

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“Nanopartículas de proteína de soja: preparación,  
caracterización y aplicación a la encapsulación de  
 $\beta$ -caroteno”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**CLARISSA MURRU**

**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. **Marta Elena Díaz García** (Universidad de Oviedo)

## CERTIFICA:

Que D. **Clarissa Murru** 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, 11<sup>a</sup> promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 12 de Julio de 2017

Dra. Marta Elena Díaz García

Dr. Alfonso Fernández González

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS...**

*A mi tutora Marta Elena Díaz, por la oportunidad de realizar este proyecto y por acordarme en todo momento que hay que trabajar siempre con curiosidad y con ganas de aprender.*

*A mi tutor Alfonso Fernández, por su disponibilidad y sus consejos.*

*A Cristian y Jorge por su enorme paciencia y por estar siempre allí, ayudándome y sugiriéndome mejoras.*

*A Pelayo por su apoyo incondicional, para animarme cuando más lo necesito y por haber hecho este año un poco menos duro.*

*A mi familia, especialmente a mi madre, por haberme dado raíces fuertes para recordar siempre quien soy y grandes alas para convertirme en la persona que quiero. / Alla mia famiglia, specialmente a mia madre, per avermi dato radici forti per ricordare chi sono e ali grandi per poter diventare chi voglio.*

*....Gracias*

# 1 Índice

1	Índice.....	i
2	Lista de figuras.....	iii
3	Lista de tablas.....	v
4	Resumen.....	1
5	Abstract .....	1
6	Introducción .....	2
6.1	Nanotecnología y Nanomateriales.....	2
6.2	Las Nanopartículas.....	4
7	Objetivos .....	5
8	Consideraciones teóricas .....	6
8.1	La encapsulación.....	6
8.2	Encapsulación de compuestos con actividad funcional.....	7
8.3	Sistemas coloidales .....	8
8.3.1	Micelas .....	10
8.3.2	Liposomas .....	11
8.3.3	Emulsiones/Nanoemulsiones.....	11
8.3.4	Nanopartículas lipídicas sólidas.....	12
8.3.5	Nanopartículas poliméricas .....	12
8.4	Harina de soja.....	13
8.5	Proceso productivo de la harina de soja .....	15
8.6	Nanopartículas sintetizadas a partir de proteínas de soja .....	16
9	Importancia de la encapsulación del $\beta$ -caroteno .....	17
10	Proceso de producción de la sidra .....	18
11	Calidades de la magaya .....	21
12	METODOLOGÍA .....	22
13	Síntesis de nanopartículas .....	23
13.1	Preparación de proteínas aisladas de soja (SPI) .....	23
13.2	Preparación de nanocápsulas de proteínas de soja. ....	24
13.3	Nanoencapsulación de $\beta$ -caroteno.....	25
14	Estudio morfológico.....	26
14.1	TEM .....	26
14.2	Dynamic Light Scattering (DSL) .....	27

14.2.1	Potencial zeta.....	27
14.2.2	Principio de medición del potencial zeta.....	28
14.2.3	Medida de Potencial Zeta con Zetasizer Nano de Malvern Instruments .....	29
14.2.4	Tamaño de las nanopartículas .....	30
15	Estudio FTIR.....	32
15.1	Preparación muestra .....	32
15.2	FTIR .....	32
16	Eficiencia de la encapsulación .....	34
17	Metodo Folin-Ciocalteu.....	34
17.1	Preparación recta patrón y muestra .....	34
18	Liberación de $\beta$ -caroteno en PBS.....	34
19	RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	35
19.1	Caracterización morfológica .....	35
19.2	Índice de polidispersividad.....	37
19.3	Potencial zeta.....	39
19.4	Análisis por FTIR.....	42
19.5	Determinación de la eficiencia de la encapsulación.....	44
19.6	Liberación de $\beta$ -caroteno en PBS .....	46
20	Conclusiones .....	48
21	Bibliografía .....	49
22	Anexo I. Encapsulación de antioxidantes procedentes de magaya de sidra: estudios preliminares.....	52
22.1	Nanopartículas encapsuladas con antioxidantes.....	52
22.1.1	Extracción antioxidante procedentes de la magaya.....	52
22.1.2	Preparación nanopartículas encapsuladas con antioxidantes procedentes de magaya de sidra.....	52
22.1.3	Tamaño e índice de polidispersividad .....	53
22.2	Estudio FTIR.....	55
22.3	Determinación de antioxidantes extraídos en las nanopartículas con metodo Folin-Ciocateau.....	55
22.4	Eficiencia de encapsulación .....	56
23	Anexo II: Ensayo del Biuret para proteínas .....	58
23.1	Preparación del reactivo de Biuret .....	58
23.2	Metodología .....	58
24	Anexo III: Formación de nanopartículas en una secuencia de imágenes.....	60

## 2 Lista de figuras

- Figura 1. Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación: a) reservorio, b) matriz inclusiva, c) mixto y d) aglomerados. Fuente: Deladino y col. (2007) 7
- Figura 2. Ingredientes funcionales de mayor importancia. Fuente: Mintel (2009). 8
- Figura 3. Nanoformulaciones comunes para compuestos lípofílicos (Shin, Kim y Park, 2015). 9
- Figura 4. Nanoformulaciones (Katouzian y Mahdi, 2016). 10
- Figura 5. Representación de nanopartículas poliméricas. 13
- Figura 6. Soja Texturizada fina comercial, utilizada en este trabajo. 15
- Figura 7: Soja Texturizada tratada con mortero. 15
- Figura 8. Posibles estructuras de las nanocápsulas. 17
- Figura 9. Estructura molecular de: a)  $\beta$ -caroteno; b) vitamina A 18
- Figura 10. a) Sobrenadante básico obtenido después la primera centrifugación 23  
b) Precipitado obtenido tras acidular la solución y segunda centrifugación 23  
c) Diálisis del precipitado frente a agua desionizada. 23
- Figura 11. a) Nanocápsulas en suspensión etanol/glutaraldehído. 24
- Figura 12. a) Disoluciones con  $\beta$ -caroteno antes la acción del glutaraldehído 25
- Figura 13. Esquema básico de un microscopio electrónico de transmisión. 27
- Figura 14. Dos formas de visualizar la doble capa: la imagen izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide; la derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado. 29
- Figura 15. Componentes básicos del Zetasizer Nano. 30
- Figura 16. Función de correlación entre diámetro de la nanopartícula y el índice de polidispersidad. 31
- Figura 17. Representación de diferentes modos de vibración molecular 33
- Figura 18. Esquema básico de un sistema FTIR-ATR 33  
a diferentes concentraciones de SPI y etanol. 35
- Figura 21. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS. Nanopartículas 4mgSPI/mL - 10% con $\beta$ -caroteno. 37
- Figura 22. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS. Nanopartículas 4mgSPI/mL - 80% y  $\beta$ -caroteno. 37
- Figura 23. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS Nanopartículas 12mg SPI/mL-10% y  $\beta$ -caroteno. 38
- Figura 24. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS Nanopartículas 12mgSPI/mL - 80% y  $\beta$ -caroteno. 38
- Figura 25. Registro del potencial zeta obtenido por DLS. 39  
Nanopartículas 4mgSPI/mL - 10% - $\beta$ -caroteno. 39
- Figura 26. Registro del potencial zeta obtenido por DLS. 40  
Nanopartículas 4mgSPI/mL - 80% - $\beta$ -caroteno. 40
- Figura 27. Registro del potencial zeta obtenido por DLS. 40  
Nanopartículas 12mgSPI/mL - 10% - $\beta$ -caroteno. 40
- Figura 28. Registro del potencial zeta obtenido por DLS. 41  
Nanopartículas 12 mgSPI/mL - 80% - $\beta$ -caroteno. 41
- Figura 29. Espectro FTIR de las proteínas aisladas de soja 43
- Figura 30. Espectro FTIR del  $\beta$ -caroteno. 43
- Figura 31. Espectro FTIR de nanopartículas conteniendo  $\beta$ -caroteno encapsulado 44
- Figura 32. Recta de calibrado para  $\beta$ -caroteno en etanol. 45

*Figura 33. Recta de calibrado para la liberación de  $\beta$ -caroteno en PBS. 46*

*Figura 1A1. Extracto de magaya suspendido en etanol (matraz a la izquierda) y precipitado solido tras el tratamiento de la muestra con ultrasonidos (matraz a la derecha). 52*

*Figura 2A1. Disolución de SPI, agua, etanol,  $\beta$ -caroteno y glutaraldehído antes de la formación de las nanopartículas. 53*

*Figura 3A1. Distribución de diámetro por número obtenido por DLS de nanopartículas preparadas con 12mgSPI/mL - 10% y antioxidantes procedentes de magaya de sidra. 53*

*Figura 4A1. Potencial zeta obtenido por DLS. Nanopartículas 12mgSPI/mL - 10% encapsuladas con antioxidantes procedentes de magaya. 54*

*Figura 5A1. Comparación de los diferentes espectros obtenidos por FTIR. 55*

*Figura 6A1. Recta de calibrado para la determinación de la cantidad de antioxidantes extraídos de magaya de sidra 56*

*Figura 1A2. Recta de calibrado para determinar la cantidad de proteínas. 58*

*Figura 1A3. Agregado proteínico. 60*

*Figura 2A3. Agregado proteínico. 60*

*Figura 4A3. Nanopartícula completamente formada. 60*

*Figura 3A3. Formación de la nanopartícula. 60*

### 3 Lista de tablas

*Tabla 1. Aminoácidos en la harina de soja. 14*

*Tabla 2. Condiciones para la síntesis de nanopartículas encapsuladas. 25*

*Tabla 3. Diámetro promedio obtenido en la síntesis de nanopartículas a diferentes concentraciones de SPI y etanol. 35*

*Tabla 4. Índice de polidispersividad de NPs obtenidos por DSL. 39*

*Tabla 5. Potenciales zeta de nanopartículas obtenidos por DSL. 41*

*Tabla 6. Bandas IR de proteínas de soja (Chen X., Ru Y; Chen F; 2012). 42*

*Tabla 7. Eficencia de encapsulación de las nanopartículas encapsuladas. 45*



## 4 Resumen

El diseño de nanopartículas utilizadas para la encapsulación de nutrientes ha adquirido gran importancia en la industria de los alimentos; en particular resulta muy interesante el empleo de polímeros de grado alimenticio como las proteínas. Las nanopartículas diseñadas a partir de proteínas son ideales para la encapsulación y la protección de esos componentes que de otra manera no podrían ser incorporados a matrices alimentarias por su alta inestabilidad o incompatibilidad, como las vitaminas o los antioxidantes. En este trabajo se ha abordado la encapsulación de  $\beta$ -caroteno en nanopartículas obtenidas a partir de harina de soja desgrasada con objeto de ser incorporadas en productos alimentarios. El  $\beta$ -caroteno es un antioxidante natural y la encapsulación permite su estabilización, liberación y absorción, solucionando el problema de su naturaleza lipofílica. Las nanopartículas se obtuvieron a partir de aislados de proteínas de soja (SPI) diluidas en agua desionizada y etanol en porcentajes exactos y las nanoestructuras se formaron mediante el uso de un agente de cross-linker; se caracterizaron morfológicamente y espectroscópicamente y se analizó la eficiencia de encapsulación.

## 5 Abstract

The design of nanoparticles used for the encapsulation of nutrients has acquired great importance in the food industry, in particular is interesting the use of proteins. Nanoparticles designed from proteins are ideal for the encapsulation of those components that could not be incorporated in to food matrices because of their high instability or incompatibility, such as vitamins or antioxidants. This work describes the encapsulation of  $\beta$ -carotene in nanoparticles obtained from defatted soybean with the aim of being incorporated in food products.  $\beta$ -carotene is a natural antioxidant and encapsulation allows its stabilization, release and absorption, solving the problem of its lipophilic nature. Nanoparticles were obtained from soy protein isolates (SPI) diluted in deionized water and ethanol in exact percentages and the nanostructures were formed using a cross-linker agent. The nanoparticles were characterized morphologically and spectroscopically and the encapsulation efficiency was analyzed.

## 6 Introducción

### 6.1 Nanotecnología y Nanomateriales

La Nanotecnología es el estudio, diseño, creación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica. La nanotecnología es un campo muy amplio y heterogéneo de la tecnología en el que se diseñan componentes y sistemas manteniendo un control sobre el tamaño y la forma de sus elementos constituyentes a escala de los nanómetros, de tal manera que dichas estructuras poseen al menos una propiedad característica nueva o mejorada debido al pequeño tamaño de sus constituyentes. La Nanotecnología utiliza un amplio abanico de disciplinas científico-técnicas con el fin de estudiar materiales, partículas y estructuras que implican la creación o presencia de elementos que tienen al menos una dimensión espacial inferior a los 100 nm. Los materiales constituidos por estructuras tan pequeñas, a menudo presentan propiedades distintas a los materiales tradicionales independientemente de que estén compuestos por los mismos constituyentes químicos, ya que muchas de las propiedades de los materiales dependen del comportamiento de los electrones que se mueven en su seno o de cómo estén ordenados los átomos en la materia. En un material nanométrico, el movimiento de los electrones está muy limitado por las dimensiones del propio material. Además, la proporción de átomos en la superficie con respecto al interior es con mucho, más alta que en materiales de tamaño micro o macro. Por consiguiente, si se reducen las dimensiones de un material, éste puede presentar nuevas propiedades mecánicas, ópticas, químicas, magnéticas o electrónicas. Los nanomateriales pueden obtenerse del medio ambiente con sus características naturales o pueden ser generados de forma sintética.

Con el transcurrir de los años surgieron las más distintas investigaciones en las más diversas áreas de estudio. Esto posibilitó el desarrollo de diversos nanomateriales, nanopartículas y diversas hipótesis futurísticas, que cada día que pasa ya dejan de ser hipotéticas. Todos estos productos son de grandes beneficios a la sociedad, al medio ambiente y a la industria.

La Nanotecnología permite el desarrollo de nanoestructuras que forman bloques de construcción (building blocks) como clusters, nanopartículas, nanotubos y nanofibras que a su vez se forman a partir de átomos y moléculas. Manipulando estos bloques de construcción se forman los materiales y dispositivos nanoestructurados que es el

objetivo central de la Nanotecnología.

La Agencia del Medioambiente de los EE.UU. ha clasificado los nanomateriales actuales en cuatro tipos (Alonso, J.A. y Rubio, A. 2001):

- Basados en carbono

Estos nanomateriales están compuestos mayoritariamente por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales de carbono, huecos, con forma elipsoidal o esférica se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos reciben el nombre de nanotubos. Estas partículas tienen muchas aplicaciones posibles, incluido el desarrollo de recubrimientos y películas mejoradas, materiales más ligeros y resistentes y diversas aplicaciones en el campo de la electrónica. Asimismo, dentro de este grupo se encuentran los puntos cuánticos de carbono (carbon dots), caracterizados por su alto rendimiento cuántico de fluorescencia (Alonso, J.A. y Rubio, A. 2001).

- Basados en metales

Estos nanomateriales incluyen puntos cuánticos (quantum dots, sales de semiconductores), nanopartículas metálicas (p.e. de oro, plata, cobre) y nanopartículas de óxidos metálicos como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , etc.

- Dendrímeros

Estos nanomateriales son polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de un dendrímero tiene numerosos extremos de cadena, que se pueden adaptar para desempeñar funciones químicas específicas. Esta propiedad se podría utilizar también para la catálisis. Además, debido a que los dendrímeros tridimensionales contienen cavidades interiores en las que se pueden introducir otras moléculas, pueden ser útiles para la administración de fármacos.

- Compuestos

Los compuestos combinan las nanopartículas con otras nanopartículas o con materiales de mayor tamaño. Las nanopartículas, como arcilla a nanoescala, ya se están añadiendo a numerosos productos, desde piezas de automóviles a materiales de empaquetado, para mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas,

protectoras, etc. Estos materiales se conocen también con el nombre de nanocomposites.

## **6.2 Las Nanopartículas**

En las industrias farmacéutica y alimentaria ha crecido exponencialmente la tendencia a utilizar las nanopartículas como medio de transporte de fármacos y nutrientes, respectivamente; entre las más utilizadas se encuentran los liposomas, las micelas, las nanopartículas metálicas, lipídicas y las poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas se definen como partículas de tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , generalmente entre 10 y 500 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza. El método de fabricación, la composición química de éstos y la naturaleza del ligando influenciarán su funcionalidad y efectividad. Considerando la estructura física, las nanopartículas pueden clasificarse en nanoesferas y nanocápsulas; Las nanoesferas son sistemas matriciales, donde el elemento que nos interesa (bien un fármaco, una vitamina, o un colorante alimentario) está disperso en una matriz polimérica. Las nanocápsulas por su parte son sistemas de tipo reservorio, en donde el constituyente se encuentra en una cavidad central cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación dependiendo de su naturaleza química. Existen diversos materiales empleados como componente principal de la matriz que formará las nanopartículas: dentro de éstos se incluyen las grasas (fosfolípidos, ácidos grasos), las proteínas (gelatina, albúmina) y los polímeros, ya sea naturales (dextrano, quitosano), semisintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos poly(acrilatos), poly(anhídridos), poly(acrilamidas) y poly(ésteres).

Las ventajas que se obtienen empleando nanopartículas cargadas con moléculas terapéuticas son muchas; principalmente se mejora la estabilidad física y química de los compuestos activos encapsulados y también se aumenta la absorción de moléculas activas, lo que se traduce en una mejor biodisponibilidad. Un ejemplo puede ser representado por el uso de las proteínas de soja como nanocarries de la curcumina, (Chen F.P., Ou S.Y., Chen Z., Tang C.,H., 2017). La curcumina es un compuesto polifenólico extraído de los rizomas de la planta de la cúrcuma que posee un gran número de actividades biológicas, incluyendo actividades antioxidantes, anti-inflamatorias, y actividades anticáncerígenas. Sin embargo, su baja solubilidad en agua y la pobre biodisponibilidad de este compuesto limitan en gran medida su aplicación en

formulaciones de alimentos funcionales. El trabajo describe como sea posible el empleo de proteínas de soja como vehículo para aumentar la solubilidad y la estabilidad de la curcumina.

En el caso de los fármacos las nanopartículas pueden alcanzar tejidos/barreras específicas y penetrar células inalcanzables por principios activos convencionales gracias a su pequeño diámetro y disminuir los efectos adversos y toxicidad asociada a la administración de fármaco libre.

## 7 Objetivos

En este trabajo se ha propuesto la encapsulación del nutriente  $\beta$ -caroteno en nanopartículas sintetizadas a partir de proteínas de soja aisladas con objeto de aumentar la estabilidad del compuesto. El  $\beta$ -caroteno es un compuesto que se utiliza como aditivo alimentario por ser un colorante natural y porque es un poderoso antioxidante. Se decidió utilizar la soja por sus altos valores nutricionales y porque posee una composición equilibrada de aminoácidos no polares, polares y cargados, pudiendo así incorporar compuestos con diversos grupos funcionales. La soja es un ingrediente ampliamente utilizado en la industria alimentaria a causa de su excelente biocompatibilidad y es ideal para la síntesis de nanoestructuras con el objetivo de encapsular componentes lipófilos, tales como el  $\beta$ -caroteno.

A continuación, se enumeran los objetivos de este trabajo:

- Extracción y caracterización de proteínas aisladas (SPI) a partir de harina de soja desgrasada.
- Síntesis de nanopartículas obtenidas a partir de SPI empleando medios acuosos y disolventes polares y agentes reticulantes. Caracterización físico-química de las nanopartículas sintetizadas.
- Encapsulación de  $\beta$ -caroteno en las nanopartículas de SPI y evaluación del proceso de encapsulación y estabilidad del material encapsulado.

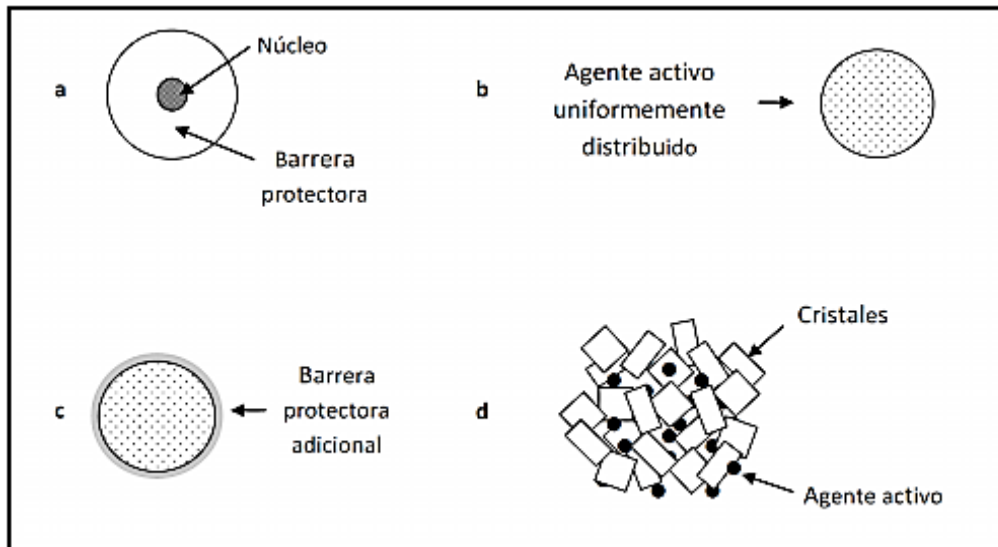
## 8 Consideraciones teóricas

### 8.1 La encapsulación

La encapsulación es una de las técnicas más usadas en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceuticos. La encapsulación ha sido definida como la tecnología mediante la cual se logra confinar compuestos activos dentro de una matriz polimérica. Esta técnica crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior (Borgogna, y col., 2010). Algunos de los objetivos que se pretenden abordar con la técnica de encapsulación y/o nanoencapsulación en la industria de alimentos son (Champagne, y col., 2007; Onwulata, 2012):

- Proteger el compuesto activo de la degradación producida por el ambiente (calor, aire, luz, humedad, etc.)
- Liberación controlada del compuesto activo desde la matriz encapsulante bajo condiciones específicas (pH, temperatura, etc.)
- Modificar las características físicas del material original y hacer más fácil su manipulación. Por ejemplo, reducir la higroscopicidad, modificar su densidad, distribuir el material uniformemente en una muestra, convertir materiales líquidos en polvo, entre otros.
- Enmascarar sabores desagradables.
- Separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen.

Se pueden obtener diversos tipos de microcápsulas, nanocápsulas, aglomerados o cápsulas dependiendo de los ingredientes y del procedimiento de obtención (Deladino, y col., 2007b). La Fig.1 muestra una representación esquemática de los sistemas más comunes. Los reservorios o sistemas núcleo-capa externa consisten en un interior constituido por el material activo y un recubrimiento denominado material de cubierta, pared, barrera, o encapsulante el cual puede estar formado por una o varias capas concéntricas. La velocidad de liberación de estos sistemas depende del grosor, el área y la permeabilidad de la barrera.

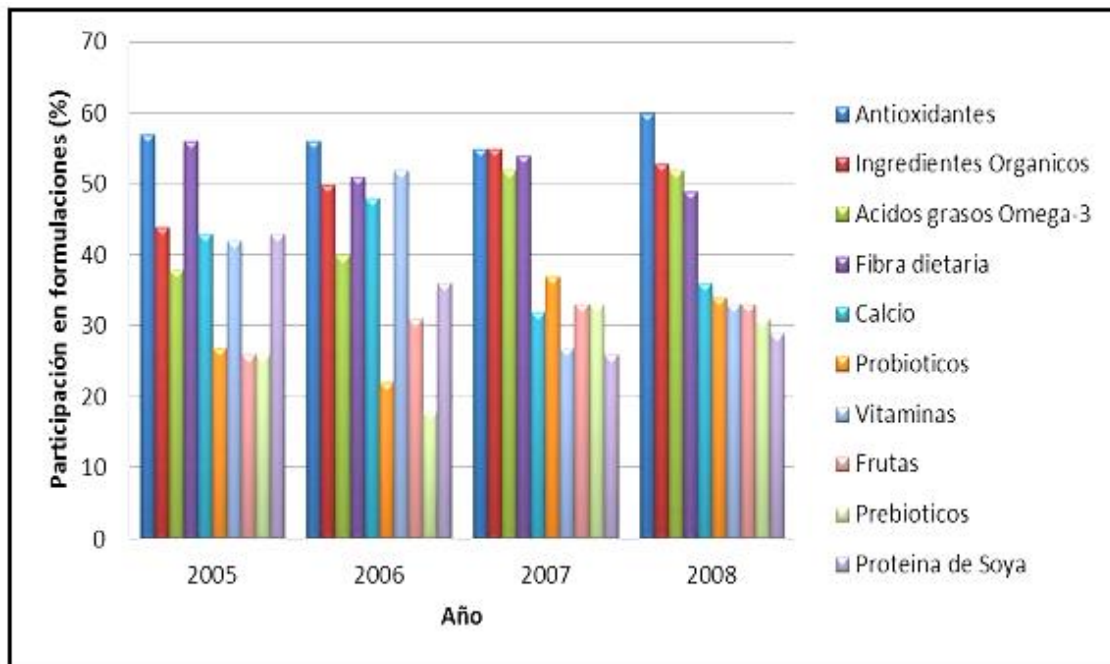


**Figura 1. Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación: a) reservorio, b) matriz inclusiva, c) mixto y d) aglomerados. Fuente: Deladino y col. (2007)**

El sistema matriz inclusiva consiste en una mezcla homogénea del ingrediente activo y el material encapsulante (Fig. 1.b). Parte del compuesto activo se encontraría en la superficie de la cápsula desprotegido. La liberación en estos sistemas depende del tipo del material de la matriz, la forma de la cápsula y la cantidad de compuesto activo.

## **8.2 Encapsulación de compuestos con actividad funcional**

El aumento en la demanda de alimentos saludables ha provocado el desarrollo de nuevos aditivos e ingredientes alimentarios. Sin embargo, el reto es asegurar que estos ingredientes permanezcan efectivos durante la elaboración y el almacenamiento del producto (Onwulata, 2011). Los alimentos pueden ser utilizados como un vehículo eficaz para el suministro de compuestos bioactivos y micronutrientes en los niveles adecuados. Dentro de los ingredientes funcionales de mayor importancia utilizados en la preparación de alimentos se encuentran los antioxidantes, ingredientes orgánicos, ácidos grasos omega-3, fibra, minerales, probióticos, entre otros (Day, y col., 2009). En la Figura 2 se muestra la evolución en la utilización de este tipo de ingredientes entre los años 2005-2008.



**Figura2. Ingredientes funcionales de mayor importancia. Fuente: Mintel (2009).**

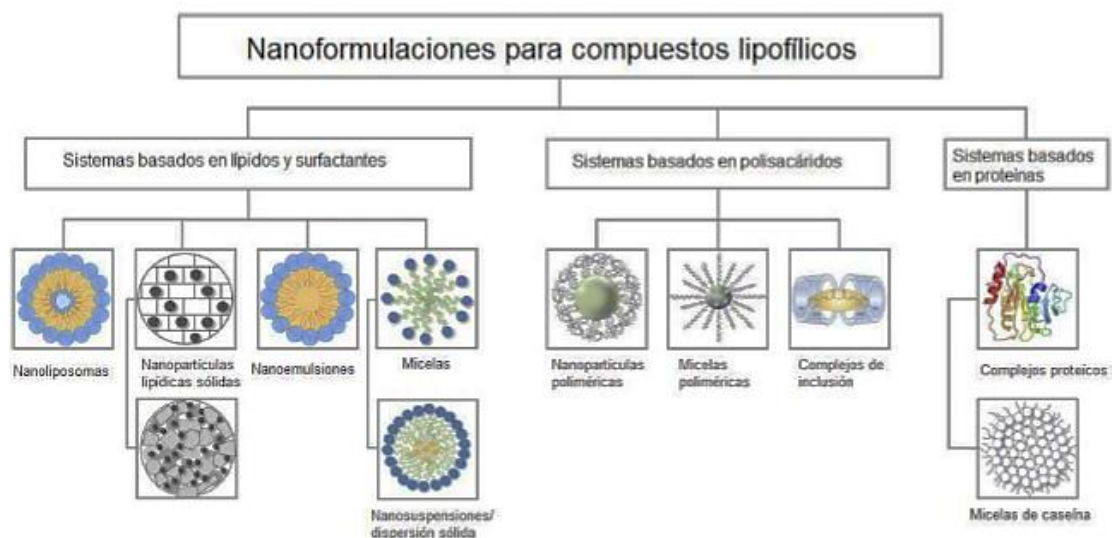
El desequilibrio entre la generación de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la acción de los sistemas de defensa antioxidante del organismo, es una de las causas más importantes en la generación de enfermedades (Moure, y col., 2001; Zhang, y col., 2007). Por esta razón, el desarrollo de alimentos funcionales que contribuyan a contrarrestar la agresión oxidativa y sus efectos adversos, es uno de los desafíos más ambiciosos de la industria alimentaria. La utilización de los polifenoles encapsulados en lugar de compuestos libres pueden superar los inconvenientes de su inestabilidad, disminuir el gusto desagradable, así como mejorar la biodisponibilidad y la vida útil del compuesto.

### 8.3 Sistemas coloidales

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



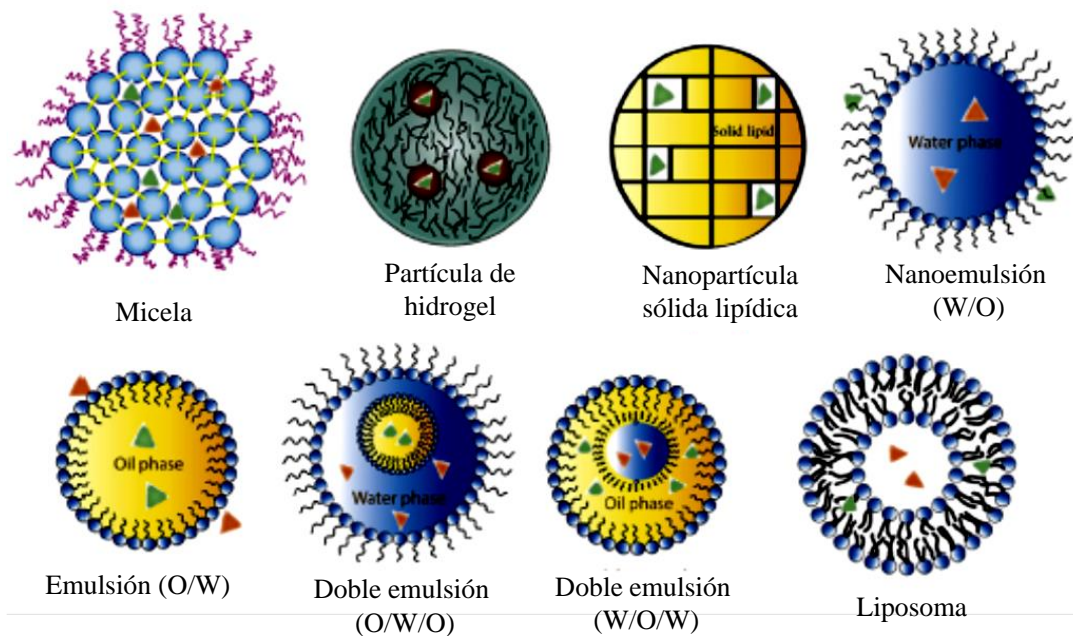
Los sistemas de liberación coloidal pueden estar compuestos de un solo componente activo (partículas coloidales) o una combinación de bioactivos incorporados a una matriz (por ejemplo, nanopartículas poliméricas, partículas sólidas de lípidos, etc.). El estado de agregación podría ser líquido (emulsiones), cristalino o sólido amorfo (partículas coloidales) y cristales líquidos (mesofases). El tamaño puede variar desde 10 nm para las micelas o cientos de nanómetros para otras dispersiones. La estabilización es un requisito fundamental para la formación de sistemas coloidales, y se puede lograr por carga superficial (estabilización electrostática), por adsorción superficial de una capa de tensoactivo o polímero (estabilización estérica) o por una combinación de ambas (estabilización electroestérica) (Patel y Velikov, 2011). En la Fig 3. se muestran algunas estrategias para la nanoencapsulación de compuestos lipofílicos.



**Figura3. Nanoformulaciones comunes para compuestos lipofílicos (Shin, Kim y Park, 2015).**

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

bioactivo a través de distintos mecanismos (aumento de su estabilidad durante la digestión, mejora de su solubilidad en los fluidos intestinales y mejora de su transporte y absorción) (Livney, 2015). En la Fig.4 se muestran algunas nanoformulaciones típicas.



**Figura4. Nanoformulaciones (Katouzian y Mahdi, 2016).**

A continuación, se resumen los principales sistemas de liberación coloidal de interés para uso en alimentos.

### 8.3.1 Micelas

Se denomina micela a la agrupación de moléculas anfifílicas, en estructuras aproximadamente esféricas, que constituye una de las fases de los coloides en disoluciones acuosas los grupos polares tienden a situarse en la superficie mientras que las partes apolares quedan inmersas en el interior de la micela en una disposición que elimina los contactos desfavorables entre el agua y las zonas hidrófobas y permite la solvatación de los grupos de las cadenas polares. Los compuestos activos con carácter lipofílico son encapsulados en el núcleo de la micela.

La formación de micelas es un proceso cooperativo, el ensamblaje de pocas moléculas no puede proteger las colas hidrófobas del contacto con el agua; en consecuencia, las disoluciones acuosas de sustancias anfifílicas no forman micelas hasta que su concentración no alcanza un valor crítico, la **concentración micelar crítica (CMC)**,

por encima del cual todas las moléculas anfifílicas adicionales se agregan para formar micelas. El valor de la CMC depende del tipo de molécula, concretamente de su balance lipofilia/hidrofilia (moléculas con regiones hidrófobas largas tienen valores de CMC más bajos), de las características de la disolución (fuerza iónica) y de la temperatura. Los sistemas micelares presentan las siguientes ventajas: tamaño pequeño (10-30 nm), estabilidad termodinámica y estabilidad coloidal. Sin embargo, tienen una limitada solubilidad que viene determinada por la naturaleza de la sustancia anfifílica y su concentración.

### **8.3.2 Liposomas**

Los liposomas son nanopartículas que cuyo diámetro oscila entre los 20 nm y 500  $\mu\text{m}$ . Son esferas huecas donde la pared que separa el medio interno del medio externo es una bicapa lipídica (ver Figura 4). Al estar compuestos tanto por una fracción lipídica como por una fracción acuosa, los liposomas pueden alojar sustancias lipofílicas y/o sustancias hidrofílicas. Los liposomas vacíos pueden presentar una amplia gama de variantes, como diferentes tamaños o diferentes grados de rigidez en la membrana. No todos los tamaños son igualmente estables en cuanto a la ruptura de la membrana lipídica. Sus principales limitaciones son el alto costo de las materias primas y el uso de disolventes orgánicos y tensoactivos sintéticos en el proceso de preparación, baja estabilidad a pH ácido y sobre todo la baja eficiencia de encapsulación.

### **8.3.3 Emulsiones/Nanoemulsiones**

Una emulsión se refiere a un sistema de dispersión no estable termodinámicamente compuesto por dos líquidos inmiscibles y que es estabilizado utilizando moléculas de superficie activa (agentes tensoactivos). Pueden estar compuestos por gotas con tamaños que van desde varias decenas de nanómetros a milímetros. Las microemulsiones son similares a las micelas en cuanto su comportamiento debido a su organización espontánea. Tanto las emulsiones como las nanoemulsiones son adecuadas para solubilizar activos lipofílicos.

### **8.3.4 Nanopartículas lipídicas sólidas**

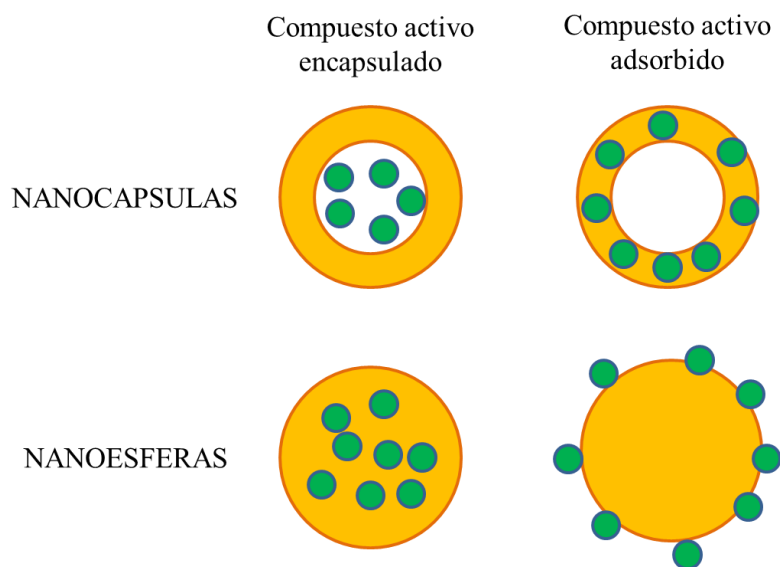
Las nanopartículas lipídicas fueron desarrolladas como un sistema de transporte alternativo a las emulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas. Son similares a las nanoemulsiones, pero en este caso el lípido está totalmente o parcialmente cristalizado a temperatura ambiente. Esto se consigue calentando el lípido por encima de su temperatura de fusión y disolviendo el compuesto a encapsular. A continuación, la mezcla se dispersa y homogeniza en una solución acuosa con un tensoactivo precalentado a la misma temperatura. Por último, se somete a homogenización a alta presión para obtener una emulsión O/W. Las nanopartículas sólidas se obtienen por enfriamiento y recristalización de la emulsión O/W a temperatura ambiente. Las ventajas de la utilización de las nanopartículas lipídicas como transportadores incluyen la utilización de lípidos fisiológicamente aceptables para su preparación, la posibilidad de evitar el uso de disolventes orgánicos en su preparación y un espectro de utilización amplio. Las nanopartículas lipídicas presentan una mejor biodisponibilidad, protegen las moléculas encapsuladas susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, y podrían ser de liberación prolongada para sustancias activas poco solubles en agua incorporadas en la matriz lipídica sólida.

Entre sus desventajas estarían el crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, una tendencia hacia una gelificación impredecible, cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de los compuestos activos debido a la estructura cristalina del lípido sólido.

### **8.3.5 Nanopartículas poliméricas**

Las nanopartículas poliméricas sólidas son partículas de menos de, aproximadamente, 1  $\mu\text{m}$  de diámetro que se preparan a partir de polímeros naturales o sintéticos. Las nanopartículas son un término colectivo empleado para las nanocápsulas y nanoesferas. Las primeras son sistemas vesiculares en los que el principio activo está confinado en una cavidad o núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica, mientras que las esferas son sistemas matriciales en los que el activo se encuentra incrustado en la matriz polimérica de manera uniforme. La principal ventaja de las nanocápsulas frente a las

nanoesferas es su menor contenido polimérico y mayor eficiencia de encapsulación (Teixeira et al., 2012).



**Figura5. Representación de nanopartículas poliméricas.**

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

#### **8.4 Harina de soja**

La harina de soja es un tipo de harina obtenida a partir de granos enteros molidos de soja que tiene un alto porcentaje de proteínas. La harina de soja conserva todas las cualidades del material de partida y es considerada una importante fuente de minerales

y vitaminas. En la Tabla 1 se muestra la composición en aminoácidos de la harina de soja. Además, posee elevados niveles de lecitina, una sustancia emulsionante y antioxidante que ayuda a normalizar los valores de colesterol en sangre. Tomar harina de soja, al estar entre los alimentos ricos en fibra, ayuda a favorecer el tránsito intestinal, ayuda a controlar la obesidad y es recomendable para mejorar el control de la glucemia en personas con diabetes, reducir el colesterol y prevenir el cáncer de colon. La harina de soja es de color amarillo pálido uniforme y tiene un ligero aroma a nueces. Se comercializa al peso o envasada de fábrica, en las siguientes variedades:

- Sin desgrasar (se obtiene a partir de las semillas enteras)
- Desgrasada (se obtiene a partir de las semillas a las que previamente se les ha extraído todo el aceite).

**Tabla 2. Aminoácidos en la harina de soja.**

<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad, mg</b>	<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad, mg</b>
Ácido aspártico	4095	Leucina	2632
Ácido glutámico	7156	Lisina	2340
Alanina	1535	Metionina	530
Arginina	2870	Prolina	2139
Cistina	539	Serina	1901
Fenilalanina	1700	Tirosina	1325
Glicina	1535	Treonina	1471
Hidroxiprolina	0	Triptofano	439
Histidina	868	Valina	1800
Isoleucina	1737		

## 8.5 Proceso productivo de la harina de soja

El proceso de producción comienza con el lavado de la soja y el secado de la misma sin superar el 11% de humedad. Posteriormente la soja se deposita en un almacén y se selecciona con una clasificadora, la cual se encarga de retirar las impurezas (piedras), soplando y ventilando la materia prima. El siguiente paso consiste en tostar la soja en una máquina tostadora durante unos 45 minutos, realizando varias veces la operación de tostado para luego pelar los granos de forma manual. Una máquina ventiladora se encarga de desechar la cáscara que se obtuvo en el proceso anterior antes de los procesos de molienda y tamizado. Finalmente, se muele la soja en un molino y en tamices adecuados se retienen los granos más grandes que no hayan sido debidamente molidos.



**Figura 6. Soja Texturizada fina comercial, utilizada en este trabajo.**



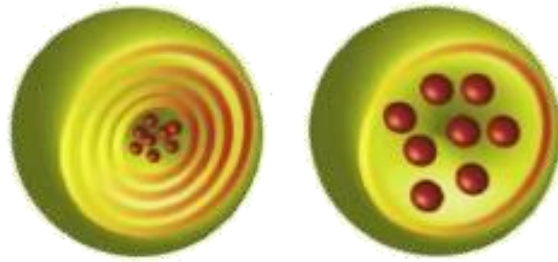
**Figura 7. Soja texturizada sometida a molienda fina en mortero.**

## 8.6 Nanopartículas sintetizadas a partir de proteínas de soja

Las proteínas son consideradas un material ideal para la formación de nanopartículas ya que gracias a su naturaleza anfifílica pueden interactuar tanto con el compuesto que se quiere encapsular como con el disolvente. Ha sido posible crear nanopartículas a partir de proteínas solubles en agua (albúmina de suero humano o bovino) y de proteínas insolubles (zeína, gliadina etc.), ya que aportan numerosas ventajas como es el aumento de la solubilidad de nutraceuticos encapsulados y su biodisponibilidad. Sin embargo, algunas de estas nanopartículas tienen varias limitaciones en su uso en la industria farmacéutica y alimentaria; por ejemplo, la albúmina tiene un bajo contenido de aminoácidos hidrófobos, por lo que es menos capaz de encapsular nutraceuticos con muchos grupos hidrofóbicos. En contraste las nanopartículas preparadas con zeína o gliadina pueden utilizarse satisfactoriamente en la incorporación de sustancias hidrofóbicas, pero su bajo contenido en aminoácidos hidrófilos y cargados limitas su solubilidad en medios acuosos.

Otra fuente de proteína utilizada para la formación de nanopartículas es la soja. La forma enriquecida de proteína de soja, conocida como aislado de proteína de soja (SPI), posee altos valores nutricionales y tiene amplia aplicación como ingrediente alimentario; además SPI posee una composición equilibrada de aminoácidos no polares, polares y cargados, pudiendo así incorporar fármacos o compuestos con diversos grupos funcionales. Los componentes principales de SPI son la glicinina y  $\beta$ -conglucina (Teng, Luo, Wang, 2012). La  $\beta$ -conglucina es una proteína presente en forma de polímero con un peso molecular de 180 kDa, que se compone de tres subunidades:  $\alpha'$  (57-72 kDa),  $\alpha$  (57-68 kDa) y  $\beta$  (45-52 kDa) estabilizadas por enlaces no covalentes. La glicinina existe como un hexámero con una masa molecular de 320-380 kDa y cada subunidad está compuesta de un polipéptido ácido y uno básico unidos por un puente disulfuro. En un entorno acuoso estos componentes existen principalmente como moléculas globulares, constituidas por una cubierta hidrófila y un núcleo hidrófobo; la adición de un agente de entrecruzamiento permite que las moléculas de SPI se agreguen para formar estructuras diferentes: microesferas, hidrogeles y mezclas de polímeros (Hsiao, Lu, Kuo, Hsieh 2016). En la Figura 8 se muestran dos posibles estructuras de nanocápsulas. La cubierta protege los encapsulados (vitaminas, antioxidantes, etc.) del entorno acuoso, la luz o el oxígeno.





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

## **9 Importancia de la encapsulación del $\beta$ -caroteno**

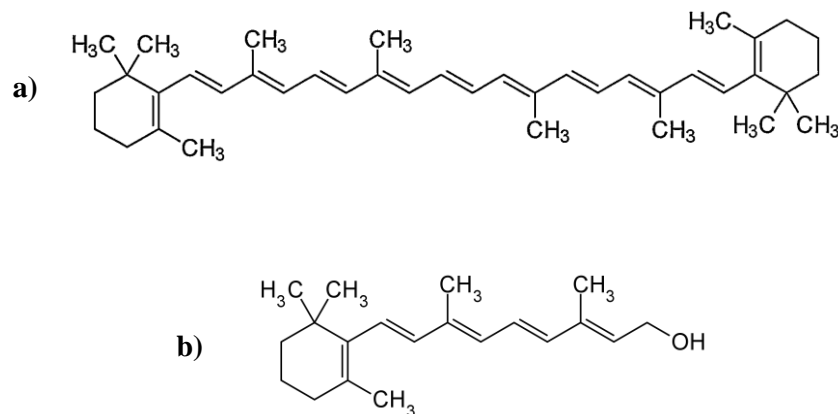
El  $\beta$ -caroteno es uno de los pigmentos rojos, anaranjados y amarillos que junto con otros carotenoides provee aproximadamente el 50% de la vitamina A necesaria en la dieta. Tiene propiedades antioxidantes que pueden ayudar a neutralizar los radicales libres, moléculas reactivas del oxígeno que pueden dañar los lípidos de las membranas celulares y el material genético. El  $\beta$ -caroteno está presente en las frutas y verduras, tales como, zanahoria, piña y cítricos, así como en flores, semillas, algunas estructuras animales, como plumas y músculos, y también en micro-algas, levaduras y bacterias, aunque también puede ser sintetizado de manera artificial en un laboratorio. El  $\beta$ -caroteno es un compuesto del tipo polieno, con dobles enlaces conjugados con posibilidad de resonancia posicional. Su fórmula molecular es  $C_{40}H_{56}$ , su punto de fusión oscila entre 176-182°C, su masa molecular es de 536,58 g/mol y posee dos bandas de absorción de radiación con máximos a 466y 496 nm (Restrepo 2007).

En la actualidad, la sociedad demanda productos naturales, saludables y de mayor efectividad. Para conseguir que los productos tengan estas cualidades, es necesaria la utilización de aditivos naturales, los cuales darán al producto final un valor añadido. El  $\beta$ -caroteno es ampliamente utilizado como aditivo y sus aplicaciones son muy variadas, destacando en el campo de la medicina la disminución del asma producido por el esfuerzo físico, prevención de ciertos cánceres, enfermedades del corazón, cataratas y degeneración macular senil. Se aplica, también, en las mujeres desnutridas para disminuir las probabilidades de muerte y ceguera nocturna durante el embarazo. Todas

estas aplicaciones, están aún en investigación, por lo que de algunas de ellas no se tiene resultados convincentes sobre la efectividad de su aplicación (MedilinePlus). Otra rama de aplicaciones para el  $\beta$ -caroteno son las derivadas de la industria alimentaria y la industria farmacéutica y estética. Su uso en estas industrias, es como colorante natural de sus productos o como suplemento alimenticio. Existen estudios que indican que cubrir los carotenoides con polímeros proporciona una protección frente a los procesos de oxidación y degradación (Martín et al. 2007), ya que el  $\beta$ -caroteno es un pigmento que se degrada con la exposición del mismo al calor, luz y oxígeno.

El  $\beta$ -caroteno es un precursor de la vitamina A que en la mucosa intestinal es convertido por la  $\beta$ -caroteno-15,15'-monooxigenasa a retinol (forma de vitamina A), una vitamina liposoluble y su efectividad como antioxidante en la matriz alimentaria depende tanto de su reactividad química como de sus propiedades físicas. La incorporación del  $\beta$ -caroteno a algunos productos es complicada debido a incompatibilidad con matrices acuosas. Por eso, la encapsulación se ha propuesto como solución a su inestabilidad química incrementando su biodisponibilidad durante el tránsito gastro-intestinal.

En las Figura9 se muestran las estructuras moleculares del  $\beta$ -caroteno y de la vitamina A.



**Figura9. Estructura molecular de: a)  $\beta$ -caroteno; b) vitamina A**

## 10 Proceso de producción de la sidra

La **sidra** es una bebida alcohólica de baja graduación fabricada con el zumo fermentado de la manzana. La producción de sidra natural históricamente se extendía por toda la

Cordillera Cantábrica, pero desde el siglo XIX ha quedado centrada principalmente en el Principado de Asturias y en Guipúzcoa. En la actualidad en Asturias la sidra sigue siendo considerada no solo una bebida, sino una parte intrínseca de su cultura y folklore y es la primera región española productora de sidra con más del 80% de la producción nacional. Para su producción, a raíz de la creación el 12 de noviembre de 2002 de la Denominación de Origen Protegida (**D.O.P.**) “*Sidra de Asturias*” se utilizan exclusivamente variedades de manzana autóctona (Raxao, Xuanina, Coloradona, etc.) reconocidas por el Consejo Regulador. El proceso de producción asturiano es artesano; existen varios procesos de elaboración dependiendo de las diferentes tradiciones regionales, pero, en todo caso, el primer paso siempre consiste en la recogida de la manzana en otoño.

Recolección. La campaña de recogida comienza aproximadamente en la primera quincena del mes de octubre, aunque, lógicamente, dependerá del estado de maduración de las manzanas, que a su vez está condicionado por la meteorología de cada año. Es entonces, cuando comienza a recogerse *opañar* la manzana, proceso que aún hoy se realiza en casi su totalidad de forma manual.

Traslado. Una vez recibida en la báscula la manzana, se realiza un primer análisis visual, rechazando aquellas partidas que representen alguna anomalía (maduración, falta de limpieza, etc...). Posteriormente las manzanas son sometidas a un lavado con varios puntos de agua a presión con el fin de eliminar toda suciedad adherida a las mismas. Más tarde pasan por un escogedor donde de forma manual los operarios rechazan aquellas unidades que no se encuentren en condiciones óptimas.

Trituración. En la trituradora se lleva a cabo el mayado propiamente dicho. La trituración se realiza con unos molinos eléctricos a los que la fruta debe llegar limpia y en condiciones óptimas. Es importante seleccionar, en función de las variedades y su maduración, la granulometría de la magaya o pulpa triturada, para evitar que sea excesivamente pequeña, impidiendo así que el mosto salga del lagar por los pequeños conductos, o que sea demasiado grande, dejando trozos de manzana sin triturar.

Prensado. De la trituradora la manzana pasa directamente a las prensas o lagares. En este momento el primer mosto o sidra dulce, comienza a depositarse en la base del

lagar, pasando a las tinas dispuestas a tal efecto. Las prensas utilizadas pueden ser prensas de madera, prensas hidráulicas de acero inoxidable o prensas neumáticas. Una vez lleno cada lagar con manzanas *mayadas* y tras unas horas de reposo de la magaya, comienza “el cortado del llagar”, proceso que consiste en hacer un canal a lo largo del perímetro del lagar, facilitando así la salida del mosto. Al cabo de tres o cuatro días, en lo que se repite este proceso, la magaya es extraída de la prensa completamente exprimida. Una vez extraído el mosto, se bombea hacia los toneles de castaño o de acero inoxidable, donde la sidra proveniente de las prensas está en disposición de fermentar.

Fermentación. Durante el proceso de fermentación el mosto por acción de las levaduras, junto con las bacterias del entorno, se va transformando en sidra con desprendimiento de anhídrido carbónico. Durante la fermentación alcohólica, los azúcares son transformados en un gran número de componentes, entre los que destacan como productos mayoritarios el etanol y el CO<sub>2</sub>. La fermentación tiene lugar a temperatura controlada, hasta que en los menguantes de enero y febrero se realizan los trasiegos.

Trasiegos: Esta operación consiste en el mezclado de los toneles, esto se hace por dos motivos, el primero para eliminar los posos (borras) que se forman en el fondo del tonel, procedentes de la decantación del mosto y el segundo para unificar los mostos. Este proceso suele llegar hasta los meses de abril o mayo.

Las últimas etapas del proceso cambian dependiendo de que el producto final sea Sidra o Sidra Natural. Según el Real Decreto 72/2017\* la **sidra natural** es un “producto resultante de la fermentación del mosto natural de manzana, cuyo contenido en gas carbónico y azúcares tiene origen endógeno exclusivamente. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 5% vol. y su presión relativa en el interior de la botella será superior a 0,5 bares a 20.°C.”

Por su parte, la **sidra** como bebida comercializada, es el “producto resultante de la fermentación total o parcial del mosto de manzana, al que se puede incorporar, posteriormente a la fermentación, los azúcares o jarabes azucarados, regulados en la normativa sobre determinados azúcares destinados a la alimentación humana, y anhídrido carbónico. Su grado alcohólico volumétrico adquirido será igual o superior a 4% vol.”

## 11 Calidades de la magaya

En Asturias desarrollan su actividad cerca de un centenar de lagares que se dedican casi de manera exclusiva a elaborar sidra natural. Este sector transforma una media de 35 millones de kg/año de manzana de sidra y, como consecuencia de esta actividad, se origina una importante cantidad de residuos. Entre ellos destaca, con un volumen que se puede cifrar en unos 9 millones de Kg, la magaya, residuo sólido obtenido después del prensado, formado principalmente por pulpa, piel, pepitas y algunos pedúnculos. Sin embargo, la magaya, lejos de ser calificada como un residuo debería ser considerada como un subproducto con alto valor añadido, por ser fuente de compuestos bioactivos con potencial para el diseño de aditivos naturales y alimentos saludables, entre otros. La magaya está compuesta principalmente por fibra alimentaria (lignina, celulosa, hemicelulosa y pectinas), lo que sin duda hace que esta materia prima pueda ser considerada como saludable. Es conocido que la fibra disminuye el riesgo de diabetes, enfermedades del corazón, obesidad y cáncer (Mann y Cummings, 2009). Igualmente, se ha descrito la presencia en la magaya de diferentes familias de compuestos fenólicos como flavonoides, procianidinas, dihidrocalconas y ácidos fenólicos (Schieber y col., 2003 ) y se han asociado con la actividad antioxidante in vitro (Foo y col., 1999), que ayuda a reducir el riesgo de insuficiencia coronaria y actúa contra el cáncer.

# 12 METODOLOGÍA

## Reactivos y disoluciones

- Soja texturizada fina de cultivo ecológico, Ecocesta
- Etanol absoluto, LiChrosolv, Merck
- Glutaraldehído, Alfa Aesar
- Hidróxido de Sodio 98%, Alfa Aesar
- Ácido clorhídrico 37%, VWR Chemicals PROLABO (BDH)
- $\beta$ -caroteno, Fluka
- Tampón salino de fosfatos 10X DPBS, Gibco Life Technologies
- Tween20, SIGMA-ALDRICH

## Instrumentación Analítica

- Balanza Analítica Mettler AE 163
- pHmetro micropH 2002, CRISON
- Espectrofotómetro Agilent Technologies CARY 60 UV-Vis
- Microscopio de transmisión electrónica JeolJEM 2100F
- Espectrofotómetro FTIR Varian 670 IR con accesorio Specac's Golden Gate ATR
- DLS Zetasizer, Malvern

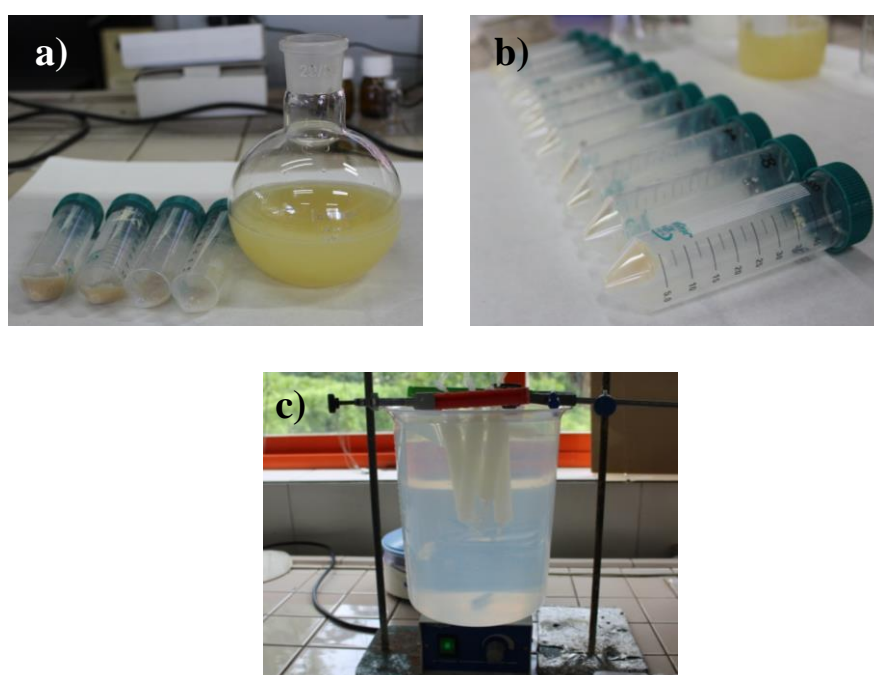
## Utillaje de laboratorio

- Placa calefactora Heidolph MR-HeiTec.
- Baño de ultrasonidos Selecta Ultrasons MEDI-II
- Centrifuga GYROZEN 15Bdr
- Rotavapor Laborota 4000, Heidolph
- Celda de cuarzo para medidas espectrofotométricas
- Vasos de precipitado: 10mL y 100mL
- Micropipetas LABMATE+: 10-100  $\mu$ L, 10-1000  $\mu$ L
- Pipetas pasteur, espátulas, mortero y maja de ágata
- Vortex Vx100 LabnetMixer
- Matraces aforados clase A: 10, 100 mL
- Tubos Eppendorf Safe Lock 2.5 mL
- Tubos cónicos de centrifuga 15 mL y 20 mL

## 13 Síntesis de nanopartículas

### 13.1 Preparación de proteínas aisladas de soja (SPI)

Las SPI se prepararon de acuerdo con el método de precipitación isoelectrica (Teng, Luo, Wang 2012). Para ello, se pesaron 50 g de soja texturizada y se trituraron con la ayuda del mortero para optimizar la extracción de proteínas. Se suspendió la soja triturada en 750 mL de agua desionizada (en proporción 1:15; 15 mL de agua cada gramo de proteína pesado), se ajustó el pH de la solución hasta 8 con 1M NaOH para aumentar la solubilidad de las proteínas y se dejó en agitación suave durante una hora. Posteriormente se centrifugó la dispersión a 10.000g durante 15 minutos (Figura 10). El sobrenadante se acidificó con 1M HCl hasta alcanzar un valor de pH de 4,5 y se centrifugó otra vez en las mismas condiciones (Figura 10b). El precipitado obtenido se suspendió en agua desionizada y se ajustó el pH a 7,5 con 1M NaOH. Finalmente, la suspensión se dializó durante 24 horas (Figura 10c).

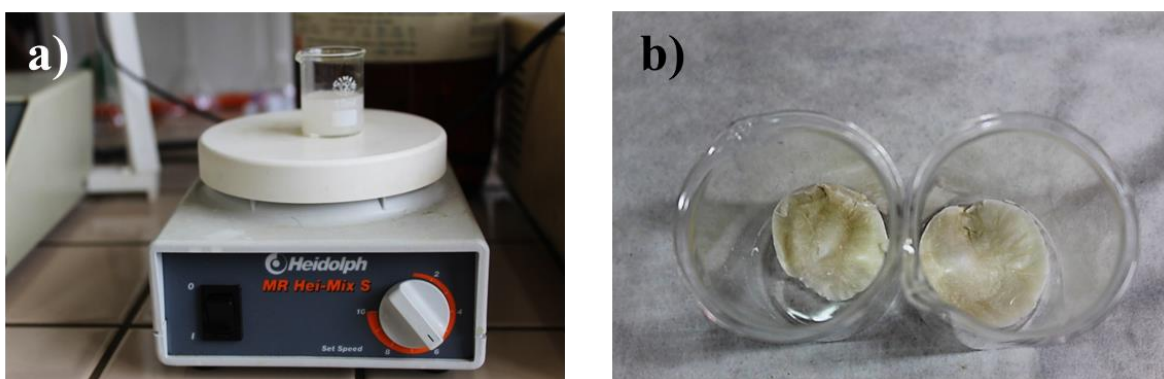


**Figura 10. a) Sobrenadante básico obtenido después la primera centrifugación  
b) Precipitado obtenido tras acidular la solución y segunda centrifugación  
c) Diálisis del precipitado frente a agua desionizada.**

### 13.2 Preparación de nanocápsulas de proteínas de soja.

Trabajos previos en el tema han mostrado que los mejores resultados para la preparación de nanopartículas de proteína, en términos de mejor relación entre estabilidad y tamaño, se obtienen partiendo de una concentración de SPI que varía entre 4 y 12 mg/mL y un porcentaje de etanol de 10% y 80% (Teng, Luo, Wang 2012).

Las nanocápsulas se prepararon a partir de SPI de acuerdo con un método de solvatación descrito en la bibliografía (Teng, Luo, Wang 2012), con algunas modificaciones. Se pesaron 20 mg de SPI, se disolvieron en 4,5 mL de agua desionizada y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0,5 mL de etanol gota a gota hasta alcanzar un 10% de etanol y se agitó la disolución durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 21  $\mu$ L de glutaraldehído (1,05  $\mu$ L por cada mg de SPI) como agente de entrecruzamiento. Tras 16 horas de reacción de entrecruzamiento, la disolución se diluyó 3 veces, con agua desionizada y etanol sin cambiar la proporción agua/etanol (13,5 mL de agua desionizada; 1,5 mL etanol) para favorecer la formación de las nanocápsulas (Figura 11a). Finalmente, el etanol se eliminó utilizando el rotavapor a 30°C, tras lo cual se reemplazó por el mismo volumen de agua desionizada. La dispersión resultante fue centrifugada a 10.000 g por 15 minutos para remover los agregados más grandes. El sobrenadante se liofilizó y guardó a 4°C (Figura 11b).



**Figura 11. a) Nanocápsulas en suspensión etanol/glutaraldehído.  
b) Nanocápsulas liofilizadas.**



### 13.3 Nanoencapsulación de $\beta$ -caroteno

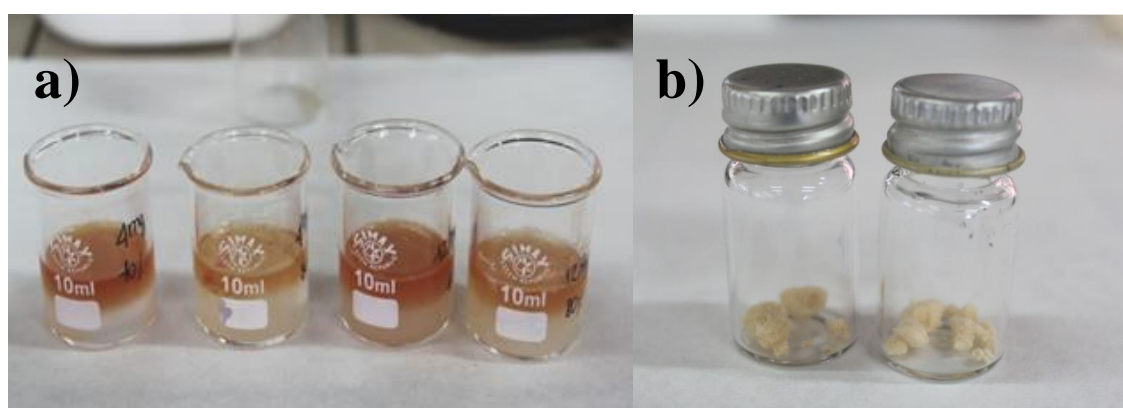
Se prepararon 4 muestras de nanopartículas a diferentes concentraciones de SPI y diferente porcentaje de etanol. En todos los casos se mantuvo constante el contenido del  $\beta$ -caroteno respecto a la concentración de SPI como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones para la síntesis de nanopartículas encapsuladas.**

SPI mg/mL	Etanol	Volumen final (mL)	$\beta$ -caroteno (mg/mL)
4	10%	5	0,08
4	80%	5	0,08
12	10%	5	0,24
12	80%	5	0,24

\*Solución estándar  $\beta$ -caroteno 6mg/mL en etanol

Se pesaron los gramos adecuados de SPI para tener las concentraciones adecuadas para un volumen final de 5 mL y se dejaron agitar en agua desionizada durante una hora. Se preparó una disolución estándar de  $\beta$ -caroteno pesando 12,3 mg que se suspendieron en 2 mL etanol. Al cabo de una hora se añadieron el etanol y el  $\beta$ -caroteno en solución gota a gota hasta alcanzar el porcentaje de etanol establecido y se dejaron agitar 15 minutos (Figura 12a). Finalmente se añadió el glutaraldehído que se dejó reaccionar durante 16 horas. La solución se suspendió sin cambiar el porcentaje agua/etanol, se eliminó el etanol por rotavaporación y se suspendió nuevamente, centrifugó y liofilizó como está descrito en el apartado anterior (Figura 12b).



**Figura 12. a) Disoluciones con  $\beta$ -caroteno antes la acción del glutaraldehído  
b) Nanopartículas encapsuladas con el  $\beta$ -caroteno y liofilizadas**

## 14 Estudio morfológico

Las nanopartículas se caracterizaron morfológicamente por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello se tomaron unos pocos  $\mu\text{L}$  de cada dispersión y se depositaron sobre una rejilla de cobre recubierta por una película de carbono amorfo. Asimismo, se determinó el diámetro promedio de las partículas por dispersión de luz dinámica (DLS).

### 14.1 TEM

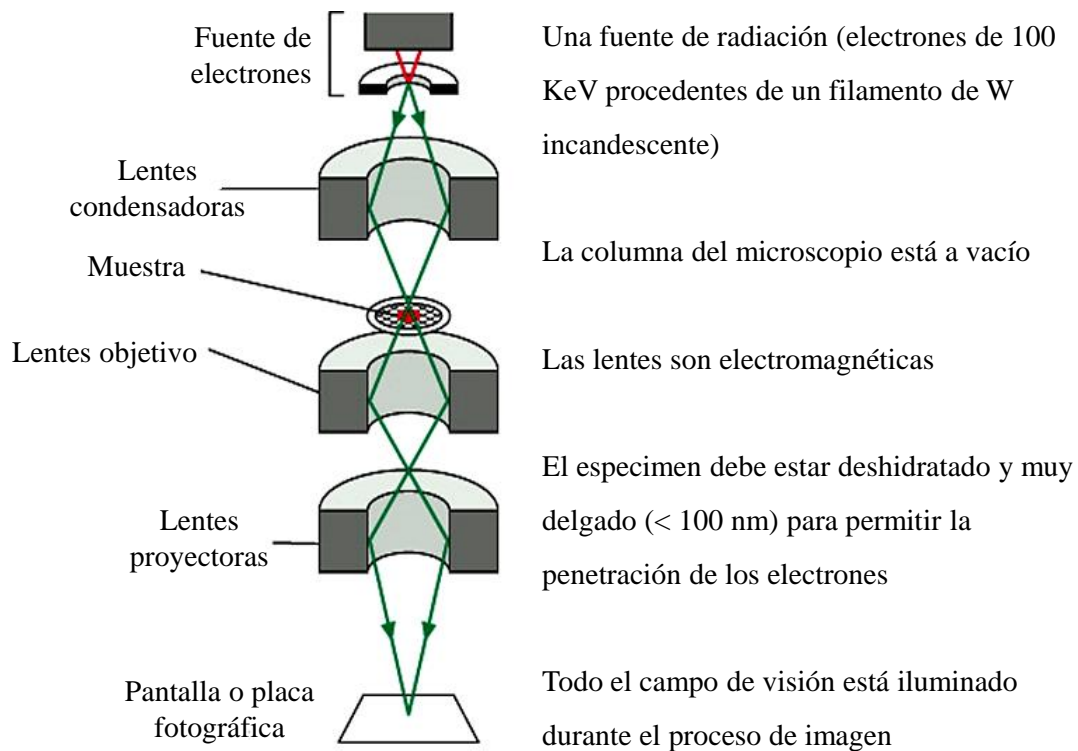
Un microscopio electrónico de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es un microscopio que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto.

Las partes principales de un microscopio electrónico de transmisión son:

- **Cañón de electrones**, que emite los electrones que chocan o atraviesan el espécimen, creando una imagen aumentada.
- **Lentes magnéticas** para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones.
- **Sistema de vacío** es una parte muy importante del microscopio electrónico. Debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, se debe hacer un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características (para conseguir el flujo ininterrumpido de electrones, el TEM debe operar a bajas presiones, típicamente en el orden de  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  atm)
- **Placa fotográfica o pantalla fluorescente** que se coloca detrás del objeto a visualizar para registrar la imagen aumentada.
- **Sistema de registro** que muestra la imagen que producen los electrones, que suele ser un ordenador.

El principio del funcionamiento del TEM es que los electrones incidentes en la muestra son en parte difractados y en parte transmitidos y su detección genera un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas, imagen que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de

gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. En la Figura 13 se muestra un esquema básico de microscopio de transmisión electrónica.



**Figura 13. Esquema básico de un microscopio electrónico de transmisión.**

## 14.2 Dynamic Light Scattering (DSL)

### 14.2.1 Potencial zeta

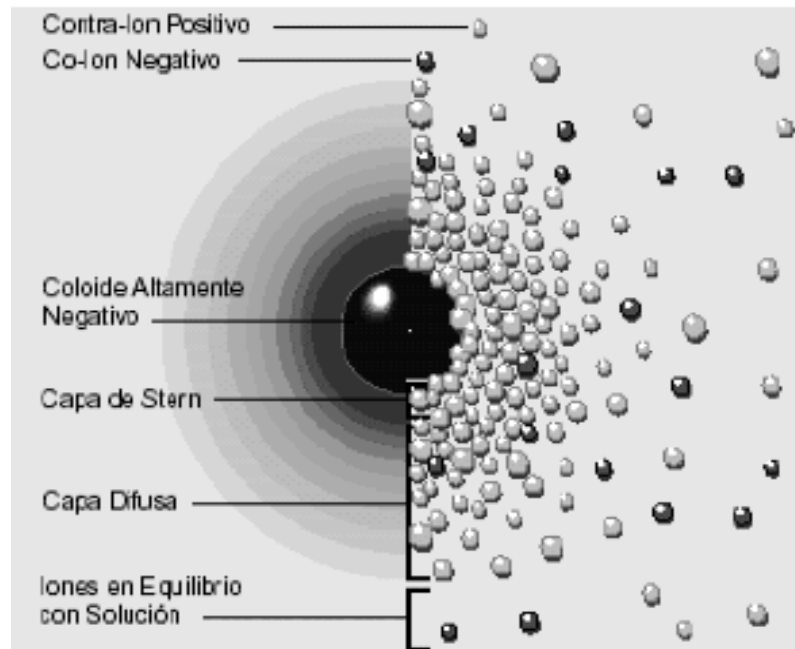
El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas; se utiliza frecuentemente en la **química coloidal** y su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación del material en estudio. Se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones. La medición del potencial zeta se basa en el principio de que el comportamiento de los coloides está determinado por las cargas eléctricas presentes en su superficie, que suele ser de naturaleza negativa (aunque también puede ser positiva). Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática

entre los coloides vecinos. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión.

#### 14.2.2 Principio de medición del potencial zeta

Para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión se usa el modelo de la **doble capa**. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas: inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la *capa de Stern*. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una *capa difusa* de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución. En forma similar, aunque opuesta, en la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que el coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse del coloide, mientras que las fuerzas repulsivas del coloide son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera cargada rodeando al coloide. A cualquier distancia de la superficie, la densidad de carga es igual a la diferencia de concentración entre iones positivos y negativos. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que juntos llamaremos la doble capa (Figura 14). El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución. El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia desde el coloide es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede

ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento y la estabilidad del coloide.



**Figura 14. Dos formas de visualizar la doble capa:** la imagen izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide; la derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado.

### 14.2.3 Medida de Potencial Zeta con Zetasizer Nano de Malvern Instruments

El Zetasizer es un equipo de alta sensibilidad que mide el potencial Z de partículas usando una técnica de dispersión de luz llamada *Electroforesis Doppler con Láser*. Es una técnica usada para medir el movimiento de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico que utiliza el efecto Doppler; la luz difundida por una partícula en movimiento experimenta un cambio de frecuencia que se puede medir por una técnica de interferometría.

En el caso del equipo Zetasizer Nano un rayo procedente del láser debe pasar a través de una partícula en dispersión (haz difractado) mientras que otro rayo (haz de referencia), que se crea dividiendo el haz del láser, se conduce por fuera de la célula de capilar donde está introducida la muestra. En la célula de medida se aplica un campo eléctrico alterno y las partículas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. El haz de rayo

láser incide sobre las partículas en movimiento provocando un cambio de frecuencia (efecto Doppler). Con este sistema se determina la movilidad de las partículas haciendo una comparación de fase entre la señal detectada (luz dispersada por la partícula) y la señal de referencia; lo importante es que los dos haces se deben comparar en un punto después de que el haz difractado haya pasado a través de la muestra (Figura 15).

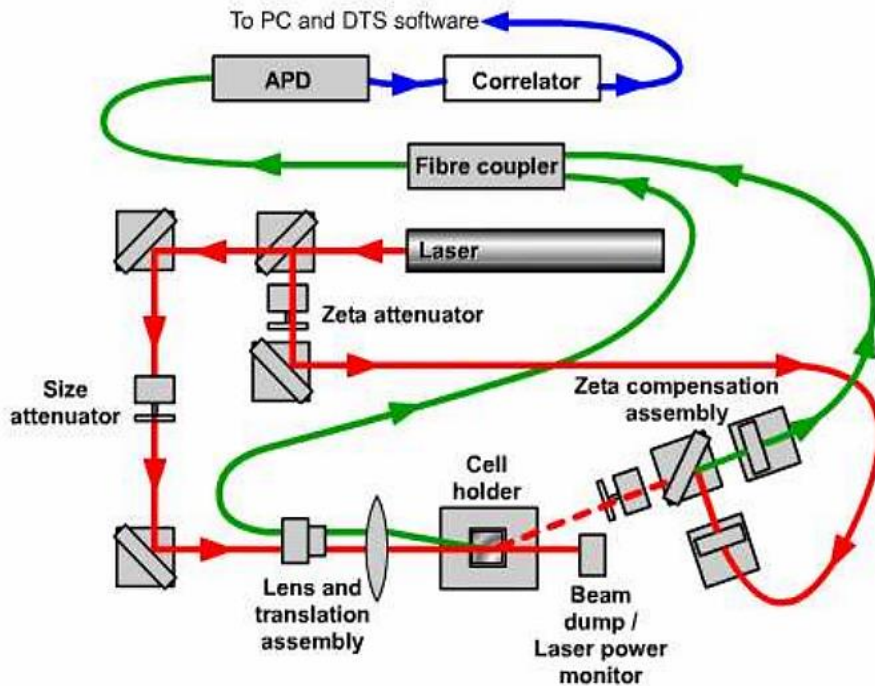


Figura 15. Componentes básicos del Zetasizer Nano.

#### 14.2.4 Tamaño de las nanopartículas

El aparato Zetasizer Nano SZ también permite la medición del tamaño de las nanopartículas mediante la técnica de difusión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering) que mide el movimiento Browniano de las nanopartículas y lo relaciona con su tamaño nanométrico. El **movimiento browniano** es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido (líquido o gas), como resultado de choques contra las moléculas de dicho fluido. La velocidad del movimiento Browniano depende fundamentalmente de tres factores:

- Tamaño de las nanopartículas
- Temperatura

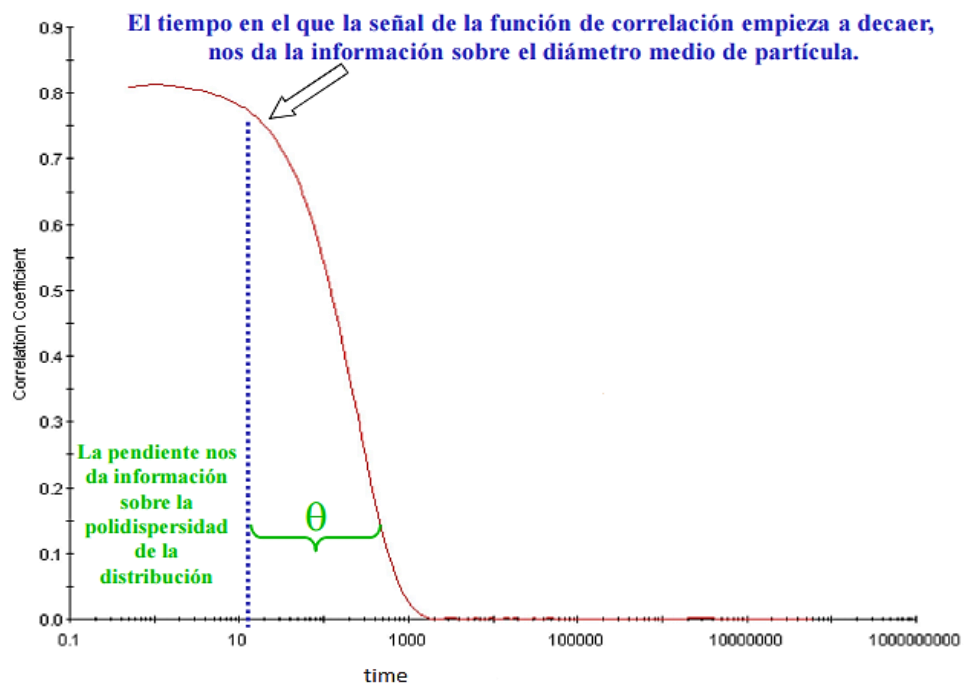
- Viscosidad del medio dispersante

Cuando se tienen partículas en disolución, éstas se desplazan y al hacer incidir un haz de luz sobre estas partículas es dispersado y su intensidad varía con el tiempo. DLS mide las fluctuaciones de intensidad a lo largo del tiempo, para determinar el coeficiente de difusión translacional ( $D_t$ ), y posteriormente el diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D_t}$$

en la que  $k$  = constante Boltzmann,  $T$  = temperatura,  $\eta$  = viscosidad

Otro parámetro que puede ser medido con el equipo Zetasizer Nano SZ es el índice de polidispersidad (PdI) que nos informa acerca de la homogeneidad de los tamaños de las nanopartículas en suspensión y tiene un valor entre 0 y 1. Si las partículas en la muestra son homogéneas el valor de PdI se aproximará a cero (Figura 16).



**Figura 16. Función de correlación entre diámetro de la nanopartícula y el índice de polidispersidad.**

# 15 Estudio FTIR

## 15.1 Preparación muestra

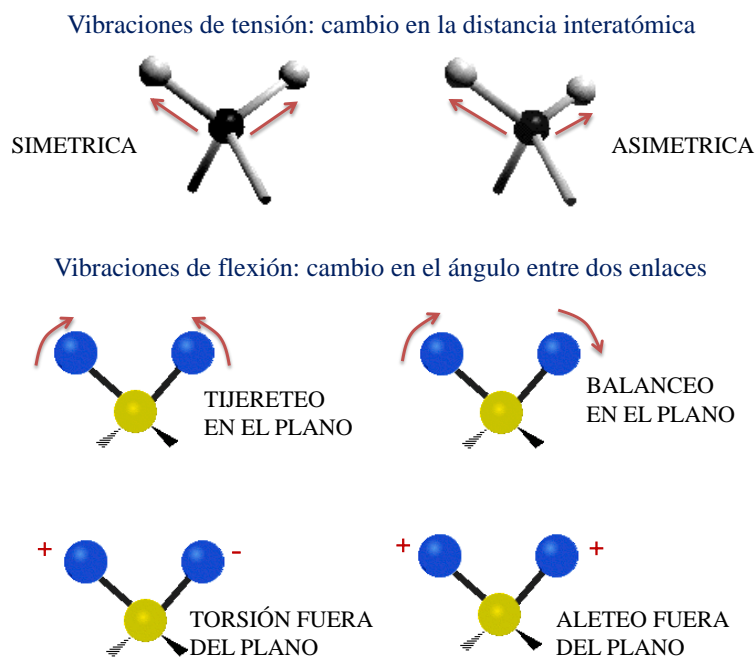
Se caracterizaron las nanopartículas liofilizadas y se analizó la interacción entre los compuestos encapsulados por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier. Para ello se tomaron unos pocos mg de muestra y se determinó el espectro de absorción en el intervalo de frecuencias 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## 15.2 FTIR

La espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se emplea en la caracterización de diferentes compuestos para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras. Esta técnica es una herramienta poderosa en la determinación de la estructura molecular ya que refleja las vibraciones características de los grupos de átomos por lo que se emplean para identificar especialmente los grupos orgánicos.

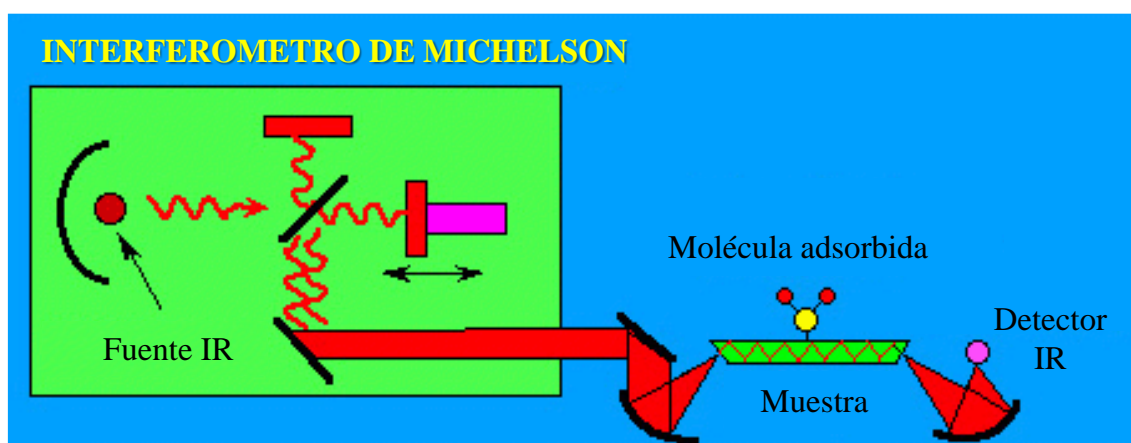
FTIR está basada en los principios de la espectroscopia molecular: las moléculas absorben energía de la luz en longitudes de ondas específicas, conocidas como sus frecuencias de resonancia (vibración). Por ejemplo, las moléculas de agua resuenan (vibran) a una frecuencia de 3450 (se indica como  $\text{cm}^{-1}$ ), en la región infrarroja del espectro electromagnético. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces y cada uno de estos tipos de vibración tiene asociada una frecuencia característica (Figura 17). En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas mononucleares como  $\text{O}_2$  y  $\text{Br}_2$ ) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo.





**Figura 17. Representación de diferentes modos de vibración molecular**

Una forma de realizar un espectro en FTIR es utilizar un dispositivo ATR (Attenuated Total Reflection), en la que la muestra se deposita sobre un cristal especial que es iluminado por una fuente de luz infrarroja procedente del interferómetro de Michelson (Figura 18). La intensidad de la luz transmitida a través del cristal hacia la muestra es analizada y transformada en un espectro IR mediante la transformada de Fourier.



**Figura 18. Esquema básico de un sistema FTIR-ATR**

## 16 Eficiencia de la encapsulación

Para el estudio de la eficiencia de la encapsulación se utilizó el precipitado obtenido en la última etapa de centrifugación, el cual se encuentra el  $\beta$ -caroteno, insoluble en el medio acuoso. Este precipitado fue suspendido en 5 mL de etanol para solubilizar el  $\beta$ -caroteno y se centrifugó una segunda vez a 10.000g durante 15 minutos. El  $\beta$ -caroteno presente en el sobrenadante obtenido se determinó espectrofotométricamente a 450 nm y se calculó la eficiencia de encapsulación según la fórmula:

$$100 - \left( \frac{\beta\text{-caroteno en suspensión de etanol}}{\beta\text{-caroteno añadido en principio}} \times 100 \right) = \%$$

## 17 Metodo Folin-Ciocalteu

### 17.1 Preparación recta patrón y muestra

Para la preparación de la curva patrón se utilizó ácido gálico a diferentes concentraciones (0,5; 10; 20; 50; 100 ppm) por dilución adecuada de una disolución patrón en agua hasta un volumen final de 9 mL. Para ello, a la disolución de ácido gálico se añadieron 500  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, 500  $\mu$ L de carbonato sódico 7,5% y 7 mL de agua desionizada (volumen final de la disolución 9 mL). La muestra fue preparada de la misma manera: se diluyeron 50  $\mu$ L de extracto de magaya en 450  $\mu$ L de agua desionizada y se añadieron el reactivo de Folin, el carbonato sódico y el agua como se ha descrito antes. La muestra y las disoluciones se dejaron reaccionar al abrigo de la luz durante una hora.

## 18 Liberación de $\beta$ -caroteno en PBS

La liberación de  $\beta$ -caroteno en tampón fosfato salino (PBS) es un ensayo muy útil para estudiar el comportamiento de las nanopartículas en una solución que simula las condiciones fisiológicas humanas. Para este análisis se pesaron 2,51 mg de nanopartículas liofilizadas y se disolvieron en 4 mL de PBS (pH 7,5) con un 0,5% de

Tween20. La dispersión se dejó en el sonicador 2 h 30 min a una temperatura de 37 °C tras lo cual se añadió 1 mL de etanol para facilitar la disolución del  $\beta$ -caroteno y alcanzar un volumen final de 5 mL. Se midió la absorbancia de la disolución a 450 nm utilizando una curva de calibración para  $\beta$ -caroteno/PBS/Tween20.

## 19 RESULTADOS EXPERIMENTALES

### 19.1 Caracterización morfológica

Como se muestra en las Figuras 19 y 20, las nanopartículas se sintetizaron satisfactoriamente con el método de precipitación isoelectrónica (Teng, Luo, Wang 2012), con una morfología esférica y uniforme. En la Tabla 3, se recogen los datos obtenidos para los diámetros medios de las diferentes partículas, empleando la técnica DLS y TEM.

**Tabla 3. Diámetro medio obtenido en la síntesis de nanopartículas a diferentes concentraciones de SPI y etanol.**

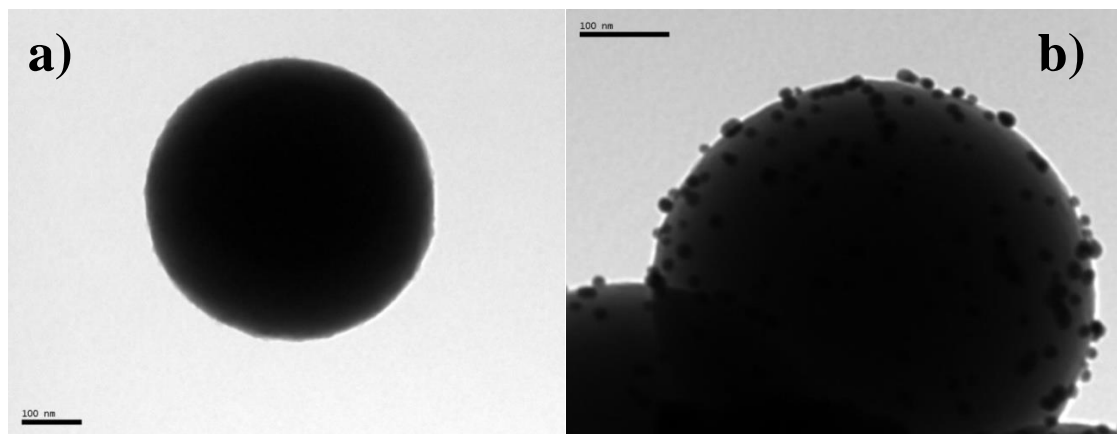
Muestra	Diámetro medio de partículas DSL (nm)	Diámetro medio de partículas TEM (nm)
4 mg SPI/mL – 10% + $\beta$ c.	419,1	295
4 mg SPI/mL – 80% + $\beta$ c.	996,8	391,8
12 mg SPI/mL – 10% + $\beta$ c.	262,5	n.d.
12 mg SPI/mL – 80% + $\beta$ c.	474,2	359,7

Los datos indican que, como era de esperar, el radio hidrodinámico (medido por DSL) es superior al diámetro obtenido por TEM, como resultado de que en el primer caso la medida se lleva a cabo en disolución, donde las partículas se encuentran solvatadas, mientras que en el segundo caso, las medidas se llevan a cabo sobre muestra seca. El diámetro medio de las partículas secas oscila entre 300 y 400 nm, un tamaño adecuado para su aplicación en la encapsulación de nutrientes.

Por otra parte, se comprueba que el contenido en etanol influye en el diámetro hidrodinámico, observándose que a mayor contenido de alcohol, mayor es el radio, independientemente de la concentración de SPI. La misma tendencia se observa en el radio medio obtenido por TEM. Este hecho, podría explicarse por la solubilidad del  $\beta$ -

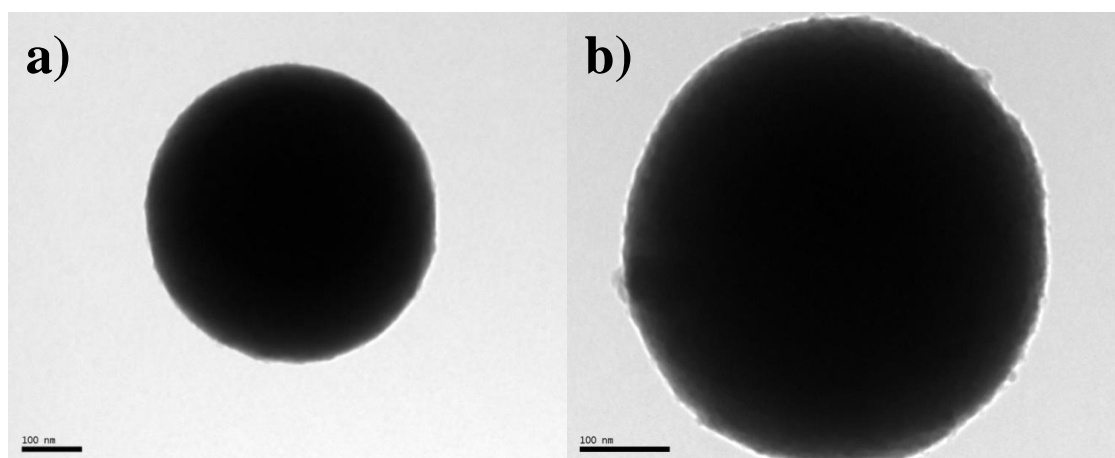
caroteno en medio orgánico, lo que favorecería un mayor porcentaje de encapsulación del mismo en las partículas.

En la Figura 19 se observa la morfología de las nanocápsulas de proteína de soja obtenidas con la misma concentración de SPI aunque cambiando el porcentaje de etanol. Como se aprecia en ambos casos se generan nanocápsulas esféricas, de apariencia compacta, aunque un mayor contenido en etanol da lugar a nanocápsulas más grandes.



**Figura 19. Imágenes TEM de nanocápsulas de proteína de soja obtenidas con:**  
a) 4 mg/mL SPI- 10% etanol  
b) 4 mg/mL SPI-80% etanol

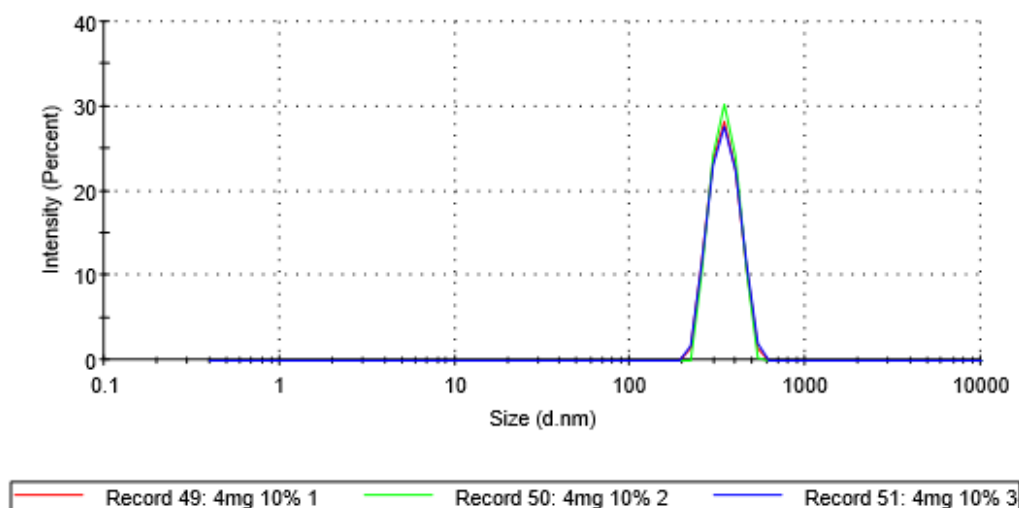
En la Figura 20, se puede comprobar el efecto de encapsulación del  $\beta$ -caroteno en nanocápsula 4mg/mL SPI-10% etanol, observándose un considerable aumento de tamaño de las nanocápsulas, aunque manteniéndose la geometría esférica y el aspecto compacto de las mismas.



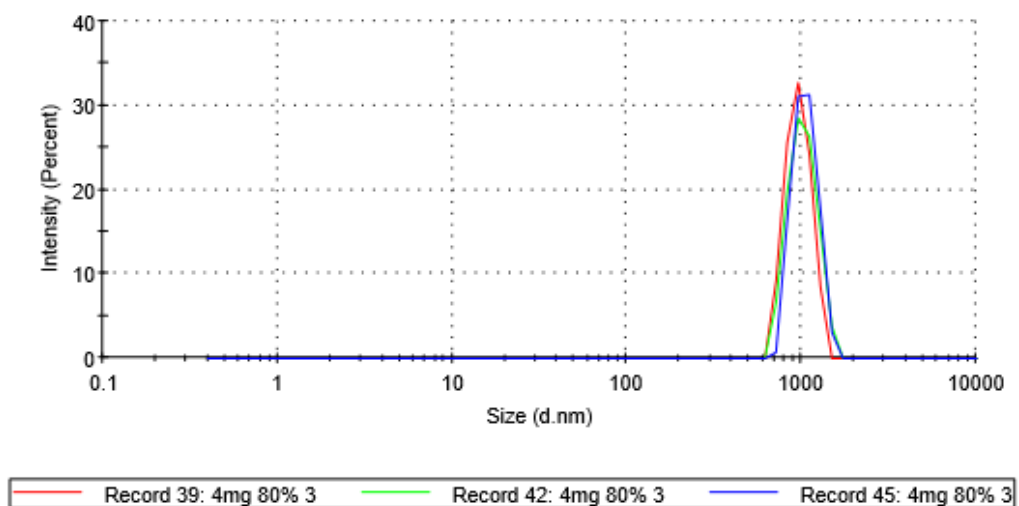
**Figura 20. Imágenes TEM de nanocápsulas de proteína de soja obtenidas con:**  
c) 4 mg/mL SPI- 10% etanol “vacía”  
d) 4 mg/mL SPI-10% etanol con  $\beta$ -caroteno

## 19.2 Índice de polidispersividad

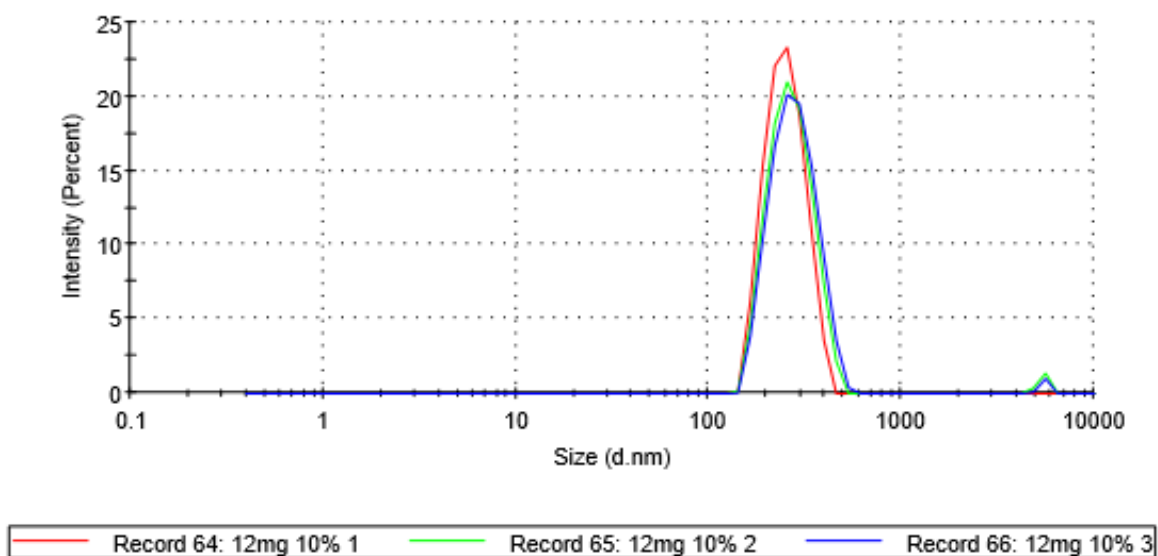
El índice de polidispersividad nos informa acerca de la uniformidad de los tamaños de las nanopartículas y, como se ha descrito en los apartados anteriores, si las partículas en la muestra son homogéneas el valor de PdI se aproximará a cero. Como se muestra en las Figuras 21, 22, 23 y 24, todas las nanopartículas resultaron tener una distribución de tamaño relativamente homogénea y el índice PdI no se vio afectado por el porcentaje de etanol utilizado. Sin embargo, sí se puede observar que las nanopartículas obtenidas con menor concentración de SPI son más monodispersas que las obtenidas con mayor concentración. Las medidas se realizaron por triplicado para cada muestra.



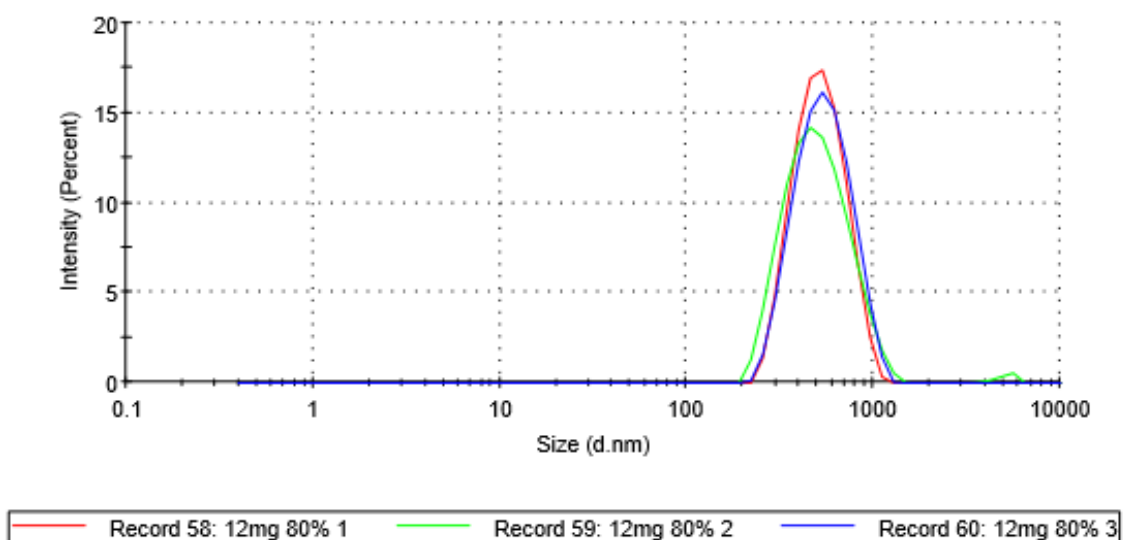
**Figura 21. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS. Nanopartículas 4mgSPI/mL - 10% con  $\beta$ -caroteno.**



**Figura 22. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS. Nanopartículas 4mgSPI/mL - 80% y  $\beta$ -caroteno.**



**Figura 23. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS Nanopartículas 12mg SPI/mL-10% y  $\beta$ -caroteno.**



**Figura 24. Distribución de diámetro por número de partículas obtenido por DLS Nanopartículas 12mgSPI/mL - 80% y  $\beta$ -caroteno.**

En la Tabla 4 se recogen los valores de PDI para las partículas en estudio. Los datos muestran que las nanopartículas más monodispersas conteniendo  $\beta$ -caroteno, son las 4 mg SPI/mL-80% etanol.

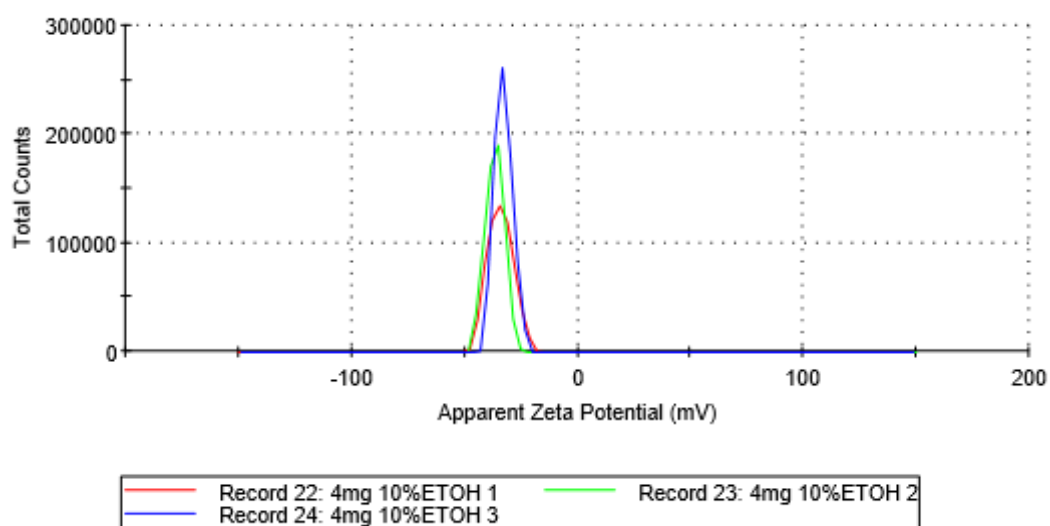
**Tabla 4. Índice de polidispersividad de nanopartículas SPI obtenidos por DSL.**

Muestras	Valores PDI (0-1)
4 mg SPI/mL – 10% + $\beta$ c.	0,323
4mg SPI/mL – 80% + $\beta$ c.	0,027
12mg SPI/mL – 10% + $\beta$ c.	0,264
12mg SPI/mL – 80% + $\beta$ c.	0,102

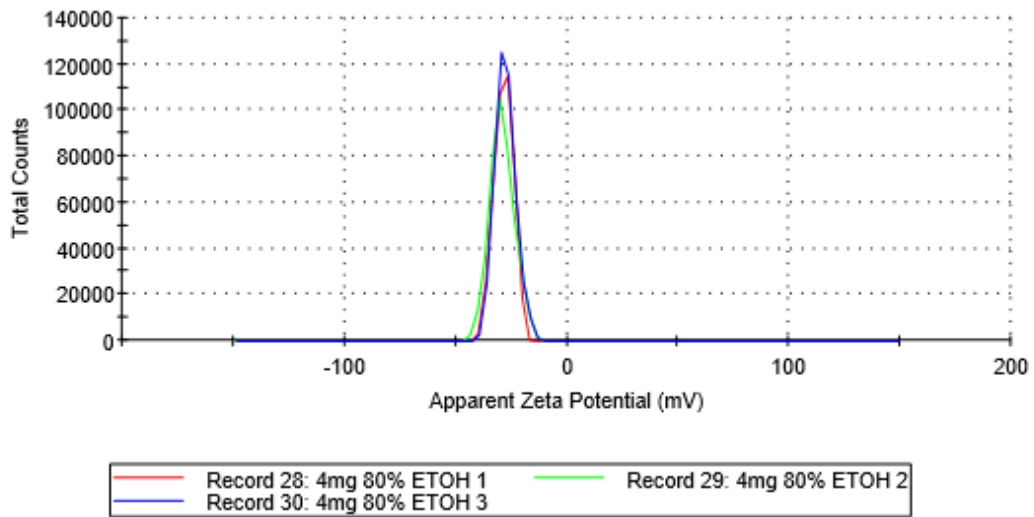
Las nanopartículas sintetizadas utilizando un porcentaje más alto de etanol resultaron tener una distribución de diámetro más baja (mayor homogeneidad).

### 19.3 Potencial zeta

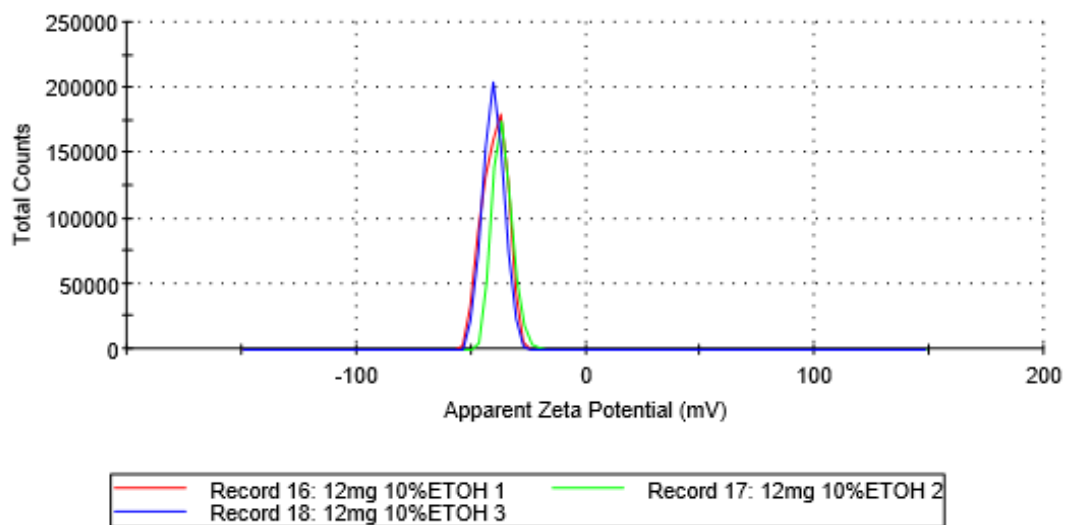
La medición del potencial zeta permitió determinar las cargas eléctricas presentes en su superficie de las nanopartículas; cuanto más negativo el valor del potencial zeta, tanto mayor es la estabilidad de las mismas en disolución. En las Figuras 25-28 se muestran los diferentes valores de potenciales zeta medidos con el equipo DLS. Cada muestra fue medida por triplicado.



**Figura 25. Registro del potencial zeta obtenido por DLS.  
Nanopartículas 4mgSPI/mL - 10% - $\beta$ -caroteno.**

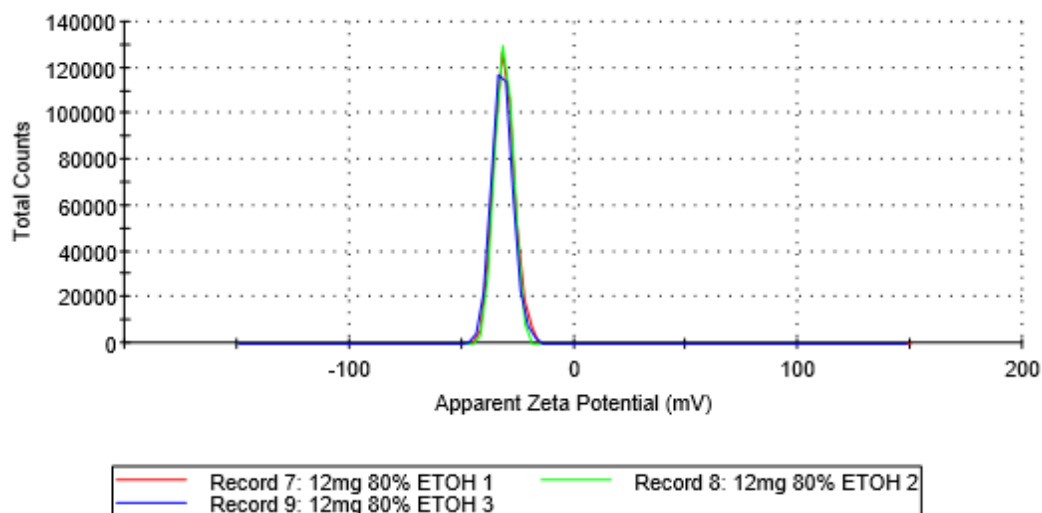


**Figura 26. Registro del potencial zeta obtenido por DLS.  
 Nanopartículas 4mgSPI/mL - 80% - $\beta$ -caroteno.**



**Figura 27. Registro del potencial zeta obtenido por DLS.  
 Nanopartículas 12mgSPI/mL - 10% - $\beta$ -caroteno.**





**Figura 28. Registro del potencial zeta obtenido por DLS.  
Nanopartículas 12 mgSPI/mL - 80% - $\beta$ -caroteno.**

En la Tabla 5 se recogen los valores de los potenciales zeta medios obtenidos en esta experiencia.

**Tabla 5. Potenciales zeta de nanopartículas obtenidos por DSL.**

Muestras	Valores potencial zeta, mV
4 mg SPI/mL – 10% + $\beta$ c.	- 34,0
4mg SPI/mL – 80% + $\beta$ c.	- 27,7
12mg SPI/mL – 10% + $\beta$ c.	- 39,6
12mg SPI/mL – 80% + $\beta$ c.	- 30,9

Todas las nanopartículas encapsuladas con  $\beta$ -caroteno resultaron ser estables en solución acuosa. La decisión de utilizar 12 mg de SPI/mL y una concentración del 10% de etanol para sintetizar nanopartículas encapsuladas con antioxidantes (Anexo I), se basó en el hecho que las nanopartículas encapsuladas con  $\beta$ -caroteno a estas concentraciones resultaron ser las más estables, muestran un tamaño adecuado y un índice de polidispersividad aceptable.

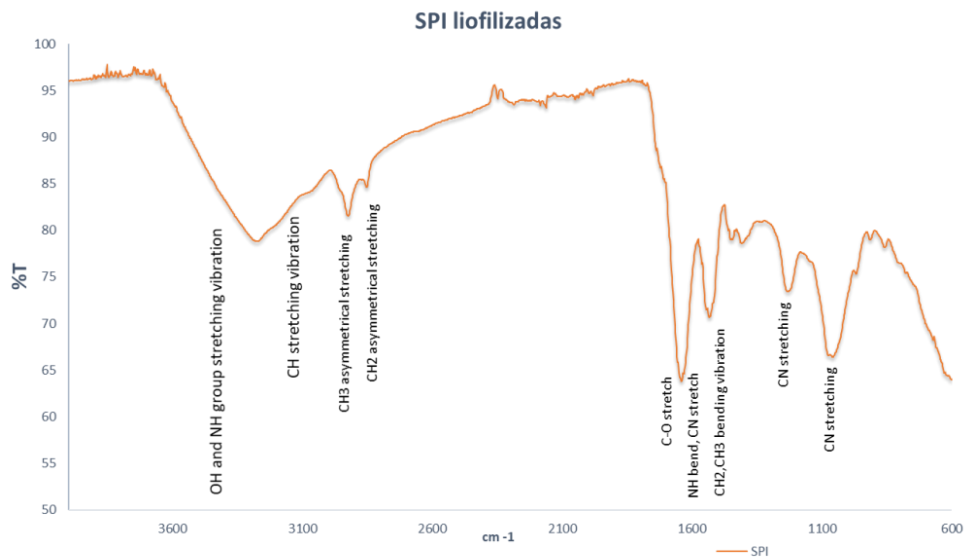
## 19.4 Análisis por FTIR

Con objeto de confirmar la encapsulación de  $\beta$ -caroteno en las nanopartículas, se llevó a cabo un estudio de los espectros de absorción IR de cada uno de los sistemas: nanopartículas SPI liofilizadas,  $\beta$ -caroteno y de las nanopartículas SPI encapsuladas. En la Tabla 6 se recogen las principales bandas de absorción en IR de la proteína de soja.

**Tabla 6. Bandas IR de proteínas de soja (Chen X., Ru Y; Chen F; 2012).**

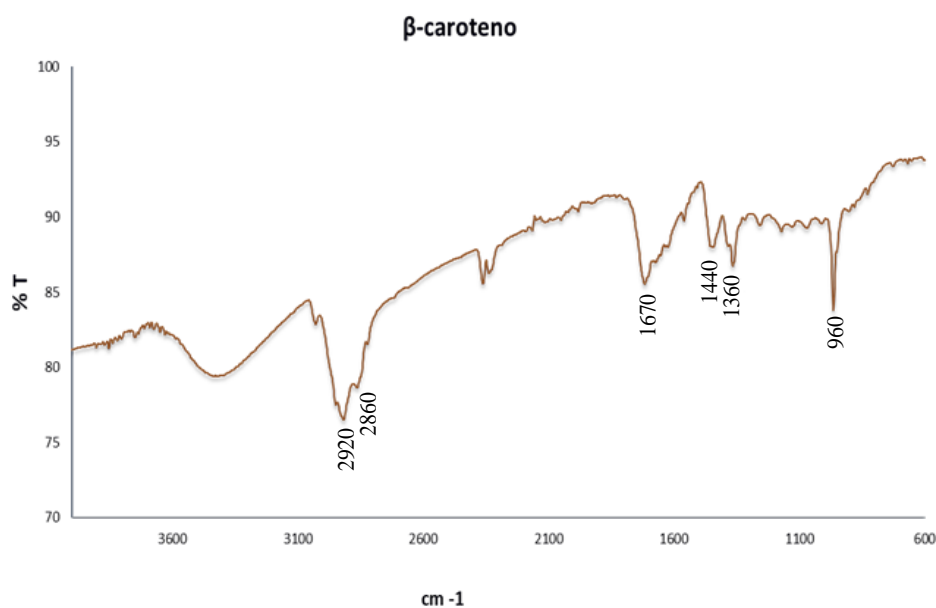
Número de onda $\text{cm}^{-1}$	Tipo de señal	Tipo de enlace
3266	Torsión	OH y NH
3066	Torsión	CH
2921	Torsión asimétrica	$\text{CH}_3$
2852	Torsión asimétrica	$\text{CH}_2$
1641	Tensión	C=O
1529	NH torsión, CN tensión	NH y CN
1411	Torsión	$\text{CH}_2$
1224	Torsión	$\text{CH}_3$
1239	Tensión	C-N
1054	Tensión	C-O

En la Figura 29 se muestra el espectro de infrarrojo FTIR de las proteínas de soja aisladas liofilizadas. Como se puede comprobar, se observan las bandas características descritas en la bibliografía, lo que nos confirma que el proceso de extracción de la proteína ha sido eficaz.

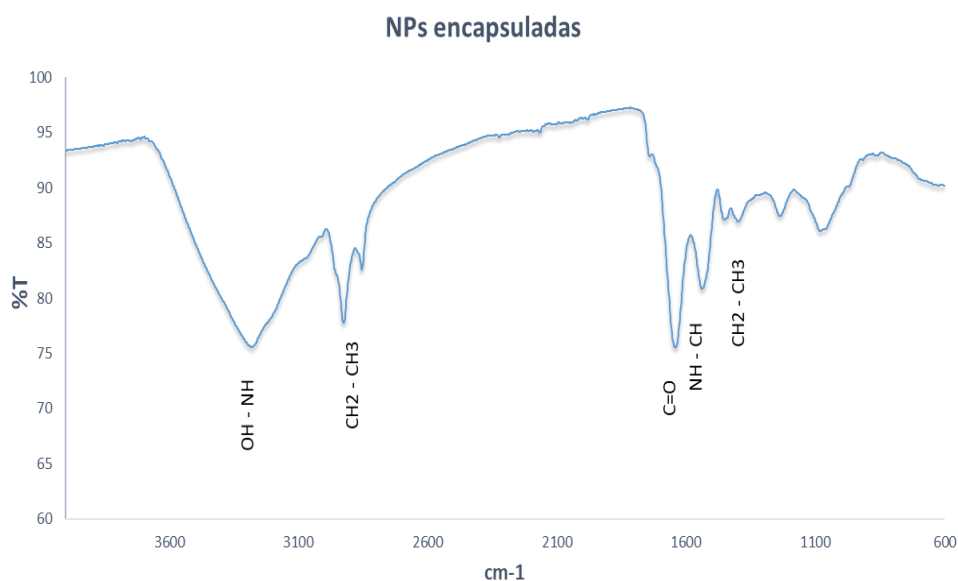


**Figura 29. Espectro FTIR de las proteínas aisladas de soja**

El espectro de absorción del  $\beta$ -caroteno muestra, asimismo, las bandas IR características del compuesto (Figura 30), dos bandas a  $2920\text{ cm}^{-1}$  y  $2860\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las torsiones asimétrica y simétrica de los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , respectivamente, una banda a  $1440$  para el tijereteo en el plano del grupo  $\text{CH}_2$ , una banda a  $1360\text{ cm}^{-1}$  para el desdoblamiento del grupo dimetilo, así como una banda a  $960\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la deformación de los alquenos conjugados trans  $-\text{CH}=\text{CH}-$ . El espectro de las nanopartículas con  $\beta$ -caroteno encapsulado (Figura 31) muestra las bandas típicas de la proteína de soja y la bandas a  $1440$  y  $1360\text{ cm}^{-1}$  del  $\beta$ -caroteno.



**Figura 30. Espectro FTIR del  $\beta$ -caroteno.**



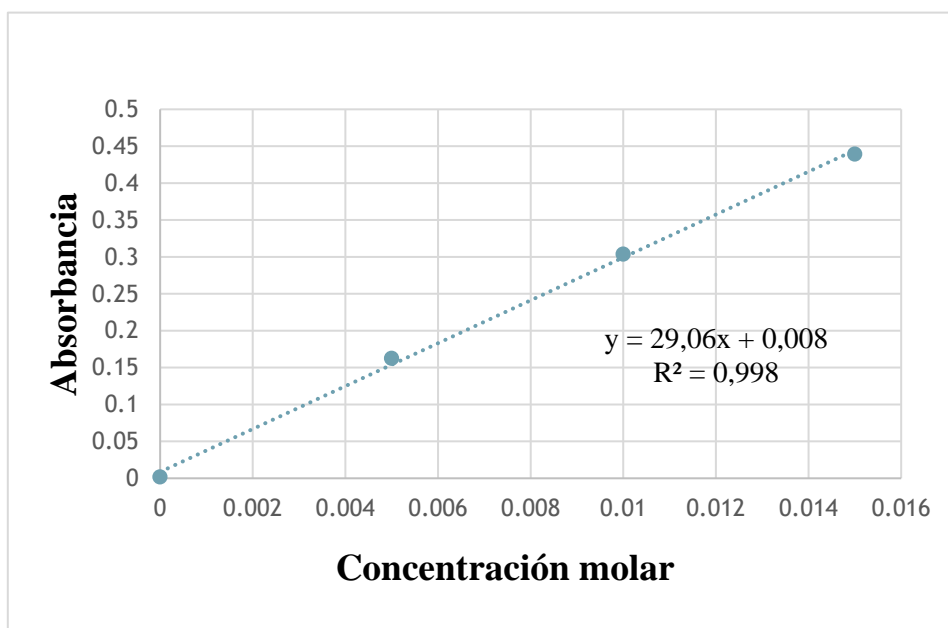
**Figura 31. Espectro FTIR de nanopartículas conteniendo  $\beta$ -caroteno encapsulado**

### **19.5 Determinación de la eficiencia de la encapsulación**

Se cuantificó la concentración de  $\beta$ -caroteno encapsulado suspendiendo en etanol el precipitado que contenía el  $\beta$ -caroteno no encapsulado. Con el intento de determinar la concentración de  $\beta$ -caroteno presente en el interior de las nanopartículas se realizó un calibrado de  $\beta$ -caroteno en una mezcla de etanol absoluto. A partir del calibrado (Figura 32) y del valor máximo de absorbancia del  $\beta$ -caroteno medido a 450 nm, se determinó el porcentaje de  $\beta$ -caroteno encapsulado. Para determinar la concentración de  $\beta$ -caroteno encapsulado es necesario conocer los miligramos utilizados para sintetizar las nanopartículas encapsuladas. En la Tabla 7 se muestran los valores de absorbancias obtenidos por cada muestra, la eficiencia de encapsulación expresada como el porcentaje de la relación entre la concentración de  $\beta$ -caroteno no encapsulado y el  $\beta$ -caroteno total (mg de añadidos para sintetizar las nanopartículas).

**Tabla 7. Eficiencia de encapsulación de las nanopartículas encapsuladas**

Muestra	4 mg/10%	4mg/80%	12mg/10%	12mg/ 80%
Volumen de dispersión (mL)	3	3	3	3
$\beta$ -caroteno añadido (mg)	0,40	0,40	1,2	1,2
Absorbancia	0,49	0,78	0,06	1,09
Eficiencia de encapsulación (%)	95,8%	93,3%	99,8%	96,8%

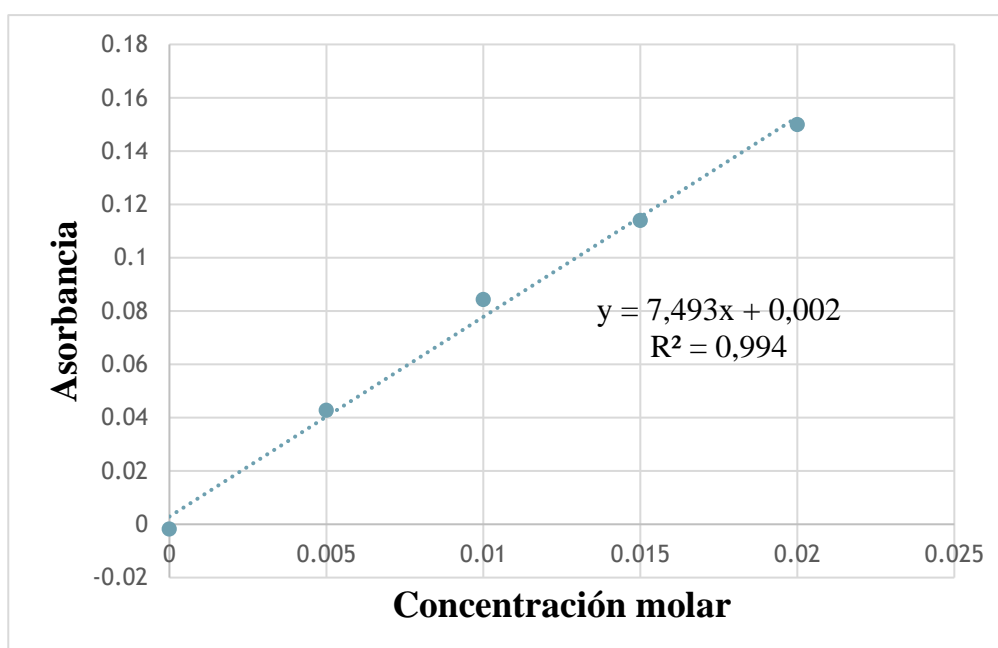


**Figura 32. Recta de calibrado para  $\beta$ -caroteno en etanol.**

Los porcentajes que determinaron la eficiencia de encapsulación resultaron ser muy altos en todas las muestras. La muestra que más se acercó a alcanzar el 100% de eficiencia fue el de las nanopartículas sintetizadas a partir de una concentración de 12 mg SPI y un 10% de etanol. De hecho, el sobrenadante que pertenecía a esta muestra fue el único que mostró un color rojo vivo ya que la mayoría del  $\beta$ -caroteno estaba encapsulado en las nanopartículas (sobrenadante) y no precipitó.

### 19.6 Liberación de $\beta$ -caroteno en PBS

Para el análisis de la liberación del  $\beta$ -caroteno se utilizaron las nanopartículas sintetizadas a partir de una concentración de 12 mg de SPI y 10 % de etanol porque resultaron ser las más estables (valor más negativo de potencial zeta) y con el más alto porcentaje de eficiencia de encapsulación (99,8%). En la Figura. se muestra la curva de calibrado utilizada para determinar la liberación del  $\beta$ -caroteno en PBS.



**Figura 33. Recta de calibrado para la liberación de  $\beta$ -caroteno en PBS.**

La liberación del  $\beta$ -caroteno en PBS se calculó teniendo en cuenta los miligramos de  $\beta$ -caroteno añadidos para encapsular las nanopartículas. Para la síntesis de las nanopartículas se pesaron 60,8 mg de SPI y el  $\beta$ -caroteno añadido correspondía al 2% de las SPI pesadas: 1,2 mg. Las nanopartículas pesadas para este análisis fueron 2,51

mg. La determinar los mg de  $\beta$ -caroteno situados en el interior de las nanopartículas se calculó de forma sencilla aplicando la siguiente relación:

$$60,8 \text{ mg (SPI): } 1,2 \text{ mg } (\beta\text{-caroteno}) = 2,5 \text{ mg (nanopartículas): } X$$

$$X = 0,0493$$

La eficiencia de encapsulación es de 99,8%

$$0,0493:100 = X: 99,8$$

$$X = 0,492 \text{ mg de } \beta\text{-caroteno en } 2,51 \text{ mg de nanopartículas.}$$

La señal de absorción de la muestra es de 0,05 y despejando la Y obtenida en la recta de calibración los miligramos de  $\beta$ -caroteno diluidos en 1 mL de solución resultaron ser 0,0062.

La muestra estaba diluida inicialmente en 5 mL de PBS/Tween20/etanol, así que se multiplicaron los miligramos por el valor de ese volumen:

$$0,006212 \times 5 = 0,03106 \text{ mg}$$

El porcentaje de  $\beta$ -caroteno liberado se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg de } \beta\text{-caroteno en } 5 \text{ mL PBS, Tween20, etanol}}{\beta\text{-caroteno contenido en } 2,5 \text{ mg de NPs}} \times 100$$

El porcentaje de  $\beta$ -caroteno liberado en PBS fue del 62%.

## 20 Conclusiones

1. Se sintetizaron satisfactoriamente nanopartículas a partir de proteínas aisladas de soja y se encapsularon con  $\beta$ -caroteno. El compuesto quedó encapsulado en el interior de los agregados proteicos.
2. Todas las nanopartículas resultaron tener una morfología esférica y homogénea. El tamaño más grande alcanzado lo alcanzaron las nanopartículas obtenidas a partir de 4mg/mL de SPI y 80% de etanol, mientras que las más estables resultaron ser las nanopartículas sintetizadas a partir de 12 mg/mL de SPI y 10% etanol.
3. El análisis de las muestras por FTIR mostró que el  $\beta$ -caroteno se encontraba ligado a las nanopartículas.
4. El porcentaje de la eficiencia de encapsulación resultó ser superior al 90% en todas las muestras estudiadas. La liberación de  $\beta$ -caroteno en un medio acuoso de PBS de las nanopartículas que resultaron ser las más estables fue superior al 60%.



## 21 Bibliografía

- Alonso, J.A. y Rubio, A (2001). Nanotubos de carbono. Nuevos sensores químicos. *Revista Investigación y Ciencia*:295 Abril 2001
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., y Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416- 423.
- Champagne, C. P., y Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184- 190.
- Chen F.P., Ou S.Y., Chen Z., Tang C.,H., (2017). Soy Soluble Polysaccharide as a Nanocarrier for Curcumin. *J. Agric. Food Chem.*, 65, 1707–1714
- Chuan-He T., Fu L., (2013). Cold, gel-like soy protein emulsions by microfluidization: Emulsion characteristics, rheological and microstructural properties, and gelling mechanism. *Food Hydrocolloids* 30, 61-72.
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., y Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 388-395
- Deladino, L., Navarro, A., y Martino, M. N. (2007b). Encapsulation of active compounds: Ionic gelation and cocrystallization as case studies. In C. E. Lupano (Ed.), *Functional Properties of Food Components*, (pp. 125-157).
- Estevinho, B. N., Rocha, F., y Gonçalves, A. (2016). Microencapsulation of vitamin A: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 76-87.
- Fei-Ping C., Shi-Yi O., Zhong C., Chuan-He T., (2017).Soy Soluble Polysaccharide as a Nanocarrier for Curcumin. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 1707–1714.
- Foo LY.; Lu Y. 1999. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chemistry* 64, 511-518.

- Fu L., Chuan-He T., (2011). Cold, gel-like whey protein emulsions by microfluidisation emulsification: Rheological properties and microstructures. *Food Chemistry* 127 1641–1647.
- Fu L., Chuan-He T.,(2016). Soy glycinin as food-grade Pickering stabilizers: Part. I. Structural characteristics, emulsifying properties and adsorption/arrangement at interface. *Food Hydrocolloids* 60, 606-619.
- Hsiao Y.H., Lu C.P., Kuo M.I., Hsieh J.F., (2016). Coacervation of  $\beta$ -conglycinin, glycinin and isoflavones induced by propylene glycol alginate in beate soymilk. *Food Chemistry*. 200, 55-61.
- Katouzian, I y Mahdi, S. (2016). Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*, 150, 280-286.
- Lin, C., Jianshe C., Jiaoyan Re., , Mouming Z., (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 887-897.
- Livney Y. D. (2015). Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. *Current Opinion in Food Science*. 3,125, 135.
- Mann, J.I.; Cummings, J. H. 2009. Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19, 226-29.
- Mintel. (2009). Mintel Predicts Consumer Behaviour Trends for 2010. In Report from Mintel International Group Limited.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., y Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- Onwulata, C. I. (2011). Encapsulation of New Active Ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 183-202.
- Onwulata, C. I. (2012). Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, no-no.

- Patel A.R y Velikov K.P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *Food Science and Technology*, 44 (9), 1958-1964.
- Schieber, A.; Hilt, P.; Streker, P.; En, H.U.; Rentschler, C.; Carle, R. 2003. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 99-107.
- Shin a G. H , Kim J. T. y Park H. J. (2015). Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends in Food Science & Technology* 46(1), 144-157.
- Socrates G. Third Edition. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Chartes. (Wiley).
- Teixeira, Z., Dreiss, C. A., Lawrence, M.J., Heenan, R. K., Machado, D., Justo, GZ., ... Durán, N. (2012). Retinyl palmitate polymeric nanocapsules as carriers of bioactives. *Journal of Colloids And Interface Science*, 382(1), 36-47.
- Teng, Z., Luo Y., Wang Q,. (2012). Nanoparticles synthesized from sot proteins: preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 60, 2712-2710.
- Yu-Hsuan H., Chun-Ping L., Meng-I K., Jung-Feng H., (2016). Coacervation of b-conglycinin, glycinin and isoflavones induced by propylene glycol alginate in heated soymilk. *Food Chemistry* 200, 55–61.
- Zhang, L., y Kosaraju, S. L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43(7), 2956–2966.

## **22 Anexo I. Encapsulación de antioxidantes procedentes de magaya de sidra: estudios preliminares**

### **22.1 Nanopartículas encapsuladas con antioxidantes**

Utilizando las concentraciones de SPI y etanol que presentaron los mejores resultados (12 mg SPI/mL-10% etanol) se decidió sintetizar nanopartículas encapsuladas con antioxidantes procedentes de magaya.

#### **22.1.1 Extracción antioxidante procedentes de la magaya**

Para extraer los antioxidantes de la magaya se pesaron 2,06 gramos de materia prima y se suspendieron en 40 mL de metanol. La suspensión se dejó en agitación en ultrasonidos 30 minutos y luego se centrifugó a 5000 revoluciones por 5 minutos. Finalmente se utilizó el rotavapor a 30 °C para eliminar el metanol (se extrajeron 0,8 g de antioxidantes). El precipitado solido se suspendió en 20 mL de etanol (Figura 1A1).



**Figura1A1. Extracto de magaya suspendido en etanol (matraz a la izquierda) y precipitado solido tras el tratamiento de la muestra con ultrasonidos (matraz a la derecha).**

#### **22.1.2 Preparación nanopartículas encapsuladas con antioxidantes procedentes de magaya de sidra**

Se decidió preparar una única muestra utilizando las concentraciones de SPI y etanol que dieron los mejores resultados en las encapsulaciones de  $\beta$ - caroteno (mejor relación entre estabilidad y tamaño): 12 mg/mL SPI - 10% etanol.

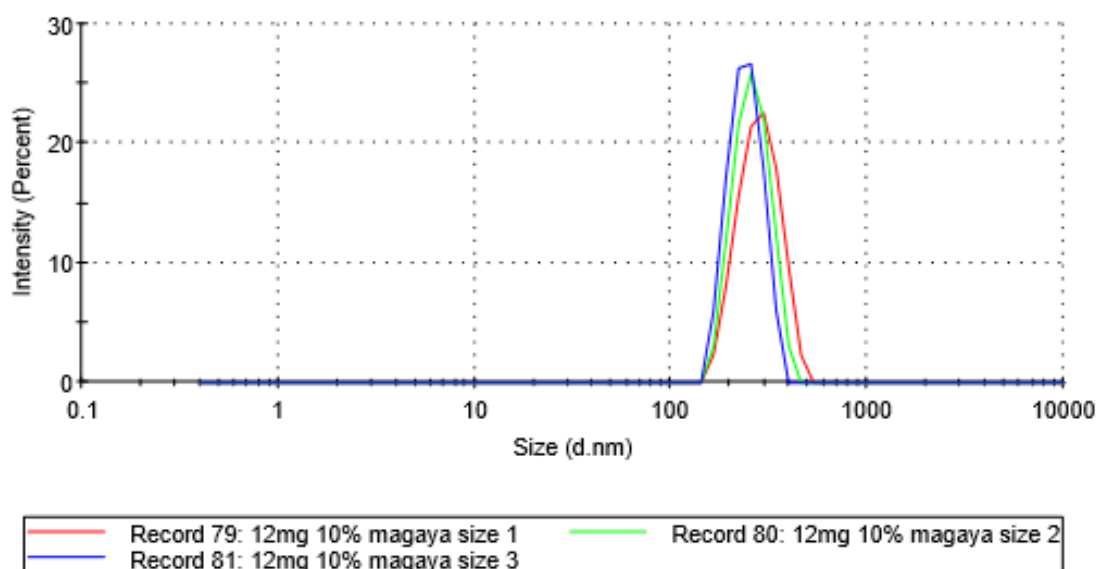
Se pesaron 62,7 mg y se suspendieron en 4,5 mL de agua desionizada, se dejaron en agitación y al cabo de una hora se añadieron 200  $\mu$ L de etanol gota a gota y 300  $\mu$ L de disolución que contenía los antioxidantes procedentes de la magaya. Finalmente, se añadió el glutaraldehído (Figura 2A1) y se siguieron las mismas etapas descritas en el caso del  $\beta$ -caroteno.



**Figura 2A1. Disolución de SPI, agua, etanol,  $\beta$ -caroteno y glutaraldehído antes de la formación de las nanopartículas.**

### 22.1.3 Tamaño e índice de polidispersividad

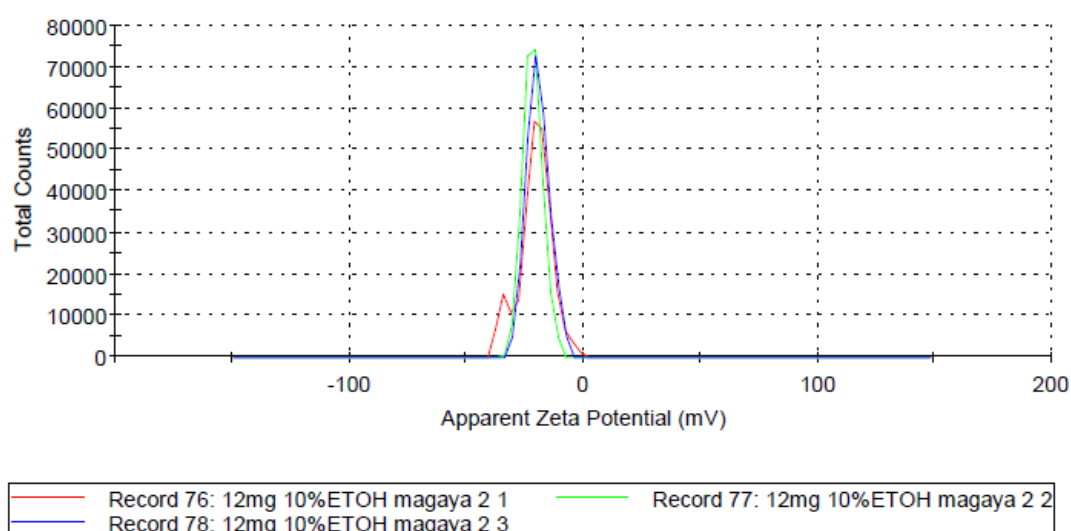
Las nanopartículas encapsuladas con antioxidantes procedentes de la magaya presentaron un diámetro hidrodinámico de 546,2 nm y un índice de polidispersividad de 0,49; valores mayores respecto a las nanopartículas encapsuladas con  $\beta$ - caroteno. En la Fig.3A1 se muestra el grafico obtenido por DSL.



**Figura 3A1. Distribución de diámetro por número obtenido por DLS de nanopartículas preparadas con 12mgSPI/mL - 10% y antioxidantes procedentes de magaya de sidra.**

La decisión de sintetizar las nanopartículas con antioxidantes a partir de una concentración de SPI de 12mg/mL y un porcentaje de etanol del 10% fue tomada principalmente por el hecho que cuando se sintetizaron las nanopartículas encapsuladas con  $\beta$ -caroteno el potencial zeta más favorable se obtuvo en la muestra con esas concentraciones (-39 mV).

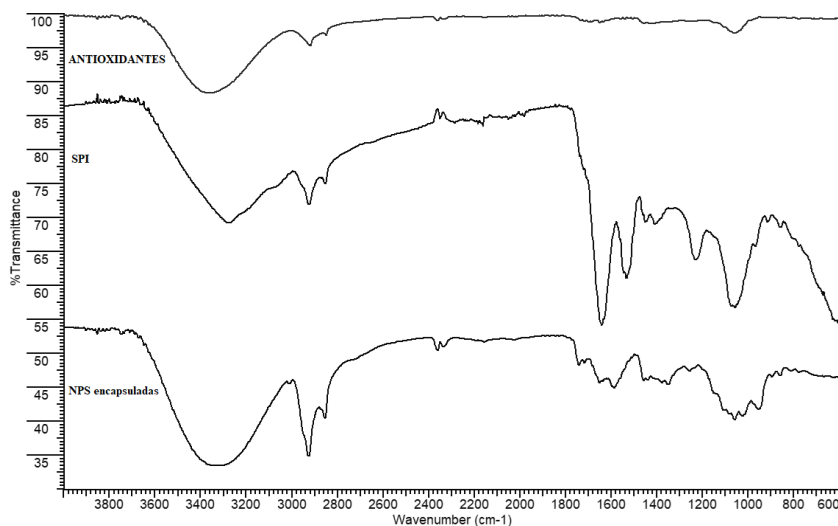
Las nanopartículas encapsuladas con antioxidantes procedentes de magaya resultaron ser las menos estables de todas, con un valor de potencial zeta de -19 mV. En la Figura 4A1, se muestra el diagrama de distribución de potencial zeta.



**Figura 4A1. Potencial zeta obtenido por DLS. Nanopartículas 12mgSPI/mL - 10% encapsuladas con antioxidantes procedentes de magaya.**

## 22.2 Estudio FTIR

De forma análoga a cómo se describió para el sistema con  $\beta$ -caroteno, se registraron los espectros FTIR del extracto de magaya y de las correspondientes nanopartículas, encapsuladas y libres. En la Figura 5A1 se muestran los resultados obtenidos.



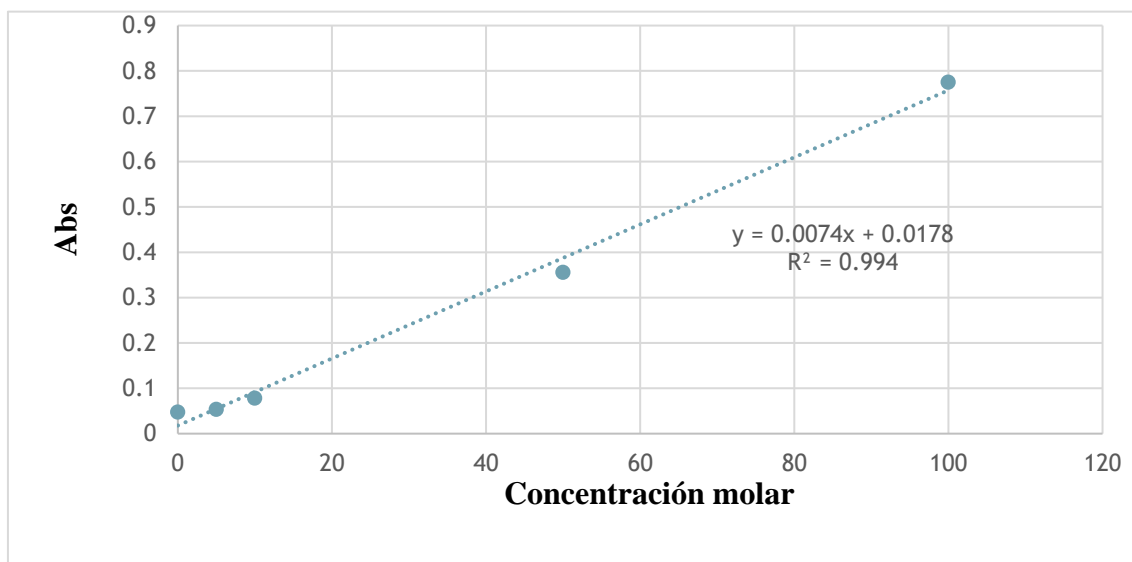
**Figura 5A1. Comparación de los diferentes espectros obtenidos por FTIR.**

Aunque es necesario llevar a cabo una caracterización exhaustiva de la composición del extracto de magaya, que será objeto de trabajos posteriores, si parece evidente que las nanopartículas libres presentan un espectro FTIR claramente diferente al de las nanopartículas encapsuladas. Este hecho parece indicar que sí hay algún tipo de interacción que las modifica, aunque en el estado actual de la investigación no podemos avanzar o especular qué tipo de compuestos han sido encapsulados o si éstos simplemente se han adherido a la superficie de las nanopartículas. La bibliografía señala como algunos de los antioxidantes extraíbles de la magaya los siguientes: ácidos gálico, clorogénico y p-cumárico, así como quercitrina, epicatequina y quercetina.

## 22.3 Determinación de antioxidantes extraídos en las nanopartículas con metodo Folin-Ciocateau

El extracto procedente de la magaya, donde se presume la presencia de antioxidantes, se diluyó en una solución de etanol absoluto. Se añadieron a las disoluciones que

contenían las nanopartículas 300 µL del extracto para alcanzar el 10% de etanol. Para determinar la cantidad de antioxidantes, la muestra de extracto se trató como se describe en el apartado 17.1 y se construyó una curva de calibrado con ácido gálico utilizando el método de Folin- Cioclateau. En la Fig.6A1 se muestra la recta de calibrado obtenida.



**Figura 6A1. Recta de calibrado para la determinación de la cantidad de antioxidantes extraídos de magaya de sidra**

Los resultados mostraron que el extracto contenía 252 mg de antioxidantes/mL de extracto.

#### **22.4 Eficiencia de encapsulación**

Para calcular la eficiencia de encapsulación, el precipitado que contenía los antioxidantes fue suspendido en 5 mL de etanol, centrifugado 10.000g durante 15 minutos y el sobrenadante se diluyó en carbonato sódico, reactivo de Folin y agua como se describió en el apartado 16. Tras una hora de reposo al abrigo de la luz, la muestra se midió en el espectrofotómetro y la eficiencia de la encapsulación se calculó empleando la fórmula:

$$100 - \left( \frac{\text{extracto en suspensión de etanol}}{\text{extracto añadido en principio}} \times 100 \right) = \%$$



Los resultados no fueron concluyentes debido a que la medida de absorbancia resultó demasiado alta, lo que puede ser indicativo de que el tratamiento de centrifugación no fue efectivo y parte de las proteínas reaccionaron con el reactivo de Folin. Es necesario ahondar en este aspecto. Por ejemplo, aumentar el tiempo de centrifugación, realizar blancos con las nanopartículas o ensayar un método alternativo que no esté sujeto a interferencias por proteínas.

## 23 Anexo II: Ensayo del Biuret para proteínas

### 23.1 Preparación del reactivo de Biuret

Se disolvieron 0,15 g de Sulfato de cobre pentahidratado y 0,6 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua desionizada; se añadieron 30 mL de solución acusa al 10% de NaOH, se adicionaron 0,1 g de yoduro de potasio para inhibir la reacción del cobre y se enrasó hasta el volumen de 100 mL. Se guardó la disolución al abrigo de la luz.

### 23.2 Metodología

Se preparó una recta patrón disolviendo 100,4 mg de albúmina de suero bovino (BSA) en 10 mL de agua desionizada. La BSA será la proteína de referencia para determinar SPI. Se prepararon las diferentes disoluciones de ABS y se dejaron reaccionar con el reactivo de Biuret durante media hora. La muestra fue preparada disolviendo 1,1 mg de SPI en 1 mL de agua desionizada. Se tomaron 500  $\mu$ L de esta disolución y se dejaron reaccionar con 2,5 mL de reactivo de Biuret durante 30 minutos. En la Figura 1A2 se muestra la curva de calibrado para BSA utilizada para la medición de la muestra de las proteínas de soja aisladas.

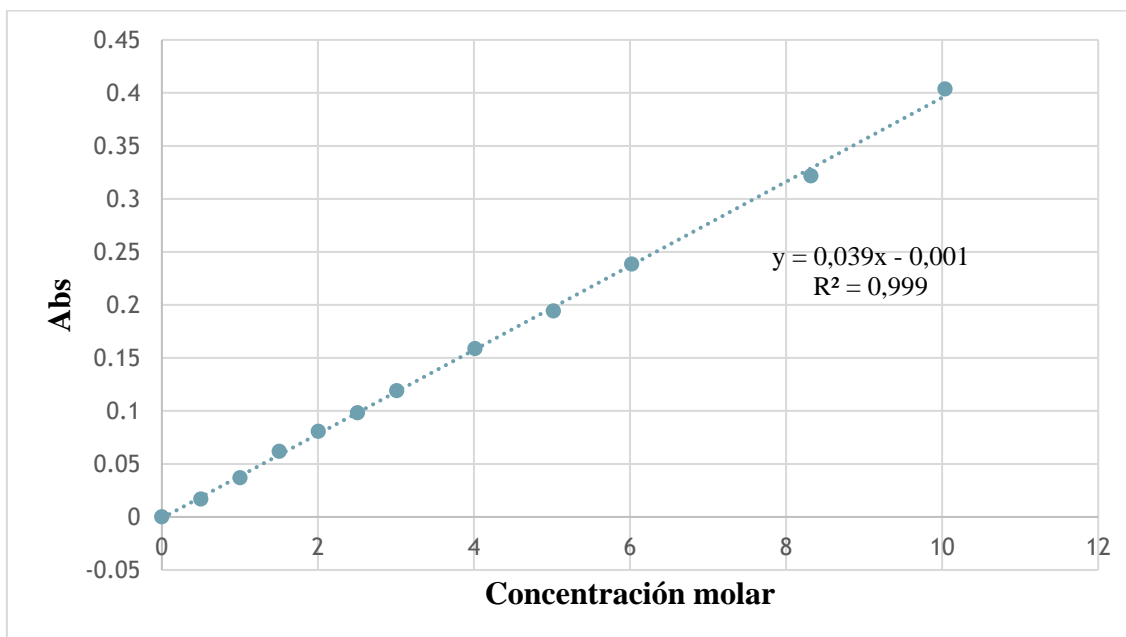
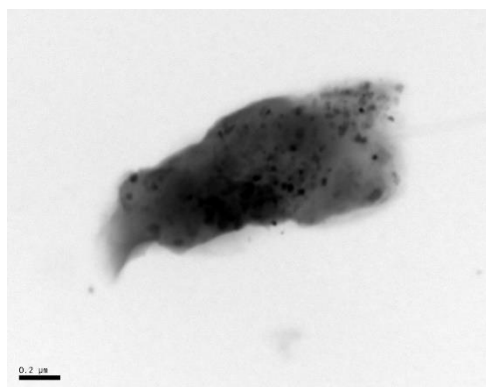


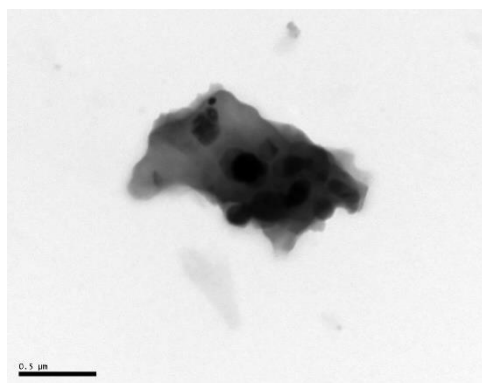
Figura 1A2. Recta de calibrado para determinar la cantidad de proteínas.

Los resultados obtenidos en esta experiencia no fueron analíticamente útiles, obteniéndose mayor cantidad de SPI que la adicionada. Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que se utiliza como patrón de referencia la BSA, una proteína muy diferente a la proteína de soja. En estudios posteriores se seleccionará una proteína afín para llevar a cabo la determinación, empleando el método del Biuret.

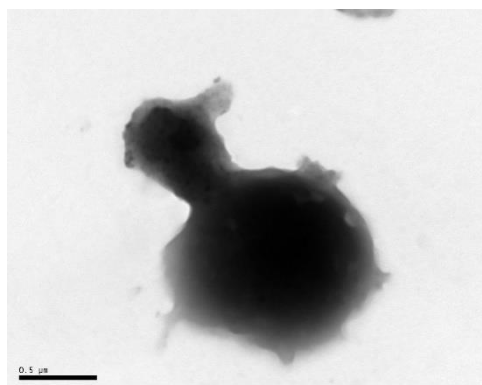
## 24 Anexo III: Formación de nanopartículas en una secuencia de imágenes.



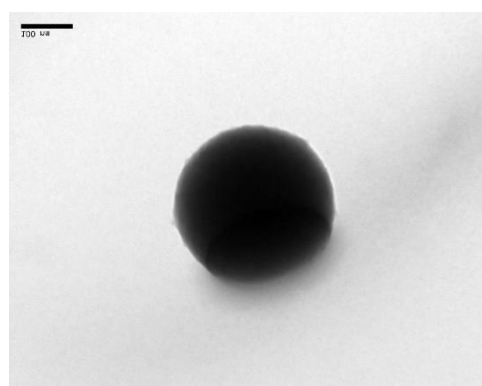
**Figura 1A3. Agregado proteínico.**



**Figura 2A3. Agregado proteínico.**



**Figura 3A3. Formación de la nanopartícula.**



**Figura 4A3. Nanopartícula completamente formada.**