

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA**

**“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
A BASE DE ZEÍNA ESTABILIZADAS CON PECTINA Y  
 $\beta$ -LACTOGLOBULINA”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO  
DE

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Q. EN A. ANDREA ESQUIVEL CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

DRA. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ

DR. D. JULIAN MCCLEMENTS

QUERÉTARO, QRO.

OCTUBRE 2013.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**POSGRADO DE ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA**

**"DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE ZEÍNA  
ESTABILIZADAS CON PECTINA Y  $\beta$ -LACTOGLOBULINA"**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Q. EN A. ANDREA ESQUIVEL CHÁVEZ

DIRIGIDA POR

DRA. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ

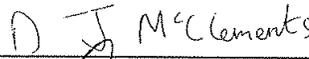
DR. D. JULIAN MCCLEMENTS

**SINODALES**

DRA. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ  
PRESIDENTE

  
FIRMA

DR. DAVID JULIAN MCCLEMENTS  
SECRETARIO

  
FIRMA

DRA. MA. GUADALUPE F. LOARCA PIÑA  
VOCAL

  
FIRMA

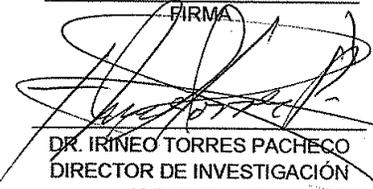
DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO  
SUPLENTE

  
FIRMA

DRA. ERIKA BUSTOS BUSTOS  
SUPLENTE

  
FIRMA

  
M.S.P. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

  
DR. IRINEO TORRES PACHECO  
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN  
Y POSGRADO

CENTRO UNIVERSITARIO  
QUERÉTARO, QRO.  
OCTUBRE 2013.  
MÉXICO

## Resumen

La zeína es una proteína rica en prolina, proveniente del maíz, la cual ha sido estudiada ampliamente para la formulación de sistemas de liberación. Su característica hidrofóbica la hace un candidato ideal para el desarrollo de partículas poliméricas de origen natural, las cuales pueden ser empleadas para la liberación controlada de fármacos u otras moléculas funcionales como los nutraceuticos. Sin embargo el uso de partículas coloidales a base de zeína como sistemas acarreadores de sustancias activas en alimentos puede no ser óptimo debido a que estas no son estables a diferentes valores de pH que se pueden encontrar en alimentos. La presente tesis de maestría está dirigida al desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación con un valor potencial en aplicaciones alimentarias. En este estudio utilizando la técnica de dispersión liquido-liquido se indica la posibilidad de usar HMP y  $\beta$ -lg para la estabilización de sistemas nanoparticulados a base de zeína con propiedades que pueden ser moduladas mediante el pH y la concentración del estabilizante empleado. Un incremento en la concentración de polisacárido da partículas cargadas más negativamente, así mismo tamaños de partícula mayores hasta que se alcanza la concentración de saturación. Sin embargo este comportamiento no se observa tan marcadamente en todos los valores de pH. Para el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se presentan partículas solubles a pH de 8 y 7, pero una agregación muy grande a pH de 6 a 3, la cual puede ser atribuido a la neutralización de las cargas entre las macromoléculas y enlaces. Las nanopartículas formadas en este estudio pueden ser empleadas como sistemas de liberación en alimentos con pH de 5 y 6 para el caso de aquellos sistemas estabilizados con pectina a una concentración  $\geq 0.9\%$  en donde los tamaños de partícula son menores. Las partículas de zeína son inestables cuando se incorporan a matrices con valores de pH por arriba de su pl, pero estables cuando se forman en presencia de pectina.

(Palabras clave: nanopartículas, zeína, pectina alto metoxilo,  $\beta$ -lactoglobulina, dispersión líquido-líquido.)

## Summary

Zein is a proline-rich protein obtained from corn, which has been studied extensively as a biomaterial for delivery systems. Its hydrophobic property makes it an ideal candidate for the development of natural biopolymeric colloidal particles, which can be used for controlled release for drugs or other functional molecules such as nutraceuticals. However, the use of zein colloidal particles in foods or as delivery systems may not be optimal because these system is not stable at pH of food. This master thesis is focused on developing new encapsulation systems with a potential value in food applications. In this study using the technique of liquid-liquid dispersion will develop nanoparticulate structures including zein and biopolymers such as high metoxil pectin or  $\beta$ -lactoglobulin, as stabilizers. The properties of the structures are modulated by pH and biopolymers concentration. An increased in polysaccharide concentration generate nanoparticles negatively charged, resulting in bigger particle sizes. But this effect is not the same in all the range of pH. The systems stabilized with  $\beta$ -lactoglobulin show soluble particles at pH 8 and 7, but aggregate when the pH is in the range of 6 to 3 because of molecule neutralization of charge. The resulting nanoparticles stabilized with  $\geq 0.9\%$  pectin concentration can be used as delivery systems in food with pH 6 or 5, the particle size in this condition are smaller. Zein nanoparticles are unstable when are incorporating in food matrix with pH values above the pI of zein, but stables with pectin as stabilizer.

(Key words: nanoparticles, zein, high metoxil pectin,  $\beta$ -lactoglobulin, liquid-liquid dispersion.)

## Dedicatorias

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que estaba a punto de caer; ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han brindado. A ustedes les dedico cada una de las páginas de esta tesis.

Mamá y papá.

“Food is Essential to life therefore make it good”

S.Truett Cathy

## **Agradecimientos**

A mis padres por darme la vida, educarme, quererme, inspirarme, orientarme y respetar todas y cada una de las decisiones que he tomado en la vida.

A mi hermano por quererme, aconsejarme e impulsarme a ser mejor cada día.

A Emmanuel por todo su apoyo, paciencia, ejemplo, amor y por seguir compartiendo conmigo su vida aquí, en el extranjero y en donde quiera que nos encontremos.

A mi familia por todo el apoyo y cariño que me brindaron durante mi estancia lejos de casa.

A mis abuelos por su sabiduría, amor y confianza.

A la familia Villanueva Chimal, por todas sus atenciones, cariño y apoyo.

A la Dra. Sandra por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por brindarme su confianza y apoyo; pero sobretodo, por ser una guía e influir con lecciones y experiencias en mi formación profesional.

A los miembros del Comité Evaluador por su revisión crítica y comentarios a esta tesis.

A todo el Laboratorio de Nutraceuticos: Adriana, Alma, Etzuly, Magaly y Sandra por el caos al trabajar juntas, las reuniones de grupo, las comidas y la retroalimentación continua.

A esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, cariño y amistad: Aurora, Caro y Diego.

# INDICE

	<b>Página</b>
Resumen	
Summary	
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	6
II.1. Sistemas de liberación coloidal	6
II.2. Nanopartículas	9
II.3. Ventajas del uso de los sistemas nanoparticulados	10
II.4. Características importantes de las nanopartículas	11
II.4.1. Tamaño de partícula	11
II.4.2. Propiedades de superficie	12
II.4.3. Carga del activo	12
II.4.4. Liberación del activo	13
II.5. Técnicas de preparación de las nanopartículas	13
II.5.1. Dispersión de polímeros preformados	14
II.5.2. Polimerización de monómeros	15
II.5.3. Coacervación o gelación iónica	16
II.6. Materiales de pared	16
II.7. Maíz	20
II.7.1 Proteínas del maíz	23
II.8. Zeína	25
II.9. Beta-lactoglobulina ( $\beta$ -lg)	29
II.10. Pectina	32
III. HIPÓTESIS	36
IV. JUSTIFICACIÓN	37
V. OBJETIVO GENERAL	38
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
VII. METODOLOGÍA	39

VII.1. Materiales	39
VII.2. Métodos	39
VII.2.1 Prueba de solubilidad	39
VII.2.2. Formación de las nanopartículas	40
VII.2.3. Estabilización de las nanopartículas	41
VII.2.3.1. Preparación de la solución primaria	41
VII.2.3. 2. Preparación de la fase amortiguadora	41
VII.2.4. Estabilidad de las nanopartículas al cambio de pH	42
VII.2.5. Caracterización de nanopartículas formadas	42
VII.2.5.1. Tamaño de partícula	43
VII.2.5.2. Potencial- $\zeta$	43
VII.2.5.3. Microscopía óptica	44
VII.3. Análisis Estadístico	44
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
VIII.1. Identificación del sistema binario (etanol/agua) para la solubilización de la zeína	45
VIII.2. Identificación de las condiciones de pH adecuadas para la formación de nanopartículas a base de zeína	47
VIII.2.1. Estabilidad de los sistemas nanoparticulados al cambio de pH	53
VIII.3. Impacto del tipo de biopolímero en la estabilización de sistemas nanoparticulados a base de zeína	54
VIII.3.1. Impacto del biopolímero en el tamaño de partícula	55
VIII.3.2. Impacto del biopolímero en la carga de la partícula	60
IX. CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	70
APENDICE	77

## Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1.	Materiales de pared para la encapsulación de ingredientes alimentarios.	19
2.	Distribución de los componentes mayoritarios del grano de maíz.	23
3.	Distribución de las fracciones proteicas en el maíz (% base seca).	24
4.	Composición de aminoácidos de la zeína.	26
5.	Propiedades de la zeína.	29
6.	Propiedades de la $\beta$ -lactoglobulina.	30
7.	Tamaño de partícula y potencial- $\zeta$ de dispersiones coloidales formadas a diferentes pHs.	51
8.	Efecto de la concentración de estabilizante en el tamaño de partícula a pH 7.	60
9.	Valores de potencial- $\zeta$ de dispersiones coloidales estabilizadas con pectina a diferentes concentraciones (2.0 - 0.3 %) ajustadas a diferentes pHs.	64

## Índice de Figuras

Figura		Página
1.	Representación esquemática de las características de los sistemas coloidales en términos de composición, tamaño y propiedades de superficie.	7
2.	Representación esquemática de nanopartículas poliméricas.	10
3.	Corte transversal del grano de maíz, muestra la localización de los componentes mayoritarios presentes en el grano.	22
4.	Diagrama de tres fases para la solubilidad de la zeína en etanol y agua.	27
5.	Estructura química de la pectina.	33
6.	Prueba de solubilidad de zeína a diferentes concentraciones en sistemas binarios etanol/agua.	46
7.	Principio de dispersión líquido-líquido para la producción de nanopartículas a base de zeína.	48
8.	Dispersiones de zeína preparadas empleando soluciones amortiguadoras a diferentes pHs.	49
9.	Efecto del pH sobre el tamaño de partícula ( $D [3,2]$ ) de las nanopartículas a base de zeína.	50
10.	Efecto del pH sobre el potencial- $\zeta$ de las nanopartículas a base de zeína.	52
11.	Estabilidad de las dispersiones coloidales a base de zeína al cambio de pH.	54
12.	Dispersiones coloidales preparadas empleando diferentes concentraciones de $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg).	55
13.	Dispersiones coloidales preparadas empleando diferentes concentraciones de pectina de alto metoxilo (HMP).	56
14.	Efecto de la concentración de pectina y el pH en el tamaño de partícula.	57
15.	Efecto del cambio de pH en el tamaño de partícula.	58

16.	Efecto de la concentración de $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y el pH en el tamaño de partícula.	59
17.	Efecto de la concentración de pectina y el pH en la carga de la partícula.	61
18.	Grupos aniónicos de la molécula de pectina.	62
19.	Efecto de la concentración de $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y el pH en la carga de la partícula.	65

# I. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas o más la percepción de la población con respecto a los alimentos ha cambiado drásticamente, estos han pasado de ser satisfactores de hambre a ser una fuente de bienestar. Este creciente interés por parte de los consumidores ha conducido a la aparición de una categoría de alimentos especializados, conocidos comúnmente como alimentos funcionales, que se basa en el enriquecimiento de los productos alimentarios con micronutrientes (ej. Vitaminas y minerales) o ingredientes funcionales (ej. fitoquímicos como polifenoles, fitoesteroles) o una combinación novedosa de ingredientes, tales como, fibra añadida a bebidas, aceite de pescado añadido al pan o cultivos bacterianos añadidos a productos lácteos. Estos alimentos además de nutrir son capaces de producir beneficios para la salud (Heidebach et al., 2012).

Por lo que la industria alimentaria ha centrado su investigación en productos de esta naturaleza (Schrooyen et al., 2001; Carneiro et al., 2012). Aunque el desarrollo de estos productos no es una tarea sencilla, ya que a menudo la adición de ingredientes funcionales a los alimentos conduce a problemas que van desde dificultades de formulación, estabilidad, apariencia, hasta su interacción con la matriz alimentaria y disminución de la bioaccesibilidad de los compuestos. Representando así nuevos desafíos para la industria alimentaria.

Existen básicamente dos formas de adicionar ingredientes (funcionales) a un alimento: en su forma soluble, como solución o en su forma insoluble como dispersión. Si la solubilidad lo permite, añadir los ingredientes solubles es muy ventajoso en términos de facilidad de formulación, en donde los ingredientes pueden ser añadidos por simple disolución. Además el componente soluble se encontraría más fácilmente disponible para la absorción y por lo tanto conduciría a una mejor bioaccesibilidad; sin embargo, la forma soluble da características

gustativas inherentes. Además, la reactividad química de la forma soluble será más elevada conduciendo a interacciones no deseadas con los componentes del producto que pueden incluir por ejemplo decoloración y precipitación. Adicionando el ingrediente en su forma insoluble se puede considerar para aquellos ingredientes que imparten sabores indeseables o aquellos que muestran alta reactividad química. Por el otro lado, la forma insoluble conduce a cambios en la textura debido a la posible cremación o sedimentación. La presencia de grandes partículas insolubles también puede conducir a la arenosidad, alterando la palatabilidad del producto. También puede significar un riesgo potencial debido a la disminución de la bioaccesibilidad aunada a la insolubilidad de los ingredientes funcionales añadidos.

En consecuencia, ingredientes funcionales como: vitaminas (Luo et al., 2011; Ziani et al., 2012), fármacos (Xiao y Zhong, 2011), antioxidantes (Arcan y Yemenicioğlu, 2011; Zou et al., 2012) y antimicrobianos (Fu et al., 2009; Wu et al., 2012); son poco utilizados directamente en su forma pura, en su lugar son incorporados dentro de algún sistema de liberación. Las características del sistema de liberación influyen en la eficacia de los ingredientes funcionales en muchos productos alimentarios. Hasta el momento los sistemas de liberación coloidales logran un claro balance entre la forma soluble y la insoluble y ofrecen una alternativa prometedora a la actual formulación práctica.

En la forma coloidal, los ingredientes conservan su característica insoluble en el producto por lo que se presentan menos problemas en cuanto al sabor o la reactividad química pero una vez que sean ingeridos, estos son solubilizados en condiciones *in vivo* y presentan una buena bioaccesibilidad. En el área farmacéutica, los sistemas de liberación han presentado enfoques alternativos en cuanto a la formulación de fármacos. A lo largo de los años el área de los sistemas coloidales ha evolucionado desde la identificación de nuevos materiales empleados para el transporte pasivo o activo de aditivos y más recientemente a sistemas biológicamente activos (Patel y Velikov, 2011).

Es bien sabido que los sistemas coloidales como sistemas de liberación pueden ser una fuente de información para el desarrollo de estos sistemas en alimentos. Actualmente, existe un creciente interés en el desarrollo de sistemas coloidales como matrices encapsulantes basadas en materiales naturales, biodegradables y comestibles como polisacáridos, lípidos y proteínas. Estas últimas, al poseer un alto valor nutricional y funcional se convierten en vehículos o componentes atractivos para la construcción de sistemas para la liberación de una serie de compuestos bioactivos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos (Schrooyen et al., 2001).

En México, el maíz forma parte de nuestra alimentación diaria, es el cultivo de mayor presencia en nuestro país, constituye un insumo para la ganadería y para la obtención de numerosos productos industriales, por lo que, desde el punto de vista alimentario, económico, político y social, es el cultivo agrícola más importante (SIAP, 2008). El maíz (*Zea mays ssp. mays*), al igual que el trigo, el arroz, la cebada, el centeno y la avena pertenecen a la familia Poaceae. Este cultivo se originó mediante el proceso de domesticación que llevaron a cabo los antiguos habitantes de Mesoamérica, a partir de los “teocintles”, gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica.

El proceso de domesticación del maíz inicio hace aproximadamente 10,000 años, asociado a la invención y desarrollo independiente de la agricultura en Mesoamérica, y continua en el presente con el manejo, el cultivo y selección que hacen año con año los agricultores. Hoy día el maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar. El maíz es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. Además el maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es

mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Habiéndose originado y evolucionado en la zona tropical como una planta de excelentes rendimientos, hoy día se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile. La mayor parte del maíz es cultivado a altitudes medias, pero se cultiva también por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3 800 msnm en la cordillera de los Andes. Las mayores partes del grano de maíz son el endospermo y el germen, los cuales contienen la mayor cantidad de almidón y aceite, respectivamente. El contenido de proteína de las diferentes variedades es de 6-12% base seca. Alrededor del 75% de la proteína se encuentra en el endospermo. La zeína pertenece al grupo de las prolaminas, proteínas características de los cereales (el equivalente a la hordeína en la cebada y la gliadina en el trigo). Debido a su insolubilidad en agua su uso en productos alimentarios ha sido limitado, sin embargo a mediados del siglo 20 se buscó la posibilidad de ser empleado como polímero industrial.

La zeína ha sido aplicada exitosamente como material acarreador para la formación de películas, recubrimientos, microesferas y microcapsulas (Arcan y Yemenicioğlu, 2011; Cho et al., 2002; Fu et al., 2009; Hurtado-López y Murdan, 2006; Liu et al., 2005; Luo et al., 2011; Mastromatteo et al., 2009; Muthuselvi y Dhathathreyan, 2006; O'Donnell et al., 1999; Patel et al., 2010a, Patel et al., 2010b; Patel et al., 2012; Parris et al., 2005; Quispe-Condori et al., 2011; Singh et al., 2010; Wang et al., 2005, Xiao y Zhong, 2011; Zhong y Jin, 2009; Zhong et al., 2009; Zou et al., 2012) para el atrapamiento y la liberación controlada de fármacos, aceites esenciales o micronutrientes en el área farmacéutica y alimentaria.

Sin embargo, este tipo de sistemas de liberación no son estables a cambios de pH, fuerza iónica o temperatura, por lo que es necesaria su estabilización para ser empleados en una matriz compleja, como es el caso de los alimentos. El uso de estabilizantes como polisacáridos o proteínas presenta una opción viable para el

desarrollo de sistemas acarreadores estables a factores inherentes a la matriz alimentaria.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Sistemas de liberación coloidal

En la naturaleza no abundan las sustancias puras. La mayoría de las sustancias son sistemas de más de un componente químico. Aquellos sistemas en los que encontramos componentes macromoleculares, como proteínas, polisacáridos, polímeros sintéticos, entre otros presentan comportamientos específicos que les confieren ciertas particularidades. Esto hace que sean considerados como un tipo especial de sistemas dispersos o sistemas coloidales (Rodríguez, 2006). Los sistemas coloidales de liberación son sistemas de, al menos, dos fases, una de ellas dividida en pequeñas partículas (fase dispersa, fase discontinua) a las que rodea completamente otra sustancia (fase dispersante, fase continua). Estos sistemas pueden ser clasificados de la siguiente manera: i) dispersiones de sólidos en líquidos, ii) dispersiones de líquidos en líquidos y iii) dispersiones de moléculas autoensambladas. La **Figura 1** muestra una representación esquemática de algunas características de los diversos sistemas de liberación coloidal en cuanto a su composición, tamaño, morfología y superficie (Patel y Velikov, 2011).

Los sistemas de liberación coloidal pueden estar compuestos de un solo componente-activo (partículas coloidales) o una combinación de bioactivos incorporada a una matriz (por ejemplo, nanopartículas poliméricas, partículas sólidas de lípidos, etc.), el estado de agregación del sistema podría ser líquido (emulsiones); cristalino o sólido amorfo (partículas coloidales) y cristales líquidos (mesofases). El tamaño puede variar desde alrededor de 10 nm para las micelas a cientos de nanómetros para las otras dispersiones. La estabilización es el requisito básico para la formación de sistemas coloidales, esta se puede lograr ya sea por carga superficial (estabilización electrostática); adsorción superficial de una capa

de tensoactivo o un polímero (estabilización estérica) o una combinación de ambas (estabilización electroestérica) (Patel y Velikov, 2011).

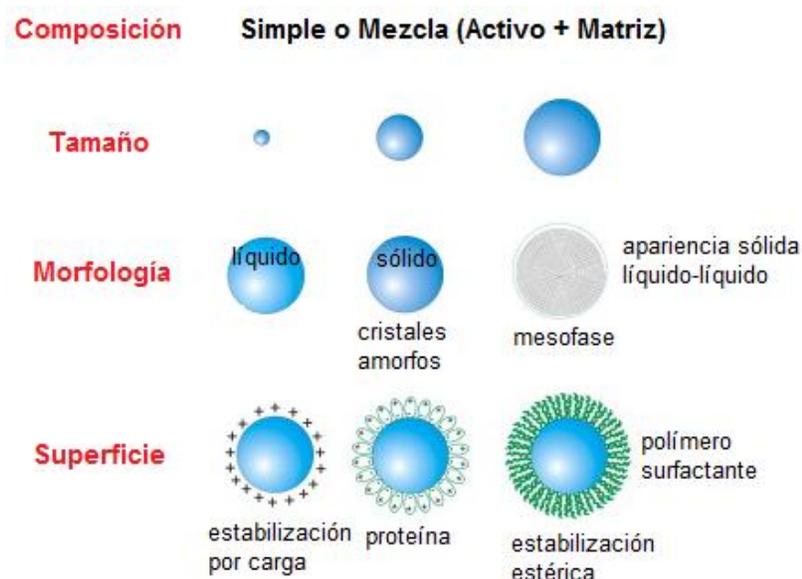


Figura 1. Representación esquemática de las características de los sistemas coloidales en términos de composición, tamaño y propiedades de superficie.

Este tipo de sistemas abarca una amplia gama de sistemas de dispersión que van desde emulsiones submicrónicas y partículas coloidales hasta liposomas y micelas (Patel y Velikov, 2011). Hasta el momento uno de los sistemas de liberación más ampliamente estudiado son los liposomas, siendo diseñados inicialmente para la administración de fármacos. Su estructura consiste en una vesícula formada a partir de una o más bicapas lipídicas, generalmente compuesta por fosfolípidos, que rodea un núcleo acuoso. La presencia de un dominio hidrófobo y uno hidrófilo dentro de la estructura del liposoma permite su utilización como portadores de moléculas de ambas naturaleza, las interacciones entre los liposomas y los compuestos activos están dadas por enlaces no covalentes. Los lípidos que integran los liposomas son fácilmente degradables *in vivo*, permitiendo que sus componentes sean removidos del cuerpo fácilmente. Sin embargo,

algunas de las limitaciones de su uso en productos alimenticios incluyen generalmente altos costos de las materias primas, el uso de disolventes orgánicos y tensoactivos sintéticos en el proceso de preparación, la baja estabilidad a pH ácidos y la baja eficiencia de encapsulado (Costantino et al., 2009; Patel y Velikov, 2011).

Las micelas por otro lado tienen de alguna manera una limitada capacidad para encapsular compuestos bioactivos (Costantino et al., 2009). Su estructura puede explicarse de la siguiente manera: cuando las micelas se encuentran en medios polares como el agua, la parte hidrófoba de los compuestos anfifílicos tiende a situarse lejos de la fase polar, mientras que la parte polar de las moléculas tiende a localizarse en la interfaz micela-disolvente y asumir varias formas, dependiendo de las condiciones y la composición del sistema, tales como esferas, discos o varillas. La carga de las micelas se basa generalmente en la encapsulación física durante el proceso de montaje de las micelas, en el cual los compuestos activos pueden ser secuestrados por el núcleo de la micela. Los sistemas micelares tienen ciertas ventajas como sistemas de liberación: tamaño pequeño (típicamente <10 nm), estabilidad termodinámica y estabilidad coloidal. Sin embargo, tienen una limitada solubilidad la cual está determinada por la especificidad del surfactante y su concentración. Además, estos sistemas de agentes tensoactivos (incluyendo microemulsiones y sistemas autoemulsificantes) tienen la tendencia de impartir sabor indeseable a la formulación debido a la alta concentración de tensoactivo limitando así su uso en productos alimentarios (Patel y Velikov, 2011).

Al igual que los liposomas las emulsiones han sido estudiadas ampliamente y es el sistema coloidal comúnmente empleado en la industria alimentaria. Una emulsión es un sistema de dispersión termodinámicamente inestable que se compone de dos líquidos inmiscibles estabilizados por moléculas tensoactivas. Las emulsiones pueden tener tamaños de partícula muy amplios, sin embargo puede darse el caso en que los tamaños de partícula sean tan pequeños

que estos sistemas se asemejen a las micelas debido a su comportamiento, a su organización espontánea y a la forma en que interactúan. Con el fin de liberar los compuestos bioactivos las emulsiones necesitan someterse a un complejo proceso de digestión de los lípidos en donde estos interactúan con la bilis y enzimas digestivas en el intestino (Patel y Velikov, 2011).

A diferencia de los sistemas de liberación mencionados anteriormente, las nanopartículas presentan una ventaja significativa cuando se pretende escalar su producción debido a que se emplean tanto materias primas como procesos de elaboración de bajo costo, fácilmente escalables (Costantino et al., 2009; Zhong y Jin, 2009).

## II.2. Nanopartículas

Las nanopartículas se definen como dispersiones particuladas o sólidos coloidales con un tamaño que va desde 1 nm hasta 1000 nm, diseñadas generalmente a partir de polímeros que pueden ser degradados *in vivo* (Mohanraj y Chen, 2006; Zou et al., 2012). Las nanopartículas son un término colectivo empleado para las nanocápsulas y nanoesferas, las cuales se pueden obtener dependiendo del método de preparación (**Figura 2**) (Reis et al., 2006).

Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los cuales el activo está conferido en una cavidad o núcleo rodeado por una membrana polimérica, mientras que las esferas son sistemas matriciales en los cuales el bioactivo se encuentra incrustado en la matriz polimérica de manera uniforme (Mohanraj y Chen, 2006; Patel y Velikov, 2011; Reis et al., 2006).

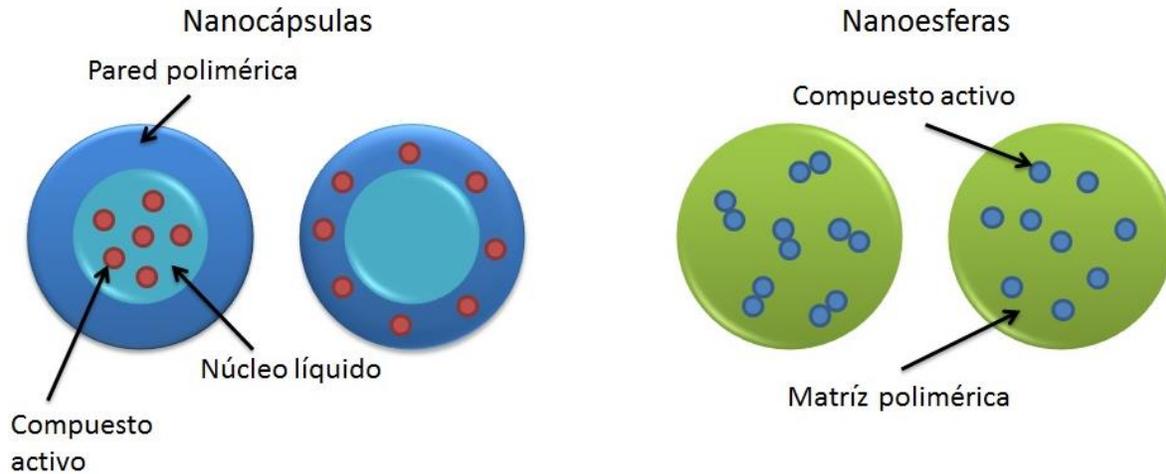


Figura 2. Representación esquemática de nanopartículas poliméricas.

Aunque los liposomas han sido empleados como acarreadores potenciales con ventajas únicas incluyendo la protección de los fármacos contra la degradación, dirigir al sitio de acción, reducción de la toxicidad y efectos secundarios, sus aplicaciones son limitadas debido a problemas inherentes como son: baja eficiencia de encapsulación, rápida difusión del fármaco y pobre estabilidad durante su almacenamiento. Por otra parte, las nanopartículas poliméricas ofrecen algunas ventajas específicas sobre los liposomas.

### II.3. Ventajas del uso de los sistemas nanoparticulados

Las nanopartículas formuladas a partir de polímeros tanto sintéticos como naturales han sido usadas como sistemas acarreadores por las siguientes razones (Reis et al., 2006; Singh y Lillard Jr.; 2009).

1. Mejoran la biodisponibilidad de aquellos compuestos bioactivos que presentan características pobres de absorción.
2. Prolongan el tiempo de residencia de los bioactivos en el intestino.
3. Controlan la liberación de los compuestos con actividad biológica.

4. Dirigen la liberación del bioactivo a un órgano en específico y reducen su toxicidad.
5. Reducen la irritación de la mucosa intestinal producida por el compuesto bioactivo.
6. Aseguran la estabilidad del bioactivo en el tracto gastrointestinal (TGI).

## **II.4. Características importantes de las nanopartículas**

### **II.4.1 Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño son las características más importantes en un sistema nanoparticulado. Estos determinan la distribución *in vivo*, la estabilidad de las nanopartículas, la carga, toxicidad y liberación del activo, así como su blanco de acción (Mohanraj y Chen, 2006; Singh y Lillard Jr. 2009). Un tamaño de partícula menor tiene mayor área superficial, por lo tanto, la mayoría de los activos asociados estarán más cerca de la superficie de la partícula, lo que lleva a la liberación más rápida del activo. Mientras que, partículas de mayor tamaño tienen núcleos más grandes, permiten la encapsulación de más activo y una difusión paulatina. Menores tamaños de partícula tienen mayor riesgo de agregación de las partículas durante el almacenamiento y el transporte de la dispersión (Redhead et al., 2001).

El reto más grande durante el diseño de un sistema nanoparticulado es formular las nanopartículas con el tamaño de partícula más pequeño y una mayor estabilidad. La degradación del polímero también puede verse afectada por el tamaño de partícula. Actualmente, el método más rápido y de rutina para determinar el tamaño de partícula es mediante espectroscopia de correlación de fotones o por dispersión dinámica de luz (dynamic light scattering).

## **II.4.2. Propiedades de superficie**

Además del tamaño de las nanopartículas, la hidrofobicidad de la superficie de las nanopartículas determina la circulación *in vivo* de las nanopartículas y la probabilidad de que estas lleguen al órgano blanco. Esto se puede lograr mediante el recubrimiento de las nanopartículas con polímeros/surfactantes hidrofílicos o la formulación de nanopartículas con copolímeros biodegradables. El potencial zeta de la nanopartícula se utiliza generalmente para caracterizar la carga superficial de las nanopartículas. Este refleja el potencial eléctrico de las partículas, el cual está influenciado por la composición de la partícula y el medio en el que se dispersa. Las nanopartículas con un potencial zeta por arriba de +/- 30 mV han demostrado ser estables en suspensión, ya que la carga superficial evita la agregación de las partículas. El potencial zeta también puede ser empleado para determinar si un compuesto activo se encapsula dentro de la nanopartícula o es absorbido en la superficie hidrofílica (Mohanraj y Chen, 2006; Singh y Lillard Jr. 2009).

## **II.4.3. Carga del activo**

Para que un sistema nanoparticulado sea considerado exitoso debe poseer una alta capacidad de carga del compuesto activo que se desea encapsular. La carga de activos se puede hacer por dos métodos: a) Incorporación al momento de producción de las nanopartículas, b) Absorción del activo después de la formación de las nanopartículas, mediante la incubación del acarreador con una solución concentrada del activo. La carga del activo y la eficiencia de atrapamiento depende en gran medida de las características químicas tanto del componente bioactivo como del material matricial o polímero (Constantino et al., 2009; Mohanraj y Chen, 2006; Singh y Lillard Jr. 2009).

#### **II.4.4. Liberación del activo**

Durante la formulación de un sistema nanoparticulado es importante considerar tanto la liberación del activo como la biodegradación del polímero. En general, la tasa de liberación del activo depende de: a) la solubilidad del activo, b) la desorción del activo a la superficie de la nanopartícula; c) la difusión del activo a través de la matriz polimérica; d) la erosión/degradación de la matriz de la nanopartícula, y e) la combinación de procesos de erosión/difusión. Por lo tanto la liberación del componente activo se rige por la solubilidad, la difusión y la biodegradación de los materiales de la matriz. Una liberación inicial rápida se atribuye principalmente a la unión débil o la adsorción de los activos a la gran área superficial de las nanopartículas (Mohanraj y Chen, 2006; Singh y Lillard Jr. 2009). Es evidente que el método de incorporación del activo tiene un efecto sobre el perfil de liberación. Estas pueden ser sintetizadas mediante la polimerización de monómeros (emulsión o dispersión) o por la dispersión de polímeros (nanoprecipitación o evaporación de solvente) (Johnston et al., 2011).

#### **II.5. Técnicas de preparación de las nanopartículas**

Hasta el momento se han desarrollado un sinnúmero de técnicas de encapsulación y gracias a ello las funcionalidades al aplicar estas técnicas son muy amplias. Existen sustancias empleadas comúnmente para promover la rápida liberación de los activos contenidos en las nanopartículas mediante cambios de pH (cobertura entérica), estrés mecánico, temperatura, actividad enzimática, tiempo y fuerza osmótica (Gouin, 2004). Sin embargo es necesario considerar algunos criterios clave para saber si la técnica de microencapsulación es adecuada (Fernández et al., 2002; Aldana et al., 2004):

1. Las especificaciones del producto se deben alcanzar a un bajo costo.
2. Reproducibilidad de la técnica.
3. Disponibilidad de instalaciones y servicios.
4. Alto rendimiento.
5. La estabilidad y actividad biológica de algunos ingredientes bioactivos.
6. La eficiencia de encapsulado.
7. Los perfiles de liberación del activo dentro de los límites especificados.
8. La ausencia de agregación o adhesión de las partículas.
9. Los niveles residuales del disolvente orgánico, dentro de los límites reglamentarios.

La cuestión de los costos no puede ser demasiado estricta para la industria farmacéutica, pero es definitivamente un factor importante para la industria alimentaria debido a su bajo margen de beneficios. Sin embargo, en algunos casos, el alto costo podría ser justificado por el valor añadido de los productos (Fernández et al., 2002; Villena et al., 2009). Diversos métodos han sido propuestos para la producción de sistemas nanoparticulados. En general, estos métodos pueden ser divididos en tres grupos: 1) Dispersión de polímeros preformados; 2) Polimerización de monómeros; y 3) Gelación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos.

### **II.5.1. Dispersión de polímeros preformados**

La dispersión de polímeros preformados es una técnica comúnmente empleada para preparar nanopartículas biodegradables a partir de ácido poliláctico (PLA, por sus siglas en inglés); poli (D, L-glicólico) (PLG, por sus siglas en inglés); poli (D, L-láctido-co-glicolido) (PLGA, por sus siglas en inglés) y poli (cianoacrilato) (PCA) (Mohanraj y Chen, 2006). Esta técnica puede ser empleada de diferentes maneras:

#### **a) Evaporación de solvente.**

En este método, el polímero se disuelve en un solvente orgánico como diclorometano, cloroformo, o etilacetato; el compuesto activo puede ser disuelto empleando el mismo disolvente. La solución resultante es emulsificada en una solución acuosa que contenga el agente emulsificante o surfactante para dar como resultado una emulsión estable de aceite en agua (o/w, por sus siglas en inglés). Posteriormente el solvente orgánico es evaporado ya sea mediante agitación continua o reduciendo la presión del sistema. Los tamaños de partícula del sistema se ven influenciados por el tipo y las concentraciones del estabilizador, la velocidad de homogeneización y la concentración del polímero. Con el fin de producir partículas de menor tamaño, a menudo se emplean homogenizaciones a altas velocidades o ultrasonificación (Mohanraj y Chen, 2006).

#### **b) Emulsificación espontánea o difusión de solvente.**

En este método el solvente miscible en agua junto con una pequeña cantidad del solvente orgánico miscible en agua es empleado como fase oleosa. Debido a la difusión espontánea de los solventes se crea una turbulencia interfacial entre las dos fases dando como resultado la formación de pequeñas partículas. A medida que la concentración del solvente miscible en agua aumenta, el tamaño de partícula disminuye (Mohanraj y Chen, 2006).

### **II.5.2. Polimerización de monómeros**

En este método, para formar las nanopartículas los monómeros son polimerizados en solución acuosa. El compuesto activo puede ser incorporado mediante a) su disolución en el medio de polimerización o b) por absorción en las nanopartículas después de que la polimerización es completada. Una vez formadas las nanopartículas, la suspensión es sometida a ultracentrifugación para remover los estabilizantes y surfactantes empleados durante la polimerización. Posteriormente las nanopartículas se resuspenden en un medio isotónico libre de

surfactantes, para obtener la solución purificada. La formación y el tamaño de las nanopartículas dependen de la concentración del surfactante y el estabilizante empleado (Mohanraj y Chen, 2006).

### **II.5.3. Coacervación o gelación iónica**

Este método involucra una mezcla de dos fases acuosas. Los coacervados se forman como resultado de interacciones electrostáticas entre dos fases acuosas, mientras que la gelación iónica involucra la transición del material de líquido a gel debido a las condiciones de interacción iónica a temperatura ambiente (Mohanraj y Chen, 2006).

Las nanopartículas pueden ser preparadas a partir de una gran variedad de materiales como son: proteínas, polisacáridos y polímeros sintéticos. La selección del material matricial depende de muchos factores incluyendo: a) tamaños de partícula requeridos, b) propiedades inherentes del compuesto bioactivo, c) características superficiales, d) grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad y e) perfil de liberación deseado.

### **II.6. Materiales de pared**

El paso inicial en la encapsulación de un ingrediente alimenticio es la selección del material de pared apropiado. Una gran cantidad de sustancias pueden ser utilizadas para recubrir o encapsular sólidos, líquidos o gases de diferentes tipos y propiedades. Sin embargo, las normas para los aditivos alimentarios son más rígidas que para productos farmacéuticos (Kreuter, 1994). Diferentes compuestos, ampliamente aceptados para la encapsulación de fármacos, no han sido aprobados para su uso en la industria alimentaria, ya que muchas de estas sustancias no han sido certificadas para sus aplicaciones en alimentos como materiales "generalmente reconocidos como seguros" (GRAS). En realidad, todo el procesamiento de alimentos debe ser diseñado con el fin de

cumplir con los requisitos de seguridad de las agencias gubernamentales como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en los EE.UU. (Aldana et al., 2004; Nedovic et al., 2011).

Aunque el método de encapsulación puede afectar el mecanismo de liberación del componente bioactivo, la formulación del recubrimiento por sí mismo es el factor determinante de las propiedades funcionales del sistema y debe reunir ciertos requisitos que dependen de las características químicas del material encapsulado, la aplicación, las condiciones de almacenamiento y el proceso al cual será expuesto. Las sustancias de revestimiento son básicamente aquellas capaces de formar películas y se pueden seleccionar de entre una amplia variedad de polímeros naturales o sintéticos, dependiendo del material a encapsular y las características finales deseadas en las nanopartículas. Un material de revestimiento ideal debería poseer las siguientes propiedades (Shahidi y Han, 1993; Aldana et al., 2004):

1. Buenas propiedades reológicas a altas concentraciones (baja viscosidad) y la facilidad de manipulación durante el proceso de encapsulación (baja higroscopicidad).
2. Capacidad para dispersar o emulsionar el material activo y estabilizar la emulsión producida.
3. Ser inerte con el material a encapsular durante el procesamiento y el almacenamiento prolongado.
4. Capacidad para sellar y mantener el material activo dentro de su estructura durante el procesamiento o el almacenamiento.
5. La completa liberación de disolventes u otros materiales empleados durante el proceso de encapsulación, en virtud de secado, o de otro tipo condiciones de eliminación del solvente.

6. Capacidad de proporcionar la máxima protección a la materia activa contra las condiciones ambientales (por ejemplo, calor, luz, humedad, pH y otros ingredientes reactivos).
7. Solubilidad en disolventes aceptables en la industria alimentaria (por ejemplo, agua, etanol, etc.) o en el producto alimenticio final.
8. Capacidad para cumplir con las propiedades de solubilidad especificadas o deseadas de las nanopartículas y las propiedades de liberación del activo.
9. Poseer bajo costo.

Dado que en la mayoría de las ocasiones el material de revestimiento no satisface todas las características enumeradas, en la práctica se utilizan en combinación con otros materiales de revestimiento y/o modificadores, tales como secuestradores de oxígeno, antioxidantes, agentes quelantes y tensoactivos. Algunos tipos de materiales de revestimiento se presentan en el **Cuadro 1** (Shahidi y Han, 1993).

Los materiales de pared utilizados para el diseño de sistemas nanoparticulados deben ser de grado alimentario, biodegradables y capaces de formar una barrera entre la fase interna y sus alrededores. La mayoría de los materiales utilizados para la encapsulación en el sector alimentario son biomoléculas (Nedovic et al., 2011). Dado que la mayoría de estos materiales son de naturaleza hidrófila, los sistemas de liberación están diseñados basándose en las interacciones proteína-polisacárido, molécula bioactiva-biopolímero, autoensamblaje, diferencias de solubilidad dependientes del pH, entrecruzamiento y modificaciones hidrófobas (Neiryck, Van Lent, Dewettinck, y Van der Meeren, 2007; Benichou, Aserin, y Garti, 2004a, 2004b; Sahu et al., 2008; Van Soest, 2006; Shutava et al., 2009). En el caso de los biopolímeros hidrófobos (por ejemplo, zeína), una simple precipitación anti-disolvente puede ser utilizada eficientemente para producir partículas coloidales mono-dispersas (Patel et al., 2010b).

Cuadro 1. Materiales de pared para la encapsulación de ingredientes alimentarios.

Clases de material	Tipos específicos de recubrimiento
Gomas	Goma arábica, goma tragacanto, goma acacia, goma karaya, goma de mezquite, agar, alginato de sodio, carragenina
Carbohidratos	Almidón y sus derivados, maltodextrinas, sacarosa, jarabe de maíz, ciclodextrinas
Celulosas	Carboximetil celulosa, metil celulosa, etil celulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa, acetato de celulosa-ftalato, celulosa acetato-butirato-ftalato
Lípidos	Cera, parafina, triestarina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, cera de abeja, cera de carnauba, cera candelina, aceites, grasas, glicéridos y fosfolípidos
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, Silicato
Proteínas	Gluteína, caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina, péptidos

(Shahidi y Han, 1993; Aldana et al., 2004)

Las nanopartículas comprenden como material acarreador materiales tales como lípidos, polímeros y compuestos puros. La liberación de los ingredientes funcionales a partir de este tipo de sistemas se produce a través de uno de los siguientes procesos: i) disolución, ii) desorción del ingrediente funcional de la superficie, iii) difusión a través de la matriz; iv) erosión de la matriz

incluyendo la degradación enzimática, y v) una combinación de todos estos procesos (Soppimath et al., 2001).

Los sistemas particulados se están volviendo cada vez más importantes para la encapsulación, la protección y la liberación de ingredientes funcionales, tales como fármacos, nutracéuticos, sabores y antimicrobianos, solo por mencionar algunos. Las partículas empleadas en estos sistemas pueden ser construidas a partir de una variedad de materiales incluyendo surfactantes, lípidos, polímeros sintéticos, proteínas y polisacáridos. Sin embargo hay un creciente interés en la utilización de biopolímeros naturales, tales como proteínas y polisacáridos, para la fabricación de sistemas de liberación para ser empleados en productos comestibles, debido a preocupaciones de los consumidores sobre el uso de materiales sintéticos. Partículas biopoliméricas han sido anteriormente propuestas para encapsular, proteger y liberar compuestos como, minerales, péptidos, proteínas, enzimas, productos farmacéuticos, lípidos y fibra dietaria (Jones et al., 2010a).

## **II.7. Maíz**

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos utilizados por el hombre, perteneciente a la familia de las Poáceas (Gramíneas). El maíz es una gramínea originaria de México, introducida a Europa en el siglo XVI. Este grano es conocido con varios nombres comunes; el más usado dentro de los países anglófonos es *maize*, excepto en los Estados Unidos de América y Canadá, donde se le denomina *corn*. El maíz en español es llamado *maíz*, en francés *maïs*, en portugués *milho* y en el subcontinente hindú es conocido como *makka* o *makki*.

Se caracteriza por poseer tallos en forma de caña, aunque macizos en su interior a diferencia del resto de miembros de su familia. El maíz es una planta que tiene múltiples usos y que puede ser utilizada en varias etapas de su desarrollo

desde las mazorcas muy jóvenes -maíz *baby*-, hasta las mazorcas verdes tiernas y los granos ya maduros (FAO, 2001).

Según la USDA, hoy día el maíz es el primer cultivo a nivel mundial en cuanto a oferta-demanda (USDA, 2011), es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. Se estima que en el 2011 la producción mundial de maíz ascendió a los 829 millones de toneladas, de las cuales México produce alrededor del 3% (SAGARPA, 2011).

El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. El cultivo del maíz se originó y evolucionó en la zona tropical del globo terráqueo como una planta de excelentes rendimientos, hoy día se cultiva hasta los 58° de latitud norte en Canadá y en Rusia y hasta los 40° de latitud sur en Argentina y Chile (FAO, 2001).

El maíz es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las espigas jóvenes del maíz (maíz *baby*) cosechado antes de la floración de la planta es usado como hortaliza. Las mazorcas tiernas de maíz dulce son un manjar refinado que se consume de muchas formas. Las mazorcas verdes de maíz común también son usadas en gran escala, asadas o hervidas, o consumidas en el estado de pasta blanda en numerosos países. La planta de maíz, que está aún verde cuando se cosechan las mazorcas *baby* o las mazorcas verdes, proporciona un buen forraje.

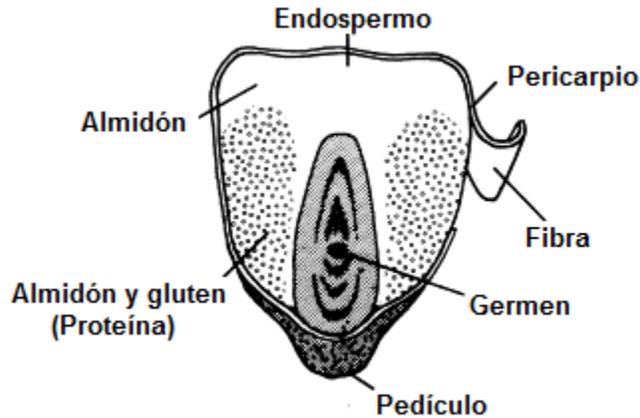


Figura 3. Corte transversal del grano de maíz, muestra la localización de los componentes mayoritarios presentes en el grano.

Como se muestra en el **Cuadro 2**, las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente de su composición química (**Figura 3**). El endospermo se caracteriza por un elevado contenido de almidón (87 por ciento), aproximadamente un 8 por ciento de proteínas y un contenido de aceite relativamente bajo. El pericarpio, en cambio, contiene un nivel elevado de otros componentes entre los que se encuentran fibra, nitrógeno no proteico, pentosanos, ácido fólico, azúcares solubles y xantofilas. Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas aproximadamente el 33 por ciento, además de que contiene un nivel relativamente elevado de proteínas (próximo al 20 por ciento) y minerales.

Cuadro 2. Distribución de los componentes mayoritarios del grano de maíz.

Componente	Grano entero (%)	Porcentaje en Peso seco (%)			
		Endospermo	Germen	Pericarpio	Pedículo
Almidón	62.0	87.0	8.3	7.3	5.3
Proteína	7.8	8.0	18.4	3.7	9.1
Aceite	3.8	0.8	33.2	1.0	3.8
Cenizas	1.2	0.3	10.5	0.8	1.6
Otros	10.2	3.9	29.6	87.2	80.2
Agua	15.0	0	-	-	-

(Shukla y Cheryan, 2001)

### II.7.1. Proteínas del maíz

Después del almidón, las proteínas representan el segundo componente químico por orden de importancia del grano de maíz. El contenido de proteínas de las variedades comunes de maíz puede oscilar entre el 8 y el 12 por ciento del peso seco del grano. Alrededor del 75% de las proteínas presentes en el grano de maíz se encuentran en el endospermo. Mientras que el resto de las proteínas, se encuentran distribuidas entre el germen y el salvado. Las proteínas de los granos del maíz han sido estudiadas ampliamente; según Shukla y Cheryan (2001), están formadas por cuatro fracciones distintas definidas principalmente por su solubilidad en disolventes seleccionados (**Cuadro 3**). Conforme a su descripción, las albúminas y las globulinas representan aproximadamente el 12% del total de nitrógeno presentes principalmente en el germen, con proporciones del 7%, y 5%, respectivamente (Pérez-Xochipa, 2009; Shukla y Cheryan, 2001).

Cuadro 3. Distribución de las fracciones proteicas en el maíz (% base seca).

Proteína	Solubilidad	Grano entero	Endospermo	Germen
Albuminas	Agua	8	4	30
Globulinas	Sal	9	4	30
Glutelinas	Álcali	40	39	25
Zeína	Alcohol	39	47	5

(Shukla y Cheryan, 2001)

La zeína pertenece a la clase de proteínas conocidas como prolaminas, las cuales se encuentran específicamente en cereales (el equivalente a la hordeína de la cebada, la gliadina del trigo y la avenina de la avena) (Gorinstein et al., 2001; Drzewiecki et al., 2003; Wang et al., 2013). Mientras que las glutelinas se encuentran distribuidas entre el endospermo y el germen, la mayoría de la zeína se encuentra en el endospermo. La zeína ha sido de interés científico desde su aislamiento en 1981, su característica insoluble en agua limita su uso en alimentos; por lo que el principal objetivo desde mediados del siglo veinte ha sido su posible utilización como polímero de uso industrial (Shukla y Cheryan, 2001).

En la actualidad hay una creciente demanda de nuevos productos alimenticios de alta calidad nutritiva. Por lo que los aislados de proteínas representan un ingrediente interesante para las formulaciones de este tipo de alimentos los cuales deben aportar no sólo buenas propiedades nutricionales, sino también adecuadas propiedades funcionales (Ventureira et al., 2010).

## II.8. Zeína

La zeína es la proteína de reserva mayoritaria del grano de maíz y comprende del 40 – 50 % de la proteína total. Esta se encuentra localizada en “cuerpos” de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  distribuidos uniformemente por el citoplasma de las células del endospermo del grano. Se identificó por primera vez en 1897 en base a su solubilidad en soluciones etanólicas (60 - 95%) (Fu et al., 2009; Shukla y Cheryan, 2001; Wang et al., 2005). El comportamiento de su solubilidad está determinado por su alta proporción de residuos de aminoácidos no polares, como son leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%) y su deficiencia en aminoácidos básicos o ácidos (**Cuadro 4**) (Liu et al., 2005; Folter et al., 2012).

La zeína es en realidad una mezcla de péptidos de diferentes pesos moleculares, solubilidad y carga. Las dos fracciones mayoritarias presentes en la zeína son la  $\alpha$  y la  $\beta$ . La  $\beta$ -zeína representa  $\approx 20\%$  del total de la zeína presente en el grano de maíz, ésta a diferencia de la  $\alpha$ -zeína no se encuentra en preparaciones industriales debido a su baja estabilidad. La  $\alpha$ -zeína se definió como la prolamina del maíz, esta es soluble en etanol al 95% y representa  $\approx 80\%$  del total de la prolamina presente en el maíz (Shukla y Cheryan, 2001; Zhong e Ikeda, 2012).

El primer paso para la manufactura de la zeína es la extracción de la proteína usando los solventes adecuados. Tomando en consideración la proporción de aminoácidos no polares en la zeína (**Cuadro 4**), es posible predecir que el tipo de solventes empleados para la solubilización y la extracción de la proteína deben contener grupos tanto polares como no polares (Shukla y Cheryan, 2001). Las soluciones acuosas de etanol han sido empleadas ampliamente para la producción comercial de zeína, mostrando una buena solubilidad de la proteína en soluciones del 50 - 90% de etanol (Zhong y Jin, 2009).

Cuadro 4. Composición de aminoácidos de la zeína.

Clasificación	Aminoácido	Zeína nativa	Zeína comercial
		Mossé (1961)	Pomes (1971)
No polar	Glicina	0.0	0.7
	Alanina	10.52	8.3
	Valina	3.98	3.1
	Leucina	21.1	19.3
	Isoleucina	5.0	6.2
	Fenilalanina	7.3	6.8
	Triptófano	0.16	NR*
	Prolina	10.53	9.0
	Serina	7.05	5.7
-OH	Treonina	3.45	2.7
	Tirosina	5.25	5.1
-S	Metionina	2.41	2.0
	Cisteína	0.83	0.8
Básico	Lisina	0.0	NR
	Arginina	4.71	1.8
	Histidina	1.32	1.1
	Asparagina	NR	4.5
	Glutamina	NR	21.4
Ácido	Acido aspártico	4.61	NR
	Acido glutámico	26.9	1.5

\*No reportado

(g aminoácido/ 100 g zeína) Shukla y Cheryan, 2001

El comportamiento de la solubilidad de la zeína se presenta en el diagrama de tres fases (**Figura 4**). A temperatura constante, la solubilidad de la zeína varía entre 2 y 6% (w/w), dependiendo de la concentración de etanol. A bajas (<40%) y altas (>90%) concentraciones de etanol, se presentan dos fases,

las cuales contienen zeína, agua y etanol. La formación de precipitado a bajas concentraciones de etanol puede ser evitado a bajas temperaturas, por la remoción de pigmentos y otros compuestos solubles en éter, y la reducción de puentes disulfuro (Shukla y Cheryan, 2001).

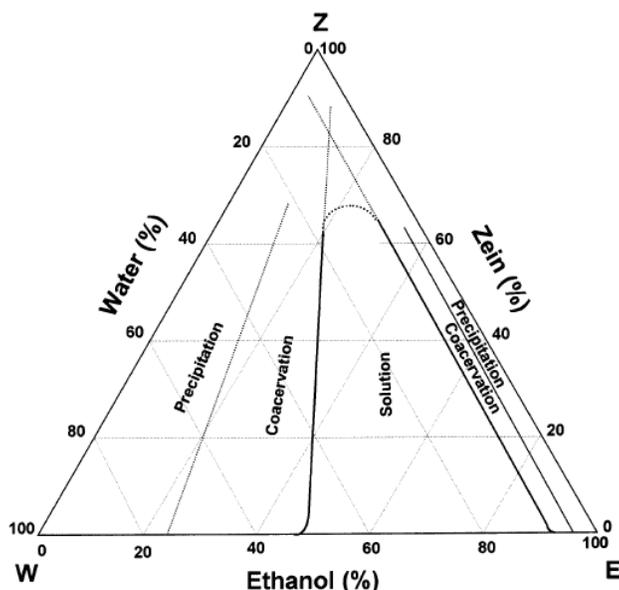


Figura 4. Diagrama de tres fases para la solubilidad de la zeína en etanol y agua.  
(Shulka y Cheryan, 2001)

El uso de la zeína en muchas de sus aplicaciones potenciales se ha visto obstaculizado por su coloración amarilla (Parris et al., 2005). Esto es debido a pigmentos presentes en el maíz como son xantofilas, carotenoides y otros compuestos, asociados con las proteínas hidrófobas, como la zeína. Estos pigmentos tienden a transferir su color a las superficies que recubren, lo que es indeseable en muchas aplicaciones, por lo que se han buscado alternativas para producir zeína libre de color. Empleando el uso de solventes como: tolueno, éter de petróleo, benzol, etanol o propanol (Carter y Reck, 1970; Donard y Labbe', 1903; Pearce, 1941). Sin embargo estos solventes no penetran la matriz de la zeína lo suficiente como para remover todas la impurezas. Además de que se

emplean volúmenes muy grandes de solventes, estos no son grado alimentario lo que limita el uso de la proteína blanqueada para aplicaciones tanto farmacéuticas como alimentarias (Shukla y Cheryan, 2001). Una posible alternativa es el uso de membranas (ej. microfiltración, ultrafiltración) para simultáneamente purificar la zeína, concentrar la solución y reusar el solvente de extracción (Kampen, 1995; Cheryan, 1999). Por lo que Cheryan (1998) propone el uso de membranas como un proceso de baja energía y bajo costo de operación para la obtención de zeína comercial.

Debido a su alta hidrofobicidad, la zeína puede formar recubrimientos duros, brillantes, hidrófobos, impermeables, flexibles y compresibles (**Cuadro 5**). La zeína ha sido aplicada exitosamente como material acarreador para la formación de películas (Arcan y Yemenicioğlu, 2011; Cho et al., 2002; Fu et al., 2009; Mastromatteo et al., 2009; O'Donnell et al., 1999; Singh et al., 2010; Wang et al., 2005), recubrimientos (Muthuselvi y Dhathathreyan, 2006), microesferas y microcapsulas (Fu et al., 2009; Hurtado-López y Murdan, 2006; Liu et al., 2005; Luo et al., 2011; Patel et al., 2010a; Patel et al., 2012; Parris et al., 2005; Quispe-Condori et al., 2011; Xiao y Zhong, 2011; Zhong y Jin, 2009; Zhong et al., 2009; Zou et al., 2012) para el atrapamiento y la liberación controlada de fármacos, aceites esenciales o micronutrientes en el área farmacéutica y alimentaria.

En el 2005, Parris et al., propusieron la encapsulación de aceites esenciales en nanoesferas a base de zeína como un vehículo de encapsulación con liberación sitio-específica para maximizar las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales. Estas nanoesferas presentaron la característica de tener una posible aplicación oral o inyectable de materiales biológicos, debido a que presentan una rápida liberación en el intestino grueso. Zhong et al., en el 2009 propusieron la encapsulación de aceite de pescado en partículas a base de zeína mediante el método de dispersión líquido-líquido propuesto inicialmente por O'Donnell et al. (2007) el cual se basa en la manipulación de la zeína en base a su solubilidad en soluciones etanólicas. Se evaluaron la estabilidad del aceite

encapsulado y la factibilidad de la formación de las nanopartículas. Concluyendo que el método de dispersión líquido-líquido es un método rápido y sencillo, fácilmente escalable, pudiendo ser aplicado para la encapsulación de una gran variedad de compuestos lipofílicos.

Cuadro 5. Propiedades de la zeína.

Propiedad	Características
Color	Crema
Constante dieléctrica, a 500 V, 60 ciclos, 25-90 °C	4.9 – 5.0
Coeficiente de difusión	$3.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$
Coeficiente de viscosidad	25
Temperatura de transición vítrea	165 °C
Punto isoeléctrico, pH	6.2 (varía entre 5 y 9)
Peso molecular	35 000 (varía entre 9.6 y 44 K)
Forma física	Polvo amorfo
Coeficiente de sedimentación	1.5 s
Gravedad específica, a 25 °C	1.25
Punto de degradación térmica	320 °C

Adaptado de Shukla y Cheryan (2001)

## II.9. Beta-lactoglobulina ( $\beta$ -lg)

Las proteínas mayoritarias del suero de leche de vaca son la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y la  $\alpha$ -lactoglobulina ( $\alpha$ -lg) (Lozano et al., 2008; Shokker et al., 2000). La  $\alpha$ -lg representa el 20% de la proteína total del suero de leche, mientras que la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) es la proteína prevalente. Esta última representa aproximadamente el 10% del total de la proteína de la leche y el 60% de las proteínas presentes en el suero de leche. Contiene generalmente 162 residuos de

aminoácidos, un peso molecular de 18.4 kDa, un punto isoeléctrico (pI) de  $\approx 5.2$  y una estructura globular con un radio de 2 nm (**Cuadro 6**) (Jones et al., 2010b; Liang y Subirade, 2010; Lozano et al., 2008; Nicolai et al., 2011).

Cuadro 6. Propiedades de la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg).

Propiedad	Característica
Peso molecular	18.4 kDa
Punto isoeléctrico, pH	5.2
Temperatura de desnaturalización, a pH neutro	70 °C

Adaptado de Nicolai et al., 2001

Las proteínas globulares tienen una estructura bien definida y rígida que determina su función en los organismos vivos. De acuerdo a la literatura, en soluciones acuosas entre pH 5.2 y 7.5 la estructura dimérica de la proteína es dominante, mientras por debajo de pH 3.0 y por arriba de pH 8.0, la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) existe como monómero, estabilizado por repulsión electrostática. A temperatura ambiente, las moléculas nativas de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) pueden existir en diferentes formas cuaternarias (por ejemplo, monómeros, dímeros, octámeros) dependiendo del pH de la solución y composición iónica. Cuando la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se calienta cualquier oligómero tiende a disociarse en monómeros (Jones et al., 2009). La carga neta de las proteínas globulares depende del pH y el punto isoeléctrico de la proteína. Sin embargo, a menudo las proteínas contienen tanto cargas negativas como positivas. La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) contiene dos puentes disulfuro y un grupo tiol libre (Shokker et al., 2000). Cerca del punto isoeléctrico las proteínas contienen cargas tanto negativas como positivas y las interacciones entre cargas de diferente signo pueden estar involucradas en la agregación de las proteínas además de interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno (Nicolai et al., 2011).

La funcionalidad de las proteínas está asociada a su estructura nativa, la cual depende del pH, temperatura, presión y efecto del solvente (Jones et al., 2009). Se han descritos varios métodos para el aislamiento de la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) a partir del suero del leche, pero la mayoría de ellos son caros y no dan altos rendimientos. Entre los métodos utilizados frecuentemente para separar la proteína del suero de leche son la precipitación a pH bajo, la hidrólisis péptica seguida por una filtración en membrana selectiva, cromatografía en gel, la precipitación con sales y solubilidad selectiva. Sin embargo, algunos de estos métodos inducen la desnaturalización o presentan bajos rendimientos con otras proteínas y sales como contaminantes, haciéndolas inservibles en algunos casos y costosos en otros. Lozano et al. (2008), propuso un método para aislar la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) de otras proteínas del suero de leche basado en un precipitación selectiva presentando como ventajas en cuanto a los otros métodos como la conservación de la estructura nativa de la proteína además de tener altos rendimientos y presentar ventajas económicas sobre otros métodos .

La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) presenta propiedades funcionales y nutricionales que han sido empleadas en aplicaciones industriales como son, aditivo alimentario, estabilizante en emulsiones y agente texturizante (Guzey et al., 2004; Shokker et al., 2000). Su acción es más efectiva cuando se emplean las proteínas aisladas y purificadas en lugar de concentrados proteicos. En el 2004, Guzey et al. proponen el uso de la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) como emulsificante en una emulsión primaria debido a su rápida absorción en la superficie de los glóbulos de grasa durante la homogenización de la emulsión dando como resultado un tamaño de partícula menor, para posteriormente ser emulsificadas por un pectina para finalmente contar con una membrana a base de un emulsificante y un biopolímero. Esta tecnología puede ser empleada para producir emulsiones que contengan dentro o entre las fases ingredientes funcionales encapsulados.

Jones et al. (2009) proponen la preparación y caracterización de partículas biopoliméricas mediante la complejación de la proteína y un polisacárido mediante la desnaturalización de la proteína a temperaturas por arriba de la temperatura de desnaturalización de la proteína. Reportando que estas partículas son estables a la agregación a pH 3 - 7, la cual disminuye conforme la concentración de pectina aumenta. Siendo útiles para la encapsulación y liberación de componentes alimentarios bioactivos.

## II.10. Pectina

La pectina, deriva del griego πηχτος 'pektikos' que significa congelar o solidificar, es una mezcla compleja de polisacáridos estructurales que constituye alrededor de una tercera parte o más de la pared celular de algunas plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas (Willats et al., 2006). La mayoría de la pectina se encuentra en la lamela intermedia de la pared celular de las plantas, con un decremento gradual una vez que se atraviesa la pared primaria hacia la membrana plasmática (Bengoechea et al., 2011; Liu et al., 2005; Sriamornsak, 2009). La pectina contribuye a la firmeza y estructura de la planta y sus cambios estructurales pueden causar cambios físicos en el fruto. Se ha reportado la presencia de grandes cantidades en tejidos blandos de plantas bajo condiciones de rápido crecimiento y altos contenidos de humedad (Thakur et al., 1997).

Químicamente, la pectina como muchos otros polisacáridos de las plantas es esencialmente lineal. Los polímeros de ácido galacturónico forman el componente principal de la pectina los cuales se encuentran unidos mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$ - 1→4. Algunos de los grupos carboxilo de las moléculas de ácido galacturónico en las cadenas de pectina son metilo esterificados, unidades de ramnosa unidas por enlaces  $\alpha$  1→2 (**Figura 5**) (Liu et al., 2005). Diferentes pectinas pueden tener diferentes grupos laterales como: arabinosa, glucosa, manosa, xilosa, galactosa, arabinogalactosa. Generalmente la pectina contiene

de unos cuantas unidades de sacarosa hasta 1000; esto corresponde a pesos moleculares intermedios de 50,000 a 150,000 Da. Sin embargo la estructura de la pectina es muy difícil de determinar debido a que esta puede cambiar durante su aislamiento, almacenamiento y procesamiento del material (Mesbahi et al., 2005; Sriamornsak, 2009).

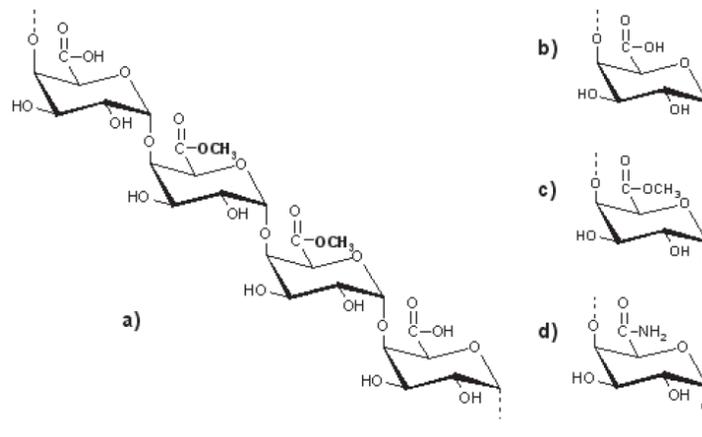


Figura 5. Estructura química de la pectina. a) segmentos repetidos de la molécula de la pectina y grupos funcionales: b) carboxilo, c) éster, d) amida en la cadena de pectina.

A pesar de que la pectina se encuentra en la mayoría de los tejidos de las plantas, el número de fuentes que pueden ser empleadas para su manufactura a nivel comercial es muy limitada (Mesbahi et al., 2005). Debido a que la capacidad de la pectina para formar geles depende del tamaño molecular y del DE, la pectina de diferentes fuentes no tiene la misma capacidad gelificante debido a la variación de estos parámetros. Por lo que una gran cantidad de pectina presente no es suficiente para que la fruta califique como fuente de pectina comercial. En la actualidad, la pectina comercial se extrae casi exclusivamente de la cáscara de cítricos (20 - 30% de pectina base seca) o pulpa de manzana (15 - 18% de pectina en base seca), ambas mediante el subproducto proveniente de jugo (o sidra) durante su manufactura. Las pectinas de cítricos son color crema claro o cafes;

mientras que la pectina de manzana son a menudo más oscuras (Surh et al., 2006; Sriamornsak; 2009).

Comercialmente, la pectina se extrae mediante el tratamiento de la materia prima con ácido mineral caliente diluido a  $\text{pH} \approx 2$ . El tiempo de extracción depende de la materia prima, el tipo de pectina deseada, y de un fabricante a otro. El extracto de pectina caliente se separa del residuo sólido tan eficientemente como sea posible. Esto se dificulta debido a que los sólidos se encuentran blandos y la fase líquida es viscosa. La viscosidad aumenta con la concentración de pectina y el peso molecular de la misma. El extracto de pectina puede ser clarificado por filtración con la ayuda de un coadyuvante de filtración. Una vez clarificado el extracto se concentra a bajo vacío. Mediante este proceso se obtiene pectina de alrededor del 70% de esterificación (o metilación). Para producir otros tipos de pectina, algunos de los grupos éster deben ser hidrolizados (Mesbahi et al., 2005; Sriamornsak, 2009).

Las pectinas son solubles en agua y se clasifican de acuerdo a su grado de esterificación (DE, por sus siglas en inglés) en dos grandes grupos: pectina de alto metoxilo (HMP, por sus siglas en inglés) y pectina de bajo metoxilo (LMP, por sus siglas en inglés). Los valores correspondientes de DE para pectinas comerciales son HMP 60 - 75% y LMP en un intervalo de 20 - 40% (Mesbahi et al., 2005; Sriamornsak, 2009). Debido a la ionización de grupos carboxilo libres a lo largo de la cadena base, las soluciones de pectina tienden a ser ácidas; una solución acuosa de pectina al 1% puede presentar  $\text{pH}$  alrededor de 2.7 - 3 (Bengoechea et al., 2011). La pectina presenta una carga negativa debido a la ionización de los grupos carboxílicos a lo largo de la cadena base la cual tiene un valor de  $\text{pK}_a$  alrededor de 3.5 (Surh et al., 2006). Las pectinas nativas son generalmente altamente metiladas (HMP), pero pectinas con bajo contenido de grupos éster pueden ser preparadas comercialmente. El grado de metilación afecta su capacidad para formar geles. Aquellas pectinas de alto metoxilo (HMP) pueden formar geles en soluciones con sólidos totales solubles mayores al 55% y

a valores de pH por debajo de 3.5. Mientras que las pectinas de bajo metoxilo (LMP) son capaces de formar geles independientemente del contenido de sólidos totales solubles. La pectina se somete a una extensa degradación cuando se expone a condiciones alcalinas, especialmente a altas temperaturas. Esto implica su degradación mediante desesterificación y la ruptura de enlaces glucosídicos (Bengoechea et al., 2011).

La pectina ha sido empleada por muchos años en la industria farmacéutica y alimentaria. En alimentos, la pectina es empleada como agente gelificante, espesante y texturizante. También presenta algunas propiedades únicas que permite su uso como matriz de atrapamiento y/o estabilizante coloidal de una variedad de fármacos, proteínas y células (Mesbahi et al., 2005). Surh et al. (2006), investigaron la influencia que podía presentar la pectina sobre emulsiones a base de caseína, mediante la formación de un sistema de emulsión multilaminar. Reportaron que el pH es el principal factor que influye en la estabilidad de la emulsión. Además de su uso como estabilizante en emulsiones, Bengoechea et al. (2011) propusieron la formación de biopartículas como sistemas de liberación mediante la complejación lactoferrina-pectina con el propósito de incorporar la lactoferrina en alimentos y de este modo promover sus propiedades funcionales, así como su posible aplicación en recubrimientos y emulsiones. Se observó que la estabilidad de estos complejos está determinada por la concentración del polímero, pH y temperatura de formación. Por lo que concluyeron que la complejación lactoferrina-pectina presenta estabilidad en el intervalo de pH de 7-3.5.

### **III. Hipótesis**

La adición de un estabilizante ya sea pectina de alto metoxilo (HMP) o  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) durante la síntesis de nanopartículas a base de zeína podría aumentar la estabilidad del sistema coloidal favoreciendo su utilización en una matriz alimentaria.

## **IV. Justificación**

Hasta el momento los sistemas nanoparticulados a base de zeína formulados son inestables a condiciones inherentes de los alimentos, como son el pH, la fuerza iónica y la temperatura de producción y almacenamiento. Por lo que el propósito de esta investigación es formar nanopartículas de grado alimentario; con una buena estabilidad, flexibilidad y propiedades controlables de liberación capaces de resistir el cambio de pH, mediante la utilización de polímeros de origen natural previamente empleados como estabilizantes en sistemas nanoparticulados.

## **V. Objetivo General**

Desarrollar y caracterizar nanopartículas formadas a base de zeína estabilizadas con pectina de alto metoxilo (HMP, por sus siglas en ingles) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) capaces de resistir el cambio de pH para ser empleadas como sistemas de liberación en una matriz alimentaria.

## **VI. Objetivos Específicos**

1. Proponer los parámetros de formación de nanopartículas de zeína.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las microestructuras basadas en zeína y estabilizadas con pectina de alto metoxilo (HMP) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg).
3. Determinar que estabilizante produce nanoestructuras estables para ser empleadas en una matriz alimentaria.

## VII. Metodología

### VII.1. Materiales

Alcohol etílico suministrado por Pharma-aaper. Ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ), Trizma base ( $C_4H_{11}NO_3$ ), Hidróxido de sodio (NaOH), Zeína suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.). Solución de ácido clorhídrico 12.1 N de ácido clorhídrico suministrado por Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $NaH_2PO_4$ ), Fosfato de sodio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ) suministrados por Sigma-Aldrich. Ácido acético glacial suministrado por Merck. Beta-lactoglobulina en polvo generosamente donada por Davisco Foods International (BioPURE Beta-lactoglobulin, Eden Prairie, MN). La composición reportada del polvo es de 97.4% de proteína total, 92.5%  $\beta$ -lactoglobulina y 2.4% Cenizas. Pectina de alto metoxilo (Pretested HM Rapid Set, DE (por sus siglas en inglés, grado de esterificación) 71%, <1% Cenizas) donada por TIC Gums (Belcamp, MD). Acetato de sodio anhidro ( $C_2H_3O_2Na$ ), Ácido cítrico anhidro ( $C_6H_8O_7$ ), Tris-HCl ( $C_4H_{11}NO_3HCl$ ) suministrados por Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). Todas las soluciones se realizaron con agua bidestilada.

### VII.2. Métodos

#### VII.2.1 Prueba de solubilidad

Se eligió el sistema binario etanol/agua para la prueba de solubilidad de la zeína debido a que estudios previos reconocen este sistema como GRAS (reconocido generalmente como seguro, por sus siglas en inglés) y es el más usado en aplicaciones alimentarias (Dickey et al., 2003; Fu y Weller, 1999; Guo et al., 2005; Kim et al., 2004; Lawton, 2002; Parris y Coffin, 1997; Zhong e Ikeda,

2012). Se evaluó la solubilidad de la zeína en soluciones con diferentes porcentajes de etanol (70, 80, 85 y 90%) y zeína (0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 y 13.3%) de acuerdo a los parámetros propuestos por Kim y Xu en el 2008, con algunas modificaciones. Las soluciones resultantes se sometieron a agitación continua a temperatura ambiente hasta la completa disolución de la zeína. Una vez disuelta la proteína en su totalidad las soluciones resultantes se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos, usando una centrifuga (Thermo Scientific, CL10 centrifuge). Para determinar el sistema binario al cual se disolvió la mayor cantidad de proteína, se evaluó de manera cualitativa la solubilidad de la proteína en las soluciones etanólicas, mediante la ausencia de partículas insolubles en la superficie del tubo.

## **VII.2.2. Formación de las nanopartículas**

La formación de las nanopartículas se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Parris et al. (2005), con algunas modificaciones. La cantidad de zeína a disolver en la solución etanólica se determinó en el apartado anterior, además se controló la velocidad agitación a 2150 rpm. En este apartado se evaluó el efecto que tiene el pH de la fase amortiguadora sobre la estabilidad (tamaño de partícula, potencial- $\zeta$  y microestructura) del sistema coloidal formado. Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para la síntesis de las nanopartículas fue necesario preparar dos fases: la fase polimérica o solución primaria y la fase amortiguadora. Se disolvieron 0.9 g de zeína en 15 mL del solvente binario etanol/agua (85:15 v/v) para obtener una solución primaria. La fase amortiguadora se preparó de acuerdo a lo señalado en el **Apéndice**, para cada valor de pH. La solución primaria se vertió en 40 mL de solución amortiguadora a diferentes pHs (3-9) en agitación continua (2150 rpm) empleando un agitador magnético. Una vez vertida toda la solución primaria, la solución resultante se mantuvo en agitación durante 1 minuto. Inmediatamente después de su elaboración se midió el pH de las dispersiones resultantes y se ajustó el pH

dependiendo del pH de la solución amortiguadora empleada para su formación. Las dispersiones finales se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización y prueba de estabilidad.

### **VII.2.3. Estabilización de las nanopartículas**

Para la estabilización de las nanopartículas se propusieron dos polímeros naturales: pectina de alto metoxilo (HMP) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg). La formación de las nanopartículas se llevó a cabo de igual manera que en el paso anterior, con algunas modificaciones. Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

#### **VII.2.3.1. Preparación de la solución primaria**

La solución primaria se preparó siguiendo los parámetros propuestos en el apartado síntesis de las nanopartículas. Se disolvieron 0.9 g de zeína en 15 mL de solución al 85% de etanol/agua (v/v). La solución resultante se sometió a agitación continua hasta la completa solubilización de la proteína.

#### **VII.2.3.2. Preparación de la fase amortiguadora**

Las muestras de pectina de alto metoxilo (HMP) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se disolvieron en una solución amortiguadora de fosfatos (20mM, pH 8), variando las concentraciones del polímero. Para las nanopartículas estabilizadas con pectina se probaron soluciones a diferentes concentraciones de 0.1 - 2.0%, mientras que aquellas nanopartículas estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se trataron con concentraciones de 0.5 - 2.0%. Las soluciones se mantuvieron en agitación (250 rpm) hasta la completa

solubilización del polímero (>5 h), el tiempo de agitación varió dependiendo de la concentración del polímero en la fase amortiguadora.

Para la síntesis de las nanopartículas estabilizadas con el polímero, la solución primaria se vertió en 40 mL de solución amortiguadora en agitación continua (2150 rpm) empleando un agitador magnético. Una vez vertida toda la solución primaria, la solución resultante se mantuvo en agitación durante 1 minuto. Inmediatamente después de su elaboración se midió el pH de las dispersiones resultantes y se ajustó a pH 8. Las dispersiones finales se almacenaron a 4 °C hasta su caracterización y prueba de estabilidad.

#### **VII.2.4. Estabilidad de las nanopartículas al cambio de pH**

Para evaluar la estabilidad de las partículas al cambio de pH, una vez formadas se ajustó el pH de la solución coloidal a 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0 y 3.0, para el caso de las nanopartículas formadas con zeína y aquellas estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg). Por otro lado para aquellas nanopartículas estabilizadas con pectina de alto metoxilo (HMP) se ajustó de igual manera el pH de la solución coloidal resultante a 8.0, 7.0, 6.0, 5.0 y 4.0. Se tomó una alícuota de todas las muestras tratadas en cada unidad de pH, para su posterior caracterización.

#### **VII.2.5. Caracterización de nanopartículas formadas**

Las nanopartículas resultantes se caracterizaron midiendo su tamaño de partícula, potencial de superficie y microestructura.

### VII.2.5.1. Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas se midió utilizando un instrumento de dispersión de luz láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Este instrumento mide la dependencia angular de la intensidad de la luz láser ( $\lambda=632.8$  nm) dispersada por una solución, y a continuación, se encuentra la distribución del tamaño de partícula que da el mejor ajuste entre las mediciones experimentales y las predicciones basadas en la teoría de dispersión de luz. El tamaño de partícula promedio fue reportado como el diámetro promedio de la superficie pesada  $d_{32}$  ( $= \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$ ), donde  $n_i$  es el número de partículas con diámetro  $d_i$ . Cabe señalar que la teoría utilizada para calcular la distribución del tamaño de partícula supone que las partículas son esféricas y homogéneas, pero las partículas en sistemas inestables que contienen agregados no son esféricas y homogéneas. Por lo tanto, los datos de tamaño de partícula en soluciones coloidales floculadas deben ser interpretados con cautela. El tamaño de partícula se expresa como la media de tres lecturas, para cada condición.

### VII.2.5.2. Potencial- $\zeta$

El potencial- $\zeta$  de las partículas formadas se determinó utilizando un instrumento de electroforesis de partícula (Zetasizer Nano ZS series, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) que mide la dirección y velocidad de movimiento de las partículas en el campo eléctrico aplicado. El potencial- $\zeta$  proporciona una estimación de la carga neta de una partícula medida en el 'plano de corte', que depende de la carga de la partícula real más la carga asociada con cualquiera de los iones que se mueven junto con la partícula en el campo eléctrico. Una medición de potencial- $\zeta$  individual se determinó a partir de la media de tres lecturas tomadas de la misma muestra.

### **VII.2.5.3. Microscopía óptica**

Las nanopartículas se agitaron con cuidado en un tubo de ensaye antes de ser analizadas con el propósito de homogeneizar la dispersión. Una gota de la dispersión ( $\approx 4\mu\text{L}$ ) se colocó en un portaobjetos y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos para ser observadas al microscopio (Nikon Eclipse 80i, Nikon Instrument Inc, Melvine, NY) con objetivos 60x (NA 0.75) y obtener las imágenes correspondientes a cada muestra.

### **VII.3. Análisis estadístico**

Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado, se calculó la media y desviación estándar. Se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey con ayuda del paquete estadístico JMP 10.0.

## VIII. Resultados y Discusión

### VIII.1. Identificación del sistema binario (etanol/agua) para la solubilización de la zeína

Como se puede observar en la **Figura 6** la solución binaria de etanol/agua al 70% (v/v) presentó una buena solubilidad cuando se emplearon concentraciones de zeína  $\leq 2\%$ . Cuando la concentración de zeína aumenta a un 4%, en la superficie del tubo se observa una ligera capa de proteína que no se disolvió. La cantidad de partículas agregadas aumentan al aumentar la concentración de zeína de 6% a 13.3% p/v.

El sistema con 80% (v/v) de etanol presenta una solubilidad máxima hasta 4% de zeína. La solución a una concentración de 6% de zeína es turbia y se forma una ligera capa en la superficie del tubo, siendo un indicador de que la concentración de zeína se encuentra cercana a la concentración de saturación máxima que puede soportar el sistema. La superficie del tubo presenta agregados de proteína cuando la concentración de zeína aumenta de 8% a 13.3% (p/v). Es evidente que los sistemas binarios de 85 y 90% (v/v) de etanol pueden disolver concentraciones de zeína  $\leq 13.3\%$  (p/v).

Las soluciones de 90% de etanol presentan soluciones menos turbias en comparación a las soluciones de 85% de etanol, disolviendo mayores concentraciones de zeína. Concentraciones de zeína  $\geq 8\%$  (p/v) en soluciones al 85% (v/v) de etanol presentan una ligera capa en la superficie del tubo indicando que la proteína a esas concentraciones no se disolvió en su totalidad.

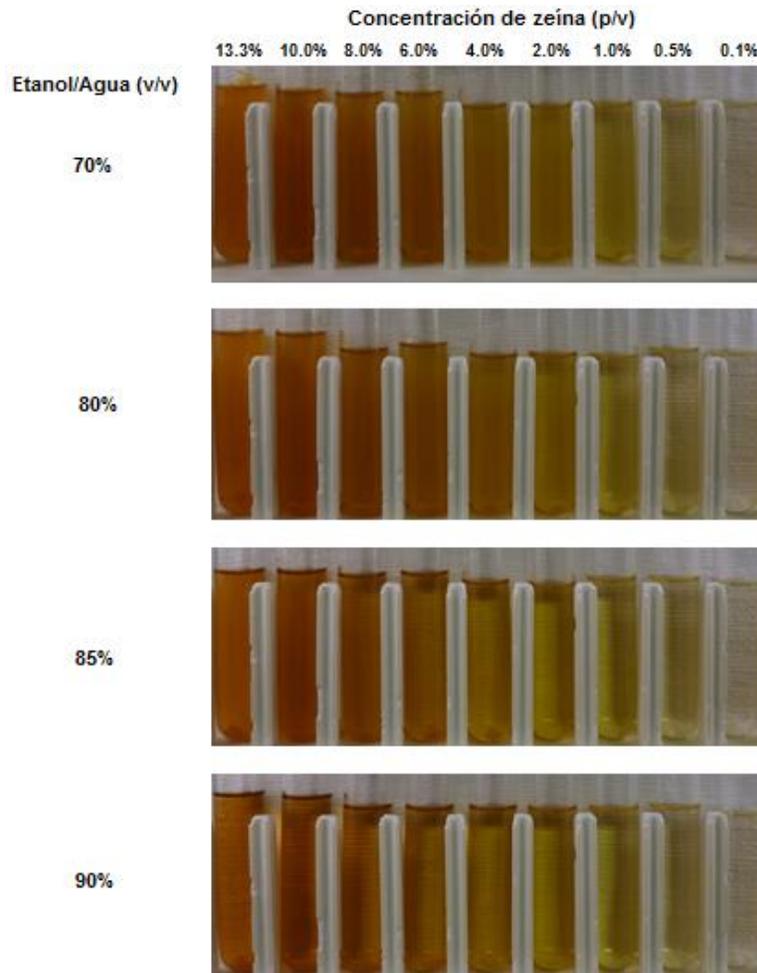


Figura 6. Prueba de solubilidad de zeína a diferentes concentraciones en sistemas binarios etanol/agua.

Es evidente que al aumentar la concentración de etanol se mejora la calidad del sistema para solubilizar a la zeína, lo cual concuerda con lo reportado por Zhong e Ikeda (2012) quienes informan que al aumentar la concentración de etanol de un 70% a un 90% aumenta la solubilidad de la zeína y la capacidad de absorción de la proteína. En todas las soluciones binarias tratadas, al disminuir la concentración de etanol la turbidez del sistema aumentaba, según Kim y Xu (2008) esto puede deberse a que los agregados de zeína forman una solución coloidal más grande y los agregados son de mayor tamaño. Este efecto se ha reportado cuando la concentración de etanol baja de un 90% a un 70%.

La prueba de solubilidad permitió conocer que en el sistema binario 85% etanol/agua se puede disolver hasta un 6% de zeína sin que se muestre alguna señal evidente de proteína insoluble. Este resultado es similar al reportado por Zhong y Jin (2009) para la síntesis de nanopartículas a base de zeína en donde disolvieron 6.66% de zeína en una solución de etanol al 85%. Por lo que se decidió que a estas condiciones se puede disolver la mayor cantidad de proteína sin presentar problemas de agregación para posteriormente preparar la solución primaria bajo las mismas condiciones.

## **VIII.2. Identificación de las condiciones de pH adecuadas para la formación de nanopartículas a base de zeína**

Para dar una idea general sobre el fenómeno de formación de las nanopartículas éste se esquematiza en la **Figura 7**, a pesar de que el principio de formación del sistema nanoparticulado a base de zeína ha sido explicado por diversos autores existen diferentes teorías sobre este fenómeno. En el presente trabajo se sugiere que este fenómeno es similar al proceso “dispersión líquido-líquido” (Alargova et al., 2004; Zhong y Jin, 2009; Wu et al., 2012); debido a la excelente miscibilidad del etanol y el agua, el etanol en las gotas dispersas de agua causa fricción entre las moléculas de agua-solvente. Cuando la solución primaria que contiene a la zeína se adiciona a una solución acuosa en agitación, las partículas disueltas en la solución primaria se deforman hasta dar como resultado partículas de menor tamaño. Cuando la concentración de etanol en las gotas dispersas cae por debajo del límite de solubilidad, la zeína se vuelve insoluble y precipita para formar nanopartículas.

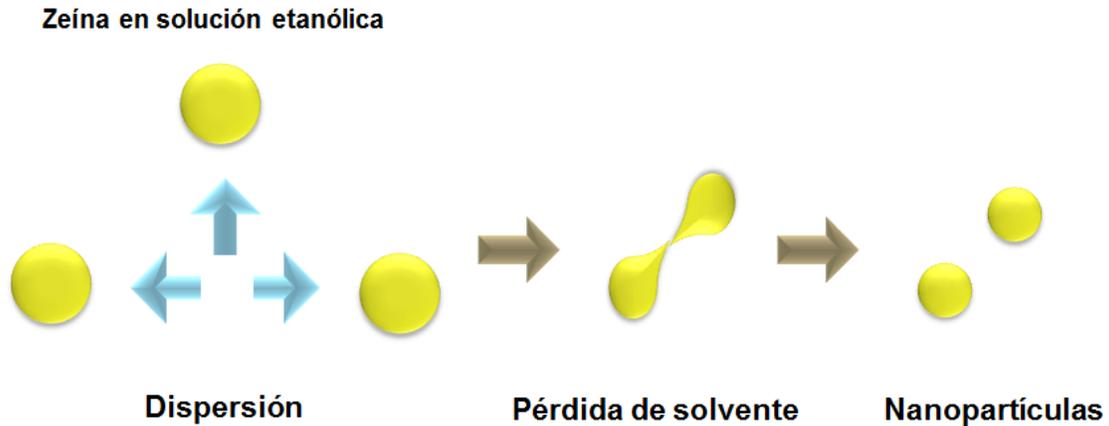


Figura 7. Principio de dispersión líquido-líquido para la producción de nanopartículas a base de zeína. La zeína disuelta en una solución etanólica da como resultado partículas de menor tamaño (izquierda), la interdifusión de etanol y agua (fricción de solventes, centro) reduce la solubilidad de la zeína, y la zeína precipita para formar nanopartículas (derecha).

El objetivo de este experimento fue conocer a que pH se obtenían los menores tamaños de partícula dentro de la escala nanométrica. Durante la producción de las nanopartículas a diferente pH de formación se sugiere que conforme el pH se acerca al punto isoeléctrico de la proteína ( $pI_{zeína} \approx 6.2$ ) el sistema coloidal se vuelve inestable debido que la carga neta de la proteína a ese valor de pH es cero y la repulsión electrostática entre las moléculas disminuye provocando la precipitación de las nanopartículas. Mientras que a valores de pH por arriba o por debajo del  $pI_{zeína}$  la estabilidad del sistema se ve favorecida (**Figura 8**). Esto concuerda con Parris et al. (2005) y Patel et al. (2010a) quienes reportan que las partículas coloidales a base de zeína tienden a agregar a pH neutro debido al pI de la proteína.

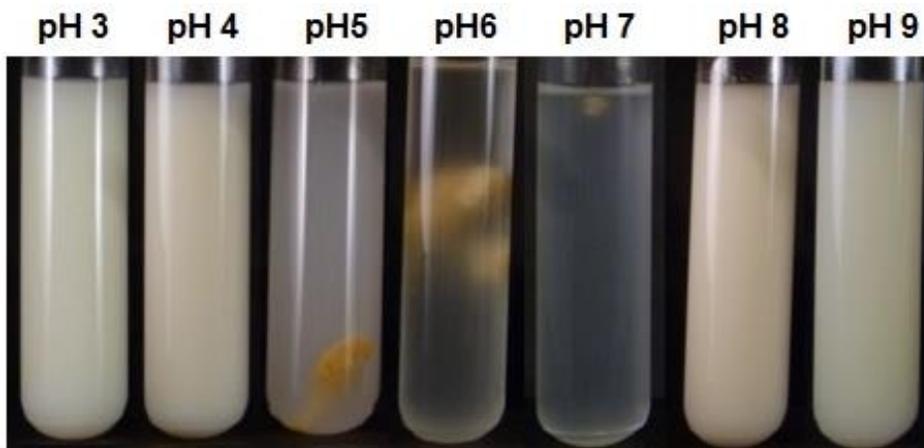


Figura 8. Dispersiones de zeína preparadas empleando soluciones amortiguadoras a diferentes pHs. De izquierda a derecha, las soluciones coloidales se prepararon a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. La concentración de zeína se mantuvo constante a 1.63% (p/v).

Para la caracterización del sistema se realizaron las mediciones de tamaño de partícula y potencial- $\zeta$  de los sistemas coloidales formados a diferente pH. Se determinó que a pH de formación (**Figura 9**) de 3, 4, 8 y 9 se obtienen los menores tamaños de partícula: 285, 195, 158 y 110 nm, respectivamente. Los valores presentados en el **Cuadro 7** permiten confirmar que no existe diferencia significativa entre el tamaño de partícula para los pHs de formación que reportan valores menores de tamaño, mientras que para aquellos en los que el tamaño de partícula es mayor todos los tratamientos son significativamente diferentes. Estos valores son similares al tamaño de partícula reportado por Patel et al. (2010a), donde las nanopartículas a base de zeína producidas mediante el método dispersión líquido - líquido presentan un tamaño de partícula de  $147 \pm 20$  nm.

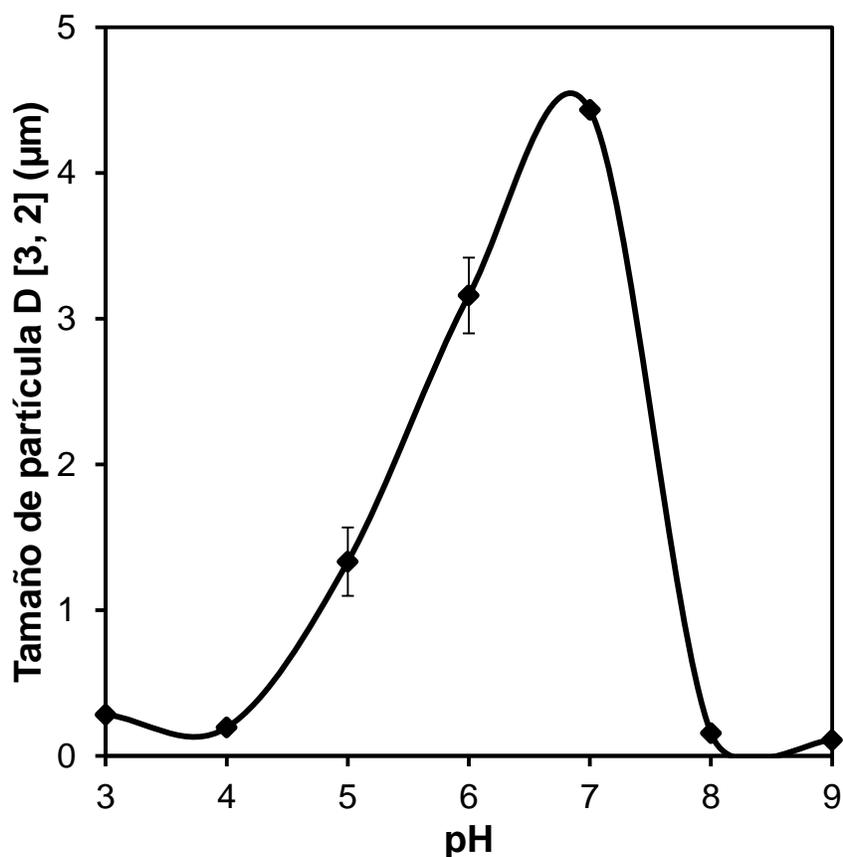


Figura 9. Efecto del pH sobre el tamaño de partícula (D [3,2]) de las nanopartículas a base de zeína. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v) en 40 mL de solución amortiguadora a diferentes pHs (3-9). Las barras de error corresponden al error estándar de tres mediciones.

Otro parámetro a considerar para determinar la estabilidad de un sistema es el valor de potencial- $\zeta$ . Con ayuda de la **Figura 10** se puede determinar el punto isoeléctrico del sistema el cual se encuentra alrededor de 5.5, en donde la carga neta del sistema es cero. Además en el gráfico se observa que a pHs por abajo del pI del sistema (3, 4 y 5) los valores de potencial- $\zeta$  son positivos y pasan a valores negativos cuando el pH se encuentra por arriba del pI del sistema (6, 7, 8 y 9). Esto concuerda con lo reportado por Jones et al. (2010b) en donde se sugiere que la carga eléctrica de las moléculas de proteína cambia de positiva a

negativa cuando el pH del sistema cambia a valores de pH por debajo y por arriba del punto isoeléctrico de la proteína.

Cuadro 7. Tamaño de partícula y potencial- $\zeta$  de dispersiones coloidales formadas a diferentes pHs.

pH de formación	Tamaño de partícula (nm)	Potencial- $\zeta$ (mV)
3	285 $\pm$ 14 a	13.4 $\pm$ 0.3
4	195 $\pm$ 5 b	36.0 $\pm$ 0.2
5	1333 $\pm$ 235 c	8.9 $\pm$ 0.1
6	3160 $\pm$ 260 d	- 8.1 $\pm$ 0.3
7	4432 $\pm$ 0 d	-10.1 $\pm$ 0.1
8	158 $\pm$ 5 d	-26.5 $\pm$ 0.5
9	110 $\pm$ 0 d	-13.1 $\pm$ 0.3

Los valores son presentados como la *media  $\pm$  E.E.* Letras diferentes indican diferencia significativa  $p \leq 0.05$ .

A partir de los valores presentados en el **Cuadro 7** se puede determinar que a pesar de que los sistemas formados a pH 3 y 9, los cuales presentaron tamaños de partícula de 197  $\pm$  43.3 nm y que podrían presentar buena estabilidad, poseen un potencial- $\zeta$  representativo de sistemas inestables: 13.4  $\pm$  0.3 mV y -13.1  $\pm$  0.3 mV, respectivamente. Los sistemas a pH de 4 y 8 en donde los tamaños de partícula son alrededor de 176  $\pm$  9.8 nm presentan valores de potencial- $\zeta$  característicos de sistemas con buena estabilidad, 36  $\pm$  0.2 mV y -26.5  $\pm$  0.5 mV, respectivamente. Las nanopartículas con un potencial- $\zeta$  por encima de  $\pm$  30 mV han demostrado ser sistemas estables en suspensión, debido a que la carga superficial de las partículas evita su agregación (Singh y Lillard Jr., 2009).

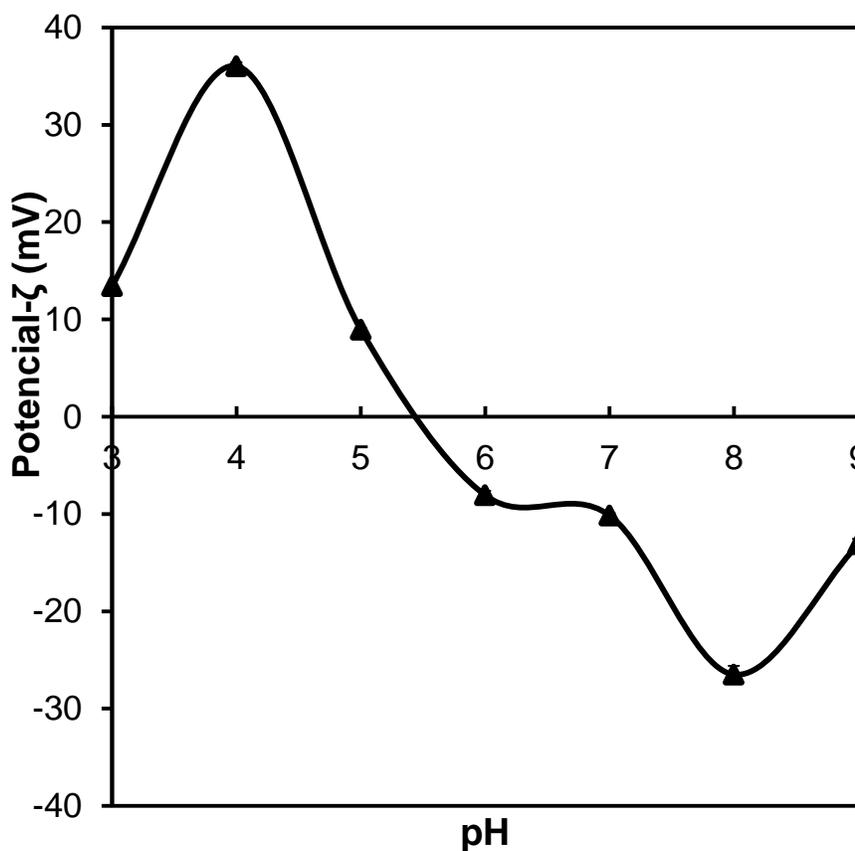


Figura 10. Efecto del pH sobre el potencial- $\zeta$  de las nanopartículas a base de zeína. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria (con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v) en 40 mL de solución amortiguadora a diferentes pHs (3-9).

Considerando ambas características: tamaño de partícula y potencial- $\zeta$  se puede sugerir que el pH de 8 genera sistemas coloidales a base de zeína estables (Patel et al., 2010a). Bajo estas condiciones se obtienen tamaños de partícula de  $158 \pm 5$  nm y potencial- $\zeta$  de  $-26.5 \pm 0.5$ .

### VIII.2.1. Estabilidad de los sistemas nanoparticulados al cambio de pH.

Como se puede observar en la **Figura 11** en el sistema coloidal a base de zeína formado a pH 8, a pesar de que se producen nanopartículas dentro de la escala nanométrica y con un valor de potencial- $\zeta$  característico de un sistema coloidal estable, este sistema es totalmente inestable al cambio de pH en un intervalo de pH de 6-3. El tamaño de partícula y potencial- $\zeta$  de estos sistemas no pudieron ser medidos, debido a que las partículas sedimentadas no lograron ser re-dispersadas para formar una solución homogénea, siendo un requisito para la caracterización. Mientras que a pH de 8 y 7 el sistema nanoparticulado presenta visiblemente una buena estabilidad. Una vez realizadas las mediciones pertinentes se obtuvo que el tamaño de las partículas aumento de  $0.222 \pm 0.001 \mu\text{m}$  a  $10.944 \pm 0.116 \mu\text{m}$ , conforme el pH se acerca a la neutralidad. En el caso del potencial- $\zeta$  se obtuvieron valores de  $-26.6 \pm 0.2 \text{ mV}$  a  $-37.8 \pm 0.2 \text{ mV}$ , en donde se puede sugerir que la estabilidad del sistema aumenta de pH 8 a 7, según lo reportado por Singh y Lillard Jr. (2009). Aunque el tamaño de partícula aumenta conforme el pH se acerca a la neutralidad, el valor de potencial- $\zeta$  toma valores más negativos haciendo al sistema estable a este pH. A pesar de ello se busca que el sistema coloidal sea estable en todo el intervalo de pH, por lo que se propone la estabilización del sistema con dos polímeros de origen natural: pectina de alto metoxilo (HMP) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg).

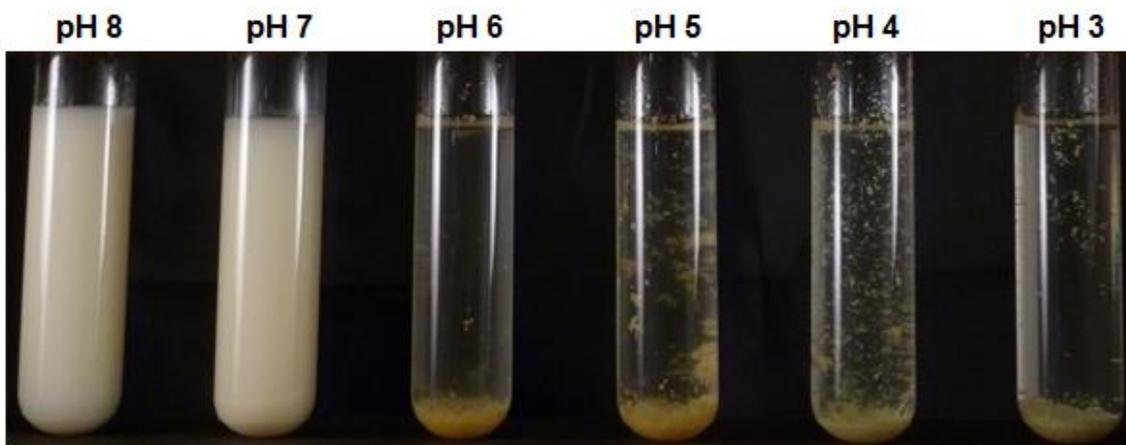


Figura 11. Estabilidad de las dispersiones coloidales a base de zeína al cambio de pH. De izquierda a derecha, las soluciones coloidales se ajustaron a pH 8, 7, 6, 5, 4 y 3. La concentración de zeína se mantuvo constante a 1.63% (p/v), el pH de síntesis fue de 8.

### **VIII.3. Impacto del tipo de biopolímero en la estabilización de sistemas nanoparticulados a base de zeína.**

Para la estabilización de las nanopartículas se propusieron dos polímeros naturales: pectina de alto metoxilo (HMP) y  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg). Estos polímeros han sido anteriormente empleados para la síntesis y estabilización de sistemas nanoparticulados (Bengoechea et al., 2011; Guzey et al., 2004; Jones et al., 2009; Jones et al., 2010a y 2010b; Nicolai et al., 2011). El objetivo de este experimento fue identificar los sistemas coloidales en los que se obtienen tamaños de partícula dentro de la escala nanométrica y sistemas coloidales estables en función de la concentración de estabilizante y el pH, en el intervalo de 3-8.

### VIII.3.1. Impacto del biopolímero en el tamaño de partícula.

Inicialmente se realizaron las observaciones de todos los sistemas nanoparticulados estabilizados con los polímeros anteriormente propuestos. En las **Figuras 12** y **13** se observan los sistemas nanoparticulados estabilizados a diferentes concentraciones de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y pectina de alto metoxilo (HMP), respectivamente. Para el caso de los sistemas coloidales estabilizados con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se observa una estabilidad aparente a todas las concentraciones tratadas (**Figura 12**).

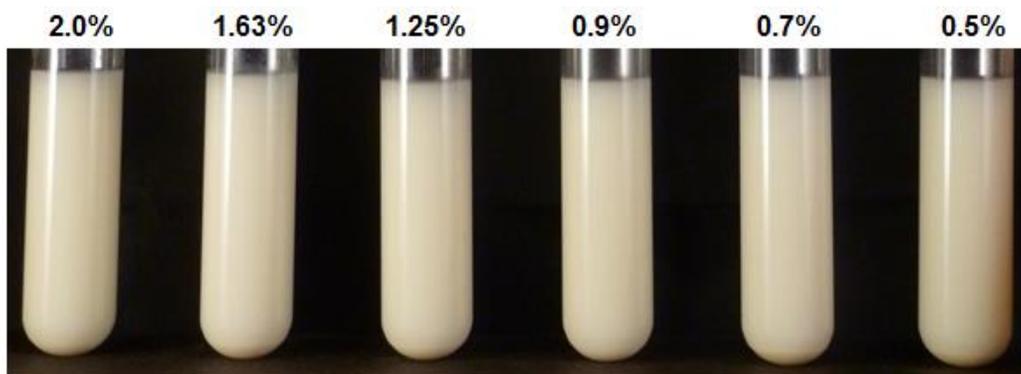


Figura 12. Dispersiones coloidales preparadas empleando diferentes concentraciones de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg). De izquierda a derecha, las soluciones coloidales se prepararon usando 2.0, 1.63, 1.25, 0.9, 0.7, 0.5 y 0.3% de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) como estabilizante. La concentración de zeína se mantuvo constante a 1.63% (p/v), el pH de síntesis fue de 8.

Por otra parte aquellos sistemas coloidales que fueron estabilizados con pectina a las concentraciones de 0.3 - 0.7% de pectina presentaron sedimentación de las partículas, esto puede deberse a que la concentración del polisacárido no fue suficiente para producir partículas estables de menor tamaño y se requieren concentraciones mayores (**Figura 13**). Este tipo de polisacáridos a pesar de que proveen buena estabilidad en sistemas coloidales bajo diferentes condiciones de estrés presentan un efecto pobre cuando se trata de producir partículas de menor

tamaño además de que se requieren altas concentraciones para observar su efecto estabilizante (McClements, 2003). El resto de las concentraciones tratadas (0.9 – 2.0%) presentan una estabilidad aparente ya que no se observa sedimentación en el fondo del tubo, indicando que las dispersiones coloidales a estas concentraciones de estabilizante contienen partículas con tamaños que van desde los 2.95  $\mu\text{m}$  hasta los 3.63  $\mu\text{m}$ .

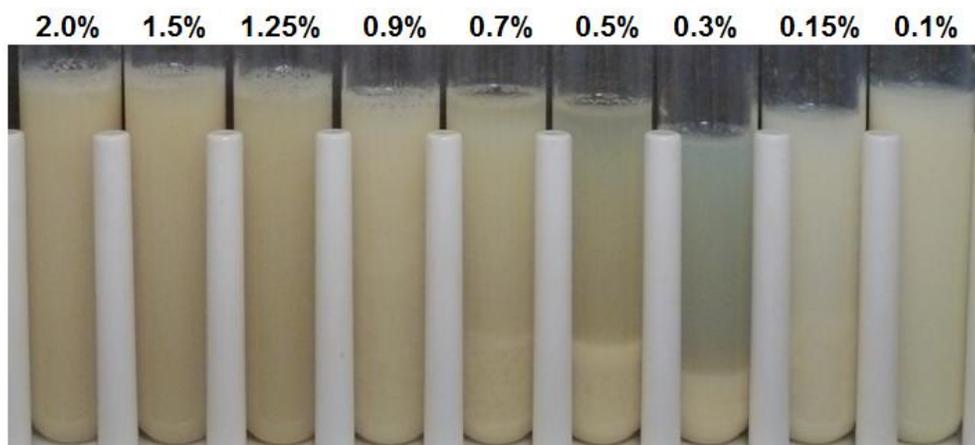


Figura 13. Dispersiones coloidales preparadas empleando diferentes concentraciones de pectina de alto metoxilo (HMP). De izquierda a derecha, las soluciones coloidales se prepararon usando 2.0, 1.5, 1.25, 0.9, 0.7, 0.5, 0.3, 0.15, 0.1% de pectina de alto metoxilo (HMP) como estabilizante. La concentración de zeína se mantuvo constante a 1.63% (p/v), el pH de síntesis fue de 8.

Fue necesario realizar la caracterización de los sistemas nanoparticulados para comprobar lo observado. La **Figura 14** muestra los resultados obtenidos para los tamaños de partícula de los sistemas nanoparticulados estabilizados con pectina. Como se puede observar en el grafico los tamaños de partícula disminuyeron conforme el pH se acercaba a la neutralidad (pH 7), esto se observa a todas las concentraciones de pectina tratadas, obteniéndose el menor tamaño de partícula ( $2.50 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ) a este valor de pH (**Cuadro 8**).

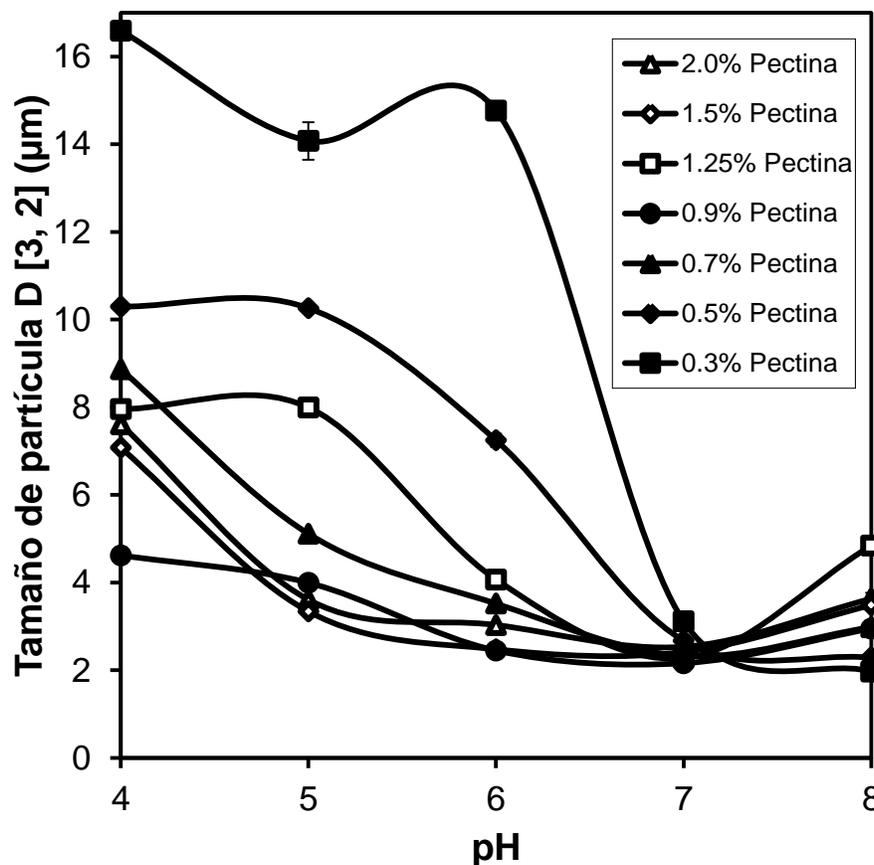


Figura 14. Efecto de la concentración de pectina y el pH en el tamaño de partícula. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria (con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v)) en 40 mL de solución amortiguadora 20 mM a pH 8 (con diferentes concentraciones de pectina 0.3 - 2.0%). Las barras de error son el error estándar de tres mediciones.

A una concentración de pectina de 0.9% se obtuvieron partículas con un tamaño de 2.16 hasta 3.99  $\mu\text{m}$  en el intervalo de pH tratado, formándose los menores tamaños de partícula, por lo que se prosiguió con la toma de micrografías ópticas para ejemplificar lo anterior. Como se puede observar en la **Figura 15**, el tamaño de partícula es prácticamente constante al cambio de pH y la forma de las partículas en todo el intervalo de pH permanece esférica. Por lo que se sugiere que la concentración del polisacárido es suficiente para cubrir en su totalidad la superficie de las partículas formadas, estabilizando así el sistema nanoparticulado.

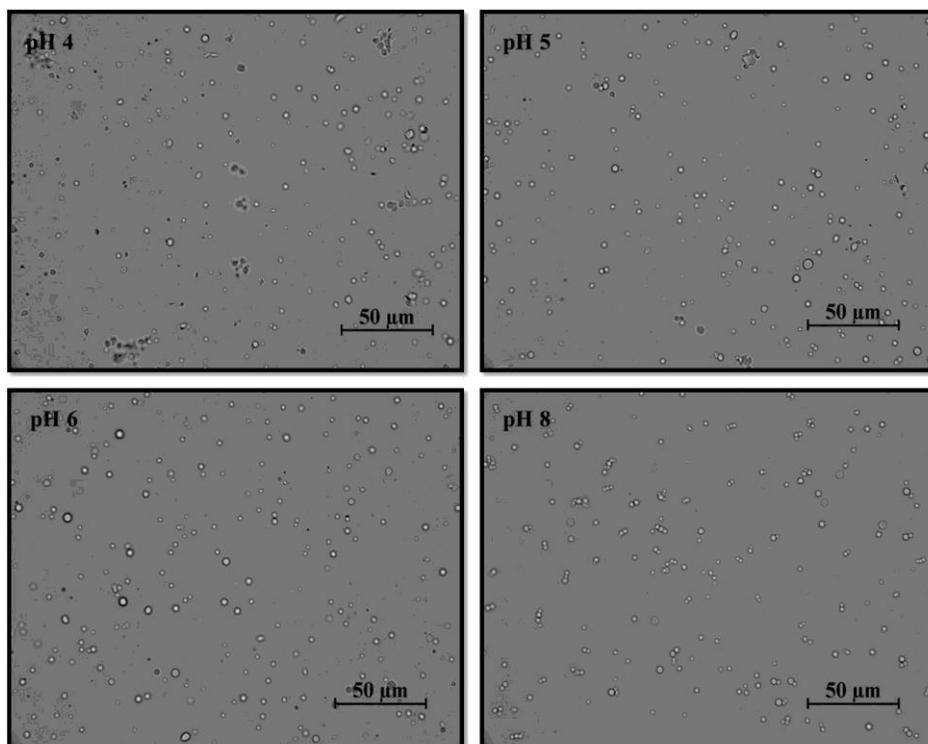


Figura 15. Microscopia óptica de sistemas nanoparticulados. Efecto del cambio de pH en el tamaño de partícula. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria (con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v)) en 40 mL de solución amortiguadora (20 mM, pH 8, 0.9% pectina).

Los sistemas coloidales estabilizados con 0.15% y 0.10% de pectina presentaron inestabilidad al cambio de pH por lo que fue imposible realizar las mediciones de caracterización y se descartaron para análisis posteriores.

Para las nanopartículas estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) los tamaños de partícula tienen un comportamiento diferente a aquellos sistemas estabilizados con pectina (**Figura 16**). Las partículas aumentan de tamaño hasta llegar a un máximo a pH 5, cuando el pH se acerca a la neutralidad los tamaños de partícula disminuyen alcanzándose a pH de 7 las partículas más pequeñas, esto ocurre para concentraciones de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) de 2.0-0.9%. Se sugiere que el aumento en el tamaño de partícula al cambio de pH se debe a una floculación de las partículas (Guzey et al., 2004). Se observa que en el intervalo de

pH de 3-6 los tamaños de partícula de aquellos sistemas estabilizados con concentraciones de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) de 0.7% y 0.5% permanecen alrededor de  $26.36 \pm 0.893 \mu\text{m}$  y  $42.99 \pm 1.09 \mu\text{m}$ , respectivamente. Cuando el pH es 7 las partículas disminuyen de tamaño drásticamente a  $0.34 \pm 0.01 \mu\text{m}$  y  $0.45 \pm 0.01 \mu\text{m}$ , respectivamente. A una concentración de 1.25% de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se obtienen partículas de tamaño pequeño en todo el intervalo de pH tratado, los cuales van de los 192 nm hasta los 2.2  $\mu\text{m}$ .

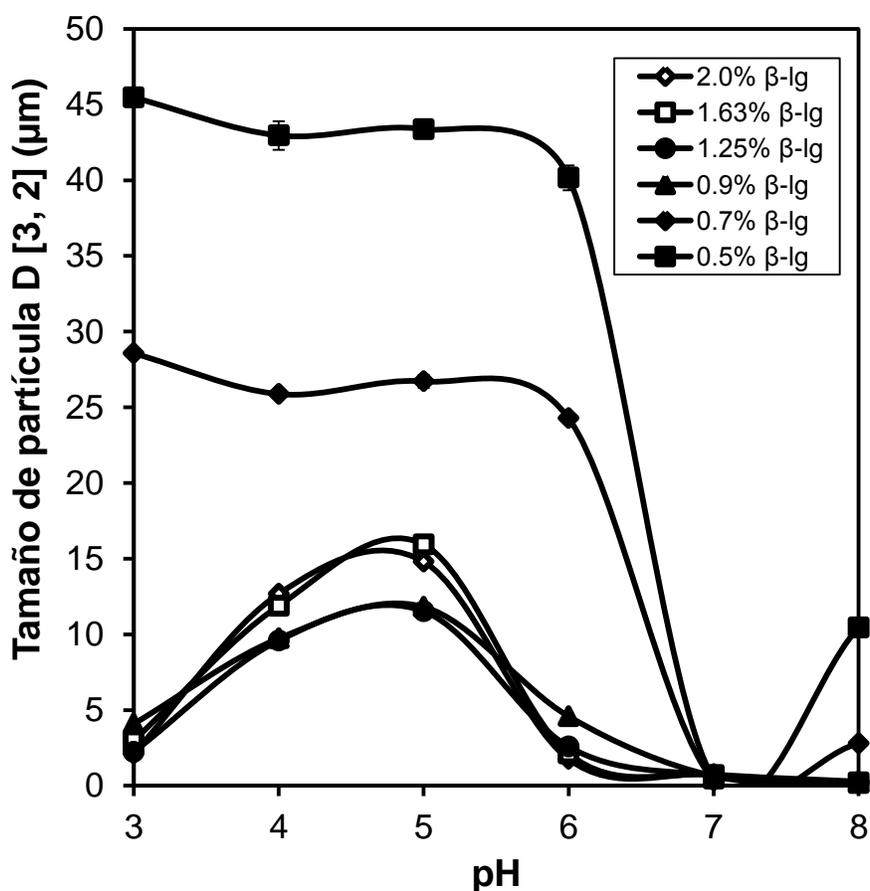


Figura 16. Efecto de la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y el pH en el tamaño de partícula. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria (con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v)) en 40 mL de solución amortiguadora 20 mM a pH 8 (con diferentes concentraciones de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) 0.5 - 2.0%). Las barras de error son el error estándar de tres mediciones.

A pesar de que los tamaños para las partículas estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) presentan un intervalo de tamaño mayor (45.468 – 0.166  $\mu\text{m}$ ) que en el caso de los sistemas nanoparticulados estabilizados con pectina (16.59 – 1.971  $\mu\text{m}$ ), a un pH de 7 en donde para ambos estabilizantes se obtuvieron las partículas más pequeñas; aquellas estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) presentan partículas de menor tamaño a todas las concentraciones propuestas de este estabilizante (**Cuadro 8**). Se sugiere que el tamaño de las partículas se ve influenciado por la conformación que tiene el estabilizante a distintos valores de pH, así como la cantidad de estabilizante empleado.

Cuadro 8. Efecto de la concentración de estabilizante en el tamaño de partícula a pH 7.

% Estabilizante (p/v)	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	
	Pectina (HMP)	$\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg)
2.0	2.553 $\pm$ 0.002 c	0.751 $\pm$ 0.004 g
1.63	-	0.698 $\pm$ 0.005 gh
1.50	2.415 $\pm$ 0.009 d	-
1.25	2.276 $\pm$ 0.009 e	0.671 $\pm$ 0.001 gh
0.9	2.160 $\pm$ 0.005 f	0.629 $\pm$ 0.005 h
0.7	2.327 $\pm$ 0.030 e	0.342 $\pm$ 0.006 j
0.5	2.674 $\pm$ 0.027 b	0.453 $\pm$ 0.006 i
0.3	3.116 $\pm$ 0.040 a	-

Los valores son presentados como la *media*  $\pm$  *E.E.* Letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j) indican diferencia significativa  $p \leq 0.05$ .

### VIII.3.2. Impacto del biopolímero en la carga de la partícula.

La estabilidad de los sistemas coloidales y el tamaño de partícula dependen en gran medida de los valores de potencial- $\zeta$ . Los resultados de las mediciones de los sistemas nanoparticulados estabilizados con pectina se

muestran en la **Figura 17**. A diferencia de lo reportado en estudios previos en donde se propone que la concentración del polímero afecta a la carga del sistema (Bengoechea et al., 2011; Jones et al., 2009), en el caso de la pectina no se observa de manera clara algún efecto que relacione la carga del sistema con la concentración del polímero, ya que a todas las concentraciones tratadas la carga del sistema se comporta de manera semejante.

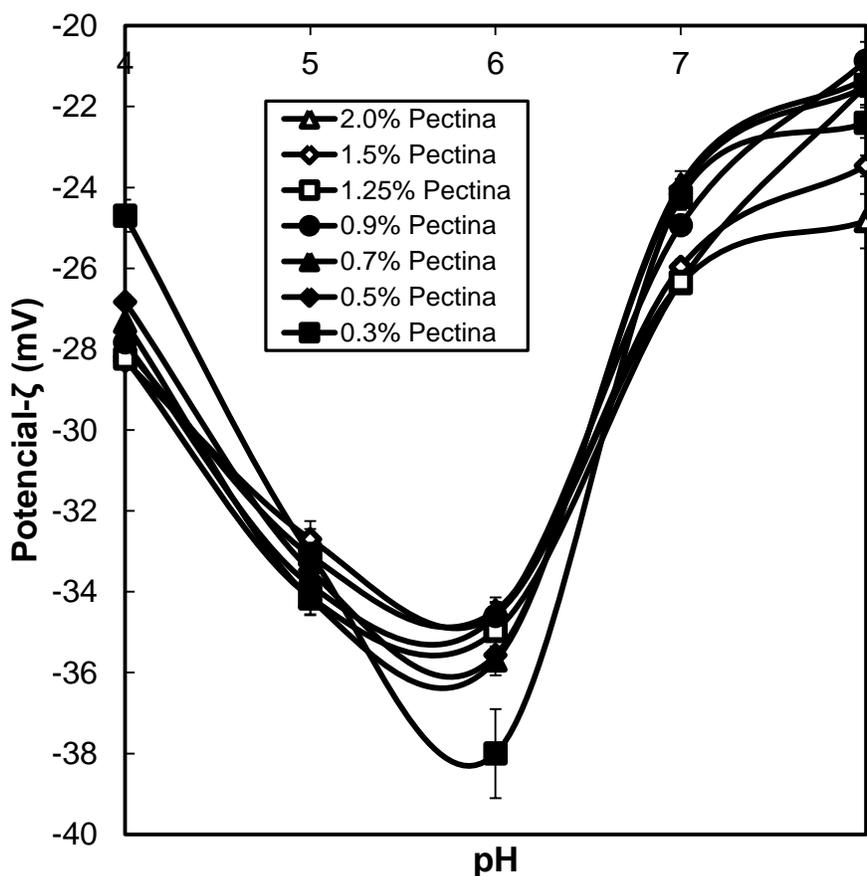


Figura 17. Efecto de la concentración de pectina y el pH en la carga de la partícula. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria (con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v)) en 40 mL de solución amortiguadora 20 mM a pH 8 (con diferentes concentraciones de pectina 0.3 - 2.0%). Las barras de error son el error estándar de tres mediciones.

El fenómeno anterior puede ser atribuido a que el número relativamente bajo de grupos aniónicos en las moléculas de pectina de alto metoxilo (HMP) se encuentran saturados de proteína a todas las concentraciones de pectina tratadas, demostrado por el hecho de que su carga es independiente de la concentración de polisacárido (**Figura 18**). En consecuencia, se sugiere que solo algunos grupos aniónicos se encontraban disponibles en las moléculas de pectina de alto metoxilo (HMP) podrían unirse a moléculas de proteína (Jones et al., 2010b).

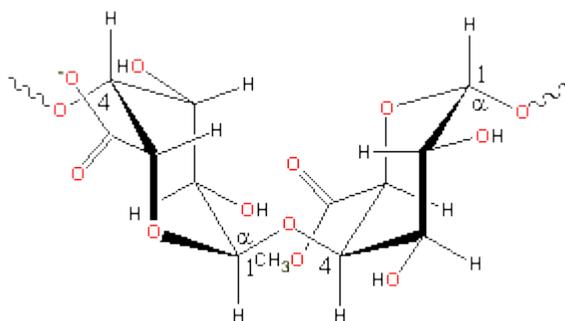


Figura 18. Grupos aniónicos de la molécula de pectina.

Conforme el valor de pH se acerca al punto isoeléctrico (pI) de la proteína el valor de potencial aumenta hacia valores negativos llegando a un máximo de valor negativo a pH 6 y conforme el valor de pH se vuelve menos ácido el potencial se vuelve menos negativo. Esto puede deberse a que la pectina al ser una macromolécula aniónica a lo largo de todo el intervalo de pH tratado (pKa  $\approx 3.5$ ), se encuentra cargada negativamente. En un intervalo de pH de 4-6 la carga electrostática de los polímeros es opuesta, mientras las moléculas de proteína se encuentran cargadas positivamente las cargas del polisacárido son negativas. Debido a que las cargas de los polímeros son opuestas la interacción entre ellos es más fuerte. Conforme el pH se aleja del pI hacia valores de pH por arriba de este, la carga de ambos polímeros es negativa pudiendo verse disminuida así la interacción entre ambas macromoléculas y por lo tanto mejorar la estabilidad de las nanopartículas. Este comportamiento se ha reportado previamente, en donde

se propone que la pectina no puede ser absorbida a la superficie de las partículas cuando la carga de la proteína y del polisacárido son de la misma naturaleza debido a la gran repulsión electrostática entre ambas macromoléculas (Surh et al., 2006).

Sin embargo no existe un valor de pH al cual la carga del sistema se neutralice, es decir sea cero. Este resultado concuerda con lo reportado por Jones et al. (2010b), en donde se observa que a pesar de que la densidad de carga de la pectina es baja esta no es neutralizada por la unión de la proteína; por lo que a pH bajos a pesar de que la carga positiva de las proteínas aumenta la densidad de la carga lineal de la pectina se disminuye evitando así la neutralización de las cargas.

Cuando el pH del sistema se ajusta a 5 y 6 todos los sistemas coloidales estabilizados a las diferentes concentraciones de pectina presentan valores de potencial- $\zeta$  característicos de aquellos sistemas nanoparticulados estables en suspensión, los resultados se muestran en el **Cuadro 9**. Según lo reportado por Singh y Lillard Jr. (2009), aquellas nanopartículas que tienen potencial- $\zeta$  por arriba de  $\pm 30$  mV tiene el potencial de ser empleadas como sistemas de liberación.

Por otra parte los sistemas nanoparticulados estabilizados con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) muestran un comportamiento diferente a aquellos estabilizados con pectina. Los valores de potencial- $\zeta$  de las nanopartículas fueron de negativos (-25.13 mV) a positivos (29.37mV) cuando el pH disminuyó de 8 a 3. A diferencia de los sistemas nanoparticulados estabilizados con pectina en donde no se observa la neutralización de la carga en todo el intervalo de pH tratado, aquellos estabilizados con  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) presentan la neutralización de la carga a un valor de pH cercano al  $pI_{\beta\text{-lg}}$ .

Cuadro 9. Valores de potencial- $\zeta$  de dispersiones coloidales estabilizadas con pectina a diferentes concentraciones (2.0 - 0.3 %) ajustadas a diferentes pHs.

% Pectina (p/v)	Potencial- $\zeta$ (mV)	
	pH 5	pH 6
2.0	-33.1 $\pm$ 0.1	-34.5 $\pm$ 0.3
1.5	-32.7 $\pm$ 0.5	-34.6 $\pm$ 0.3
1.25	-34.1 $\pm$ 0.4	-35 $\pm$ 0.4
0.9	-33.8 $\pm$ 0.1	-34.6 $\pm$ 0.3
0.7	-34.2 $\pm$ 0.4	-35.7 $\pm$ 0.3
0.5	-33.5 $\pm$ 0.5	-35.6 $\pm$ 0.5
0.3	-33.1 $\pm$ 0.6	-38 $\pm$ 1.1

Los valores son presentados como la *media*  $\pm$  *E.E.* Letras diferentes indican diferencia significativa  $p \leq 0.05$ .

Como se puede observar en el gráfico de la **Figura 19**, el *pl* (carga neta de 0 mV) del sistema se presenta a un pH  $\approx$  5. Este valor difiere del punto isoeléctrico (*pl*) de cada uno de los biopolímeros involucrados, la zeína (*pl*  $\approx$  6.2) y la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) (*pl*  $\approx$  4.6). Bengoechea et al. (2011) proponen que generalmente el comportamiento de los biopolímeros individualmente se ve afectado por la presencia de otro biopolímero en solución cuando estos son mezclados.

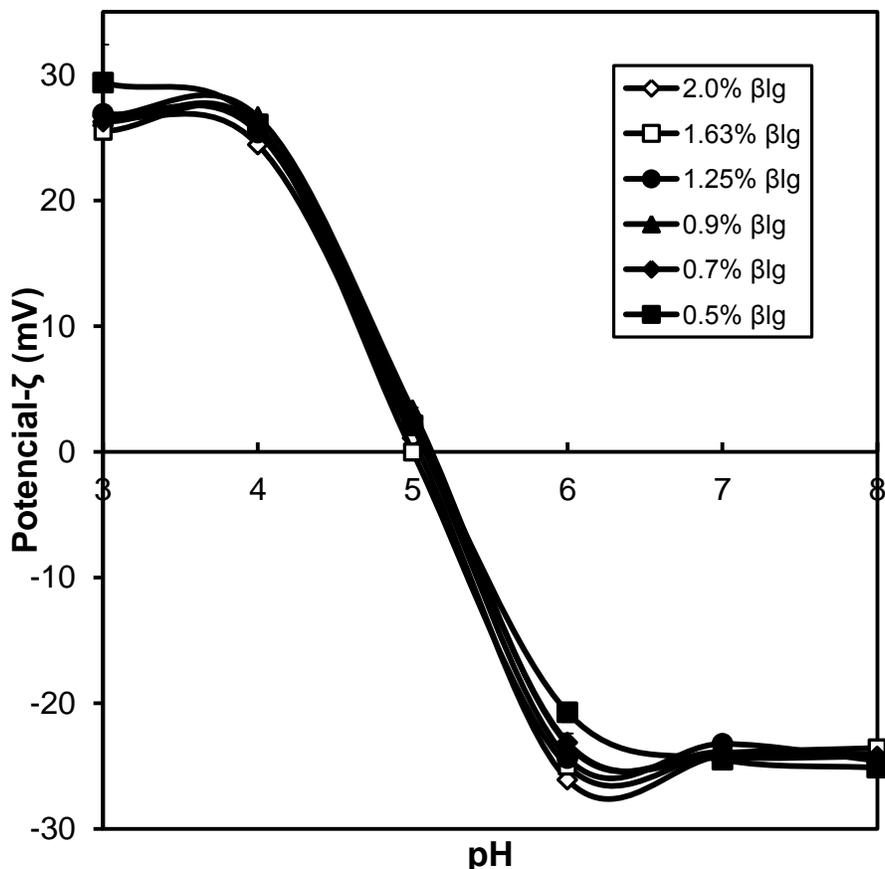


Figura 19. Efecto de la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y el pH en la carga de la partícula. Las nanopartículas de zeína se prepararon adicionando 15 mL de la solución primaria (con 0.9 g zeína en solución binaria etanol/agua 85% (v/v)) en 40 mL de solución amortiguadora 20 mM a pH 8 (con diferentes concentraciones de  $\beta$ -lg (0.5 - 2.0%). Las barras de error son el error estándar de tres mediciones.

A valores de pH por arriba del pI del sistema posiblemente las moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) se unen a las de zeína por interacciones hidrofóbicas entre ambas macromoléculas (Bengoechea et al., 2011). Por otra parte a valores de pH de 7 a 8, las soluciones presentaron una apariencia turbia, indicando la formación de dispersiones coloidales de partículas relativamente estables. Mientras que a valores de pH de 6 a 3, se observa la presencia de un sedimento blanco en el fondo del tubo con un sobrenadante transparente (pH 5) y un sobrenadante turbio (pH 6, 4, 3) indicando la presencia de agregados de mayor tamaño inestables. Estas observaciones se asemejan al trabajo realizado por

Bengoechea et al. (2011) en donde postulan que es posible controlar la naturaleza de las partículas mediante el control de las condiciones de formación.

A pH por debajo del pI de la zeína se observa tanto la coalescencia de las partículas como la sedimentación de las mismas a medida que la concentración de pectina (e.i.  $\geq 0.9\%$ ) o  $\beta$ -lg (e.i.  $\geq 1.25\%$ ) aumenta este fenómeno se observa en menor grado. A pH (e.g. 7 y 8) por arriba del pI de la zeína el efecto de coalescencia se ve disminuido y únicamente se presenta sedimentación de las nanopartículas a medida que la concentración del polisacárido aumenta, en el caso de los sistemas estabilizados con  $\beta$ -lg a todas las concentraciones tratadas se observa la estabilidad del sistema.

A valores de pH (e.g. 6, 5 y 4) por debajo del pI de la zeína, tanto las moléculas de proteína como las de pectina se encuentran cargadas opuestamente, por lo que se espera que las moléculas de pectina sean atraídas electrostáticamente a la superficie de las nanopartículas. Una sola molécula de pectina puede ser absorbida a la superficie de más de una nanopartícula, actuando como un puente polimérico promoviendo así la “bridging flocculation” (Dickinson, 2003; Glover et al., 2000; Guzey et al., 2004). Todo esto aunado a valores de potencial- $\zeta$  pequeños da como resultado que las fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas no son suficientes para prevenir la agregación de las nanopartículas.

A valores de pH por arriba del pI de la zeína, tanto las nanopartículas como las moléculas de pectina se encuentran cargadas negativamente, por lo que no se espera que las moléculas de pectina sean atraídas hacia la superficie de las nanopartículas. En este caso existe una cantidad considerable de pectina no absorbida en la fase acuosa, la cual promueve “droplet flocculation” mediante el mecanismo de “depletion” (Chanamai y McClements, 2001; Guzey et al., 2004; McClements, 2000). Este efecto también puede verse favorecido a altas concentraciones de pectina en donde la cantidad de pectina no absorbida es

mayor (Furusawa et al., 1999). Por último a valores intermedios (e.g. pH 6), se observó menor agregación de las partículas, lo que sugiere que la absorción de la pectina a la superficie de las nanopartículas aumenta su estabilidad a este valor de pH. Este efecto puede ser atribuido al hecho de que la absorción de la pectina aumenta la magnitud de la carga absoluta de las partículas, e.g. (valor de potencial- $\zeta$  a pH 6). Aumentando la repulsión electrostática entre las partículas, reduciendo así su tendencia a agregar (Guzey et al., 2004).

## IX. Conclusiones

En este estudio se indica la posibilidad de usar pectina y  $\beta$ -lg para la estabilización de sistemas nanoparticulados a base de zeína con propiedades que pueden ser moduladas mediante el pH y la concentración del estabilizante empleado. Un incremento en la concentración de polisacárido da partículas cargadas más negativamente ( $\leq -30$  mV), así mismo tamaños de partícula mayores ( $\geq 3.99$   $\mu$ m) hasta que se alcanza la concentración de saturación (i.e.  $\geq 0.9\%$  pectina). Sin embargo este comportamiento no se observa tan marcadamente en todos los valores de pH.

Para el caso de la  $\beta$ -lg se presentan partículas solubles a pH de 8 y 7, pero una agregación muy grande a pH de 6 a 3, la cual puede ser atribuido a la neutralización de las cargas entre las macromoléculas y enlaces. Las nanopartículas formadas en este estudio podrían ser empleadas como sistemas de liberación en alimentos con pH de 5 y 6 para el caso de aquellos sistemas estabilizados con pectina a una concentración  $\geq 0.9\%$  en donde los tamaños de partícula son menores ( $\leq 2.44$   $\mu$ m).

Las partículas de zeína son inestables cuando se incorporan a matrices con valores de pH por arriba de su pI, pero estables cuando se forman en presencia de pectina. Esto puede ser atribuido al hecho de que la repulsión electrostática entre las partículas estabilizadas con pectina es suficientemente grande para superar las interacciones de atracción partícula-partícula (e.g. atracciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals).

Es importante resaltar que son necesarios estudios posteriores con el propósito de elucidar de manera clara un mecanismo para la justificación de los resultados aquí presentados y establecer el comportamiento de las partículas en

un amplio intervalo de condiciones ambientales (e.g. fuerza iónica, liofilización y digestibilidad).

## Bibliografía

Aldana, A. S., Sandoval, E.R., Aponte, A.A. (2004). "Encapsulación de Aditivos para la Industria de Alimentos." Ingeniería y Competitividad **6**(2): 73 - 83.  
AOAC (1996). Official methods of analysis. AOAC. 16. Arlington, VA.

Arcan, I., Yemenicioğlu, A. (2011). "Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials." Food Research International **44**: 550–556.

Bengoechea, C., Jones, O.G., Guerrero, A., McClements, D.J. (2011). "Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment." Food Hydrocolloids **25**: 1227- 1232.

Carneiro, H. C. F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D. (2012). "Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials." Journal of Food Engineering.

Costantino, L., Tosi, G., Ruozi, B., Bondioli, L., Vandelli, M.A., Forni, F. (2009). "Colloidal systems for CNS drug delivery." H.S. Sharma (Ed.) Progress in Brain Research, Vol. 180 ISSN: 0079-6123

Chang, W. W., Hu, F.W., Yu, C.C., Wang, H.H., Feng, H.P., Lan, C., Tsai, L.L., Chang, Y.C. (2012). "Quercetin in elimination of tumor initiating stem-like and mesenchymal transformation property in head and neck cancer." Head and Neck: 1-7.

Chanamai, R. y McClements, D. J. (2001). "Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch." Journal of Food Science **66**: 457–463.

Chen, L., Remondetto, G.E., Subirade, M. (2006). " Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems." Trends in Food Science y Technology **17**: 272–283

Dickey, L.C., McAloon, A., Parris, N. (2003). "Minimizing entrainment of extract liquid by settling maize particles." Industrial Crops and Products **18**: 77–84.

Dickinson, E. (2003). "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems." Food Hydrocolloids **17**: 25–39.

Drzewiecki, J., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Pawelzik, E., Martin-Belloso, O., Park, Y.S., JUNG, S.T., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S. (2003). "Identification and Differences of Total Proteins and Their Soluble Fractions in Some Pseudocereals Based on Electrophoretic Patterns." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**: 7798-7804.

FAO, F. a. A. O. o. t. U. N., WHO, (World Health Organization) (2001). Human Vitamin and Mineral Requirements. Roma, FAO.

Fernández, J. Y., Montoya, J.A.S., Martínez, L.C., Hernández, J.J., Robles, M.M., Ramírez, E.G.R. (2002). "Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación." Avance y Perspectiva **21**: 313-319.

Folter, J.W.J., van Ruijven, M.W.M., Velikov, K.P. (2012). "Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein." Soft Matter **8**: 6807.

Fu, J.X., Wang, Hu.J., Zhou Y.Q., Wang, J.Y. (2009). "Antibacterial activity of ciprofloxacin-loaded zein microsphere films." Materials Science and Engineering **29**: 1161–1166.

Fu, D., Weller, C.L. (1999). "Rheology of zein solutions in aqueous ethanol." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**: 2103–2108.

Furusawa, K., Ueda, M., Nashima, T. (1999). "Bridging and depletion flocculation of synthetic latices induced by polyelectrolytes." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **153**: 575 - 581.

Gouin, S. (2004). "Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends." Trends in Food Science y Technology **15**: 330–347.

Guo, Y., Liu, Z., An, H., Li, M., Hu, J. (2005). "Nano-structure and properties of maize zein studied by atomic force microscopy." Journal of Cereal Science **41**: 277–281.

Guzey, D., Kim, H.J., McClements, D.J. (2004) " Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin–pectin membranes." Food Hydrocolloids **18**: 967–975.

Heidebach, T., Forst, P., Kulozik, U. (2012). "Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **52**: 291 - 311.

Hurtado-López, P., Murdan, S. (2006). "Zein microspheres as drug/antigen carriers: A study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes." Journal of Microencapsulation **23(3)**: 303–314.

Johnston, A.P.R., Such, G.K., Ng, S.L., Carus, F. (2011) " Challenges facing colloidal delivery systems: From synthesis to the clinic." Current Opinion in Colloid y Interface Science **16**: 171–181.

Jones, O.G., Decker, E.A., McClements, D.J. (2010a) " Comparison of protein polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation." Journal of Colloid and Interface Science **344**: 21–29

Jones, O., Decker, E.A., McClements, D.J. (2010b). "Thermal analysis of  $\beta$ -lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles." Food Hydrocolloids **24**: 239–248.

Jones, O.G., Decker, E.A., McClements, D.J. (2009) "Formation of biopolymer particles by thermal treatment of  $\beta$ -lactoglobulin–pectin complexes." Food Hydrocolloids **23**: 1312–1321.

Kim, S., Sessa, D.J., Lawton, J.W. (2004). "Characterization of zein modified with a mild cross-linking agent." Industrial Crops and Products **20**: 291–300.

Kim, S., Xu, J. (2008). "Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol." Journal of Cereal Science **47**: 1–5.

Lawton, J.W. (2002). "Zein: a history of processing and use." Cereal Chemistry **79** (1): 1–18.

Liang, L., Subirade, M. (2010). " $\beta$ -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological Implication." Journal of Physical Chemistry B. **114**(19): 6707–6712.

Liu, X., Sun, Q., Wang, H., Zhang, L., Wang, J.Y. (2005). "Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system." Biomaterials **26**: 109–115.

Lozano, J.M., Giraldo, G.I., Romero, C.M. (2008). "An improved method for isolation of  $\beta$ -lactoglobulin." International Dairy Journal **18**: 55–63.

Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L., Wang, Q. (2011). "Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro controlled release study." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **85**: 145–152.

McClements, D. J. (2003). "Role of hydrocolloids as food emulsifiers." In P. A. Williams, & G. O. Phillips (Eds.), Gums and stabilizers for the food industry **12**. UK: The Royal Society of Chemistry.

Mesbahi, G., Jamalian, J., Farahnaky, A. (2005). "A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems." Food Hydrocolloids **19**: 731–738.

Mohanraj, V.J., Chen, Y. (2006). "Nanoparticles – A Review." Tropical Journal of Pharmaceutical Research **5 (1)**: 561-573.

Muthuselvi, L., Dhathathreyan, A. (2006). "Simple coacervates of zein to encapsulate Gitoxin." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **51**: 39–43.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). "An overview of encapsulation technologies for food applications." Procedia Food Science: 1806 – 1815.

Nicolai, T., Britten, M., Schmitt, C. (2011) "  $\beta$ -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications." Food Hydrocolloids **25**:1945-1962.

Parris, N., Coffin, D.R. (1997). "Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic zein films." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**: 1596–1599.

Parris, N., Cooke, P.H., Hicks, K.B. (2005). " Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**: 4788-4792.

Patel, A.R., Bouwens, E.C.M., Velikov, K.P. (2010a). "Sodium Caseinate Stabilized Zein Colloidal Particles." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**: 12497–12503.

Patel, A.R., Heussen, P.C.M., Hazekamp, J., Drost, E., Velikov, K.P. (2012). "Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium." Food Chemistry **133**: 423–429.

Patel, A.R., Hu, Y., Tiwari, J.K., Velikov, K.P. (2010b). "Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles." The Royal Society of Chemistry **6**: 6192–6199.

Patel, A.R., Velikov, K.P. (2011). "Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery". LWT - Food Science and Technology **44** : 1958-1964

Pérez-Xochipa, I. (2009). "Estudio de la variabilidad genética de maíces criollos y su correlación con el contenido y estructura de las zeínas". Tesis de maestría.

- Pralhad, T., Rajendrakumar, K. (2004). "Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **34**: 333–339.
- Quispe-Condori, S., Saldaña, M.D.A., Temelli, F. (2011). "Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying." LWT - Food Science and Technology **44**: 1880-1887.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F. (2006). "Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine **2**: 53–65
- Rodríguez, L.J. (2006). "Sistemas coloidales: Características generales." Departamento de Química física. Universidad de Salamanca.
- Schrooyen, P. M. M., van der Meer, R., De Kruif, C.G. (2001). "Microencapsulation: its application in nutrition." Proceedings of the Nutrition Society **60**: 475 – 479.
- Shahidi, F., Han, X.Q. (1993). "Encapsulation of Food ingredients." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **33**: 501-547.
- Shukla, R., Cheryan, M. (2001). " Zein: the industrial protein from corn." Industrial Crops and Products **13**: 171–192.
- Singh, N., Georget, D.M.R., Belton, P.S., Barker, S.A. (2010). "Physical properties of zein films containing salicylic acid and acetyl salicylic acid." Journal of Cereal Science **52**: 282-287.
- Singh, R., Lillard Jr., J.W. (2009). "Nanoparticle-based targeted drug delivery." Experimental and Molecular Pathology **86**: 215–223
- Sriamornsak, P. (2009). "Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review." 207-227.
- Surh, J., Decker, E.A., McClements, D.J. (2006). " Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions." Food Hydrocolloids **20**: 607–618.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K., Rao, M.A. (1997). "Chemistry and uses of pectin — A review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **37(I)**:47 73.
- Ventureira, J., Martínez, E.N., Añón, M.C. (2010). "Stability of oil: Water emulsions of amaranth proteins. Effect of hydrolysis and pH." Food Hydrocolloids **24**: 551–559.

- Villena, M. J. M., Hernández, M.E.M., Lara, G.V., Martínez, M.A.R. (2009). "Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos." ARS Pharmaceutica **50**: 43-50.
- Wang, H.J., Lin, Z.X., Liu, X.M., Sheng, S.Y., Wang, J.Y. (2005). " Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. " Journal of Controlled Release **105**: 120– 131.
- Wang, Y., Su, C.P., Schulmerich, M., Padua, G.W. (2013). "Characterization of core-shell structures formed by zein." Food Hydrocolloids **30**: 487-494.
- Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D. (2006). "Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel." Trends in Food Science y Technology **17**: 97–104.
- Wu, Y., Luo, Y., Wang, Q. (2012). "Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method." LWT - Food Science and Technology **48**: 283-290.
- Xiao, D., Zhong, Q. (2011). "In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules." Journal of Food Engineering **106**: 65–73.
- Zhong, Q., Ikeda, S. (2012). "Viscoelastic properties of concentrated aqueous ethanol suspensions of  $\alpha$ -zein." Food Hydrocolloids **28**: 46-52.
- Zhong, Q., Jin, M. (2009). "Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion." Food Hydrocolloids **23**: 2380–2387.
- Zhong, Q., Tian, H., Zivanovic, S. (2009). "Encapsulation of fish oil in Solid zein particles by Liquid-Liquid dispersion." Journal of Food Processing and Preservation **33**: 255–270.
- Ziani, K., Fang, Y., McClements, D.J. (2012). "Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: vitamin E, vitamin D, and lemon oil." Food Chemistry **134**: 1106-1112.
- Zou, T., Li, Z., Percival, S.S., Bonard, S., Gu, L. (2012). " Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles." Food Hydrocolloids **27**: 293-300.



## Apéndice

### Preparación de las fases amortiguadoras a diferente pH.

#### **Solución amortiguadora de citrato pH 3, 20 mM.**

1. Pesar 4.202 g de ácido cítrico monohidratado.
2. Disolver el ácido cítrico en 800 mL de agua bidestilada.
3. Ajustar el pH a 3 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
4. Aforar a 1 L.

#### **Solución amortiguadora de acetatos pH 4, 20 mM.**

1. En 200 mL de agua bidestilada medir 4.94 mL de ácido acético glacial.
2. Pesar 1.2714 g de acetato de sodio y disolver en 200 mL de agua bidestilada.
3. Mezclar ambas soluciones y añadir agua bidestilada c.b.p 800 mL.
4. Ajustar el pH con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
5. Aforar a 5 L.

#### **Solución amortiguadora de acetatos pH 5, 20 mM.**

1. En 200 mL de agua bidestilada medir 2.364 mL de ácido acético glacial.
2. Pesar 6.496 g de acetato de sodio y disolver en 200 mL de agua bidestilada.
3. Mezclar ambas soluciones y añadir agua bidestilada c.b.p 800 mL.
4. Ajustar el pH con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
5. Aforar a 6 L.

#### **Solución amortiguadora de fosfatos pH 6, 20 mM.**

1. Pesar 1.4574 g de fosfato de sodio monobásico y 0.3864 g de fosfato de sodio dibásico.
2. Disolver en 800 mL de agua bidestilada.
3. Ajustar el pH a 6 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
4. Aforar a 6 L.

**Solución amortiguadora de fosfatos pH 7, 20 mM.**

1. Pesar 4.5112 g de fosfato de sodio monobásico y 6.7243 g de fosfato de sodio dibásico.
2. Disolver en 800 mL de agua bidestilada.
3. Ajustar el pH a 7 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
4. Aforar a 4 L.

**Solución amortiguadora de fosfatos pH 8, 20 mM.**

1. Pesar 1.43976 g de fosfato de sodio monobásico y 12.4215 g de fosfato de sodio dibásico.
2. Disolver en 800 mL de agua bidestilada.
3. Ajustar el pH a 8 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
4. Aforar a 5 L.

**Solución amortiguadora Tris pH 9, 20 mM.**

1. Pesar 1.9857 g de Tris-HCl y 12.9334 g de Tris base.
2. Disolver en 800 mL de agua bidestilada.
3. Ajustar el pH a 9 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
4. Aforar a 6 L.