

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“ENCAPSULACIÓN DE  
ANTIOXIDANTES EN  
NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**MACARENA AFONSO DÍAZ**

**JULIO, 2016**



Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



**PROFESORES TUTORES:**

Dra. Marta Elena Díaz García

Dra. Rosana Badía Laíño

**CERTIFICAN:**

Que **Macarena Afonso Díaz** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, 13 de julio de 2016

Marta Elena Díaz García



Rosana Badía Laíño

VºBº



Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

## ÍNDICE

---

|  |    |
|--|----|
| Resumen .....  | i  |
| Abstract.....  | i  |
| Lista de figuras .....   | ii |
| Lista de tablas .....  | iv |
| 1. Introducción .....  | 1  |
| 1.1. Importancia de la nanotecnología en la industria alimentaria. ....                  | 1  |
| 1.2. Situación actual de la nanotecnología en alimentación. ....                         | 2  |
| 1.3. Objetivos.....  | 3  |
| 2. Consideraciones teóricas.....   | 4  |
| 2.1. Importancia de la encapsulación de quercetina y vitamina A.....                     | 4  |
| 2.2. Métodos de encapsulación.....   | 8  |
| 2.4. Características de la zeína.....  | 15 |
| 3. Metodología .....   | 19 |
| 3.1. Reactivos y disoluciones.....   | 19 |
| 3.2. Instrumentación analítica.....  | 19 |
| 3.3. Utillaje de laboratorio. ....   | 19 |
| 3.4. Síntesis de nanopartículas.....   | 20 |
| 3.4.1. Nanopartículas de zeína.....  | 20 |
| 3.4.2. Nanopartículas de zeína con quercetina. ....                                      | 21 |
| 3.4.3. Nanopartículas de zeína con vitamina A palmitato.....                             | 21 |
| 3.4.4. Nanopartículas de zeína y caseinato sódico. ....                                  | 22 |
| 3.4.5. Optimización de la cantidad de zeína para encapsular vitamina A<br>palmitato..... | 22 |
| 3.5. Estudio morfológico. ....   | 23 |
| 3.6. Estudio espectroscópico visible-UV y FTIR. ....                                     | 23 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.7.   | Estudio fotoluminiscente. ....   | 24 |
| 3.8.   | Análisis de la eficiencia de encapsulación. ....                                   | 24 |
| 4.     | Resultados experimentales. ....  | 25 |
| 4.1.   | Caracterización morfológica. ....  | 25 |
| 4.2.   | Caracterización espectroscópica. ....  | 30 |
| 4.2.1. | Nanopartículas de zeína con quercetina. ....                                       | 30 |
| 4.2.2. | Nanopartículas de zeína con vitamina A. ....                                       | 35 |
| 4.3.   | Características luminiscentes de las nanopartículas. ....                          | 37 |
| 4.3.1. | Nanopartículas de zeína con quercetina. ....                                       | 37 |
| 4.3.2. | Nanopartículas de zeína con vitamina A. ....                                       | 40 |
| 4.4.   | Determinación de la eficiencia de encapsulación. ....                              | 41 |
| 4.4.1. | Nanopartículas con quercetina. ....  | 42 |
| 4.4.2. | Nanopartículas con vitamina A. ....  | 45 |
| 4.4.3. | Nanopartículas con cantidades crecientes de zeína cargadas con<br>vitamina A. .... | 48 |
| 5.     | Conclusiones. ....   | 51 |
| 6.     | Bibliografía. ....   | 52 |

## **RESUMEN**

---

El diseño y la producción de nanoformulaciones como sistemas de liberación controlada de aplicación en la industria alimentaria están ganando cada vez más protagonismo. Se pueden emplear polímeros de grado alimenticio, como proteínas, para diseñar diversos sistemas capaces de encapsular, proteger y liberar de manera controlada componentes funcionales que de otra manera no podrían ser incorporados a matrices alimentarias por su alta inestabilidad o incompatibilidad, como vitaminas y polifenoles. En este trabajo se ha abordado la encapsulación de quercetina y vitamina A palmitato en nanopartículas de zeína, una proteína prolamida del maíz, con objeto de ser incorporados a productos alimentarios para minimizar la oxidación de nutrientes, debido a sus propiedades antioxidantes, o bien como nutraceuticos. Las nanopartículas se sintetizaron por el método de dispersión líquido-líquido, se caracterizaron morfológica y espectroscópicamente y se analizó la eficiencia de encapsulación.

## **ABSTRACT**

---

Design and production of nanostructured delivery systems for food applications are being quickly developed. Food-grade polymers, such as proteins, can be used to design new systems capable of encapsulating, protecting and controllably releasing functional components which could not otherwise be incorporated into food matrixes, due to its high instability and incompatibility, such as vitamins and polyphenols. In this work, quercetin-loaded and vitamin A-loaded zein nanoparticles synthesis has been addressed as a way of incorporating these components into food products to minimize nutrients oxidation, due to their antioxidant activity. They could also be incorporated as nutraceuticals. Nanoparticles synthesis by the liquid-liquid dispersion method, spectroscopic measurements, morphological characterisation and encapsulation efficiency determination were conducted in this work.

## LISTA DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de los flavonoides. ....  | 5  |
| Figura 2. Actividad antioxidante de los flavonoides (Kiokias y Varzakas, 2014). ....   | 5  |
| Figura 3. Estructura de la vitamina A palmitato. ....  | 6  |
| Figura 4. Interconversión entre estructuras de la vitamina A.....  | 7  |
| Figura 5. Nanoformulaciones comunes para compuestos lipofílicos (Shin, Kim, y Park, 2015). ....  | 8  |
| Figura 6. Nanoformulaciones (Katouzian y Mahdi, 2016). ....  | 9  |
| Figura 7. Representación de nanopartículas poliméricas. ....   | 12 |
| Figura 8. Posibles estructuras de las nanocápsulas. ....   | 12 |
| Figura 9. Preparación de nanopartículas de zeína por el método de dispersión líquido-líquido. ....   | 14 |
| Figura 10. Principales aminoácidos no polares de la zeína. ....  | 16 |
| Figura 11. Zeína disuelta en la mezcla etanol absoluto:agua (90/10 v/v) (izquierda) y dispersión de nanopartículas (derecha). ....   | 20 |
| Figura 12. Síntesis de nanopartículas. ....  | 21 |
| Figura 13. Nanopartículas de zeína con quercetina dispersas en fase acuosa (izquierda) y quercetina no encapsulada en una mezcla de etanol y agua (derecha), de muestras con adición inicial de 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 g de quercetina..... | 23 |
| Figura 14. Nanopartículas de zeína con vitamina A dispersas en fase acuosa, de muestras con adición inicial de 50 µL; 100 µL; 200 µL y 500 µL de vitamina A (izquierda a derecha).....   | 24 |
| Figura 15. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína y 0,05 g de quercetina en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 48 nm (TEM). ....  | 26 |
| Figura 16. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína y 0,50 g de quercetina en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 74 nm (TEM). ....  | 26 |
| Figura 17. Distribución de diámetro por número obtenida por DLS de nanopartículas preparadas en presencia de diferentes cantidades de quercetina y 2,50 g de zeína. ....   | 27 |
| Figura 18. Distribución de diámetro por número obtenida por DLS de nanopartículas preparadas en presencia de diferentes cantidades de vitamina A y 2,50 g de zeína.....  | 28 |
| Figura 19. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína y 50 µL de vitamina A en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 126 nm (TEM). ....  | 29 |
| Figura 20. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína, caseinato sódico y 50 µL de vitamina A en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 124 nm (TEM). ....  | 29 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 21. Nanopartículas obtenidas con 6,00 g de zeína, caseinato sódico y 50 µL de vitamina A en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 136 nm (TEM). .....                               | 30 |
| Figura 22. Espectro visible-UV de quercetina y de nanopartículas de zeína libres. ....   | 31 |
| Figura 23. Espectro visible-UV de nanopartículas de zeína con quercetina. ....   | 31 |
| Figura 24. Espectro visible-UV del precipitado de quercetina no encapsulada. ....  | 32 |
| Figura 25. Espectro FTIR de quercetina y nanopartículas de zeína libres. ....  | 34 |
| Figura 26. Espectro FTIR de nanopartículas de zeína con quercetina. ....   | 34 |
| Figura 27. Espectro visible-UV de nanopartículas de zeína con vitamina A en solución acuosa. ....  | 35 |
| Figura 28. Espectro visible-UV del precipitado de vitamina A no encapsulada. ....  | 35 |
| Figura 29. Espectro FTIR de vitamina A y nanopartículas de zeína libres. ....  | 36 |
| Figura 30. Espectro FTIR de nanopartículas de zeína con vitamina A. ....   | 37 |
| Figura 31. Espectros de excitación y emisión de nanopartículas de zeína libres. ....   | 38 |
| Figura 32. Espectros de excitación y emisión de quercetina en una mezcla de etanol absoluto:agua (60:40 v/v). ....   | 39 |
| Figura 33. Espectros de emisión de nanopartículas de zeína y nanopartículas de zeína cargadas con quercetina ( $\lambda_{exc} = 280$ nm). ....   | 40 |
| Figura 34. Espectro de emisión de las nanopartículas con quercetina ( $\lambda_{exc} = 385$ nm). ....  | 40 |
| Figura 35. Espectros de emisión de nanopartículas de zeína y nanopartículas de zeína cargadas con vitamina A ( $\lambda_{exc} = 280$ nm). ....   | 41 |
| Figura 36. Recta de calibrado para la quercetina. ....   | 43 |
| Figura 37. Espectros de absorción visible-UV de quercetina en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína). ....  | 44 |
| Figura 38. Espectros de absorción visible-UV de quercetina en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p) ....  | 45 |
| Figura 39. Recta de calibrado para la vitamina A palmitato. ....   | 46 |
| Figura 40. Espectros de absorción visible-UV de vitamina A en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína). ....  | 47 |
| Figura 41. Espectros de absorción visible-UV de vitamina A en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p). .... | 48 |
| Figura 42. Recta de calibrado para la vitamina A palmitato. ....   | 49 |
| Figura 43. Espectros de absorción visible-UV de vitamina A (50 µl) en nanopartículas con cantidades crecientes de zeína y caseinato sódico (relación zeína:caseinato de 1:0,30). ....            | 50 |

## LISTA DE TABLAS

---

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los trans-retinol, retinol palmitato y quercetina.....   | 7  |
| Tabla 2. Composición en aminoácidos de la zeína (g aminoácido/100 g zeína) (Shukla y Cheryan, 2001).....   | 17 |
| Tabla 3. Propiedades físico-químicas de la zeína comercial (Shukla y Cheryan, 2001).....   | 17 |
| Tabla 4. Propiedades favorables de la zeína para su aplicación en sistemas de liberación controlada (Shukla y Cheryan, 2001).....  | 18 |
| Tabla 5. Antioxidantes encapsulados en nanopartículas de zeína.....  | 18 |
| Tabla 6. Tamaño promedio de partícula obtenido para nanopartículas preparadas en presencia de diferentes cantidades de quercetina y 2,50 g de zeína.....                                 | 26 |
| Tabla 7. Diámetro promedio de partícula obtenido para nanopartículas preparadas en presencia de cantidades diferentes de vitamina A y 2,50 g de zeína.....                               | 28 |
| Tabla 8. Principales señales espectrales FTIR para la quercetina y la zeína.....   | 33 |
| Tabla 9. Eficiencia de encapsulación de quercetina en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína).....   | 43 |
| Tabla 10. Eficiencia de encapsulación de quercetina en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p)..... | 44 |
| Tabla 11. Eficiencia de encapsulación de vitamina A en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína).....  | 46 |
| Tabla 12. Eficiencia de encapsulación de vitamina A en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p)..... | 47 |
| Tabla 13. Eficiencia de encapsulación de vitamina A (50 µl) en nanopartículas con cantidades crecientes de zeína y caseinato sódico (relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p).....        | 49 |

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. Importancia de la nanotecnología en la industria alimentaria.

La nanotecnología consiste en el diseño, síntesis, manipulación y aplicación de estructuras y materiales que tienen generalmente un tamaño de entre 1 y 100 nanómetros, lo que conlleva a unas propiedades físicas y químicas que difieren significativamente de las habituales a mayor escala (EFSA Scientific Committee 2011). El uso de la nanotecnología se ha extendido actualmente a la industria farmacéutica, cosmética, textil y alimentaria. En la industria alimentaria sus principales aplicaciones destacan en áreas como el envasado, la calidad y seguridad alimentaria (biosensores), la mejora de los procesos (gelatinización, espumas y emulsiones) y en el desarrollo de nuevos productos, donde se emplean para evitar la pérdida de compuestos sensibles con propiedades volátiles (como aquellos que aportan sabor), reducir la reactividad e incompatibilidad de ciertos compuestos con el medio, mejorar su estabilidad en condiciones de calor, luz, radiación, oxígeno, etc., disminuir la pérdida de valor nutricional, enmascarar el sabor indeseable de ciertos componentes y controlar la liberación de un agente determinado a la matriz en la que se encuentra encapsulado (Dasgupta et al., 2015).

La encapsulación de componentes activos como nutracéuticos o conservantes aumenta su concentración, su biodisponibilidad y su estabilidad en productos alimentarios. Los sistemas de liberación controlada varían en tamaño desde varios nm hasta cientos de micras. Las nanopartículas son un método de encapsulación efectivo que protege al compuesto encapsulado frente a la degradación ambiental y permite controlar la velocidad de liberación del componente de interés (Dan, 2016). Se ha propuesto la nanoencapsulación como una solución a la inestabilidad química de compuestos hidrofóbicos que pueden inactivarse o degradarse fácilmente en sistemas acuosos, insolubles en disolventes acuosos y muy sensibles a oxidantes, la luz y la temperatura. Mediante su incorporación a sistemas de liberación controlada se puede aumentar su estabilidad y mejorar sus propiedades.

El tamaño de las nanopartículas hace que sus propiedades físico-químicas sean diferentes a las de aquellas partículas de mayor tamaño, obteniéndose una mejora en la estabilidad frente a los fenómenos de agregación y de separación gravitacional,

mayor velocidad de difusión, mayor solubilidad, mayor velocidad de penetración ante las barreras biológicas, etc. El agente activo puede ser liberado de las partículas de diferentes maneras, que dependerán de la estructura de las mismas, bien por difusión o bien por fragmentación física o química (Dan, 2016). Los métodos de encapsulación son numerosos y se seleccionan en función de las propiedades físicas y químicas del agente activo y el agente encapsulante, el tamaño y la forma deseados de las nanopartículas, el perfil de liberación controlada requerido, el proceso de escalado, costes, etc.

## **1.2. Situación actual de la nanotecnología en alimentación.**

En el año 2009, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realizó una evaluación sobre los riesgos potenciales de las nanotecnologías para la alimentación y los piensos y concluyó que aún existían muchas incertidumbres sobre su seguridad. Por ello, la EFSA ha desarrollado la “*Guía para la evaluación de riesgos derivados de la aplicación de la nanociencia y las nanotecnologías en los alimentos y piensos*” con un enfoque práctico para evaluar los riesgos potenciales derivados de las aplicaciones de la nanociencia y la nanotecnología en la cadena alimentaria (incluyendo, entre otros, aditivos, suplementos alimenticios y nuevos alimentos). Aunque actualmente existe un vacío legal, la guía hace referencia a los riesgos asociados a tres categorías de productos (aquellos destinados al consumo humano o animal, agroquímicos y envases) y provee información sobre los requisitos para la caracterización físico-química de los nanomateriales y para la identificación de peligros asociados. Los riesgos de los nanomateriales vendrán determinados por su composición química y sus propiedades físico-químicas (p.ej. tamaño, forma, solubilidad, carga superficial y reactividad superficial, que influenciarán su absorción, distribución, metabolismo y excreción, etc.) (EFSA Scientific Committee 2011).

Existen algunos biopolímeros aprobados comercialmente para la encapsulación de vitaminas, como proteínas, almidones, ciclodextrinas, alginatos y etilcelulosa (Katouzian y Mahdi, 2016).

### **1.3. Objetivos.**

En este trabajo se ha propuesto la encapsulación en nanopartículas de zeína de quercetina, que debido a sus propiedades antioxidantes puede emplearse con objeto de minimizar o ralentizar la oxidación de nutrientes en alimentos, y de vitamina A palmitato, como una solución a su baja solubilidad en medios acuosos y su inestabilidad en las condiciones de procesado y almacenamiento de los productos. Se ha seleccionado la zeína por tratarse de una proteína prolamina del maíz, por ser un ingrediente de calidad alimentaria, GRAS (Generally Recognized As Safety por la Food and Drug Administration de Estados Unidos) y ampliamente utilizada en las industrias farmacéutica y alimentaria, debido a su capacidad para formar películas y su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad.

A continuación se enumeran los objetivos de este trabajo:

- Síntesis, caracterización y evaluación de la eficiencia de encapsulación de nanopartículas de zeína cargadas con quercetina.
- Síntesis, caracterización y evaluación de la eficiencia de encapsulación de nanopartículas de zeína cargadas con vitamina A palmitato.
- Evaluación de la influencia en la dispersión de la adición de caseinato sódico como estabilizante.
- Optimización de la concentración de zeína en la síntesis de nanopartículas cargadas con vitamina A palmitato.

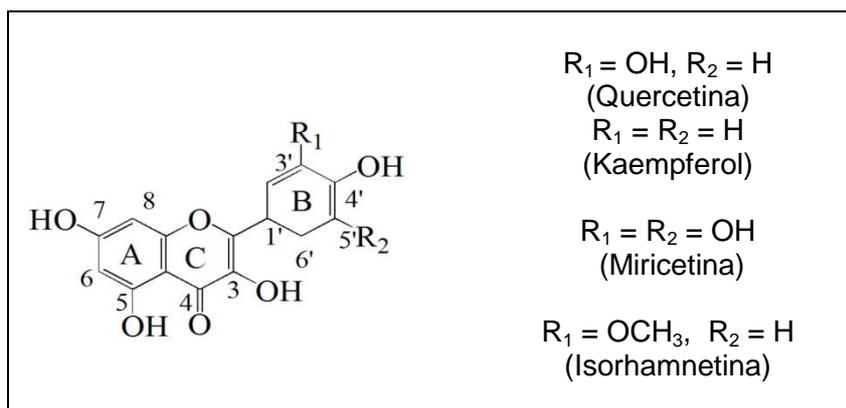
## **2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.**

---

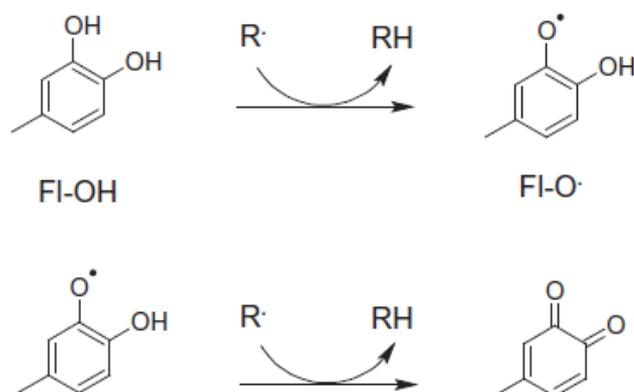
### **2.1. Importancia de la encapsulación de quercetina y vitamina A.**

La oxidación lipídica produce olores y sabores indeseables en el producto, disminuye su vida útil, altera la textura y el color y disminuye el valor nutricional (Kiokias y Varzakas, 2014). Consiste en una reacción en cadena de radicales libres iniciada por la abstracción de un átomo de hidrógeno de la cadena de ácidos grasos insaturados. Se han planteado numerosos métodos para controlar la velocidad y extensión de la oxidación lipídica en alimentos, siendo una de las más efectivas la adición de antioxidantes. Estos compuestos evitan la oxidación mediante la reducción de los radicales peroxilo y alcoxilo en compuestos estables, inhibiendo la propagación de la cadena y la escisión del ácido graso, disminuyendo de este modo la formación de productos volátiles de descomposición de ácidos grasos (por ejemplo, aldehídos y cetonas) que causan rancidez (Decker, 2009).

Los compuestos polifenólicos son útiles para mitigar el estrés oxidativo y prevenir o retrasar los procesos de oxidación causados por radicales libres. Por ello son utilizados como antioxidantes para la conservación de alimentos, en cosmética, etc. Los flavonoides son polifenoles que contienen 15 átomos de carbono, arreglados en dos anillos aromáticos conectados por un heterociclo de tres átomos de carbono, con un esqueleto molecular  $C_6-C_3-C_6$ . Estos tres anillos contienen diversos grupos hidroxilo que participan en múltiples interacciones intra- e intermoleculares (Halake, Birajdar, y Lee, 2016). La quercetina es un flavonoide clasificado como flavonol porque su estructura básica consiste en una 3-hidroxi-benzo-pirano y varios grupos hidroxilo distribuidos en los anillos A y B (Figura 1). La actividad antioxidante de la quercetina se ha atribuido a la formación de un radical ariloxilo estabilizado por deslocalización de electrones (Figura 2) (Kiokias y Varzakas, 2014).



**Figura 1. Estructura de los flavonoides.**



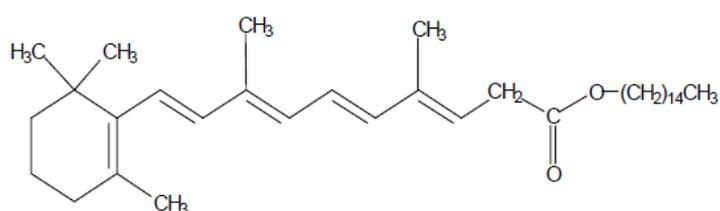
**Figura 2. Actividad antioxidante de los flavonoides** (Kiokias y Varzakas, 2014).

La efectividad de un antioxidante en la matriz alimentaria depende tanto de su reactividad química como de sus propiedades físicas. La quercetina es estable en solución acuosa a pH 3, pero comienza a degradarse a medida que el pH aumenta por encima de 5, siendo altamente inestable en medio alcalino (Patel et al., 2012). Los compuestos fenólicos pueden interactuar con los sitios hidrofóbicos de las nanopartículas a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Suficiente carga superficial los mantienen encapsulados de manera estable en sistemas acuosos, mejorando su solubilidad en agua (Li, Jiang, Xu, y Gu, 2014).

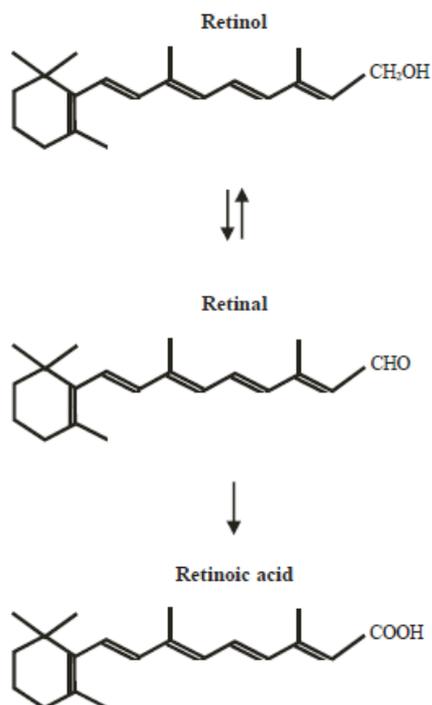
Por otra parte, la encapsulación de vitamina A se ha propuesto como una solución a su inestabilidad química, ya que se degrada fácilmente ante la luz, la temperatura y la presencia de oxidantes. Es una vitamina liposoluble, por lo que su incorporación a

algunos productos alimentarios es complicada debido a su incompatibilidad con matrices acuosas. Además, su estabilidad depende fuertemente de los factores ambientales y genera productos de descomposición que pueden afectar notablemente a las propiedades organolépticas y nutritivas del producto (Vilanova y Solans, 2015). La vitamina A podría incorporarse a matrices alimentarias con fines nutracéuticos o bien como conservante debido a sus propiedades antioxidantes, que han sido estudiadas recientemente en diversos campos (Ahmed, Dutta, y Nashiruddullah, 2016; Jin et al., 2014; Uematsu, Uematsu, Lavers, y Congdon, 2014). Su incorporación a sistemas de liberación controlada es asimismo una estrategia para promover su liberación en el sitio de interés, optimizando su absorción y asegurando su biodisponibilidad (Estevinho, Rocha, Engenharia, y Frias, 2016).

Vitamina A hace referencia al retinol y sus derivados naturales con la misma actividad biológica, el retinal y el ácido retinoico (Figura 3). Los ésteres de retinilo (su forma de almacenamiento) y los carotenoides también son considerados vitamina A (Estevinho, Rocha, Engenharia, y Frias, 2016). En la Figura 4 se muestra la estructura molecular de la Vitamina A y en la Tabla 1 se recogen las propiedades físico-químicas del retinol, retinol palmitato y quercetina, los compuestos con actividad antioxidante cuya encapsulación se estudió en este trabajo.



**Figura 3. Estructura de la vitamina A palmitato.**



**Figura 4. Interconversión entre estructuras de la vitamina A.**

**Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los trans-retinol, retinol palmitato y quercetina.**

| Propiedad                        | Retinol                         | Retinol palmitato<br>(vitamina A palmitato)       | Quercetina                   |
|----------------------------------|---------------------------------|---|------------------------------|
| Fórmula                          | $C_{20}H_{30}O$                 | $C_{36}H_{60}O_2$                                 | $C_{15}H_{10}O_7$            |
| Peso molecular                   | 286,46                          | 524,88  | 338,34                       |
| Densidad                         |                                 | 0,9 g/ml  |                              |
| Punto de fusión                  | 63-64 °C                        | 28-29 °C  | 43 °C                        |
| Estado físico                    | Polvo<br>cristalino<br>amarillo | Polvo cristalino<br>amarillo o aceite<br>amarillo | Polvo cristalino<br>amarillo |
| Absorción UV (nm)                | 325                             | 326   | 257 y 371                    |
| Fluorescencia:                   |                                 |   |                              |
| Excitación, $\lambda_{max}$ (nm) | 325                             | 325   | 496                          |
| Emisión, $\lambda_{max}$ (nm)    | 470                             | 470   | 532                          |
| Solubilidad:                     |                                 |   |                              |
| Agua                             | Insoluble                       | Insoluble   | Prácticamente<br>insoluble   |
| Etanol                           | Soluble                         | Soluble   | Soluble                      |
| Éter                             | Soluble                         | Soluble   | Soluble                      |
| Cloroformo                       | Soluble                         | Soluble   |                              |
| NaOH 1N                          |                                 |   | Soluble                      |

## 2.2. Métodos de encapsulación.

Los sistemas coloidales de liberación son sistemas de al menos dos fases, una de ellas dividida en pequeñas partículas (fase dispersa) a las que rodea completamente otra sustancia (fase dispersante). Estos sistemas se pueden clasificar de la siguiente manera: 1) dispersiones de sólidos en líquidos; 2) dispersiones de líquidos en líquidos y 3) dispersiones de moléculas autoensambladas. ( Patel y Velikov, 2011).

Los sistemas de liberación coloidal pueden estar compuestos de un solo componente activo (partículas coloidales) o una combinación de bioactivos incorporadas a una matriz (por ejemplo, nanopartículas poliméricas, partículas sólidas de lípidos, etc.). El estado de agregación podría ser líquido (emulsiones), cristalino o sólido amorfo (partículas coloidales) y cristales líquidos (mesofases). El tamaño puede variar desde 10 nm para las micelas a cientos de nanómetros para otras dispersiones. La estabilización es un requisito fundamental para la formación de sistemas coloidales, y se puede lograr por carga superficial (estabilización electrostática), por adsorción superficial de una capa de tensoactivo o polímero (estabilización estérica) o por una combinación de ambas (estabilización electroestérica) ( Patel y Velikov, 2011). En la Figura 5 se muestran algunas estrategias para la nanoencapsulación de compuestos lipofílicos.

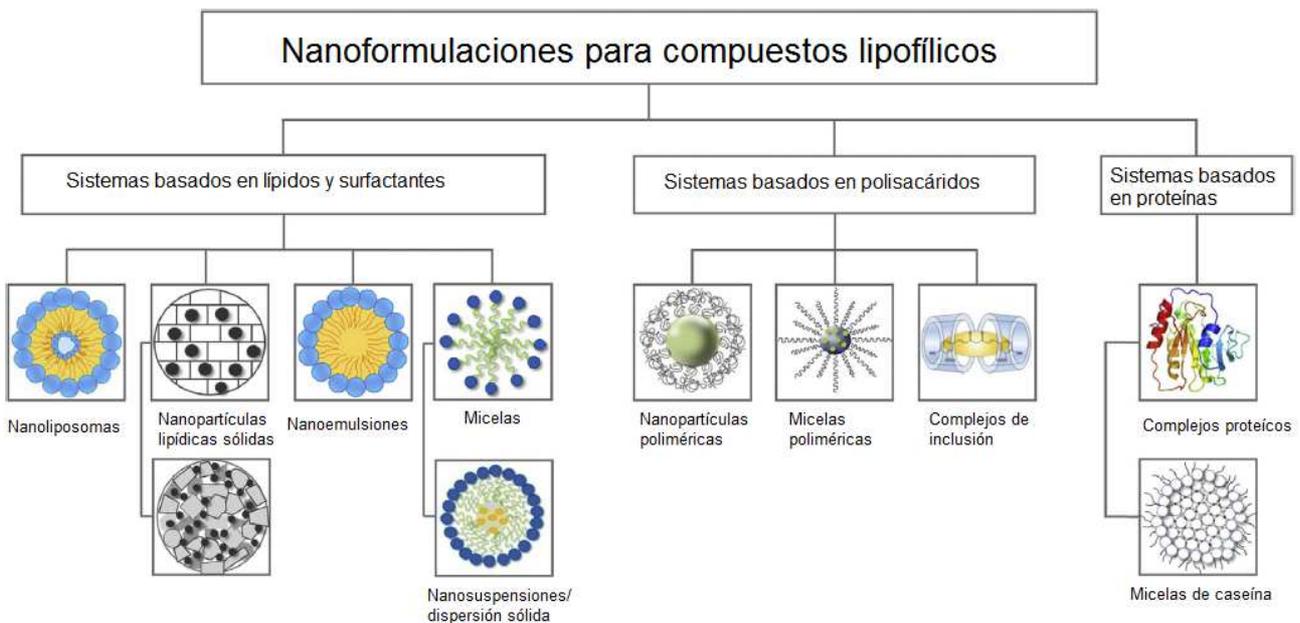
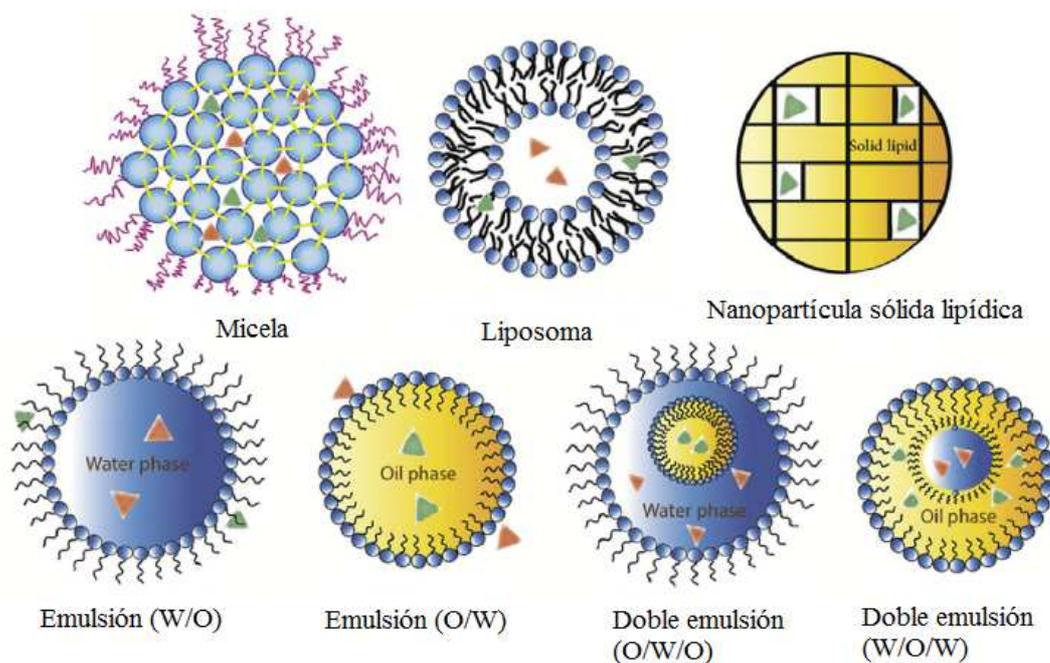


Figura 5. Nanoformulaciones comunes para compuestos lipofílicos (Shin, Kim, y Park, 2015).

Para ser utilizados en alimentos, los sistemas de liberación coloidal deben ser compatibles con la matriz en cuestión y no debe cambiar sus características originales como apariencia, textura, estabilidad y sabor. Por otro lado, deben garantizar en todo momento la estabilidad y actividad del agente activo durante su procesado y almacenamiento, sin que sean fácilmente degradados por la luz, oxígeno, temperatura y pH (Shin, Kim, y Park, 2015). Una de las ventajas de las nanoformulaciones es que normalmente evaden la percepción sensorial, permitiendo el enriquecimiento de productos con bioactivos sin afectar a las propiedades organolépticas del producto original. Otra de sus principales ventajas es la mejora de la biodisponibilidad del bioactivo a través de distintos mecanismos (aumento de su estabilidad durante la digestión, mejora de su solubilidad en los fluidos intestinales y mejora de su transporte y absorción) (Livney, 2015). En la Figura 6 se muestran algunas nanoformulaciones típicas.



**Figura 6. Nanoformulaciones** (Katouzian y Mahdi, 2016).

A continuación se resumen los principales sistemas de liberación coloidal de interés para uso en alimentos (Fang 2010; Katouzian y Mahdi 2016; Livney 2015; Patel y Velikov 2011; Shin, Kim, y Park 2015):

### ***Micelas***

Las micelas se pueden definir como conjuntos coloidales de moléculas anfifílicas, producidas a una concentración bien definida, llamada concentración micelar crítica. En medios polares como el agua, la parte hidrófoba de los compuestos anfifílicos que conforman la micela tiende a situarse lejos de la fase polar, mientras que la parte polar de las moléculas tiende a localizarse en la interfaz micela-disolvente y asumir varias formas (esferas, discos o varillas), dependiendo de las condiciones y la composición del sistema. Los compuestos activos son encapsulados en el núcleo de la micela. Los sistemas micelares presentan las siguientes ventajas: tamaño pequeño (inferior a 10 nm), estabilidad termodinámica y estabilidad coloidal. Sin embargo, tienen una limitada solubilidad, que viene determinada por la especificidad del surfactante y su concentración.

### ***Liposomas***

Su estructura consiste en una vesícula formada a partir de una o más bicapas lipídicas, compuesta generalmente por fosfolípidos, que rodea un núcleo acuoso. La presencia de un dominio hidrófobo y otro hidrófilo dentro de la estructura del liposoma permite su utilización como portadores de moléculas de ambas naturalezas. Los compuestos bioactivos encapsulados en su interior están protegidos frente a la degradación. Sus principales limitaciones son el alto costo de las materias primas y el uso de disolventes orgánicos y tensoactivos sintéticos en el proceso de preparación, baja estabilidad a pH ácido y sobre todo, la baja eficiencia de encapsulación.

### ***Emulsiones/nanoemulsiones***

Una emulsión se refiere a un sistema de dispersión no estable termodinámicamente compuesto por dos líquidos inmiscibles y que es estabilizado utilizando moléculas de superficie activa. Pueden estar compuestas por gotas con tamaños que van desde varias decenas de nanómetros a milímetros. Las microemulsiones son similares a las micelas en cuanto a su comportamiento debido a su organización espontánea. Tanto

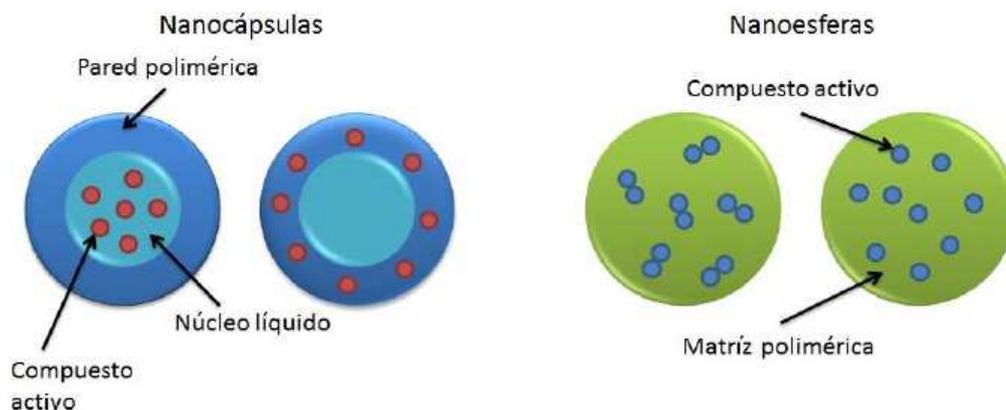
las emulsiones como las nanoemulsiones son adecuadas para solubilizar activos lipofílicos.

### ***Nanopartículas lipídicas sólidas***

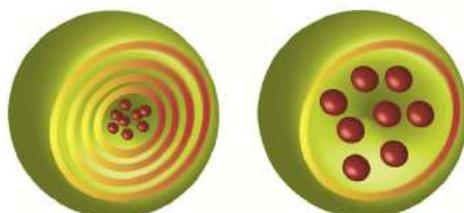
Son similares a las nanoemulsiones, pero en este caso el lípido está total o parcialmente cristalizado a temperatura ambiente. Esto se consigue calentando el lípido por encima de su temperatura de fusión y disolviendo el compuesto a encapsular. A continuación, la mezcla se dispersa y homogeniza en una solución acuosa con surfactante precalentada a la misma temperatura. Por último, se somete a homogenización a alta presión para obtener una emulsión O/W. Las nanopartículas sólidas se obtienen por enfriamiento y recristalización de la emulsión O/W a temperatura ambiente. A pesar de presentar muchas ventajas, como buena estabilidad, excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad, presentan una baja eficiencia de encapsulación cuando el compuesto a encapsular presenta solubilidad limitada en el lípido.

### ***Nanopartículas poliméricas***

Las nanopartículas se definen como dispersiones particuladas o sólidos coloidales con un tamaño comprendido entre 10 y 100 nm. Están diseñadas generalmente a partir de polímeros. Las nanopartículas son un término colectivo empleado para las nanocápsulas y nanoesferas (Figuras 7 y 8). Las primeras son sistemas vesiculares en los que el principio activo está confinado en una cavidad o núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica, mientras que las esferas son sistemas matriciales en los que el activo se encuentra incrustado en la matriz polimérica de manera uniforme. La principal ventaja de las nanocápsulas frente a las nanoesferas es su menor contenido polimérico y mayor eficiencia de encapsulación (Teixeira et al., 2012).



**Figura 7. Representación de nanopartículas poliméricas.**



**Figura 8. Posibles estructuras de las nanocápsulas.**

Los sistemas nanoparticulados presentan características únicas, como alta relación superficie-volumen, uniformidad y estructura estable (Rim et al., 2011).

La calidad de las partículas producidas se evalúa en base a la capacidad de retención del material polimérico y de la estabilidad de la dispersión con el tiempo. También es importante evaluar el sistema de liberación, asegurando que el compuesto encapsulado es liberado en el sitio y a la velocidad de interés. Existen numerosos mecanismos de liberación, que varían en función del método de preparación, del agente encapsulante y de las condiciones seleccionadas. Su clasificación se basa en los fenómenos físico-químicos que promueven la liberación del compuesto encapsulado: por difusión, por gradientes de presión u osmóticos, por cambios de pH o temperatura o una combinación de ellos. Existen modelos matemáticos que permiten desarrollar sistemas con características específicas y optimizar la cinética de liberación (Estevinho et al., 2016).

Las nanoformulaciones basadas en polímeros incorporadas a alimentos están restringidas al uso de biopolímeros y polímeros sintéticos GRAS (Generally Recognized As Safe). Algunos de estos biopolímeros son polisacáridos procedentes

de plantas (pectina, almidón y carragenina), polisacáridos de origen microbiano (xantanodex y dextrano), proteínas de alimentos (soja, albumina, caseína, seroproteínas y zeína) y quitosano (Patel y Velikov, 2011). La selección de un componente determinado dependerá los requisitos en cuanto a morfología, tamaño, carga superficial y estabilidad en las condiciones ambientales de interés, coste, facilidad de uso y las condiciones de procesado (Matalanis, Jones, y McClements, 2011).

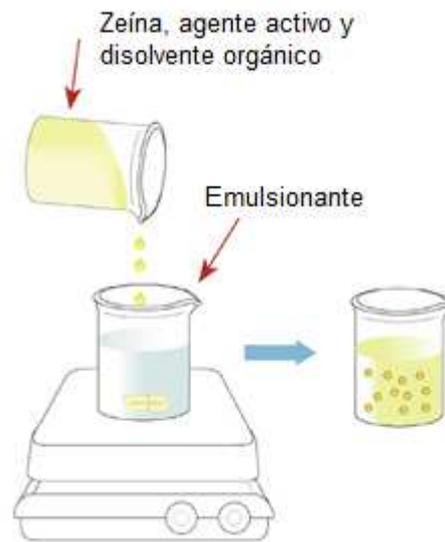
### **2.3. Métodos de preparación de nanopartículas de proteína.**

Las nanopartículas de proteína son adecuadas para aplicaciones industriales dado que el proceso de producción normalmente es fácilmente escalable y son biodegradables (Chen et al. 2014). Además, su estructura molecular única y sus propiedades fisicoquímicas las hacen adecuadas para diferentes tipos de aplicaciones. En la industria alimentaria, se pueden diseñar partículas con una morfología y tamaño adecuados para proveer alimentos térmicamente estables e inmovilizar y liberar activos hidrófobos e hidrófilos (Sağlam, Venema, van der Linden, y de Vries, 2014). Existen diversos métodos de preparación de nanopartículas de proteína, como son la desnaturalización térmica, métodos de extrusión, métodos de moldeo, dispersión líquido-líquido y métodos de gel de interrupción (Chen et al. 2014). La idoneidad de un método determinado dependerá de la naturaleza del biopolímero y de las características deseadas de las nanopartículas (tamaño, forma, carga superficial, hidrofobicidad, eficiencia de encapsulación, digestibilidad, etc.), así como de la viabilidad económica, necesidades de material y equipos y facilidad, costes y tiempo de fabricación.

#### ***Dispersión líquido-líquido***

El agente lipofílico que interesa encapsular y la proteína se disuelven inicialmente en una disolución de alcohol, que se introduce posteriormente en una solución acuosa. Cuando el alcohol, soluble en agua, pasa a la fase acuosa tiene lugar la formación de nanopartículas que encapsulan el agente activo (Chen et al. 2014) (ver Figura 9). Mediante este método se ha encapsulado aceite de pescado, aceite de lino y aceites esenciales (Quispe-Condori, Saldaña, y Temelli, 2011), curcumina (Hu et al., 2015) y tangeretina (Chen et al. 2014), entre otros. Dada la simplicidad del método, se pueden

encapsular ingredientes funcionales no polares al ser disueltos en la fase alcohólica junto con la proteína.



**Figura 9. Preparación de nanopartículas de zeína por el método de dispersión líquido-líquido.**

### *Desnaturalización térmica*

Se pueden obtener partículas de biopolímeros induciendo su asociación debido a alteraciones en la disolución o en las condiciones ambientales, como pH, fuerza iónica o temperatura. Es la primera técnica introducida en la industria alimentaria para la preparación de partículas de proteína, ya que es un método completamente escalable, y que, junto con técnicas mecánicas permite controlar el tamaño de las partículas a mayores concentraciones de proteína (Sağlam et al., 2014). Se calienta la disolución que contiene la proteína por encima de su temperatura de desnaturalización, bajo condiciones de pH y fuerza iónica que favorezcan su asociación (Saberri y McClements, 2015). La estructura, tamaño, forma y funcionalidad dependen de la concentración de proteína, de las condiciones de calentamiento, del pH y del tipo de sal añadida. La repulsión electrostática, controlada por el pH y concentración de sales, es la responsable de la morfología de los agregados de proteína. Se han obtenido partículas esféricas de proteína por este método de  $\beta$ -lactoglobulina con un diámetro medio de entre 160 y 200 nm (Sağlam et al., 2014).

Este método requiere operar a elevadas temperaturas, por lo que no es adecuado para la encapsulación de ingredientes activos termolábiles. Esto podría solventarse desnaturalizando las proteínas bajo condiciones que no permitan su asociación, y tras enfriar la disolución hasta la temperatura ambiente, alterar las condiciones modificando el pH y la fuerza iónica para promover su asociación a esa temperatura (Saberri y McClements, 2015).

### ***Otros métodos***

Se pueden formar perlas de hidrogel a través de la complejación electrostática de polisacáridos aniónicos y proteínas catiónicas bajo condiciones de solución apropiadas. Este procedimiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos, pero las perlas de hidrogel formadas por lo general tienen que ser recubiertas para mantener su estabilidad.

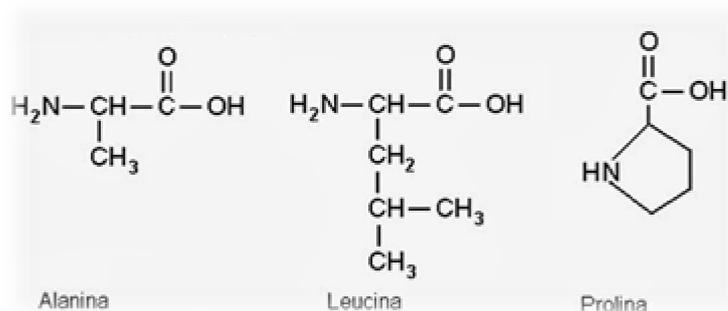
Por otro lado, las partículas de hidrogel se pueden formar por métodos emulsión. En este caso, un biopolímero gelificante se disuelve en una solución acuosa, que se homogeniza a continuación con una fase de aceite para crear una emulsión de agua en aceite. A continuación, la fase acuosa interna se convierte a gel alterando la solución o las condiciones ambientales, por ejemplo, por calentamiento de la emulsión de agua en aceite (que contiene proteínas en la fase acuosa interna) por encima de la temperatura de desnaturalización térmica de las proteínas. Las partículas de hidrogel se pueden separar posteriormente de la fase oleosa por centrifugación, filtración y lavado con un disolvente orgánico. Este método es particularmente adecuado para la formación de pequeñas partículas de hidrogel con dimensiones bien definidas. Sin embargo, es de difícil implantación a nivel comercial debido a su complejidad y a la cantidad de aceite y surfactante utilizada (Saberri y McClements, 2015).

### **2.4. Características de la zeína.**

La zeína es la proteína de reserva mayoritaria del maíz y consiste en cuatro fracciones principales:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -zeína. Es una mezcla de péptidos de diferentes pesos moleculares, solubilidad y carga. Las dos fracciones mayoritarias presentes en la zeína son la  $\alpha$  y la  $\beta$ . La  $\alpha$ -zeína se definió como la prolamina del maíz; es soluble en etanol y representa aproximadamente el 80% del total de la prolamina presente en el

maíz. La  $\beta$ -zeína no se encuentra en preparaciones industriales debido a su baja estabilidad (Shukla y Cheryan, 2001).

Estructuralmente, la zeína consiste en su mayoría en aminoácidos no polares hidrofóbicos (leucina, alanina y prolina) (Figura 10), que suman más del 50% de su contenido en aminoácidos, a los que se atribuye su hidrofobicidad (Patel y Velikov, 2014). Debido al alto contenido en aminoácidos sin carga (Tabla 2), es insoluble en agua y soluble en alcohol y en surfactantes aniónicos. Su núcleo interno hidrofóbico sirve como una barrera de agua y, por lo tanto, puede utilizarse para la fabricación de películas, fibras, composites y nanopartículas (con o sin otros biopolímeros) para la liberación controlada de fármacos y micronutrientes y de moléculas con propiedades antioxidantes y antimicrobianas en la industria alimentaria y farmacéutica. (Paliwal y Palakurthi, 2014). Además, la zeína presenta las ventajas de ser de origen natural, biodegradable, de bajo coste, abundante y disponible. Está clasificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la Food and Drug Administration de Estados Unidos. Asimismo, se caracteriza por su resistencia a las enzimas digestivas, lo que conduce a una menor digestión en el tracto gastrointestinal; esto permite la liberación controlada de componentes funcionales encapsulados en partículas de zeína (Patel y Velikov, 2014). Sin embargo, este tipo de sistemas de liberación no son estables a cambios de pH, fuerza iónica o temperatura, por lo que es necesaria su estabilización para ser empleados en una matriz compleja, como es el caso de los alimentos. En la Tabla 3 se recogen varias propiedades físico-químicas de la zeína comercial.



**Figura 10. Principales aminoácidos no polares de la zeína.**

**Tabla 2. Composición en aminoácidos de la zeína (g aminoácido/100 g zeína) (Shukla y Cheryan, 2001).**

| Clasificación | Aminoácido      | Zeína comercial |
|---------------|-----------------|-----------------|
| No Polar      | Glicina         | 0,7             |
|               | Alanina         | 8,3             |
|               | Valina          | 3,1             |
|               | Leucina         | 19,3            |
|               | Isoleucina      | 6,2             |
|               | Fenilalanina    | 6,8             |
|               | Triptófano      | -               |
|               | Prolina         | 9,0             |
|               | Serina          | 5,7             |
| -OH           | Treonina        | 2,7             |
|               | Tirosina        | 5,1             |
| -S            | Metionina       | 2,0             |
|               | Cisteína        | 0,8             |
| Básico        | Lisina          | NR              |
|               | Arginina        | 1,8             |
|               | Histidina       | 1,1             |
|               | Asparagina      | 4,5             |
|               | Glutamina       | 21,4            |
| Ácido         | Ácido aspártico | -               |
|               | Ácido glutámico | 1,5             |

**Tabla 3. Propiedades físico-químicas de la zeína comercial (Shukla y Cheryan, 2001).**

| Propiedad                        | Características   |
|----------------------------------|---|
| Color                            | Crema   |
| Estado físico                    | Polvo amorfo  |
| Peso molecular                   | 35000 Da  |
| Coefficiente de difusión         | $3,7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$  |
| Coefficiente de viscosidad       | 25  |
| Temperatura de transición vítrea | 165°C   |
| Punto isoelectrico, pH           | 6,2 (varía entre 5 y 9)   |
| Índice de refracción             | 1,44  |
| Coefficiente de sedimentación    | 1,5 s   |
| Gravedad específica a 25°C       | 1,25  |
| Punto de degradación térmica     | 320 °C  |
| Solubilidad                      | Disolventes primarios: glicoles, glicol-éteres, amino-alcoholes, ácidos nitro-alcohol, amidas, aminas.<br>Disolventes secundarios: agua con pequeñas concentraciones de alcoholes alifáticos y cetonas. |

En la Tabla 4 se recogen algunas de las propiedades características de la zeína que justifican su uso en sistemas de liberación controlada. En la Tabla 5 se hace mención a distintos estudios en los que se emplea la zeína como agente encapsulante para la fabricación de nanopartículas cargadas con compuestos antioxidantes.

**Tabla 4. Propiedades favorables de la zeína para su aplicación en sistemas de liberación controlada** (Shukla y Cheryan, 2001).

| Propiedad   | Ventajas   |
|---|--|
| Insoluble en agua; soluble en solución acuosa con alcohol (2/3 aminoácidos hidrofóbicos y 1/3 hidrofílicos) | Fácil precipitación para la formación de nanopartículas.<br>Más adecuada para sistemas de liberación controlada que proteínas hidrofílicas.<br>Permite encapsular compuestos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. |
| Económico, biocompatible y biodegradable  | Viabilidad comercial.  |
| Resistente al agua  | Protección para compuestos encapsulados sensibles a la hidrólisis.   |
| Carácter antioxidante y antimicrobiano  | Protección para compuestos encapsulados frente a la degradación.   |
| Estructura  | Alta carga útil y liberación sostenida del compuesto encapsulado.  |
| Peso molecular elevado  | Se puede conseguir alto efecto de permeabilidad y retención.   |

**Tabla 5. Antioxidantes encapsulados en nanopartículas de zeína.**

| Antioxidante   | Zeína: Antioxidante                 | Estabilizante           | Referencia bibliográfica                |
|----------------|-------------------------------------|-------------------------|---|
| Tangeretina    | 25:1(p/p)                           | $\beta$ -lactoglobulina | (Chen et al. 2014)                      |
| Quercetina     | 5:1, 10:1, 25:1 y 50:1(p/p)         | Caseinato de sodio      | (Patel et al. 2012)                     |
| Quercetagetina | 30:1, 25:1, 20:1, 15:1 y 10:1 (p/p) | -                       | (Sun et al., 2015)                      |
| Curcumina      |                                     | Pectina                 | (Hu et al., 2015)                       |
| Procianidina   | 1:8, 1:6, 1:4 y 1:2 (p/p)           | -                       | (Zou, Li, Percival, Bonard, y Gu, 2012) |
| Timol          |                                     | Caseinato de sodio      | (Zhang et al., 2014)                    |

### 3. METODOLOGÍA

---

#### 3.1. Reactivos y disoluciones.

- Zeína purificada, ACROS Organics
- Caseinato sódico, Sigma
- Quercetina dihidratada, Sigma
- Vitamina A palmitato 1,7 MIU/g, DSM
- Etanol absoluto, J.T. Baker
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio, VWR

#### 3.2. Instrumentación analítica.

- Balanza Analítica Mettler AE 163
- pH metro micropH 2002, CRISON
- Fluorímetro Varian Cary Eclipse
- Espectrofluorímetro Edimburgh Instruments FLSP920
- Espectrofotómetro visible-Ultravioleta Perkin Elmer Lambda 900.
- Microscopio de transmisión electrónica JeolJEM 2100 F
- Espectrofotómetro FTIR Varian 670 IR
- DLS Zetasizer, Malvern

#### 3.3. Utillaje de laboratorio.

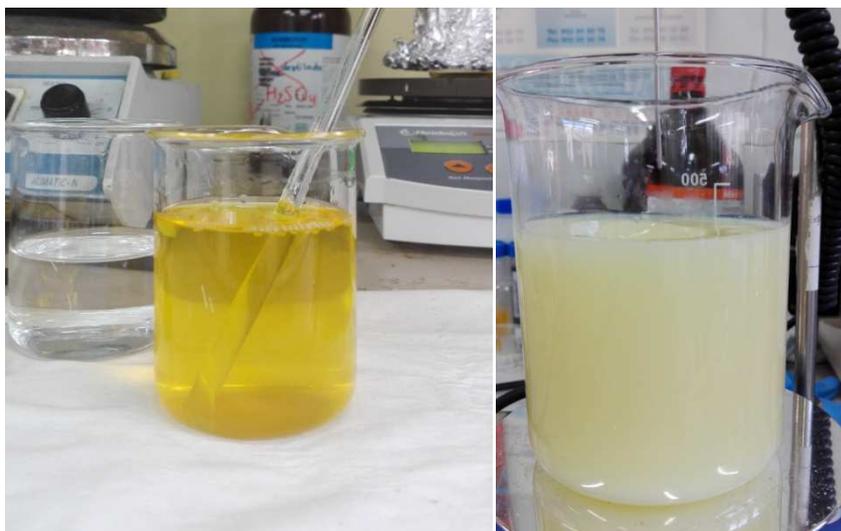
- Placa calefactora Heidolph MR-Hei Tec.
- Baño de ultrasonidos Selecta Iltasons MEDI-II
- Centrifugadora Labofuge 200, Thermo scientifics
- Centrifugadora Biofuge Stratos Heraeus, Thermo scientifics
- Rotavapor Laborota 4000, Heidolph
- Celda de cuarzo para medidas fluorimétricas.
- Celdas de cuarzo para medidas espectrofotométricas.
- Vasos de precipitado: 10 mL y 100 mL.
- Micropipetas LABMATE+: 10-100  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L.

- Pipeta aforada clase A 10 mL.
- Matraces aforados clase A: 10, 25 y 50 mL.
- Pipeta pasteur.
- Bureta 100 mL.
- Balón 500 mL.

### 3.4. Síntesis de nanopartículas.

#### 3.4.1. Nanopartículas de zeína.

Las nanopartículas se prepararon según el método de dispersión líquido-líquido descrito por Patel et al. (2012). Se pesaron 2,50 g de zeína y se disolvieron en 100 mL de una mezcla de etanol absoluto:agua (90:10 v/v). Esta fase orgánica se mantuvo en agitación durante 1 hora a 800 rpm y se añadió posteriormente gota a gota a 300 mL de agua destilada en agitación continua, manteniéndose en agitación 1 hora a 1000 rpm. A la dispersión formada se le eliminó parte del disolvente mediante rotavapor y se almacenó a 4°C para su posterior caracterización. En la Figura 11 se muestran la zeína disuelta en la fase orgánica y las nanopartículas de zeína en dispersión.



**Figura 11. Zeína disuelta en la mezcla etanol absoluto:agua (90/10 v/v) (izquierda) y dispersión de nanopartículas (derecha).**

### 3.4.2. Nanopartículas de zeína con quercetina.

Se siguió el procedimiento descrito anteriormente para preparar una serie de dispersiones de nanopartículas conteniendo cantidades diferentes de quercetina. Para ello, se disolvieron 2,50 g de zeína y 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 g de quercetina en la mezcla de etanol absoluto:agua (90:10 v/v).

### 3.4.3. Nanopartículas de zeína con vitamina A palmitato.

La síntesis de nanopartículas cargadas con vitamina A se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Patel et al. (2012) con ligeras modificaciones. Se pesaron 2,50 g de zeína y se disolvieron en una mezcla de 150 mL de etanol absoluto:agua (90:10 v/v) con 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 500  $\mu$ L de vitamina A palmitato. La mezcla se agitó y sonicó durante 3 horas a 40°C para asegurar la completa disolución de la vitamina A. Esta fase orgánica se añadió posteriormente, gota a gota, a 300 mL de agua en agitación continua (Figura 12), manteniendo la agitación a 1000 rpm durante 1 hora. A las dispersiones de nanopartículas formadas se les eliminó parte del disolvente mediante rotavapor y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su caracterización.



**Figura 12. Síntesis de nanopartículas.**

#### **3.4.4. Nanopartículas de zeína y caseinato sódico.**

Materiales poliméricos, tanto naturales como sintéticos, tales como surfactantes, fosfolípidos, proteínas -caseinato sódico (Zhang et al., 2014; Chen y Zhong, 2014a, 2014b; Feng y Lee, 2016; Sosa et al., 2016) y  $\beta$ -lactoglobulina (Chen et al., 2014)- y polisacáridos -pectina (Hu et al., 2015)- se han utilizado para la estabilización de nanopartículas en distintos sistemas. El caseinato sódico es una proteína anfifílica que se adsorbe a la superficie de las nanopartículas de zeína, reduciendo su hidrofobicidad superficial e incrementando la repulsión electrostática. La presencia de caseinato de sodio en el medio de precipitación da lugar a la interacción superficial de las partículas cargadas positivamente de la zeína y las cargadas negativamente del caseinato, dando lugar a dispersiones de nanopartículas más estables. Las partículas pueden dispersarse en la fase acuosa sin ningún efecto significativo en la distribución de tamaños de partícula.

Se sintetizaron nanopartículas de zeína y caseinato sódico utilizando una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p en base a los estudios de Feng y Lee (2016) y Patel et al. (2010), es decir, 2,50 g de zeína y 0,75 g de caseinato. Se pesaron 0,75 g de caseinato sódico y se disolvieron en 300 mL de agua. A esta fase acuosa se añadió posteriormente gota a gota la fase orgánica, según los procedimientos descritos anteriormente. Se sintetizaron por un lado nanopartículas de zeína y caseinato con 0,05 g y 0,50 g de quercetina en la fase orgánica, y nanopartículas de zeína y caseinato con 50  $\mu$ L y 500  $\mu$ L de vitamina A.

#### **3.4.5. Optimización de la cantidad de zeína para encapsular vitamina A palmitato.**

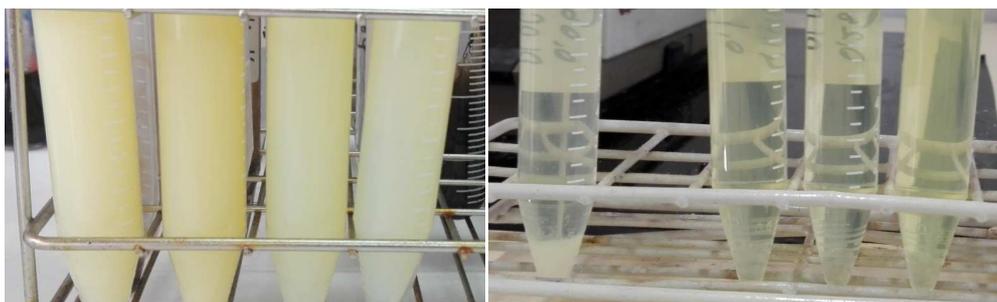
Los mejores resultados, en términos de una distribución de tamaño más estrecha, se obtienen cuando la concentración de zeína en la fase orgánica es de 2-5% (Patel y Velikov, 2014). En base a esto, se sintetizaron nanopartículas para encapsular vitamina A palmitato utilizando el método descrito anteriormente, empleando 50  $\mu$ L de vitamina A y cantidades crecientes de zeína: 3,50 g; 4,50 g y 6,00 g. Se añadió caseinato sódico a la fase acuosa en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p (1,05 g; 1,35 g y 1,80 g respectivamente).

### 3.5. Estudio morfológico.

Las nanopartículas se caracterizaron morfológicamente por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, se tomaron unos pocos  $\mu\text{L}$  de cada dispersión y se depositaron sobre una rejilla de cobre recubierta por una película de carbono amorfo. Por otro lado, se determinó el diámetro promedio de las partículas por dispersión de luz dinámica (DLS). Todas las muestras se analizaron a  $25^\circ\text{C}$  y se tomaron tres medidas por cada muestra.

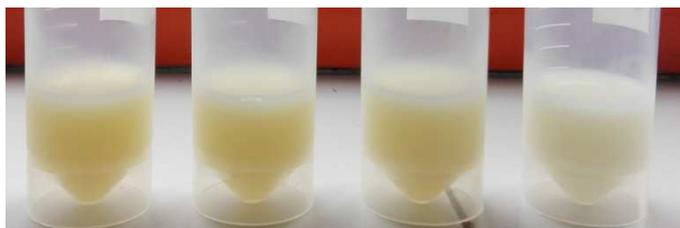
### 3.6. Estudio espectroscópico visible-UV y FTIR.

Se caracterizaron las nanopartículas en dispersión y la quercetina y la vitamina A no encapsuladas por espectrometría visible-UV y se analizó la interacción entre los compuestos encapsulados y la zeína por espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Para ello, se tomaron 10 mL de cada una de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con quercetina y se centrifugó de 20 a 40 minutos a una velocidad de 5000 rpm para precipitar la quercetina no encapsulada. El sobrenadante (nanopartículas) se separó del precipitado (quercetina libre) y éste se disolvió en 10 mL de una mezcla etanol absoluto:agua (90:10 v/v) (ver Figura 13). A continuación, se realizó el estudio por espectrometría visible-UV y FTIR del sobrenadante y de la quercetina libre.



**Figura 13. Nanopartículas de zeína con quercetina dispersas en fase acuosa (izquierda) y quercetina no encapsulada en una mezcla de etanol y agua (derecha), de muestras con adición inicial de 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 g de quercetina.**

Se realizó el mismo procedimiento para cada una de las dispersiones de nanopartículas de zeína cargadas con vitamina A (Figura 14), aunque en este caso, la centrifugación se realizó durante 5 minutos a 5000 rpm.



**Figura 14. Nanopartículas de zeína con vitamina A dispersas en fase acuosa, de muestras con adición inicial de 50  $\mu\text{L}$ ; 100  $\mu\text{L}$ ; 200  $\mu\text{L}$  y 500  $\mu\text{L}$  de vitamina A (izquierda a derecha).**

El espectro de absorción se determinó con un rango de operación en la región visible-UV de 240-700 nm y en el infrarrojo de 600-3900  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.7. Estudio fotoluminiscente.**

Se analizó por espectrometría de fluorescencia las características luminiscentes de las nanopartículas en dispersión y la interacción entre la zeína y los compuestos encapsulados.

### **3.8. Análisis de la eficiencia de encapsulación.**

Se tomaron 20 mL de cada una de las dispersiones y se sometieron a centrifugación para precipitar la quercetina y la vitamina A libre en todos los casos como se explicó en el apartado 3.6. De los sobrenadantes de esta primera centrifugación, donde se tienen las nanopartículas en dispersión en medio acuoso, se tomaron 10 mL y se sometieron a una segunda centrifugación a 12000 rpm durante 45 minutos para precipitar las nanopartículas. A continuación, se separó el sobrenadante del precipitado y éste se disolvió en 10 mL de una mezcla etanol absoluto:agua (60:40 v/v para la quercetina y 90:10 v/v para la vitamina A) para cuantificar la quercetina y la vitamina A encapsuladas por espectrometría visible-UV.

## **4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.**

---

### **4.1. Caracterización morfológica.**

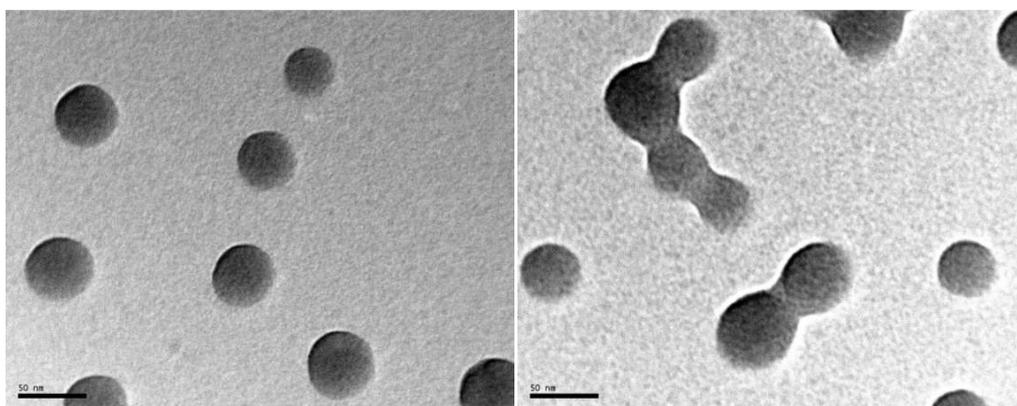
Como se observa en las Figuras 15 y 16, las nanopartículas de zeína con quercetina se fabricaron satisfactoriamente por el método de dispersión líquido-líquido, con una morfología esférica y uniforme. Los diámetros de las nanopartículas obtenidos por DLS (Tabla 6) muestran que a mayor concentración inicial de quercetina en la fase orgánica, mayor diámetro de la nanopartícula. Sin embargo, las nanopartículas que presentaron mayor eficiencia de encapsulación fueron las de menor diámetro (dispersiones que contenían 0,05 g y 0,10 g de quercetina). Las nanopartículas de zeína libres presentaron un diámetro promedio por DLS de 51 nm.

Se analizaron por TEM las nanopartículas con mayor y menor concentración de quercetina y vitamina A en la fase orgánica durante la síntesis. En vista de que los diámetros promedio de las nanopartículas de estas dispersiones coinciden prácticamente con los obtenidos por DLS, es de esperar que esta semejanza sea aplicable al resto de muestras. Para las dispersiones con quercetina con cantidades iniciales de 0,05 g y 0,50 g se obtuvieron por TEM diámetros promedio de 48 nm y 74 nm respectivamente (Figuras 15 y 16), y por DLS de 60 nm y 87 nm respectivamente (Tabla 6), mientras que para la dispersión con una cantidad inicial de vitamina A de 50  $\mu$ L se obtuvo por TEM un diámetro promedio de las nanopartículas de 126 nm (Figura 19) y por DLS de 135 nm (Tabla 7). En las Figuras 17 y 18 se muestran las distribuciones de diámetro por número de las nanopartículas cargadas con distintas cantidades de ambos compuestos.

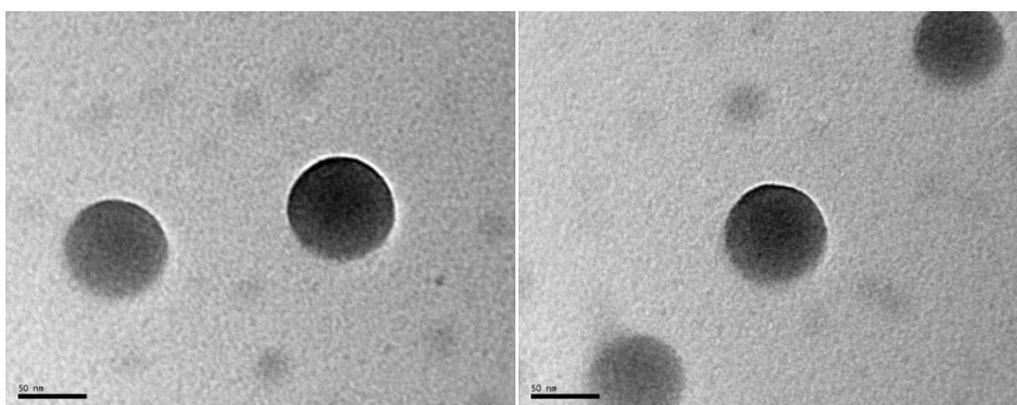
**Tabla 6. Diámetro promedio de partícula obtenido para nanopartículas preparadas en presencia de diferentes cantidades de quercetina y 2,50 g de zeína.**

| Muestra | Diámetro promedio de partícula por DLS (nm) | Diámetro promedio de partícula por TEM (nm) |
|---------|---|---|
| 0,05 g  | 60  | 48  |
| 0,10 g  | 42  | n.d.  |
| 0,25 g  | 80  | n.d.  |
| 0,50 g  | 87  | 74  |

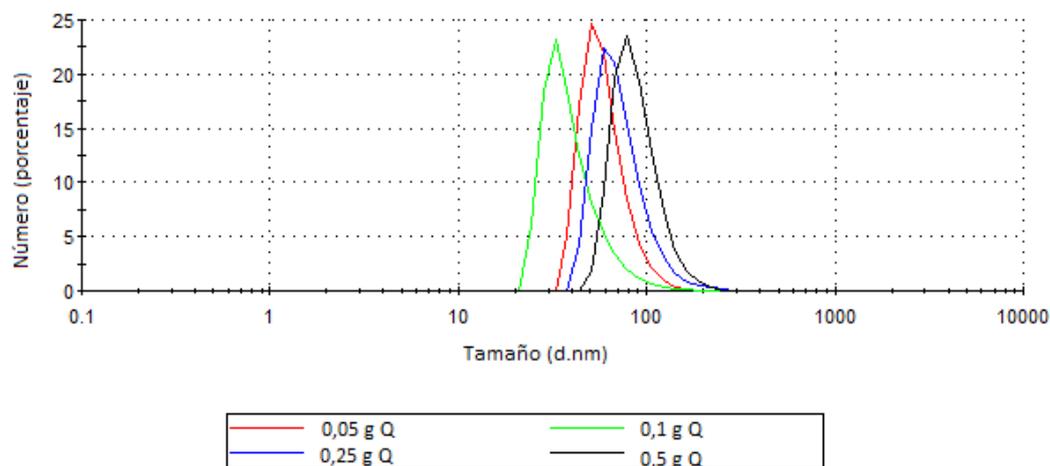
*n.d.: datos no disponibles*



**Figura 15. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína y 0,05 g de quercetina en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 48 nm (TEM).**



**Figura 16. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína y 0,50 g de quercetina en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 74 nm (TEM).**



**Figura 17. Distribución de diámetro por número obtenida por DLS de nanopartículas preparadas en presencia de diferentes cantidades de quercetina y 2,50 g de zeína.**

Las nanopartículas con vitamina A presentaron un diámetro promedio superior a las nanopartículas con quercetina, de entre 113 y 171 nm según los resultados obtenidos por DLS (Tabla 7). En base a estos resultados, no se observa una relación directa entre el diámetro de nanopartícula y la concentración inicial de vitamina A en la fase orgánica o la eficiencia de encapsulación.

La principal limitación de las partículas coloidales de zeína es que tienden a perder estabilidad. El punto isoeléctrico de la zeína es 6,2. Por lo tanto, los sistemas coloidales a base de zeína preparados a pH neutro pueden poseer menor carga superficial y dar lugar a agregados mayores y a una mayor distribución de tamaño. El uso de estabilizantes en concentraciones óptimas pueden cambiar la carga superficial o alterar el pH del medio para obtener dispersiones de nanopartículas más estables (Zhang et al., 2014). Los polímeros ofrecen estabilización por fenómenos de repulsión estérica y electrostática. Además, sus propiedades (como rigidez y polaridad) juegan un papel importante en la inhibición del crecimiento del tamaño de las nanopartículas (Joye y Julian, 2013), ya que se ha observado que ciertos polímeros disminuyen la tensión interfacial y, por lo tanto, disminuyen la velocidad de nucleación, dando lugar a nanopartículas de menor tamaño. Sin embargo, a concentraciones superiores a la requerida de estabilizante sus efectos beneficiosos desaparecen y pueden incluso promover el crecimiento de la partícula. Cuando la

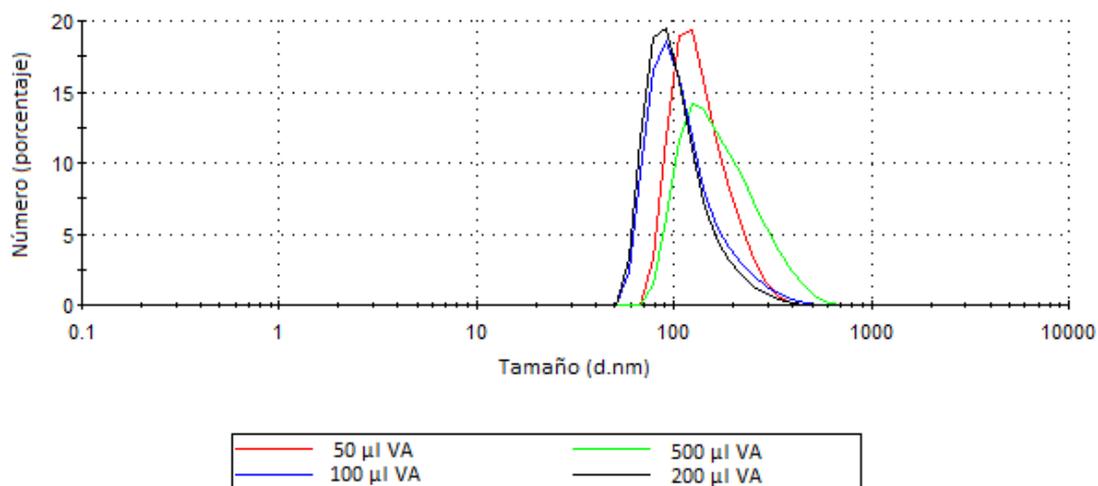
concentración de estabilizante excede su concentración de floculación crítica, puede inducir a la agregación de las partículas (Joye y Julian, 2013).

El uso de caseinato sódico no afectó significativamente al diámetro pero sí a la uniformidad de las nanopartículas, como se aprecia comparando las Figuras 19 y 20. Por otra parte, se distingue un ordenamiento entre las nanopartículas, que parecen embebidas en una micela de caseinato (ver Figuras 20 y 21).

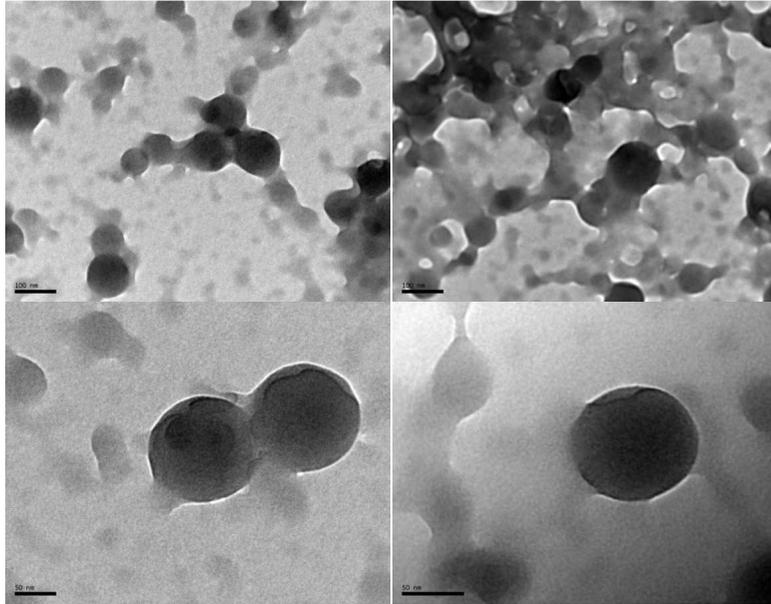
**Tabla 7. Diámetro promedio de partícula obtenido para nanopartículas preparadas en presencia de cantidades diferentes de vitamina A y 2,50 g de zeína.**

| Muestra        | Diámetro promedio de partícula por DLS (nm) | Diámetro promedio de partícula por TEM (nm) |
|----------------|---|---|
| 50 $\mu$ L VA  | 135   | 126   |
| 100 $\mu$ L VA | 118   | n.d.  |
| 200 $\mu$ L VA | 113   | n.d.  |
| 500 $\mu$ L VA | 171   | n.d.  |

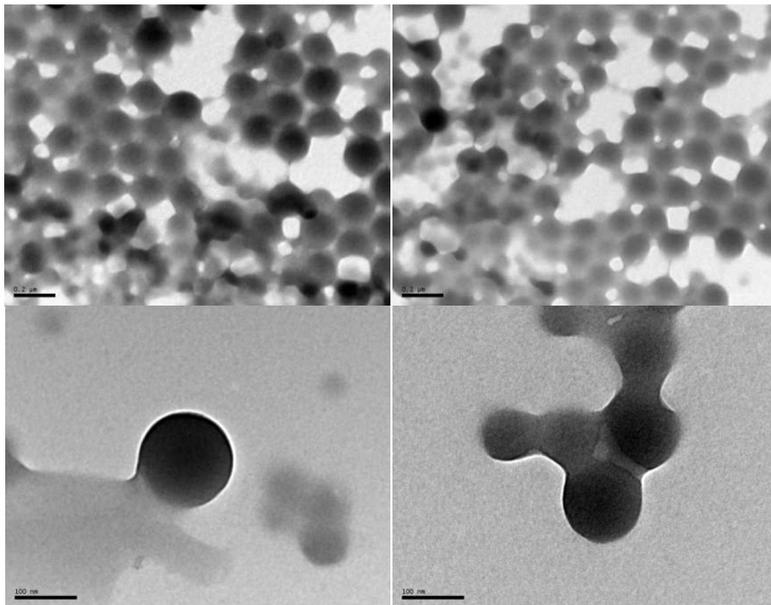
*n.d.: datos no disponibles*



**Figura 18. Distribución de diámetro por número obtenida por DLS de nanopartículas preparadas en presencia de diferentes cantidades de vitamina A y 2,50 g de zeína.**



**Figura 19. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína y 50  $\mu$ L de vitamina A en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 126 nm (TEM).**

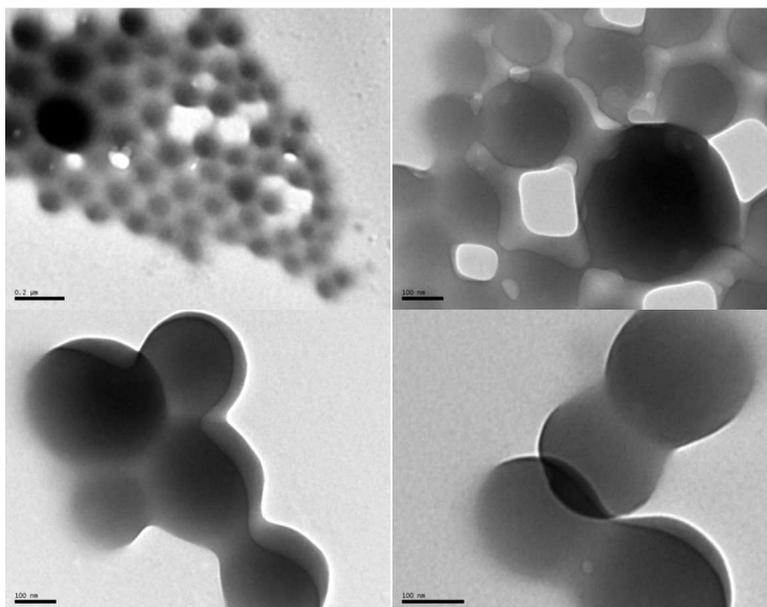


**Figura 20. Nanopartículas obtenidas con 2,50 g de zeína, caseinato sódico y 50  $\mu$ L de vitamina A en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 124 nm (TEM).**

Los factores que influyen mayormente en la formación de partículas coloidales son la concentración de zeína y de etanol en la mezcla. Altas concentraciones de etanol conducen a la formación de partículas más pequeñas, mientras que altas concentraciones de zeína dan lugar a partículas mayores (Patel y Velikov, 2014). Esto

es debido a que a bajas concentraciones de etanol, el límite de solubilidad de la zeína se alcanza en menos tiempo, y la zeína dispersa en gotas solidifica rápidamente, antes de que las gotas puedan dividirse en otras más pequeñas, dando lugar a la formación de partículas más grandes.

Al aumentar la cantidad de zeína de 2,50 g a 6,00 g se obtuvieron nanopartículas con una distribución de tamaño mayor (Figura 21).



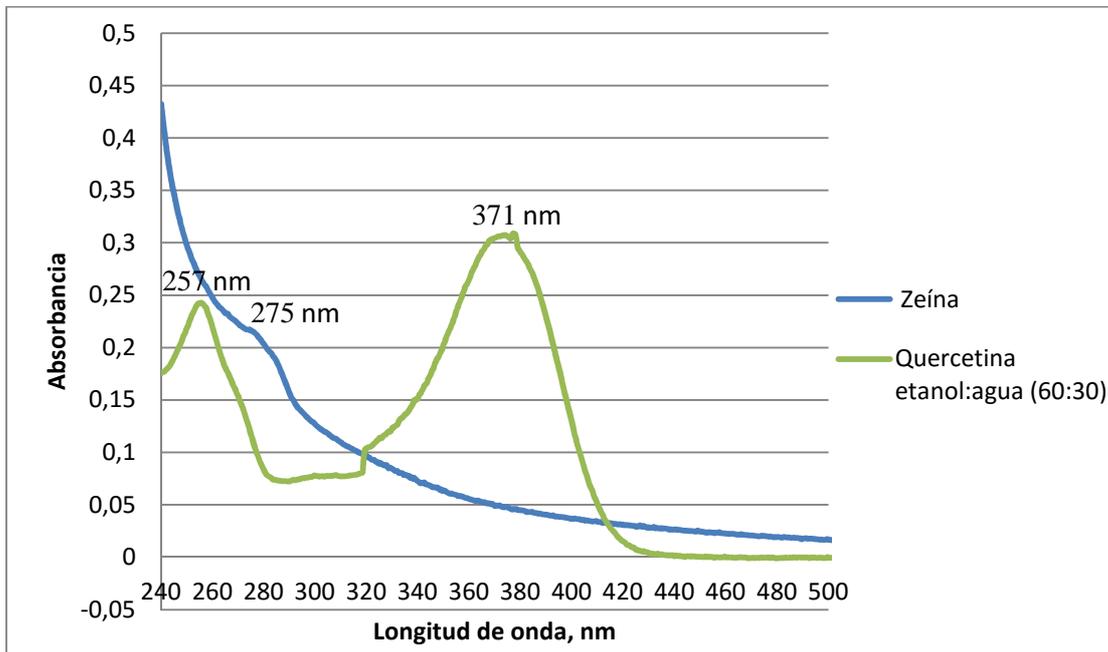
**Figura 21. Nanopartículas obtenidas con 6,00 g de zeína, caseinato sódico y 50  $\mu$ L de vitamina A en la mezcla de síntesis. Diámetro promedio de 136 nm (TEM).**

## **4.2. Caracterización espectroscópica.**

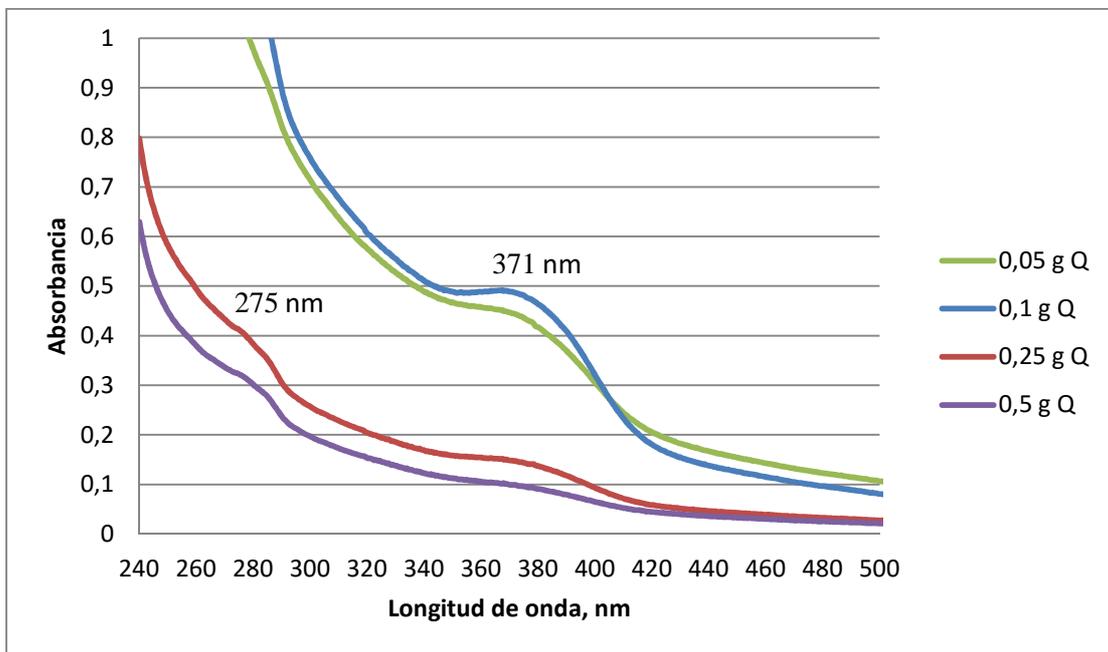
### **4.2.1. Nanopartículas de zeína con quercetina.**

Se obtuvo el espectro UV-vis de la quercetina en una mezcla etanol absoluto:agua (60:10 v/v) y de las nanopartículas de zeína (Figura 22) y se comparó con el de las nanopartículas cargadas con el antioxidante (Figura 23). La quercetina mostró dos bandas de absorción, una de ellas a 371 nm y otra a 257 nm, asociadas a la absorción de luz del sistema cinamoil (anillos B+C) y benzoil (anillos A+B) respectivamente (Patel et al. 2012). Las proteínas absorben una cantidad de luz considerable por debajo de 300 nm, por lo que solo se pueden comparar los cambios en la banda a 371

nm correspondiente a la quercetina en los espectros de absorción de las nanopartículas de zeína cargadas con la misma.



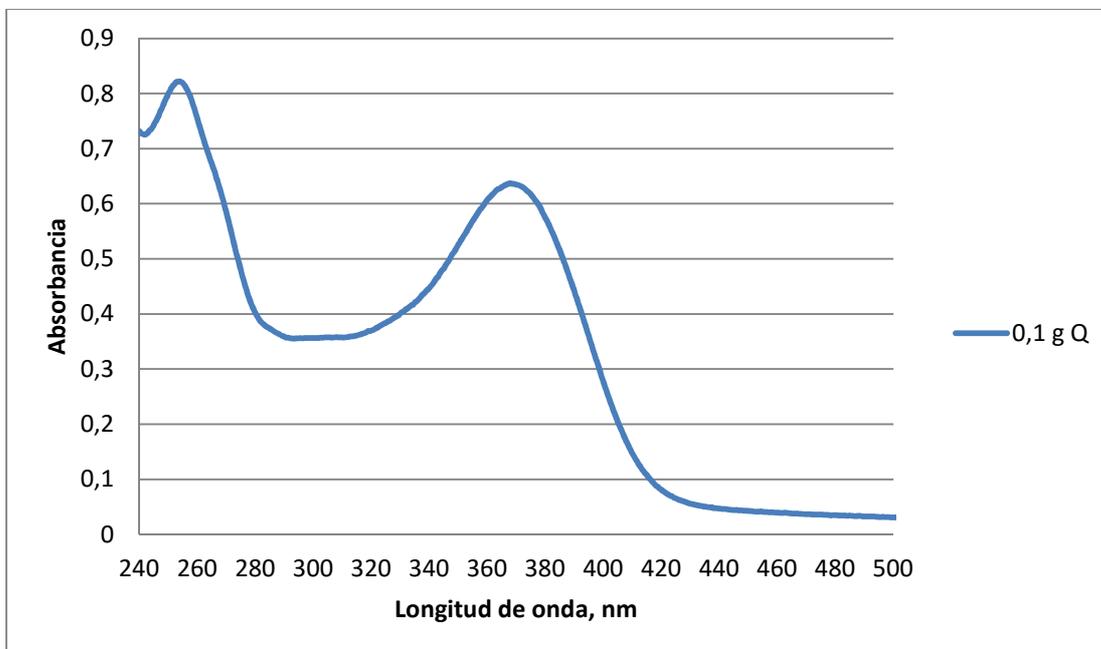
**Figura 22. Espectro visible-UV de quercetina y de nanopartículas de zeína libres.**



**Figura 23. Espectro visible-UV de nanopartículas de zeína con quercetina.**

La interacción de la quercetina con proteínas está documentada en la bibliografía ( Li et al., 2014; Patel et al., 2012; Rasoulzadeh et al., 2009) y explica el ensanchamiento de la banda espectral a 371 nm (Figura 23).

En el espectro del precipitado aparecen dos bandas a 257 nm y 271 nm correspondientes a la quercetina libre (Figura 24) y no se observa una contribución significativa de la banda correspondiente a la zeína, indicando que la quercetina precipitada está libre de proteína.

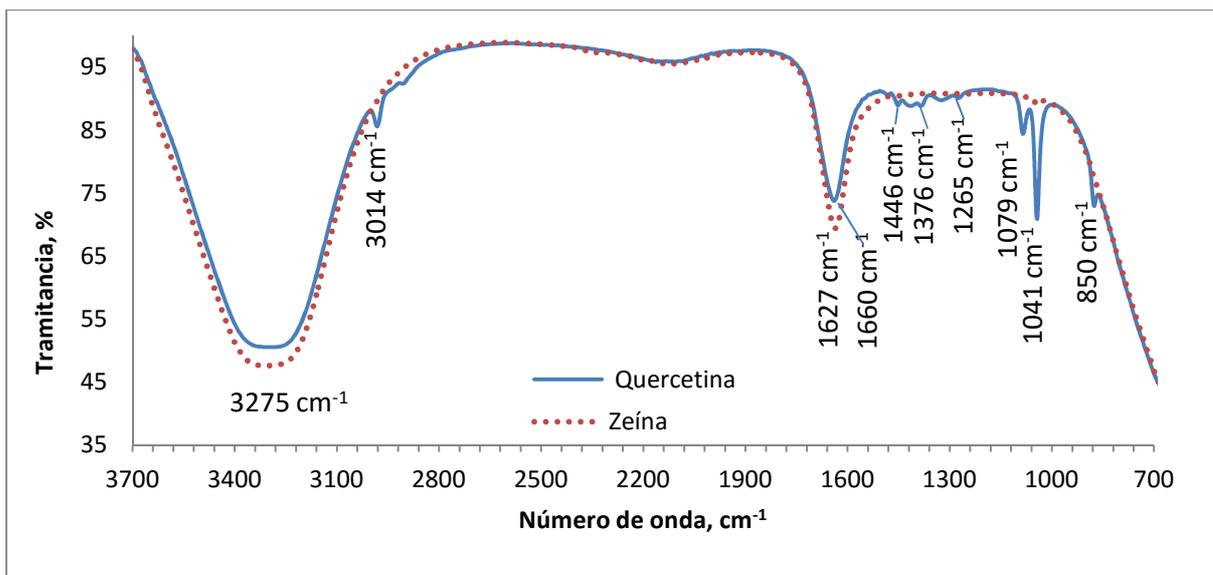


**Figura 24. Espectro visible-UV del precipitado de quercetina no encapsulada.**

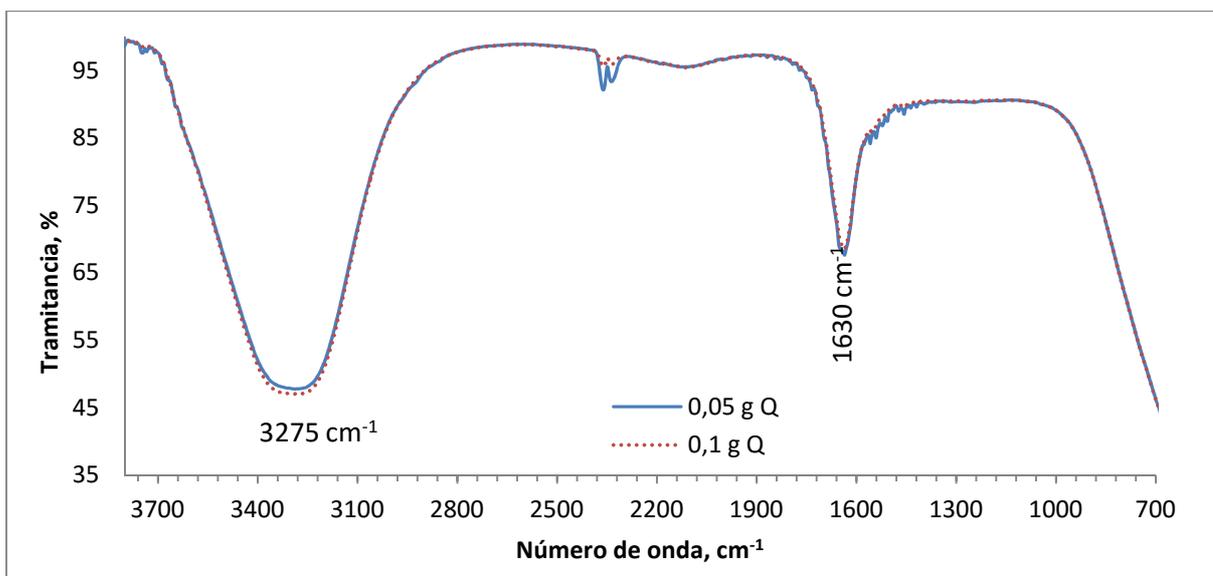
A continuación se muestran los espectros de absorción al infrarrojo de la quercetina disuelta en una mezcla de etanol absoluto:agua (60:40 v/v) y las nanopartículas de zeína libres por un lado (Figura 25) y de las nanopartículas de zeína cargadas con quercetina por otro (Figura 26). Las bandas características de la quercetina se corresponden con la flexión del C-O ( $1660\text{ cm}^{-1}$ ), flexión de grupos aromáticos entre  $1100$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$  ( $1446\text{ cm}^{-1}$ ), flexión del O-H fenólico entre  $1200$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  ( $1269\text{ cm}^{-1}$ ) y alargamiento del mismo ( $3275\text{ cm}^{-1}$ ) (Patel et al., 2012). Las bandas de la zeína se corresponden con la flexión del C-O a  $1627\text{ cm}^{-1}$  y alargamiento del O-H y N-H a  $3275\text{ cm}^{-1}$ . En la Tabla 8 se muestran las principales señales observadas en el espectro y su asignación al grupo funcional correspondiente, contrastadas con la bibliografía.

**Tabla 8. Principales señales espectrales FTIR para la quercetina y la zeína.**

| Frecuencia en la bibliografía, $\text{cm}^{-1}$<br>(Wu, Sun, Zhao, Li, y Zhou, 2008) | Frecuencia, $\text{cm}^{-1}$ | Tipo de señal  | Tipo de enlace   | Asignación                         |
|--|------------------------------|--|--|------------------------------------|
| 3335   | 3275                         | Alargamiento   | O-H y N-H  | Hidroxilos y aminas                |
| 2917   | 3014                         | Alargamiento asimétrico                                    | C-H  | Grupos $\text{CH}_2$ de saturación |
| 2849   | 2900                         | Alargamiento simétrico                                     | C-H  | Hidrocarburos                      |
| 1699   | 1660 y 1625                  | Vibración de flexión asimétrica                            | C-O  | Flavonoides y aminoácidos          |
| 1513   | -                            | Alargamiento   | Compuestos aromáticos                                  | Flavonoides y anillos aromáticos   |
| 1450   | 1446                         | Vibración de flexión                                       | C-H de grupos $\text{CH}_2$ y $\text{CH}_3$ aromáticos | Flavonoides y anillos aromáticos   |
| 1369   | 1376                         | Vibración de flexión                                       | C-H  | Grupo $\text{CH}_3$ de flavonoides |
| 1269   | 1265                         | Vibración de flexión (O-H) y de flexión asimétrica (C-CO)  | O-H y C-CO   | Flavonoides                        |
| 1088   | 1079                         | Vibración de alargamiento (C-C) y flexión (C-OH)           | C-C y C-OH   | Flavonoides y grupos alcohólicos   |
| 1043   | 1041                         | Alargamiento (-C-O-C), alargamiento (C-C) y flexión (C-OH) | C-O-C, C-C y C-OH                                      | Grupos alcohólicos                 |
| 881  | 850                          | Estiramiento simétrico                                     | C-C-O  | Grupos alcohólicos                 |



**Figura 25. Espectro FTIR de quercetina y nanopartículas de zeína libres.**

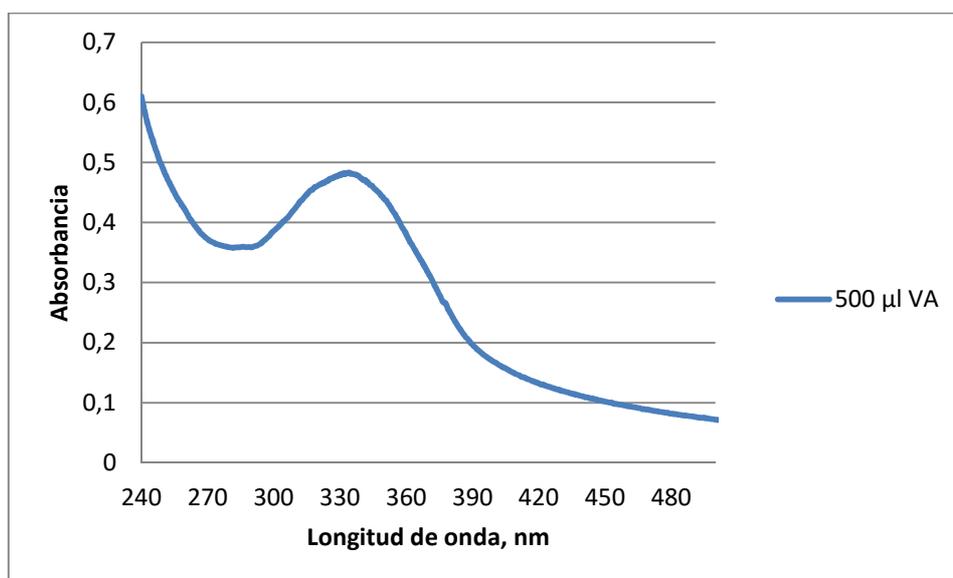


**Figura 26. Espectro FTIR de nanopartículas de zeína con quercetina.**

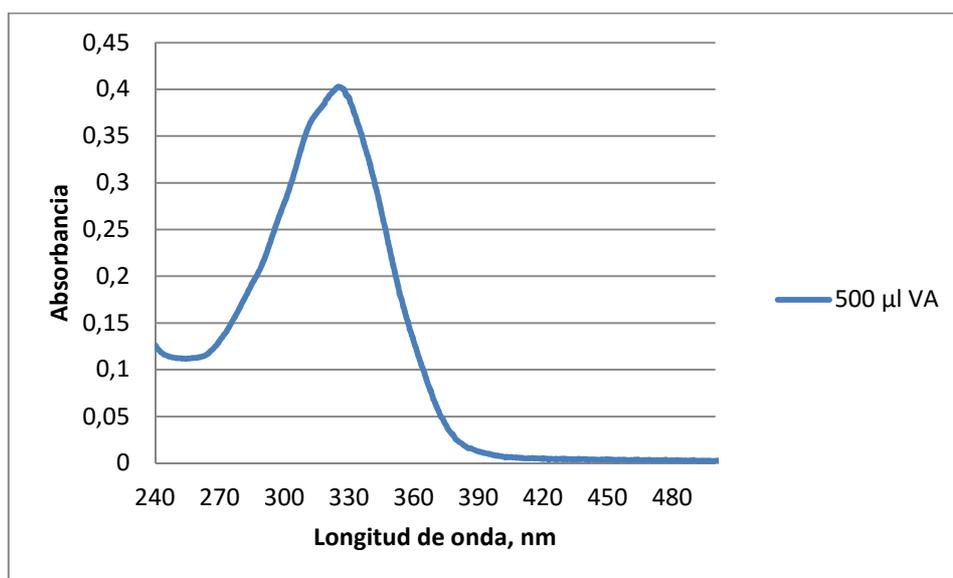
En la figura 26 desaparecieron las bandas espectrales de la quercetina a  $3014\text{ cm}^{-1}$  y  $1079\text{ cm}^{-1}$ , lo que puede ser indicativo que está encapsulada, dominando el espectro de la zeína. Las bandas a  $850\text{ cm}^{-1}$  y  $1041\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes al etanol, también desaparecieron en este espectro, dado que las nanopartículas se encuentran en medio acuoso.

#### 4.2.2. Nanopartículas de zeína con vitamina A.

La vitamina A muestra una banda de absorción a 326 nm en el espectro visible-UV (Figura 27). En el espectro de las nanopartículas se produce un ensanchamiento en esta banda (Figura 28), al igual que ocurría con la quercetina, lo que podría indicar interacción entre la vitamina A y la zeína.



**Figura 27. Espectro visible-UV de nanopartículas de zeína con vitamina A en solución acuosa.**



**Figura 28. Espectro visible-UV del precipitado de vitamina A no encapsulado.**

A continuación se muestran los espectros FTIR de la vitamina A palmitato disuelta en una mezcla de etanol absoluto: agua (90:10 v/v) y de las nanopartículas de zeína libres (Figura 29), así como de las nanopartículas de zeína cargadas con vitamina A (Figura 30). El espectro de la vitamina A palmitato presenta bandas de absorción a  $2800-3200\text{ cm}^{-1}$  debido al alargamiento del  $\text{CH}_3$ ,  $1648\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alargamiento del éster,  $1400-1500$  debido al alargamiento del ciclohexano aromático y  $1083\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alargamiento de C-O (Pezeshky, Ghanbarzadeh, y Hamishehkar, 2016).

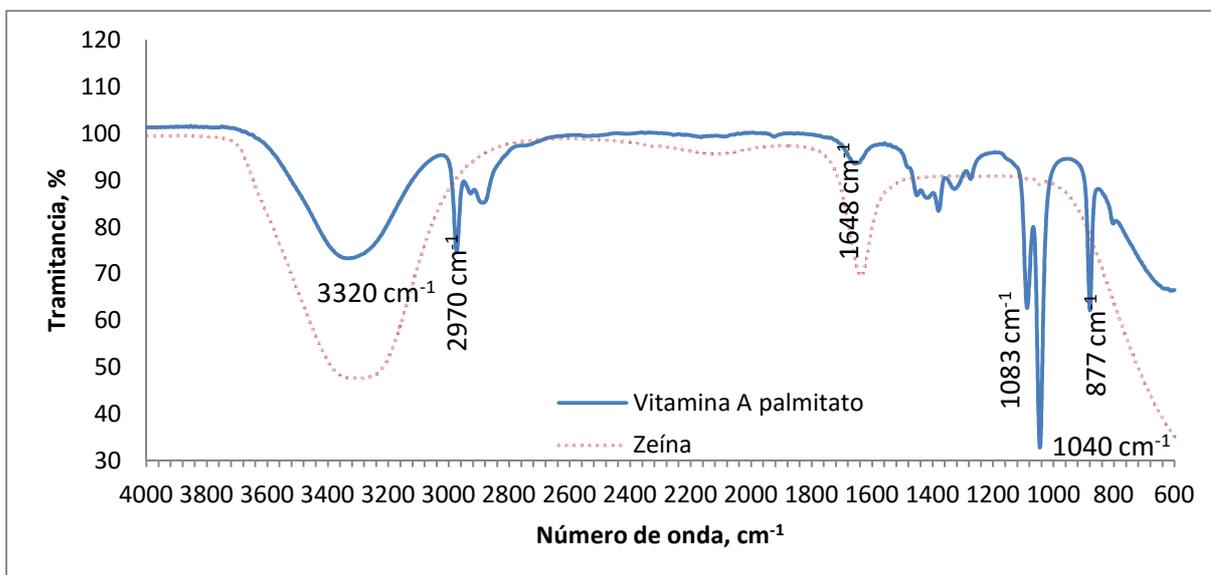
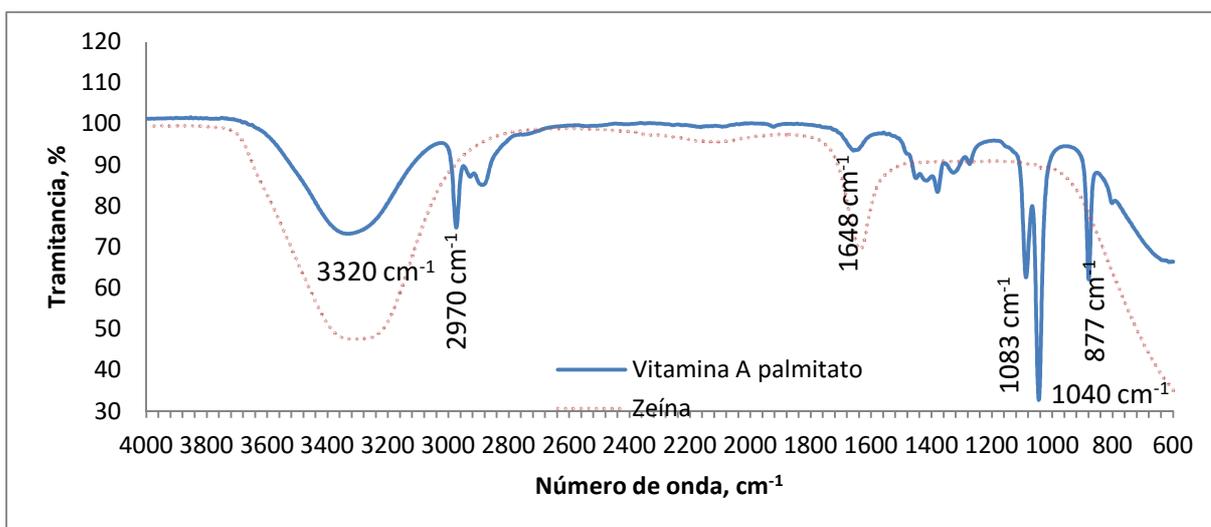
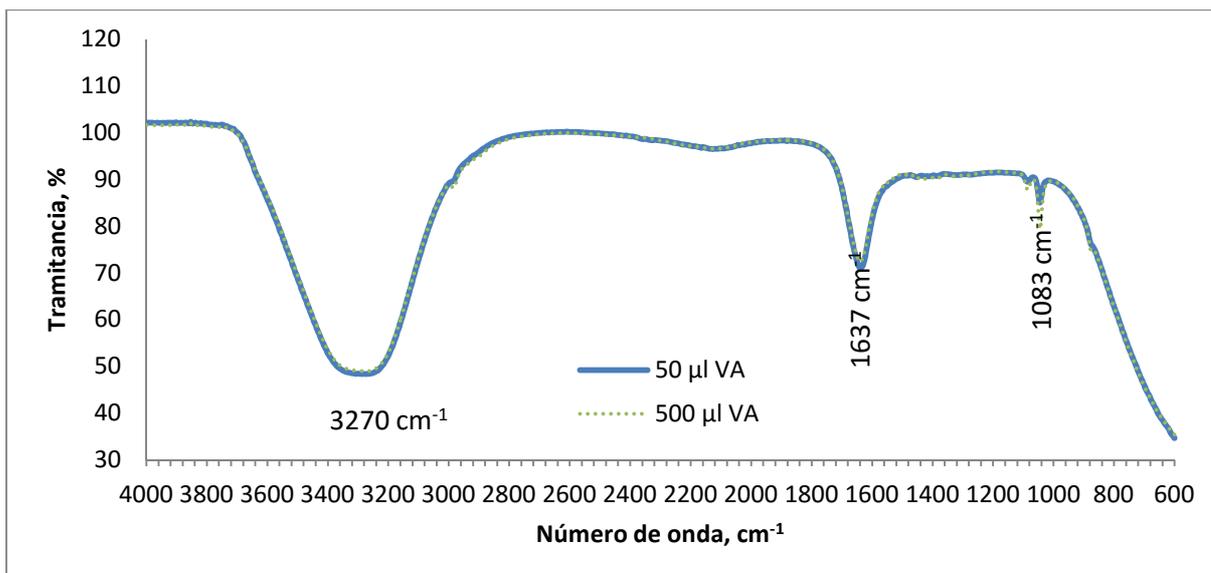


Figura 29. Espectro FTIR de vitamina A y nanopartículas de zeína libres.



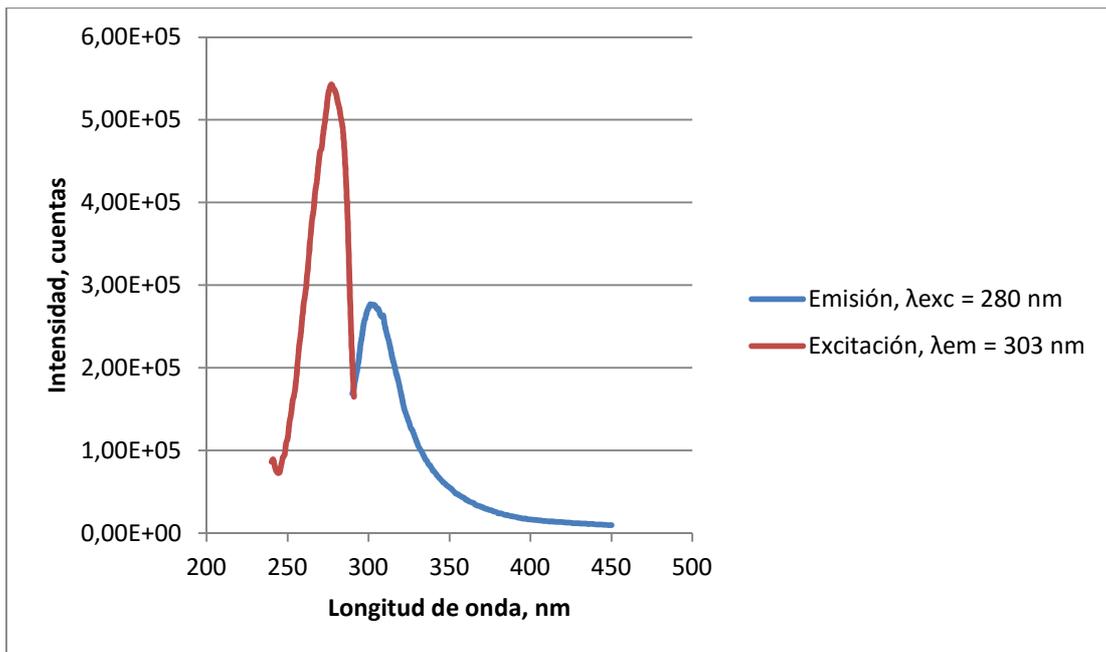
**Figura 30. Espectro FTIR de nanopartículas de zeína con vitamina A.**

Las bandas de la zeína se correspondían con la flexión del C-O a  $1627\text{ cm}^{-1}$  y alargamiento del O-H y N-H a  $3275\text{ cm}^{-1}$ . En la Figura 30 se observa que la intensidad de las bandas características de la vitamina A a  $2970\text{ cm}^{-1}$  y  $1083\text{ cm}^{-1}$  disminuye considerablemente, lo que también puede ser indicativo de que tuvo lugar la encapsulación.

### **4.3. Características luminiscentes de las nanopartículas.**

#### **4.3.1. Nanopartículas de zeína con quercetina.**

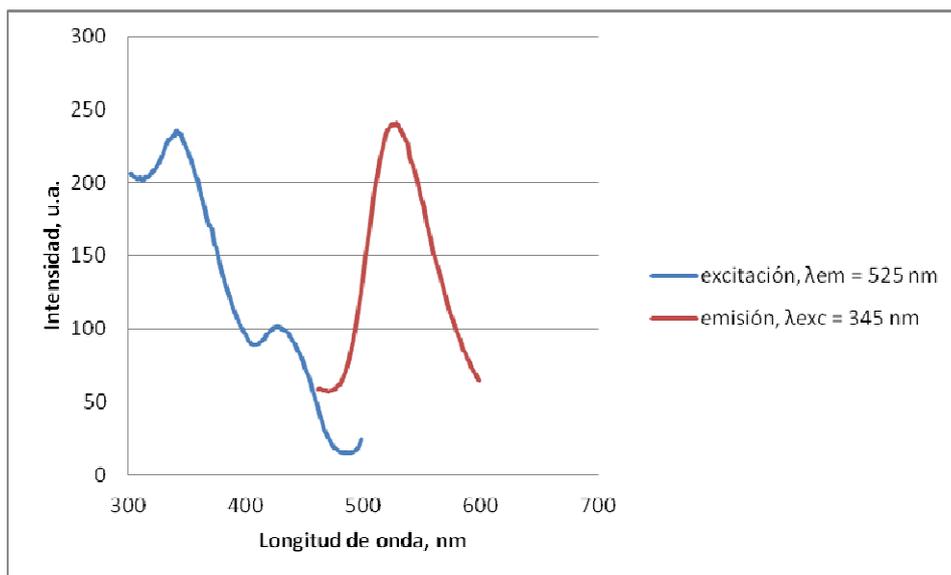
A continuación se muestran los espectros de emisión de las nanopartículas de zeína libres (Figura 31), de la quercetina (Figura 32) y de las nanopartículas con quercetina (Figuras 33 y 34).



**Figura 31. Espectros de excitación y emisión de nanopartículas de zeína libres.**

La zeína muestra un espectro de emisión a 304 nm cuando es excitada a 280 nm. La corta longitud de onda de emisión de la zeína se atribuye a su composición en aminoácidos. La zeína contiene una elevada cantidad de residuos de tirosina (5,0% p/p aproximadamente), que presenta un máximo de emisión de en torno a 304 nm (Joye et al. 2015).

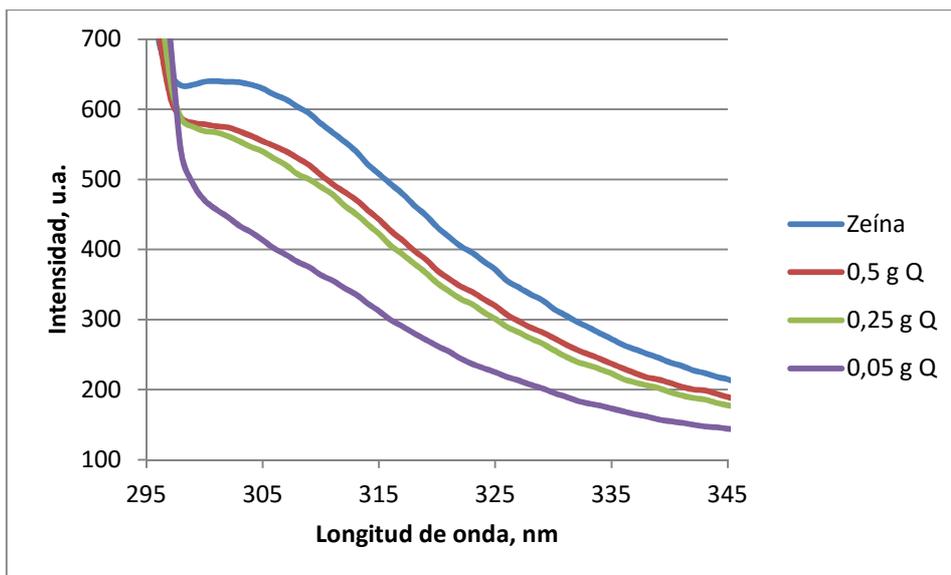
El espectro de emisión de la quercetina cambia de 570 nm cuando el disolvente es agua a 527 nm en etanol absoluto:agua (60:40 v/v) y 485 nm en etanol absoluto:agua (90:10 v/v), lo que indica que en disolventes menos polares tiene lugar un desplazamiento espectral hacia longitudes de onda más cortas (Joye et al. 2015).



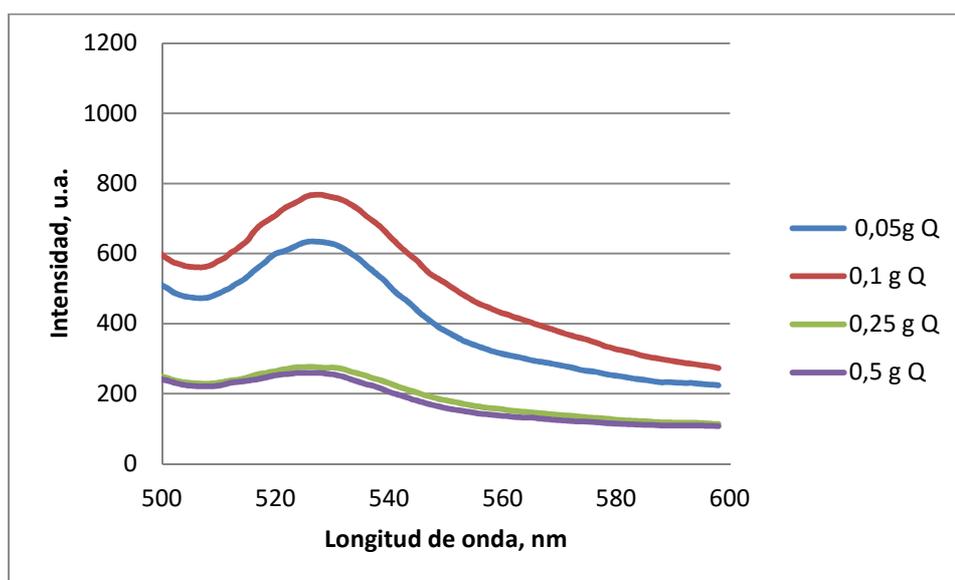
**Figura 32. Espectros de excitación y emisión de quercetina en una mezcla de etanol absoluto:agua (60:40 v/v).**

El término quenching de fluorescencia hace referencia a la disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por un fluorocromo, como la proteína, debido a distintas interacciones moleculares posibles como reordenamientos moleculares, transferencia de energía, colisiones moleculares o formación de un nuevo complejo molecular. Permite obtener información sobre el tipo de interacción que tiene lugar entre proteínas y otras moléculas ya que produce cambios en la fluorescencia intrínseca de las mismas (Joye et al. 2015; Sun et al. 2015). En la bibliografía se ha reportado este fenómeno en nanopartículas de zeína. En el estudio de Joye et al. (2015) la fluorescencia de la zeína se redujo gradualmente con el aumento de la concentración de quercetina encapsulada. Lo mismo ocurrió en el trabajo de Sun et al. (2015) al encapsular resveratrol en nanopartículas de zeína y de gliadina, sugiriendo que el resveratrol interactuó con la zeína mediante puentes de hidrógeno y con la gliadina mediante interacciones hidrofóbicas.

Se comprobó que la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas de zeína disminuye al aumentar la concentración de quercetina encapsulada (Figura 33), dado que las nanopartículas que contenían 0,05 g y 0,10 g de quercetina en la fase orgánica fueron las que presentaron mayor eficiencia de encapsulación.



**Figura 33. Espectros de emisión de nanopartículas de zeína y nanopartículas de zeína cargadas con quercetina ( $\lambda_{exc} = 280$  nm).**



**Figura 34. Espectro de emisión de las nanopartículas con quercetina ( $\lambda_{exc} = 385$  nm).**

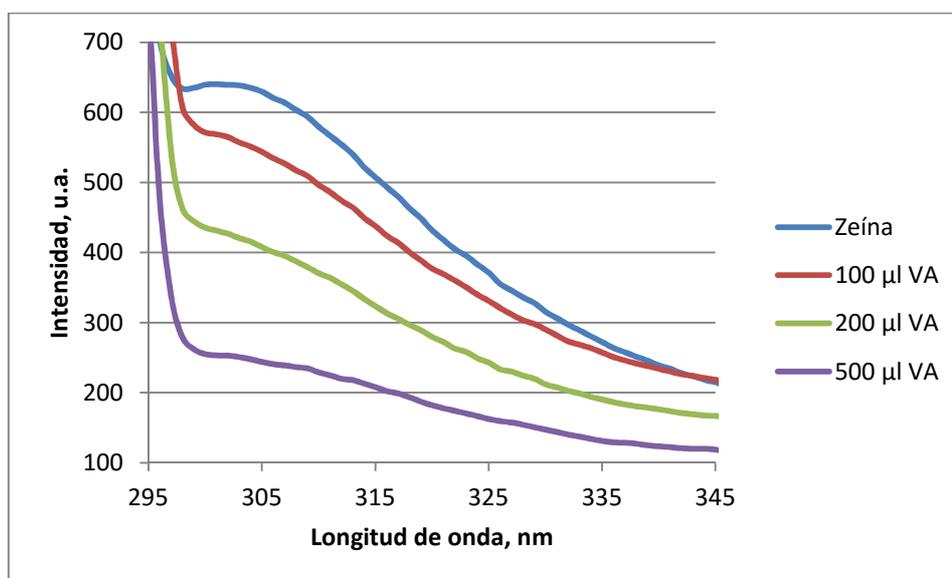
Las nanopartículas de zeína cargadas con quercetina presentan un máximo de emisión a 525 nm para una longitud de onda de excitación de 385 nm (Figura 34).

#### 4.3.2. Nanopartículas de zeína con vitamina A.

Al igual que ocurre con la quercetina, la intensidad de fluorescencia de la zeína disminuye al aumentar la concentración de vitamina A encapsulada (Figura 35), lo

que es indicativo de la existencia de algún tipo de interacción entre la vitamina A y la zeína.

La vitamina A palmitato presenta un máximo de emisión a 480 nm cuando es excitada a 400 nm y las nanopartículas cargadas con vitamina A, a 485 nm cuando son excitadas a 415 nm.



**Figura 35. Espectros de emisión de nanopartículas de zeína y nanopartículas de zeína cargadas con vitamina A ( $\lambda_{exc} = 280$  nm).**

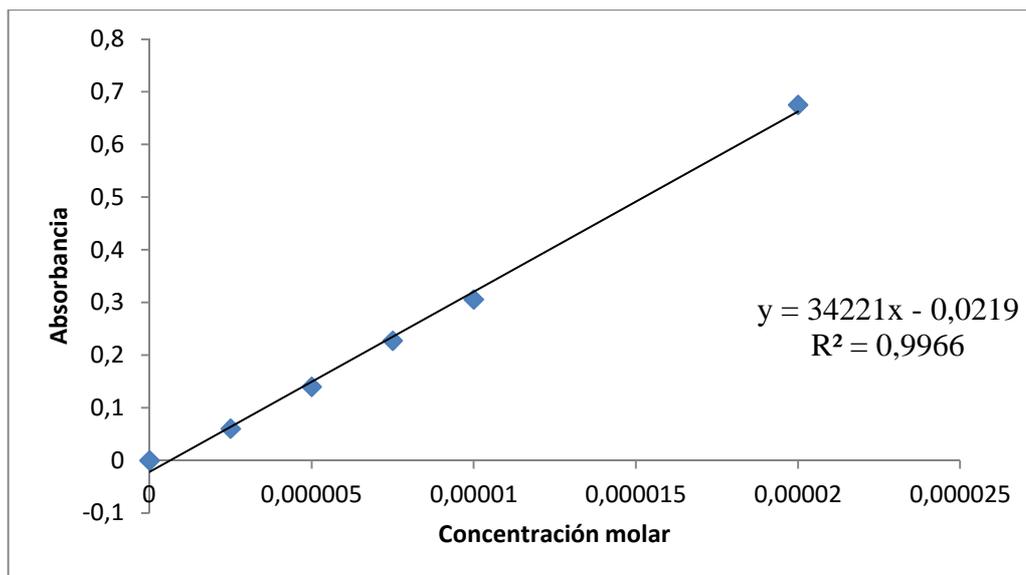
#### **4.4. Determinación de la eficiencia de encapsulación.**

Se cuantificó la concentración de los compuestos encapsulados tras eliminar la quercetina y la vitamina A no encapsulados de las dispersiones mediante centrifugación. Se siguió el siguiente procedimiento: se centrifugaron 20 mL de cada una de las dispersiones y a continuación se separó el sobrenadante del precipitado. De cada uno de los sobrenadantes de esta primera centrifugación, donde se tienen las nanopartículas en medio acuoso, se tomaron 10 mL. Este volumen se sometió a una segunda centrifugación para precipitar las nanopartículas. Los precipitados de nanopartículas se disolvieron posteriormente en 10 mL de una mezcla de etanol absoluto y agua (60:40 v/v para las de quercetina y 90:10 v/v para las de vitamina A) y se realizó la cuantificación por espectrometría visible-UV tras diluir cada muestra adecuadamente. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

#### **4.4.1. Nanopartículas con quercetina.**

Con objeto de determinar la concentración de quercetina presente en el interior de las nanopartículas, se realizó un calibrado de quercetina en una mezcla de etanol absoluto: agua (60:40 v/v) (Figura 36) y las nanopartículas precipitadas por centrifugación tras eliminar la quercetina libre se disolvieron en 10 mL de una mezcla de etanol absoluto y agua (también en una relación 60:40 v/v), liberando la quercetina de las mismas. Tras una dilución apropiada de cada muestra (Tabla 9), se obtuvo su espectro visible-UV (Figura 37). A partir del calibrado y el valor máximo de absorbancia de la quercetina (a 371 nm) (Tabla 9) se determinó la concentración de quercetina encapsulada, teniendo en cuenta la dilución hecha para cada dispersión. En la Tabla 9 se muestran los gramos encapsulados en cada muestra y la eficiencia de encapsulación, expresada como el porcentaje de la relación entre la concentración de quercetina encapsulada y la concentración de quercetina total (libre y encapsulada) en la dispersión. Para determinar la concentración de quercetina total en la dispersión es necesario conocer el volumen de cada dispersión, por lo que al finalizar la síntesis, tras eliminar parte del disolvente mediante rotavapor de cada dispersión, se midió su volumen (Tabla 9). Se realizó el mismo procedimiento para las nanopartículas de zeína y caseinato sódico con adición inicial de 0,05 g y 0,50 g de quercetina. En la Figura 38 se muestran los espectros de absorción visible-UV de las muestras correspondientes a las nanopartículas de zeína y caseinato sódico con 0,05 g y 0,50 g de quercetina en la mezcla de síntesis y su eficiencia de encapsulación se muestra en la Tabla 10.

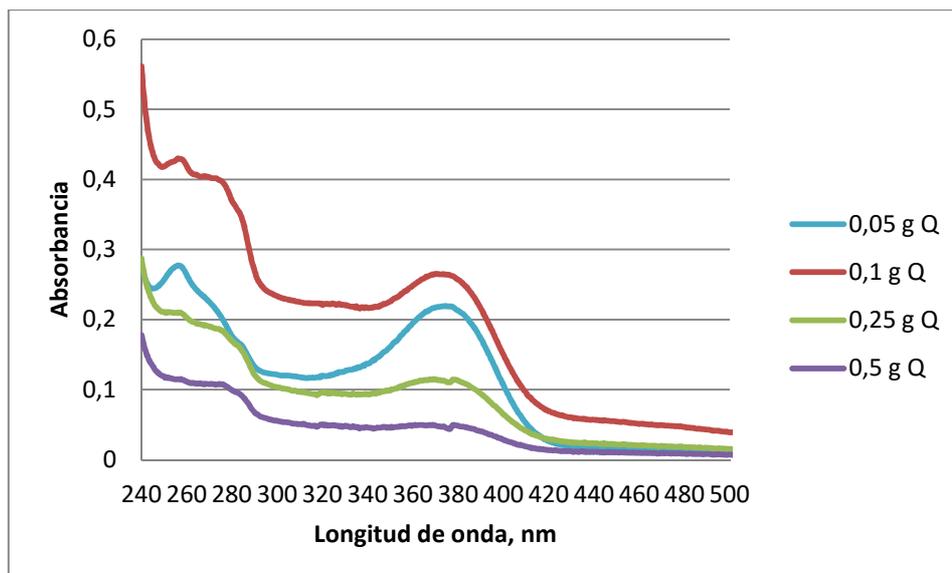
Las dispersiones que contenían inicialmente 0,05 g y 0,10 g de quercetina (sin caseinato sódico) fueron las que presentaron respectivamente mayor eficiencia de encapsulación (ver Tabla 9). Las nanopartículas de la dispersión con 0,10 g de quercetina fueron las que mayor cantidad de quercetina encapsularon (0,0263 g) y se deduce que bajo estas condiciones de síntesis las nanopartículas no son capaces de retener cantidades superiores.



**Figura 36. Recta de calibrado para la quercetina.**

**Tabla 9. Eficiencia de encapsulación de quercetina en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína).**

| Muestra                                 | 0,05 g Q   | 0,10 g Q   | 0,25 g Q   | 0,50 g Q   |
|---|------------|------------|------------|------------|
| Dilución                                | 1:30       | 1:30       | 1:30       | 1:30       |
| Absorbancia                             | 0,2182     | 0,2646     | 0,1137     | 0,0724     |
| Concentración de la muestra diluida (M) | 7,0149E-06 | 8,3724E-06 | 3,9631E-06 | 2,7568E-06 |
| Volumen de dispersión (L)               | 0,25       | 0,30       | 0,30       | 0,30       |
| Concentración inicial en dispersión (M) | 5,9172E-04 | 9,8619E-04 | 2,4655E-03 | 4,9310E-03 |
| Concentración encapsulada (M)           | 2,1746E-04 | 2,5954E-04 | 1,2286E-04 | 8,5462E-05 |
| Gramos encapsulados                     | 0,0184     | 0,0263     | 0,0125     | 0,0087     |
| Eficiencia de encapsulación (%)         | <b>37</b>  | <b>26</b>  | <b>5</b>   | <b>2</b>   |

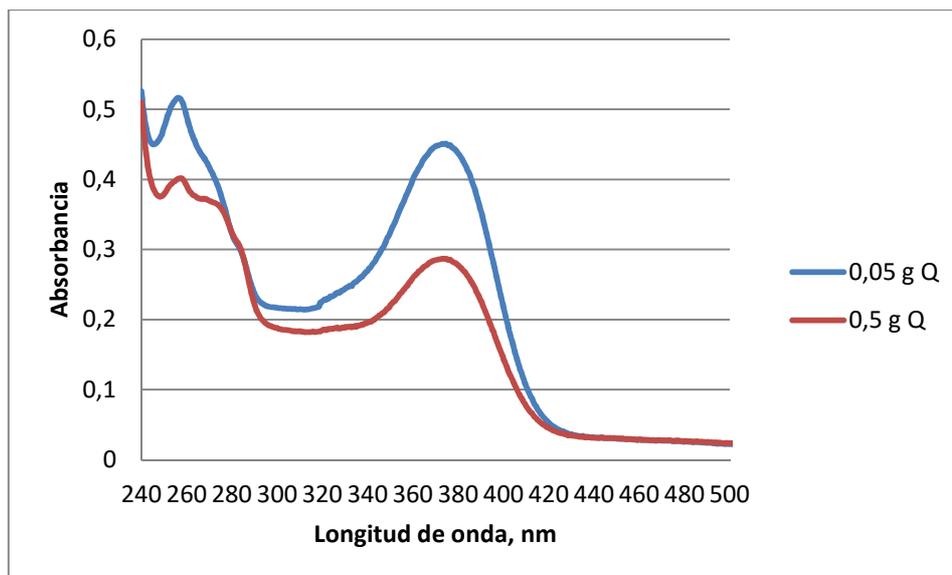


**Figura 37. Espectros de absorción visible-UV de quercetina en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína).**

Al añadir caseinato sódico a la fase acuosa como estabilizante se reduce la eficiencia de encapsulación, que pasa del 37 % al 31 % para la dispersión con 0,05 g de quercetina y del 2 % al 1 % para la dispersión con 0,50 g (ver tabla 10).

**Tabla 10. Eficiencia de encapsulación de quercetina en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p)**

| Muestra                                    | 0,05 g Q   | 0,50 g Q   |
|--|------------|------------|
| Dilución                                   | 1:10       | 1:6        |
| Absorbancia                                | 0,4482     | 0,2854     |
| Concentración de la muestra diluida (M)    | 1,3737E-05 | 8,9808E-06 |
| Volumen de dispersión (L)                  | 0,30       | 0,20       |
| Concentración inicial en la dispersión (M) | 4,9310E-04 | 7,3964E-03 |
| Concentración encapsulada (M)              | 1,5111E-04 | 6,2866E-05 |
| Gramos encapsulados                        | 0,0153     | 0,0042     |
| Eficiencia de encapsulación (%)            | <b>31</b>  | <b>1</b>   |

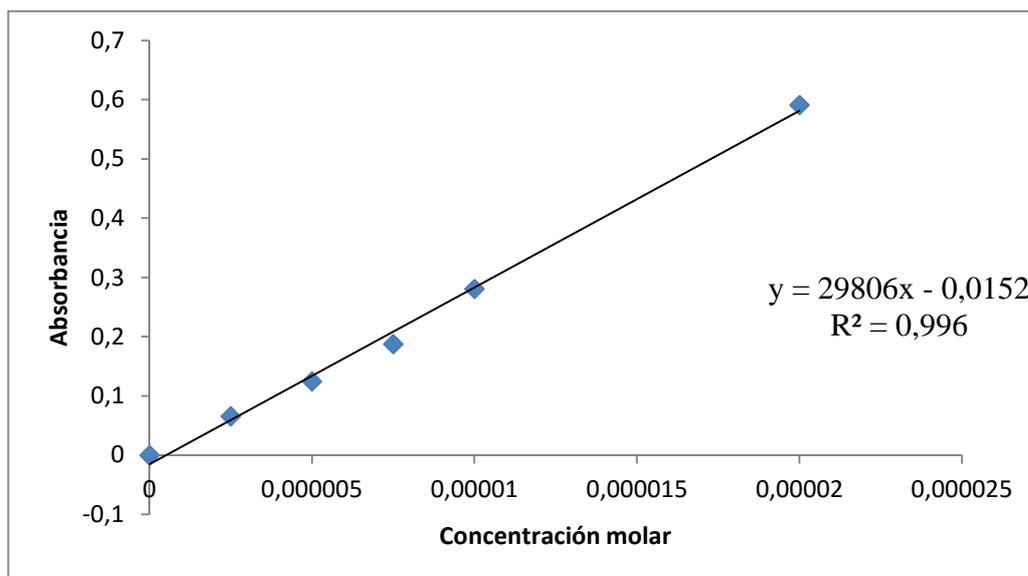


**Figura 38. Espectros de absorción visible-UV de quercetina en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p)**

#### 4.4.2. Nanopartículas con vitamina A.

Para determinar la concentración de vitamina A encapsulada en las nanopartículas, se realizó un calibrado de vitamina A palmitato en una mezcla de etanol absoluto: agua (90:10 v/v) (Figura 39). Las nanopartículas precipitadas por centrifugación tras eliminar la vitamina A libre se disolvieron en 10 mL de una mezcla de etanol absoluto y agua con la misma concentración que el calibrado (90:10 v/v). Se obtuvo el espectro visible-UV de cada muestra (Figura 40), tras hacer las diluciones apropiadas (Tabla 11). A partir del calibrado y el valor máximo de absorbancia de la vitamina A (a 326 nm) (Tabla 11) se determinó la concentración de vitamina A encapsulada, teniendo en cuenta la dilución hecha para cada dispersión. En la Tabla 11 se muestran la concentración encapsulada en cada muestra y la eficiencia de encapsulación, expresada como el porcentaje de la relación entre la concentración de vitamina A encapsulada y la concentración total de vitamina A en la dispersión. Se realizó el mismo procedimiento para las nanopartículas de zeína y caseinato sódico con adición inicial de 50  $\mu$ L y 500  $\mu$ L de vitamina A. En la Figura 41 se muestran los espectros de absorción visible-UV de las muestras correspondientes a las nanopartículas de zeína y caseinato sódico con 50  $\mu$ L y 500  $\mu$ L de vitamina A en la mezcla de síntesis y su eficiencia de encapsulación se muestra en la Tabla 12.

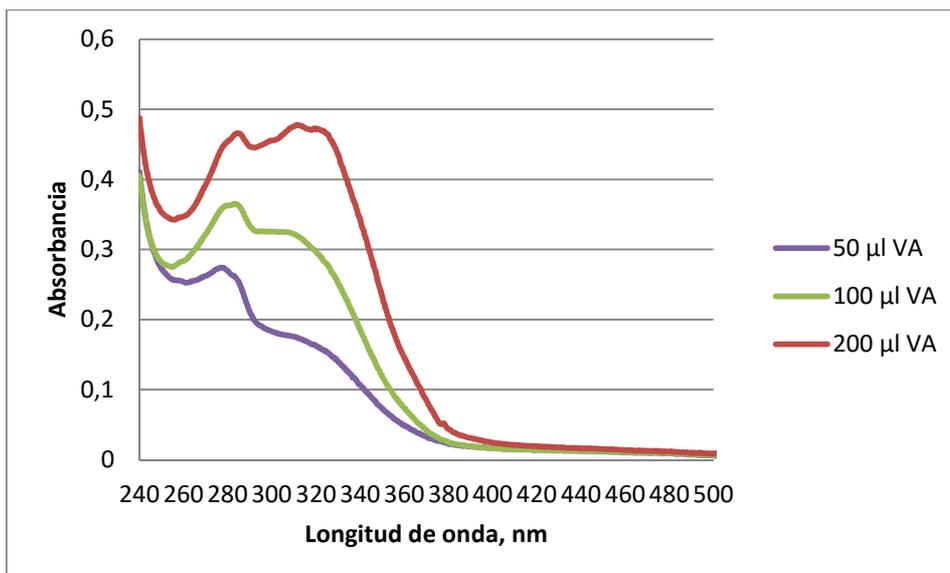
Al contrario que con las nanopartículas cargadas con quercetina, se produjo un aumento de la concentración encapsulada conforme se aumentó la concentración inicial de vitamina A en la fase orgánica, aunque en términos de eficiencia se produce una disminución desde el 44 % para la dispersión con 50  $\mu\text{L}$  de vitamina hasta el 36 % para la dispersión con 500  $\mu\text{L}$  (ver Tabla 11). Asimismo, con el uso de caseinato sódico aumenta ligeramente la eficiencia de encapsulación, hasta un 45 % para la dispersión con 50  $\mu\text{L}$  y hasta un 38 % para la dispersión con 500  $\mu\text{L}$  (ver Tabla 12).



**Figura 39. Recta de calibrado para la vitamina A palmitato.**

**Tabla 11. Eficiencia de encapsulación de vitamina A en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína).**

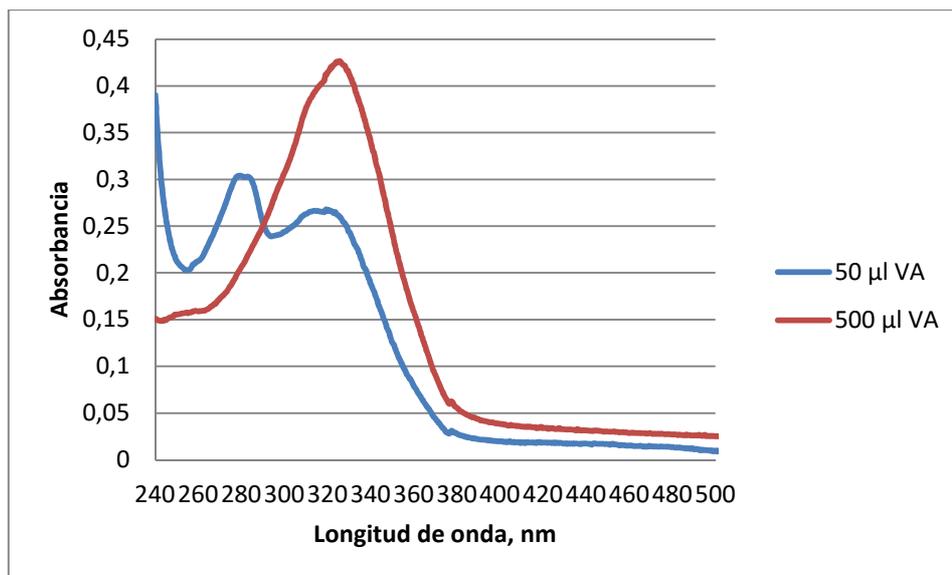
| Muestra                                    | 50 $\mu\text{L}$ | 100 $\mu\text{L}$ | 200 $\mu\text{L}$ | 500 $\mu\text{L}$ |
|--|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Dilución                                   | 1:30             | 1:30              | 1:30              | 1:60              |
| Absorbancia                                | 0,1509           | 0,2743            | 0,4570            | 0,5206            |
| Concentración (M)                          | 5,5673E-06       | 9,7056E-06        | 1,5835E-05        | 1,7970E-05        |
| Volumen de dispersión (L)                  | 0,22             | 0,25              | 0,24              | 0,28              |
| Concentración inicial en la dispersión (M) | 3,8968E-04       | 6,8584E-04        | 1,4288E-03        | 3,0618E-03        |
| Concentración encapsulada (M)              | 1,7259E-04       | 3,0087E-04        | 4,9089E-04        | 1,0962E-03        |
| Volumen encapsulado ( $\mu\text{L}$ )      | 22               | 44                | 69                | 179               |
| Eficiencia de encapsulación (%)            | 44               | 44                | 34                | 36                |



**Figura 40. Espectros de absorción visible-UV de vitamina A en nanopartículas de zeína (2,50 g de zeína).**

**Tabla 12. Eficiencia de encapsulación de vitamina A en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p).**

| Muestra                                 | 50 µL      | 500 µL     |
|---|------------|------------|
| Dilución                                | 2:30       | 1:100      |
| Absorbancia                             | 0,2591     | 0,4260     |
| Concentración de la muestra diluida (M) | 9,2034E-06 | 1,4794E-05 |
| Volumen de dispersión (L)               | 0,26       | 0,22       |
| Concentración inicial en dispersión (M) | 3,2973E-04 | 3,8968E-03 |
| Concentración encapsulada (M)           | 1,4726E-04 | 1,4942E-03 |
| Volumen encapsulado (µL)                | 22         | 192        |
| Eficiencia de encapsulación (%)         | <b>45</b>  | <b>38</b>  |

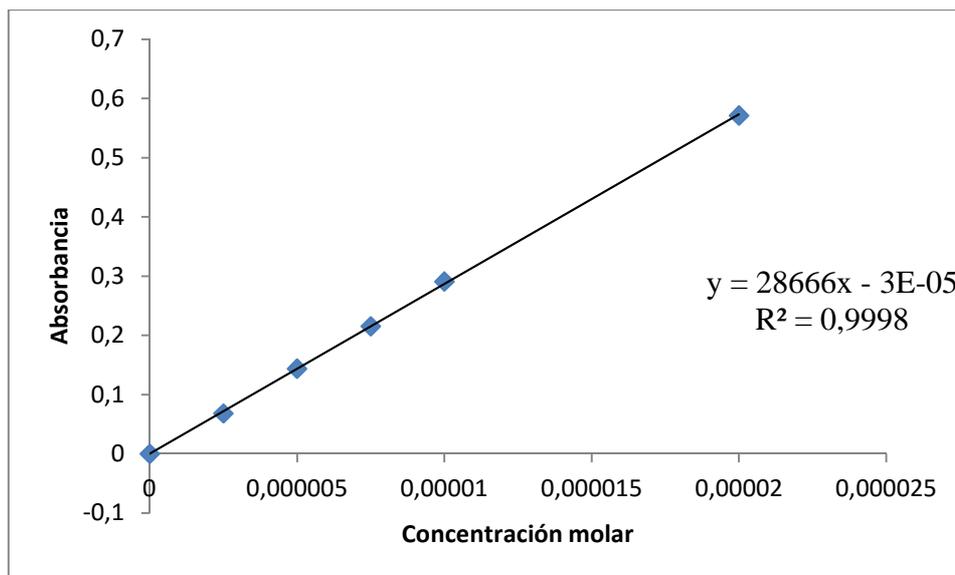


**Figura 41. Espectros de absorción visible-UV de vitamina A en nanopartículas de zeína y caseinato sódico (2,50 g de zeína; caseinato sódico en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p).**

#### **4.4.3. Nanopartículas con cantidades crecientes de zeína cargadas con vitamina A.**

Para cuantificar la vitamina A encapsulada en las nanopartículas obtenidas con distintas cantidades de zeína y caseinato sódico en la mezcla de síntesis, empleando 50 µL de vitamina A, se realizó un nuevo calibrado de vitamina A en una mezcla de etanol absoluto: agua (90:10 v/v) (Figura 42). Las nanopartículas precipitadas se disolvieron en 10 mL de una mezcla de etanol absoluto y agua con la misma concentración (90:10 v/v). Como en los casos anteriores, tras una dilución apropiada de cada muestra (Tabla 13), se obtuvo su espectro visible-UV (Figura 43) y a partir del calibrado y el valor máximo de absorbancia de la vitamina A (a 326 nm) (Tabla 13) se determinó la concentración de vitamina A encapsulada. En la Tabla 13 se muestra la concentración encapsulada en cada muestra y la eficiencia de encapsulación, expresada como el porcentaje de la relación entre la concentración de vitamina A encapsulada y la concentración total de vitamina A en la dispersión.

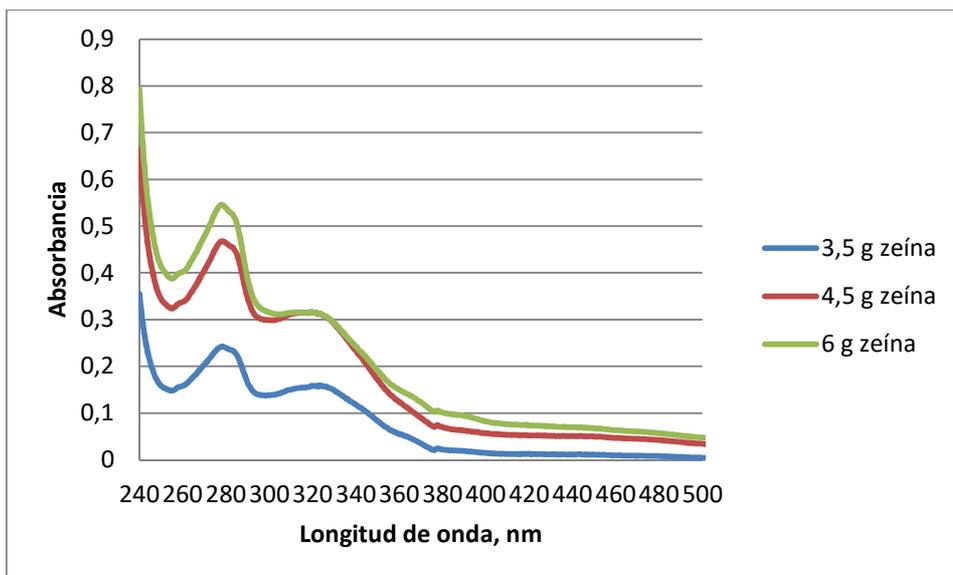
Al aumentar la cantidad de zeína en la fase orgánica hasta 6,00 g, con 50 µl de vitamina A y caseinato sódico en la fase acuosa en una relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p, se consigue una eficiencia de encapsulación del 85 % (ver tabla 13).



**Figura 42. Recta de calibrado para la vitamina A palmitato.**

**Tabla 13. Eficiencia de encapsulación de vitamina A (50 µl) en nanopartículas con cantidades crecientes de zeína y caseinato sódico (relación zeína:caseinato de 1:0,30 p/p).**

| Muestra                                 | 2,50 g zeína | 3,50 g zeína | 4,50 g zeína | 6,00 g zeína |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Dilución                                | 2:30         | 1:30         | 1:30         | 1:30         |
| Absorbancia                             | 0,2591       | 0,1561       | 0,3070       | 0,3068       |
| Concentración de la muestra diluida (M) | 9,2034E-06   | 5,4473E-06   | 1,0711E-05   | 1,0703E-05   |
| Volumen de dispersión (l)               | 0,26         | 0,25         | 0,20         | 0,22         |
| Concentración inicial en dispersión (M) | 3,2973E-04   | 3,4292E-04   | 4,2865E-04   | 3,8968E-04   |
| Concentración encapsulada (M)           | 1,4726E-04   | 1,6887E-04   | 3,3205E-04   | 3,3179E-04   |
| Volumen encapsulado (µL)                | 22           | 25           | 39           | 43           |
| Eficiencia de encapsulación (%)         | 45           | 49           | 77           | 85           |



**Figura 43. Espectros de absorción visible-UV de vitamina A (50 µl) en nanopartículas con cantidades crecientes de zeína y caseinato sódico (relación zeína:caseinato de 1:0,30).**

## 5. CONCLUSIONES.

---

1. Se sintetizaron con éxito nanocápsulas de zeína capaces de contener en su interior antioxidantes como la quercetina y la vitamina A palmitato.
2. La eficiencia de la encapsulación de los antioxidantes depende de la concentración inicial de los mismos en la mezcla de síntesis. En presencia de 0,05 g iniciales de quercetina, la eficiencia de la encapsulación resultó ser del 37 %. En el caso de la vitamina A palmitato, la eficiencia de la encapsulación para 50 µL de la misma fue del 44 %.
3. Con el aumento de la concentración de zeína y la adición de caseinato sódico como estabilizante de las nanocápsulas se obtiene una mejora en la eficiencia de encapsulación de la vitamina A, pasando del 44 % al 85 %.
4. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten augurar un potencial interesante de las nanopartículas de zeína como vehículos para la introducción de diferentes tipos de moléculas de interés nutricional o protector en alimentos, tanto por la eficiencia de encapsulación como por sus características de material GRAS.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

---

- Ahmed, J. , Dutta, D., y Nashiruddullah, N. (2016). Comparative efficacy of antioxidant retinol , melatonin , and zinc during in vitro maturation of bovine oocytes under induced heat stress. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40, 365–373.
- Chen, H., y Zhong, Q. (2014a). Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 358–366.
- Chen, H., y Zhong, Q. (2014b). Processes improving the dispersibility of spray-dried zein nanoparticles using sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 358–366.
- Chen, J., Zheng, J., McClements, D. J., y Xiao, H. (2014). Tangeretin-loaded protein nanoparticles fabricated from zein/ $\beta$ -lactoglobulin: Preparation, characterization, and functional performance. *Food Chemistry*, 158, 466–472.
- Dan, N. (2016). Transport and release in nano-carriers for food applications. *Journal of Food Engineering*, 175, 136–144.
- Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R., y Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food : From field to plate. *Food Research International*, 69, 381–400.
- Decker, E. (2009). Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(7), 2969–2976.
- EFSA Scientific Committee (2011). Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*, 9, 1–36.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., y Gonçalves, A. (2016). Microencapsulation of vitamin A : a review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 76–87.
- Fang, Z. (2010). Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523.
- Feng, Y., y Lee, Y. (2016). Food Hydrocolloids Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 56, 292–302.
- Halake, K., Birajdar, M., y Lee, J. (2016). Structural implications of polyphenolic

- antioxidants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 35, 1–7.
- Hu, K., Huang, X., Gao, Y., Huang, X., Xiao, H., y McClements, D. J. (2015). Core-Shell Biopolymer Nanoparticle Delivery Systems: Synthesis and Characterization of Curcumin Fortified Zein-Pectin Nanoparticles. *Food Chemistry*, 182, 275–281.
- Jin, L., Yan, S., Shi, B., Bao, H., Gong, J., Guo, X., y Li, J. (2014). Effects of vitamin A on the milk performance , antioxidant functions and immune functions of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 192, 15–23.
- Joye, I. J., Davidov-pardo, G., Ludescher, R. D., y Mcclements, D. J. (2015). Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin : Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. *Food Chemistry*, 185, 261–267.
- Joye, I. J., y Julian, D. (2013). Production of nanoparticles by anti- solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 34(2), 109–123.
- Katouzian, I., y Mahdi, S. (2016). Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 53, 34–48.
- Kiokias, S., y Varzakas, T. (2014). Activity of flavonoids and b -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. *Food Chemistry*, 150, 280–286.
- Li, Z., Jiang, H., Xu, C., y Gu, L. (2014). A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals. *Food Hydrocolloids*, 43, 153–164.
- Livney, Y. D. (2015). Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. *Current Opinion in Food Science*, 3, 125–135.
- Matalanis, A., Jones, O. G., y McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865–1880.
- Paliwal, R., y Palakurthi, S. (2014). Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 189, 108–22.

- Patel, A. R., y Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *Food Science and Technology*, 44(9), 1958–1964.
- Patel, A. R., Heussen, P. C. M., Hazekamp, J., Drost, E., y Velikov, K. P. (2012). Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry*, 133(2), 423–429.
- Patel, A. R., y Velikov, K. P. (2014). Zein as a source of functional colloidal nano- and microstructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 450–458.
- Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., y Hamishehkar, H. (2016). Food Bioscience Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food Bioscience*, 13, 49–55.
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M. D. A., y Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *Food Science and Technology*, 44(9), 1880–1887.
- Rasoulzadeh, F., Nadjarpour, H., Naseri, A., y Rashidi, M. (2009). Molecular and Biomolecular Spectroscopy Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase. *Spectrochimica Acta Part A*, 72, 190–193.
- Rim, K., Ahn, K., Park, J., Eun, K., Jeon, H., y Lee, J. (2011). Biochemical and Biophysical Research Communications Lyophilization and enhanced stability of fluorescent protein nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(2), 225–229.
- Saberi, A. H., y McClements, D. J. (2015). Fabrication of protein nanoparticles and microparticles within water domains formed in surfactant–oil–water mixtures: Phase inversion temperature method. *Food Hydrocolloids*, 51, 441–448.
- Sağlam, D., Venema, P., van der Linden, E., y de Vries, R. (2014). Design, properties, and applications of protein micro- and nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(5), 428–437.
- Shin, G. H., Kim, J. T., y Park, H. J. (2015). Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 144–157.

- Shukla, R., y Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13(3), 171–192.
- Sosa-herrera, M. G., Martínez-padilla, L. P., Delgado-reyes, V. A., y Torres-robledo, A. (2016). Effect of agave fructans on bulk and surface properties of sodium caseinate in aqueous media. *Food Hydrocolloids*, 60, 199–205.
- Sun, C., Liu, F., Yang, J., Yang, W., Yuan, F., y Gao, Y. (2015). Physical , structural, thermal and morphological characteristics of zein-quercetagenin composite colloidal nanoparticles. *Industrial Crops & Products*, 77, 476–483.
- Teixeira, Z., Dreiss, C. A., Lawrence, M. J., Heenan, R. K., Machado, D., Justo, G. Z., ... Durán, N. (2012). Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives. *Journal of Colloid And Interface Science*, 382(1), 36–47.
- Uematsu, S., Uematsu, K., Lavers, J. L., y Congdon, B. C. (2014). Reduced vitamin A ( retinol ) levels indicate radionuclide exposure in Streaked Shearwaters ( *Calonectris leucomelas* ) following the 2011 Fukushima nuclear accident. *Ecological Indicators*, 43, 244–251.
- Vilanova, N., y Solans, C. (2015). Vitamin A Palmitate –  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Characterization , protection and emulsification properties. *Food Chemistry*, 175, 529–535.
- Wu, Y., Sun, S., Zhao, J., Li, Y., y Zhou, Q. (2008). Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 884, 48–54.
- Zhang, Y., Niu, Y., Luo, Y., Ge, M., Yang, T., Yu, L., y Wang, Q. (2014). Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymolloaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. *Food Chemistry*, 142, 269–275.
- Zou, T., Li, Z., Percival, S. S., Bonard, S., y Gu, L. (2012). Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 293–300.