis padres y hermanos, por servirme de apoyo a lo largo de la vida, tanto en lo académico como en lo personal.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE TABLAS | 6 |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | 7 |
| RESUMEN | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 3. CONSIDERACIONES TEÓRICAS | 14 |
| 3.1 EL HUEVO | 14 |
| 3.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES | 14 |
| 3.1.2 ESTRUCTURA DEL HUEVO | 15 |
| 3.1.3 ESTRUCTURA DE LA YEMA DE HUEVO | 16 |
| 3.2 LA FOSVITINA | 19 |
| 3.2.1 HIDRÓLISIS DE LA FOSVITINA | 21 |
| 3.3 EL QUITOSANO | 22 |
| 3.3.1 PROPIEDADES DEL QUITOSANO | 23 |
| 3.4 NANOTECNOLOGÍA | 25 |
| 3.5 NANOPARTÍCULAS | 26 |
| 3.6 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO | 27 |
| 3.7 EMULSIONES TIPO PICKERING | 30 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 4.1 MATERIALES | 31 |
| 4.2 EXTRACCIÓN DE LA FOSVITINA DE LA YEMA DE HUEVO | 32 |
| 4.2.1 Electroforesis SDS-PAGE | 34 |
| 4.2.2 Determinación de la cantidad de proteína de la fosvitina liofilizada | 35 |
| 4.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS | 36 |
| 4.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS | 37 |
| 4.4.1 Evaluación del tamaño de las nanopartículas (Z-average) | 37 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.5 | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | 39 |
| 4.5.1 | Método ABTS | 39 |
| 4.5.2 | Método DPPH | 39 |
| 4.7 | ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO | 41 |
| 4.7.1 | pH | 41 |
| 4.7.2 | Turbidez | 41 |
| 4.7.3 | DLS | 42 |
| 4.8 | HIDRÓLISIS DE LA FOSVITINA | 42 |
| 4.9 | EMULSIONES TIPO PICKERING | 42 |
| 4.10 | TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS | 43 |
| 5. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 44 |
| 5.1 | EXTRACCIÓN DE LA FOSVITINA DE HUEVO | 44 |
| 5.1.1 | Electroforesis SDS-PAGE | 44 |
| 5.1.2 | Determinación de la cantidad de proteína | 46 |
| 5.2 | SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS | 47 |
| 5.3 | CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA | 48 |
| 5.3.1 | DLS | 48 |
| 5.3.2 | TEM | 50 |
| 5.3.3 | Contenido en humedad | 52 |
| 5.3.4 | FT-IR | 52 |
| 5.4 | CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | 54 |
| 5.5 | EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN | 55 |
| 5.6 | ESTABILIDAD EN EL TIEMPO | 57 |
| 5.7 | HIDRÓLISIS DE LA FOSVITINA | 62 |
| 5.8 | PICKERING EMULSIONS | 64 |
| 6. | CONCLUSIONES | 65 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 66 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|------|
| Figura 1. Estructura del huevo y sus partes. Adaptado de Ortiz Ureta (2008)..... | 144 |
| Figura 2. Fraccionamiento y composición de la yema de huevo en gránulos y plasma. Adaptado de Anton, 2013..... | 177 |
| Figura 3. Estructura de la quitina y el quitosano. (Javaknmar et al., 2021) | 22 |
| Figura 4. Esquema de las diversas manera en que el quitosano puede ser procesado en diversas formas (Jayakumar et al., 2021) | 23 |
| Figura 5. Distintos objetos de interés para la nanotecnología. Serena (2021) | 25 |
| Figura 6. Esquema de la síntesis de nanopartículas de quitosano y TPP. Adaptado de Divya, 2018 | 288 |
| Figura 7. Esquema de una pickering emulsión y una emulsión clásica (a base de tensioactivos). Adaptado de Chevalier & Bolzinger, 2013 | 3030 |
| Figura 8. Esquema general del procedimiento para obtener fosvitina liofilizada a partir de huevos enteros. Adaptado de Orcajo et al., 2013..... | 322 |
| Figura 9. Tamaños en kDa de las bandas del patrón peqGOLD Protein Marker V utilizado para la electroforesis SDS-PAGE. Imagen obtenida del catálogo del producto (VWR, nº 27-2210) | 35 |
| Figura 10. Espectrofotómetro UV-Visible GENESYS 150 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Obtenida de 2022 Thermo Fisher Scientific Inc..... | 36 |
| Figura 11. Método del 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH). (Molyneux, 2004)..... | 40 |
| Figura 12. Ilustración de la síntesis de pickering emulsions utilizando un homogeneizador ULTRA TURRAX para llevar a cabo la emulsión..... | 43 |
| Figura 13. Fosvitina liofilizada obtenida tras el procedimiento de extracción mencionado en el punto 4.2 | 44 |

| | |
|---|-----|
| Figura 14. Gel de SDS-PAGE electroforesis donde se observa la presencia de α -fosvitina y β -fosvitina (~ 35 kDa) y la presencia de los fosvetes (~10-15 kDa), indicados en recuadros amarillos..... | 45 |
| Figura 15. Recta de calibrado con disoluciones de Albúmina de Suero Bovino (BSA) a distintas concentraciones | 46 |
| Figura 16. De izquierda a derecha: disolución de quitosano, NTPP, disolución de quitosano, NF0,5, NF1,0, NF1,5. | 476 |
| Figura 17. Microscopía del microscopio electrónico de transmisión de las nanopartículas NTPP, NF0,5, NF1,0 Y NF1,5 visualizadas 20000 y 50000 aumentos | 51 |
| Figura 18. Espectros IR de quitosano puro (negro), fosvitina aislada (rojo), y de las nanopartículas sintetizadas: NF1,5 (verde), NF1,0 (amarillo) y NF0,5 (azul)..... | 53 |
| Figura 19. Eficacia de encapsulación (%) de la curcumina en las nanopartículas sintetizadas: NF0,5, NF1,0, NF1,5 y NTPP. Letras diferentes indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$) | 56 |
| Figura 20. Gel de SDS-PAGE electroforesis de la fosvitina hidrolizada..... | 62 |
| Figura 21. Resultados de SDS-PAGE de la hidrólisis enzimática con pretratamiento HTMP, donde en la celda 1 están los patrones, en 2 la fosvitina nativa, en 3 la fosvitina pretratada HTMP, en 4 la fosvitina pretratada HTMP + tripsina. Huang et al., 2019.... | 63 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Relación entre la fosvitina presente en el sedimento y la añadida inicialmente (n=4) | 47 |
| Tabla 2. Resultados del tamaño en nm de las nanopartículas sintetizadas (Z-average), índice de polidispersidad (PdI) y Potencial Z (mV) (medias \pm desviaciones estándar) (Para Z-average y PdI n=2, para Potencial Z n=3) | 48 |
| Tabla 3. Contenido en humedad y de sólidos de las nanopartículas de quitosano y fosvitina. | 52 |
| Tabla 4. Análisis de la capacidad antioxidante desarrollado con los métodos de ABTS y DPPH. Resultados expresados como medias \pm desviaciones estándar (n=3)..... | 54 |
| Tabla 5. Evolución de los parámetros de pH y Turbidez (medias \pm desviaciones estándar) (n=2) (n=2) de las nanopartículas de quitosano y TPP y las nanopartículas de quitosano y fosvitina con distintas concentraciones. | 60 |
| Tabla 6. Evolución de los parámetros de Z-average, PdI y Potencial Z (medias \pm desviaciones estándar) (n=2) de las nanopartículas de quitosano y TPP y las nanopartículas de quitosano y fosvitina con distintas concentraciones..... | 61 |
| Tabla 7. Tamaño de las emulsiones tipo Pickering (medias \pm desviaciones estándar) (n=2) | 64 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|--------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| APS | Amonio Persoxodisulfato |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| DLaTGS | Detector de sulfato de triglicina dopado con α alanina de lantano deuterado |
| DLS | Dispersión Dinámica de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>) |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FTIR | Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| HTMP | <i>High Temperature Mild Pressure</i> |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| LSD | <i>Least Significant Difference</i> |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |
| NC | Nanopartículas resultantes de la encapsulación de curcumina |
| NF | Nanopartículas de quitosano y fosvitina |
| NF0,5 | Nanopartículas de quitosano y una disolución de fosvitina de 0,5 mg/ml |

| | |
|----------|--|
| NF1,0 | Nanopartículas de quitosano y una disolución de fosvitina de 1,0 mg/ml |
| NF1,5 | Nanopartículas de quitosano y una disolución de fosvitina de 1,5 mg/ml |
| NTPP | Nanopartículas de quitosano y tripolifosfato de sodio |
| PdI | Índice de polidispersidad |
| PEG | Polietilenglicol |
| pI | Punto isoelectrico |
| PLA | Ácido poliláctico |
| PNP | Nanopartículas poliméricas |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| TPP | Tripolifosfato de sodio |

RESUMEN

El huevo es un alimento que se consume en todo el mundo por sus propiedades nutricionales y funcionales. La yema de huevo está compuesta por diferentes compuestos con diferentes propiedades y se puede separar fácilmente por centrifugación en dos fracciones: los gránulos y el plasma. En los gránulos se encuentra la proteína más fosforilada que existe naturalmente, la fosvitina, que presenta notables propiedades bioactivas y tecnológicas como son su actividad antioxidante, su capacidad emulsionante o su actividad antimicrobiana, que la hacen de gran interés para multitud de aplicaciones.

En este trabajo se evaluó la capacidad de la fosvitina para la síntesis de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica como sustituto natural del tripolifosfato de sodio, aditivo más conocido y estudiado como agente aglomerante. Se caracterizó la morfología, las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad en el tiempo de almacenamiento de las nanopartículas, así como también se evaluó el posible uso de los péptidos resultantes de la hidrólisis de la fosvitina para la síntesis de nanopartículas. Se valoró también su posible aplicación en la industria alimentaria como agente encapsulante y como agente emulsificante para la preparación de emulsiones de tipo Pickering.

Los resultados obtenidos indicaron que las nanopartículas tenían una morfología esférica uniforme de un tamaño comprendido entre 230 y 860 nm con una capacidad de eliminar los radicales libres de entre 28,1-52,9%, dependiendo de la concentración de fosvitina añadida. Por otra parte, el pH varió a lo largo del tiempo de almacenamiento y la turbidez aumentó, así como también el tamaño mostró una tendencia a aumentar y el potencial Z a disminuir, pero sin diferencias claras entre las distintas muestras. El resultado de la hidrólisis no resultó óptimo para sintetizar nanopartículas. Las nanopartículas permitieron encapsular curcumina pero con una eficacia de encapsulación baja, y actuaron como agente emulsionante en la formación de emulsiones de tipo Pickering aunque el tamaño de las gotas de las emulsiones no fueron las ideales.

Los resultados generales sugieren que es posible sustituir el tripolifosfato por fosvitina en la preparación de nanopartículas de quitosano, sin embargo, las propiedades emulsionantes y encapsulantes de estas no fueron suficientemente altas como para ser consideradas relevantes. Por lo tanto, más estudios sobre la posible utilidad de las nanopartículas preparadas con fosvitina son necesarios para que puedan ser aprovechadas por la industria alimentaria

ABSTRACT

The egg is consumed all over the world for its nutritional and functional properties. The egg yolk is made up of different compounds with different properties and can be easily separated by centrifugation into two fractions: the granules and the plasma. Phosvitin, the most phosphorylated protein that exists naturally is found in the granules, which has remarkable bioactive and technological properties such as its antioxidant activity, its emulsifying capacity, or its antimicrobial activity, which make it of great interest for many applications.

In this work, the capacity of phosvitin for the synthesis of chitosan nanoparticles by ionic gelation as a natural substitute for sodium tripolyphosphate, the best-known additive and studied as agglomerating agent, was evaluated. The morphology, physicochemical properties and storage stability of the nanoparticles were characterized, as well as the possible use of the peptides resulting from the hydrolysis of phosvitin for the synthesis of nanoparticles. Its possible application in the food industry as an encapsulating agent and as an emulsifying agent for the preparation of Pickering emulsions was also assessed.

The results obtained indicated that the nanoparticles had a uniform spherical morphology with a size between 230 and 860 nm with a free radical scavenging capacity of between 28.1-52.9%, depending on the concentration of phosvitin added. On the other hand, the pH varied throughout the storage time and the turbidity increased, as well as the size showed a tendency to increase and the Z potential to decrease, but without clear differences between the different samples. The hydrolysis result was not optimal to synthesize nanoparticles. The nanoparticles allowed curcumin to be encapsulated but with a low encapsulation efficiency and acted as an emulsifying agent in the formation of Pickering emulsions, although the size of the droplets of the emulsions were not ideal.

The general results suggest that it is possible to substitute tripolyphosphate for phosvitin in the preparation of chitosan nanoparticles, however, the emulsifying and encapsulating properties of these were not high enough to be considered relevant. Therefore, more studies on the possible usefulness of nanoparticles prepared with phosvitin are necessary so that they can be used by the food industry.

1. INTRODUCCIÓN

El huevo es un alimento muy importante en la nutrición humana básica además de tener cualidades funcionales muy importantes en la industria alimentaria. El huevo de gallina está definido por la Unión Europea (UE) de la siguiente manera; “huevos” son los huevos con cáscara, que no sean huevos rotos, incubados o cocidos, que son producidos por gallinas de la especie *Gallus* y son aptos para el consumo humano directo o para la preparación de productos de huevo (UE, 2008). En España el consumo total de huevos en 2018 fue de 385,5 millones de kilogramos, lo cual representa un consumo per cápita de 134,3 unidades. En cuanto a la producción, España posee el 11% de las gallinas ponedoras de la Unión Europea (Gil, 2020).

El huevo consta de tres partes diferentes, en general, se puede expresar como 56-64% de albúmina, 25-33% de yema y 9-11% de cáscara con membranas (Cherian, Holsonbake & Goeger, 2002). Los principales componentes del huevo consisten en agua (76%), proteínas (12%) y lípidos (10%), además, también contiene cantidades bajas de carbohidratos, minerales y vitaminas (USDA, 2020). Casi todos los lípidos del huevo se encuentran en la yema, mientras que las proteínas se distribuyen entre la clara y la yema, principalmente. La yema de huevo se compone principalmente de livetinas (formas α , β y γ), lipovitelinas (formas α y β), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y fosvitina (Huang & Ahn, 2019).

La yema de huevo puede ser dividida en dos fracciones distintas que se pueden obtener luego de diluir y centrifugar la yema de huevo; los gránulos o sedimento y el plasma o sobrenadante (Laca et al., 2012). La fracción de plasma constituye el 77-81% de la materia seca de la yema de huevo, mientras que los gránulos el 19-23%. Los principales componentes del plasma son las LDL y las livetinas. Los gránulos consisten principalmente en lipoproteínas de alta densidad (HDL), fosvitina y LDLg (Anton, 2013).

La fosvitina es una de las fosfoproteínas de la yema de huevo conocida como la proteína con el mayor contenido de fósforo encontrada en la naturaleza (Takeuchi et al., 2022). Debido a la multitud de propiedades funcionales que posee, como son las actividades emulsionantes, antioxidante, antibacteriana, inmunoestimulante, inhibidora de la melanogénesis, antígenotóxica, antielastasa y antihialuronidasa (Lee et al., 2020; Moon et al., 2014; Jung et al., 2012; Kovacs-Nolan et al., 2005), es de gran interés tanto en la tecnología alimentaria como en la salud humana (Yilmaz, 2020).

Por otra parte, la industria alimentaria tiene la necesidad de innovar y desarrollar nuevos alimentos que se adapten a las exigencias del mercado, que ha cambiado de forma importante debido a la evolución en los hábitos de los consumidores, cada vez más críticos, informados y exigentes y con creciente interés por la salud y la seguridad alimentaria. Del mismo modo, la legislación es cada vez más restrictiva en el uso de aditivos y el consumidor es cada vez más reacio a su consumo, prefiriendo ingredientes naturales, pero sin renunciar a la calidad de los alimentos ni a una vida útil prolongada. Por lo cual, la industria alimenta busca una nueva alternativa tecnológica que, además de mantener la vida útil de los alimentos, proporcione también nuevas propiedades tecnológicas y efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores.

Una de las técnicas que se encuentran en auge en la industria alimentaria es la aplicación de la nanotecnología, que crea oportunidades de mejora sobre la calidad, la seguridad y la biodisponibilidad de los alimentos (Zibaei & Jafari, 2021) en donde se incluyen las nanopartículas, las cuales tienen gran interés en la producción, el procesamiento y el envasado de alimentos, así como también en la formulación de nuevos aditivos alimentarios con el fin de prolongar la vida útil, mejorar las propiedades sensoriales y aumentar la estabilidad del proceso y de los productos alimentarios (Wang et al, 2021). Además, las nanopartículas también son interesantes para fines específicos como pueden ser la encapsulación de nutrientes o la elaboración de nanoemulsiones (Thekkethil et al, 2019).

Entre las nanopartículas sintetizadas de materiales orgánicos más estudiadas se encuentran las nanopartículas de quitosano y tripolifosfato de sodio (TPP) como agente iónico para formar complejos. Sin embargo, aunque este método está muy estudiado, es interesante la búsqueda de nuevos métodos de síntesis que se ajusten a las nuevas exigencias de los consumidores, como son las de sustituir los aditivos alimentarios por otras fuentes naturales, así como también proporcionar nuevas propiedades bioactivas con efectos beneficiosos en la salud humana.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, en este trabajo se busca sustituir el TPP por la fosvitina de la yema de huevo como polianión acomplejante en la síntesis de nanopartículas de quitosano, de manera que aporte nuevas propiedades bioactivas. Por otro lado, se busca también estudiar la aplicabilidad de estas nuevas nanopartículas en la industria alimentaria como agente encapsulante y como agente emulsionante en la formación de emulsiones de tipo Pickering.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que en la bibliografía se encuentra descrito el uso de tripolifosfato de sodio como agente aglomerante en la preparación de nanopartículas de quitosano, el objetivo principal de este trabajo es evaluar la utilización de fosvitina, una proteína natural extraída de la yema de huevo con diferentes propiedades bioactivas, como agente aglomerante sustitutivo, preparándose de este modo nanopartículas de quitosano con propiedades extendidas. Con este fin, se pretende evaluar el efecto de la fosvitina sobre la morfología, tamaño y potencial Z de las nanopartículas preparadas y el uso de fosvitina hidrolizada como agente aglomerante en lugar de la fosvitina intacta. Además de determinar las propiedades antioxidantes de estas nanopartículas de fosvitina y quitosano, así como su estabilidad de almacenamiento y su capacidad encapsulante de curcumina. Finalmente, se desea evaluar la posibilidad de preparar emulsiones tipo Pickering con las nanopartículas producidas.

3. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

3.1 EL HUEVO

3.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El huevo es un alimento ideal, complemento de la óptima alimentación, que proporciona valiosas y nutritivas proteínas (Ortiz Ureta, 2008). Los huevos que se consumen de manera habitual son huevos de la especie *Gallus gallus*, si no se indica la especie, se entiende que la palabra “huevo” se refiere a los huevos de esta especie. La Unión Europea regula la comercialización de estos huevos con normas sobre producción, comercialización, etiquetado e higiene (Instituto de Estudio del Huevo, 2022).

El corte transversal de un huevo permite diferenciar nítidamente tres elementos fundamentales y fácilmente separables entre sí (Figura 1): la cáscara (10%), la clara o albumen (54%) y la yema (36%), separadas entre sí por membranas que mantienen su integridad (Ortiz Ureta, 2008).

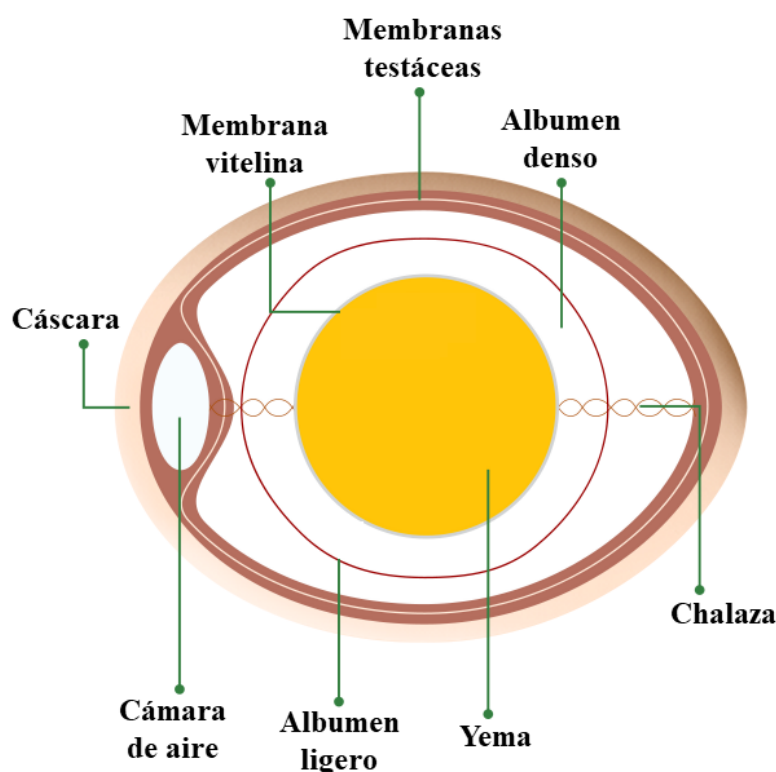


Figura 1. Estructura del huevo y sus partes. Adaptado de Ortiz Ureta (2008)

El huevo está diseñado como una estructura idónea para proteger y alimentar al embrión, el cual se desarrolla a partir de un huevo fertilizado. Existen barreras físicas y químicas para proteger el embrión de la contaminación exterior y del crecimiento bacteriano. Se consideran barreras físicas la cáscara y cutícula, las membranas testáceas,

la densidad y estructura de la clara y la membrana exterior de la yema. De igual manera, las barreras químicas son los compuestos antibacterianos del albumen, su pH alcalino, las moléculas que secuestran cationes, proteínas y vitaminas, así como las que tienen efecto antienzimático (Instituto de Estudio del Huevo, 2022).

Por otra parte, las proteínas presentes en el huevo tienen un 93,7% de valor biológico, tasa de eficiencia que la proteína invierte en el crecimiento. Por ello, obtiene la mejor calificación de todos los alimentos y es tomada como proteína patrón o de comparación para otras proteínas. Tiene los 20 aminoácidos, ofreciendo cada huevo mediano, aproximadamente de 60 g, de entre 65 a 75 kilocalorías (Ortiz Ureta, 2008), es decir, un aporte calórico relativamente bajo.

3.1.2 ESTRUCTURA DEL HUEVO

3.1.2.1 Cáscara

Es el recubrimiento calcáreo que aísla al huevo del exterior, constituye el 10% del huevo. Está constituido por carbonato de calcio (más del 95% del total de la cáscara), carbonato de magnesio y fosfato tricálcico como cristales integrados en una red fibrosa de polisacáridos y proteínas (2% del total de la cáscara) (Ortiz Ureta, 2008). En su superficie hay numerosos poros que facilitan el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior del huevo (Instituto de Estudio del Huevo, 2022).

3.1.2.2 Clara o albumen

Representa el 54% del total del peso del huevo. Es una sustancia viscosa, transparente, que se compone de 4 capas que forman el llamado “saco albuminoideo”, cuya función es proteger a la yema: capa fina interior fluida, capa intermedia densa, capa gruesa fluida, capa fina exterior densa (Instituto de Estudio del Huevo, 2022). Es una disolución de proteínas en agua, de 10 a 12%, con azúcares libres, de 0,5 a 1%, principalmente glucosa. Sus proteínas son responsables de la formación de espuma al batir las claras, por incorporación de aire (Ortiz Ureta, 2008).

3.1.2.3 Yema

También llamada vitelo, ocupa 36% del huevo fresco completo, la materia seca varía del 50 al 52% según la edad de la gallina ponedora y del tiempo de conservación, ya que durante el almacenamiento del huevo supone una transferencia de agua desde la clara a la yema (Anton, 2007).

La composición de la yema de huevo en materia seca es la siguiente (Anton, 2007; Ortiz Ureta, 2008):

- Lípidos, alrededor de un 63%, de los cuales un 62% están constituidos por triglicéridos de ácidos grasos saturados, poliinsaturados linoleico y monoinsaturado oleico; 33% de fosfolípidos de lecitina o fosfatidilcolina y menos de 5% por colesterol, de 250 a 300 mg por yema; además de pigmentos carotenoides luteína y zeaxantina (<1%) que actúan como antioxidantes y dan color a la yema.
- Proteínas, un 33% aproximadamente. La mayor parte de las proteínas se encuentran en unión junto a los lípidos, en una proporción 2:1 de lípidos y proteínas, respectivamente. Se estima que en 100 g de yema hay 33 g de α y β lipovitelinas (60% de fosfolípidos y 40% de lípidos neutros), 27 g de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 30 g de α , β , γ livetinas, y 8,5 g de fosvitina.
- Carbohidratos, menos de 1%
- Minerales, alrededor del 3%, en forma de sales de calcio, fósforo, hierro, selenio, zinc y yodo.
- Vitaminas liposolubles A, D, E y trazas de tiamina y riboflavina

Las lipoproteínas y los fosfolípidos de la yema, juntos, le dan al huevo su poder emulgente o emulsionante, porque estabilizan las micelas grasas de una emulsión, formando una capa externa lípido-proteína, con la parte lipoide hacia adentro y la parte hidrófila hacia el medio acuoso (Ortiz Ureta, 2008).

3.1.3 ESTRUCTURA DE LA YEMA DE HUEVO

La yema de huevo es un sistema complejo de partículas en suspensión en un fluido amarillento denominado plasma que contiene lípidos y proteínas. Los lípidos de la yema de huevo se encuentran exclusivamente como ensamblajes de lipoproteínas y se componen de un 62% de triglicéridos, un 33% de fosfolípidos y alrededor de un 5% colesterol, que empaquetados junto a proteínas forman las lipoproteínas. Por su parte, las proteínas están presentes como proteínas libres o apoproteínas asociadas a los lípidos. Las lipoproteínas constituyen el principal componente de la yema de huevo, así, la yema de huevo está formada en un 68% por lipoproteínas de baja densidad (LDL), en un 16% por lipoproteínas de alta densidad (HDL), 10% por proteínas globulares (livetinas), 4% por fosvitina y 2% por proteínas menores (Anton, 2007; Marcet, 2015).

Los principales tipos de partículas que se encuentran en suspensión en la yema de huevo son esferas, perfiles y gránulos. Las esferas son los componentes menores (1% de la materia seca de la yema) con un diámetro de 4 a 150 μm que consisten en empaquetamientos de lípidos y lipoproteínas, los perfiles son partículas redondas de 12-48 nm de diámetro y se consideran LDL, mientras que los gránulos consisten en complejos circulares con un diámetro del rango de 0,3 μm a 2 μm .

Es por esto por lo que la yema de huevo puede ser fácilmente separada en dos fracciones (Figura 2), con diferentes propiedades nutricionales y funcionales, luego de una dilución con NaCl y centrifugación en las condiciones adecuadas (Anton, 2007). El sobrenadante resultante de la centrifugación corresponde con la fracción plasmática, que contiene entre un 75 y 81% de la materia seca de la yema y es la fracción rica en lípidos ya que contiene la mayor proporción de grasas y colesterol y un bajo contenido en proteínas, conteniendo sobre todo LDLs. La segunda fracción es la granular o sedimento que representa entre el 19 y el 23% de la materia seca de la yema de huevo y está constituida principalmente por proteínas y en menor cantidad por lípidos, representando un porcentaje de 64 y 31, respectivamente, fracción que está principalmente compuesta de HDL y fosvitina (Anton, 2013; Marcet, 2022).

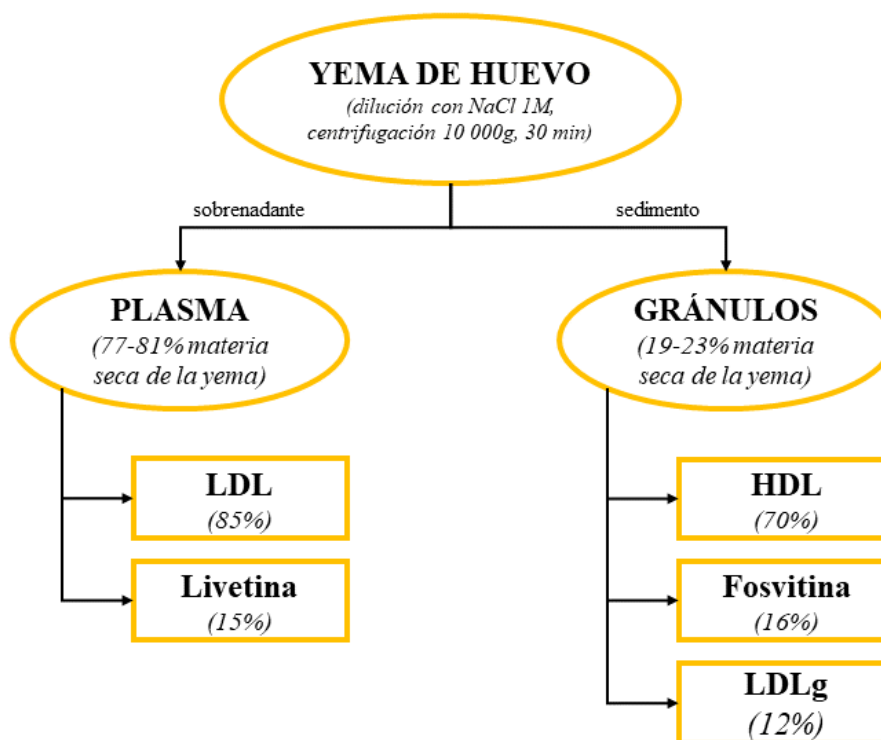


Figura 2. Fraccionamiento y composición de la yema de huevo en gránulos y plasma. Adaptado de Anton, 2013.

Estas dos fracciones presentan una composición, estructura y propiedades muy diferentes, por lo que conseguir su separación para aplicaciones tecnológicas permite un uso más eficiente que el empleo de la yema de huevo completa, dependiendo de las aplicaciones en las cuales se pretende utilizar.

3.1.4 Fracción plasmática

El plasma forma una fase acuosa en la que las partículas de la yema están en suspensión. Comprende el 75-81% de la materia seca de la yema de huevo, y está compuesto en un 85% por LDL y un 15% por glicoproteínas globulares, principalmente α , β , y γ livetinas. Las LDL son partículas esféricas de unos 35 nm de diámetro formadas por triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol rodeados por una capa de apoproteínas y fosfolípidos (Laca et al, 2015).

Las LDL desempeñan un papel principal en la formación y estabilización de emulsiones a base de yema, y en consecuencia, se considera que la fracción plasmática contribuye principalmente a las propiedades emulsionantes de la yema (Anton et al, 2003).

3.1.5 Fracción granular

Los gránulos representan entre el 19-23% de la materia seca de la yema de huevo, reuniendo aproximadamente el 50% del total de la proteína de la yema y el 7% de los lípidos. Se compone por aproximadamente de un 70% de HDL, 16% fosvitina y en menor medida por LDL, que se encuentran formando complejos circulares (Marcet, 2015).

A diferencia del plasma, se requieren condiciones específicas de alta concentración de NaCl para que las proteínas de los gránulos sean solubles, ya que los complejos HDL-fosvitina unidos por puentes fosfocálcicos a una fuerza iónica baja son insolubles, y cuando la fuerza iónica aumenta con ayuda de NaCl, los puentes de fosfocalcio se rompen debido a que el sodio reemplaza al calcio divalente, consiguiendo solubilizar el 80% del contenido granular (Anton et al, 1997; Le Denmat et al, 2000).

Los agregados de los gránulos tienen poca actividad superficial y no se adsorben de manera eficiente cuando compiten con las proteínas solubles. Pero cuando las condiciones fisicoquímicas permiten la solubilización de los gránulos, la HDL solubilizada proporciona propiedades emulsionantes. Además, la fosvitina se desplaza fácilmente de la interfase por las lipoproteínas de la yema (Le Denmat et al, 2000).

3.2 LA FOSVITINA

La fosvitina es una de las fosfoproteínas presentes en la yema de huevo conocida por ser la proteína con el mayor contenido en fósforo presente en la naturaleza, donde aproximadamente el 80% del fósforo de la yema de huevo se encuentra en esta proteína (Yilmaz et al, 2020). Las fosvitinas representan el 4% de la materia seca de la yema de huevo y el 16% de los gránulos de la yema de huevo. Estas proteínas están altamente fosforiladas y tienen una masa molar de 35-40 kDa, con unos 200 aminoácidos, donde más de la mitad de ellos son serinas como fosfoserinas, y casi el 90% de estas serinas se encuentran fosforiladas (Takeuchi et al, 2022; Yilmaz, 2020).

Aunque la función biológica de la fosvitina aún no se comprenda por completo, se ha visto que la fosvitina tiene un efecto sobre la nucleación y el crecimiento de la hidroxiapatita, que es un componente mineral principal del hueso animal (Onuma, 2005; Zhang et al., 2017).

La fosvitina se puede separar en isoformas de fosvitina α -fosvitina y β -fosvitina, con diferentes pesos moleculares de sus subunidades, de 160 y 190 kDa, respectivamente. La composición en aminoácidos de una molécula de fosvitina es similar a la de un copolímero tribloque: una cadena peptídica hidrofílica central larga en forma de bloque de aproximadamente 100 residuos de serina fosforilados que se encuentra conectado a otros dos bloques externos más pequeños que contienen principalmente aminoácidos hidrofóbicos. El bloque medio de la fosvitina contiene una gran cantidad de grupos de ácido fosfórico cargados negativamente para $\text{pH} \gg \text{pI}$, siendo pI el punto isoeléctrico y el de la fosvitina se encuentra por debajo de $\text{pH} 2$, por lo que para las condiciones de solución más comunes con $\text{pH} > 2$, las fosvitinas están altamente cargadas negativamente (Huopalahti et al, 2007). En soluciones acuosas saladas, todos los grupos fosforilados se protonan a $\text{pH} < \text{pI}$ y los pocos aminoácidos cargados positivamente como la arginina y la lisina, luego proporcionan una carga neta positiva (Takeuchi, 2022).

La fosvitina de la yema de huevo de gallina tiene muchas propiedades biológicas y funcionales debido a su estructura única como también a sus cualidades físicas y químicas. Como posee una estructura polianionica, debido a la gran cantidad de grupos de fosfoserina cargados, las fosvitinas tienen la capacidad de quelación de iones multivalentes biológicamente esenciales como el magnesio, el calcio y el hierro, donde este último presente en la yema de huevo se encuentra prácticamente unido en su totalidad

(95%) a la fosvitina, donde la capacidad de unión se ve fuertemente afectada por el pH o la fuerza iónica (Yilmaz et al, 2020). La afinidad por los aniones de hierro es mayor cuando este se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}) que ferroso (Fe^{2+}) (López, 2021). Por otro lado, debido a la presencia de fosvitina en la yema de huevo, la absorción de algunos minerales se ve reducida, reduciendo su biodisponibilidad

Sin embargo, esta alta capacidad de unión a metales multivalentes hace que la fosvitina sea un potencial agente antioxidante. Además de la fosvitina, otros componentes de la yema de huevo como otras proteínas presentes, fosfolípidos, vitamina E, carotenoides y aminoácidos aromáticos contribuyen a la capacidad antioxidante total de la yema de huevo. La fosvitina tiene capacidad antioxidante en la yema de huevo al inhibir la oxidación de fosfolípidos catalizada por hierro y cobre, lo que resulta interesante para la industria alimentaria, ya que podría ser una fuente natural que ralentice la oxidación lipídica (Yilmaz et al, 2020). La oxidación de lípidos es un problema importante, ya que limita la vida útil de los productos alimenticios, que es causada por una reacción en cadena de radicales libres promovida por la reacción de reducción-oxidación (redox) de iones metálicos multivalentes (Takeuchi et al, 2022). Por lo que la fosvitina podría ser un sustituyente interesante de los antioxidantes sintéticos, ya que es una fuente natural y con efectos positivos en la salud humana (Yilmaz, 2020).

Por otra parte, la fosvitina se aplica frecuentemente en emulsiones alimentarias, ya que actúa como estabilizador y se encuentra presente de manera natural en las emulsiones derivadas de la yema de huevo. En las emulsiones alimentarias, se ha sugerido que la quelación de hierro por las fosvitinas desempeña un papel vital en la oxidación lipídica de las emulsiones alimentarias y, por lo tanto, la actividad antioxidante de las fosvitinas mediante la quelación de dichos metales prooxidantes ha despertado interés. Recientemente, se ha encontrado que el hierro férrico de las fosvitinas puede ser uno de los principales prooxidantes de las emulsiones alimentarias, ya que se considera que el hierro férrico de las fosvitinas se libera a pH ácido, lo que promueve la reacción radical de la fase lipídica. La actividad superficial de las fosvitinas en una interfase aceite-agua está impulsada por la estructura similar a un tribloque de la fosvitina, con dos bloques exteriores relativamente hidrofóbicos y un gran bloque cargado hidrofílico, donde la interacción electrostática entre los grupos fosfato cargados tiene una gran influencia en la estabilización de las gotas de la emulsión (Takeuchi et al, 2022).

Otra propiedad bioactiva de la fosvitina es que muestra buenas cualidades antibacterianas. La mayoría de las bacterias patógenas son Gramnegativas, las cuales tienen una membrana exterior compuesta por lipopolisacáridos (LPS), a menudo llamados endotoxinas que proporcionan una barrera de permeabilidad eficaz a la célula bacteriana contra los agentes nocivos. Sin embargo, dado que el LPS puede ser el blanco de algunos compuestos antibacterianos como los tensioactivos y los quelantes, las proteínas anfifílicas capaces de quelar también podrían tener un efecto negativo sobre las bacterias Gramnegativas, como es el caso de la fosvitina (Sattar Khan et al., 2000).

Aunque las fosvitinas tienen funciones esenciales como quelante de iones y emulsionante en las emulsiones alimentarias, las propiedades fisicoquímicas fundamentales de la fosvitina, como el tamaño, el comportamiento de agregación, la carga y la influencia de los cationes multivalentes, aún no se comprenden con exactitud.

3.2.1 HIDRÓLISIS DE LA FOSVITINA

La fosvitina de la yema de huevo es un excelente sustrato para la producción de péptidos bioactivos como son los fosfopéptidos, los cuales tienen una gran capacidad de quelación de iones como el calcio o el hierro. Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos que son inactivos dentro de la proteína original, pero que juega una actividad fisiológica o biológica específica en el cuerpo una vez que son liberados por hidrólisis enzimática. Los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias son excelentes candidatos como agentes promotores de salud por su capacidad antioxidante, la quelación de minerales, y su actividad inmunomoduladora y anticancerígena (Zhao et al., 2021).

Muchos estudios demostraron que las fosfoproteínas tienen un papel importante en el proceso de biomineralización ya que el calcio se une a los grupos fosfatos de las fosfoproteínas y promueve la absorción y cristalización de minerales. Se ha descrito que la fosvitina promueve la transformación del dihidrato de fosfato dicálcico en hidroxiapatita e induce la mineralización. Los fosfopéptidos derivados de fosfoproteínas también tienen un potencial de promover la biomineralización. Es por ello, que la hidrólisis en péptidos de la fosvitina, puede ser una fuente excelente de producción de fosfoproteínas de gran variedad (Zhao et al., 2021).

3.3 EL QUITOSANO

Los polímeros son moléculas de muy alto peso molecular que consisten en unidades estructurales repetidas, los monómeros, que usualmente se mantienen unidas por enlaces covalentes formando una cadena. Los polímeros naturales, también conocidos como biopolímeros son derivados de polisacáridos, proteínas, lípidos, polifenoles y otros grupos de moléculas especializadas que participan en la construcción celular, el almacenamiento de energía y en la conservación y transmisión de la información genética (Fabián et al., 2012). Dentro de los biopolímeros derivados de polisacáridos tienen especial interés el almidón, la celulosa y la quitina/quitosano.

La quitina es, tras la celulosa, el biopolímero más extendido en la naturaleza, conformado por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces β -(1-4), donde su desacetilación da como producto el quitosano, polímero de unidades repetitivas alternas de N acetilglucosamina y D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos β -(1-4) (Figura 3) (Jayakumar et al., 2021).

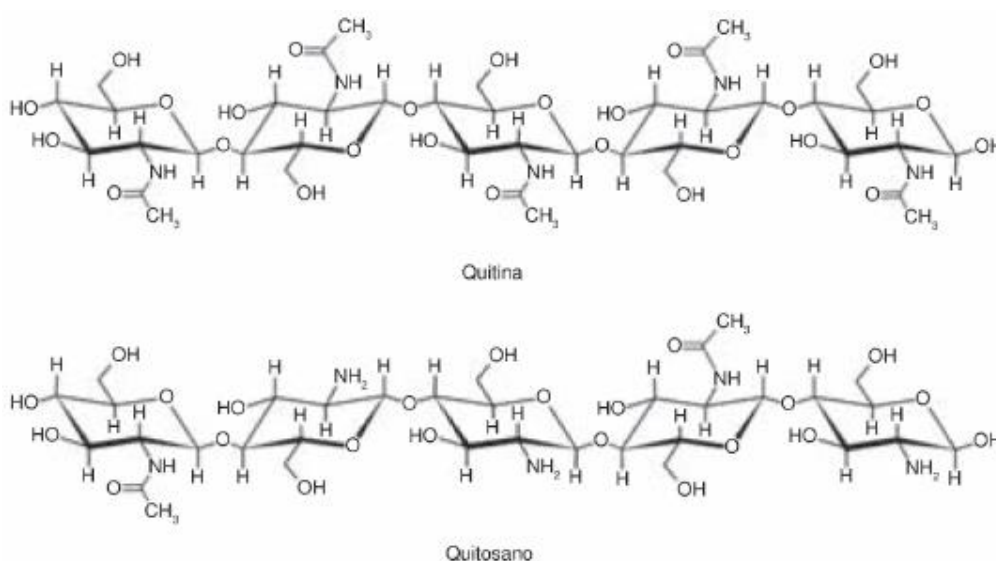


Figura 3. Estructura de la quitina y el quitosano. (Jayakumar et al., 2021)

La principal fuente de quitina la constituyen los desechos de mariscos, como caparzones de cangrejos, camarones, calamares y otros crustáceos de la industria pesquera, por lo que se pueden extraer en grandes cantidades de manera ambientalmente viable para aplicaciones biológicas. Por otra parte, el quitosano es sintetizado de manera conjunta con la quitina por algunos hongos como parte de su pared celular. Sin embargo, el quitosano comercial se produce a partir de la desacetilación de la quitina en reacciones de catálisis básica (Fabián et al, 2012).

Las propiedades físicas del quitosano están controladas por el peso molecular del precursor, el grado de desacetilación y despolimerización, así como las interacciones con los grupos amino e hidroxilo presentes en la estructura del polímero. Las propiedades estructurales y biológicas del quitosano como su naturaleza catiónica, solubilidad en medio acuoso, biodegradabilidad y mucoadhesividad son resultado de su estructura polisacárida (Jayakumar et al., 2021). La unidad estructural básica, como la N-acetil D glucosamina presente en el quitosano, es uno de los principales componentes de la matriz extracelular de los mamíferos. Debido a esta ventaja, el quitosano y sus derivados pueden procesarse para aplicaciones biológicas y biomédicas. Otra gran ventaja del quitosano y sus productos es que pueden procesarse en diversas formas, como polvos, escamas, membranas, esponjas, fibras e hidrogeles (Figura 4). Además, el quitosano y sus derivados tienen varias propiedades biológicas útiles como la bioadhesión, la biocompatibilidad, el efecto antimicrobiano y una mayor capacidad de cicatrización de heridas una vez colocados en un sistema biológico, demostrando así ser un excelente biomaterial (Jayakumar et al., 2021).

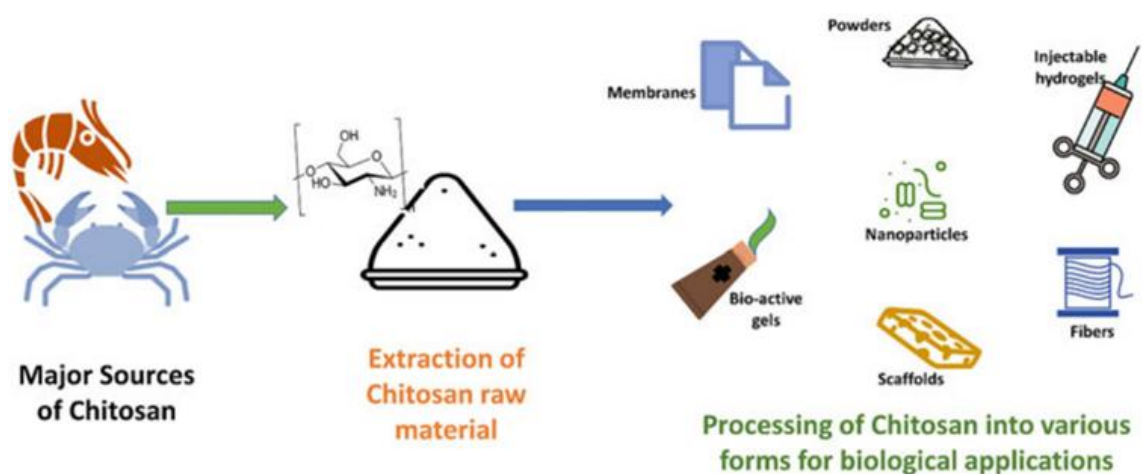


Figura 4. Esquema de las diversas manera en que el quitosano puede ser procesado en diversas formas (Jayakumar et al., 2021)

3.3.1 PROPIEDADES DEL QUITOSANO

El quitosano ha despertado gran interés a nivel industrial por sus múltiples aplicaciones, ya que es física y biológicamente funcional, puede ser modificado química y enzimáticamente y es biodegradable y compatible con órganos, tejidos y células. Dependiendo de la aplicación a la que sea destinado, debe entenderse a una serie de características, como puede ser el grado de N-acetilación, ya que algunas propiedades

dependen del número de monómeros que presenta dicha desacetilación (Badawy & Rabea, 2011).

En el campo biomédico resulta interesante por sus propiedades biológicas como son la biodegradabilidad, la biocompatibilidad, la no toxicidad, los efectos antibacterianos y antifúngicos, el potencial de cicatrización de heridas, la capacidad de estimular el sistema inmunitario, la actividad antitumoral, etc., de manera que puede ser interesante en ingeniería de tejidos, como anticoagulantes sanguíneos, como apósitos para heridas o para el suministro controlado de fármacos/vacunas/enzimas así como también agente idóneo para la fabricación de biosensores o biomembranas (Saharan et al., 2016; Jayakumar et al., 2021). La propiedad antimicrobiana, el efecto analgésico y el efecto hemostático del quitosano lo hacen adecuado como material de vendaje para heridas (Saharan et al., 2016; Muxika et al., 2017), mientras que propiedades como la gelificación in situ, el carácter hidrofílico y la mucoadhesión lo hacen ideal para las funciones de administración de fármacos (Shariatnia et al., 2018).

En la industria alimentaria también tiene gran interés, ya que el quitosano es capaz de formar películas que pueden sustituir a los materiales plásticos derivados del petróleo cuya degradación y eliminación es costosa, tanto en tiempo como en carga contaminante. Los envoltorios de quitosano por su parte son biodegradables y presentan una estructura estable y homogénea, así como buenas propiedades mecánicas y de barrera (Kerch, 2015), lo que permitiría desarrollar nuevos tipos de envasados más sostenibles. Por otra parte, el quitosano es capaz de formar hidrogeles, redes tridimensionales que se hinchan al entrar en contacto con el agua, así como también formar nanopartículas, fibras o películas aplicables en la industria alimentaria (Desai, 2016). Por otra parte, gracias a su naturaleza catiónica, el quitosano posee propiedades antibacterianas, las cuales se pueden mejorar aún más combinándolo con nanopartículas metálicas, como ZnO, TiO₂ y Ag. Del mismo modo, debido a su propiedad quelante, presenta cierta actividad antioxidante, que junto a la actividad antibacteriana resultaría interesante como aditivo alimentario natural para prolongar la vida útil de los productos alimentarios. Así como también tiene aplicación como agente espesante y estabilizante de emulsiones alimentarias (Fabián et al., 2012).

3.4 NANOTECNOLOGÍA

El término "nanotecnología" comprende la comprensión de la física, la química, la biología y la tecnología fundamentales de los objetos a escala nanométrica. El término "nano" en la palabra nanotecnología significa una milmillonésima, por lo que la nanotecnología trata sobre las diferentes estructuras de la materia con dimensiones del orden de una milmillonésima parte de metro. En los últimos años, se ha convertido en uno de los campos de vanguardia más importantes de la ciencia (Khattak et al., 2019).

La vida está organizada a nivel de las células, pero es bien sabido que los eventos, interacciones y procesos celulares naturales tienen lugar a escala subcelular y molecular. Esta es la razón por la cual la nanotecnología está destinada a desempeñar un papel de liderazgo clave en el desarrollo de herramientas capaces de identificar, medir y estudiar tales eventos a nivel nanométrico, así como contribuir a la revelación de interacciones y mecanismos biológicos desconocidos (Khattak et al., 2019).

Se considera que los objetos de interés para la nanotecnología son aquellos comprendidos entre 0,1 y 1000 nm, rango denominada como nanoescala. De forma general, las entidades con tamaños nanométricos son denominadas nanoobjetos, donde podemos encontrar desde átomos y pequeñas moléculas hasta estructuras fabricadas con ADN, nanotubos de carbono, transistores, nanopartículas, etc. (Figura 5) (Serena, 2021).

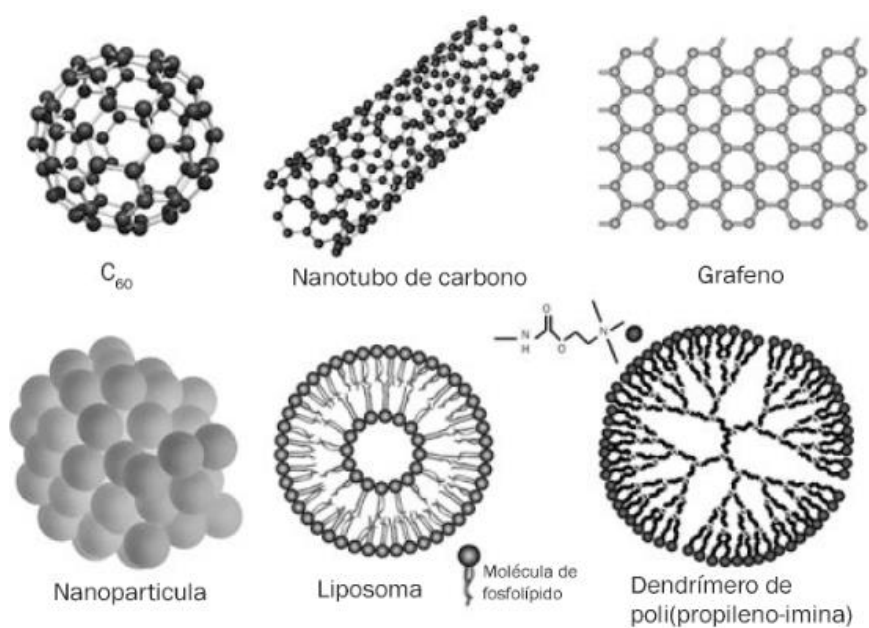


Figura 5. Distintos objetos de interés para la nanotecnología. Serena (2021)

En la industria alimentaria, la nanotecnología tiene gran interés para los envasados de alimentos y bebidas, donde el uso de nanopartículas diseñadas en aplicaciones de contacto con alimentos ofrece varios beneficios. Mientras el envasado tradicional se ocupa principalmente de la conservación del producto, la nanotecnología está involucrada en el envasado activo, que amplía las funciones del envasado desde la contención inerte del producto hasta la contención activa, que tiene como objeto la mejora de los nutrientes y favorece la entrega y extiende su vida útil (Enescu et al., 2019).

3.5 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son agrupaciones de átomos sin un tamaño, una forma o una composición bien definida, ya que pueden aumentar o disminuir de tamaño o cambiar de aspecto mediante la incorporación o la eliminación de uno o varios átomos. Hay una gran variedad de nanopartículas: metálicas, de óxidos metálicos, cerámicas, poliméricas, con estructuras amorfas o cristalinas, redondeadas, poliédricas, alargadas, huecas, etc. (Serena, 2021).

Las nanopartículas tienen propiedades físicas novedosas distintas tanto de la materia molecular como de la materia en estado sólido debido a su fracción significativa de átomos en la superficie. El estudio de estas propiedades físicas proporciona una forma única de aprender cómo se pueden preparar y caracterizar las nanopartículas. El conocimiento de la aplicación de nanopartículas en diferentes entornos industriales dicta las técnicas de preparación y caracterización de nanopartículas. Hay átomos en la superficie de las nanopartículas mediante los cuales la nanopartícula interactúa con su entorno (Nassar et al., 2021).

Las técnicas de preparación apropiadas pueden conducir a la formación de diferentes tipos de nanopartículas que pueden usarse como adsorbentes y catalizadores para diferentes aplicaciones en energía y medio ambiente. Diferentes técnicas de preparación pueden dar como resultado diferentes tipos de estructuras. Estas técnicas, desarrolladas utilizando experimentos apropiados, pueden brindar información sobre cuestiones complejas en la adsorción y la catálisis, como la selectividad de la unión de sustratos a los vértices, bordes o sitios frontales en una nanopartícula. Por ejemplo, las partículas nanométricas de metal, farmacéuticas, semiconductoras y cerámicas simples o complejas tienen numerosas aplicaciones en el desarrollo de sensores, recubrimientos de barrera térmica, catalizadores, pigmentos, fármacos, etc. (Nassar et al., 2021).

Teniendo en cuenta las diversas aplicaciones, existen diferentes técnicas de preparación de las nanopartículas. Los desafíos pueden variar desde controlar el tamaño de las partículas y la distribución del tamaño hasta la cristalinidad, la morfología y la forma de las partículas, ser capaces de usar las nanopartículas para una aplicación determinada y producirlas a partir de una variedad de precursores de elección. Se eligen diferentes técnicas de preparación de nanopartículas según sean adecuadas para una variedad de aplicaciones y minimicen los desafíos asociados con tales métodos de preparación. Una síntesis general de nanopartículas combina las ventajas de la baja toxicidad y el costo de los precursores y el alto rendimiento de la química coloidal de base acuosa tradicional con el control de la dispersión por tamaño (Nassar et al., 2021).

Otras nanopartículas de importancia industrial se pueden categorizar como nanopartículas poliméricas (PNP), las cuales son partículas coloidales sólidas de tamaño nanométrico generadas a partir de polímeros con propiedades novedosas. Los factores que hacen que los PNP alcancen propiedades relativamente únicas están relacionados con su tamaño de partícula reducido, donde predominan los efectos cuánticos y aumenta la relación entre el área superficial expuesta y el volumen. El tamaño y las distribuciones de tamaño de los PNP son notablemente interesantes, ya que contribuyen a características como el área superficial, la densidad de empaquetamiento, la viscosidad, la estructura compacta y la forma definida (Rao, 2011).

3.6 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

El quitosano, además de las aplicaciones ya mencionadas, tiene la capacidad de utilizarse como materia prima para sintetizar nanopartículas. Las nanopartículas de quitosano tienen las características del quitosano y las propiedades de las nanopartículas, como efecto de superficie e interfaz, efectos de tamaño pequeño y tamaño cuántico (Divya et al., 2018).

Actualmente se conocen 5 métodos diferentes para la síntesis de nanopartículas de quitosano: gelificación ionotrópica, microencapsulación, método de difusión del disolvente de emulsificación, formación de complejos poli electrolíticos y método micelar inverso. El método más comúnmente utilizado y desarrollado es la gelificación ionotrópica, que se basa en la interacción de un polianión, habitualmente el TPP, con el grupo amino del quitosano (Divya et al., 2018).

Para ello, el quitosano se disuelve en ácido acético y las nanopartículas se forman espontáneamente a temperatura ambiente tras la adición del polianión en agitación (Figura 6).

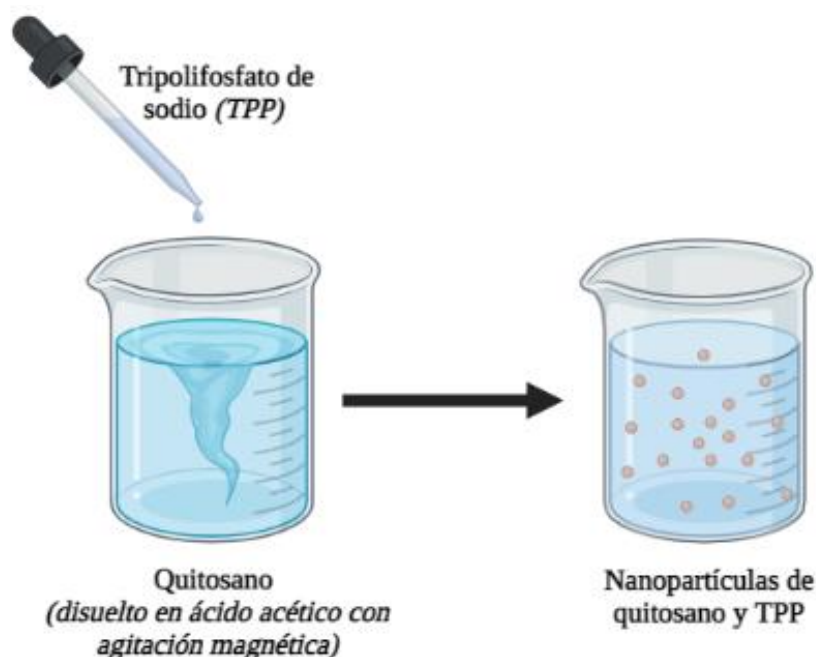


Figura 6. Esquema de la síntesis de nanopartículas de quitosano y TPP. Adaptado de Divya, 2018

Las nanopartículas de quitosano tienen gran aplicabilidad en distintos campos. En la industria alimentaria tienen varias aplicaciones, siendo una de ellas en la tecnología de encapsulación, ya que generalmente los compuestos lábiles como los polifenoles del té, los aceites esenciales, las vitaminas, las enzimas, etc., son inestables y pueden alterarse o perder sus bioactividades durante la formulación, el procesamiento de alimentos o la digestión. Las nanopartículas de quitosano y TPP permiten la estabilidad a lo largo del tiempo de estos compuestos al encapsularlos, así como también les permite una liberación controlada, además de una mejora en el potencial antioxidante, como una mayor inhibición de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en comparación con los compuestos libres sin encapsular, donde se sabe que el tamaño de las nanopartículas de quitosano y TPP influye en la actividad antimicrobiana (Singh et al., 2021).

Por otra parte, las nanopartículas de quitosano también tienen interés en la industria alimentaria al tener una potencial aplicación como recubrimientos o películas comestibles, donde la capacidad de las nanopartículas de quitosano para controlar la liberación de varios compuestos bioactivos puede mejorar las propiedades

antimicrobianas y antioxidantes de los materiales de envasado de alimentos. En varios estudios realizados, se ha demostrado que tratar carnes o pescados con un recubrimiento comestible que contiene nanopartículas de quitosano retrasa la oxidación lipídica, ya que se obtienen valores más bajos de peróxido, nitrógeno volátil total y ácido tiobarbitúrico, así como también recuentos más bajos de bacterias mesófilas, psicotrópicas y bacterias ácido lácticas en comparación con aquellos alimentos de origen animal sin recubrimientos de nanopartículas de quitosano, de manera que se puede decir que las películas comestibles elaboradas a partir de nanopartículas de quitosano, se puede usar potencialmente para aumentar la vida útil de los alimentos (Singh et al., 2021).

Otro de los campos de interés es la ingeniería de tejidos, ya que estas nanopartículas, debido a sus propiedades biológicas y de mucoadhesividad, pueden mejorar la permeabilidad transmucosa, mejorando así el transporte a través de la vía paracelular de las que puede inducir la reorganización estructural de las proteínas asociadas a la uniones estrechas (Peppas & Huang, 2004).

Además, también tienen gran interés en aplicaciones biomédicas; por un lado son interesantes en el uso de sondas de detección de algunos tipos de cáncer, ya que las sondas actuales al estar compuestas por metales pesados tienen el problema de la citotoxicidad, mientras que las nanopartículas de quitosano tienen una naturaleza biocompatible y no tóxica, que podrían ser utilizadas para este propósito. Por otro lado, también resultan interesantes para la liberación controlada de medicamentos, ya que las nanopartículas de quitosano pueden atravesar barreras biológicas y de este modo administrar fármacos o macromoléculas mediante liberación controlada en un sitio objetivo o bien, para proteger a las macromoléculas de la degradación en medios biológicos (Lopez-Leon et al. 2005; Perera & Rajapakse 2013). También se considera un material idóneo para la inmovilización de enzimas, donde el grupo amino funcional del quitosano permite realizar dicha inmovilización (Ghadi et al. 2015).

Del mismo modo, las nanopartículas de quitosano aprovechan su gran actividad como agente antioxidante, ya que eliminan los radicales libres y tienen la capacidad de quelar iones metálicos, para el tratamiento de aguas, donde permiten eliminar de forma eficaz compuestos como colorantes, pesticidas y contaminantes metálicos. Además, al contrario que otros adsorbentes como el carbón activo, el quitosano es económicamente eficiente. (Divya et al., 2018).

3.7 EMULSIONES TIPO PICKERING

Las emulsiones tipo Pickering son emulsiones de cualquier tipo, ya sea aceite en agua (o/w), agua en aceite (w/o) o incluso múltiples, estabilizadas por partículas sólidas en lugar de tensioactivos (Figura 7).

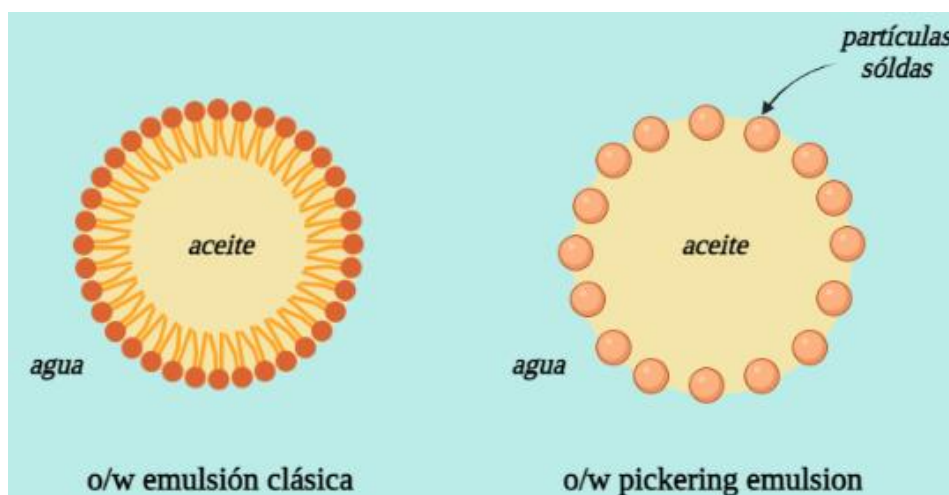


Figura 7. Esquema de una pickering emulsión y una emulsión clásica (a base de tensioactivos). Adaptado de Chevalier & Bolzinger, 2013

Estas emulsiones conservan las propiedades básicas de las emulsiones clásicas estabilizadas por tensioactivos (emulsionantes), de modo que una emulsión tipo Pickering puede sustituir a una emulsión clásica en la mayoría de las aplicaciones de emulsiones. La estabilización por partículas sólidas aporta propiedades específicas a tales emulsiones (Chevalier & Bolzinger, 2013), como por ejemplo, una alta resistencia a la coalescencia. Que sean libres de tensioactivos también las hace interesantes para aplicaciones tanto en farmacéuticas como en cosmética. Las partículas sólidas de tamaño nanométrico permiten la estabilización de gotas tan pequeñas como de unos pocos micrómetros de diámetro o de gotas más grandes. La disponibilidad de emulsiones estables de tamaño milimétrico es un beneficio adicional de las emulsiones tipo Pickering con respecto a las emulsiones clásicas, beneficio que viene dado por la alta estabilidad frente a la coalescencia (Chevalier & Bolzinger, 2013).

Como en el caso de los tensioactivos, la estabilización de las gotas de emulsión tiene lugar mediante la adsorción de partículas sólidas en la superficie de las gotas de emulsión. Sin embargo, el mecanismo de adsorción es muy diferente al de los tensioactivos, ya que las partículas sólidas no necesitan ser anfifílicas. La humectación parcial de la superficie de las partículas sólidas por agua y aceite es el origen del fuerte anclaje de las partículas sólidas en la interfase aceite-agua (Chevalier & Bolzinger, 2013).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

En este estudio se utilizó como materia principal la fosvitina obtenida a partir de huevos de tamaño M comprados en un comercio local, así como también el quitosano, necesario para la formación de las nanopartículas, adquirido en Sigma-Aldrich (ref 448877 lote BCCG2332). Durante la experimentación se utilizaron distintos reactivos, así como equipos y aparatos de laboratorio, los cuales se indican a continuación:

Reactivos:

- De Sigma-Aldrich (EE. UU.): ABTS·+ ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$), ácido acético (CH_3COOH), albúmina de suero bovina (BSA), aluminio nitrato nonahidrato ($AlN_3O_9 \cdot 9H_2O$), amonio peroxodisulfato (APS) ($(NH_4)_2S_2O_8$), azul de bromofenol, β -mercaptoetanol (C_2H_6OS) curcumina, DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), glicerol, quitosano de peso molecular medio, dodecil sulfato de sodio (SDS), tartrato sódico potásico ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), tripsina de páncreas bovino ref T9935, trolox ($C_{14}H_{18}O_4$).
- De VWR Chemicals (EE. UU.): carbonato de sodio (Na_2CO_3), metanol (CH_3OH), peqGOLD Protein Marker V, reactivo de Folin-Ciocalteu.
- De Panreac (España): etanol 96% (C_2H_5OH) ácido clorhídrico (HCl), potasio peroxodisulfato ($K_2S_2O_8$), solución de Acrilamida 30%.
- De Bio-Rad (EE. UU.) se adquirieron los siguientes: azul brillante de Coomasie, glicina, nitrato de aluminio ($Al(NO_3)_3$), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina, tris, triton X-100
- De Quality Chemicals (España): bicarbonato sódico ($NaHCO_3$)
- De Supelco (Alemania): hidróxido de sodio (NaOH)
- De Fluka (EE. UU.): cloruro de sodio (NaCl)
- De Mane Ibérica S.A (España): tripolifosfato sódico

Equipos, aparatos y materiales: autoclave Stericlav S (Trade Raypa, España), agitador de tubos vórtex (Heidolph, Alemania), agitador magnético con placa calefactora RCT standard safety control (Lab Logistics Group, Alemania), balanzas analíticas y de precisión (Mettler Toledo, EE. UU.), bomba de filtración a vacío MZ 2C NT (Vacuubrand, Alemania), cámara de refrigeración, centrifuga high speed refrigerated modelo 6500 (Kubota, Japón), centrífuga Multifuge X1 (Thermo Heraeus, Alemania), conductímetro PC Testr 35 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), eppendorf ThermoMixer

compact (Eppendorf, Alemania), espectrofotómetro de UV Vis GENESYS 150 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), espectrómetro FTIR VARIAN 670-IR (Agilent Technologies, EE. UU.), celda de electroforesis Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, EEUU), liofilizador modelo Cryodos -80 (Telstar, EE. UU.), Mastersizer MSS Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Malvern Instruments Ltd, UK), microscopio electrónico de transmisión MET 2000 EX-II (Jeol, Japón), membranas de diálisis de celulosa de 49 mm (Sigma-Aldrich, EE. UU.), papel de filtro (Whatman, UK), pHmetro pH Basic 20 (Crison Instruments, España), tubos de centrifuga 50 mL (VWR Chemicals, EE. UU.), tubos de centrifuga 500 mL, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK).

4.2 EXTRACCIÓN DE LA FOSVITINA DE LA YEMA DE HUEVO

El proceso de extracción de la fosvitina de la yema de huevo a partir de huevos frescos de tamaño M se encuentra resumido en la Figura 8.

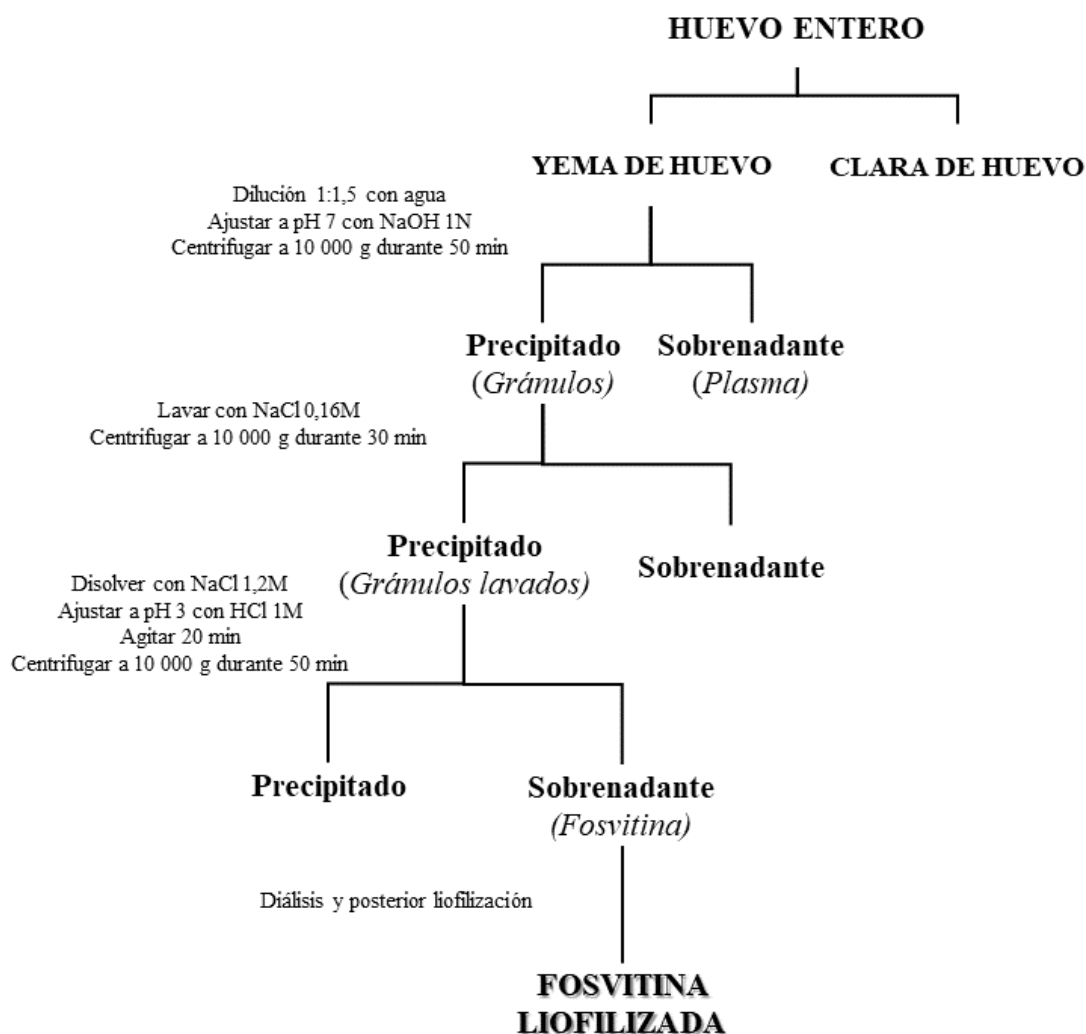


Figura 8. Esquema general del procedimiento para obtener fosvitina liofilizada a partir de huevos enteros. Adaptado de Orcajo et al., 2013.

Primeramente, los huevos fueron cascados y se separó la clara de la yema de manera manual, de tal manera que la yema con la membrana vitelina intacta fue secada con papel de filtro, eliminándose de este modo cualquier resto de clara. A continuación se rompió la membrana vitelina que envuelve a la yema con una punta de micropipeta para liberar su contenido.

La yema obtenida, se diluyó en agua destilada en proporción 1:1,5 (v/v) y se ajustó el pH a 7,0 con una disolución de NaOH 1M. Se procedió a una primera centrifugación a 10.000 g durante 50 minutos, de manera que se separó el plasma de los gránulos de la yema del huevo, quedando en el sobrenadante y precipitado, respectivamente.

Una vez centrifugado, se desechó el sobrenadante y se trabajó sobre el precipitado, la fracción con los gránulos de la yema, y por lo tanto, con la fosvitina que se desea extraer. Este precipitado se sometió a un lavado, para lo cual se resuspendió en una solución de NaCl 0,16 M en una cantidad equivalente a 3 veces su peso y se sometió a una segunda centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se recuperó el sedimento con los gránulos lavados, el cual se disolvió al 3% en peso en una solución de NaCl 1,2 M. Se ajustó el pH a 3,0 con una disolución de HCl 1M y se mantuvo en agitación durante 20 minutos en una placa de agitación magnética. Transcurrido el tiempo, se procedió a realizar la tercera y última centrifugación a 10.000 g durante 50 minutos, donde el sobrenadante resultante contenía la proteína fosvitina de interés en el estudio.

Este sobrenadante se sometió a una operación de diálisis mediante membrana, de manera que se eliminan los restos de sales que quedaron después de los lavados. Para ello, se introdujo un volumen aproximado de 800 mL del sobrenadante en una membrana de diálisis (34 mm de poro, celulosa regenerada, Membra-Cel™), la cual se dializó en un vaso con 5 L de agua destilada, cambiando el agua cada 5 horas aproximadamente durante 2 días. Para comprobar que se eliminaron el total de las sales, se midió la conductividad del agua en la que se encontraba la membrana con ayuda de un conductímetro PC Testr 35 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), donde un valor $< 1\mu\text{S}/\text{cm}$ indicaba la finalización de la diálisis.

Finalmente, el sobrenadante ya dializado, se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofilizó (TELSTAR CRYODOS, Telstar, España) obteniéndose de esta manera la fosvitina en estado sólido.

4.2.1 Electroforesis SDS-PAGE

Con el fin de comprobar que efectivamente, se ha extraído correctamente la fosvitina del huevo, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en una celda de electroforesis Mini-PROTEAN II (BIO-RAD, EE. UU.), siguiendo las mismas condiciones utilizadas por Orcajo et al (2013) en su trabajo.

Para realizar la electroforesis, se preparó un gel de separación utilizando 3,35 mL de agua destilada; 2,5 mL de Tris HCl 1,5 M a pH 8,8; 100 μ L de SDS 10%; 4 mL de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8%); 50 μ L de APS 10% y 5 μ L de TEMED, junto con un gel de concentración para el cual se añadió 3 mL de agua destilada; 1,24 mL de Tris HCl 0,5 M a pH 6,8; 50 μ L de SDS 10%; 0,6 mL de acrilamida/bis-acrilamida (30%/0,8%); 50 μ L de APS 10% y 6 μ L de TEMED. Se añadió primeramente el gel de separación en el acoplador de la celda de electroforesis y se dejó polimerizar 20 minutos, seguidamente se añadió el gel de concentración con el peine para la formación de los pocillos y se dejó polimerizar 10 minutos.

Las muestras para insertar en los pocillos del gel se prepararon resuspendiendo la fosvitina liofilizada en una disolución de agua destilada y SDS en una proporción 1:1 (v/v) a tres concentraciones distintas: 5, 3 y 1 mg/mL. A estas disoluciones de las muestras se les añadió el tampón de muestra 4X, de manera que quedó una proporción 3:1 de muestra y tampón, respectivamente. Se calentaron en agitación a 100 °C durante 10 minutos en un equipo ThermoMixer Compact (Eppendorf, Alemania).

Una vez listas las muestras, se insertaron 15 μ L de las misma en los pocillos del gel de electroforesis con ayuda de una micropipeta, así como también 15 μ L de la proteína patrón peqGOLD Protein marker V (VWR, EE. UU.), empleada para comparar los tamaños de las bandas con las de la muestra (Figura 9), y se dejó migrar en función de su tamaño, representando un rango de 10 a 250 kDa.

Tras finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con dos soluciones distintas. La primera es una tinción específica para fosfoproteínas que consistió en una disolución con ácido acético 10% (v/v), Tritón X-100 al 1% (v/v), etanol 25% (v/v), azul de Coomassie 0,005% (p/v) y nitrato de aluminio 3.75% (p/v), dejando actuar alrededor de 5 horas, tiempo tras el cual se realizó una segunda tinción que consistió en una disolución con metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y azul de Coomassie 0,1% (p/v), donde se

dejó actuar alrededor de otras 5 horas. Una vez realizada las dos tinciones, el gel se destiñó con una solución que contenía ácido acético 10%, metanol 40% y agua destilada el 50% restante.

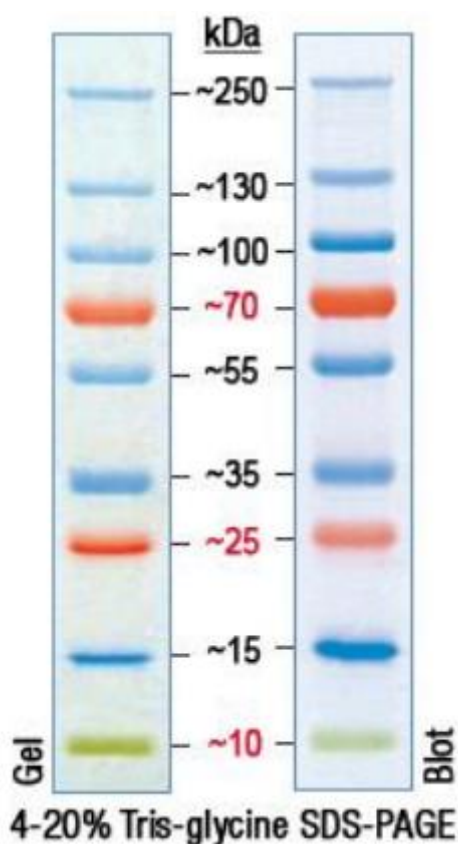


Figura 9. Tamaños en kDa de las bandas del patrón peqGOLD Protein Marker V utilizado para la electroforesis SDS-PAGE. Imagen obtenida del catálogo del producto (VWR, n° 27-2210)

4.2.2 Determinación de la cantidad de proteína de la fosvitina liofilizada

Se determinó el contenido de proteína que se obtiene en el liofilizado, de manera que se conoce el porcentaje de proteína real que hay presente en el liofilizado y por tanto la cantidad de fosvitina total por gramo de liofilizado.

La cuantificación del contenido proteico total se realizó siguiendo el método de Lowry et al. (1951) modificado. Para ello, se disolvió 0,1% del sólido liofilizado en agua destilada y se centrifugó a 8.000 g durante 10 minutos. De esta muestra se tomó 1 mL de la disolución y se añadió 5 mL del reactivo de Lowry. Para preparar este reactivo se mezcló en el momento del análisis en una proporción 50:0,5:0,5 tres reactivos; el reactivo A (Na_2CO_3 al 2% y NaOH 0,1M), el reactivo B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%) y el reactivo B2 (tartrato sódico-potásico al 2%). Una vez añadido el reactivo a las muestras se dejó en

oscuridad 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se adicionó 0,3 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2 con agua destilada, se mezclaron las muestras y se dejó reaccionar en ausencia de luz durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se midió las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Visible GENESYS™ 150 (Thermo Fisher Scientific™, EE. UU.) (Figura 10) a una longitud de onda de 580 nm, empleando como blanco una muestra preparada a partir de agua destilada. A partir de las absorbancias, se conoció la concentración en proteína por medio de una recta de calibrado realizada con albumina de suero bovino (BSA) en disoluciones a distintas concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm.



Figura 10. Espectrofotómetro UV-Visible GENESYS 150 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Obtenida de 2022 Thermo Fisher Scientific Inc.

4.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

La síntesis de nanopartículas se realizó siguiendo el método de Qi et al (2004), donde se prepararon tanto nanopartículas de quitosano y tripolifosfato (NTPP) como nanopartículas de quitosano y fosvitina (NF). Para ello, se preparó primeramente una solución de quitosano, donde se disolvió el quitosano al 0,5% (p/v) en una disolución acuosa de ácido acético al 1% (v/v) y se subió el pH a 4,6-4,8 con NaOH 10N, se mantuvo en agitación *overnight* y se filtró mediante un sistema de filtración con bomba de vacío y papel Whatman n°1 para eliminar las impurezas.

Para la síntesis de NTPP, se preparó una solución acuosa de TPP a una concentración de 0,15 mg/mL, y se añadió gota a gota y en constante agitación a la disolución de quitosano preparada anteriormente en una proporción 1:3, de disolución

acuosa de TPP y quitosano, respectivamente. La formación de las nanopartículas se evidenció por el cambio de aspecto de la disolución de quitosano.

Para llevar a cabo la purificación de las nanopartículas, se realizó una única centrifugación a 13.500 rpm durante 40 minutos, tras la cual las nanopartículas formadas se encontraron en el sedimento. Este sedimento se resuspendió en agua destilada en el mismo volumen previo a la centrifugación con ayuda de una sonda de ultrasonidos, donde el fenómeno de cavitación permitió destruir los aglomerados de las nanopartículas, de manera que se aseguró que las nanopartículas formadas fueran efectivamente de un tamaño nanométrico. Una vez resuspendidas, las nanopartículas fueron almacenadas a 4 °C para realizar los análisis posteriores.

De igual manera se prepararon las NF, donde se sustituye la disolución de TPP por una disolución acuosa de fosvitina. A diferencia de las NTPP, las NF se sintetizaron a tres concentraciones distintas: 1,5 mg/mL (NF1,5), 1,0 mg/mL (NF1,0) y 0,5 mg/mL (NF0,5). Estas disoluciones, fueron añadidas, al igual que en la síntesis de NTPP, gota a gota a la disolución de quitosano en una proporción 1:3, resultando en una disolución con un color opalescente. Las NF sintetizadas fueron purificadas de igual manera que las obtenidas con quitosano y TPP y fueron almacenadas a 4 °C para los análisis posteriores.

Por otra parte, para conocer la cantidad de proteína realmente presente en las NF con respecto a la fosvitina inicialmente añadida, se realizó una determinación de proteínas por el método de Lowry a partir del sedimento resultante de la centrifugación necesaria para la purificación de las nanopartículas, el cual se resuspendió en un volumen de 10 mL teniendo en cuenta que la disolución final de las nanopartículas de quitosano y fosvitina sin centrifugar tenía un volumen final de 40 mL (30 mL disolución de quitosano + 10 mL disolución de fosvitina).

4.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS

4.4.1 Evaluación del tamaño de las nanopartículas (Z-average)

La distribución de tamaño de las nanopartículas de quitosano/TPP y las nanopartículas de quitosano/fosvitina fueron estudiadas mediante *Dynamic Light Scattering* (DLS) utilizando un sistema Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido).

Para el análisis en DLS, las muestras de nanopartículas preparadas previamente y almacenadas a 4 °C, fueron medidas por duplicado tanto para el tamaño de partícula (Z-average) como para el índice de polidispersidad (PDI) y por triplicado para la determinación de su potencial zeta. El instrumento de medida estaba equipado con un láser He-Ne rojo (633 nm) con recolección de luz retrodispersada a 173° y un índice de refracción de 1,33.

Las muestras de las nanopartículas purificadas y resuspendidas se mantuvieron a 25 °C en un portamuestras con control de temperatura y se dejó equilibrar durante 60 s antes del análisis. Cada medida de tamaño se determinó para 15 ciclos de medición con 10 s/ejecución y se informaron los valores medios. Los datos se analizaron utilizando el software DTS Applications 5.10. Todos los diámetros medios de las nanopartículas se calcularon a partir de distribuciones de tamaño de partículas basadas en la intensidad.

4.4.2 Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las nanopartículas se analizó mediante TEM. Para ello, se dejó secar una gota de la disolución de nanopartículas sobre una cuadrícula de cobre con una capa de carbón, se realizó una tinción negativa con uracilo durante 1 minuto y se analizaron en el equipo MET JEOL-2000 EXII, Tokio, Japón.

4.4.3 Contenido en humedad

El contenido en sólidos secos de las nanopartículas se analizó con un analizador de humedad halógeno HR73 (Mettler-Toledo, Columbus, OH). Para ello se prepararon nanopartículas en un volumen final de 80 mL, que tras centrifugación, se obtuvo el sedimento de interés. Se colocó el contenido total de sedimento obtenido en una placa del analizador y se dejó evaporar el solvente para obtener un valor de materia seca en forma de porcentaje (p/p).

4.4.4 Espectroscopia Infrarroja por Transformaciones de Fourier (FT-IR)

Los espectros de las nanopartículas y los compuestos puros (quitosano y fosvitina) se obtuvieron utilizando un espectrómetro FTIR, modelo VARIAN 670-IR, fabricante Agilent Technologies (California, EE. UU.) con un detector piroeléctrico de sulfato de triglicina dopado con α alanina de lantano deuterado (DLaTGS). Para ello se prepararon nanopartículas de NTPP, NF0,5, NF1,0 y NF1,5, donde tras la centrifugación se recolectaron los respectivos sedimentos hasta tener un volumen suficiente para su

posterior liofilización. Se realizaron 32 escaneos, donde los espectros de las muestras se leyeron en el rango de 4000 a 600 cm^{-1} con una velocidad de 5 KHz y una resolución de 4 cm^{-1} .

4.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

4.5.1 Método ABTS

Este método se fundamenta en la decoloración del radical catión $\text{ABTS}^{\cdot+}$, el cual se genera por adición de un agente oxidante, el persulfato potásico. El radical catiónico $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es un cromóforo de color azul verdoso, que presenta un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm de longitud de onda, el cual, en presencia de un agente antioxidante se decolora y por tanto disminuye la absorbancia (Re et al., 1999).

El ensayo se llevó a cabo siguiendo un método modificado de Re et al. (1999). Para ello, el catión $\text{ABTS}^{\cdot+}$ se preparó mezclando el reactivo ABTS 7 mM y el potasio peroxodisulfato 2,45 mM) en una relación 1:1. La mezcla se mantuvo en oscuridad durante 16 horas y protegida de la luz. Transcurrido este tiempo se diluyó con agua destilada hasta conseguir una lectura de absorbancia de entre 0,7 y 0,8 a 734 nm.

Para el análisis se añadió 100 μL de la disolución de nanopartículas en un tubo de ensayo junto a 4,9 mL del reactivo $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Al cabo de 20 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia final. Para el caso del control negativo, se tomó 100 μL de agua destilada junto a 4,9 mL del reactivo $\text{ABTS}^{\cdot+}$. La capacidad antioxidante se calculó mediante la Ecuación 1:

$$(1) \quad \textit{Capacidad antioxidante} (\%) = \left(1 - \frac{\textit{Abs muestra}}{\textit{Abs control}}\right) \times 100$$

4.5.2 Método DPPH

En el ensayo DPPH se parte del radical estable $\text{DPPH}^{\cdot+}$. Este radical tiene un electrón desapareado, dando un color púrpura que tiene su máximo de absorción a 517 nm. Cuando es neutralizado por un antioxidante, este color se torna a amarillo (Figura 11). Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre $\text{DPPH}^{\cdot+}$. Cuanta mayor cantidad de antioxidantes tenga la muestra, mayor tono amarillento se observará y la disminución de la absorción será mayor (Molyneux., 2004).

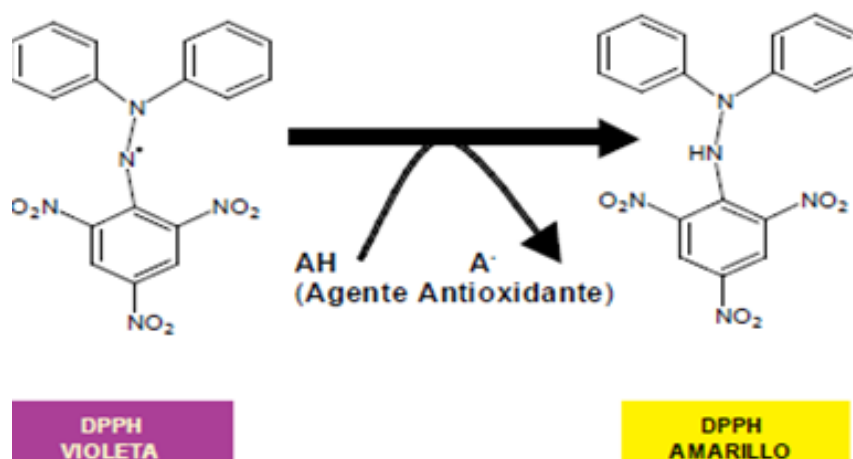


Figura 11. Método del 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH). (Molyneux, 2004)

Primeramente se preparó el reactivo DPPH 0,1 mM en etanol en una concentración 0,04% (p/v). Para la realización del ensayo se tomó 0,6 mL de cada muestra de nanopartículas en tubos de ensayo junto con 0,6 mL del reactivo DPPH y se añadió 4 mL de etanol. Para cada una de las muestras se realizó un propio blanco con 4,6 mL de etanol y 0,6 mL de la muestra. Por otro lado, se realizó un control negativo con 4 mL de etanol, 0,6 mL del reactivo DPPH y 0,6 mL de agua destilada en lugar de muestra. Las muestras se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 30 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo se midió su absorbancia a 517 nm. La capacidad antioxidante fue calculada mediante la Ecuación 1

4.6 EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

Se evaluó la capacidad de las nanopartículas sintetizadas para encapsular compuestos bioactivos, en este caso curcumina. La curcumina tiene muchas propiedades interesantes entre las que se encuentran su actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y antitumoral.

Las nanopartículas de quitosano cargadas con curcumina (NC) se sintetizaron mediante gelificación ionotrópica siguiendo el procedimiento de Tsai et al (2018) con algunas modificaciones. Para ello se preparó una disolución acuosa de curcumina a una concentración inicial de 1 mg/mL, se ajustó el pH a 8 y se centrifugó 20 minutos a 10000 g para descartar la curcumina no disuelta, ya que la misma no se disuelve en soluciones polares. Para conocer el contenido de curcumina real, se cuantificó el sobrenadante

utilizando un espectrofotómetro UV-vis a 430 nm y se realizó una recta de calibrado con distintas disoluciones de curcumina en etanol.

Por otro lado, se prepararon las disoluciones de fosvitina (0,5; 1,0 y 1,5 mg/mL) y la disolución de TPP y además se preparó la disolución de quitosano al 0,5% en ácido acético 1% mencionada en el apartado 4.3, de manera que la disolución de curcumina se añadió gota a gota primeramente a la disolución de quitosano en continua agitación magnética y seguidamente se añadió, gota a gota, la disolución del polianión, de manera que la proporción es 2:3 [1 (disolución curcumina) + 1 (disolución del polianión), 3 (disolución de quitosano)]. Las nanopartículas sintetizadas fueron centrifugadas 30 minutos a 13500 rpm, tras lo cual se midió la absorbancia del sobrenadante a 430 nm. La eficacia de encapsulación (EE) fue calculada según la siguiente Ecuación 2:

$$(2) \quad \text{Eficacia Encapsulación (EE) (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs NC}}{\text{Abs Control}}\right) \times 100$$

4.7 ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Para el estudio de la estabilidad en el tiempo se evaluaron los mismos parámetros estudiados por Jonassen et al. (2012) siguiendo su metodología. Las nanopartículas se prepararon mediante gelificación ionotrópica, como se comentó anteriormente en el apartado 4.3. Las condiciones de preparación se mantuvieron constantes y una vez preparadas, las nanopartículas se almacenaron a 25 °C con una exposición mínima a la luz. Las nanopartículas se caracterizaron mediante DLS (Z-average, PdI y Potencial Z), turbidez y pH en los días 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 21 después de la preparación.

4.7.1 pH

El pH de las suspensiones de partículas se midió a temperatura ambiente usando un pHmetro PH BASIC 20 (Crison Instruments, España) con electrodo de inmersión. Las medidas se realizaron por duplicado para cada una de las muestra.

4.7.2 Turbidez

La transmitancia de las suspensiones de nanopartículas se midió a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) con un espectrofotómetro UV-Visible GENESYSTM 150 (Thermo Fisher ScientificTM, EE. UU.) a una longitud de onda (λ) de 500 nm. La

turbidez, τ , de las suspensiones se calculó a partir de la transmitancia utilizando la ley de Lambert-Beer según la Ecuación 3:

$$(3) \quad \tau = -\frac{1}{L} \ln \left(\frac{I_t}{I_0} \right)$$

Donde L es la longitud del camino de luz en la celda de muestra (1 cm), I_t es la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra e I_0 es la intensidad de la luz transmitida a través del solvente.

4.7.3 DLS

Se realizaron medidas tanto de Z-average, PdI como del Potencial Z de las nanopartículas, siendo los apartados 4.6 y 4.7 mencionados anteriormente.

4.8 HIDRÓLISIS DE LA FOSVITINA

La hidrólisis de la fosvitina mediante una hidrólisis térmica y enzimática siguiendo la metodología utilizada por Zhao et al. 2021. Primeramente se realizó un pretratamiento donde la fosvitina liofilizada se disolvió en agua destilada desionizada en una concentración de 10 mg/mL, se ajustó el pH a 6,5 y se realizó un tratamiento térmico HTMP (*High Temperature Mild Pressure*) a 121 °C durante 30 minutos usando un autoclave Stericlav S (Trade Raypa, España). Una vez tratado y enfriado a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 8 y se añadió la enzima tripsina de páncreas bovino ref T9935 (Sigma, EE. UU.) en una proporción 1:50 v/v de tripsina y fosvitina, respectivamente. Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, la disolución se incubó a 37 °C durante 18 horas en agitación orbital. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se calentó la solución en baño de agua a 100 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

Una vez obtenida la fosvitina totalmente hidrolizada se realizó una electroforesis en el gel SDS-PAGE según el apartado 4.2.1 y se sintetizaron nanopartículas de quitosano y fosvitina hidrolizada a 0,5, 1,0 y 1,5 mg/mL según el apartado 4.3.

4.9 EMULSIONES TIPO PICKERING

Para la síntesis de emulsiones tipo Pickering primero se prepararon nanopartículas de quitosano y TPP como de quitosano y fosvitina según lo indicado en el apartado 4.3. Las emulsiones tipo Pickering se prepararon homogeneizando 20 mL de la disolución de nanopartículas con ayuda de un ULTRA TURRAX, a la cual se añadió 20 mL de aceite

de girasol comercial con ayuda de una micropipeta y se mantuvo en homogeneización a 15000 rpm durante 2 minutos (Figura 13).

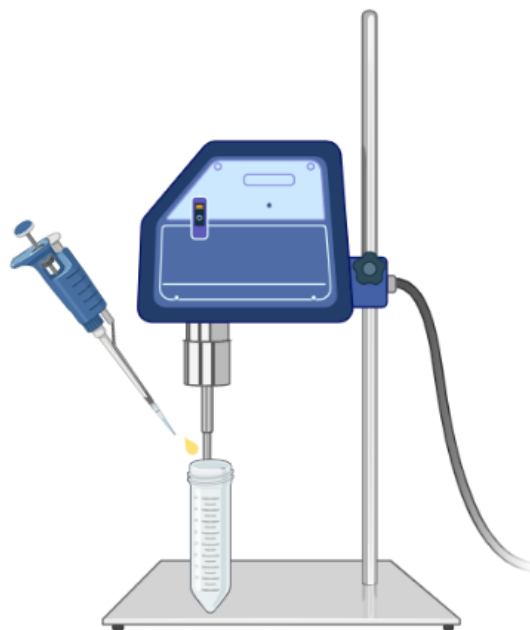


Figura 12. Ilustración de la síntesis de pickering emulsions utilizando un homogeneizador ULTRA TURRAX para llevar a cabo la emulsión.

Para estudiar la estabilidad de las emulsiones preparadas, se evaluaron los tamaños de las emulsiones con ayuda de un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Instrumentes, EE. UU.), que permite analizar el tamaño de partículas por difracción láser.

4.10 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se utilizó el programa estadístico Statgraphics ® Centurion XVIII (Statpoint Technologies) donde los datos fueron sometidos a un análisis comparativo de varianzas (ANOVA) usando el test de diferencia menos significativa (LSD) de Fisher para detectar las diferencias significativas entre las muestras a un nivel de significancia de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXTRACCIÓN DE LA FOSVITINA DE HUEVO

Tras llevar a cabo todos los pasos comentados en el apartado 3.2, se obtuvo un producto final sólido liofilizado. La fosvitina tiene un aspecto esponjoso, de color blanco y de un peso muy ligero (Figura 13).



Figura 13. Fosvitina liofilizada obtenida tras el procedimiento de extracción mencionado en el punto 4.2

5.1.1 Electroforesis SDS-PAGE

La fosvitina liofilizada fue disuelta en agua destilada y SDS (1:1 v/v) en tres concentraciones distintas: 5, 3 y 1 mg/mL y analizada por SDS-PAGE con el objetivo de valorar cualitativamente el grado de pureza de la fosvitina extraída.

El resultado de la electroforesis se indica en la Figura 14, donde se puede observar siete calles distintas: la calle A corresponde con la proteína patrón peqGOLD Protein marker V, donde se indican distintas bandas que corresponden a los diferentes pesos moleculares indicados en unidades de kDa. Por otra parte las calles B hasta la G se corresponden con la fosvitina liofilizada extraída de la yema de huevo y resuspendida en agua destilada a distintas concentraciones; las calles B y E se corresponden con la concentración de 5 mg/mL de fosvitina extraída analizadas por duplicado, las calles C y

F se corresponden con la concentración de 3 mg/mL realizadas por duplicado, mientras que las calles D y G se corresponden con la disolución a una concentración de 1 mg/mL también por duplicado.

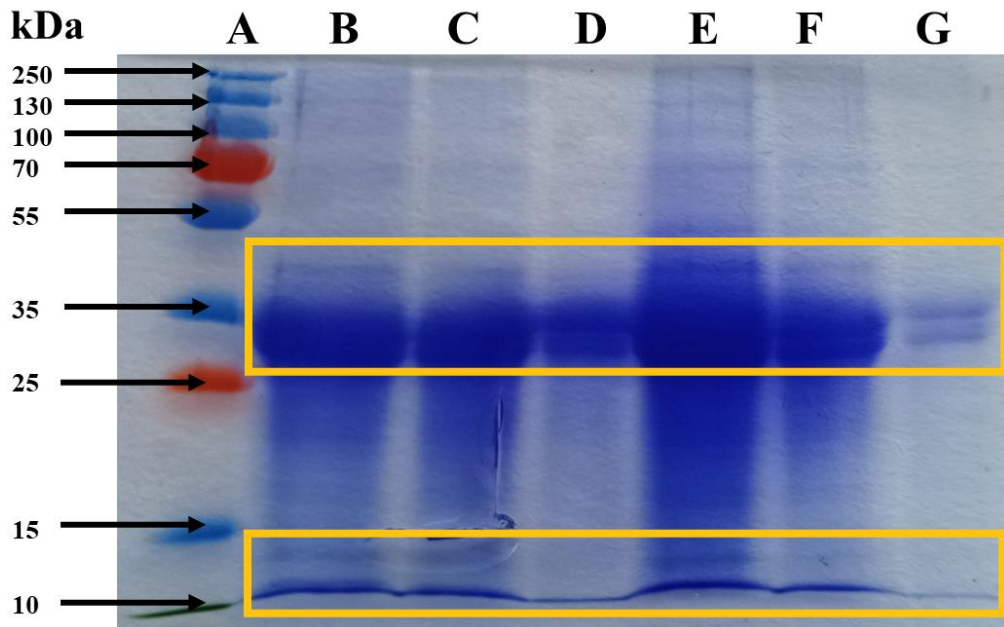


Figura 14. Gel de SDS-PAGE electrophoresis donde se observa la presencia de α -fosvitina y β -fosvitina (~35 kDa) y la presencia de los fosvetes (~10-15 kDa), indicados en recuadros amarillos.

Se observa que en todas las muestras apareció una banda ancha a nivel del tamaño de la proteína patrón de entre los 30 a 40 kDa. En el caso de la calle G, se distingió más claramente que la banda ancha corresponde realmente a dos bandas de distinto tamaño, que se podría traducir en los dos polipéptidos que conforman la fosvitina: α -fosvitina y β -fosvitina. En la literatura Taborsky & Mok (1967) identifican que los pesos moleculares de estos componentes mayoritarios son de 40 y 35 kDa, de α -fosvitina y β -fosvitina, respectivamente, aunque en los años siguiente, se informó que los pesos moleculares de los componentes de la fosvitina varían entre 10 a 50 kDa (Abe et al., 1982), ya que además de estos dos componentes mayoritarios, también se encuentran polipéptidos de pequeño tamaño enriquecidos en grupos fosfato y con un tamaño de entre 10 y 15 kDa, denominados fosvetes (Anton et al., 2007).

Según Anton (2013), la α -fosvitina y la β -fosvitina son estructuras de 160 y 190 kDa, respectivamente, que están formadas por la combinación de muchos polipéptidos diferentes. La α -fosvitina contiene entre 3 y 4 subunidades de 35 a 40 kDa, mientras que la β -fosvitina está formada por entre 4 y 5 subunidades de 45 kDa.

Por otra parte, también se apreciaron bandas de mayor tamaño pero de menos intensidad, prácticamente inapreciables, que podrían corresponder con los restos de las demás proteínas de los gránulos de la yema de huevo (HDL y LDL). Dicho esto, podemos decir que el grado de pureza de la extracción de la fosvitina de la yema de huevo se podría considerar bastante alta, ya que las bandas de mayor intensidad corresponden con la fosvitina.

5.1.2 Determinación de la cantidad de proteína

Para cuantificar el contenido de liofilizado que corresponde a proteína, se realizó el ensayo de Lowry explicado en el apartado 4.2.2 por duplicado. La recta de calibrado resultante se indica en la Figura 15.

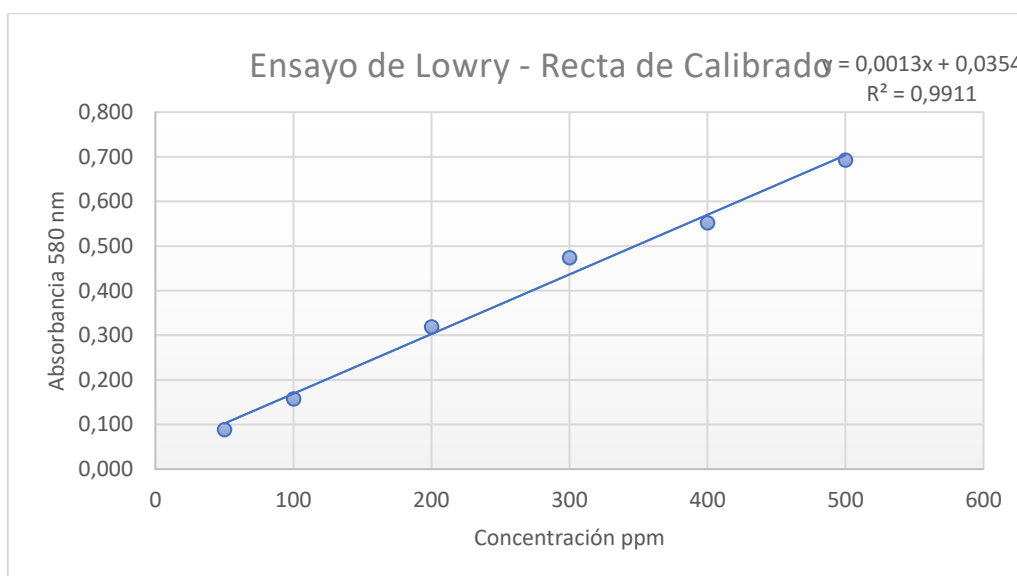


Figura 15. Recta de calibrado con disoluciones de Albúmina de Suero Bovino (BSA) a distintas concentraciones

Se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:

$$y = 0,0013x + 0,0354$$

De manera que, a partir de las absorbancias de las muestras, se calculó el contenido real de proteína presente en el liofilizado que correspondió con un 42% aproximadamente, donde se considera que la totalidad de la proteína presente corresponde con fosvitina. El porcentaje restante del liofilizado podría ser principalmente sales, ya que la diálisis pudo no ser completa o restos de lípidos y otras impurezas de la extracción.

5.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

Durante la síntesis de nanopartículas por gelificación ionotrópica, la adición del polianión, la fosvitina o el TPP, a la disolución de quitosano se tradujo en un cambio de la coloración del quitosano puro, desde uno transparente hasta un color opalescente, con cierta turbidez, lo que nos indicó la formación espontánea de las nanopartículas (Figura 16).

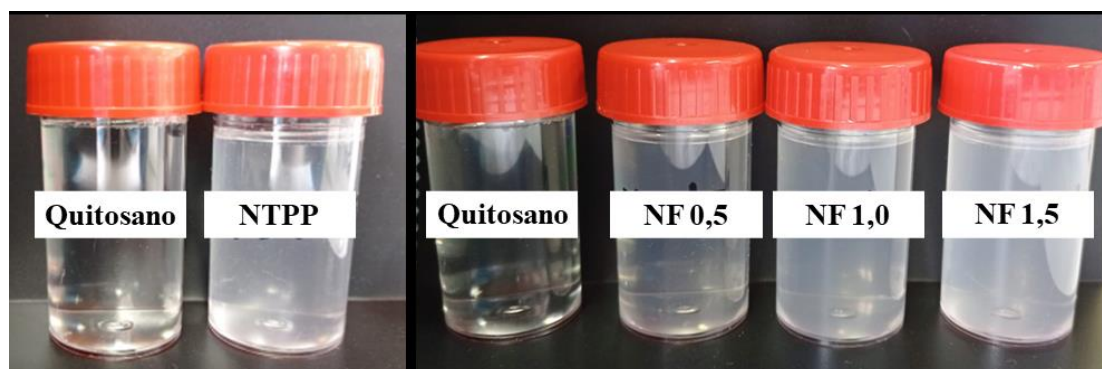


Figura 16. De izquierda a derecha: disolución de quitosano, NTPP, disolución de quitosano, NF0,5, NF1,0, NF1,5.

Se observó claramente que aquellas nanopartículas sintetizadas con una mayor concentración del agente polianión, como las nanopartículas NF1,5, donde la solución de fosvitina se encontraba a una concentración de 1,5 mg/mL, presentaron un color más opalescente que el resto, así como también mayor turbidez. Del mismo modo, las nanopartículas sintetizadas con TPP también presentaron cierta opalescencia en comparación con la disolución de quitosano puro.

Como se comentó anteriormente, para conocer la cantidad de proteína que se unió al quitosano en la formación de las nanopartículas de fosvitina, se realizó una determinación de proteínas por el método de Lowry a partir del sedimento resultante de la centrifugación. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 1:

Tabla 1. Relación entre la fosvitina presente en el sedimento y la añadida inicialmente (n=4)

| | Formulación | | |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | NF 1`5 | NF 1`0 | NF 0`5 |
| % Sedimento | 49,75 ± 8,62 ¹ | 40,46 ± 5,00 ¹ | 40,20 ± 5,04 ¹ |

Diferentes superíndices en la misma fila difieren significativamente (p<0.05) según Least Significant Difference (LSD) de Fisher.

Se observa que no toda la fosvitina presente en la disolución se encontró formando las nanopartículas de quitosano. La cantidad de fosvitina medida en el precipitado rondó sobre el 40% respecto a la fosvitina añadida inicialmente, donde alcanzó el mayor valor para las NF 1,5 con un 49,75% y el menor contenido en las NF 0,5 con 40,20%. Esto implicaría que menos de la mitad de la fosvitina añadida forma parte de las nanopartículas, por lo que el resto de la proteína añadida permanece en el sobrenadante y no forma parte de las nanopartículas. Esto podría deberse a que la fosvitina, a diferencia del TPP, tiene una menor capacidad de ligación para la formación de complejos.

5.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

5.3.1 DLS

Los resultados del estudio fisicoquímico de las nanopartículas DLS, tanto del tamaño de las nanopartículas formadas (Z-average), como del índice de polidispersidad (PdI) y el Potencial Z, se encuentran resumidos en la Tabla 2, indicada a continuación:

Tabla 2. Resultados del tamaño en nm de las nanopartículas sintetizadas (Z-average), índice de polidispersidad (PdI) y Potencial Z (mV) (medias \pm desviaciones estándar) (Para Z-average y PdI $n=2$, para Potencial Z $n=3$)

| Parámetro | Polianión | Muestra | Media \pm desviación |
|-----------------------|-----------|---------|--------------------------------|
| Z-average (nm) | TPP | NTPP | 262,8 \pm 32,2 ^a |
| | | NF0,5 | 459,8 \pm 47,5 ^d |
| | Fosvitina | NF1,0 | 398,9 \pm 44,9 ^b |
| | | NF1,5 | 441,5 \pm 48,5 ^{bc} |
| PdI | TPP | NTPP | 0,585 \pm 0,138 ^b |
| | | NF0,5 | 0,251 \pm 0,133 ^a |
| | Fosvitina | NF1,0 | 0,245 \pm 0,044 ^a |
| | | NF1,5 | 0,302 \pm 0,127 ^a |
| Potencial Z | TPP | NTPP | 30,5 \pm 5,1 ^a |
| | | NF0,5 | 38,5 \pm 5,6 ^b |
| | Fosvitina | NF1,0 | 39,5 \pm 4,8 ^b |
| | | NF1,5 | 42,1 \pm 5,1 ^b |

a, b, c. Las medias dentro de una columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según Least Significant Difference (LSD) de Fisher.

Se observó que las nanopartículas de quitosano donde se utilizó como agente polianión al tripolifosfato de sodio (TPP) tuvieron un menor tamaño que aquellas donde el agente de unión fue la fosvitina. Por otro lado, se observó que no había una dependencia clara entre la relación de la concentración de la fosvitina utilizada y el tamaño de las nanopartículas formadas, ya que las nanopartículas de menor tamaño fueron las de concentración 1 mg/mL de fosvitina con una media de 398,9 nm y las de mayor tamaño fueron las de concentración 0,5 mg/mL con una media de 459,8 nm de diámetro.

El índice de polidispersidad (PdI) es una medida del grado de dispersión del tamaño de las nanopartículas, cuyos valores se encuentran entre 0 y 1. Un PdI alto nos indica mayor dispersión, es decir, mayor variación entre los diámetros del tamaño de las nanopartículas de medida. Como se muestra en la Tabla 3, los grupos mostraron valores relativamente bajos, aunque nos indica que hay cierta variación entre los tamaños de las muestras, donde las muestras NTPP obtuvieron la mayor variación con un valor medio de PdI de 0,585, valor significativamente mayor que los obtenidos en las NF lo que nos indica que los tamaños de estas nanopartículas no son muy dispares (Mujica et al., 2019).

El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, es decir, es la diferencia de potencial a través de los límites de fase entre los sólidos y los líquidos, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afecta la estabilidad de las nanopartículas. Su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones (Malvern Panalytical Ltd, 2022). De acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 3, el potencial Z de las muestras se encontró entre los 30 y 40 mV, donde valores situados entre 0 y ± 20 mV mostrarían una tendencia de las nanopartículas a formar agregados con el paso del tiempo (López, 2021), por lo tanto, todas las nanopartículas son estables y no deberían tender a formar agregados durante el almacenamiento. La muestra NF1,5 con un valor de 42,1 mV presentó el mayor valor de potencial Z por lo que se podría decir que es la muestra que mejor estabilidad tendría, mientras que la muestra control de NTPP es la que menor potencial Z obtuvo, con un valor de 30,5 mV. Las diferencias que se observaron entre la muestra de TPP y las muestras de fosvitina fueron significativamente diferentes, obteniendo mejores resultados en aquellas donde se empleó como agente de ligación la fosvitina las diferencias entre las muestras de fosvitina como polianión a concentraciones diferentes no fueron significativas, lo que nos indica que la

concentración añadida no influye de manera significativa sobre el potencial Z de las muestras.

5.3.2 TEM

El TEM es una técnica de caracterización muy precisa, que se utiliza para el análisis cuantitativo de la forma, textura, tamaño, composición y estructura cristalina de las nanopartículas. Además, los TEM son la técnica de microscopía de mayor resolución que puede proporcionar imágenes directas de las nanopartículas.

En la Figura 17 se observan las micrografías del TEM a 20000 y 50000 aumentos de las distintas nanopartículas sintetizadas (NTPP, NF0,5, NF1,0 y NF1,5). Se observa que las nanopartículas formaban cuerpos esféricos y de color blanco, ya que la tinción con uracilo se considera una tinción negativa, donde se tiñe el medio pero no a las nanopartículas en sí. Por otro lado, los tamaños de las nanopartículas NTPP variaron entre los 100 nm hasta unos 450 nm, las NF0,5 tenían un tamaño de unos 400 nm aproximadamente, mientras que NF1,0 fueron las que tuvieron un tamaño más pequeño, rondando entre 80 hasta 250 nm, y finalmente, las NF1,5 tuvieron un tamaño aproximado de entre 100 y 300 nm.

Al comparar los tamaños de las nanopartículas obtenidos mediante TEM y DLS se puede ver que coinciden en cuanto a que las nanopartículas formadas no tienen todas el mismo tamaño y que hay cierta dispersión en el diámetro de las nanopartículas formadas. Como se observa en la imagen de las NTPP a 50000 aumentos tienen un tamaño aproximado de 200 nm, lo que coincide con la media de tamaño del resultado de DLS de 262 nm. Por otra parte los resultados de las NF0,5 mediante TEM también coinciden con los de DLS, ya que como se observa en la imagen de las NF0,5 a 50000 aumentos tienen un tamaño rondando los 300 nm. Sin embargo en las imágenes obtenidas para las NF1,0 y NF1,5 se ven que las nanopartículas formadas son de un tamaño menor que en los resultados obtenidos mediante DLS, aunque esta diferencia puede deberse a que en el análisis TEM se haya centrado en puntos con nanopartículas más pequeñas.

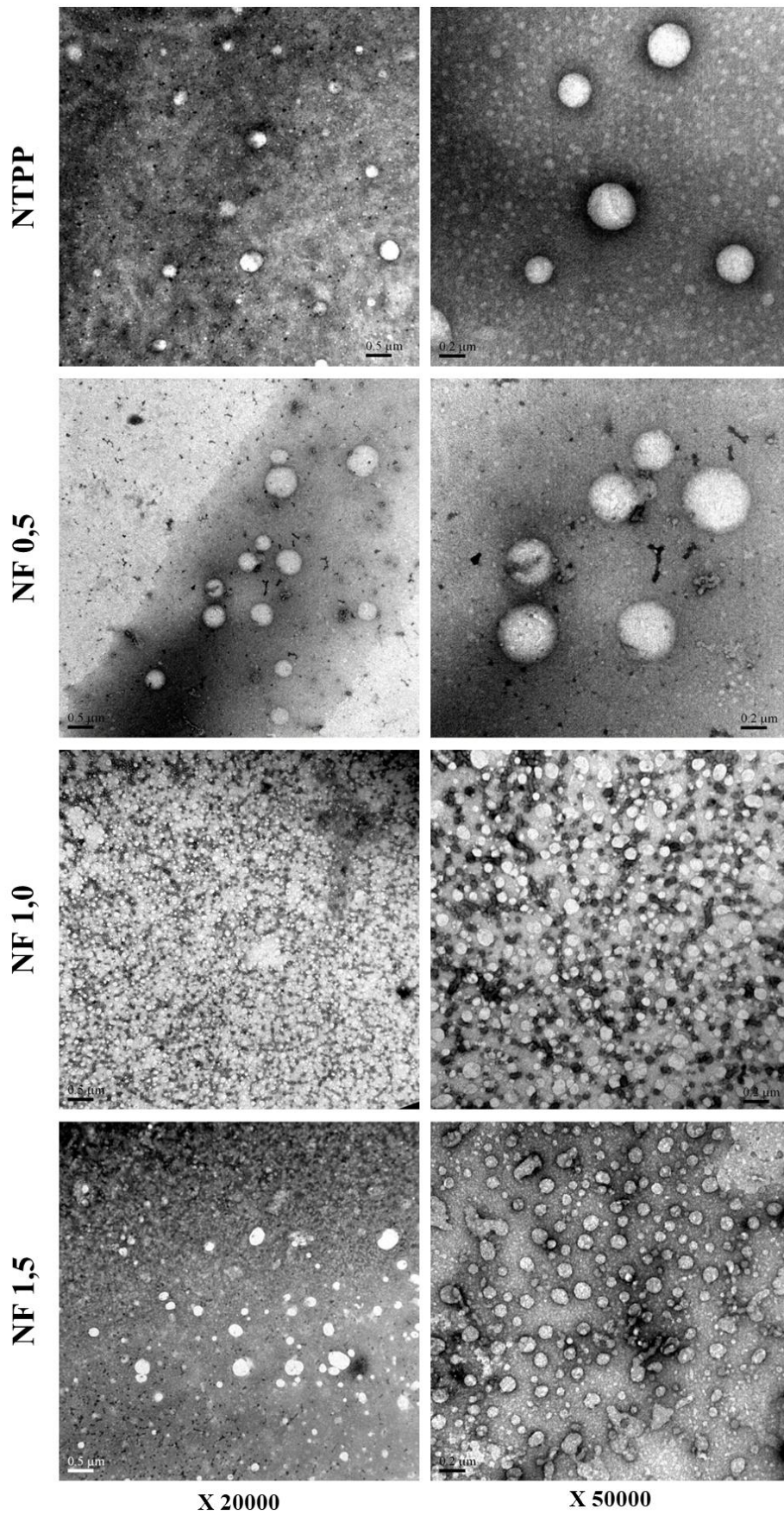


Figura 17. Microscopía del microscopio electrónico de transmisión de las nanopartículas NTPP, NF0,5, NF1,0 Y NF1,5 visualizadas 20000 y 50000 aumentos

5.3.3 Contenido en humedad

Para conocer el contenido en humedad y de sólidos presentes en el pellet formado de las nanopartículas, se prepararon 80 mL de la disolución de nanopartículas, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido en humedad y de sólidos de las nanopartículas de quitosano y fosvitina.

| Parámetro | Formulación | | |
|-------------------------|-------------|-------|-------|
| | NF0,5 | NF1,0 | NF1,5 |
| Peso inicial (g) | 2,363 | 2,285 | 3,407 |
| Peso final (g) | 0,015 | 0,025 | 0,041 |
| Humedad (%) | 99,37 | 98,91 | 98,80 |
| Sólidos (%) | 0,63 | 1,09 | 1,20 |

Se puede ver que a medida que aumentó la concentración de fosvitina en la síntesis de nanopartículas, aumentó también el contenido de sólidos tras el tratamiento por secado en el equipo HR73 Halogen Moisture Analyzer (Mettler Toledo). Sin embargo, las tres formulaciones obtuvieron un contenido muy alto de humedad y por ende, muy poco contenido en sólidos, lo que nos podría indicar lo que se ha comentado en el apartado 5.2, que no toda la fosvitina añadida para la síntesis de las nanopartículas se encuentra formando complejos con el quitosano y que parte de ella se encuentra en el sobrenadante resultante de la purificación de las nanopartículas.

5.3.4 FT-IR

Los espectros FTIR de quitosano, fosvitina y nanopartículas de NTPP, NF1,5, NF1,0 y NF0,5 se muestran en la Figura 18, donde se puede observar que existen varios picos de interés en el espectro de fosvitina, resaltando los picos de $1454,0\text{ cm}^{-1}$ (O-H) y $1521,6\text{ cm}^{-1}$ que nos indica un pico de proteínas (N-H) según Cortez (2020), también se encontraron varios picos relevantes en el espectro de quitosano: uno a $1540,9\text{ cm}^{-1}$ y a $1402,0\text{ cm}^{-1}$ de longitud de onda que nos indica un enlace H-N-H y otro a $991,2\text{ cm}^{-1}$ de longitud de onda (C-O-C) (Mirza et al., 2014).

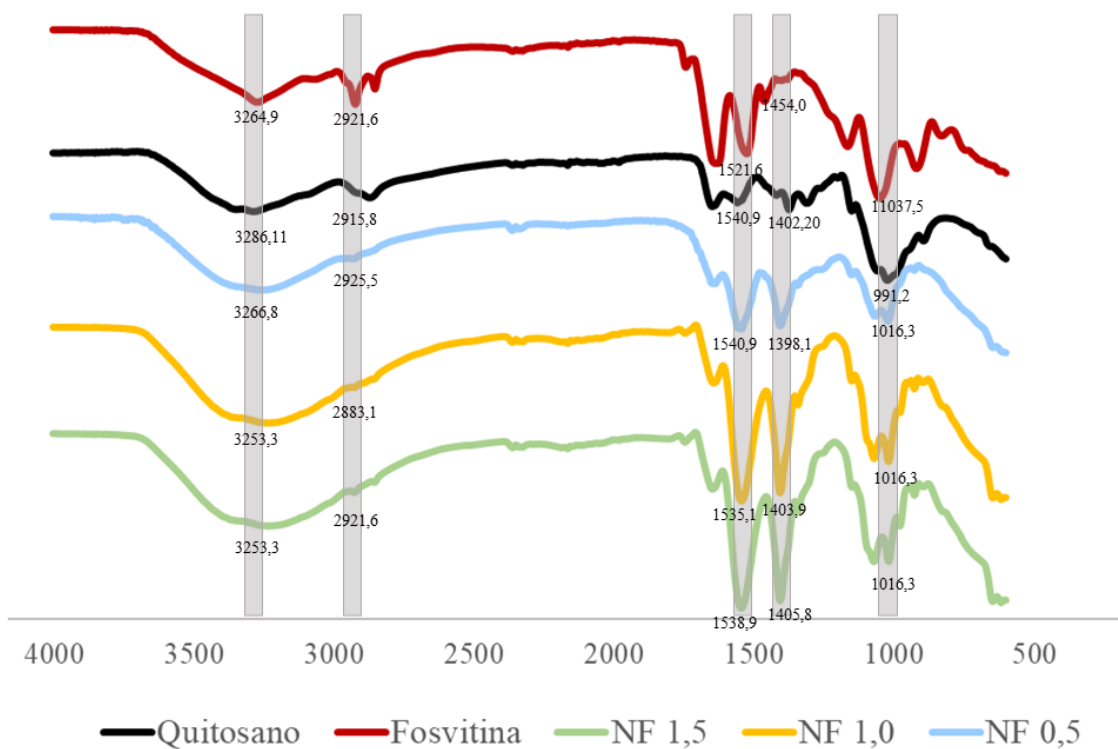


Figura 18. Espectros IR de quitosano puro (negro), fosvitina aislada (rojo), y de las nanopartículas sintetizadas: NF1,5 (verde), NF1,0 (amarillo) y NF0,5 (azul).

En las nanopartículas de quitosano y fosvitina se observó un espectro IR similar al del quitosano a $1540,9 \text{ cm}^{-1}$ con picos más profundos lo que se puede interpretar como una interacción entre el fosfato y el quitosano, donde el pico de las nanopartículas NF1,0 es a $1535,1 \text{ cm}^{-1}$ y el de las nanopartículas NF1,5 es a $1538,9 \text{ cm}^{-1}$. Se puede decir que la intensidad de las bandas de las nanopartículas de quitosano y fosvitina aumenta su intensidad cuanto más fosvitina tienen incorporada, mientras que a menor concentración de fosvitina (NF0,5) los picos se asemejan más a los del quitosano puro.

5.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos realizados para determinar la capacidad de las nanopartículas para retirar del medio radicales libres, y por lo tanto, su capacidad antioxidante.

Tabla 4. Análisis de la capacidad antioxidante desarrollado con los métodos de ABTS y DPPH. Resultados expresados como medias \pm desviaciones estándar ($n=3$)

| Método | Polianión | Muestra | Media \pm desviación estándar | <i>P-value</i> |
|---|-----------|---------|---------------------------------|----------------|
| ABTS (<i>Scavering capacity, %</i>) | TPP | NTPP | 25,49 \pm 0,85 ^a | <0,0001 |
| | | NF 0,5 | 28,70 \pm 0,61 ^b | |
| | Fosvitina | NF 1,0 | 37,99 \pm 0,23 ^c | |
| | | NF 1,5 | 51,85 \pm 1,54 ^d | |
| DPPH (<i>Scavering capacity, %</i>) | TPP | NTPP | 5,13 \pm 0,45 ^a | <0,0001 |
| | | NF 0,5 | 8,65 \pm 0,31 ^b | |
| | Fosvitina | NF 1,0 | 12,57 \pm 0,67 ^c | |
| | | NF 1,5 | 17,21 \pm 0,45 ^d | |

a, b, c, d. Las medias dentro de una columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en cuanto a la muestra

En la cuarta columna se observan los resultados del ensayo ABTS, donde el radical catiónico $ABTS\cdot+$, en presencia de un antioxidante, se decolora, por lo que a menor absorbancia, mayor actividad antioxidante tiene la muestra, lo que se traduce en mayor “*scavering capacity*”. Según los resultados obtenidos, se puede decir que la muestra NF1,5, con el mayor contenido en fosvitina, presentó mayor actividad antioxidante con un 52,85%, mientras que la muestra NTPP fue la que menor actividad tuvo, con un porcentaje del 25,49.

Al realizar el análisis estadístico, se puede observar que las diferencias que hay entre las cuatro muestras fueron diferentes unas de otras de manera significativa, ya que el *P-value* es $<0,005$. Las muestras en las que su polianión era la fosvitina, presentaron una actividad antioxidante significativamente mayor que la muestra con TPP, esto es debido a que la fosvitina presenta una alta capacidad de unión a iones multivalentes que determina su propiedad antioxidante (Lesnierowski & Stangierski, 2019), y es también por lo que esta actividad se ve incrementada a medida que aumenta la cantidad de fosvitina utilizada. Sin embargo, las NTPP también presentaron cierta actividad

antioxidante ya que están compuestas por quitosano, biopolímero que tiene actividad antioxidante *per se*. Varios investigadores plantearon la hipótesis de que el mecanismo de acción antioxidante del quitosano se basaba en la formación de un radical de macromolécula estable mediante la reacción de los radicales anión hidroxilo y superóxido con los átomos de hidrógeno activos del quitosano. Sin embargo se ha descubierto que la actividad antioxidante del quitosano disminuye a bajas concentraciones de metales y aumenta con el aumento de la concentración de metales (Saddam et al., 2022).

Por otro lado, en la Tabla 4 se muestran los resultados del ensayo DPPH, donde los radicales DPPH•+ se ven neutralizados en presencia de un antioxidante. En estos casos, los porcentajes fueron menores que los obtenidos en el ensayo ABTS, mostrando por lo tanto menor capacidad antioxidante. Esto es debido a que el reactivo DPPH se disuelve en disolventes orgánicos, como es el caso del etanol, disolvente que dificulta que los biopolímeros que forman parte de las nanopartículas puedan interaccionar de manera efectiva con esta molécula. Sin embargo, la tendencia es la misma que en el caso anterior, donde las nanopartículas en las que se emplearon la fosvitina como polianión tuvieron mejores resultados que las que se sintetizaron con TPP, y la actividad antioxidante también es proporcional a la concentración de fosvitina empleada.

En un estudio similar, donde se estudiaba el papel de las nanopartículas de quitosano en las propiedades antioxidantes de las vinagretas, se demostró que la presencia de quitosano aumentaba la capacidad de eliminación de radicales libres de las vinagretas (Tovar et al., 2022). Por otro lado, Marcet et al. (2022) mencionan que la presencia de fosvitina en emulsiones de lecitina y gránulos de yema de huevo mejoran las propiedades antioxidantes de las mismas.

5.5 EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN

La curcumina es un compuesto fenólico amarillo natural presente particularmente en *Curcuma longa* Linn. (cúrcuma) que ha demostrado varias actividades bioactivas y farmacológicas tales como efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos y antidiabéticos. Sin embargo, debido a su inestabilidad química en condiciones alcalinas y baja solubilidad acuosa, la curcumina presenta una absorción deficiente después de la administración oral (Nair et al., 2019).

Una manera de mejorar su biodisponibilidad y estabilidad es mediante la formulación en nanopartículas. Como se ha comentado anteriormente, las nanopartículas

poliméricas se utilizan ampliamente en los sistemas de administración de fármacos debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, por lo que encapsular la curcumina en nanopartículas mejorarían su solubilidad y eficacia, así como también la protegería de los factores ambientales (Rachmawati et al., 2016). Los resultados obtenidos de la encapsulación de curcumina se resumen en la Figura 19.

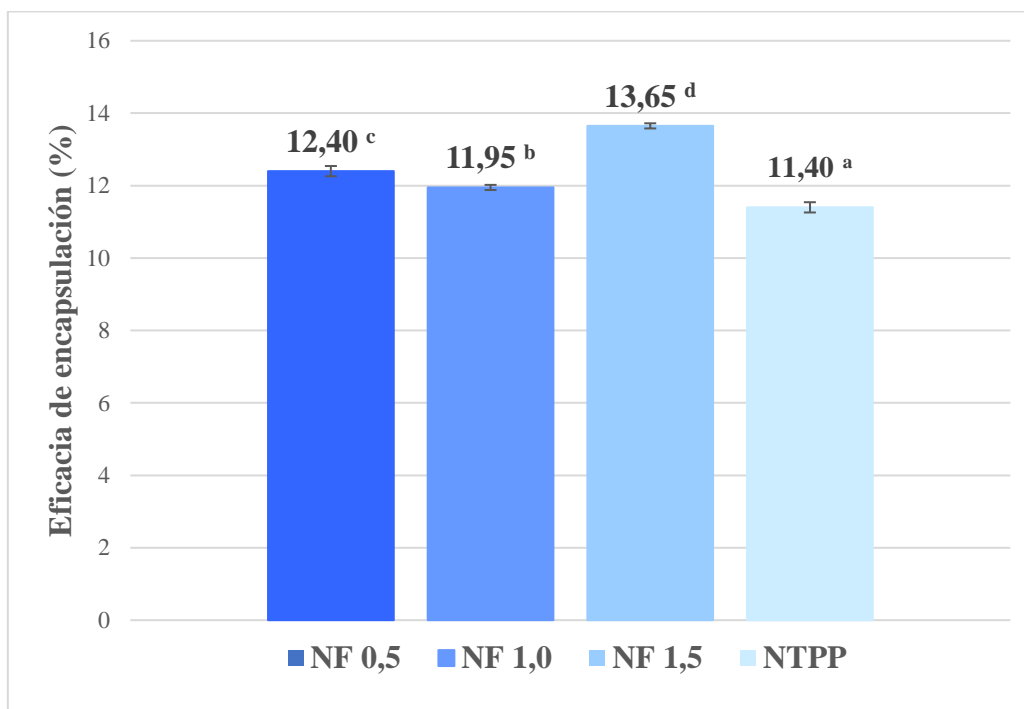


Figura 19. Eficacia de encapsulación (%) de la curcumina en las nanopartículas sintetizadas: NF0,5, NF1,0, NF1,5 y NTPP. Letras diferentes indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

La eficacia de encapsulación de curcumina resultó ser baja para todos los casos, obteniendo los mejores resultados en el caso de NF1,5 con una eficacia de encapsulación del 13,64% y el peor resultado con las nanopartículas control (quitosano + tripolifosfato).

Estos resultados contrastan mucho con los obtenidos por Nair et al. (2019), donde consiguieron encapsular un 88,4% de curcumina en nanopartículas de quitosano y tripolifosfato, aunque cabe resaltar que las condiciones de trabajo fueron diferentes a las realizadas en este estudio ya que utilizaron etanol como disolvente de la curcumina, a diferencia de en el presente Trabajo Fin de Master donde se utilizó agua para evitar alteraciones en la fosvitina.

En otros estudios, se ha visto que encapsular compuestos bioactivos con nanopartículas de quitosano y tripolifosfato mediante gelificación iónica es bastante eficiente. En un estudio donde se encapsuló quercitina, se obtuvo una eficacia de

encapsulación del 91%, por otro lado, la encapsulación de la rutina (pigmento con grandes propiedades antioxidantes) consiguió una eficacia de encapsulación igual al 58%, la baicalina consiguió una alta eficacia de encapsulación en nanopartículas con un 91%, al igual que otros compuestos derivados de falvanones y flavonoides, que consiguieron altos porcentajes de encapsulación (Di Santo et al., 2021; Ezhilarasi et al., 2013).

5.6 ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

Los resultados obtenidos de la estabilidad a lo largo del tiempo se encuentran resumidos en las tablas 5 y 6.

La Tabla 5 recoge los resultados de la evolución del pH y de la turbidez de las nanopartículas NTPP, NF0,5, NF1,0 y NF1,5 en los días 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 21 de almacenamiento. Se observó que respecto al pH en el día 0 los valores oscilaron entre 4,44 y 4,46, donde las diferencias que se observan no fueron significativas ($P\text{-value} > 0,005$). En los días 1, 2 y 3 las diferencias entre muestras tampoco fueron significativas, sin embargo se puede apreciar un descenso del pH importante en el día 2 en todas las muestras. En los días 7, 14 y 21 se observaron diferencias significativas entre las cuatro muestras ($p\text{-value} < 0,005$), donde las muestras con fosvitina tuvieron valores más elevados que las muestras de TPP de manera inversa a la concentración de fosvitina, es decir que la muestra con menor concentración de fosvitina (NF0,5) es la que obtuvo valores de pH más elevados. Por otra parte, se puede apreciar que las diferencias a lo largo del tiempo de almacenamiento entre mismas muestras fueron significativamente diferentes, aunque no se observó una tendencia clara en el tiempo de almacenamiento en el pH. Se podría decir que el aumento del pH en los últimos días en las muestras de NF se debe al crecimiento de microorganismos y a su actividad enzimáticas que pueden promover la solubilización de la fosvitina e inducir a la evolución del pH ya que genera compuestos nitrogenados.

Con respecto a los resultados de turbidez, se puede decir que las muestras de nanopartículas sintetizadas con fosvitina fueron significativamente más turbias que las de TPP, así como también se observó diferencias entre las muestras de fosvitina a distintas concentraciones, aunque no hay una tendencia clara en lo que respecta la turbidez con la concentración de fosvitina empleada. En los días 1 y 7 las diferencias que se observaron entre las muestras no fueron significativas, al contrario que los días 0, 2, 3, 14 y 21 donde $P\text{-value} < 0,005$. Por otro lado, la turbidez de las muestras aumentó de manera significativa

a lo largo del tiempo de almacenamiento, llegando a los niveles más altos en el día 21 con valores de $5,59 \text{ cm}^{-1}$ en el caso de NF05 y el valor más bajo en el caso de NTPP con $3,51 \text{ cm}^{-1}$. Este aumento en la turbidez puede ser debido al crecimiento de microorganismos como pueden ser las bacterias aerobias mesófilas ya que las muestras se encontraban a temperatura ambiente y además todo el procedimiento de extracción de la fosvitina y de preparación de las nanopartículas fueron dadas en condiciones de no esterilidad, por lo tanto la turbidez podría ser un indicador proporcional al crecimiento microbiano a lo largo del tiempo de almacenamiento.

En la Tabla 6 se pueden observar los resultados de la evolución del tamaño de las nanopartículas (Z-average), el Índice de Polidispersidad (PdI) y el Potencial Z de las nanopartículas NTPP, NF0,5, NF1,0 y NF1,5 a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Se puede decir que el tamaño de las nanopartículas NTPP, NF0,5, NF1,0 y NF1,5 varió entre los días de almacenamiento. En los primeros días no se observó una tendencia clara en el cambio del diámetro de las nanopartículas pero a partir de día catorce se observa que el tamaño tiende a aumentar en la mayoría de las muestras a excepción de la muestra NF1,5, donde la media del tamaño disminuyó con respecto a la medida anterior. Sin embargo en el día 21 se observó un aumento significativo en el tamaño de las cuatro muestras. Esto puede deberse a que las partículas en una dispersión coloidal pueden adherirse entre sí y formar agregados de tamaño cada vez mayor, que pueden depositarse bajo la influencia de la gravedad, por lo que tanto las NTPP como las NF tienden a aumentar de tamaño. Por otro lado, con respecto a la cantidad de fosvitina empleada para la síntesis de las NF se puede decir que esta no influyó en de manera significativa en el tamaño de las nanopartículas, ya que en los tres casos aumentaron de tamaño sin una relación proporcional a la cantidad de fosvitina añadida.

En cuanto al PdI, se puede decir que en estas muestras la variabilidad de tamaños fue mayor que en el ensayo de caracterización de las nanopartículas. Esta dispersión fue mayor en el caso de la muestra NTPP con un valor de 0,678 a tiempo 0 y aumentó con el paso del tiempo de almacenamiento. Por otro lado el PdI de las NF a tiempo 0 se encontró entre 0,445 y 0,460 por lo que la variación de diámetros en las nanopartículas de la muestra fue importante. Esta variación permaneció estable hasta el día 14, con puntos con valores mayores o menores a lo largo del almacenamiento, pero en el día 21 aumentó con diferencias significativas respecto a los días anteriores lo que nos indica que hay una

mayor variación entre los tamaños, probablemente por la agregación entre las nanopartículas de la muestra.

Por otra parte, con respecto al potencial Z se puede decir que las muestras presentaron una tendencia a disminuir, lo que nos indica que la estabilidad de las nanopartículas también va disminuyendo. Esto es debido a que la estabilidad coloidal de la suspensión de nanopartículas se ve afectada por la capacidad de resistir a la floculación o la agregación de partículas y como se comentó anteriormente, las nanopartículas tienden a formar agregados. En el día 21 la muestras con un mayor potencial Z fue la NTPP, por lo que podemos decir que estas nanopartículas tienen fuerzas repulsivas lo suficientemente fuertes como para resistir la floculación/agregación, mientras que las NF tienen poca fuerza repulsiva y eventualmente tiene lugar la agregación/floculación o coagulación.

Tabla 5. Evolución de los parámetros de pH y Turbidez (medias \pm desviaciones estándar) ($n=2$) ($n=2$) de las nanopartículas de quitosano y TPP y las nanopartículas de quitosano y fosvitina con distintas concentraciones.

| Parámetro | Muestra | Días de almacenamiento | | | | | | |
|----------------------------------|---------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| pH | NTPP | 4,44 \pm 0,01 ^{a2} | 4,40 \pm 0,01 ^{a2} | 4,16 \pm 0,01 ^{a1} | 4,16 \pm 0,01 ^{c1} | 4,53 \pm 0,01 ^{a3} | 4,54 \pm 0,01 ^{a3} | 4,55 \pm 0,01 ^{a3} |
| | NF0,5 | 4,45 \pm 0,01 ^{ab4} | 4,43 \pm 0,01 ^{b3} | 4,17 \pm 0,01 ^{a2} | 4,15 \pm 0,01 ^{c1} | 4,67 \pm 0,01 ^{c5} | 5,51 \pm 0,01 ^{d6} | 6,11 \pm 0,01 ^{d7} |
| | NF1,0 | 4,46 \pm 0,00 ^{b4} | 4,41 \pm 0,01 ^{a3} | 4,16 \pm 0,01 ^{a2} | 4,13 \pm 0,01 ^{b1} | 4,60 \pm 0,01 ^{b5} | 5,11 \pm 0,01 ^{c6} | 5,42 \pm 0,01 ^{c7} |
| | NF1,5 | 4,45 \pm 0,00 ^{ab4} | 4,40 \pm 0,01 ^{a3} | 4,16 \pm 0,01 ^{a2} | 4,11 \pm 0,01 ^{a1} | 4,55 \pm 0,01 ^{a5} | 4,75 \pm 0,01 ^{b6} | 5,23 \pm 0,01 ^{b7} |
| Turbidez (cm^{-1}) | NTPP | 2,01 \pm 0,09 ^{a1} | 2,82 \pm 0,17 ^{a2} | 2,97 \pm 0,04 ^{b2} | 3,38 \pm 0,02 ^{c34} | 3,29 \pm 0,10 ^{a3} | 3,40 \pm 0,05 ^{a34} | 3,51 \pm 0,06 ^{a4} |
| | NF0,5 | 2,71 \pm 0,09 ^{b1} | 3,15 \pm 0,03 ^{b2} | 3,16 \pm 0,03 ^{c2} | 3,28 \pm 0,03 ^{b2} | 3,48 \pm 0,11 ^{a3} | 5,43 \pm 0,08 ^{c4} | 5,59 \pm 0,02 ^{b4} |
| | NF1,0 | 2,86 \pm 0,04 ^{c1} | 2,86 \pm 0,04 ^{a1} | 2,86 \pm 0,04 ^{a1} | 2,92 \pm 0,04 ^{a1} | 3,35 \pm 0,03 ^{a2} | 4,86 \pm 0,02 ^{b3} | 5,48 \pm 0,03 ^{b4} |
| | NF1,5 | 2,01 \pm 0,00 ^{d1} | 3,31 \pm 0,03 ^{b1} | 3,35 \pm 0,02 ^{d1} | 3,45 \pm 0,02 ^{c1} | 3,33 \pm 0,05 ^{a1} | 5,20 \pm 0,23 ^{bc2} | 5,50 \pm 0,11 ^{b3} |

a, b, c, d: Para cada parámetro, las medias dentro de una columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en cuanto al tipo muestra (NTPP, NF0,5, NF1,0, NF1,5)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7: Para cada parámetro, las medias dentro de una fila con diferentes números son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el tiempo de almacenamiento

Tabla 6. Evolución de los parámetros de Z-average, PDI y Potencial Z (medias \pm desviaciones estándar) ($n=2$) de las nanopartículas de quitosano y TPP y las nanopartículas de quitosano y fosvitina con distintas concentraciones.

| Parámetro | Muestra | Días de almacenamiento | | | | | | |
|----------------------------|---------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 | 14 | 21 |
| Z-average (nm) | NTPP | 290,4 \pm 110,7 ^{a12} | 174,1 \pm 0,78 ^{a1} | 186,0 \pm 9,83 ^{a1} | 211,4 \pm 12,0 ^{a1} | 226,4 \pm 22,1 ^{a1} | 266,7 \pm 97,7 ^{ab1} | 415,9 \pm 13,7 ^{a2} |
| | NF0,5 | 237,6 \pm 2,05 ^{a1} | 318,1 \pm 19,6 ^{c1} | 281,5 \pm 14,28 ^{a1} | 302,9 \pm 4,03 ^{c1} | 288,8 \pm 32,95 ^{c1} | 364,9 \pm 7,57 ^{c1} | 793,1 \pm 306,7 ^{a2} |
| | NF1,0 | 245,3 \pm 2,19 ^{a1} | 245,0 \pm 7,14 ^{b1} | 230,7 \pm 1,63 ^{a1} | 240,6 \pm 3,68 ^{b1} | 217,4 \pm 18,8 ^{b1} | 353,3 \pm 12,0 ^{bc1} | 781,0 \pm 289,8 ^{a2} |
| | NF1,5 | 246,0 \pm 3,04 ^{a1} | 245,0 \pm 4,74 ^{a1} | 252,1 \pm 1,34 ^{a1} | 246,2 \pm 1,48 ^{b1} | 234,4 \pm 0,28 ^{a1} | 197,7 \pm 55,4 ^{a1} | 667,7 \pm 47,4 ^{a2} |
| PdI | NTPP | 0,678 \pm 0,004 ^{a1} | 0,848 \pm 0,106 ^{b1} | 0,716 \pm 0,286 ^{a1} | 0,804 \pm 0,047 ^{b1} | 0,655 \pm 0,129 ^{b1} | 0,784 \pm 0,153 ^{b1} | 0,935 \pm 0,059 ^{a1} |
| | NF0,5 | 0,445 \pm 0,034 ^{ab12} | 0,484 \pm 0,023 ^{a12} | 0,370 \pm 0,118 ^{a1} | 0,469 \pm 0,009 ^{a12} | 0,382 \pm 0,041 ^{a1} | 0,402 \pm 0,006 ^{a1} | 0,692 \pm 0,258 ^{a2} |
| | NF1,0 | 0,451 \pm 0,026 ^{b12} | 0,433 \pm 0,038 ^{a1} | 0,422 \pm 0,003 ^{a1} | 0,399 \pm 0,062 ^{a1} | 0,435 \pm 0,058 ^{a1} | 0,405 \pm 0,013 ^{a1} | 0,695 \pm 0,260 ^{a2} |
| | NF1,5 | 0,460 \pm 0,225 ^{b3} | 0,446 \pm 0,004 ^{a23} | 0,447 \pm 0,006 ^{a23} | 0,441 \pm 0,008 ^{a23} | 0,413 \pm 0,007 ^{a2} | 0,269 \pm 0,028 ^{a1} | 0,502 \pm 0,017 ^{a4} |
| Potencial Z (mV) | NTPP | 33,1 \pm 1,7 ^{a2} | 34,0 \pm 3,3 ^{a2} | 30,1 \pm 5,8 ^{a2} | 32,5 \pm 1,3 ^{a2} | 32,6 \pm 3,5 ^{b2} | 29,6 \pm 1,2 ^{c12} | 24,5 \pm 2,6 ^{b1} |
| | NF0,5 | 47,6 \pm 3,0 ^{c34} | 37,8 \pm 2,4 ^{ab2} | 42,0 \pm 3,7 ^{b23} | 50,3 \pm 5,4 ^{b4} | 38,5 \pm 2,2 ^{bc2} | 15,3 \pm 0,4 ^{b1} | 12,5 \pm 5,6 ^{a1} |
| | NF1,0 | 43,0 \pm 3,6 ^{bc34} | 39,0 \pm 3,1 ^{b3} | 42,3 \pm 1,1 ^{b34} | 47,0 \pm 2,1 ^{b4} | 26,1 \pm 4,6 ^{a2} | 12,5 \pm 1,4 ^{a1} | 13,8 \pm 0,1 ^{a1} |
| | NF1,5 | 40,0 \pm 2,8 ^{b2} | 40,4 \pm 1,2 ^{b3} | 37,9 \pm 1,5 ^{b2} | 47,3 \pm 0,9 ^{b4} | 43,4 \pm 1,2 ^{c3} | 14,5 \pm 1,6 ^{ab1} | 12,6 \pm 0,4 ^{a1} |

a, b, c, d: Para cada parámetro, las medias dentro de una columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en cuanto al tipo muestra (NTPP, NF0,5, NF1,0, NF1,5)

1, 2, 3, 4: Para cada parámetro, las medias dentro de una fila con diferentes números son significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el tiempo de almacenamiento

5.7 HIDRÓLISIS DE LA FOSVITINA

Para corroborar que la fosvitina fue adecuadamente hidrolizada se realizó una electroforesis SDS-PAGE (Figura 20), en los pocillos del gel se encuentra la muestra por duplicado en una concentración de 10 mg/mL. Se observa que los péptidos obtenidos tienen un tamaño igual y menor a 10 kDa.

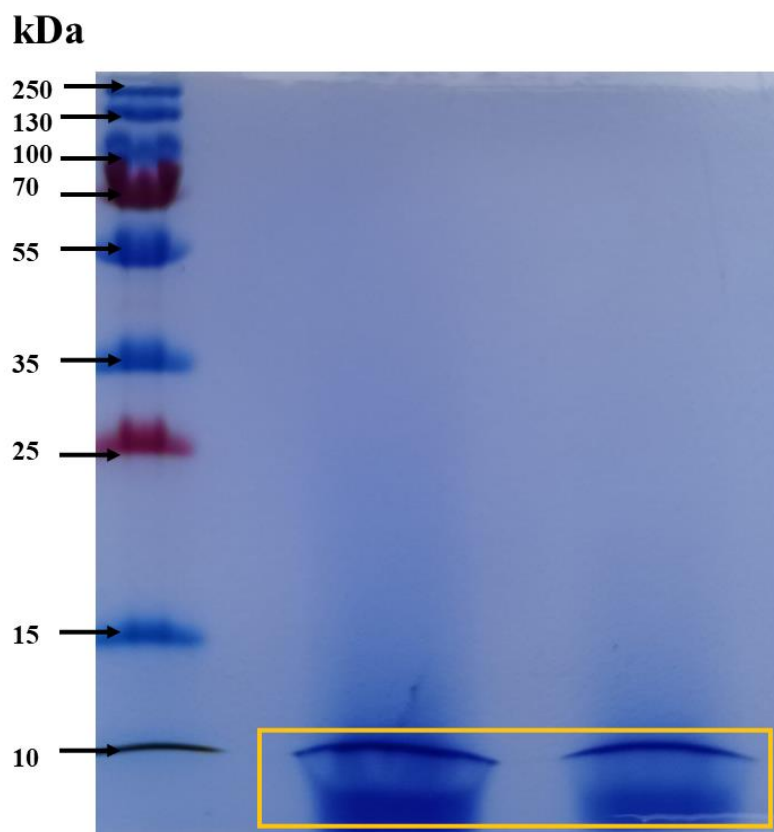


Figura 20. Gel de SDS-PAGE electroforesis de la fosvitina hidrolizada

En un estudio realizado por Huang et al. (2019) donde hidrolizaron fosvitina térmica y enzimáticamente, obtuvieron 154 péptidos distintos proveniente únicamente del pretratamiento térmico, mientras que con la hidrólisis de distintas enzimas (tripsina, Protez 6L, Multifect 14L y la combinación de estas) produjeron 252, 280 y 164 péptidos, respectivamente. En la Figura 21, se observa la electroforesis SDS-PAGE de Huang et al. (2019) donde la celda 4, corresponde con el mismo tratamiento realizado en nuestro caso, resultando también en péptidos de un tamaño inferior a 10 kDa.

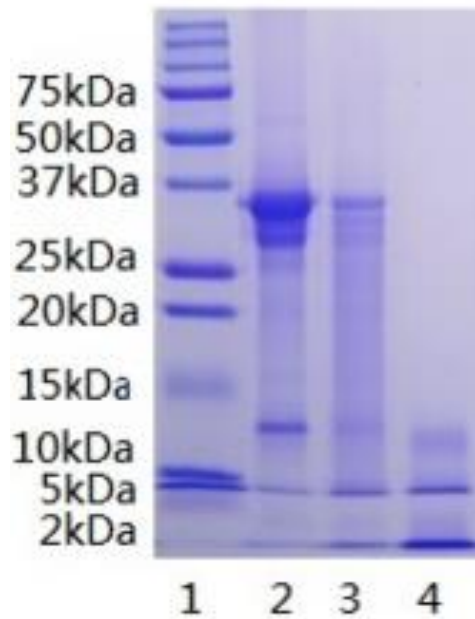


Figura 21. Resultados de SDS-PAGE de la hidrólisis enzimática con pretratamiento HTMP, donde en la celda 1 están los patrones, en 2 la fosvitina nativa, en 3 la fosvitina pretratada HTMP, en 4 la fosvitina pretratada HTMP + tripsina. Huang et al., 2019.

Sin embargo, estos péptidos obtenidos no fueron óptimos para la formación de las nanopartículas, ya que no permitían tener una fuerza iónica suficiente como para formar por gelificación iónica las nanopartículas de quitosano. Aunque por otro lado, estos péptidos obtenidos podrían resultar interesantes para potenciar las propiedades de la fosvitina como por ejemplo aumentar la capacidad de radicales o mejorar las propiedades antiinflamatorias (Marcet et al., 2022).

5.8 PICKERING EMULSIONS

Los resultados de los tamaños de gota obtenidos en las emulsiones tipo Pickering se resumen en la Tabla 7. Se observa que los tamaños de la emulsión de la muestra control (NTPP) obtuvieron los mejores resultados con una media de tamaño de 60,51 μm , mientras que las emulsiones de mayor tamaño fueron las NF 1,0 con 181,87 μm . El tamaño de gota de las emulsiones fue significativamente más pequeño en el caso de aquellas realizadas con NTPP, lo que nos indica que estas nanopartículas presentan mejores propiedades emulsionantes que las NF.

Tabla 7. Tamaño de las emulsiones tipo Pickering (medias \pm desviaciones estándar) (n=2)

| Muestra | Tamaño (μm) |
|----------------|--|
| NTPP | 60,51 \pm 1,27 ^a |
| NF 0,5 | 181,87 \pm 24,45 ^b |
| NF 1,0 | 201,34 \pm 30,34 ^b |
| NF 1,5 | 179,75 \pm 68,47 ^b |

a, b: Las medias dentro de una columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Por otra parte, las emulsiones tipo Pickering elaboradas a partir de fosvitina no fueron estables a lo largo del tiempo por lo que no se pudo evaluar su estabilidad en el tiempo ni su capacidad emulsionante. La falta de estabilidad de las emulsiones elaboradas con NF puede deberse a la conformación de las fosvitinas, ya que su actividad superficial en aceite/agua está impulsada por su estructura de tribloque donde 2 bloques son hidrofóbico y 1 bloque es hidrofílico, y esta conformación es dependiente del pH, por lo que si las condiciones no resultaron adecuadas, la interacción electrostática entre los grupos fosfatos no sería la adecuada para estabilizar las gotas de emulsión, y por lo tanto, no les permitiría a las nanopartículas adsorberse adecuadamente a la interfase aceite-agua.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicaron que es posible sintetizar nanopartículas de quitosano empleando fosvitina como agente de unión en la gelificación iónica, en donde la concentración de 1 mg/mL de fosvitina resultó ser la más idónea en cuanto al tamaño de las nanopartículas sintetizadas, mientras que la concentración de 1,5 mg/mL resultó tener el mayor potencial Z. En cuanto a su morfología, las imágenes del TEM mostraron una estructura globular característica, de tamaños dispersos pero coherentes con los resultados obtenidos en el DLS, mientras que el análisis FT-IR permitió evidenciar que las nanopartículas están formadas por la unión entre el quitosano y la fosvitina. Además, se puso de manifiesto el poder antioxidante de la fosvitina, otorgando así nuevas propiedades bioactivas a las nanopartículas de quitosano.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la estabilidad a lo largo del tiempo de almacenamiento de las nanopartículas de quitosano y fosvitina demostraron que en los últimos días el pH aumenta, al igual que la turbidez, lo cual puede deberse al crecimiento de microorganismos después de 14 días en almacenamiento a temperatura ambiente. No se aprecia una tendencia clara en cuanto al cambio en los tamaños de las nanopartículas pero sí se observa un aumento de tamaño significativo en el último día de estudio, mientras que el potencial Z parece disminuir con el tiempo.

Por otra parte, el producto de la hidrólisis de la fosvitina no resultó útil para la síntesis de las nanopartículas, donde posiblemente pierde su actividad aglomerante. En cuanto a las aplicaciones tecnológicas de las nanopartículas, se puede decir que tuvieron un rendimiento similar a las nanopartículas de quitosano y TPP, aunque habría que perfeccionar la metodología empleada para la encapsulación de curcumina así como para la formación de emulsiones de tipo Pickering.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede decir que la sustitución del TPP por la fosvitina en la síntesis de nanopartículas de quitosano, no solo es posible, sino que además esta proteína aporta actividad antioxidante y enriquece sus propiedades bioactivas, así como también tiene gran potencial tecnológico en la industria alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, Y., Itoh, T., & Adachi, S. (1982). Fractionation and characterization of hen's egg yolk phosvitin. *Journal of Food Science*, 47(6), 1903– 1907.
- Anton, M. (2007). Composition and structure of hen egg yolk. In *Bioactive egg compounds* (pp. 1-6). *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- Anton, M. (2013). Egg yolk: structures, functionalities, and processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2871– 2880.
- Anton, M., Gandemer, G. (1997) Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasms of egg yolk. *Journal of Food Science* 62(1997) 484-7
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrrondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E., Rabesona, H. (2003). Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry* 83(2003) 175-183
- Badawy, M.E.I. and Rabea, E.I. (2011) A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* (46) 0381, 29 p.
- Cherian, G., Holsonbake, T. B., & Goeger, M. P. (2002). *Fatty acid composition and egg components of specialty eggs*. *Poultry Science*, 81(1), 30– 33.
- Cortez, P. M. M. (2020). Análisis de los espectros de infrarrojo. Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas, 66-82. Guadalajara: CIATEJ.
- Enescu, D., Cerqueira, M.AP. Fucinos, P., Pastrana, L.M. (2019) Recent advances and challenges on applications of nanotechnology in food packaging. A literature review. *Food Chemistry and Toxicology* 134(May), 110814
- Desai, K. G. (2016). Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(2).

- Di Santo, M. C., D'Antoni, C. L., Rubio, A. P. D., Alaimo, A., & Pérez, O. E. (2021). Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles designed to encapsulate polyphenolic compounds for biomedical and pharmaceutical applications- A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 111970.
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental chemistry letters*, 16(1), 101-112.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 628-647.
- Fabián, S., Coral, G., & Plou Gasca, F. J. (2012). Obtención enzimática de compuestos bioactivos a partir de recursos naturales iberoamericanos. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Roshan, F.T., Alavije, R.S. (2015) Fabrication and characterization of core-shell magnetic chitosan nanoparticles as a novel carrier for immobilization of Burkholderia cepacia lipase. *Journal of Oleo Science* 64(4):423–430
- Gil, M. (2020) *El estado de alarma hace crecer el consumo de huevo en los hogares. Financial Food* (379), 1-40.
- Huang, X., Moon, S. H., Lee, J., Paik, H., Lee, E. J., Min, B., & Ahn, D. U. (2019). Effective preparation method of phosphopeptides from phosvitin and the analysis of peptide profiles using tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(51), 14086-14101.
- Huopalahti, R., López-Fandiño, M., Anton, R., Schade. (2007). Bioactive egg compounds (1st ed.), Berlín, Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Instituto de Estudios del Huevo (2022). Estructura del huevo. Visitado el 15/05/2022. Recuperado de https://www.institutohuevo.com/estructura_huevo/
- Jayakumar, R. & Prabakaran, M. (2021). Chitosan for Biomaterials III: Structure-Property Relationships (Vol. 287). Springer Nature.

- Jung, S., Jo, C. R., Kang, M.G., Ahn, D.U., & Nam, K.C. (2012). Elucidation of Antioxidant Activity of Phosvitin Extracted from Egg Yolk using Ground Meat. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 32(2), 162– 167.
- Kerch, G. (2015). Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 159-166.
- Khattak S, Wahid F, Liu L-P et al (2019) Applications of cellulose and chitin/chitosan derivatives and composites as antibacterial materials: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:1989–2006
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., & Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8421– 8431.
- Laca, A., Paredes, B., Rendueles, M., Día, M. (2015) Egg yolk plasma: Separation, characteristics, and future prospects. *LWT – Food Science and Technology*, 62(1), 7-10
- Laca, A., Paredes, B., & Díaz, M. (2012). Lipid-enriched egg yolk fraction as ingredient in cosmetic emulsions. *Journal of Texture Studies*, 43 (1), 12– 28.
- Le Denmat, M., Anton, M., Beaumal, V. (2000). Characterisation of emulsión properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids* 14(2000) 539-549
- Lee, J. H., Moon, S. H., Hong, Y., Ahn, D. U., & Paik, H. D. (2020). Anti-elastase and anti-hyaluronidase activity of phosvitin isolated from hen egg yolk. *British Poultry Science*, 61(1), 17– 21.
- Lesnierowski, G., & Stangierski, J. (2018). What’s new in chicken egg research and technology for human health promotion? -A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 46–51.
- López González, A. (2021). Preparación y caracterización de nanop  rticulas de quitosano y fosvitina. [Trabajo Fin de M  ster, Universidad de Oviedo]. Repositorio Institucional – Universidad de Oviedo.

- Lopez-Leon T, Carvalho ELS, Seijo B, Ortega-Vinuesa JL, BastosGonzalez D (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J Colloid Interface Sci* 283(2):344–351.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-75.
- Malverns Panalytical Ltd (2022). Potencial Zeta: Ventajas de utilizar las determinaciones de potencial zeta para mejorar la estabilidad y la vida de anaquel de las formulaciones, así como reducir el tiempo y los costos de formulación. Visitado el 15/06/2022. Recuperado de: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/zeta-potential>
- Marcet Manrique, I. (2015). Hidrólisis, separación y aprovechamiento de proteína de yema de huevo. [Tesis doctoral, Universidad de Oviedo]. Repositorio Institucional – Universidad de Oviedo.
- Marcet, I., Sáez-Orviz, S., Rendueles, M., & Díaz, M. (2022). Egg yolk granules and phosvitin. Recent advances in food technology and applications. *LWT*, 153, 112442.
- Mirza, A.M.J., Sharafaldin, A. M., Majid, P., Mahdi Fasihi, R., Kazem, A., Hajar, R., & Reza, M. (2014). Curcumin-loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles as a safe, natural and effective antibiotic inhibits the infection of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. *Iranian Journal of Biotechnology* 12(3):1012.
- Molyneux P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26(2), pp. 211-219
- Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, M., Park, E., Ahn, D. U., & Paik, H. D. (2014). Cytotoxic and antigenotoxic activities of phosvitin from egg yolk. *Poultry Science*, 93(8), 2103– 2107.

- Mujica Álvarez, J., Matiacevich, S., & Bustos, R. (2019). Estudios de las condiciones óptimas para maximizar estabilidad física y oxidativa de un ingrediente vitamínico nanoencapsulado. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 12(23), 0-0.
- Muxika A, Etxabide A, Uranga J et al (2017) Chitosan as a bioactive polymer: processing, properties and applications. *Int J Biol Macromol* 105:1358–1368. 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087
- Nair, R.S., Morris, A., Billa, N. et al. An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech* 20, 69 (2019).
- Nassar, N.N., Cortés, F.B., Franco, C.A (2021). Nanoparticles: An Emerging Technology for Oil Production and Processing Applications. Suiza: *The Springer* <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12051-5>
- Onuma, K. (2005) Effect of phosphonate on the nucleation and growth of calcium phosphates in physiological solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 109 (16) (2005), pp. 8257-8262, 10.1021/jp0445501
- Orcajo, J., Marcet, I., Paredes, B., & Díaz, M. (2013). Egg yolk hydrolysed granules: Characteristics, rheological properties and applications. *Food and Bioprocess Technology*, 91(4), 457-463. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.04.003>
- Ortiz Ureta, C. A., & Blanco Blasco, T. (2008). *Alimentos Bromatología*. Segunda. Lima, Perú: Universidad Nacional de Colombia.
- Peppas NA, Huang Y (2004) Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(11):1675–1687
- Perera U, Rajapakse N (2013) Chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and applications. In: Kim SK (ed) *Seafood processing by-products: trends and applications*. Springer, Nueva York, pp 371–387
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700.

- Rachmawati H, Yanda YL, Rahma A, Mase N. (2016) Curcumin-Loaded PLA Nanoparticles: Formulation and Physical Evaluation. *Science Pharmacy* 14;84(1):191-202. doi:
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. (1999). Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, pp. 1231-1237.
- S. Damodaran, S. Xu (1996) The role of electrostatic forces in anomalous adsorption behavior of phosvitin at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 178 (2) (1996), pp. 426-435, 10.1006/jcis.1996.0137
- Saddam, N. S., Hadi, A. G., & Mohammed, A. A. (2022). Enhanced antioxidant activity of chitosan extracted from fish shells materials. *Materials Today: Proceedings*, 49, 2793-2796.
- Saharan, V., & Pal, A. (2016). Chitosan based nanomaterials in plant growth and protection (pp. 33-41). New Delhi, India: Springer.
- Sattar Khan, M. A., Nakamura, S., Ogawa, M., Akita, E., Azakami, H., & Kato, A. (2000). Bactericidal action of egg yolk phosvitin against *Escherichia coli* under thermal stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1503– 1506.
- Serena Domingo, Pedro A. (2021). Nanotecnología para el desarrollo sostenible. Madrid, España: Editorial CSIC.
- Shariatnia Z, Jalali AM (2018) Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biology Macromolecules* 115:194–220.
- Singh, A., Mittal, A., & Benjakul, S. (2021). Chitosan nanoparticles: Preparation, food applications and health benefits. *Science Asia*, 47, 1-10.
- Taborsky, G. (1980). Iron binding by phosvitin and its conformational consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 255(7), 2976– 2984.
- Takeuchi, M., Mashima, T., Sztucki, M., Petukhov, A., Vis, M., Friedrich, H., Tuinier, R. (2022). Characterization of hen phosvitin in aqueous salt solutions: Size, structure, and aggregation. *Food Hydrocolloids*, 129, 107545

- Thekkethil, A. J., Nair, R., & Madhavan, A. (2019, December). The Role Of Nanotechnology In Food Safety: A Review. In *2019 International Conference on Computational Intelligence and Knowledge Economy (ICCIKE)* (pp. 405-409). 10.1109/ICCIKE47802.2019.9004412
- Tovar, C. A., Lima, K. O., Aleman, A., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2022). The effect of chitosan nanoparticles on the rheo-viscoelastic properties and lipid digestibility of oil/vinegar mixtures (vinaigrettes). *Journal of Functional Foods*, 93, 105092.
- Tsai, W. H., Yu, K. H., Huang, Y. C., & Lee, C. I. (2018). EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 903.
- UE (2008). EUR-Lex Commission Regulation (EC) No 589/2008 of 23 June 2008 laying down detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 1234/2007 as regards marketing standards for eggs. Visitado el 15/06/2022. Recuperado de: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=celex:32008R0589>
- USDA. (2020). Agricultural Research Science: Food Data Central: Eggs. Visitado el 15/07/2022. Recuperado de: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/783909/nutrients>
- Wang, M., Li, S., Chen, Z., Zhu, J., Hao, W., Jia, G., Chen, W., Zhebg, Y., Qu, W & Liu, Y. (2021). Safety assessment of nanoparticles in food: Current status and prospective. *Nanotechnology Today*, 39, 101169.
- Yilmaz, B., & Ağagündüz, D. (2020). Bioactivities of hen's egg yolk phosvitin and its functional phosphopeptides in food industry and health. *Journal of food science*, 85(10), 2969-2976.
- Zhang, X. Huang, M. Ma. (2017) Role of phosphorylation of phosvitin in the phase transformation of mineralization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101 (2017), pp. 712-718, 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.158
- Zhao, M., Li, S., Ahn, D. U., & Huang, X. (2021). Phosvitin phosphopeptides produced by pressurized hea-trypsin hydrolysis promote the differentiation and

mineralization of MC3T3-E1 cells via the OPG/RANKL signaling pathways.
Poultry science, 100(2), 527-536.

Zibaei, A., Jafari, S. (2021). Safety and Regulatory Issues of Nanoencapsulated Food Ingredients (Vol. 7). Chapter 1 – Safety and toxicity aspects of food nanoparticles., pp 1-29.