UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

"DESARROLLO DE NANOESTRUCTURAS DE BETALACTOGLOBULINA PARA LA ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS"

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

ARKAITZ CARRASCAL PANADERO

JULIO, 2017

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

PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Antonio Augusto Vicente (Universidad de Minho)

CERTIFICA:

Que D. **Arkaitz Carrascal Panadero** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Braga, a 14 de julio de 2017

D. Antonio Augusto Vicente

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi orientador, el profesor Antonio Vicente, toda su ayuda a lo largo de estos dos meses y medio de trabajo. Con su tranquilidad, consejos y cariño ha sido un pilar básico durante mi estancia en Braga. El respeto y admiración que siento hacia su persona son infinitos. Gracias de corazón.

Quiero agradecer también la ayuda recibida por parte del Doctor Oscar Ramos. Con su conocimiento, sus palabras de amigo y su positividad ha sido el impulso que necesitaba en muchos momentos de este trabajo. No tengo más que buenas palabras hacia él.

Me gustaría agradecer también la ayuda recibida por parte de Lívia Simões en el día a día de este proyecto. Las horas que hemos pasado juntos en el laboratorio han sido fundamentales para llevar este trabajo a buen puerto. Su profesionalidad y constancia le deparan un gran futuro en el campo de la investigación.

No me gustaría olvidarme de toda la gente perteneciente al grupo de investigación. Gracias a ellos los días en el laboratorio han sido más llevaderos y divertidos. Son un grupo de personas excelente y les deseo lo mejor a todos y cada uno de ellos.

Me gustaría mencionar también la excelente labor de Manuel Rendueles como coordinador del máster de Biotecnología Alimentaria y agradecerle su cercanía, su paciencia y su predisposición para resolver cualquier problema presentado.

Quiero también dar las gracias de manera especial a Ana por todo el amor y cariño que me ha demostrado a lo largo de estos meses. Ha sido mi confidente y el bastón en el que apoyarme durante los momentos menos buenos. Muchas gracias por haber estado ahí.

En último lugar me gustaría dar el mayor de los agradecimientos a mis padres y mi hermano por dármelo todo en esta vida. Sin su apoyo y su cariño no hubiese conseguido superar todas las dificultades que han ido surgiendo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS 2
ÍNDICE 3
RESUMEN 5
ABSTRACT 6
LISTA DE SÍMBOLOS 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABLAS 11
CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN 12
CAPÍTULO 2- CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES 17
2.1-NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA 18
2.1.1 SISTEMAS DE TRANSPORTE Y LIBERACIÓN CONTROLADA 19
2.1.2 OTRAS APLICACIONES 23
2.2 PROTEINAS 25
2.3-PROTEÍNAS DEL SUERO 27
2.4-BETA-LACTOGLOBULINA 29
2.5-COMPUESTOS BIOACTIVOS, VITAMINAS Y RIBOFLAVINA 32
2.5.1-COMPUESTOS BIOACTIVOS 32
2.5.2-VITAMINAS 32
2.5.3-RIBOFLAVINA 33
CAPÍTULO 3- METODOLOGÍA UTILIZADA 35
3.1- MATERIALES 36
3.2- DESARROLLO DE LAS NANOESTRUCTURAS 36
3.2.1- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE PROTEÍNA 36
3.2.2- TRATAMIENTO TÉRMICO DE LA β-LG 36
3.2.3- ADICIÓN DE LA RIBOFLAVINA 37
3.2.4- EFICIENCIA DE ASOCIACIÓN 37
3.2.4- CAPACIDAD DE CARGA 38
3.2.5-ENSAYO DE ESTABILIDAD FRENTE A LA LUZ 39
3.3- CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS 39
3.3.1- DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA 39
3.3.2- ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA 41
3.3.3-ANÁLISIS ESTADÍSTICO 42

CAPÍTULO 4- RESULTADOS EXPERIMENTALES 43
4.1-IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FABRICACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS 44
4.2- EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE RIBOFLAVINA 49
4.3- TESTS DE ENCAPSULACIÓN 51
4.4- EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA RIBOFLAVINA 53
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO 55
5.1-CONCLUSIONES 56
5.2-TRABAJO FUTURO 57
BIBLIOGRAFÍA 58

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de nanoestructuras producidas a partir de β-Lactoglobulina para la posterior encapsulación y liberación controlada de riboflavina (vitamina B_2). Estos nanosistemas se consiguieron fabricar gracias a las propiedades gelificantes que posee la β-Lg, seleccionando para ello diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempos de calentamiento y concentraciones de proteína iniciales. Las nanoestructuras se caracterizaron en términos de tamaño medio, índice de polidispersidad (PDI), potencial zeta y eficiencia de asociación y capacidad de carga de la riboflavina. El tamaño medio de las nanoestructuras formadas fue de 77.69 ± 5.92 nm para muestras sin riboflavina y 81,81 ± 7,72 nm con la riboflavina encapsulada, presentando un PDI de 0.182 ± 0.003 y 0,261 ± 0,005 respectivamente. Los nanosistemas mostraron una eficiencia de asociación del 75,54 ± 0,54% y una capacidad de carga del 5.84 ± 0.10%. Por último se realizó un ensayo de estabilidad frente a la luz para ver como afectaba a la estabilidad de las nanoestructuras fabricadas.

ABSTRACT

The purpose of this proyect is to develop nanostructures produced from β-Lactoglobulin for the subsequent encapsulation and controlled release of riboflavin (vitamin B2). These nanosystems were able to be produced thanks to the gelling properties of β-Lg by selecting different pH conditions, temperatures, heating times and initial protein concentrations. The nanostructures were characterized in terms of mean size, polydispersity index (PDI), zeta potential and riboflavin association efficiency and loading capacity. The average size of the nanostructures formed was 77.69 ± 5.92 nm for samples without riboflavin and 81.81 ± 7.72 nm with encapsulated riboflavin, presenting a PDI of 0.182 ± 0.003 and 0.261 ± 0.005 respectively. Nanosystems showed an association efficiency of 75.54 ± 0.54% and a loading capacity of 5.84 ± 0.10%. Finally, a light stability test was performed to see how it affected the stability of the produced nanostructures.

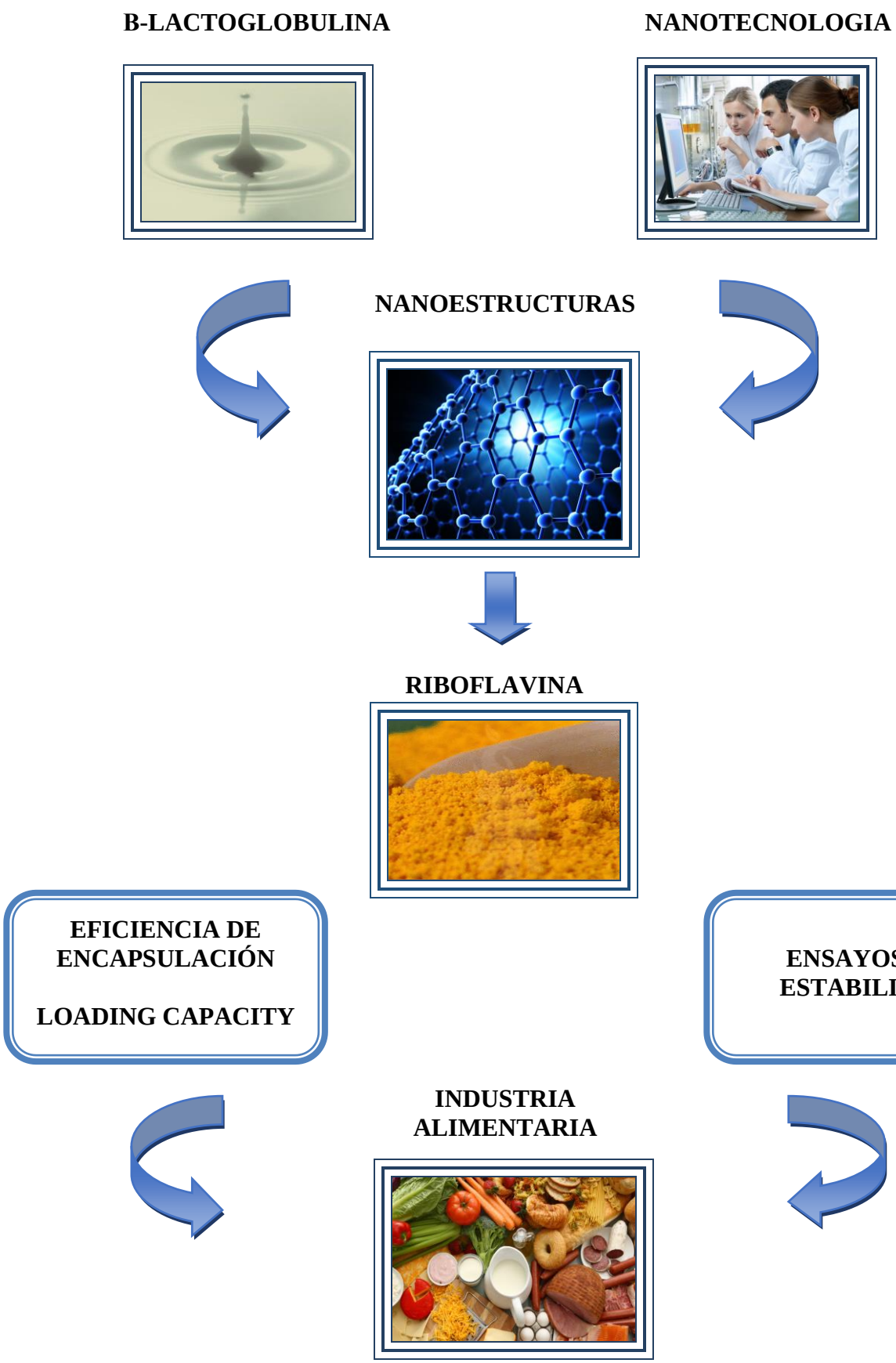

Figura 1: Representación esquemática del trabajo realizado

LISTA DE SÍMBOLOS

- α-La: Alfa-lactalbumina

- β-LG: Beta-lactoglobulina

-ADN: Ácido Dexosirribonucléico

-AE: Eficacia de asociación

-AF: Alimentos funcionales

-BSA: Albúmina del suero bovino

-DLS: Dynamic Light Scattering

-FAD: Flavín adenín dinucleótido

-FMN: Flavín mononucleótido.

-GRAS: Generally Recognized as Safe.

-IG: Inmunoglobulina

-LC: Capacidad de carga o Loading Capacity

-NT: Nutracéuticos

-PDI: Índice de polidispersidad

-pI: Punto isoeléctrico

-WPC: Concentrado de proteína del suero

-WPI: Aislado de proteína del suero

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del trabajo realizado……...……7

Figura 2.1: Representación escala nanométrica……..…..…….18

Figura 2.2: Métodos para la formación de nanocápsulas……...20

Figura 2.3: Representación esquemática de la producción de un nanohidrogel por gelificación a través de la Tª y adición de sal Ca^{2+}……..…22

Figura 2.4: Representación esquemática de la formación de un enlace peptídico…….….25

Figura 2.5: Representación de las estructuras secundarias α-hélice y lámina-β en proteínas…….…..26

Figura 2.6: Representación de de un monómero de β-Lg ….……30

Figura 2.7: Representación de la estructura de la riboflavina……33

Figura 3.1: Imagen de la instrumentación utilizada para la medición del tamaño de partícula, PDI y carga……..40

Figura 4.1: Histograma correspondiente a las nanoestructuras obtenidas a 80 ºC, 15 min de calentamiento y 0,5% de proteína inicial, a pH 6……...45

Figura 4.2: Histograma correspondiente a los oligómeros obtenidos a 70 ºC, 15 min de calentamiento y 1,0% de proteína inicial, a pH 6……..……47

Figura 4.3: Tamaño de partícula (columnas) y PDI (línea) frente a las distintas concentraciones de riboflavina testadas (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL). Nota: Los valores dentro de la gráfica con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$)……..49

Figura 4.4: Soluciones de β-Lg tras haber sido calentadas y añadidas las diversas concentraciones de riboflavina (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL)……50

Figura 4.5: Eficiencia de asociación (columnas) y capacidad de carga (línea) frente a las distintas concentraciones de riboflavina testadas (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL)…….51

Figura 4.6: Comportamiento de la riboflavina bajo las distintas condiciones de tratamiento frente al tiempo…….53

Figura 4.7: Respresentación del % de riboflavina protegida…….54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1- Aplicaciones prometedoras en nanotecnología para industrias alimentarias.....24

Tabla 2- Composición de las principales proteínas del suero bovino, concentración relativa, peso molecular (PM), punto isoeléctrico (PI), temperatura de desnaturalización y número de residuos aminoácidos……..…28

Tabla 3- Resumen del ensayo realizado a pH 6 para la producción de nanoestructuras. Con la temperatura a la que se realizó el ensayo, concentraciones de β-Lg utilizadas, tiempos de calentamiento y resultados de tamaño y PDI obtenidos…….…….46

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

Vivimos lo que actualmente se denomina una "transición epidemiológica", ya que nuestras causas de enfermedad y mortalidad comienzan a ser diferentes de aquellas que nos aquejaban hace treinta o cincuenta años atrás. Enfermedades como las patologías infecciosas, las enfermedades neonatales y la desnutrición, entre otras, están en franco retroceso para dar paso a un aumento de los problemas de salud íntimamente ligados a los hábitos alimentarios como son los accidentes cardiovasculares, el cáncer, la obesidad, la arterioesclerosis y los problemas hepáticos (Valenzuela, Valenzuela, Sanhueza, & Morales, 2014).

Todo esto, sumado al interés del consumidor por una alimentación saludable (producido precisamente por el incremento de la incidencia de estas enfermedades) y a la evidencia científica de que cierto tipo de alimentos tienen efectos positivos sobre la salud y el bienestar, ha motivado el desarrollo de los llamados alimentos funcionales (AF) y de los nutracéuticos (NT) en varios países del mundo, principalmente en aquellos de mayor desarrollo económico (Pinheiro, Ângelo, & Augusto, 2013).

Se consideran AF aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado científicamente que afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporcionan un mejor estado de salud y bienestar. Estos alimentos, además, ejercen un papel preventivo ya que reducen los factores de riesgo que provocan la aparición de enfermedades. NT es un concepto más complejo, ya que no se trata de alimentos pero sí de componentes de estos que se pueden consumir en mayores concentraciones que las habituales. Tampoco son medicamentos ya que no se les atribuye propiedades terapéuticas pero sí potencialmente preventivas (Serra & Aranceta, 2002).

Como ya se ha mencionado, el consumidor exige, cada vez más, nuevos y mejores productos alimenticios capaces de combinar características organolépticas únicas con características funcionales que puedan traer una mejora de su salud y garantizando al mismo tiempo su seguridad.

Con el objetivo de responder a estos desafíos, la industria alimentaria ha hecho un esfuerzo para poner a disposición alimentos que, además de su función vital, puedan tener un aspecto funcional. Una de estas estrategias pasa por la incorporación de compuestos bioactivos en los alimentos a lo largo de su proceso de producción (Pinheiro et al., 2013).

Una sustancia bioactiva se define como cualquier componente de los alimentos que influye en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos y que además reporta un efecto beneficioso para la salud (Azcona, 2013). La curcumina, el resveratrol, el retinol, la quercitina, el β-caroteno y minerales como el hierro y el calcio son solo algunos ejemplos de los cientos de compuestos activos presentes en nuestra dieta.
Sin embargo, estas tecnologías y procesos utilizados por la industria alimentaria para la incorporación de estos compuestos bioactivos no resultan del todo eficaces. A menudo presentan problemas relacionados con la solubilidad, la degradación, la agregación y la interacción con las distintas matrices alimentarias, que hacen que el efecto funcional de las sustancias bioactivas se reduzca e incluso se pierda antes de llegar al consumidor (Pinheiro et al., 2013).

Es aquí donde entra en juego la nanotecnología, una vez que esta área ha sido presentada en los últimos años como una de las soluciones a muchos de estos problemas. A grandes rasgos, la nanotecnología engloba la producción, la caracterización y la utilización de sistemas a escala nano. Estos sistemas, a través de las propiedades exclusivas debidas a su forma y tamaño, ofrecen un universo de nuevas posibilidades para la industria alimentaria y es por eso que, recientemente ha habido un gran interés en el comportamiento de los nanosistemas como vehículos para la incorporación, protección, transporte y liberación controlada de compuestos bioactivos (Acosta, 2009; Sekhon, 2010).
En esta línea, una de las principales aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria pasa por desarrollar sistemas de liberación de compuestos bioactivos a nanoescala, que debido a su tamaño nanométrico puedan mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad y los aspectos sensoriales de estos compuestos, permitiendo a su vez un control en su liberación (Sekhon, 2010).

Uno de los factores importantes a tener en cuenta a la hora de trabajar con estos materiales, es su seguridad. En la industria alimentaria la legislación aplicada es muy estricta, exigiendo que todos los materiales utilizados sean considerados seguros para el consumo humano (es decir, que cumplan el estatuto GRAS- Generally Recognized as Safe). Por lo tanto, uno de los principales desafíos para la utilización de nanosistemas para aplicaciones alimentarias es la utilización de materiales biodegradables y de grado

alimentario que cumplan con esta norma y que permitan el desarrollo de bio-sistemas con la funcionalidad deseada (Silva, Cerqueira, & Vicente, 2012).

Los materiales más utilizados para alcanzar ese objetivo son polisacáridos, proteínas y lípidos, que se pueden encontrar en muchos alimentos y que debido a su biodegradabilidad y no toxicidad, pueden ser utilizados para construir sistemas a nano-escala (Choi, Kim, Cho, Hwang, & Kim, 2011).

En relación a los nanosistemas mencionados anteriormente, estos pueden ser clasificados de acuerdo con los materiales utilizados en su fabricación, los métodos de producción (p.ej. bottom-up o top-down), las fuerzas predominantes del sistema (p.ej. electrostáticas, puentes de hidrógeno), las propiedades del sistema (p.ej. mecánicas u ópticas) y la energía libre asociada al sistema (Silva et al., 2012). En los últimos años se han venido desarrollando diversos nanosistemas a través de la combinación de las diferentes formas de producción, de la mezcla de materiales y de la utilización de distintas fuerzas durante el proceso de producción para lograr las funcionalidades deseadas (Pinheiro et al., 2013).

De esta forma, la encapsulación de compuestos bioactivos o ingredientes que promueven la salud (NT), tales como vitaminas, péptidos bioactivos y antioxidantes en nanosistemas y su posterior liberación, es una forma simple de desarrollar alimentos funcionales.

Sin embargo, se han de tener varios factores en cuenta, ya que la eficacia de los ingredientes funcionales depende de la preservación de su biodisponibilidad. Ésta se define como la fracción de nutriente en una dieta o en un alimento que puede ser utilizada por el organismo. Por tanto la biodisponibilidad y, consecuentemente, los beneficios potenciales para la salud humana de los compuestos bioactivos pueden verse comprometidos por factores como un tiempo de residencia insuficiente en el tracto gastrointestinal, su baja permeabilidad y/o solubilidad, así como por su inestabilidad cuando están sometidos a las condiciones del procesamiento en el tracto gastrointestinal (Martínez, Ros, Periago, & López, 1999).

La evaluación de los nanosistemas frente a diferentes condiciones (p.ej. pH, temperatura y fuerza iónica) en el tracto gastrointestinal, así como del destino de los compuestos bioactivos encapsulados es por tanto, crucial para optimizar la biodisponibilidad de estos compuestos y para asegurar su funcionalidad y seguridad cuando se utilizan para el consumo humano.

En los últimos años se han venido utilizando distintos modelos *in-vitro* para estudiar el comportamiento fisicoquímico de las nanoestructuras en el tracto gastrointestinal, pero el conocimiento respecto al destino de los nanosistemas ingeridos es muy incipiente aún. Es por eso que son necesarios estudios más profundos para poder garantizar la seguridad y producir sistemas de transporte y liberación adaptados a cada aplicación.

Este trabajo tiene por tanto el objetivo de desarrollar y caracterizar nanoestructuras formadas a partir de un material biodegradable y apto para la industria alimentaria como lo es la betalactoglobulina. Además, una vez seleccionadas las mejores condiciones para la fabricación de dichas nanoestructuras se pretende encapsular riboflavina ya que esta vitamina es particularmente inestable y se degrada fácilmente con la luz y las condiciones ambientales extremas (pH, temperatura, etc). Actualmente se han realizado trabajos muy similares en los que se ha intentado encapsular riboflavina y otros compuestos bioactivos usando distintos materiales como agentes encapsulantes pero el trabajo aquí planteado es novedoso y no se ha abordado previamente.

CAPÍTULO 2

CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1-NANOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La palabra "nano" proviene del griego enano. Según la Real Academia Española de la Lengua, la nanotecnología se define como la tecnología de los materiales y de las estructuras en la que el orden de magnitud se mide en nanómetros, con aplicación a la física, la química y la biología. La nanotecnología es por tanto un campo interdisciplinar que se extiende a través de todo el espectro de la ciencia incluyendo la física, la química y la biología, así como las técnicas de micro-fabricación pertenecientes al campo de la ingeniería. Las propiedades físicas, químicas y biológicas de las estructuras y sistemas a nanoescala son sustancialmente diferentes a las propiedades de esos mismos materiales a escala macro. Esto es debido a las interacciones individuales de átomos y moléculas que ofrecen aplicaciones únicas y novedosas. A medida que el tamaño de las partículas se reduce a escala nano, se produce un aumento inmenso de la relación superficie volumen que aumenta la reactividad y cambia las propiedades mecánicas, eléctricas y ópticas de las partículas (Neethirajan & Jayas, 2011). Generalmente se aceptan como nanopartículas aquellas con un tamaño de partícula por debajo de los 100 nanómetros, donde fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones y beneficios (Sekhon, 2010).

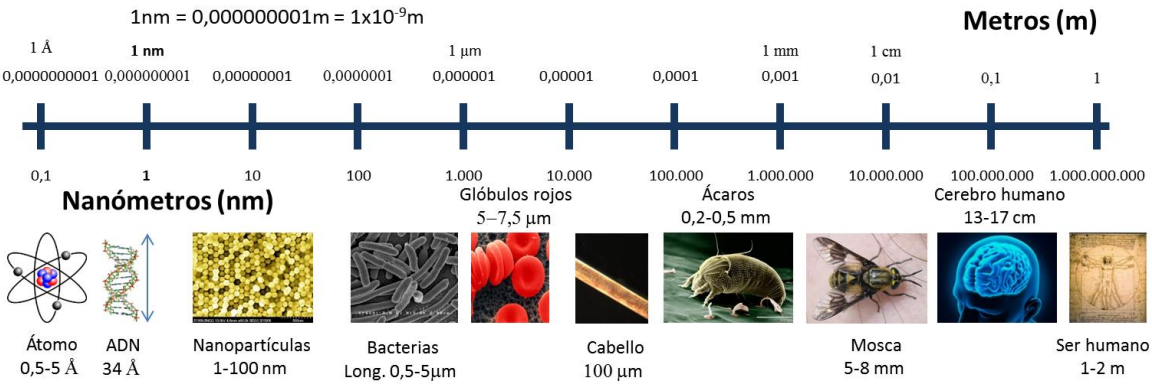

Figura 2.1: Representación escala nanométrica

(Imagen de: http://elfaronanotec.blogspot.pt/2016/10/que-es-la-nanotecnologia-el-tamano-si.html)

A pesar de que la nanotecnología en la industria alimentaria está empezando a ser explorada recientemente en comparación con otras áreas como la farmacéutica, esta tecnología ha demostrado tener un gran potencial en el sector. En estos momentos, las nanotecnologías abarcan aspectos como la inocuidad de los alimentos, los materiales de embalaje, los nanosensores, la biodisponibilidad, los sistemas de transporte y liberación de compuestos y los nuevos materiales para la detección de patógenos. Un ejemplo de

esto son los envases y los recubrimientos comestibles que son capaces de proteger los alimentos contra patógenos gracias a sus propiedades antimicrobianas (Durán & Marcato, 2013).

Entre las aplicaciones que más atención están recibiendo se encuentran los nanosensores, los sistemas de envasado de alimentos con mejores propiedades mecánicas y de barrera (p.ej. adición de nanofibras y nanopartículas) y los sistemas de transporte y liberación controlada de compuestos a tamaño nano.

2.1.1 SISTEMAS DE TRANSPORTE Y LIBERACIÓN CONTROLADA

La administración de componentes activos en el cuerpo humano requiere del uso de un vehículo apropiado para llevar una cantidad eficaz del ingrediente activo al sitio deseado en el organismo (p.ej. el flujo sanguíneo, órganos o células). La mayoría de estos compuestos fitoquímicos, como los polifenoles y los carotenoides, son compuestos poco solubles o lipofílicos y su administración está influenciada significativamente por las propiedades fisicoquímicas que presentan (p.ej. solubilidad en agua, coeficiente de partición y lipofilicidad). Éste tipo de compuestos que se disuelven mal en aceite o agua plantean serios problemas en cuanto a la ruta de administración, el transporte y el alcance de sus objetivos, que se traduce en una biodisponibilidad oral deficiente. Por tanto, el diseño de vehículos adecuados y una formulación eficiente representan un reto para la industria alimentaria (Yu & Huang, 2013).

Los sistemas de transporte y liberación controlada resuelven muchos de los problemas mencionados anteriormente. Debido a su tamaño sub-celular, son capaces de mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad y los aspectos sensoriales (p.ej. enmascarar sabores), también consiguen prevenir reacciones químicas indeseadas y proteger a los compuestos funcionales frente a la degradación física y química manteniendo su forma molecular activa y permitiendo la liberación controla del compuesto de interés (Cerqueira et al., 2014; Chen, Remondetto, & Subirade, 2006; Madalena, 2016).

Otro reto importante al que se enfrenta el sector alimentario a la hora de utilizar este tipo de nanosistemas es la sustitución de materiales no comestibles por materiales de calidad alimentaria, biodegradables, que cumplan con el estatuto GRAS. Los polisacáridos (p.ej. pectina, dextrano y quitosano), las proteínas (p.ej. los aislados de proteína del suero y β-Lactoglobulina) y los lípidos (p.ej. triglicéridos de cadena media y el aceite de maíz) son una de las alternativas para poder superar estos retos. Estos compuestos presentan distintas ventajas en cuanto a la biodegradabilidad y ausencia de toxicidad a la vez que abren una puerta a nuevas funcionalidades y aplicaciones (Cerqueira et al., 2014).

Entre las principales nanoestructuras que se han desarrollado para transportar y liberar sustancias bioactivas, destacan las nanocápsulas poliméricas, los nanosistemas basados en lípidos y los nanohidrogeles (Cerqueira et al., 2014; Chen et al., 2006).

2.1.1.1- Nanoscápsulas poliméricas

Las nanocápsulas poliméricas (rango de tamaño entre 50 y 500 nm) presentan una alta relación superficie volumen y son muy atractivas para las bioaplicaciones *in vitro* e *in vivo.* Estos nanosistemas pueden producirse a partir de una gran variedad de monómeros/polímeros sintéticos y naturales ya sea directamente a través de reacciones químicas o a través de la precipitación de polímeros preformados (Musyanovych & Landfester, 2014). En la siguiente figura se pueden observar las principales técnicas utilizadas para la formación de nanocápsulas.

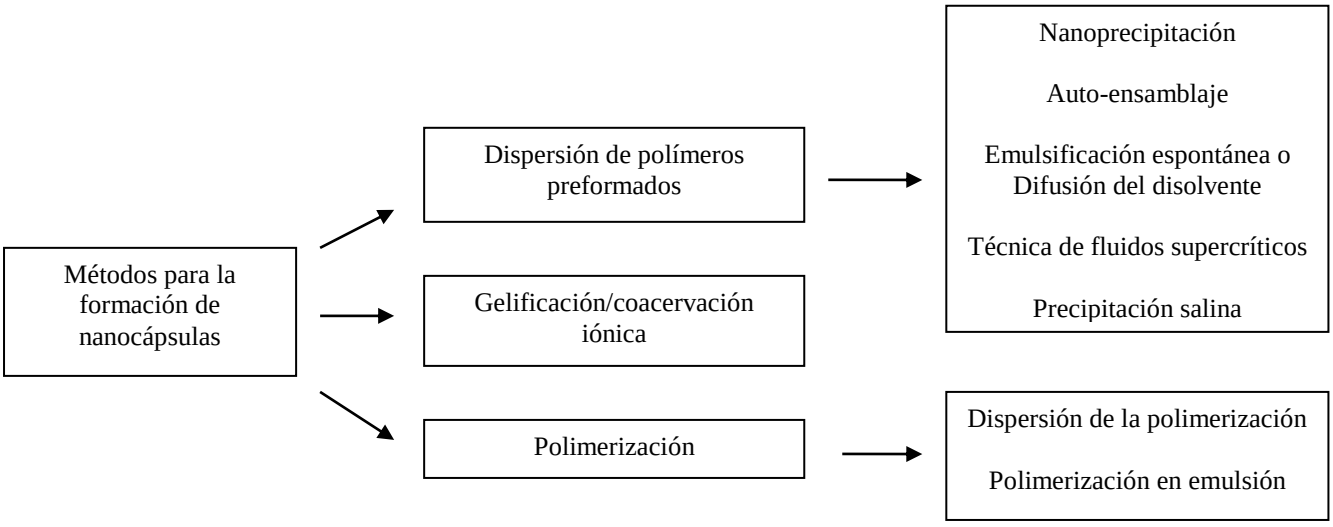

Figura 2.2: Métodos para la formación de nanocápsulas. Adaptado de Cerqueira et al. (2014).

Durante el desarrollo de las nanocápsulas, el método seleccionado para su producción es un punto clave ya que las estructuras deben tener unas propiedades que les permitan el desempeño de sus funciones de manera adecuada y efectiva. El método depende del carácter fisicoquímico del polímero, del componente bioactivo con el que se trabaja, de la aplicación final y de las propiedades deseadas para la nanocápsula (p.ej. tamaño de partícula, distribución del tamaño, área superficial, forma, solubilidad, eficacia de encapsulación y mecanismo de liberación) (Pal, Jana, Manna, Mohanta, & Manavalan, 2011).

Las nanocápsulas poliméricas por tanto, pueden actuar como vehículos eficaces para la liberación controlada y dirigida de compuestos bioactivos ya que ofrecen ventajas como una fácil preparación, una alta estabilidad en los fluidos biológicos y durante el almacenado, un tamaño subcelular que permite una captación celular mayor que otros sistemas de partículas y la capacidad de mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos (Pinheiro, 2013).

2.1.1.2- Nanosistemas basados en lípidos

Este tipo de sistemas está siendo objeto de un interés cada vez mayor por parte de la industria alimentaria. Dentro de ellos, las nanoemulsiones son uno de los campos de aplicación más interesante una vez que estas actúan como vehículos de transporte para compuestos lipofílicos como nutraceuticos, sabores, antioxidantes y sustancias antimicrobianas (Silva et al., 2012). Las nanoemulsiones consisten en una fase lípidica dispersa en una fase acuosa continua, estando cada gota de aceite (10-100 nm) rodeada por una fina capa interfacial constituida por moléculas emulsionantes (McClements, Decker, & Weiss, 2007).

Las nanoemulsiones se pueden producir utilizando una variedad de métodos que se clasifican en dos grandes grupos, enfoques de alta energía por un lado y enfoques de baja energía por otro. Los enfoques de alta energía utilizan dispositivos mecánicos capaces de generar fuertes fuerzas disruptivas que rompen las fases de aceite y agua y conducen a la formación de gotitas de aceite (p.ej. homogeneizadores de válvulas de alta presión, microfluidizadores y métodos de sonicación). Los enfoques de baja energía se basan en la formación espontánea de gotitas de aceite dentro de sistemas mixtos

aceite-agua-emulsionante cuando la solución o las condiciones ambientales se ven alteradas (p.ej. los métodos de inversión de fases y de disgregación de disolventes) (Silva et al., 2012).

Las nanoemulsiones ofrecen por tanto muchas ventajas. Poseen una alta estabilidad cinética o termodinámica, son capaces de incorporar en la misma nanoemulsión tanto compuestos lipofílicos como hidrofílicos y debido a los pequeños tamaños de gotas, las sustancias de interés pueden ser transportadas a través de las membranas celulares mucho más fácilmente, lo que se traduce en un aumento de la concentración de la sustancia en el plasma y la biodisponibilidad (Yu & Huang, 2013).

2.1.1.3- Nanohidrogeles

Los nanohidrogeles de proteínas alimentarias son una red estabilizada por interacciones hidrófobas, enlaces disulfuro y enlaces de hidrógeno resultantes del proceso de gelificación. Durante la gelificación inducida por calor, la conformación nativa de las proteínas se desdobla (exponiendo grupos funcionales tales como grupos sulfhidrilo o hidrofóbicos) y se produce el proceso de agregación a través de enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas, con el fin de minimizar la energía del sistema. A continuación se produce un gran aumento de la elasticidad, resultante de la formación de múltiples enlaces de hidrógeno tras el enfriamiento (Bourbon et al., 2015).

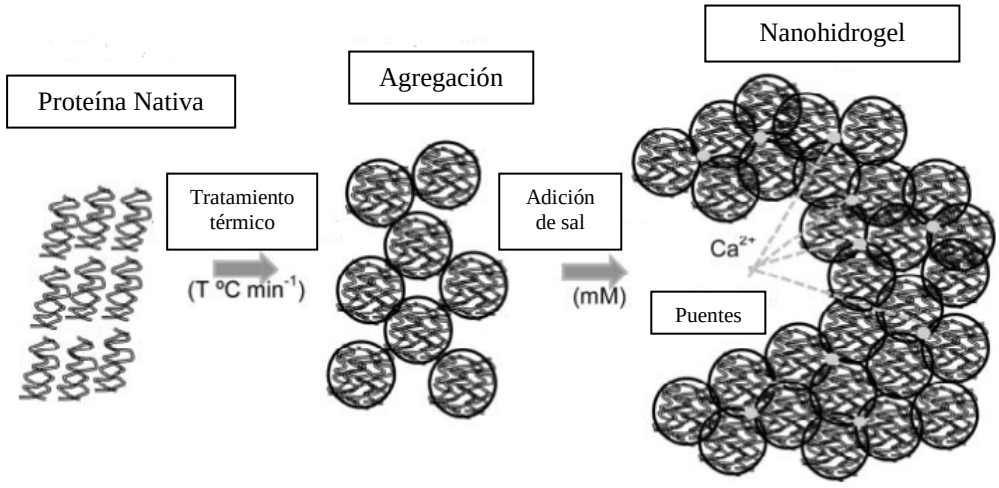

Figura 2.3: Representación esquemática de la producción de un nanohidrogel mediante gelificación a través de la temperatura y adición de sal Ca^{2+}. Adaptado de Ramos et al. (2017).

Estos sistemas basados en proteínas han atraído una considerable atención gracias a su no toxicidad, su biodegradabilidad y su pequeña dimensión (Bengoechea, Peinado, & McClements, 2011). Además, poseen una gran red interior para la bioconjugación multivalente, que permite la liberación controla de compuestos bioactivos, mejora la solubilidad y la biodisponibilidad (especialmente en aquellos compuestos con una baja solubilidad en matrices acuosas o bajas tasas de absorción), posibilita un transporte específico de dichos compuestos a los tejidos deseados y asegura la estabilidad de los mismos en el tracto gastrointestinal (Ramos et al., 2017).

Los nanohidrogeles de protéinas son también capaces de producir una respuesta a la alteración de ciertos estímulos ambientales (p.ej. pH, luz, campos eléctricos o magnéticos, fuerza iónica, composición del disolvente o condiciones enzimáticas), por medio de la cual controlan de forma rápida y sencilla las propiedades de los mismos, permitiendo así la ya mencionada liberación controlada y específica de compuestos bioactivos (Liu & Urban, 2010; Ramos et al., 2017).

Se utilizan distintos materiales y distintas técnicas para la producción de nanohidrogeles pero los materiales más utilizados comúnmente son los aislados de proteína del suero (WPI) y la β-lactoglobulina (β-Lg) de los cuales se hablará más en profundidad en los siguientes apartados.

2.1.2 OTRAS APLICACIONES

Además de las aplicaciones mencionadas en el apartado anterior, que han sido objeto de estudio a lo largo de este trabajo, la nanotecnología tiene aplicaciones potenciales en todos los aspectos de la cadena alimentaria incluyendo el almacenamiento, el control de la calidad y el procesamiento y envasado de los alimentos (Neethirajan & Jayas, 2011). Algunas de estas aplicaciones se centran globalmente en mejorar las propiedades organolépticas, aumentar la vida útil de los productos mediante innovaciones en el envasado, evaluar la inocuidad de los alimentos a través de sensores y ejercer una actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas que puedan desarrollarse (Ranjan et al., 2014). A continuación se muestra una tabla con algunas de las aplicaciones más importantes de la nanotecnología en el sector alimentario.

Tabla 1- Aplicaciones prometedoras en nanotecnología para industrias alimentarias. Adaptado de Neethirajan & Jayas. (2011).

TECNOLOGÍA	DESCRIPCIÓN	BENEFICIOS
Nanoestructuras como ingredientes alimentarios	Ingredientes y aditivos a tamaño nano	Mejoras de textura, reducción de la cantidad de sal y azúcar, mejora de la biodisponibilidad
Nanoencapsulación de suplementos	Sistemas de transporte para suplementos	Enmascarar sabores, protección frente a degradación en el procesado.
Nanopartículas de aditivos y suplementos	Aditivos nanoparticulados	Antimicrobiano, beneficios en la salud, mejora de la biodisponibilidad.
Envasado activo e inteligente mediante nanocomposites y nanosensores	Envasado de alimentos	Mejora de la flexibilidad, durabilidad, estabilidad, temperatura y humedad, propiedades barrera, evaluar la inocuidad de los alimentos
Transporte de nutrientes	Estructura enzimática, modificación, emulsión y espumas.	Entrega selectiva de nutrientes, aumento de la biodisponibilidad
Desinfectantes de superficies	Nanopartículas de ingeniería	Alimentos no contaminados, protección contra patógenos
Tintas inteligentes basadas en nanopartículas, nanolayers reactivos	Nanolitografía	Trazabilidad, autentificación prevención de la adulteración

Por ejemplo una de las aplicaciones que puede conllevar la utilización de un nanosensor es la detección de proteínas alérgicas en productos para prevenir reacciones adversas (p.ej. cacahuetes, nueces y gluten), también se han desarrollado nanosensores basados en óxidos de metal que son capaces de detectar gases y nanosensores capaces de detectar indicadores específicos del metabolismo de patógenos (Cushen, Kerry, Morris, Cruz-Romero, & Cummins, 2012; Ranjan et al., 2014; Sekhon, 2010).

Otro ejemplo de las aplicaciones que puede tener la nanotecnología lo podemos encontrar en los sistemas de envasado de alimentos. Actualmente una gran variedad de nanomateriales han sido introducidos en este área como aditivos funcionales. Desde nanoparticulas de plata (AgNP), nanoclays y óxidos de nano-zinc (nano-ZnO), hasta nanopartículas de nitruro de titanio (nano-TiN) que debido a las diferencias en sus estructuras químicas y características introducen propiedades distintas en el material huésped, lo que conduce a diferentes aplicaciones funcionales en el envasado (Bumbudsanpharoke & Ko, 2015).

2.2 PROTEINAS

Las proteínas son las macromoléculas biológicas más abundantes. Producidas en todas y cada una de las células, ocupan un lugar muy importante cualitativa y cuantitativamente hablando entre las moléculas constituyentes de los seres vivos. Desde el punto de vista funcional, su papel es fundamental ya que no existe proceso biológico que no dependa de la presencia y/o actividad de ellas (Bracho Nava, 2012)

Todas las proteínas, ya sean de las más antiguas líneas de bacterias o de las más complejas formas de vida, se construyen a partir del mismo conjunto ubicuo de 20 aminoácidos unidos covalentemente en secuencias lineales características. Estas secuencias y combinaciones son las responsables de que las proteínas tengan propiedades y actividades sorprendentemente diferentes y de que puedan formar productos tan diversos como hormonas, enzimas, fibras musculares o proteínas de la leche (Nelson & Cox, 2004).

Cada uno de los 20 aminoácidos identificados hasta el momento son α-aminoácidos y poseen en su constitución, unidos al mismo átomo de carbono, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R responsables del tamaño, estructura, carga eléctrica y solubilidad en agua de los aminoácidos (Madalena, 2016). Los aminoácidos pueden también polimerizar para formar cadenas polipeptídicas o proteicas. Esto ocurre mediante una reacción de condensación que forma un enlace peptídico entre el grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino de otro, con la consiguiente liberación de una molécula de agua (figura 1.4) (Bracho Nava, 2012).

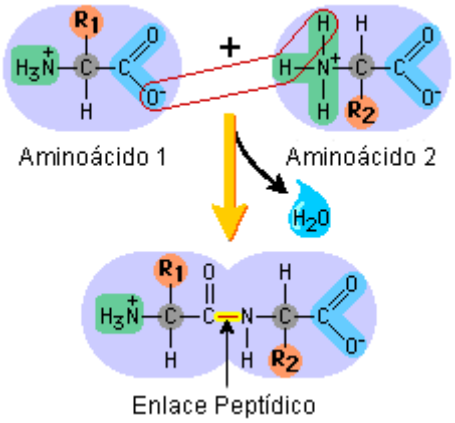

Figura 2.4: Representación esquemática de la formación de un enlace peptídico.
(Imagen de: http://www.maph49.galeon.com/biomol2/peptide.html)

Las proteínas por tanto, pueden tener diferentes estructuras dependiendo del número de aminoácidos, de su constitución y de la disposición espacial que presentan y se clasifican en estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias (Nelson & Cox, 2004). La estructura primaria hace referencia a la secuencia de aminoácidos y a la localización de los puentes disulfuro, que ayudan a la estabilidad y son muy importantes en la estructura, plegamiento y función de las proteínas. La estructura secundaria corresponde a la disposición espacial que puede adoptar la cadena de aminoácidos y su estructura viene determinada por las interacciones mediante puentes de hidrógeno. Las estructuras más comunes son la α-hélice y la lámina-β (Figura 1.5) (Bracho Nava, 2012; Olivares-Quiroz, García, & Scherer, 2004).

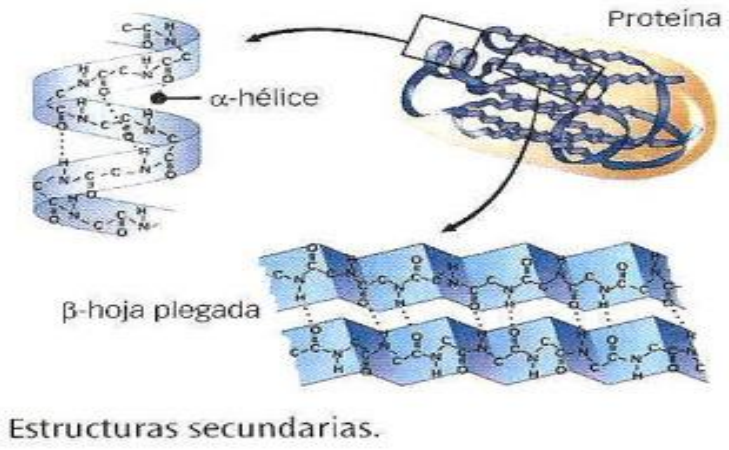

Figura 2.5: Representación de las estructuras secundarias α-hélice y lámina-β en proteínas.
(Imagen de: https://alfaheliceblog.wordpress.com/2014/06/01/que-es-una-proteina/)

En cuanto a la estructura terciaria, ésta corresponde a la estructura tridimensional y biológicamente activa de una proteína, resultante del plegamiento de una única cadena polipeptídica. Aminoácidos que están alejados en la secuencia polipeptídica (conformación primaria) y que se encuentran en diferentes tipos de estructuras secundarias, pueden interaccionar dentro de la estructura terciaria. Por último, la estructura cuaternaria corresponde a un complejo de dos o más cadenas de péptidos que se mantienen unidas por interacciones no covalentes, o en algunos casos, covalentes (puentes disulfuro) (Bracho Nava, 2012; Madalena, 2016; Olivares-Quiroz et al., 2004).

Podemos considerar a las proteínas como moléculas flexibles, ya que sus estructuras y funcionalidades a menudo cambian en respuesta a estímulos externos. Como ya se ha mencionado, la estructura molecular adoptada por una determinada proteína depende principalmente de su secuencia de aminoácidos (factores intrínsecos), pero las condiciones ambientales a las que está expuesta (p.ej. temperatura, presión, disolventes, pH), también influyen en esa estructura (factores extrínsecos) (Branco, 2015).

En general las proteínas presentan excelentes propiedades que les permiten ser utilizadas como ingredientes en la industria alimentaria a largo de los diferentes procesos y contribuyen a mejorar la calidad y los atributos sensoriales de los alimentos. Entre estas propiedades funcionales destacan la capacidad que poseen para retener agua, la capacidad gelificante, su solubilidad, las propiedades espumantes y su capacidad para modificar texturas (Branco, 2015). A lo largo de los siguientes apartados se profundizará en algunas de estas propiedades que presentan las proteínas, en concreto en las de la β-Lg presente en el suero lácteo.

2.3-PROTEÍNAS DEL SUERO

El suero lácteo es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación del coágulo. Es un líquido de color amarillo verdoso, turbio y de carácter ácido que contiene un 94% de agua, proteínas y grasas. Considerado por largo tiempo como un deshecho difícil de tratar, es actualmente una de las materias primas más utilizadas en el ámbito alimentario gracias a su coste relativamente barato, su alto valor nutricional y la gran variedad de proteínas con propiedades químicas, físicas y funcionales que posee (McIntosh et al., 1998; Prudencio, Muller, Fritzen-Freire, Amboni, & Petrus, 2014)

Las proteínas del suero son ampliamente aceptadas como elementos alimenticios y son utilizadas como ingredientes en diversos productos de confitería, panadería y helados, fórmulas infantiles, alimentos saludables y barritas deportivas. Una gran variedad de productos a partir de suero ya están disponibles en el mercado entre los que se incluyen los concentrados de proteína de suero de leche (WPC), con un contenido proteico entre 50-85% en seco, y los aislados de proteína del suero (WPI) con un contenido de

proteínas por encima del 90% y cantidades muy pequeñas de lactosa y grasa. Las proteínas del suero son también matrices adecuadas para el suministro de compuestos bioactivos, y son en consecuencia, un componente importante de la dieta humana (Ramos et al., 2017).

Estas proteínas son típicamente de naturaleza globular (muy susceptibles a la desnaturalización por calor) y con altos niveles de estructuras secundarias y terciarias en las que los aminoácidos ácidos/básicos e hidrófobos/hidrofilicos se distribuyen de una manera bastante equilibrada. Sus componentes principales son la β-Lactoglobulina (β-Lg), la α-lactalbúmina (α-La), la inmunoglobulina (IG) y la albúmina del suero bovino (BSA), que representan el 50, 20, 10 y 10%, respectivamente, de la fracción del suero. Además el suero lácteo contiene también numerosas proteínas menores como la lactoferrina (LF), la lactoperoxidasa (LP) y la peptona proteasa (PP) junto con otros componentes menores (Livney, 2010).

En la siguiente tabla se puede observar el perfil de las proteínas del suero incluyendo las propiedades químicas y fisicoquímicas generales.

Tabla 2- Composición de las principales proteínas del suero bovino, concentración relativa, peso molecular (PM), punto isoeléctrico (PI), temperatura de desnaturalización y número de residuos aminoácidos.

Proteína del suero	Concentración g/l	P.M (KDa)	P.I	Td (ºC)	Nº de residuos aminoácidos
Total	7	-	-	-	-
β-lactoglobulina	3,5	18,3	5,2	71,9	162
α-lactalbúmina	1,2	14,2	4,8	64,3	123
Inmunoglobulinas	0,7	150-900	5,5-6,8	-	-
BSA	0,4	66,4	4,7-4,9	72-0-74-0	583
Peptona proteasa	>1	<12	3,3-3,7	-	-
Lactoferrina	0,02-0,35	80,0	8,0-8,5	63,0 y 90,0	700
Lactoperoxidasa	0,01-0,03	78,5	9,8	70,0	612

Recientemente, estas proteínas han sido centro de atención por su capacidad de combinar las características de un sistema hidrogel con las de una nanopartícula y servir así como vehículos para el transporte de diversas sustancias. Puesto que estos sistemas se han logrado hacer con un tamaño submircrónico y subcelular, presentan ventajas importantes en cuanto al sitio de unión y liberación de compuestos, y gracias a su capacidad de penetrar en los sistemas circulatorios consiguen alcanzar lugares específicos en el organismo. (Cerqueira et al., 2014; Okuro & Gonc, 2017). Esto solamente ha sido posible gracias a las propiedades de las proteínas mencionadas anteriormente, en concreto, gracias a su capacidad para establecer ligaciones inter e intra-moleculares.

Dado que la β-Lg es el componente principal del suero lácteo y la fuente de la mayoría de las propiedades funcionales que presenta este subproducto, se llevará a cabo un análisis más profundo de esta proteína a continuación.

2.4-BETA-LACTOGLOBULINA

La β-Lg, la proteína del suero más presente en la leche de vacuno, es una pequeña proteína globular con 162 residuos de aminoácidos, con una masa molecular de 18,400 Da y un punto isoeléctrico (pI) de 5,3. La proteína se clasifica dentro de la familia de las lipocalinas debido a su alta afinidad por ligandos hidrofóbicos. Así la β-Lg es capaz de unirse a diversos compuestos hidrofóbicos como los ácidos grasos, lípidos, compuestos aromáticos y vitaminas (Aprodu, Ursache, Turturica, Râpeanu, & Stanciuc, 2017). Además, posee dos variantes genéticas, A y B, que difieren entre sí en las mutaciones que ocurren en las posiciones 64 (AspA → GlyB) y 118 (ValA → AlaB) de la cadena de aminoácidos (Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2004).

Ésta proteína contiene dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys66-Cys160, Cys106-Cys119) y un grupo tiol libre (Cys121) responsable de su actividad antioxidante. Su estructura terciaria está dominada por un barril-β (cáliz central) y consta de nueve láminas-β antiparalelas y una hélice-α principal en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica. El grupo tiol queda enterrado entre el barril-β y la hélice-α mencionados. A nivel de su estructura cuaternaria, la β-Lg está presente de forma mayoritaria en su forma monomérica o dimérica, viéndose este equilibrio significativamente influenciado

por las condiciones ambientales (Aprodu et al., 2017; Diarrassouba, 2013; Madureira, Pereira, Gomes, Pintado, & Xavier Malcata, 2007).

A valores de pH entre 5 y 7, incluyendo el de la leche (~ pH 6.6), la β-Lg existe en solución como dímero, a valores de pH menores de 3 y mayores de 7 predomina la conformación monomérica y a valores entre 3.5 y 5 se encuentra como un octámero. Se pueden apreciar por tanto, las diferentes transiciones estructurales de su estructura cuaternaria cuando el pH del medio es modificado (Diarrassouba, 2013; Madureira et al., 2007).

En la siguiente imagen podemos observar la estructura ya mencionada de la β-Lg, con sus nueve láminas-β que corresponden a las letras que van desde (A-I), la hélice-α y los dos puentes disulfuro.

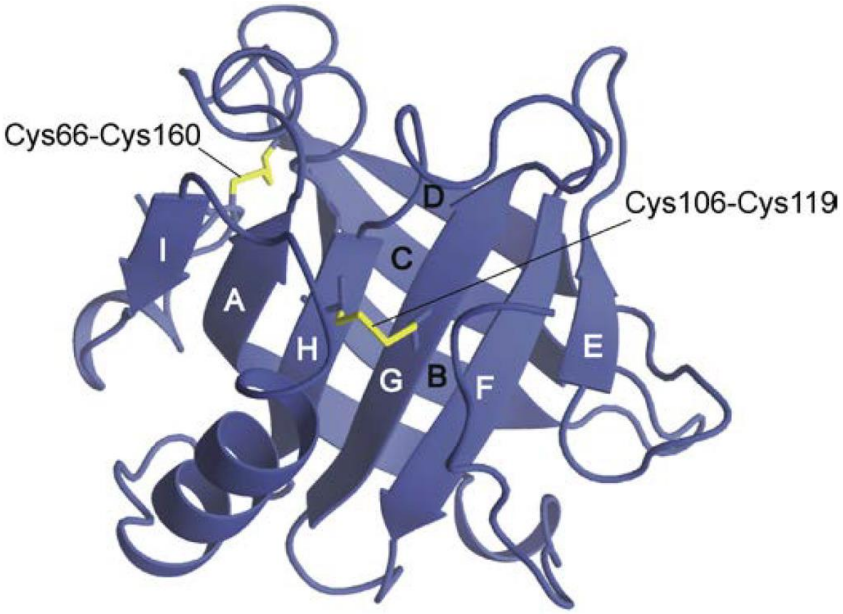

Figura 2.6: Representación de un monómero de β-Lg.

(Imagen de: http://www.mdpi.com/2218-273X/4/1/202/htm)

En cuanto a la capacidad de ligación, la β-Lg contiene tres sitios de unión para diferentes moléculas hidrófobas. El primero se encuentra en la cavidad central o cáliz, el segundo está localizado en la hendidura superficial que se encuentra entre la hélice-α y la superficie del barril y el tercero está situado en la interfase monómero-monómero (Harvey, Bell, & Brancaleon, 2007). Existen también dos lugares potenciales de unión

más, uno en la superficie cercana al Trp19-Arg124 y el otro cerca de la apertura del barril-β (Zhang, Liu, Subirade, Zhou, & Liang, 2014).

Respecto al papel fisiológico de la β-Lg, éste parece estar íntimamente relacionado con su composición en aminoácidos y estructura terciaria (Madalena, 2016). Además de su alto valor nutricional y su más que justificado uso como ingrediente funcional en alimentos y NT, esta proteína tiene un impacto relevante en la salud humana y puede servir como anticancerígeno, antimicrobiano, inmunomodulador, hipotensor y agente hipocolesterolémico (Diarrassouba, 2013).

En lo referente a las propiedades funcionales de la β-Lg, muchas de ellas encuentran numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, destacando especialmente la capacidad de formación de geles que posee, su capacidad espumante y su capacidad de estabilización de emulsiones (Chen et al., 2006).

La gelificación de esta proteína se consigue tradicionalmente mediante tratamiento térmico. Al exponerla a temperaturas superiores a 50 ºC, la β-Lg se desnaturaliza parcialmente, lo que provoca un cambio conformacional que da como resultado la exposición de los grupos hidrofóbicos y del grupo tiol previamente enterrados. Gracias a esta exposición, la proteína es capaz de agregarse y formar una red tridimensional mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro (Chen et al., 2006; Hoffmann & Mil, 1997). Cuando el valor del pH está lejos del pI, los geles formados son transparentes, mientras que si le proteína se encuentra cerca de su pI los geles que se forman son opacos y particulados (Diarrassouba, 2013).

Por lo tanto, estas nanoestructuras tridimensionales formadas a partir de β-Lg pueden ser utilizadas como sistemas de encapsulación, transporte y liberación controlada de compuestos bioactivos ya que además de proteger a estas sustancias de la degradación producida por factores externos como el oxígeno y la humedad, también presentan una elevada resistencia a condiciones de pH ácido como las que se pueden dar en el sistema gástrico (Ezhilarasi, Karthik, Chhanwal, & Anandharamakrishnan, 2013; Madureira et al., 2007; Ramos et al., 2017).

2.5-COMPUESTOS BIOACTIVOS, VITAMINAS Y RIBOFLAVINA

2.5.1-COMPUESTOS BIOACTIVOS

Durante el pasado siglo hubo avances importantes en el conocimiento sobre alimentación y salud propiciados por una gran cantidad de estudios sobre la composición de alimentos, estudios epidemiológicos y estudios de laboratorio para determinar actividades biológicas. Todo ello ha contribuido a la identificación de determinados componentes de la dieta (bioactivos), como factores potencialmente implicados en la prevención de procesos patológicos (Chalé, Ancona, & Campos, 2014; Momin, Jayakumar, & Prajapati, 2013).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los compuestos bioactivos son fitoquímicos que están presentes en los alimentos y que son capaces de modular procesos metabólicos logrando una mejora en la salud. En general estos compuestos se encuentran en alimentos vegetales como frutas, verduras y granos integrales y sus concentraciones suelen ser muy pequeñas (Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014). Dentro de estas sustancias se pueden encontrar compuestos como vitaminas, antioxidantes, antimicrobianos, polifenoles, probióticos, prebióticos y minerales (Palencia Mendoza, 2011).

2.5.2-VITAMINAS

Las vitaminas son pequeñas moléculas orgánicas esenciales para la salud humana, ya que ayudan al cuerpo a crecer y desarrollarse. Además son capaces de prevenir enfermedades y promover la salud en general (Ball, 1988). Desafortunadamente, la mayoría de estos agentes bioactivos se producen en cantidades insignificantes o directamente no se producen en el organismo. Es por eso que las vitaminas deben suministrarse a través de los alimentos o de suplementos dietéticos si fuese necesario (Katouzian & Jafari, 2016). Se clasifican en dos grupos, hidrosolubles (p.ej. vitamina B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_7, B_9, B_{12} y vitamina C) o liposolubles (p.ej. vitamina A, D, E y K) y su déficit puede provocar enfermedades como la xeroftalmia (déficit vit A), el escorbuto (déficit vit C) o la pelagra (déficit de niacina) (Ball, 1988; de Souza Simões et al., 2017).

Estas moléculas son también muy sensibles a factores como el calor, los agentes oxidantes, la luz y el pH que pueden provocar su degradación o reducir su biodisponibilidad. Es por tanto necesario el desarrollo de nuevos métodos como puede ser la nanoencapsulación para preservar y mantener las características innatas de las vitaminas a lo largo del tiempo (Katouzian & Jafari, 2016).

2.5.3-RIBOFLAVINA

La riboflavina, también conocida como vitamina B_2, es un compuesto orgánico, hidrosoluble y de color amarillo anaranjado perteneciente al complejo B de las vitaminas (Northrop-Clewes & Thurnham, 2012). Las plantas y algunos microorganismos pueden sintetizar riboflavina pero los animales necesitan obtener este nutriente mediante la dieta (Ashoori & Saedisomeolia, 2014). Entre los alimentos que presentan mayores concentraciones de esta vitamina podemos destacar la leche y los productos lácteos, los huevos, las carnes, los vegetales con hojas y el salvado de trigo (Azevedo, Bourbon, Vicente, & Cerqueira, 2014).

Aunque se necesita solo en pequeñas cantidades (la dosis diaria recomendada para hombres adultos es 1.3 mg, 1.1 mg para mujeres y entre 0.4 y 1.2 mg para niños), la riboflavina es esencial y su deficiencia se conoce como arriboflavinosis (Dai & Koh, 2015). En el ser humano, la deficiencia se asocia con un agrietamiento de la piel en las comisuras de la boca y fisura de los labios, picazón y descamación de la piel facial, hinchazón de la lengua y sensibilidad de los ojos a la luz (Northrop-Clewes & Thurnham, 2012).

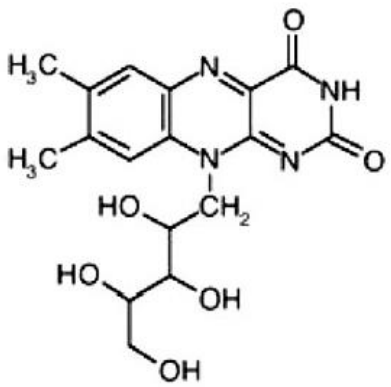

Figura 2.7: Representación de la estructura de la riboflavina.

(Imagen de: http://www.scielo.cl/fbpe/img/rchnut/v36n2/fig5.1.jpg)

A pesar de que la deficiencia de esta vitamina es más frecuente en las poblaciones subdesarrolladas con un bajo consumo de productos lácteos y carne, también se han reportado niveles bajos de ella en ancianos, niños, mujeres embarazadas y personas con ciertos tipos de cánceres, cardiopatías congénitas y consumos excesivos de alcohol en países desarrollados (Ashoori & Saedisomeolia, 2014).

Este micronutriente es también el componente central de los cofactores flaviín adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) y como el resto de vitaminas del grupo B, desempeña un papel clave en el metabolismos energético, especialmente en el metabolismo de las grasas, los cuerpos cetónicos, los hidratos de carbono y las proteínas (Mack & Grill, 2006). Al mismo tiempo es necesaria para activar la vitamina $B_{6,}$ ayuda a crear niacina y favorece a la glándula suprarrenal. También se utiliza para la formación de glóbulos rojos, la formación de anticuerpos y el crecimiento y respiración celular (Bernardos et al., 2008).

En lo referente a su estabilidad, la riboflavina es considerada una de las vitaminas más estables ya que soporta muy bien las altas temperaturas en procesos de cocinado y esterilización, pero factores como la luz y las condiciones alcalinas pueden destruirla fácilmente (Combs, 2008; Northrop-Clewes & Thurnham, 2012). Además, su solubilidad en agua es pobre por lo que su absorción en el organismo se ve comprometida (Ahmed & Ayres, 2007).
Por lo tanto, con el fin de maximizar la biodisponibilidad de esta vitamina y superar las limitaciones arriba mencionadas, la nanotecnología y más concretamente los nanosistemas para la encapsulación y transporte controlado de compuestos (p.ej. nanoestructuras de β-Lg) pueden ser utilizados como vehículos protectores.

CAPÍTULO 3
METODOLOGÍA UTILIZADA

3.1- MATERIALES

A lo largo de este trabajo se utilizó β-Lg purificada a partir de un WPI (Lacprodan DI-9212) amablemente suministrado por Arla Foods Ingredients (Viby, Denmark). La riboflavina con una pureza ≥ 98% se adquirió como polvo liofilizado a la empresa Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA). El agua ultra pura (resistividad 18,2 MΩ/ cm) se obtuvo con un sistema de purificación de agua Milli-Q Ultrapure (MIllpore, Bedford MA, USA) y la solución tampón fosfato (25mM) pH 6 se preparó utilizando 2,26 mL NaH_2PO_4 y 2,74 mL de Na_2HPO_4 por cada 95 mL de agua ultrapura.

3.2- DESARROLLO DE LAS NANOESTRUCTURAS

3.2.1- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE PROTEÍNA

Se utilizó una solución tampón fosfato a pH 6 para la preparación de las soluciones de β-Lg. Esta solución se preparó con el fin de estandarizar las condiciones de pH y conductividad, disminuyendo así la ocurrencia de errores en los ensayos sucesivos de este trabajo. Se utilizaron diferentes concentraciones de proteína (0,5; 1,0 y 1,5 % p/v) como punto de partida para la producción de las nanoestructuras en una fase de optimización y caracterización de formulaciones y técnicas. Posteriormente se verificó que el pH de cada una de las soluciones se mantuviese en 6, añadiendo para ello H_3PO_4 o NaOH si fuese preciso. Por último se agitaron las muestras durante 2 h antes de guardarlas en refrigeración para ser utilizadas.

3.2.2- TRATAMIENTO TÉRMICO DE LA β-LG

Previamente al tratamiento térmico, se procedió a agitar de nuevo las soluciones durante 20 min y se verificó una vez más el pH. Acto seguido las soluciones fueron filtradas y preparadas para testar su comportamiento bajo distintas temperaturas (60, 70 y 80 ºC) durante diferentes periodos de tiempo (es decir, 5, 15 y 25 min) a través de un proceso de calentamiento convencional en baño de agua (que permite la desnaturalización de las proteínas, exponiendo sus aminoácidos libres para nuevos reordenamientos moleculares). El calentamiento se realizó siempre bajo agitación y en tubos de ensayo por triplicado. Este proceso de calentamiento tuvo por objetivo seleccionar los tiempos

y temperaturas de calentamiento que originan las mejores propiedades proteínicas en cuanto al tamaño de partícula. Una vez analizadas cada una de las muestras y seleccionadas las condiciones adecuadas para la producción de las estructuras a escala nano se procedió a la incorporación de la riboflavina a nuestros sistemas.

3.2.3- ADICIÓN DE LA RIBOFLAVINA

Con el objetivo de conocer la concentración óptima de riboflavina a ser incorporada en las nanoestructuras producidas, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de riboflavina. Estas soluciones fueron protegidas en todo momento con papel de aluminio de la exposición a la luz. La adición de la riboflavina se realizó una vez terminado el proceso de calentamiento y se añadieron exactamente los mismos volúmenes (500 µL) a cada una de las muestras para obtener unas concentraciones de (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL). Por último, las soluciones resultantes se colocaron en hielo durante 10 min para permitir las interacciones proteína-riboflavin. Este paso es crucial para verificar que concentración de riboflavina origina la mayor eficacia de asociación.

3.2.4- EFICIENCIA DE ASOCIACIÓN

La eficacia de asociación (AE) por sus siglas en inglés se evaluó comparando la concentración total de riboflavina (de cada una de las soluciones iniciales de riboflavina) con la concentración de riboflavina no unida a la β-Lg (en cada una de las muestras preparadas). Primero se colocó 1 mL de cada una de las soluciones de riboflavina (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/ml) y 1 mL de cada una de las muestras en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 14000 *g* durante 10 min y a 5 ºC. Después de la centrifugación se obtuvo un sobrenadante con la vitamina libre y un pellet con un concentrado de nanopartículas con riboflavina encapsulada. A continuación, se recogieron 0,1 mL de cada sobrenadante y se midieron espectrofotométricamente a 450 nm (que corresponde al pico máximo de absorbancia de la riboflavina). Por último los picos máximos de absorbancia obtenidos de las soluciones de riboflavina y de las muestras se utilizaron para determinar la concentración de vitamina usando una curva de calibración apropiada de $y = 4\times10^{6} \cdot x - 2287{,}1$; ($R^2 = 0{,}9977$), siendo y la absorbancia y x la cantidad de riboflavina libre.

Los resultados fueron después utilizados para obtener la eficacia de asociación de la riboflavina a través de la siguiente ecuación:

$$AE\ (\%) = \frac{RIB\ TOTAL - RIB\ LIBRE}{RIB\ TOTAL}\ X\ 100$$

(Ecuación 1)

Donde *RIB TOTAL* representa la concentración de riboflavina en solución y *RIB LIBRE* la concentración de riboflavina libre separada de las nanoestructuras de β-Lg. Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

3.2.4- CAPACIDAD DE CARGA

La capacidad de carga (LC) por sus siglas en inglés, fue calculada mediante la siguiente ecuación para las nanoestructuras producidas a partir de β-Lg después de haber añadido las diferentes concentraciones de vitamina B_2.

$$LC = \frac{RIB\ TOTAL - RIB\ LIBRE}{NPS\ TOTAL} \times 100$$

(Ecuación 2)

Donde *RIB TOTAL* representa la cantidad total de vitamina, *RIB LIBRE* representa la cantidad de vitamina libre y *NPS TOTAL* el peso total de las nanopartículas.

El primer paso de este proceso fue pesar todos los Eppendorfs vacíos. A continuación y después de la centrifugación mencionada en el apartado anterior se retiraron todos los sobrenadantes (sin tocar el pellet). Luego los Eppendorfs fueron colocados en una estufa a 50 ºC durante dos días para terminar de eliminar el sobrenadante que no se pudo retirar. Por último se pusieron en un desecador durante unos días más antes de proceder al pesado de los pellets.
Este proceso nos permite conocer la diferencia de peso que se produjo, *NPS TOTAL*.

3.2.5-ENSAYO DE ESTABILIDAD FRENTE A LA LUZ

La estabilidad de los nanosistemas de β-Lg/riboflavina fue medida a través de un ensayo en el que las muestras fueron sometidas a una fuente lumínica con una intensidad de 11 μmol · fotón / m^2 · s durante distintos intervalos de tiempo (0, 20, 40 y 60 min) y (2, 4, 8, 24 y 48 h). Para llevar a cabo el experimento se prepararon por un lado una serie de muestras formadas solamente por riboflavina y tampón. Estas muestras se dividieron posteriormente en dos grupos, muestras de riboflavina protegidas de la luz mediante papel de aluminio y muestras de riboflavina sin ninguna protección. Por otro lado se prepararon las muestras con el complejo β-Lg/riboflavina y se procedió a dividirlas del mismo modo, muestras protegidas de la luz y muestras sin proteger. Los dos grupos de muestras protegidas de la luz se utilizaron como control a la hora de evaluar la degradación de la riboflavina. La concentración de riboflavina utilizada para la preparación de todas las muestras fue de 0,0018 mg/mL (estudiada previamente).

3.3- CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS

3.3.1- DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

La caracterización de las nanoestructuras se realizó mediante la determinación del tamaño de las nanopartículas formadas, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta (ζ). Para ello se utilizó un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS), por sus siglas en inglés, (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern Instruments, U.K.).

DLS es una técnica no invasiva, versátil y bien establecida que permite medir el tamaño y distribución de moléculas y partículas típicamente en la región submicrométrica. El tamaño de partícula hace referencia al diámetro de las nanopartículas, el PDI describe la anchura o la variación de la distribución del diámetro de partícula y es adimensional, el potencial zeta por último es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe afectan a la estabilidad. Se considera que los valores de ζ superiores a +30 mV e inferiores a -30 mV representan sistemas coloidales estables (Malvern Instruments, 2004).

Las mediciones de estos parámetros se basan en una fuente de luz láser que converge en un punto de la muestra mediante una lente. La luz es dispersada por las partículas hacia todos los ángulos y a través de un solo detector, tradicionalmente colocado a 90º o 173º respecto al haz del láser, se recoge la intensidad de la luz dispersada. El movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión que se define como el movimiento aleatorio de las partículas durante un periodo de tiempo (las partículas grandes tienen un movimiento lento, mientras que las pequeñas muestran movimientos más rápidos), hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Con el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad se obtiene la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto del tamaño de partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Branco, 2015; Madalena, 2016; Malvern Instruments, 2004).

Figura 3.1: Imagen de la instrumentación utilizada para la medición del tamaño de partícula, PDI y carga.

Está técnica fue utilizada a lo largo de todo el trabajo para la caracterización, optimización y selección de las mejores condiciones para la producción de las nanoestructuras. Las mediciones del diámetro de partícula y PDI fueron realizadas añadiendo 1,5 mL de cada muestra en una cubeta de plástico mientras que para la medición del ζ se añadieron 750 µL de cada muestra en una cubeta capilar. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado y a una temperatura de 25 ºC.

3.3.2- ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

La espectroscopia de fluorescencia puede servir como una herramienta universal a la hora de estudiar interacciones entre proteína y ligando. El método nos brinda además una información importante a la hora de comprender las características estructurales que influyen en el mecanismo de unión entre cualquier compuesto diana y una proteína, pudiendo ser aplicado con éxito para estudiar la interacción entre ellos (Aprodu et al., 2017).

En este trabajo se utilizó un espectrofluorímetro (Jasco FP6200, Tokyo, Japón) para caracterizar las nanopárticulas de β-Lg y calcular la eficiencia de asociación y la capidad de carga de la riboflavina cuando se incorpora a estas nanopartículas.

Los espectrofluorómetros están constituidos por una fuente de luz visible y otra de luz UV, un monocromador para seleccionar la frecuencia de excitación, un soporte para la muestra y un segundo monocromador equipado con un detector para registrar y medir la fluorescencia emitida. Este equipo puede usarse para determinar tanto el espectro de emisión de fluorescencia como el espectro de excitación. Su mecanismo es relativamente sencillo, la fuente emite luz en todas las direcciones y un primer monocromador selecciona una banda de frecuencias que llega a la muestra. A continuación la muestra absorberá la luz y emitirá al mismo tiempo fluorescencia en todas las direcciones. La fluorescencia es finalmente recogida por un segundo monocromador que selecciona una banda de frecuencias que será recogida por el detector para la formación de los espectros (Branco, 2015).

A lo largo del trabajo, se utilizó esta técnica en diferentes etapas. La primera de ellas consistió en determinar los espectros de absorción y emisión de diversas muestras de β-Lg tras someterlas a diferentes tratamientos de temperatura y tiempo y modificando las concentraciones de proteína iniciales. En esta etapa se midió tanto la fluorescencia intrínseca (fluorescencia natural, propia del sistema) de la muestra como la extrínseca (cuando se añade a la muestra un fluoróforo externo, en este caso ANS). La longitud de onda (λ) seleccionada para determinar la fluorescencia intrínseca fue de 295 nm y sus espectros de emisión se recogieron entre los 305 y 395 nm mientras que para la fluorescencia extrínseca se seleccionó una longitud de onda de excitación de 370 nm y se recogieron los espectros de emisión entre los 430 y 590 nm.

En la segunda etapa se utilizó la espectroscopía de fluorescencia para realizar una curva de calibración de la riboflavina. Para ello se utilizaron concentraciones por debajo y por encima de la concentración utilizada en el desarrollo de las nanoestructuras (0,0012; 0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120; 0,0180 y 0,0330 mg/mL).

A continuación se volvió a utilizar esta técnica para calcular la eficiencia de asociación y la capacidad de carga de las nanoesctructuras frente a diferentes concentraciones de riboflavina, utilizando para ello una longitud de onda de 450 nm.

Por último se volvieron a analizar espectrofotométricamente diferentes muestras de nanoestructuras tras haber sido sometidas a diferentes periodos de tiempo de exposición a la luz durante el ensayo de estabilidad realizado.

Siempre que esta técnica fue utilizada, se prepararon las muestras por triplicado y se realizaron tres mediciones por cada muestra.

3.3.3-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos que involucran datos experimentales se realizaron usando el software Statistica versión 10.0.228.8 (StatSoft.Inc, Tulsa, OK, USA). Se determinó la significancia estadística ($p \leq 0,05$) usando un análisis de varianza ANOVA seguido por los test de Turkey. A menos que se señale lo contrario, todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

"

CAPÍTULO 4
RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1-IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE FABRICACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS

En este primer apartado de resultados se ha procedido a identificar y seleccionar las mejores condiciones para la producción de las nanoestructuras de β-Lg a pH 6. A lo largo del estudio se han testado diversas concentraciones de β-Lg inicial, al mismo tiempo que se han ido variando las temperaturas y los tiempos del proceso de calentamiento para evaluar de qué forma afectan estos parámetros a la estructura de la proteína. Todas estas condiciones iniciales de fabricación de las nanoestructuras han tenido como punto de partida una serie de trabajos realizados previamente por (de Souza Simões, Vicente, & Ramos, 2017), en los que se testó la capacidad que la β-Lg tiene para formar micro y nanoestructuras bajo determinadas condiciones ambientales.

En dicho estudio se seleccionaron distintas condiciones de pH (3, 4, 6 y 7), de concentración inicial de β-Lg (0,5, 1,0 y 1,5% p/v) y de temperatura (60, 70 y 80 ºC) para que posteriormente se analizasen mediante un diseño experimental (Box-Behnken). Dicho diseño constó de 15 experimentos diferentes para cada pH y proporcionó unos resultados en los que se intuía que las mejores condiciones para la producción de nanoestructuras se encuentran a pH 6. Para el resto de pH testados no se consiguieron las características de partículas deseadas, tanto en términos del tamaño como del PDI.

Motivado por estos resultados y por la necesidad de comprobar lo visto en el diseño experimental, el presente trabajo toma como punto de partida el estudio del comportamiento estructural de la β-Lg a pH 6 para la posterior encapsulación de riboflavina. Durante este ensayo se testaron todas las combinaciones posibles de temperatura, tiempo de calentamiento y concentración de β-Lg mediante el procedimiento descrito en el capítulo anterior y posteriormente se caracterizaron las nanoestructuras formadas mediante la medición del tamaño de partícula formado, su PDI y carga.

Cada una de estas determinaciones tiene como resultado una serie de histogramas como el que se presenta en la siguiente figura a modo de ejemplo. El tamaño que se representa corresponde al tamaño por volumen de las nanoestructuras.

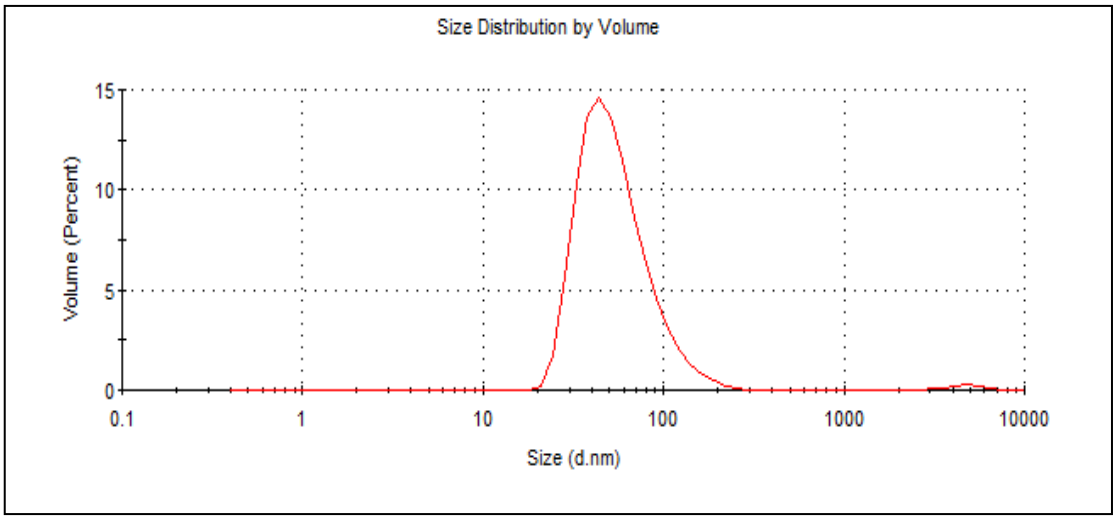

Figura 4.1: Histograma correspondiente a las nanoestructuras obtenidas a 80 ºC, 15 min de calentamiento y 0,5% de proteína inicial, a pH 6.

El conjunto de los resultados obtenidos pueden verse en la tabla 3, donde se han resumido el total de experimentos realizados.

Analizando estos resultados se puede ver como solo comienza a haber variaciones estadísticamente significativas en el tamaño de las partículas a la temperatura de 80 ºC. Con el resto de temperaturas testadas no se consigue la formación de estructuras con las características (tamaño y PDI) deseadas pero sí que se puede observar la formación de pequeños oligómeros de proteína nativa (5-6 nm), como se puede observar en el histograma de la figura 4.2. Este hecho se verifica al comparar los tamaños de estas partículas con los obtenidos para la proteína nativa y ver su parecido.

Se puede concluir por tanto, que a pesar de variar las concentraciones de proteína iniciales y los tiempos de calentamiento, las temperaturas de 60 y 70 º C (temperaturas inferiores a la temperatura de desnaturalización de la β-Lg) no son suficientes para poder formar nanoestructuras, ya que no consiguen provocar alteraciones significativas en su estructura. En cambio, cuando la β-Lg alcanza valores próximos a los 80 ºC se producen una serie de reordenamientos estructurales debidos a la ruptura de algunos de los enlaces disulfuro que la conforman y que tienen como resultado el despliegue y exposición de sus grupos sulfhidrilo. Esta exposición da pie a la formación de enlaces intra e intermoleculares con otros enlaces disulfuro que favorecen la agregación de la proteína para formar tamaños de partícula mayores y más estables (Pereira, Souza, Cerqueira, & Teixeira, 2010).

Tabla 3- Resumen del ensayo realizado a pH 6 para la producción de nanoestructuras. Con la temperatura a la que se realizó el ensayo, concentraciones de β-Lg utilizadas, tiempos de calentamiento y resultados de tamaño y PDI obtenidos.

Temperatura (ºC)	Concentración ($mg \cdot mL^{-1}$)	Tiempo (min)	Tamaño* (nm)	PDI
60 ºC	5	5	5.20 ± 0.03[a]	0.289 ± 0.031 [a]
		15	5.31 ± 0.05[a]	0.291 ± 0.024 [a]
		25	5.30 ± 0.06 [a]	0.337 ± 0.039 [ab]
	10	5	5.51 ± 0.04 [ab]	0.376 ± 0.004 [ab]
		15	5.55 ± 0.02 [ab]	0.299 ± 0.046 [a]
		25	5.54 ± 0.02 [ab]	0.383 ± 0.015 [ab]
	15	5	5.81 ± 0.12[b]	0.377 ± 0.031 [ab]
		15	6.23 ± 0.16 [c]	0.454 ± 0.030[b]
		25	5.69 ± 0.06 [b]	0.370 ± 0.003 [ab]

*Tamaño medido por volumen
Nota: Los valores dentro de una misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

70 ºC	5	5	5.18 ± 0.03 [a]	0.260 ± 0.048 [a]
		15	5.18 ± 0.01[a]	0.466 ± 0.077 [ab]
		25	5.43 ± 0.03 [ab]	0.359 ± 0.056 [ab]
	10	5	5.46 ± 0.03 [ab]	0.312 ± 0.040 [ab]
		15	5.77 ± 0.13 [abc]	0.339 ± 0.051 [ab]
		25	5.98 ± 0.18[bc]	0.447 ± 0.062 [ab]
	15	5	5.76 ± 0.03 [abc]	0.396 ± 0.058 [ab]
		15	6.36 ± 0.40[c]	0.431 ± 0.072 [ab]
		25	6.33 ± 0.08[c]	0.582 ± 0.095[b]

Nota: Los valores dentro de una misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

80 ºC	5	5	36.10 ± 8.28[a]	0.527 ± 0.013 [a]
		15	77.69 ± 5.92 [a]	0.220 ± 0.009 [b]
		25	115.22 ± 9.88 [ab]	0.229 ± 0.033 [b]
	10	5	42.60 ± 8.46 [a]	0.338 ± 0.035 [c]
		15	74.77 ± 9.44[a]	0.182 ± 0.003 [d]
		25	121.73 ± 23.42[ab]	0.195 ± 0.008 [b]
	15	5	45.24 ± 4.73 [a]	0.209 ± 0.003 [b]
		15	253.75 ± 60.81[bc]	0.227 ± 0.010 [b]
		25	384.48 ± 96.89[c]	0.239 ± 0.011 [b]

Nota: Los valores dentro de una misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Proteína nativa	5	5.28 ± 0.02[a]	0.360 ± 0.034[a]
	10	5.57 ± 0.02[b]	0.434 ± 0.022[a]
	15	5.73 ± 0.03[c]	0.418 ± 0.018[a]

Nota: Los valores dentro de una misma columna con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Centrándonos ahora en los resultados obtenidos para la temperatura de 80 ºC se puede observar que aquí la concentración de proteína inicial y los tiempos de calentamiento utilizados sí que generan diferencias en los tamaños de partícula finales. Con un tiempo de calentamiento corto (5 min) se consiguieron producir las estructuras con el tamaño más reducido, mientras que para tiempos de calentamiento más largos (15 y 25 min) los tamaños de partícula logrados fueron mayores. Esto es debido a los cambios estructurales que provoca la temperatura en la proteína. Un mayor tiempo de calentamiento da como resultado una reestructuración más extensa, lo que genera a su vez tamaños de partícula mayores. En cuanto al papel de la concentración inicial de β-Lg utilizada, vemos que cuando se pasa de una concentración de 0,5% a una de 1,5% y se utilizan tiempos de calentamiento largos, las estructuras formadas tienen tamaños superiores a 100 nm (superiores a lo pretendido para nuestras nanoestructuras).

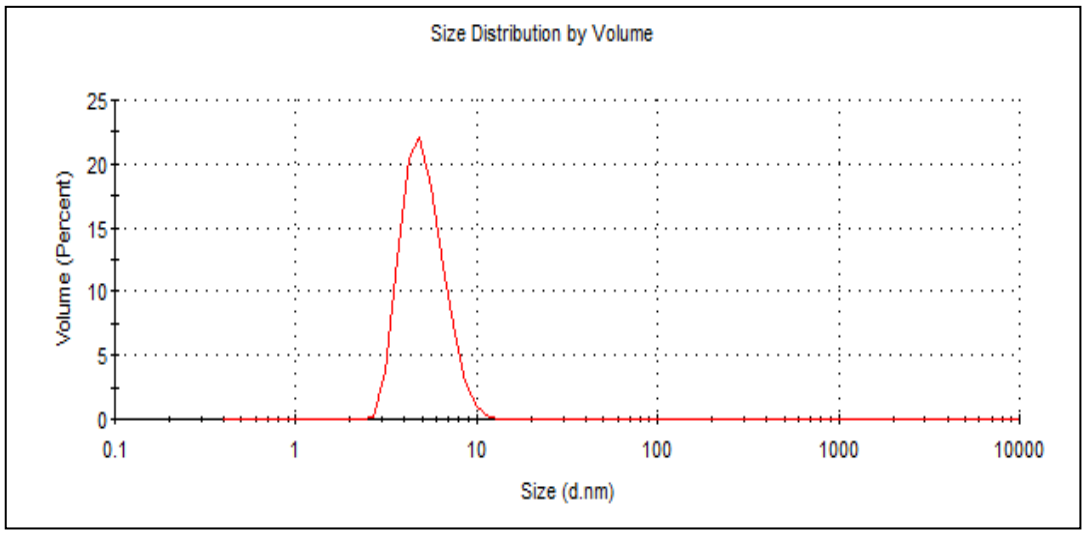

Figura 4.2: Histograma correspondiente a los oligómeros obtenidos a 70 ºC, 15 min de calentamiento y 1,0% de proteína inicial, a pH 6.

Si analizamos el PDI de las diferentes condiciones vemos que las únicas muestras que presentan valores muy por encima de lo adecuado son aquellas a las que se les ha sometido a un tiempo de calentamiento corto, mientras que el resto de las muestras presentan valores de PDI aceptables, en torno a 0,200. Se supone que esto es debido a que, a tiempos cortos, no se consiguen estabilizar las interacciones intra e intermoleculares, formándose al mismo tiempo agregados de tamaños grandes y pequeños que resultan en una mayor dispersión de tamaños. Con tiempos de reacción

más largos, se logra que los agregados de menor tamaño se unan, formando unas estructuras con mayores tamaños, una mayor estabilidad y más uniformidad en los tamaños que resulta en valores de tamaño mayores y PDI menores.

Por lo tanto, tras analizar todas las combinaciones posibles se determinó que las mejores condiciones para la fabricación de nanoestructuras corresponden a una temperatura de 80 ºC, una concentración inicial de β-Lg del 0,5% (p/v) y un tiempo de calentamiento de 15 min. Bajo estas condiciones las nanoestructuras formadas presentan un tamaño por volumen medio de 77.69 ± 5.92 nm y un PDI de 0.220 ± 0.009. Estos valores son estadísticamente semejantes a los valores correspondientes con las condiciones de concentración inicial de 1.0% y 15 min de calentamiento en las que se consiguieron partículas con un tamaño de 74.77 ± 9.44 nm y un PDI de 0.182 ± 0.003, pero tras analizar cada uno de las casos se optó por trabajar con las condiciones en las que la concentración inicial de proteína utilizada fuese menor, lo que se traduce en un menor coste de producción.

4.2- EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE RIBOFLAVINA

En este segundo apartado de resultados, una vez seleccionadas las condiciones de fabricación adecuadas para las nanoestructuras, se procedió a evaluar de qué forma se ven afectadas las estructuras cuando se les adiciona diferentes concentraciones de riboflavina inmediatamente después de ser sometidas al proceso de calentamiento y tras 10 min en hielo. Para ello, igual que en el apartado anterior se evaluaron el tamaño de partícula, el PDI y el ζ de cada una de las muestras. Los datos obtenidos pueden verse en la siguiente tabla.

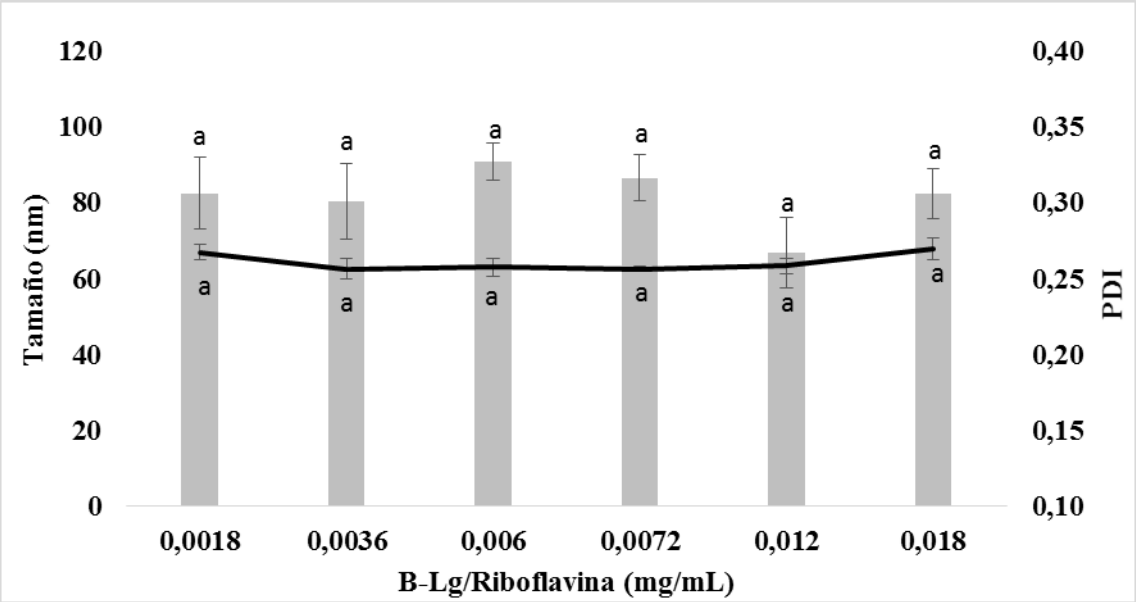

Figura 4.3: Tamaño de partícula (columnas) y PDI (línea) frente a las distintas concentraciones de riboflavina testadas (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL). Nota: Los valores dentro de la gráfica con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tras analizar los resultados obtenidos se puede observar que a pesar de haber adicionado riboflavina a nuestras nanoestructuras tanto los valores del tamaño de partícula como los del PDI se mantienen estables. La incorporación de la riboflavina a la solución se realizó mientras la β-Lg se encuentra en un estado en el que el lugar de unión interno está expuesto gracias al despliegue parcial provocado por el calentamiento. En este estado, se produce un aumento de la flexibilidad de algunas regiones estructurales lo que permite que la riboflavina acceda más fácilmente al lugar de unión interno (Tavel, Moreau, Bouhallab, Li-chan, & Guichard, 2010).

Podemos concluir por tanto que la adición de las distintas concentraciones de riboflavina no desestabilizó las nanoestructuras formadas en ninguna de las muestras analizadas. Los tamaños de partícula de los nanosistemas se mantuvieron en torno a los 81,81 ± 7,72 nm sin que hubiese diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos. Los valores de PDI siguieron esta misma tendencia y se mantuvieron alrededor de 0,261 ± 0,005, también sin diferencias significativas entre ellos.

En la imagen de la figura siguiente se puede apreciar la transparencia en el color de las soluciones fabricadas y las distintas tonalidades de color a medida que se aumenta la concentración de riboflavina añadida.

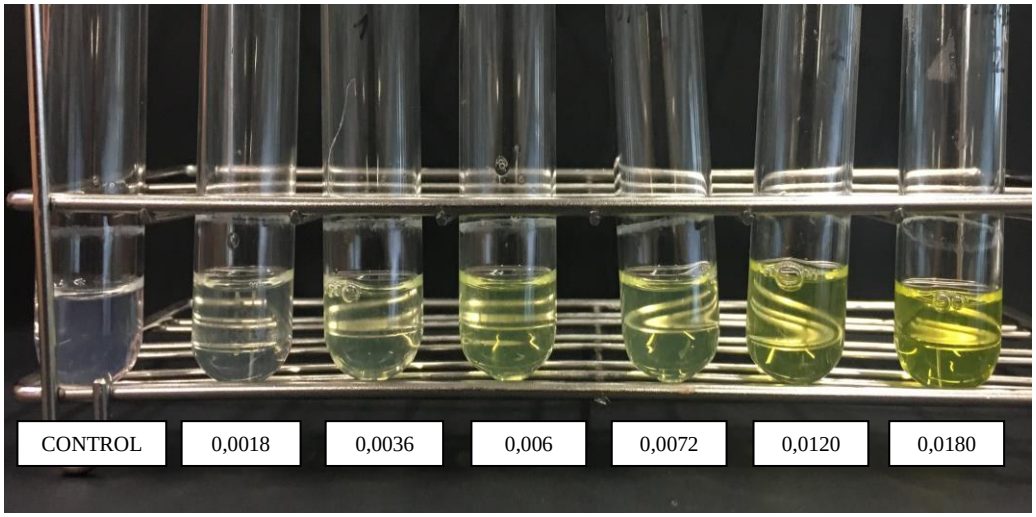

Figura 4.4: Soluciones de β-Lg tras haber sido calentadas y añadidas las diversas concentraciones de riboflavina (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL).

4.3- TESTS DE ENCAPSULACIÓN

En este tercer apartado de resultados se llevó a cabo un ensayo para determinar que concentración de riboflavina presentaba mejores resultados en cuanto a la eficiencia de asociación. Del mismo modo se determinó también la capacidad de carga máxima que presentan las nanoestructuras formadas utilizando para ello las mismas concentraciones de riboflavina testadas en el apartado anterior (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los reordenamientos estructurales promovidos en la β-Lg por la temperatura (exposición de grupos sulfhidrilo) y su posterior agregación a través del enfriamiento, consiguen que el lugar de unión interno de la proteína este expuesto y accesible para que los compuestos se liguen (Tavel et al., 2010). De este modo se consiguen alcanzar distintas eficiencias de asociación AE en función del tratamiento de temperatura utilizado y de las diferentes concentraciones de riboflavina añadidas a la red proteica.

En el siguiente gráfico se pueden observar los datos recogidos a lo largo de este ensayo para la eficiencia de asociación y la capacidad de carga de nuestras nanoestructuras con la riboflavina.

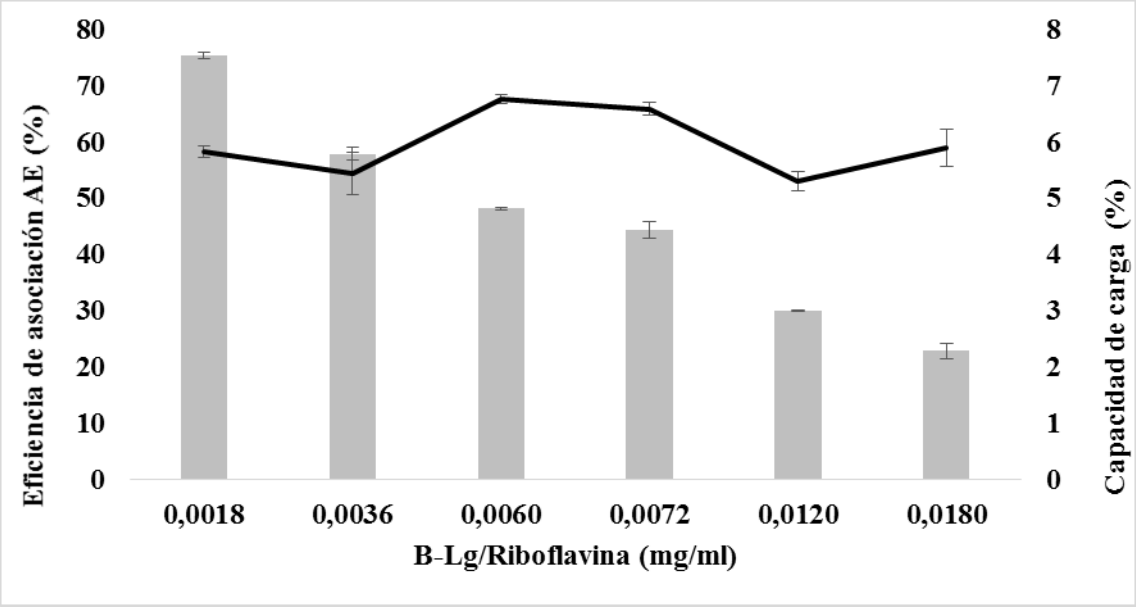

Figura 4.5: Eficiencia de asociación (columnas) y capacidad de carga (línea) frente a las distintas concentraciones de riboflavina testadas (0,0018; 0,0036; 0,0060; 0,0072; 0,0120 y 0,0180 mg/mL).

Analizando estos resultados podemos observar que los valores para la eficiencia de asociación siguen una tendencia clara. A medida que se va aumentando la concentración de la riboflavina añadida el porcentaje de asociación va disminuyendo. Pasamos de tener un porcentaje de asociación 75,54 ± 0,54% para una concentración de riboflavina de 0,0018 mg/mL a tener un valor de 22,92 ± 1,45 % para una concentración de 0,0180 mg/mL, Un porcentaje estadísticamente tres veces menor. En cuanto a la capacidad de carga se aprecia que no hay apenas diferencias entre ellas, teniendo una LC máxima de 6,76 ± 0.08% para una concentración de riboflavina de 0,0060 mg/mL y una mínima de 5,32 ± 0.17% para una concentración de 0,0120 mg/mL. Se puede concluir por tanto que la concentración de riboflavina que mejores resultados presenta en cuanto a eficiencia de asociación es de 0,0018 mg/mL con una AE de 75,54 ± 0,54 %, mientras que para la capacidad de carga los mejores resultados los presenta la concentración de 0,0060 mg/mL con valores de 6,76 ± 0.08 %. Este valor para la capacidad de carga no presenta diferencias estadísticamente significativas con el valor de LC para la concentración de 0,0018 mg/mL de riboflavina de 5.84 ± 0.10%, por lo que a pesar de ser un valor ligeramente inferior se seleccionó esta última concentración como la más adecuada para adicionar a las nanoestructuras.

En trabajos similares como el de Azevedo et al. (2014), se consiguieron producir nanopartículas con unos valores de AE 55,9 ± 5,6% y de LC de 2,2 ± 0,6% para la riboflavina, utilizando como material base la combinación de dos tipos de polisacáridos (alginato/quitosano). Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos a lo largo de este trabajo se puede observar que los valores AE y LC que aquí se presentan son muy superiores al resto de los trabajos. En el caso particular de Azevedo et al. (2014) esto puede ser explicado por los diferentes materiales usados como agentes encapsulantes (alginato/quitosano), las condiciones de producción de las nanoparticulas (p.ej. pH 4.6-4.9), así como el método utilizado en la determinación de la AE y la LC (método Amicon).

4.4- EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA RIBOFLAVINA

Se sabe que la riboflavina es una vitamina muy sensible a la fotodegradación, por ese motivo en este último apartado de resultados se procedió a evaluar la estabilidad que presentan las nanoestructuras de β-Lg/riboflavina frente a la luz. Para ello se analizó el comportamiento que presentaban por un lado las muestras de riboflavina libre cuando están sometidas a luz blanca (lámparas fluorescentes) y cuando se encuentran mantenidas en la oscuridad y del mismo modo se analizaron las muestras con las nanoestructuras de β-Lg/riboflavina, también cuando se encuentran bajo luz blanca y cuando se mantienen en la oscuridad.

La siguiente figura representa los datos de concentración recogidos tras diferentes periodos de tiempo y para los cuatro tipos de muestra, donde se aprecia la degradación de la riboflavina con la luz. Los datos están normalizados (con relación a la concentración) para permitir una comparación efectiva.

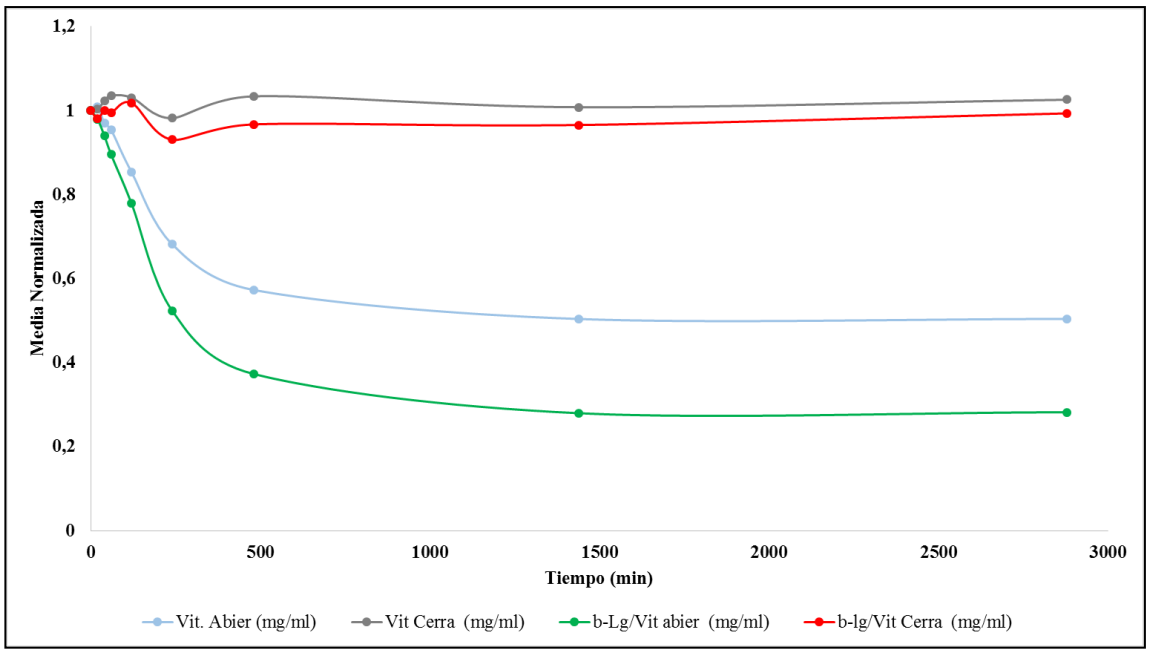

Figura 4.6: Comportamiento de la riboflavina bajo las distintas condiciones de tratamiento frente al tiempo.

Tras tratar y analizar los datos obtenidos la primera conclusión que se puede extraer es que la β-Lg no degrada la riboflavina. Esto se pudo verificar tras observar que el comportamiento que presenta el control de β-Lg/riboflavina protegido de la luz es igual

que el presentado por el control de vitamina libre protegido. Ambas muestras se mantienen estables a lo largo del tiempo. Por tanto, la concentración de riboflavina inicial (0,0018 mg/mL) añadida en los dos controles no sufrió degradación tras 48 h cuando la muestra se protegió de la luz.

Posteriormente se representó la siguiente gráfica para poder evaluar la protección que ofrecen las nanoestructras de β-Lg/riboflavina cuando están sometidas a la luz en comparación con las muestras de riboflavina libre bajo las mismas condiciones.

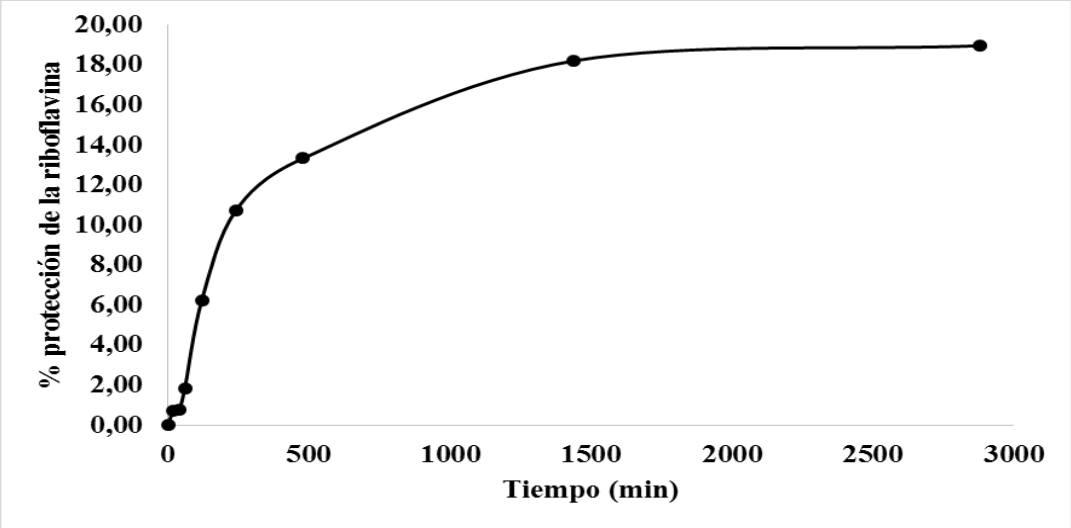

Figura 4.7: Respresentación del % de riboflavina protegida.

Tras analizar la gráfica podemos observar que los porcentajes de protección van aumentando con el tiempo, así a los 240 min (4 h) el porcentaje de protección que ofrecen las nanoestructuras de β-Lg/ riboflavina es ya un 10% mayor que la protección que pudieran tener las muestras de riboflavina libre. Si tomamos tiempos más largos como 24 y 48 h, que corresponden a los últimos dos puntos de la gráfica, vemos que el porcentaje de protección se estabiliza alcanzando unos valores de 18,19% y 18,95% respectivamente. Estos resultados demuestran por tanto, que la capacidad protectora que presentan los nanosistemas de β-Lg cuando se encapsula riboflavina en ellos es casi un 19 % mayor de la protección que pudiera tener la riboflavina libre por si sola.

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

5.1-CONCLUSIONES

La nanotecnología es una tecnología revolucionaria que presenta múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, principalmente en el desarrollo de nuevos sistemas de embalaje y de nanosistemas para la liberación controlada de compuestos bioactivos. Siguiendo esta línea este trabajo muestra que la β-Lg es una proteína capaz de formar nanoestructuras para la encapsulación y posterior liberación controlada de riboflavina mediante el control de la temperatura, el pH, las concentraciones de proteína iniciales y los tiempos de calentamiento. Las mejores condiciones para la fabricación de estas nanoestructuras formadas a partir de β-Lg fueron obtenidas a una concentración de proteína inicial del 0,5% (p/v), pH 6, una temperartura de 80 ºC y tras 15 min de calentamiento. También se observó que cuando a estas nanoestructuras se les adiciona diferentes concentraciones de riboflavina con la intención de encapsularla no se producen diferencias en el tamaño de partícula, manteniéndose por tanto la estabilidad de las nanoestructuras. Además se calcularon los porcentajes de eficiencia de asociación y de capacidad de carga que presentaban las nanoestructuras cuando se les adicionaban las distintas concentraciones de riboflavina y se pudo observar que la concentración de riboflavina a adicionar que mejores resultados presentó fue de 0,0018 mg/mL con una AE del 75,54 ± 0,54% y una LC del 5.84 ± 0.10%. Por último tras someter a las nanoestructuras a un ensayo de estabilidad frente a la luz se pudo observar que las muestras con el complejo β-Lg/riboflavina presentan un porcentaje de protección casi un 19% mayor del que ofrece la riboflavina libre por sola.

Se puede concluir por tanto que las nanoestructuras de β-Lg aquí fabricadas pueden ser aplicadas en la industria alimentaria, pudiendo ser utilizadas para complementar los alimentos con riboflavina gracias a su estabilidad, su capacidad de protección y su alto valor funcional y nutricional.

5.2-TRABAJO FUTURO

En un futuro serán necesarios más ensayos de estabilidad (pH, condicones de almacenaje) para terminar de evaluar la estabilidad de las nanoestructuras. Así mismo será necesario realizar pruebas en un sistema gastrointestinal dinámico (tán identico al sistema gastrointestinal humano como sea posible) y en líneas celulares (para imitar al máximo las células intestinales humanas) para evaluar la permeabilidad y las tasas de absorción de la riboflavina y obterner resultados más precisos con el fin de comprender mejor el comportamiento de las nanoestructuras en condiciones gastrointestinales simuladas. También será de vital importancia estudiar el comportamiento de las nanoestructuras con riboflavina en matrices alimentarias.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *14*(1), 3–15. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.002

Ahmed, I. S., & Ayres, J. W. (2007). Bioavailability of riboflavin from a gastric retention formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, *330*(1–2), 146–154. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.021

Aprodu, I., Ursache, F. M., Turturica, M., Râpeanu, G., & Stanciuc, N. (2017). Thermal stability of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) and bovine β-lactoglobulin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *173*, 562–571. https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.10.010

Ashoori, M., & Saedisomeolia, A. (2014). Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. *British Journal of Nutrition*, *111*(11), 1985–1991. https://doi.org/10.1017/S0007114514000178

Azcona, C. (2013). Otros componentes bioactivos. *Manual de Nutrición Y Dietética*, 1–4.

Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2014). Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, *71*, 141–146. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.036

Ball, M. (1988). *Vitamins: Their Role in the Human Body*. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01002.x

Bengoechea, Peinado, & McClements. (2011). Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: factors affecting particle characteristics. *Food Hydrocolloids*, *25(5)*, 1354e1360.

Bernardos, A., Aznar, E., Coll, C., Martínez-mañez, R., Manuel, J., Dolores, M., … Soto, J. (2008). Controlled release of vitamin B 2 using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffoldings. *Journal of Controlled Release*, *131*(3), 181–189. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.07.037

Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Pereira, R. N., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Development and characterization of lactoferrin-GMP nanohydrogels: Evaluation of pH, ionic strength and temperature effect.

Food Hydrocolloids, *48*, 292–300. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.026

Bracho Nava, M. (2012). *Proteínas. Generalidades de las biomoléculas. estructura y propiedades físico- químicas de las proteínas, péptidos y aminoácidos.*

Branco, C. Q. (2015). *Production of nano-systems of whey protein by conventional and ohmic heating*.

Bumbudsanpharoke, N., & Ko, S. (2015). Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. *Journal of Food Science*, *80*(5), R910–R923. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 155–171. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049

Cerqueira, M. A., Pinheiro, A. C., Silva, H. D., Ramos, P. E., Azevedo, M. A., Flores-López, M. L., … Vicente, A. A. (2014). Design of Bio-nanosystems for Oral Delivery of Functional Compounds. *Food Engineering Reviews*, *6*(1–2), 1–19. https://doi.org/10.1007/s12393-013-9074-3

Chalé, F. H., Ancona, D. B., & Campos, M. R. S. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutricion Hospitalaria*, *29*(1), 10–20. https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990

Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(5), 272–283. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.011

Choi, A.-J., Kim, C.-J., Cho, Y.-J., Hwang, J.-K., & Kim, C.-T. (2011). Characterization of Capsaicin-Loaded Nanoemulsions Stabilized with Alginate and Chitosan by Self-assembly. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(6), 1119–1126. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0568-9

Combs, G. F. (2008). *The vitamins. Fundamental aspects in Nutrition and Health.*

Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., & Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry - Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science and Technology*, *24*(1), 30–46. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.10.006

Dai, Z., & Koh, W. P. (2015). B-vitamins and bone health–a review of the current

evidence. *Nutrients*, *7*(5), 3322–3346. https://doi.org/10.3390/nu7053322

de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*. https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.010

de Souza Simões, L., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2017). Design of micro- and nanostructures from β-lactoglobulin under selected environmental conditions. *Publication in Conference Proceedings of 19th Gums & Stabilisers for the Food Industry (2017),*pp 99 27-30 June, Berlin, Germany.

Diarrassouba, F. (2013). Interactions between β -lactoglobulin and nutraceutical ligands riboflavin , vitamin D3 and Lysozyme.

Durán, N., & Marcato, P. D. (2013). Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*(6), 1127–1134. https://doi.org/10.1111/ijfs.12027

Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(3), 628–647. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0

Harvey, B. J., Bell, E., & Brancaleon, L. (2007). A tryptophan rotamer located in a polar environment probes pH-dependent conformational changes in bovine β-Lactoglobulin A. *Journal of Physical Chemistry B*, *111*(10), 2610–2620. https://doi.org/10.1021/jp065783a

Hoffmann, M. a M., & Mil, P. J. J. M. Van. (1997). Heat-Induced Aggregation of -Lactoglobulin : Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(96), 2942–2948. https://doi.org/10.1021/jf960789q

Katouzian, I., & Jafari, S. M. (2016). Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science and Technology*, *53*, 34–48. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.002

Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited Review: β-Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, *87*(4), 785–796. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1

Liu, F., & Urban, M. W. (2010). Recent advances and challenges in designing stimuli-responsive polymers. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *35*(1–2), 3–23.

https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.10.002

Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *15*(1–2), 73–83. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002

Mack, M., & Grill, S. (2006). Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(3), 265–275. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0421-7

Madalena, D. A. (2016). *Production of nanostructures for encapsulation and controlled release of nutraceuticals*.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Research International*, *40*(10), 1197–1211. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005

Malvern Instruments. (2004). Zetasizer Nano Series User Manual. https://doi.org/Malvern Instruments Ltd pp.1–270.

Martínez, C., Ros, G., Periago, M. J., & López, G. (1999). Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, *49*(2), 106–113.

McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, *72*(8). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x

McIntosh, G. H., Royle, P. J., Le Leu, R. K., Regester, G. O., Johnson, M. a, Grinsted, R. L., … Smithers, G. W. (1998). Whey proteins as functional food ingredients? *International Dairy Journal*, *8*(98), 425–434. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00065-X

Momin, J. K., Jayakumar, C., & Prajapati, J. B. (2013). Potential of nanotechnology in functional foods. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *25*(1), 10–19. https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i1.9368

Musyanovych, A., & Landfester, K. (2014). Polymer micro- and nanocapsules as biological carriers with multifunctional properties. *Macromolecular Bioscience*, *14*(4), 458–477. https://doi.org/10.1002/mabi.201300551

Neethirajan, S., & Jayas, D. S. (2011). Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(1), 39–47. https://doi.org/10.1007/s11947-010-0328-2

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger-Principles of Biochemistry*.

Biochemistry. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385183-3.00003-6

Northrop-Clewes, C. A., & Thurnham, D. I. (2012). The discovery and characterization of riboflavin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(3), 224–230. https://doi.org/10.1159/000343111

Okuro, P. K., & Gonc, J. (2017). WHEY PROTEIN AS A KEY COMPONENT IN FOOD SYSTEMS : *Food Structure*. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004

Olivares-Quiroz, L., García, L., & Scherer, -Colín. (2004). Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Rev. Soc. Quím. Méx*, *48*(December), 95–105.

Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., & Manavalan, R. (2011). Nanoparticles–An Overview of Preparation and Characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *1*(6), 228–234. https://doi.org/10.7897/2230-8407.04408

Palencia Mendoza, Y. (2011). Sustancias bioactivas en los alimentos. *Prevention Juventud*, *2*, 1–9. Retrieved from http://www.unizar.es/med_naturista/bioactivos en alimentos.pdf

Pereira, R. N., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., & Teixeira, A. (2010). Effects of Electric Fields on Protein Unfolding and Aggregation : Influence on Edible Films Formation, 2912–2918.

Pinheiro, A. C. (2013). *Development of nanostructures for application in food technology – evaluation of their in vitro behaviour*.

Pinheiro, A. C., Ângelo, M., & Augusto, A. (2013). Nanotecnologia como ferramenta para produzir novos alimentos funcionais : vantagens e precauções, 22–26.

Prudencio, E. S., Muller, C. M. O., Fritzen-Freire, C. B., Amboni, R. D. M. C., & Petrus, J. C. C. (2014). Effect of whey nanofiltration process combined with diafiltration on the rheological and physicochemical properties of ricotta cheese. *Food Research International*, *56*, 92–99. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.017

Ramos, O. L., Pereira, R. N., Martins, A., Rodrigues, R., Fuciños, C., Teixeira, J. A., … Vicente, A. A. (2017). Design of whey protein nanostructures for incorporation and release of nutraceutical compounds in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(7), 1377–1393. https://doi.org/10.1080/10408398.2014.993749

Ramos, O. L., Pereira, R. N., Rodrigues, R., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2014). Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating

production. *FRIN*, *66*, 344–355. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.036

Ranjan, S., Dasgupta, N., Chakraborty, A. R., Melvin Samuel, S., Ramalingam, C., Shanker, R., & Kumar, A. (2014). Nanoscience and nanotechnologies in food industries: Opportunities and research trends. *Journal of Nanoparticle Research*, *16*(6). https://doi.org/10.1007/s11051-014-2464-5

Sekhon, B. (2010). Food nanotechnology - an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, *3*(1), 16. https://doi.org/10.2147/NSA.S8677

Serra, L., & Aranceta, J. (2002). Guía de alimentos funcionales. *Sociedad Española Nutrición Comunitaria. Instituto Omega 3. Confederaciñon de Consumidores Y Usuarios.*, 2–14.

Silva, H. D., Cerqueira, M. Â., & Vicente, A. A. (2012). Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(3), 854–867. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7

Tavel, L., Moreau, C., Bouhallab, S., Li-chan, E. C. Y., & Guichard, E. (2010). Interactions between aroma compounds and b -lactoglobulin in the heat-induced molten globule state. *Food Chemistry*, *119*(4), 1550–1556. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.041

Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., & Morales, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutrición*, *41*(2), 198–204. https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000200011

Yu, H., & Huang, Q. (2013). Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals and Functional Foods Using Nanotechnology. *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, *75*(1), 593–604. https://doi.org/10.1002/9781118451915.ch35

Zhang, J., Liu, X., Subirade, M., Zhou, P., & Liang, L. (2014). A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. *Food Chemistry*, *165*, 256–261. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.109