RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Platania, Fedra Agustina

Optimización de nanopartículas autoensambladas de proteínas del lactosuero y polisacáridos solubles de soja como sistemas de encapsulación de curcumina

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Balcone, A., Platania, F. A. (202). Optimización de nanopartículas autoensambladas de proteínas del þÿlactosuero y polisacáridos solubles de soja como sistemas de encapsulaciõ *Universidad Nacional de Quilmes. Departamento de Ciencia y Tecnología.Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA) Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4528*

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes

LIFTA
Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos

OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS AUTOENSAMBLADAS DE PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO Y POLISACÁRIDOS SOLUBLES DE SOJA COMO SISTEMA DE ENCAPSULACIÓN DE CURCUMINA

TRABAJO FINAL DE GRADO

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

INGENIERAS EN ALIMENTOS

AGUSTINA BALCONE
Y FEDRA PLATANIA

DIRECTORA: DANIELA EDITH IGARTÚA
CO-DIRECTOR: GONZALO GASTÓN PALAZOLO

BERNAL, 2023

Este trabajo final, para optar al título de Ingenieras en Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes, fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, bajo la dirección de la Dra. Daniela Edith Igartúa y el Dr. Gonzalo Gastón Palazolo.

"Por muy calificados que estemos, por mucho que lo merezcamos, jamás alcanzaremos una vida mejor mientras no podamos imaginarla y nos permitamos alcanzarla."

Richard Bach

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a la Universidad Nacional de Quilmes por brindarnos los recursos para estudiar y realizar el presente trabajo de investigación. Por formarnos tanto a nivel profesional como personal. Por brindarnos sus aulas, laboratorios y patios, por haber sido nuestra segunda casa durante tantos años.

Gracias a los que forman parte del Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA) por recibirnos y brindarnos el espacio para realizar este trabajo.

Un especial agradecimiento a la Dra. Daniela Igartúa por habernos dado la oportunidad de realizar esta investigación y por haber confiado en nosotras desde el primer día. Por brindarnos su tiempo y su dedicación. Por la paciencia y la amabilidad con las que siempre nos trató. Por enseñarnos y aconsejarnos. Por haber musicalizado aquellas mañanas de ensayos y por prestarnos sus colores. Por su aliento tan necesario en el tramo final de nuestra carrera.

Gracias al Dr. Gonzalo Palazolo por su tiempo y dedicación en la codirección de este trabajo y de la beca CIN. Gracias al Dr. Dario Cabezas por su apoyo y compromiso en la codirección de la beca CIN. Gracias a ambos por la oportunidad y los consejos que nos brindaron.

Gracias a los profesores con los que nos cruzamos en este camino, por trasmitirnos sus enseñanzas y por compartirnos sus experiencias. Por brindarnos herramientas y valores para llegar a ser profesionales. Por enseñarnos que lo más importante para ser buen profesional es ser buena persona.

Gracias a nuestros compañeros de la UNQ, con quienes compartimos tantos momentos de aprendizaje, de alegría y también de cansancio. Por el compañerismo y la ayuda mutua.

Agustina y Fedra

Haber llegado hasta acá y ser quien soy se debe a todas las personas que me rodean. Es por eso que escribo estas palabras a modo de agradecimiento, porque sin ellos nada hubiera sido igual.

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mi familia. Gracias a mis papás y a mis hermanos por estar siempre para mí, por escucharme, guiarme, ayudarme y apoyarme en todos los momentos de mi vida. Su compañía y su cariño hicieron que este camino se me haya hecho más fácil. Su contención y su aliento son indispensables para que logre todo lo que me proponga. Gracias por festejar mis logros y por impulsarme en aquellos momentos de mayor dificultad. Sin ustedes nada hubiera sido lo mismo, les agradezco infinitamente.

Gracias a mis abuelos, mis tíos y mis primos por estar siempre presentes y por los domingos de comida, juegos y risas. En especial, gracias abuelo por haberme enseñado tantas cosas y por haber sido un referente para mí y para toda la familia.

Gracias a mi novio por ser mi compañero y por caminar siempre junto a mí. Por enseñarme tantas cosas, por apoyarme en todo momento y por impulsarme a ser mejor cada día. Por alegrar todos los días de mi vida y por tu amor infinito. Gracias por recordarme siempre que "cada quien tiene lo que se merece".

Gracias a mis amigas de toda la vida y a las amigas que me dejó la universidad por acompañarme y por contenerme siempre. Por todo lo que compartimos, por las charlas, los abrazos, las risas y también los llantos.

Gracias a mi compañera de trabajo final, Agustina, por la compañía desde el primer día de cursada hasta el último. Gracias por ayudarme, alentarme y hacer la cursada más divertida y llevadera.

A todos ustedes, ¡gracias! Los quiero con todo mi corazón.

Fedra

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis amigos y familiares por su apoyo incondicional y aliento durante mi camino hacia la finalización de esta tesis. Su presencia fue fundamental en cada etapa de este proceso y me siento verdaderamente afortunada de tenerlos a mi lado.

A mis papás, quienes han sido mi fuente constante de amor, motivación y guía a lo largo de toda mi vida, les agradezco de corazón. Su dedicación y sacrificio fueron los pilares que me permitieron llegar hasta el día de hoy. A mi hermana, gracias por ser mi compañera y por compartir conmigo tanto momentos de alegría como de dificultad.

A mis amigos, que estuvieron a mi lado en los altibajos de la vida, les agradezco por su amistad sincera y lealtad. Gracias por escucharme, por brindarme consejos valiosos y por celebrar mis logros como si fueran propios.

Quiero expresar un agradecimiento especial a mi novio, Joaquín por ser una fuente de apoyo incondicional durante este desafiante proceso de finalización de mi tesis. Gracias por entender y respetar mis compromisos académicos, por estar a mi lado durante las largas horas de estudio y por brindarme tu paciencia y comprensión cuando mi atención estaba enfocada en esta tarea.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi compañera de trabajo final, Fedra, por su colaboración y dedicación durante todo este proceso. Trabajar juntas fue una hermosa experiencia, superamos muchos desafíos y en este día estamos alcanzando nuestro objetivo. Tu compromiso, conocimientos y apoyo fueron la clave para el éxito de este trabajo. Gracias por ser mi compañera durante toda la carrera, y por nunca dejarme bajar los brazos.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos aquellos que, de una forma u otra, me brindaron su apoyo durante este viaje.

A todos ustedes ¡Gracias!

Agustina

PUBLICACIONES Y ACTIVIDADES

Publicaciones en revistas científicas

Parte de los resultados de este trabajo se han publicado en el siguiente artículo científico:

*Impact of heat treatment in whey proteins-soluble soybean polysaccharides electrostatic complexes in different pH and biopolymer mass ratio condition*s. Igartúa, D. E., Platania, F. A., Balcone, A., Palazolo, G. G., & Cabezas, D. M. (2022). Applied Food Research, 2(2), 100184. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100184

Presentaciones a reuniones científicas

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en las siguientes reuniones científicas:

Encapsulación de curcumina mediada por nanopartículas y su empleo en alimentos. Platania FA; Balcone A; Cabezas DM; Palazolo GG; Igartúa DE. IV Jornadas de Investigadores en Formación en Ciencia y Tecnología (JIF). 25 al 27 de marzo de 2021. Quilmes, Buenos Aires, Argentina. ISSN 2718-8663.

Potencialidad de los complejos proteínas-polisacáridos de uso alimentario. Balcone A; Platania FA; Cabezas DM; Palazolo GG; Igartúa DE. IV Jornadas de Investigadores en Formación en Ciencia y Tecnología (JIF). 25 al 27 de marzo de 2021. Quilmes, Buenos Aires, Argentina. ISSN 2718-8663.

Nanocomplejos de proteínas aisladas del lactosuero y polisacáridos solubles de soja obtenidos por autoensamblaje electrostático e implementados para la incorporación de curcumina en alimentos. Balcone A; Platania FA; Palazolo GG; Cabezas DM; Igartúa DE. XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados - Nano 2022. 9 al 11 de agosto de 2022. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Optimización de la formación de complejos electrostáticos entre proteínas aisladas dearvejas y polisacáridos solubles de soja. Platania FA; Balcone A; Palazolo GG; CabezasDM; Igartúa DE. VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2022). 4 al 6 de octubre de 2022. Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Otras actividades

Además, durante la pasantía de investigación en el Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de los Alimentos, se ha colaborado en la obtención y caracterización de partículas autoensambladas a partir de proteínas aisladas de arvejas y polisacáridos solubles de soja. El artículo científico relacionado con dichos experimentos se encuentra en proceso de revisión en una revista internacional del área de alimentos:

Pea protein isolate - soluble soybean polysaccharides electrostatic assembly: Effect of pH, biopolymer mass ratio, and heat treatment. Igartúa, D. E., Balcone, A., Platania, F. A., Cabezas, D. M., & Palazolo, G. G.

Adicionalmente, ambas postulantes se desempeñaron como auxiliares académicas alumnas del área Ciencias Básicas de los Alimentos.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS 5
PUBLICACIONES Y ACTIVIDADES 9
Publicaciones en revistas científicas 9
Presentaciones a reuniones científicas 9
Otras actividades 10
ÍNDICE 11
RESUMEN 15
ABREVIATURAS 17
1. INTRODUCCIÓN 19
1.1 Proteínas aisladas del lactosuero (WPI) 19
1.1.1 Fuente de obtención: Suero lácteo 19
1.1.2 Técnicas de obtención de WPI a partir del suero lácteo 20
1.1.3 Composición de WPI 21
1.1.4 Usos y aplicaciones del WPI 24
1.2 Polisacáridos solubles de soja (SSPS) 26
1.2.1 Fuente de obtención: poroto de soja 26
1.2.2 Composición de los SSPS 27
1.2.3 Propiedades funcionales de los SSPS 28
1.3 Complejos proteínas-polisacáridos 29
1.3.1 Introducción 29
1.3.2 Interacción proteínas-polisacáridos 30
1.3.3 Obtención de nanopartículas de proteínas-polisacáridos 33
1.3.4 Factores que condicionan el ensamble electrostático de proteínas y polisacáridos 35
1.3.5 Potenciales aplicaciones de complejos proteínas-polisacáridos en sistemas alimentarios 40

1.3.6 Antecedentes en la obtención de complejos WPI-SSPS 46

1.4 Curcumina (CUR) 47

2. OBJETIVOS 49

3. MATERIALES Y MÉTODOS 51

3.1 Materiales 51

3.2 Optimización de las condiciones de pH y relación proteínas:polisacáridos para asegurar la interacción de WPI y SSPS y obtener NPs 51

3.2.1 Dispersiones de WPI y SSPS 51

3.2.2 Preparación de las mezclas WPI-SSPS 51

3.2.3 Caracterización de las mezclas WPI-SSPS 52

3.3 Determinación de los efectos del pH, la relación másica WPI:SSPS y el tratamiento térmico en las características de las NPs obtenidas 57

3.3.1 Preparación de las NPs WPI-SSPS 57

3.3.2 Caracterización de las NPs WPI-SSPS 57

3.4 Encapsulación y estabilización de CUR en las NPs de WPI-SSPS 64

3.4.1 Cuantificación de la CUR 64

3.4.2 Preparación de las NPs WPI-SSPS 65

3.4.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de CUR en NPs 66

3.4.4 Caracterización de las NPs-CUR 66

3.4.5 Determinación de la estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas 67

3.4.6 Determinación de la estabilidad frente al proceso de pasteurización 67

3.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico 67

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69

4.1 Optimización de las condiciones de pH y relación proteína:polisacárido para asegurar la interacción de WPI y SSPS y obtener NPs 69

4.1.1 Potencial ζ 69

4.1.2 Turbidimetría 71

4.1.3 Diagrama de fases 73

4.1.4 Selección de condiciones para obtención de NPs WPI-SSPS 78

4.2 Determinación de los efectos del pH, la relación másica WPI:SSPS y el tratamiento térmico en las características de las nanopartículas obtenidas 79

4.2.1 Potencial ζ 79

4.2.2 Tamaño de partícula 83

4.2.3 Hidrofobicidad aromática superficial 88

4.2.4 Estabilidad física en el tiempo 90

4.2.5 Selección de la condición óptima para la obtención de NPs 105

4.3 Encapsulación y estabilización de CUR en las NPs de WPI-SSPS 106

4.3.1 Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de CUR en NPs 106

4.3.2 Caracterización de las NPs-CUR 107

4.3.3 Determinación de la estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas 108

4.3.4 Determinación de la estabilidad frente al proceso de pasteurización 111

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 113

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117

RESUMEN

En los últimos años, la interacción entre proteínas y polisacáridos y la formación de complejos electrostáticos entre dichos biopolímeros han ganado especial atención en la industria alimentaria debido a sus múltiples aplicaciones en las matrices alimentarias. En este sentido, se ha demostrado que los complejos proteínas-polisacáridos presentan propiedades tecnofuncionales mejoradas respecto a la de cada biopolímero por separado.

Actualmente, la industria alimentaria busca enriquecer a los alimentos en compuestos bioactivos tales como polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados y vitaminas, generando así alimentos funcionales. Sin embargo, estos compuestos bioactivos suelen tener limitaciones sobre su aplicación en productos alimentarios. Estas limitaciones se deben a su baja solubilidad en matrices acuosas, su sensibilidad a las condiciones de procesado y de almacenamiento de los alimentos y su baja biodisponibilidad a nivel gastrointestinal. Frente a estas barreras tecnológicas, la encapsulación en nanopartículas de proteínas y polisacáridos es una alternativa adecuada para solubilizar, estabilizar e incrementar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos hidrófobos.

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se ha propuesto como objetivo general desarrollar nanopartículas autoensambladas de proteínas aisladas del lactosuero (WPI) y polisacáridos solubles de soja (SSPS), capaces de encapsular y estabilizar compuestos bioactivos hidrofóbicos, como la curcumina (CUR).

En primer lugar, se han estudiado diferentes condiciones de pH (2,0 a 7,0) y relaciones másicas WPI:SSPS (1:1 a 1:0,10) con el fin de seleccionar las condiciones óptimas que aseguren la interacción entre WPI y SSPS y la obtención de nanopartículas autoensambladas. A partir de este estudio, se han seleccionado las condiciones de pH 3,0, 3,5 y 4,0 y las relaciones WPI:SSPS 1:0,50, 1:0,25 y 1:0,17.

En segundo lugar, se ha estudiado el efecto de un tratamiento térmico (90 °C, 20 min) en las características de los complejos WPI-SSPS obtenidos en las condiciones seleccionadas. Como resultado, se obtuvo que el tratamiento térmico incrementó levemente el tamaño de partícula, pero manteniéndolo en un rango nanométrico. Además, dicho tratamiento incrementó la hidrofobicidad superficial y la estabilidad física durante el almacenamiento. A partir de este análisis, los nanocomplejos autoensamblados WPI-SSPS con menor tamaño de partícula (126,1 ± 0,5 nm), potencial ζ cercano a la neutralidad (-1,26 ± 0,15 mV), mayor hidrofobicidad superficial y mayor estabilidad física se obtuvieron luego del tratamiento térmico en condiciones de pH 3,5 y relación WPI:SSPS 1:0,50.

Por último, se ha estudiado la capacidad de estos nanocomplejos WPI-SSPS optimizados para encapsular CUR. Como resultado, se obtuvo una eficiencia de encapsulación del 83 ± 3 % y una capacidad de carga de 5,5 ± 0,2 µg CUR/mg complejo. El tamaño de partícula y el potencial ζ de los nanocomplejos WPI-SSPS-CUR no presentaron cambios significativos respecto a los nanocomplejos WPI-SSPS sin el compuesto bioactivo, infiriendo que la estabilidad física tampoco se vería modificada. A su vez, se demostró que los nanocomplejos incrementaron la estabilidad química de la CUR en condiciones normalmente utilizadas para el procesamiento (pasteurización) y almacenamiento de alimentos (4 y 25 °C) comparado con el control de CUR sin encapsular.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los complejos WPI-SSPS podrían ser implementados en matrices alimentarias ácidas (como bebidas, salsas o aderezos) debido a su elevada estabilidad coloidal en medios ácidos, con diferentes potencialidades. Particularmente, según nuestros resultados, es la primera vez que se demuestra que las nanopartículas de WPI-SSPS se podrían implementar como sistemas para encapsular e incrementar la estabilidad de CUR.

ABREVIATURAS

ANS: 1-anilinonaftaleno-8-sulfonato

BS: *Backscattering* (retrodispersión)

CMC: Carboximetil celulosa

Col.: Colaboradores/as

CUR: Curcumina

DLS: *Dynamic Light Scattering* (dispersión de luz dinámica)

DTP: Distribución de tamaño de partícula

EE: Eficiencia de encapsulación

GMP: Glicomacropéptido

H_0: Hidrofobicidad aromática superficial

HMP: *High methoxyl pectin* (pectina de alto metoxilo)

Ig: Inmunoglobulinas

LC: *Loading capacity* (capacidad de carga)

LDV: *Laser Doppler velocimetry* (velocimetría láser por efecto Doppler)

LMP: *Low methoxyl pectin* (pectina de bajo metoxilo)

NPs: Nanopartículas

PDI: *Polidispersity index* (índice de polidispersidad)

pI: Punto isoeléctrico

PPI: *Pea protein isolate (*proteínas aisladas de arveja).

PRODAN: *N*,*N*-Dimetil-6-propionil-2-naftilamina

SPI: *Soy protein isolate* (proteínas aisladas de soja)

SSPS: *Soluble soybean polysaccharides* (polisacáridos solubles de soja)

T: Transmitancia

TSI: *Turbiscan stability index* (índice de estabilidad de Turbiscan)

WPC: *Whey protein concentrate* (concentrado de proteínas del lactosuero)

WPI: *Whey protein isolate* (aislado de proteínas del lactosuero o proteínas aisladas del lactosuero)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas aisladas del lactosuero (WPI)

1.1.1 Fuente de obtención: Suero lácteo

El suero lácteo se define como un producto lácteo obtenido de la separación del coágulo de la leche, de la crema o de la leche semidescremada durante la fabricación del queso. Este último, se puede obtener mediante la acción de ácidos (agregados o producidos por fermentación) y/o de enzimas (cuajo), los cuales rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones:

- Una fracción sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles (caseínas), las cuales, en su proceso de precipitación, arrastran los glóbulos grasos y atrapan minoritariamente algunos de los constituyentes hidrosolubles.
- Una fracción líquida, correspondiente al lactosuero, donde se encuentran en suspensión todos los otros componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la caseína.

El suero, en consecuencia, no constituye un sustituto integral de la leche de vaca debido a que se trata de una fracción de la misma. Sin embargo, contiene nutrientes y compuestos con potenciales beneficios nutricionales y de salud que se aprovechan en algunos países para la fabricación de productos alimenticios y suplementos, o como materia prima para la producción de otros ingredientes y compuestos.

Sin embargo, a pesar del valor nutricional potencial del suero lácteo y del aumento en su aprovechamiento para la producción de otros alimentos, gran parte del mismo es aún descartado, causando problemas de contaminación en ríos y suelos (Iosca y col., 2023).

La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, del tipo de queso producido y del proceso de tecnología empleado en la elaboración del queso. A partir de estas diferencias se encuentran dos tipos fundamentales de lactosuero:

1. Suero dulce: lactosuero que se separa del queso obtenido por acción enzimática.

2. Suero ácido: lactosuero que se separa del queso obtenido por acción de ácidos.

El suero dulce suele contener más lactosa que el suero ácido, mientras que éste último suele tener una mayor concentración de proteínas (Poveda, 2013).

1.1.2 Técnicas de obtención de WPI a partir del suero lácteo

En las dos últimas décadas, la evolución en las técnicas de separación con membranas selectivas ha permitido que numerosos componentes de la leche y del suero lácteo sean obtenidos (por separación) y, posteriormente, utilizados en la industria de los alimentos, como se puede observar en la Figura 1.1.

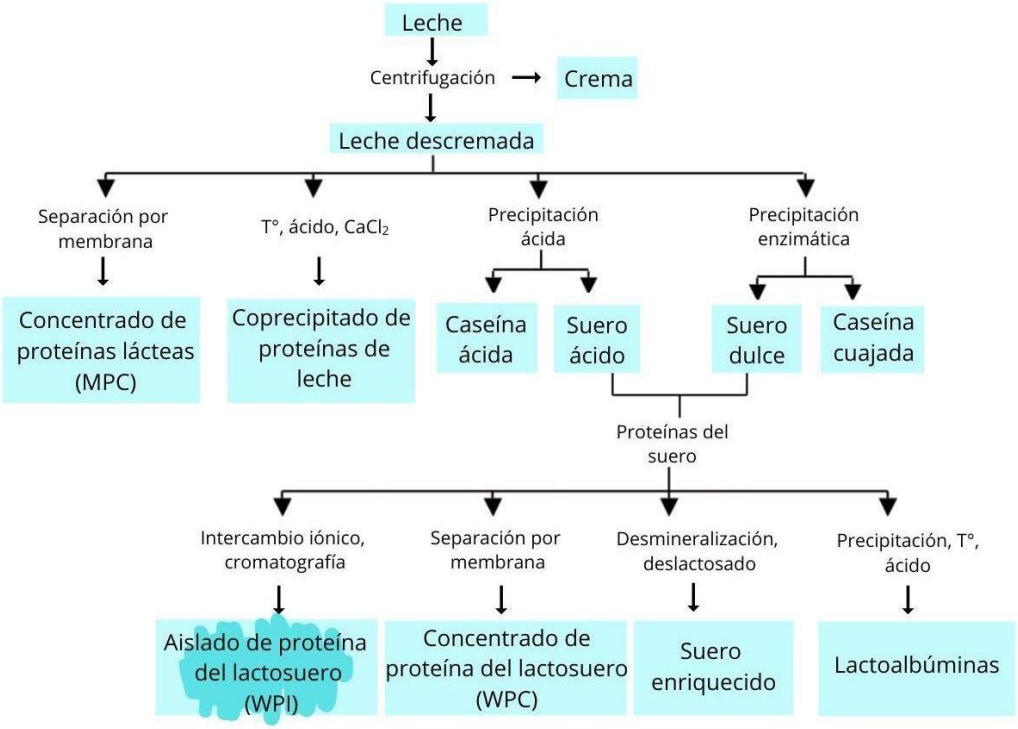

Figura 1.1 - Diagrama de obtención de los diferentes subproductos lácteos. Fuente: adaptada de: https://www.heladeria.com/articulos-heladeria/a/200902/3049-la-proteina-componente-funcional-la-leche

El lactosuero puede ser sometido a numerosos tratamientos, originando así productos con perfiles específicos tanto cualitativos como cuantitativos de proteínas, minerales, lípidos y azúcares.

Las técnicas de separación de membrana, incluida la ultrafiltración para la concentración de proteínas y la diafiltración para remover mayormente lactosa, minerales y componentes de bajo peso molecular, se utilizan para obtener concentrados de proteínas del lactosuero (WPC). Dependiendo de la metodología de separación utilizada, existen WPC que contienen diferentes concentraciones de proteína. Únicamente cuando se supera el 85 % m/m

de proteína, se puede decir que se obtuvo un aislado de proteínas del lactosuero (WPI), que se define como un concentrado de proteínas que se destaca por su elevada calidad y pureza (Madureira y col., 2007). Para su obtención se requiere del empleo de métodos de separación más sofisticados como lo son la cromatografía o el intercambio iónico.

1.1.3 Composición de WPI

El WPI es un ingrediente de gran valor agregado que contiene más de un 85 % m/m de proteínas, cuya composición y cantidad individual de cada tipo de proteína depende de la técnica de fraccionamiento empleada para su obtención. La composición aproximada de WPI y sus propiedades se detallan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 - Composición de WPI. Fuentes: Wagoner y Foegeding (2017); Boland (2011).

Tipo de proteína	Porcentaje del total (%)	Peso molecular (kDa)	Número de aminoácidos	Punto isoeléctrico (pI)
β-Lactoglobulina	50	18,3	162	5,4
α-Lactoalbúmina	15	14,2	123	4,4
Glicomacropéptido	20	6,7	63	<3,8
Seroalbúmina bovina	Cantidades traza	65,0	583	5,5
Inmunoglobulinas		~ 180	-	5,1-8,3
Lactoferrina		80,0	692	9,0

La β-lactoglobulina (Figura 1.2) es una proteína de estructura globular de la familia de las lipocalinas. Su peso molecular es de 18,3 kDa y se comprende de 162 residuos aminoacídicos. En la Figura 1.2 se puede observar la estructura típica de la β- lactoglobulina, la cual contiene las siguientes cantidades de residuos aminoacídicos esenciales de cadena ramificada: 22 de leucina, 10 de isoleucina y 9 de valina. Este hecho la convierte en una de las fuentes alimenticias más ricas en estos aminoácidos, los cuales, además, le otorgan ciertas zonas fuertemente hidrofóbicas. Las cavidades formadas en la proteína pueden actuar de sitios de unión para componentes de bajo peso molecular, incluyendo ácidos grasos, retinol y otros compuestos hidrofóbicos (Boland, 2011). La estructura cuaternaria de la proteína varía entre monómeros, dímeros u oligómeros dependiendo del pH, la temperatura y

la fuerza iónica del medio (Edwards y Jameson, 2014). Su estructura se encuentra estabilizada por puentes disulfuro, lo que significa que puede desdoblarse ante un tratamiento térmico y volver a plegarse nuevamente en una estructura similar a su forma nativa (Boland, 2011). Por lo tanto, es susceptible a cambios morfológicos al aplicar un tratamiento térmico.

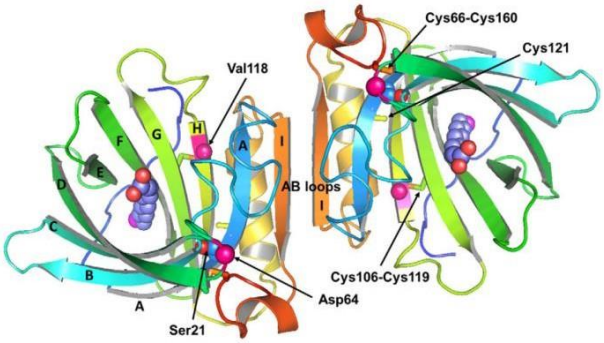

Figura 1.2 - Representación estructural de β-lactoglobulina. Fuente: Edwards y Jameson (2014).

La α-lactoalbúmina (Figura 1.3) es una proteína pequeña de un peso molecular de 14,2 kDa, que forma parte del complejo enzimático lactosa sintasa, la cual se encuentra presente en todos los tipos de leche. Se ha descubierto que la cantidad de lactosa en la leche está directamente relacionada con la concentración de esta proteína (Arroyo Castellón y Jiménez Farak, 2013). Su estructura también se encuentra estabilizada por puentes disulfuro. En presencia de otras proteínas reactivas, como la β-lactoglobulina, estas pueden formar enlaces entre sí, convirtiéndose en estructuras inestables (Boland, 2011).

La α-lactoalbúmina tiene una estructura global compacta con cuatro disulfuros y se desnaturaliza a 63 °C, pero puede retornar a su estado nativo con el enfriamiento. Es insoluble a pH entre 4,0 y 5,5 y, a un pH fuera de ese rango, la molécula sufre modificaciones de configuración, rápidas o lentas, reversibles o no, que conducen a diversas formas polimerizadas (Arroyo Castellón y Jiménez Farak, 2013). A diferencia de la β-lactoglobulina, la α-lactoalbúmina no tiene tioles libres. Un ion de calcio puede unirse con una disociación sub-micromolar constante en la zona denominada “codo de unión”, formada por los residuos 79 al 88, localizados entre medio de ambos lóbulos, con el ion coordinado en una configuración de bipirámide pentagonal (Edwards y Jameson, 2014).

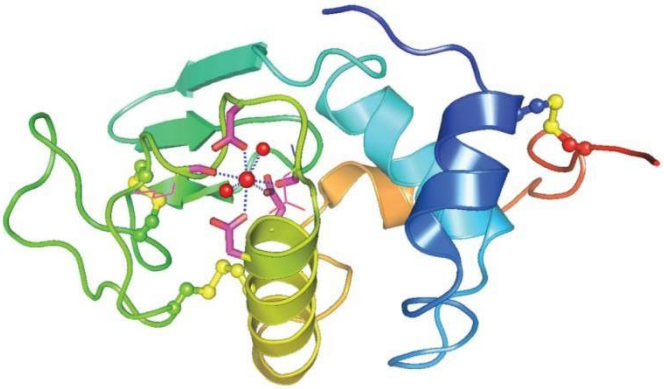

Figura 1.3 - Representación estructural de α-lactoglobulina. Fuente: Edwards y Jameson (2014).

La seroalbúmina bovina (Figura 1.4) se encuentra en la leche y en el suero en cantidades variables. Esto ocurre debido a una pérdida de la proteína desde el suero sanguíneo hacia la leche en las uniones estrechas de las células de la glándula mamaria. La cantidad de seroalbúmina depende también de la salud del animal, particularmente de la de la glándula mamaria. Sin embargo, sus niveles suelen ser bajos, por lo que se la considera como un componente minoritario en el suero lácteo. Presenta elevado peso molecular, con 580 residuos aminoacídicos, con un gran número de puentes disulfuro (diecisiete en total). Por consiguiente, la misma puede reaccionar con la β-lactoglobulina y es capaz de unirse a diversos compuestos de bajo peso molecular (Boland, 2011).

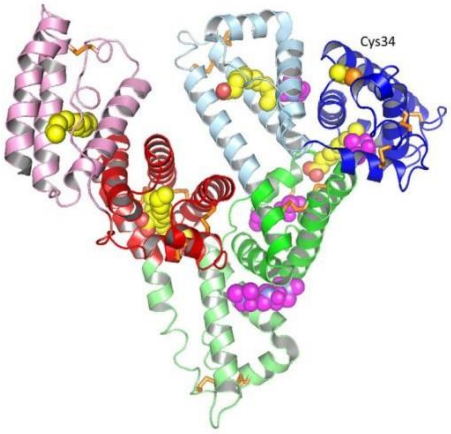

Figura 1.4 - Representación estructural de la seroalbúmina humana. Fuente: Edwards y Jameson (2014).

Las inmunoglobulinas (Ig) en la leche vacuna son una mezcla de inmunoglobulinas de la sangre e inmunoglobulinas de la glándula mamaria. Los niveles de Ig pueden variar dependiendo de la salud del animal y de la estación del año. Los niveles de Ig son muy elevados en el calostro. Luego de dar a luz, el nivel de las mismas disminuye con los días. Las Ig tienen la estructura típica característica, comprendiendo dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, cada unión de a pares pesada-ligera se unen mediante puentes disulfuro.

Son proteínas globulares termolábiles. Esto no representa un problema cuando el porcentaje de Ig es bajo, pero en casos donde represente un elevado porcentaje del total (por ejemplo, el calostro post parto) puede traer problemas tecnológicos. Es este el motivo por el cual, para aplicaciones que requieran de Ig biológicamente activas, se deben realizar procesos a bajas temperaturas (Boland, 2011). La Ig G constituye del 80 al 85 % de todas las Ig del calostro bovino y su función es identificar y ayudar a destruir agentes patógenos que causan enfermedades (Silva, 2013).

La lactoferrina pertenece a la familia de las transferrinas y consiste en una cadena polipeptídica de 692 residuos aminoacídicos. Esta proteína es capaz de retener hierro a pH menores a 3,0. Este hecho no solo la convierte en una proteína con un elevado poder bacteriostático, sino que también en una macromolécula con elevado poder antioxidante. La lactoferrina es considerada una proteína de vital importancia debido a sus propiedades antibacterianas. Además, se ha descubierto que estimula el proceso del crecimiento óseo (Legrand y col., 2005).

Finalmente, el glicomacropéptido (GMP) se define como la parte "pilosa" que rodea la superficie de la micela de caseína. Representa el dominio polar de la κ-caseína, contribuyendo a la estabilización coloidal de la micela (Damodaran y Parkin, 2017). En la obtención de quesos, cuando la κ-caseína es tratada con la quimosina, esta es hidrolizada entre los aminoácidos 105 y 106 (fenilalanina y metionina, respectivamente), dando como resultado dos fracciones: para-κ-caseína (residuos 1-105) y GMP (residuos 106 – 169) (García y Mayorga, 2015). Por lo tanto, el GMP es un péptido formado por 63 aminoácidos,el cual posee actividad biológica ya que inhibe la agregación de plaquetas, es anticarcinógeno e inmunomodulador (Damodaran y Parkin, 2017). El GMP solo se encuentra presente en el suero dulce, dado que es producto de la acción enzimática requerida para la preparación de ciertos quesos.

1.1.4 Usos y aplicaciones del WPI

El WPI tiene numerosas propiedades tanto nutricionales como funcionales. En este sentido, gracias a las proteínas que lo componen, es capaz de interaccionar y "atrapar" compuestos hidrofóbicos eficientemente. Asimismo, sus proteínas son digeribles, tienen alto valor biológico y suelen ser asimiladas sin inconvenientes por el sistema digestivo humano (Abassi y col., 2014).

En cuanto a las propiedades nutricionales, WPI tiene las siguientes aplicaciones:

- Para aplicaciones especializadas dentro del campo de la nutrición, particularmente en formulaciones para la nutrición enteral infantil debido a su elevado contenido de aminoácidos esenciales (Boland, 2011).

- Para nutrición deportiva, debido a los elevados niveles de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) que son metabolizados preferentemente por el músculo. Además, se ha demostrado que activan enzimas clave involucradas en la síntesis proteica de los músculos. También, se ha reportado que este tipo de aminoácidos conduce a la acumulación de proteína muscular en la población anciana (Boland, 2011).

- Para conciliar el sueño, dado que el WPI se relaciona con la absorción de triptófano en el cerebro. Este aminoácido es un precursor de la serotonina y su absorción se considera clave para un sueño conciliador y disminuir los niveles de fatiga.

- Para generar sensación de saciedad. En comparación con los carbohidratos, la ingestión de WPI ha demostrado reducir la subsecuente incorporación de glucosa, sacarosa y maltodextrina. Se ha demostrado que el consumo de proteínas de suero lácteo también produce una mayor reducción en la ingesta de alimentos y un aumento de saciedad en comparación con las caseínas, la albúmina de huevo y las proteínas de soja. El mecanismo implicado en el efecto del WPI sobre la saciedad es mediado a través de sus aminoácidos constituyentes, y no por la totalidad de las proteínas o péptidos bioactivos liberados durante la digestión o alguna combinación de los mismos (Chungchunlam, 2016) . Esta aplicación requiere que el WPI sea totalmente soluble en agua en un medio ácido y está vinculada a la creciente demanda de "productos saciadores" debido al problema global de la obesidad (Boland, 2011).

En cuanto a las propiedades funcionales, WPI puede ser utilizado en la industria de alimentos:

- Para estabilizar interfases, ya que las proteínas del aislado presentan buenas propiedades emulsificantes y espumantes gracias a su capacidad de asociarse y desplegarse en las interfases aceite-agua o aire-agua, formando capas viscoelásticas (Davis y Foegeding, 2007). De acuerdo con Schröder y col. (2017), el WPI es capaz de formar emulsiones más finas a bajas concentraciones en comparación con el hidrolizado de suero. Además, en la interfase aceite en agua (o/w) se obtuvieron capas mucho más fuertes y con mayor cobertura de superficie en comparación al hidrolizado. Estudios realizados por Goff, Kinsella y Jordan (1989) sobre la estabilización de emulsiones base de cremas heladas develan que la utilización de WPI para este fin contribuye en la disminución de la tensión interfacial y el aumento

de la viscosidad, así como también el aumento de la sequedad ante el congelamiento, contribuyendo al mismo tiempo con las características organolépticas del producto congelado.

- Para obtención de geles e hidrogeles, debido a que las proteínas constituyentes presentan la capacidad de interaccionar entre ellas y con las moléculas de agua. Estos geles se obtienen a concentraciones cercanas al 10 % m/m y se estabilizan luego de la aplicación de tratamientos térmicos (Fitzsimons y col., 2007; Ju, 1998;Hansen y col., 2020).

Para la mayoría de las aplicaciones mencionadas, se requiere que el WPI sea completamente soluble en la fase acuosa dentro del alimento o bebida en el cual se lo incorpora. Estudios sobre la solubilidad proteica del WPI han develado que esta tiene una estrecha dependencia con el pH y con otros componentes en solución, particularmente especies iónicas (LaClair y Etzel, 2010), además de con los tratamientos térmicos.

Debido a los beneficios que trae a la salud el consumo de WPI, una categoría de elevado interés en la industria alimentaria son las bebidas proteicas, ya sea como sustituto de alimentos o como bebidas deportivas. Las mismas requieren de un tratamiento térmico para garantizar su seguridad y vida de anaquel. El inconveniente funcional de WPI es que es intolerante a los tratamientos térmicos, particularmente a un pH cercano a su punto isoeléctrico (pI), donde ocurre su precipitación, separación de fases y/o gelación (Wagoner y Foegeding, 2017).

1.2 Polisacáridos solubles de soja (SSPS)

1.2.1 Fuente de obtención: poroto de soja

Los polisacáridos solubles de soja (SSPS) derivan del cotiledón dentro de la semilla de soja de la variante *Glycine max* Merrill. Específicamente, los SSPS son extraídos del *okara*, que es el material insoluble resultante de la manufactura del aislado de proteínas de soja (SPI), al calentar en condiciones de medio levemente ácido. La técnica de extracción patentada es muy eficiente para obtener diferentes variantes de SSPS, las cuales difieren en sus propiedades físicas y funcionales, tales como capacidad de emulsificación o de estabilización de proteínas. A la extracción le sigue un proceso de refinamiento, pasteurización y secado por *spray*, tal como se muestra en la Figura 1.5 (Yoshii y col., 1996; Furuta y col., 1998; Morita, 1965).

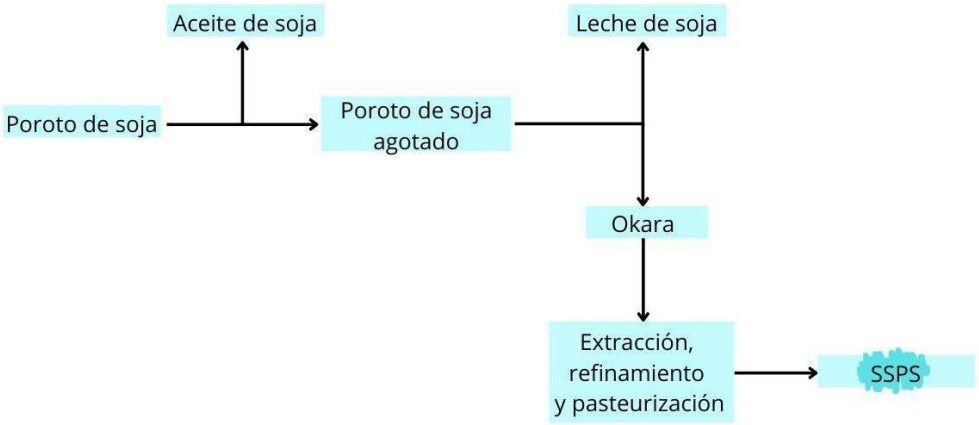

Figura 1.5 - Diagrama de obtención de los SSPS. Fuente: adaptada de Maeda y Nakamura (2009).

1.2.2 Composición de los SSPS

Los SSPS están compuestos por una cadena central de ramnogalacturonano y ramificaciones de β−1,4-galactano y α−1,3 o α−1,5-arabinano (Figura 1.6). Además, las cadenas de los polisacáridos están asociadas a fracciones proteicas que contribuyen a la capacidad de formar complejos con proteínas (Nakamura y col., 2004). Los tres componentes mayoritarios presentan pesos moleculares de 550 kDa, 25 kDa y 5 kDa, respectivamente, y su peso molecular promedio se estima en varios cientos de kDa (Maeday Nakamura, 2009).

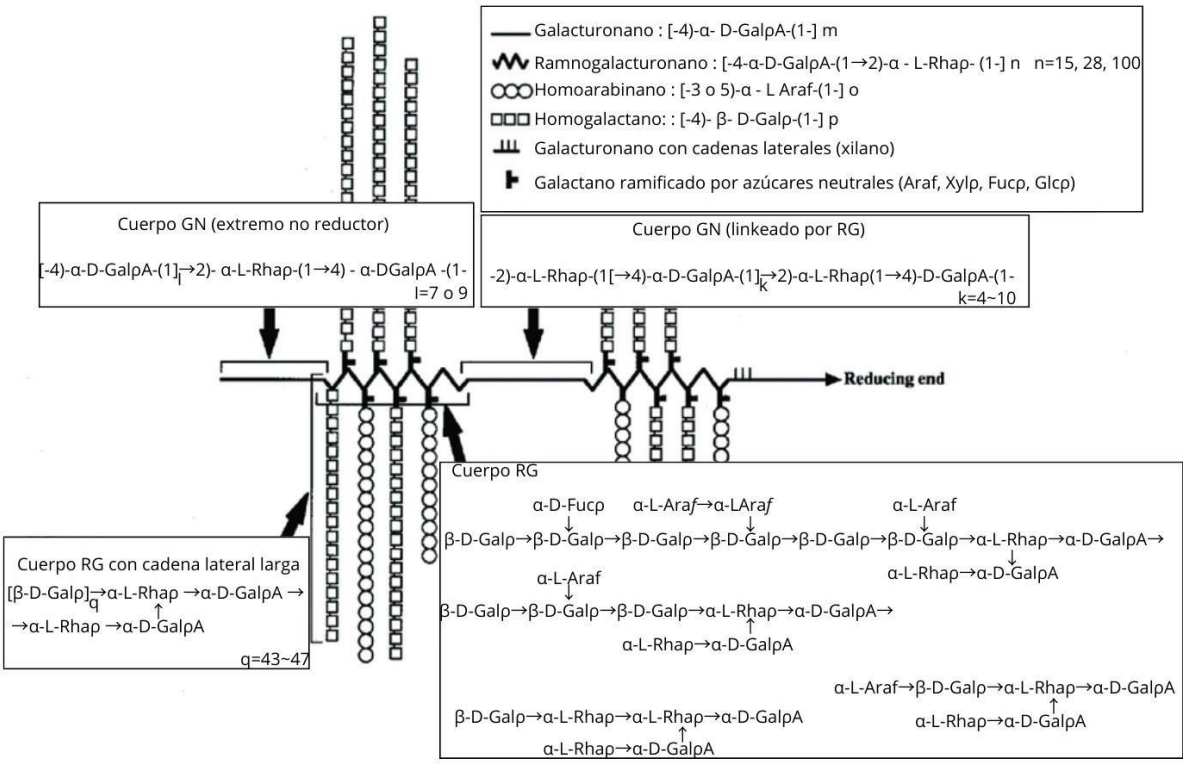

Figura 1.6 - Representación de la estructura química de los SSPS. Fuente: adaptada de Lan y col. (2019).

1.2.3 Propiedades funcionales de los SSPS

Los SSPS son parte de la fibra dietaria del poroto de soja y presentan relativamente baja viscosidad y alta estabilidad en soluciones acuosas. Además, los SSPS presentan varias funcionalidades, tales como ser agente dispersante, estabilizante y emulsificante y presentan propiedades adhesivas (Kawamura y col., 1955; Liu, Hettiarachchy y Kalapathy, 1997).

Nakamura y col. (2004) estudiaron las propiedades emulsificantes de los SSPS obtenidos por distintos métodos de extracción, demostrando que las mismas no fueron afectadas por cambios en el pH ni en la fuerza iónica del medio. Además, las propiedades emulsificantes de los SSPS fueron similares a los de la goma arábiga en emulsiones ácidas, concentradas y diluidas. Sin embargo, se requieren menores cantidades de los SSPS para estabilizar emulsiones ácidas en comparación con la goma arábiga y el almidón modificado. Por otro lado, las características moleculares de los SSPS parecen ser la causa del espesor de la capa de SSPS que se absorbe en la interfase aceite-agua. Finalmente, el tratamiento de SSPS con hemicelulasas y pectinasas da lugar a la disminución del tamaño de partícula de las emulsiones aceite en agua, seguido de un proceso de agregación. Este resultado indica que las porciones hidrofílicas de SSPS juegan un rol importante en la estabilización de las

emulsiones, al prevenir la agregación por repulsión estérica.

Por otro lado, Wang y col. (2020) evaluaron el efecto de la adición de SSPS en emulsiones preparadas con SPI durante la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Los resultados de este estudio han demostrado que la característica de fibra dietaria de los SSPS hace que aumente la estabilidad de los sistemas dispersos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* (Wang y col., 2020).

Debido a su estructura, SSPS no presenta propiedades gelificantes, aunque forma soluciones acuosas de baja viscosidad, en comparación a otras gomas o estabilizantes. Por ello, permite obtener soluciones acuosas con una alta concentración (mayor al 30 %). Además, la viscosidad de las soluciones acuosas de SSPS no son significativamente afectadas por la aplicación de calor o por el agregado de ácidos o sales. Estas propiedades físicas son consecuencia de la estructura globular de los SSPS en las soluciones acuosas (Furuta y Maeda, 1999).

Finalmente, otra propiedad funcional de los SSPS es su capacidad de estabilización de partículas proteicas bajo condiciones ácidas. En este sentido, los SSPS previenen la agregación de las proteínas y, en consecuencia, su sedimentación. A diferencia de otros polisacáridos utilizados para tal efecto, los SSPS son capaces de estabilizar las partículas proteicas a pH bajos, sin incrementar la viscosidad. Posiblemente, el mecanismo de estabilización consiste en la interacción de los grupos aniónicos de la cadena principal del SSPS (ya que contiene un 20 % de ácido galacturónico) con la superficie de las partículas proteicas catiónicas. De esta forma, la capa que forma el SSPS previene la agregación de las proteínas por repulsión estérica (Nakamura y col., 2003; Nakamura y col., 2006).

1.3 Complejos proteínas-polisacáridos

1.3.1 Introducción

En los últimos años, la interacción entre proteínas y polisacáridos y la formación de complejos electrostáticos entre dichos biopolímeros han ganado especial atención en la industria alimentaria debido a sus múltiples aplicaciones en las matrices alimentarias. Específicamente, los complejos proteínas-polisacáridos permiten la construcción de sistemas alimentarios económicamente viables, con alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además, dichos complejos aportan nuevas funcionalidades tales como la encapsulación y *delivery* de compuestos bioactivos, reemplazo de grasas, estabilización de emulsiones y espumas, formación de films comestibles y mejora en la textura de alimentos (Li y col., 2022). Hasta el

momento, diferentes sistemas proteínas-polisacáridos han sido sometidos a estudio, pero las mezclas que utilizan WPI han resultado ser las más atractivas debido a su elevado valor nutricional, propiedades funcionales y por su bajo costo (Du y col., 2022).

1.3.2 Interacción proteínas-polisacáridos

Cuando las proteínas y los polisacáridos se mezclan en un medio acuoso, pueden generarse distintos tipos de sistemas dependiendo de las características intrínsecas de los biopolímeros seleccionados y de las condiciones a la cual se combinan (relación másica,pH, fuerza iónica, adición de tratamientos térmicos o mecánicos, entre otros). En la Figura 1.7 se modelizan las diferentes posibilidades de interacción entre proteínas y polisacáridos. Si los biopolímeros son incompatibles, puede ocurrir la co-solubilidad o la segregación de fases. Por el contrario, si los polímeros son compatibles, puede ocurrir la formación de complejos solubles o insolubles.

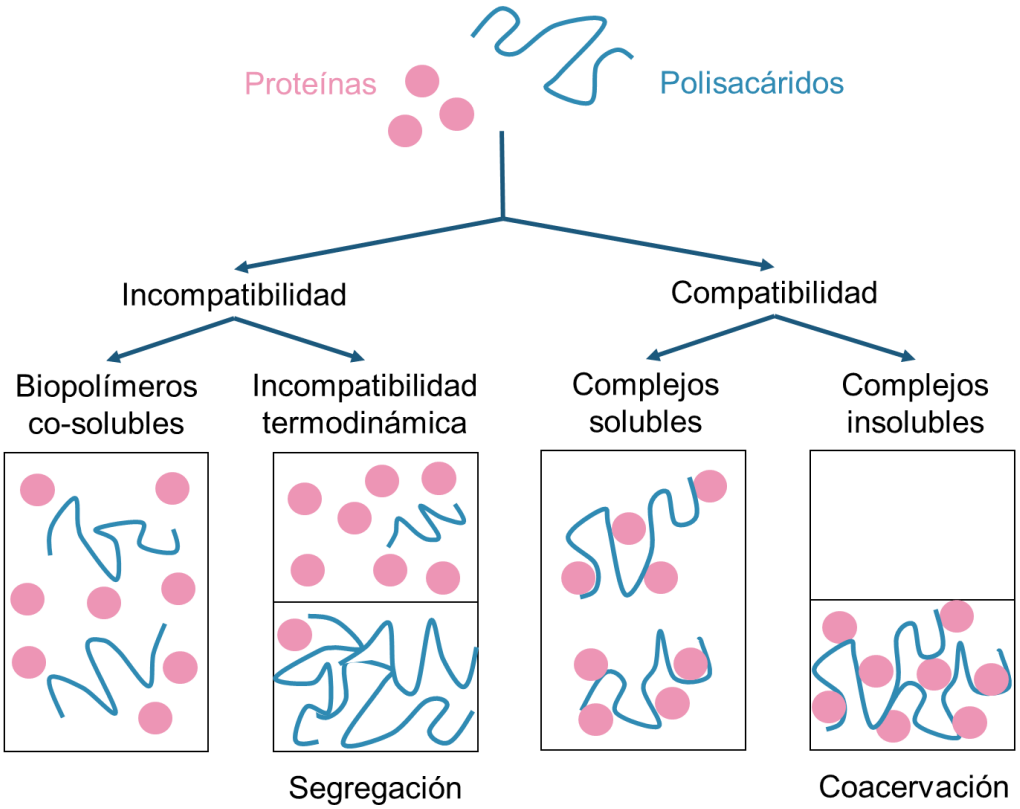

Figura 1.7 - Posibles interacciones entre proteínas y polisacáridos. Fuente: elaboración propia.

La co-solubilidad implica la formación de una sola fase en la cual ambos biopolímeros se encuentran solubles o dispersos, pero no interaccionan entre sí. Este tipo de sistemas sólo puede ocurrir en una suspensión diluida, en donde la entropía de la mezcla genera más aleatoriedad en el sistema (Goh y col., 2019). Desde un punto de vista termodinámico, la co-solubilidad ocurre cuando la energía libre de Gibbs de la mezcla es negativa, lo que significa que la entropía de la mezcla supera la entalpía de la misma (McClements, 2005). Además, la co-solubilidad se genera cuando existe repulsión electrostática entre los biopolímeros o cuando los biopolímeros no presentan cargas opuestas para que ocurra una atracción electrostática (Wei y Huang, 2019).

Por otro lado, la segregación de fases o incompatibilidad termodinámica se trata de la formación de dos fases acuosas inmiscibles entre sí, una de las cuales está enriquecida en proteínas y la otra está enriquecida en polisacáridos. La segregación de fases puede ocurrir si cada biopolímero muestra diferente afinidad con el solvente (Tolstoguzov, 1991; Piculell y Lindman, 1992). En este caso, la interacción entre el solvente y cada uno de los biopolímeros es favorecida por sobre las interacciones proteína-polisacárido y solvente- solvente (Doublier y col., 2000). Por lo tanto, en este sistema, los biopolímeros tienen preferencia de estar rodeados por moléculas de su mismo tipo.

Por su parte, la compatibilidad entre los biopolímeros y, por ende, la formación de complejos proteína-polisacárido, puede ocurrir cuando los polisacáridos cargados negativamente interactúan con proteínas cargadas positivamente a un pH menor que su pI y mayor que el pKa del polisacárido. También, dicha compatibilidad puede ocurrir cuando los polisacáridos cargados positivamente interactúan con proteínas cargadas negativamente a un pH mayor que su pI y menor que el pKa del polisacárido (Gaber y col., 2018). Cuando las proteínas poseen una carga neta cercana a cero a un pH cercano a su pI, la interacción con polisacáridos aniónicos o catiónicos suele dar lugar a la formación de complejos débiles reversibles (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011). Por lo tanto, la formación de complejos proteína-polisacárido dependerá de que las proteínas y los polisacáridos presenten cargas netas opuestas, favoreciendo la atracción electrostática que llevará a la formación de complejos (Gaber y col., 2018). De esta manera, la fuerza de la interacción proteína-polisacárido puede variar sustancialmente al ajustar el pH y/o la fuerza iónica de la fase acuosa (Benichou y col., 2002; Dickinson, 2008; de Kruif, Weinbreck, y de Vries, 2004; McClements, 2006; Turgeon, Schmitt, y Sanchez, 2007). Además de las interacciones electrostáticas, las interacciones por puentes de hidrógeno e hidrofóbicas cumplen un rol importante en la estabilidad de los agregados entre proteínas y polisacáridos (Gentile,2020).

Finalmente, la formación de complejos proteína-polisacárido insolubles, proceso llamado coacervación o coacervación compleja, puede llevar a la generación de un sistema de dos fases. En este sistema, una de las fases contiene a ambos biopolímeros en una matriz compleja y, la otra fase, contiene principalmente el solvente acuoso (Goh y col., 2019). Las fuerzas que rigen la coacervación son interacciones electrostáticas entre las proteínas y los polisacáridos y el aumento entrópico por la liberación de iones y moléculas de agua luego de la formación de los complejos coacervados (Gaber y col. 2018; Semenova, 2017; Turgeon y col., 2007; Rodríguez Patino y Pilosof, 2011). Este fenómeno suele ocurrir cuando la concentración de los biopolímeros compatibles aumenta. El mecanismo dinámico de la coacervación podría ser una nucleación y posterior proceso de crecimiento (Turgeon y col., 2007; Rodríguez Patino y Pilosof, 2011). De todos modos, dependiendo de la densidad de carga entre los dos polímeros y de la concentración utilizada, los coacervados (complejos proteínas-polisacáridos insolubles) pueden mantenerse en suspensión estable, formando complejos con características similares a los complejos solubles (Goh y col., 2020).

Para una mezcla compatible de proteínas y polisacáridos, a una temperatura y fuerza iónica específicas, el diagrama de fase puede variar en función del pH y de la relación proteínas:polisacáridos. En la Figura 1.8 se presenta el diagrama de fase típico para un sistema de biopolímeros compatibles. En el diagrama de fase se observan cinco regiones donde se forman diferentes estructuras:

(I) Biopolímeros co-solubles sin interacción entre ellos.
(II) Complejos intramoleculares solubles en estado molecular.
(III) Agregados de complejos solubles o formación de complejos insolubles que se mantienen en suspensión. La estabilidad coloidal estará determinada por el tamaño de los complejos (se pueden mantener en suspensión si el tamaño es nanométrico).
(IV) Formación de complejos insolubles que precipitan (coacervación).
(V) Biopolímeros co-solubles donde aparecen nuevamente moléculas individuales dispersas sin interacción entre ellas.

Estas regiones están divididas por tres valores críticos de pH, conocidos como pH_C, pH_Φ y pH_d, que están relacionados con la formación de complejos proteína-polisacárido solubles, el inicio en la formación de coacervados insolubles, y la disociación en biopolímeros co-solubles sin interacción entre ellos, respectivamente (Wei y Huang, 2019). Cabe destacar que una cantidad insignificante de proteínas auto-ensambladas o polisacáridos auto-ensamblados puede coexistir con los complejos proteínas-polisacáridos. Debido a esto, el control de la relación proteínas:polisacáridos, el pH y la fuerza iónica es esencial en el ensamblaje, dado que estas variables pueden determinar la estructura de los complejos.

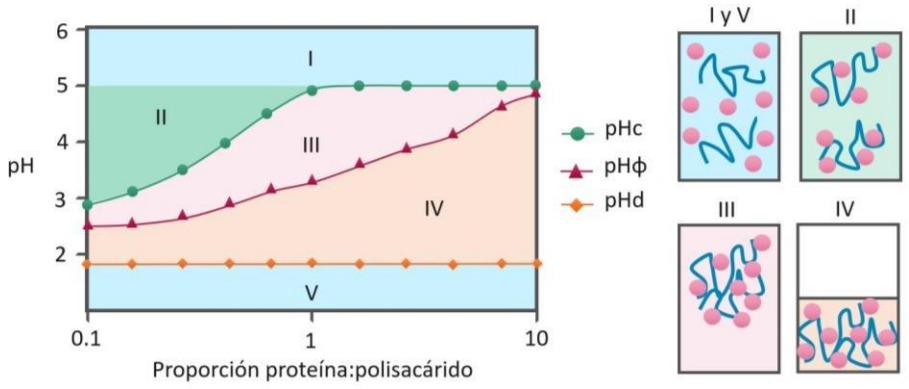

Figura 1.8 - Diagrama de fase esquemático para sistemas compatibles de proteínas-polisacáridos. Fuente: adaptado de Gaber y col. (2018).

1.3.3 Obtención de nanopartículas de proteínas-polisacáridos

Modificando las condiciones del medio es posible inducir el autoensamblaje de proteínas y polisacáridos para formar nanopartículas (NPs), partículas con tamaños en el rango nanométrico. En la bibliografía este procedimiento ha sido descrito siguiendo dos posibles métodos (Figura 1.9). El primer método consiste en una estrategia de un sólo paso donde los complejos son preparados mezclando soluciones acuosas de las proteínas y de los polisacáridos, en el pH deseado. El segundo método se denomina núcleo/cubierta e involucra dos pasos: en un primer paso, el núcleo es formado por uno de los biopolímeros y, en un segundo paso, dicho núcleo es cubierto por moléculas del otro biopolímero (Gaber y col., 2018).

La estrategia de un paso utiliza la interacción electrostática entre los dos biopolímeros para formar complejos electrostáticos; dependiendo del tamaño de las proteínas y polisacáridos y del grado de interacción se puede, incluso, obtener NPs a partir de ellos. Este método tiene como ventaja que no es necesaria la utilización de un solvente orgánico o un agente entrecruzante tóxico, tal como el glutaraldehído, que implica su subsecuente remoción. Por lo tanto, este método reduce el costo de producción e incrementa la seguridad en la formación de las NPs (Gaber y col., 2018).

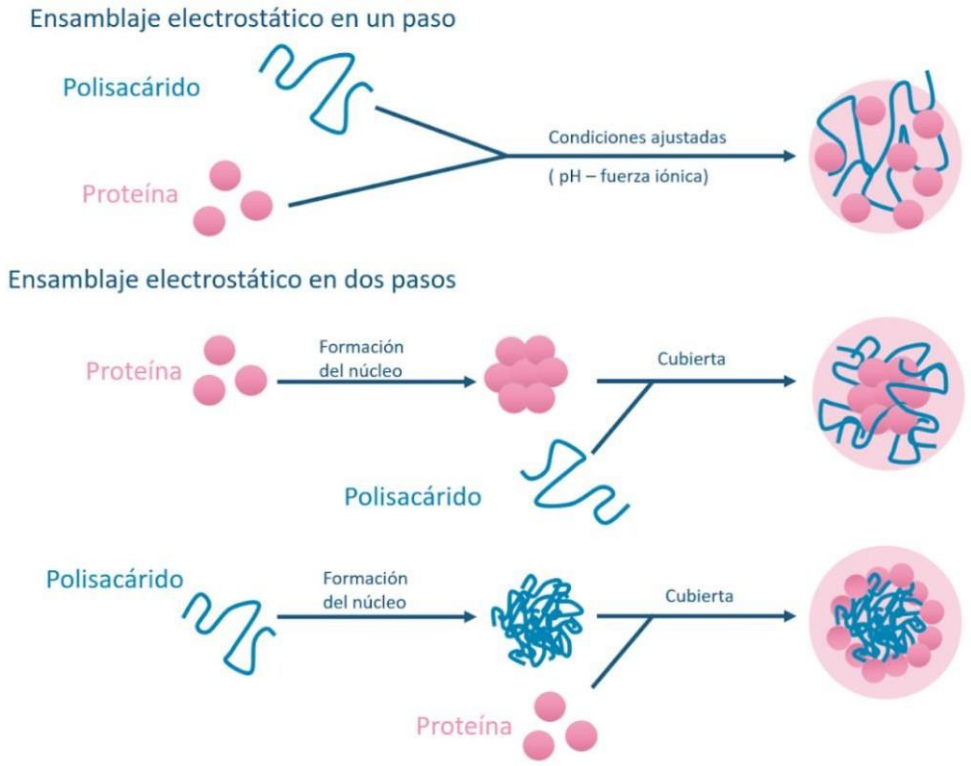

Figura 1.9 - Esquema de los métodos de ensamblaje de proteínas-polisacáridos para obtener nanopartículas. Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, en la estrategia de dos pasos, las partículas son fabricadas, inicialmente, con uno de los biopolímeros y, luego, son recubiertas electrostáticamente por el otro biopolímero. El método núcleo/cubierta dará como resultado NPs que serán o no solubles dependiendo de las características del núcleo, cubierta, tamaño, pH, fuerza iónica, y tratamientos adicionales. Usualmente este tipo de NPs requieren un paso final de secado, ya sea por liofilización, secado en spray o alguna otra técnica. Como ventaja, este método permite la encapsulación de compuestos bioactivos en un núcleo interno, lo cual aumentaríala estabilidad del mismo en comparación con complejos simples. Como desventaja, este método aumenta los costos de producción.

La mayoría de los estudios sobre la formación de complejos proteínas-polisacáridos han sido llevados a cabo a temperatura ambiente. Sin embargo, diversos autores han demostrado que las partículas de biopolímeros pueden ser formadas a través de un calentamiento controlado de los complejos electrostáticos de proteínas globulares y polisacáridos iónicos (Jones y McClements, 2011). Esta estrategia se basa en la desnaturalización térmica y agregación de las proteínas globulares cuando los complejos electrostáticos proteínas-polisacáridos son calentados por encima de la temperatura de desnaturalización térmica de la proteína globular, a un pH cercano al pI de la misma.

Los complejos proteínas-polisacáridos obtenidos pueden ser denominados micro o nano hidrogeles cuando forman una estructura esferoidal que retiene un gran volumen de una fase líquida continua (más de 600 gramos de agua por gramo de biopolímero pueden ser retenidos en la red electrostática del gel) (Semenova, 2017). También, los complejos proteínas-polisacáridos pueden ser llamados micro o nanocápsulas luego de realizar un método de secado (liofilización o secado en spray) (Wei y Huang, 2019).

1.3.4 Factores que condicionan el ensamble electrostático de proteínas y polisacáridos

Las interacciones proteínas-polisacáridos y la formación de NPs están condicionados por varios factores, entre los que se encuentran el pH, la fuerza iónica, la relación másica de los biopolímeros, la concentración total de biopolímeros y la inclusión de tratamientos adicionales, como los térmicos o los mecánicos.

1.3.4.1 pH

El pH es el principal factor que afecta la formación de complejos proteínas-polisacáridos debido a que, para que ocurra un ensamblaje electrostático, las proteínas y los polisacáridos deben tener cargas superficiales opuestas. Los polisacáridos, que poseen grupos ionizables catiónicos o aniónicos, determinarán la carga que deberán presentar las proteínas que, gracias a su naturaleza anfifílica, pueden presentar carga neta positiva o negativa. Como mencionamos anteriormente, para cada mezcla compatible de proteínas- polisacáridos, se pueden identificar tres regiones de pH en el diagrama de fase (Figura 1.8). El pH_C es considerado el punto crítico de formación de complejos proteínas-polisacáridos solubles. El pH_Φ está relacionado a la formación de complejos proteínas-polisacáridos insolubles. Finalmente, el pH_d se trata del pH donde tiene lugar la disociación de los complejos proteínas-polisacáridos. En general, para que los complejos puedan ser formados, el pH debe encontrarse entre el pHC y el pHΦ.

Por ejemplo, Wu y col. (2020) han estudiado la formación de complejos entre SPI y quitosano o carboximetil-celulosa (CMC), siendo el quitosano un polisacárido catiónico y la CMC un polímero aniónico (Wu y col., 2020). Mediante turbidimetría a diferentes pH, determinaron el pH_C y el pH_Φ para cada tipo de mezcla, a partir de los cuales seleccionaron el pH óptimo para la formación de complejos electrostáticos. Según sus resultados, para obtener complejos solubles de SPI y CMC, el pH óptimo fue cercano a 4,55, mientras que para obtener complejos solubles de SPI y quitosano, el pH óptimo fue de aproximadamente7,00, lo que corresponde

al pH entre el pH_C y el pH_Φ para cada mezcla. Para la mezcla SPI- CMC, a un pH menor a pH_C (~4,25), no se encontraron complejos y a pH mayores que el pH_Φ (~4,60) se formaron coacervados insolubles. Por el contrario, para la mezcla SPI-CMC, a valores de pH mayores que el pH_C (~7,50) no se formaron complejos y a pH menores que el pH_Φ (~6,90) se formaron coacervados insolubles.

Por otro lado, Behrouzain, Razavia, y Joynerb (2020), analizaron la interacción entre WPI y goma de semillas de albahaca (proveniente de la planta *Ocimum basilicum L.*). A partir de medidas de absorbancia a 280 y 400 nm, determinaron los pH críticos para la interacción de dichos biopolímeros. A un pH entre 6,0 y 7,0, los biopolímeros no interactuaron entre sí debido a la repulsión electrostática, generándose un sistema de biopolímeros co-solubles. Por su parte, a un pH entre 4,5 y 6,0, los biopolímeros interactuaron entre sí debido a la atracción electrostática entre los grupos aniónicos de la goma y las zonas catiónicas de la superficie de la proteína, obteniendo complejos electrostáticos solubles. A pH menores a 4,5, los biopolímeros interactuaron fuertemente debido a que las proteínas presentaron carga neta positiva, lo que permitió un mayor número de interacciones con la goma aniónica, dando lugar a coacervados insolubles. Finalmente, a pH menores a 2,0, se observó una menor cantidad de interacciones, lo que podría deberse a la neutralización de las cargas negativas en la goma de semillas de albahaca. En resumen, los pH críticos en la interacción WPI-goma de semillas de albahaca fueron pH_C=6,0, pH_Φ=4,5 y pH_d=2,0.

1.3.4.2 Fuerza iónica

El segundo factor determinante de la formación y las características de los complejos proteínas-polisacáridos es la fuerza iónica. Sin embargo, este efecto es difícil de predecir debido a que depende del tipo de sal y de las características de las proteínas y los polisacáridos.

En general, la adición de iones monovalentes tales como Na^+ o Cl^- podrían neutralizar grupos con cargas negativas o positivas, respectivamente, desfavoreciendo la formación de complejos y promoviendo la hidratación de cada polímero. Por ejemplo, de acuerdo con los resultados presentados por Heckert Bastos, Piler de Carvalho y Garcia-Rojas (2018), una concentración de NaCl superior a 50 mM debilitó la atracción entre lactoferrina y alginato de sodio, por lo que estos complejos proteínas-polisacáridos solo pueden ser utilizados en matrices alimenticias con bajas concentraciones de sal. En este sentido, Gharanjig y col. (2020) analizaron la interacción entre gelatina (tipo A o B) y las gomas “zedo” exudada de *Amygdalus scoparia* o la goma de semillas de berro. A partir de sus estudios, han demostrado que mientras la concentración de NaCl se incrementó de 0 a 50 mM, la diferencia

entre el pH_C y el pH_Φ para la formación de complejos disminuyó. Esta disminución del rango de pH donde pueden ocurrir interacciones electrostáticas se debe a que los iones de sal debilitan las interacciones electrostáticas entre dichos biopolímeros. Los autores han reportado que, a concentraciones de NaCl mayores a 60 mM, los complejos entre las gomas y la gelatina no se formaron.

Por otro lado, la adición de iones divalentes tales como Mg^{2+} o Ca^{2+} podrían mediar la interacción entre grupos aniónicos que se repelerían en otras condiciones, favoreciendo la formación de complejos proteínas-polisacáridos. Guo y col. (2020) analizaron el efecto del ion calcio (Ca^{2+}) en la interacción entre aislado de proteínas de arveja (PPI) y pectina de alto metoxilo (HMP) (Guo y col., 2020). A bajas concentraciones de calcio (< 24 mmol/L), PPI y HMP formaron puentes de calcio, permitiendo la formación de complejos con una estructura compacta. Sin embargo, a una alta concentración de calcio (> 24 mmol/L), el Ca^{2+} en exceso se une a la superficie de los complejos PPI-HMP y promueve su agregación. Por otro lado, dependiendo de los tipos de biopolímeros utilizados y las condiciones de pH, los iones divalentes podrían mediar interacciones entre macromoléculas de la misma especie formando complejos proteínas-proteínas o polisacáridos-polisacáridos, en lugar de los complejos mixtos buscados.

1.3.4.3 Relación másica y concentración de los biopolímeros

La relación másica proteínas:polisacáridos y la concentración total de biopolímeros también afectan la formación y las características de los complejos electrostáticos. Según la literatura, se ha demostrado que la mejor relación estequiométrica proteínas:polisacáridos depende principalmente de la densidad de carga, conformación y flexibilidad de los biopolímeros (Gaber y col., 2018; Jones y McClements, 2011).

Por ejemplo, Lan y col. (2019) estudiaron la interacción entre PPI y pectina de alto y bajo metoxilo (HMP y LMP, respectivamente), en función del pH (desde 2,0 hasta 7,0) y de la relación proteínas:polisacáridos (1:1, 2:1, 5:1, 10:1 y 20:1). En su trabajo, demostraron que para esta combinación proteínas-polisacáridos el tipo de interacción establecida depende tanto del pH como de la relación proteínas:polisacáridos. Por ejemplo, a pH 3,5, la relación PPI:HMP 1:1 dio lugar a una suspensión turbia con complejos solubles, la relación 2:1 generó una suspensión turbia y presencia de precipitado, debido a la presencia de complejos solubles e insolubles, y a partir de la relación 5:1 en adelante se obtuvo una solución traslúcida con precipitado, debido a la formación de coacervados insolubles. En adición,

el rango de pH de coacervación (pH a partir del cual se forman complejos insolubles) se expandió al incrementar la relación PPI:HMP desde 1:1 a 20:1. Por ejemplo,el rango de formación de coacervados se movió desde pH 2,5-3,5 para la relación 2:1 hasta pH 2,5-6,0 para la relación 20:1. Esto sugiere que la combinación de una alta concentración de proteínas con una baja concentración de polisacáridos promueve la formación de coacervados. Finalmente, el comportamiento de las mezclas PPI-LMP dio lugar a resultados diferentes a los recientemente explicados para el PPI-HMP. Esto demuestra que la relación óptima para obtener complejos o coacervados depende del tipo de proteína y de polisacárido.

En otro ejemplo, Dong, Qi y Cui (2020) analizaron la interacción entre SPI y almidón de papa, en función del pH (desde 2,0 hasta 7,0), de la relación proteínas:polisacáridos (desde 1:8 hasta 4:1) y de la concentración total de biopolímeros (desde 0,1 % hasta 0,8 % m/v). Para esta última variable, se utilizó una relación proteínas:polisacáridos de 1:8. Este grupo de investigación reportó que, al aumentar la concentración de los biopolímeros, la turbidezde las muestras aumentó significativamente y el pH óptimo de formación de complejos pasó de 3,1 a 3,3. Estos resultados sugieren que se establecieron más interacciones proteínas-polisacáridos a medida que se aumentó la concentración de biopolímeros.

1.3.4.4 Tratamiento térmico

La mayoría de los métodos de autoensamblaje electrostático han sido llevados a cabo a temperatura ambiente. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que nano o micropartículas pueden ser formadas a través de calentamiento controlado hasta una temperatura superior a la temperatura de desnaturalización térmica de las proteínas (T_m) (Jones y McClements, 2011). En la estrategia de formación de complejos de un paso que describimos anteriormente (Figura 1.9), el tratamiento térmico induce la desnaturalización térmica y la agregación de la fracción proteica en complejos proteínas-polisacáridos preformados, cuando son calentados a una temperatura superior a la T_m. Por su parte, en la estrategia de dos pasos (Figura 1.9), el tratamiento térmico es frecuentemente utilizado para generar la desnaturalización térmica y la agregación de la proteína para formar el núcleo proteico, el cual luego es recubierto con los polisacáridos mediante interacción electrostática. También, el tratamiento térmico puede ser utilizado para inducir la gelificación de una cubierta proteica sobre un núcleo de polisacáridos, como un paso adicional a la estrategia de dos pasos.

En un trabajo desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Cabezas y col., 2019), se estudió el efecto del tratamiento térmico en la formación de complejos entre WPI y SSPS, comparando las estrategias de ensamblaje de uno y de dos pasos. Para la estrategia de un

paso, el WPI y los SSPS fueron mezclados a pH 3,5 en relación WPI:SSPS 4:1 y, luego, el calentamiento fue llevado a cabo a 90°C durante 15 minutos para desnaturalizar la fracción proteica. Para la estrategia de ensamblaje de dos pasos, el WPI a pH 3,5 fue calentado a 90°C durante 15 minutos para generar la desnaturalización y la agregación de las proteínas (formación del núcleo) y, luego, los SSPS fueron añadidos al mismo pH (formación de la cubierta). En ambos casos, se utilizó como control el complejo WPI-SSPS a pH 3,5 sin calentamiento. Los resultados obtenidos sugieren que, en ambos casos, el tratamiento térmico induce el desplegamiento de las proteínas y la exposición de los residuos hidrofóbicos, los cuales incrementan la hidrofobicidad superficial de las partículas obtenidas en relación con el control. Además, las diferencias en el contenido de proteína no sedimentable, el tamaño de partícula, la hidrofobicidad aromática superficial y la resistencia a tratamientos de urea sugieren que las interacciones establecidas entre WPI y SSPS son diferentes, dependiendo de si el tratamiento térmico fue aplicado antes o después de la mezcla de los biopolímeros.

Como regla general, los complejos tratados térmicamente han mostrado mayor estabilidad a la disociación o agregación frente a cambios en el pH, fuerza iónica o temperatura que las proteínas nativas, los polisacáridos sin tratamiento térmico o los complejos electrostáticos sin tratamiento térmico (Gaber y col., 2018).

1.3.4.5 Tratamiento mecánico

Diversas investigaciones han demostrado que las características de los complejos electrostáticos pueden ser modificadas mediante tratamientos mecánicos, tales como la sonicación o la homogeneización.

Un proceso de sonicación intenso podría llevar a la hidrólisis de la cadena principal de los biopolímeros en cadenas más pequeñas, con un menor peso molecular. El cambio en los biopolímeros podría alterar las interacciones y las características de los complejos obtenidos. En el estudio de Ma y col. (2019), se aplicó un campo ultrasónico de alta intensidad a complejos electrostáticos de SPI y HMP cítrica, aumentando los valores absolutos de potencial ζ e hidrofobicidad superficial de los complejos, pero disminuyendo significativamente su tamaño de partícula, intensidad de fluorescencia y turbidez. Los resultados indicaron que los efectos moderados de cavitación resultaron en modificaciones estructurales en ambas macromoléculas, así como también mejoraron las interacciones electrostáticas entre SPI y HMP cítrica, las cuales en combinación contribuyen a mejorar las propiedades emulsificantes de los complejos. Sin embargo, los resultados también mostraron que un exceso de irradiación ultrasónica destruye la estructura globular del SPI, resultando

en la formación de grandes agregados, los cuales disminuyen las propiedades emulsificantes.

En el trabajo realizado por Hu y col. (2020), se ha estudiado la interacción de aislado de proteínas de papa y quitosano, bajo microfluidización dinámica a alta presión. El tratamiento de microfluidización dio lugar a partículas con un diámetro hidrodinámico menor, pero con un potencial ζ y una hidrofobicidad superficial similares a los de las partículas proteicas sin tratamiento mecánico.

Por último, Jin y col. (2020) analizaron los efectos de la homogeneización a alta presión y de los tratamientos con microondas de complejos formados por hidrolizados de proteína de soja y β-glucano, con carga de ácido ferúlico. Este equipo reportó que ambos tratamientos redujeron significativamente el tamaño de partícula y la intensidad de fluorescencia de los complejos y mejoraron la estabilidad térmica y la actividad antioxidante, pero no afectaron el potencial ζ y la estructura cristalina del ácido ferúlico. En comparación, el tratamiento de homogeneización a alta presión modificó la conformación de las proteínas de soja, incrementando el contenido de lámina β y disminuyendo la estructura desordenada, mientras que el tratamiento con microondas indujo el aumento del contenido de bucles aleatorios y la disminución en el contenido de α-hélice.

1.3.5 Potenciales aplicaciones de complejos proteínas-polisacáridos en sistemas alimentarios

Los alimentos industrializados existen, comúnmente, en estados coloidales como dispersiones, emulsiones, geles o sus variantes combinadas. La incorporación de complejos electrostáticos en matrices alimenticias puede permitir la construcción de sistemas económicamente viables con nuevas funcionalidades y con alta biocompatibilidad y biodegradabilidad. En este apartado se presenta un resumen de las aplicaciones potenciales en la industria alimentaria de complejos proteínas-polisacáridos obtenidos por ensamblaje electrostático.

1.3.5.1 Encapsulación de compuestos bioactivos en complejos de proteínas y polisacáridos

En la ciencia alimenticia, los compuestos bioactivos son ingredientes que pueden brindar efectos benéficos en la salud a través de la modulación de las actividades fisiológicas o celulares (Wei y Huang, 2019). Entre los ingredientes bioactivos usualmente utilizados se encuentran los polifenoles, aceites esenciales, carotenoides, vitaminas, minerales, fitosteroles, péptidos bioactivos, ácidos grasos esenciales, prebióticos y probióticos. Estos compuestos bioactivos, aún en una pequeña cantidad, pueden exhibir efectos benéficos tales

como anticancerígenos, neuroprotectores, antiinflamatorios, antioxidantes o analgésicos. Sin embargo, los compuestos bioactivos varían en su estructura química, incluyendo diferentes pesos moleculares, grupos funcionales, cargas y polaridades, lo cual lleva a variaciones en sus propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad, coeficiente de partición, estado físico y estabilidad química (McClements, 2020). Estas características diferenciales implican un nuevo desafío para la encapsulación y *delivery* de cada tipo de compuesto bioactivo, por lo que el diseño de sistemas de encapsulación adecuados es esencial para superar estas limitaciones.

Los objetivos de la encapsulación pueden ser (I) incrementar la solubilidad del compuesto bioactivo en un medio específico, (II) incrementar la estabilidad del compuesto bioactivo en ciertas condiciones como puede ser durante la producción, procesamiento y/o almacenamiento del alimento, (III) incrementar la biodisponibilidad del compuesto bioactivo en el tracto gastrointestinal, y/o (IV) reducir sabores indeseables o astringencia proveniente de algunos compuestos bioactivos (Assadpour y Mahdi Jafari, 2018; Dias y col., 2017).

Los complejos proteínas-polisacáridos podrían ser utilizados para encapsular una gran variedad de compuestos bioactivos, incluyendo tanto aquellos con características hidrofóbicas como aquellos con características hidrofílicas. Se ha reportado que la encapsulación en complejos proteínas-polisacáridos es una alternativa adecuada para incrementar la solubilidad y la biodisponibilidad de compuestos bioactivos (Katouzian y Jafari, 2016), y para proteger a los compuestos inestables contra las condiciones desfavorables que se generan durante el procesamiento, almacenamiento y transporte del alimento, incrementando su calidad y estabilidad y mejorando su bioactividad (Assadpour y Mahdi Jafari, 2018).

Para la encapsulación, el ingrediente bioactivo se asocia con algunos de los biopolímeros o con los complejos proteínas-polisacáridos, induciendo que quede atrapado dentro de las partículas biopoliméricas resultantes. Las fuerzas que intervienen en la asociación pueden ser uniones covalentes o interacciones atractivas, incluyendo atracción electrostática, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, las cuales dependerán de la naturaleza de las moléculas involucradas.

Una amplia variedad de mecanismos puede ser empleada para la encapsulación de compuestos bioactivos en complejos electrostáticos proteínas-polisacáridos, dependiendo del compuesto bioactivo, las proteínas y los polisacáridos que forman el complejo, y del alimento donde serán utilizados, entre otros aspectos. En la Figura 1.10 se esquematizan las estrategias más utilizadas.

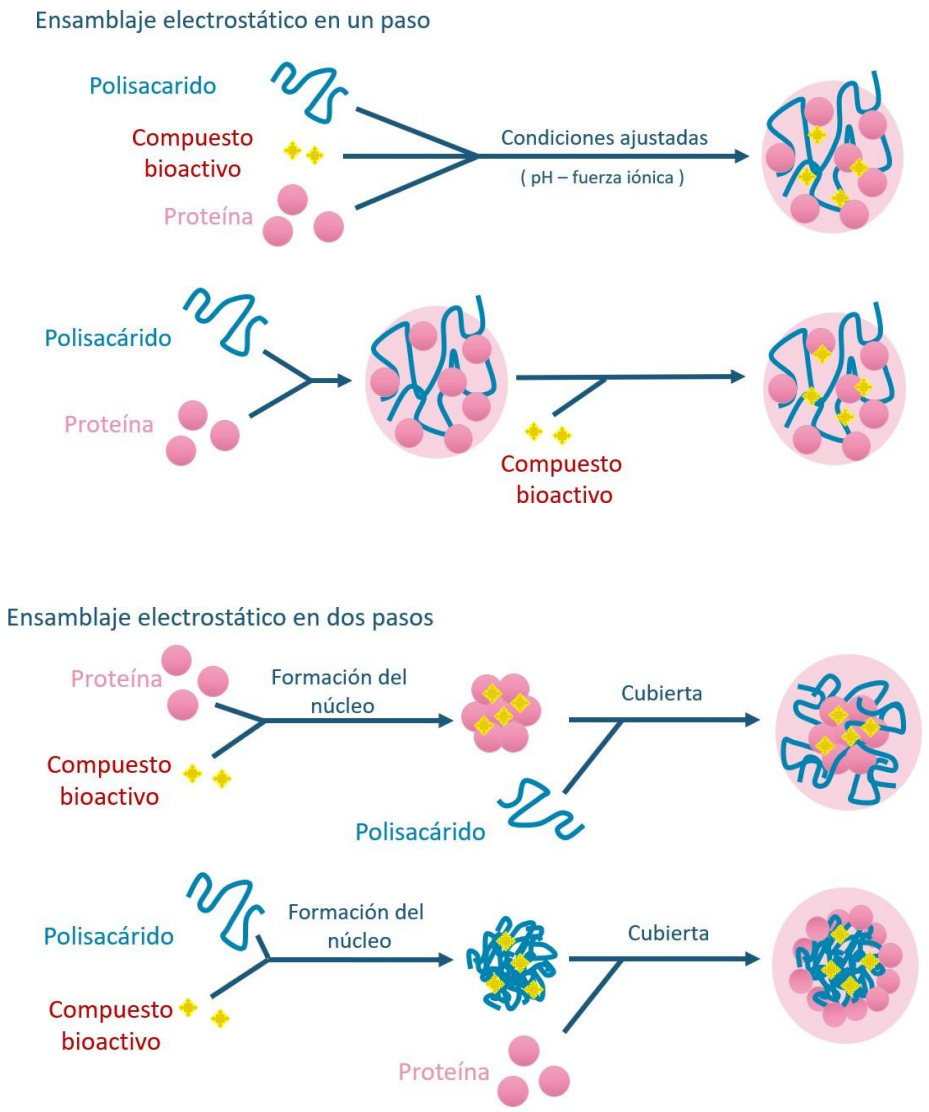

Figura 1.10 - Esquema de los métodos de encapsulación de compuestos bioactivos en complejos de proteínas-polisacáridos. Fuente: elaboración propia.

El método más simple implica la mezcla de los compuestos bioactivos con la suspensión de proteínas y polisacáridos antes o después de modificar el pH o las condiciones del medio para inducir la formación de complejos electrostáticos. Dependiendo de la naturaleza del bioactivo, los mecanismos de encapsulación podrían ser dirigidos por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas o, bien, una combinación de ambas. En algunos métodos, se lleva a cabo un paso final de calentamiento, para obtener un sistema más estable a travésde la coagulación térmica de la fracción proteica. Por ejemplo, Huang y col. (2020) desarrollaron complejos de lisozima-κ-carragenina para la encapsulación de curcumina con una alta eficiencia de encapsulación, alcanzando el 96,2 %. En comparación con el bioactivo no encapsulado, la curcumina en complejos proteínas-polisacáridos presentó una elevada actividad antioxidante e incrementó la estabilidad térmica, la estabilidad durante el almacenamiento y la fotoestabilidad.

Otra estrategia, utilizada en el método de ensamblaje electrostático de dos pasos, es la encapsulación física a través de la desolvatación de una mezcla de uno de los biopolímeros con el compuesto bioactivo, para obtener el núcleo de la partícula. Luego, este núcleo es cubierto por el otro biopolímero mediante ensamblaje electrostático. Adicionalmente, se pueden realizar tratamientos térmicos intermedios o al finalizar el proceso para modificar las características de las partículas. Por ejemplo, Chen y col. (2020) demostraron que complejos núcleo-cubierta de zeína-quitosano fueron adecuados para la encapsulación, protección y *delivery* de quercetagetina en nanocomplejos cargados positivamente (+42,5 mV) y de un tamaño relativamente pequeño (309 nm), alcanzando un 94,9% de eficiencia de encapsulación y retrasando la degradación del bioactivo cuando fueron expuestos a la luz y a altas temperaturas.

Los complejos proteínas-polisacáridos, con o sin compuestos bioactivos, son usualmente caracterizados por parámetros tales como tamaño de partícula, carga superficial y estructura de partícula. Otros parámetros utilizados para caracterizarlos son la capacidad decarga de bioactivo (cantidad de bioactivo unido por masa de partícula utilizada), la eficiencia de encapsulación de bioactivo (cantidad de bioactivo unido con respecto a la cantidad total de bioactivo expuesta a las partículas) y la estabilidad del bioactivo (cantidad de bioactivo que permanece intacto en función al tiempo, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la luz, entre otros parámetros) (Kasaai, 2018; Verma y col., 2018). Estos parámetros difieren de acuerdo al complejo proteínas-polisacáridos y al método de encapsulación.

1.3.5.2 Delivery de compuestos bioactivos a partir de complejos de proteínas y polisacáridos

Los complejos proteínas-polisacáridos podrían ser diseñados para el *delivery* de compuestos bioactivos hacia sitios de acción específicos en el tracto gastrointestinal, es decir, boca, estómago, intestino delgado o intestino grueso (Gentile, 2020; Jones y McClements, 2011). Este propósito puede ser logrado utilizando proteínas o polisacáridos con diferentes susceptibilidades a la degradación química o enzimática en el tracto gastrointestinal humano. En términos generales, mientras las proteínas son degradadas por proteasas dentro del estómago y del intestino delgado, algunos polisacáridos solo son degradados dentro del intestino grueso por bacterias de la microbiota intestinal (Jones y McClements, 2011). Estas susceptibilidades diferenciadas permitirían la liberación progresiva y controlada de los compuestos bioactivos encapsulados en los complejos proteínas-polisacáridos.

Además, la liberación en el sitio específico puede ser lograda diseñando partículas de complejos proteínas-polisacáridos con tamaños y carga neta específicos, alterando la velocidad a la cual estas son digeridas en el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, en el trabajo de Chen y col. (2020), los autores han demostrado que los complejos núcleo-cubierta

de zeína-quitosano fueron capaces de modular efectivamente el perfil de liberación de la quercetagetina bajo condiciones gastrointestinales. De hecho, durante el estadio gástrico, la quercetagetina no encapsulada fue rápidamente solubilizada alcanzando el 68,7% de liberación acumulada; mientras que durante la etapa en el intestino delgado, la liberación de la quercetagetina alcanzó un 86,6 % de liberación acumulada. Comparado con la quercetagetina no encapsulada, los complejos retrasaron la liberación de la quercetagetina durante el estadio gástrico, alcanzando solo el 30 % de liberación acumulada y mejorando su biodisponibilidad en el intestino delgado. Los autores estipulan que este efecto podría ser debido a que los complejos zeína-quitosano se agregaron y fusionaron en condiciones gástricas, evitando la liberación de la quercetagetina; mientras que estos agregados se volvieron más pequeños en las condiciones intestinales, permitiendo la liberación del compuesto bioactivo. Generalmente, las partículas más pequeñas se digieren más rápidamente que las más grandes.

Los complejos proteínas-polisacáridos también pueden inducir la liberación del bioactivo ante un estímulo (Gaber y col., 2018). Por ejemplo, Hanna y col. (2020), utilizaron complejos caseinato de sodio-quitosano para el d*elivery* de niacina (vitamina B3) en el intestino delgado. Específicamente, a pH 7,4 (simulando el pH intestinal), la hinchazón de los complejos generó un mayor nivel de liberación de niacina que a pH 2,1 (simulando el pH gástrico).

1.3.5.3 Otras aplicaciones de los complejos proteínas-polisacáridos

Los complejos proteínas-polisacáridos también se han implementado en sistemas alimenticios con objetivos distintos a la encapsulación y *delivery* de compuestos bioactivos. Entre los muchos ejemplos, nos gustaría destacar:

- Los complejos proteínas-polisacáridos, en forma de nano o micropartículas sólidas, podrían actuar estabilizando emulsiones y espumas a través de la estrategia de estabilización *Pickering* (Semenova, 2017). La principal ventaja de dicha estabilización es la formación de una barrera estérica muy efectiva en la interfase, mediada por la absorción de las partículas. Usualmente, la estabilización *Pickering* de emulsiones y espumas aumenta su longevidad, inhibiendo la coalescencia del sistema. Al mismo tiempo, la principal desventaja de dicha estabilización es el rápido cremado que experimentan las gotas de gran tamaño. Sin embargo, esta desventaja puede ser superada utilizando partículas que produzcan una barrera estérica interconectada alrededor de las gotas o las burbujas, o bien, utilizando NPs para

generar una dispersión más fina de las gotas o burbujas.

- Los complejos proteínas-polisacáridos, usualmente, tienen un índice de refracción relativamente alto (n≈1,5), en comparación con el del agua (n≈1,33). Además, pueden poseer diámetros que están en el mismo orden que la longitud de onda de la luz (d≈λ). En consecuencia, los complejos tienden a dispersar la luz fuertemente y, por ende, generar sistemas turbios u opacos (Jones y McClements, 2011). Por ello, los complejos pueden ser utilizados para incrementar la opacidad de los productos alimenticios comerciales.

- Los complejos proteínas-polisacáridos podrían incrementar la viscosidad del sistema cuando son incorporados en matrices alimentarias acuosas. El incremento en la viscosidad será relativamente pequeño a bajas concentraciones, pero aumentará abruptamente a elevadas concentraciones cuando las partículas estén lo suficientemente cerca para compactarse (Jones y McClements, 2011). De todos modos, a concentraciones de partícula altas, el sistema puede ganar características semejantes a las de un sólido. En consecuencia, los complejos de biopolímeros pueden ser incorporados dentro de productos alimenticios para modificar sus características reológicas.

- Algunos complejos proteínas-polisacáridos tienen dimensiones y características similares a las gotas lipídicas encontradas en la leche, la crema de leche, las bebidas nutricionales y otras matrices alimentarias. Por lo tanto, los complejos proteínas-polisacáridos podrían ser utilizados para imitar algunas de las características deseables de gotas lipídicas, tales como apariencia visual, palatabilidad o textura (Jones y McClements, 2011; Semenova, 2017).

1.3.6 Antecedentes en la obtención de complejos WPI-SSPS

La investigación actual ha avanzado abruptamente en la obtención y caracterización de sistemas de proteínas y polisacáridos, tanto para analizar la formación de complejos como para obtener partículas con distintas funcionalidades. Dentro de esta diversidad, la obtención y caracterización de complejos con WPI es una de la más atractiva debido a su aporte nutricional, propiedades funcionales y su relativo bajo costo (Du y col., 2022).

Por otro lado, los SSPS se postulan como candidatos prometedores para formar complejos con WPI, debido a su elevada solubilidad en agua, baja viscosidad, elevada estabilidad a la temperatura y sus usos como fibra dietaria soluble y como ingrediente funcional (Maeda y Nakamura, 2009; Xu y Liu, 2016). Sin embargo, la obtención y caracterización de complejos

de WPI-SSPS no han sido analizada en profundidad y, por lo tanto, aún no han sido implementados en la industria de los alimentos.

Hasta donde se sabe, únicamente dos estudios previos analizaron la interacción entre WPI y SSPS (Cabezas y col., 2019 ; Zamani y col., 2020).

Como mencionamos anteriormente, estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio analizaron el efecto de un tratamiento térmico sobre la formación de complejos a pH 3,5 y en una relación 4:1 de WPI:SSPS, comparando los métodos de un paso y dos pasos de ensamblaje para aplicaciones en emulsiones sometidas a procesos de congelado y descongelado (Cabezas y col., 2019). Por otro lado, estudios realizados por Zamani y col. (2020) emplearon complejos de WPI-SSPS obtenidos a pH 7,0 o 3,5 con o sin tratamiento térmico para la estabilización de WPI en bebidas.

En ninguno de estos estudios previos se realizó un análisis profundo de los efectos del pH, la relación másica WPI:SSPS y el tratamiento térmico sobre las características de los complejos, así como tampoco se evaluó su utilidad para la encapsulación de compuestos bioactivos.

1.4 Curcumina (CUR)

La curcumina (CUR) es un polifenol de bajo peso molecular (368,37 g/mol) que se encuentra en los rizomas de la planta *Curcuma longa*. La CUR pertenece al grupo de los diarilheptanoides. Presenta dos anillos aromáticos unidos a dos grupos metoxilo y a dos grupos hidroxilo; los anillos fenólicos están unidos por una cadena alifática insaturada de carbonos, con dos grupos carbonilos ubicados en el C-3 y C-5, tal como se muestra en la Figura 1.11 (Rafiee y col., 2019).

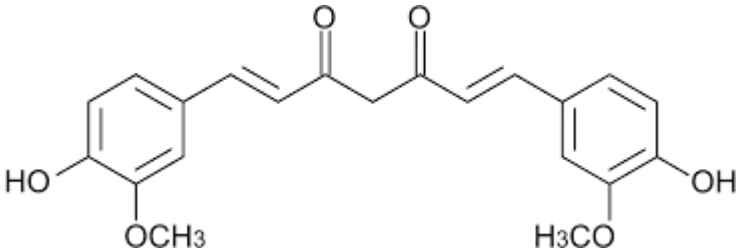

Figura 1.11 - Estructura química de la curcumina (CUR).

Actualmente, la CUR se utiliza como aditivo alimentario en calidad de colorante y/o agente de sabor. Sin embargo, este compuesto bioactivo presenta características que lo hacen un buen candidato para la prevención y/o el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo cáncer, desórdenes pulmonares y renales, enfermedades del sistema nervioso, metabólicas,

cardiovasculares e inflamatorias. Según investigaciones realizadas en las últimas décadas, la CUR presenta actividad antiinflamatoria, antioxidante, cicatrizante y antimicrobiana, por lo que es de gran interés su incorporación en alimentos (Rafiee y col., 2019).

Sin embargo, existen limitaciones en su uso en alimentos debido a su baja solubilidad en medios acuosos, su inadecuada dispersabilidad, su inestabilidad frente al calor, a la luz y a condiciones alcalinas y pro-oxidantes y su susceptibilidad a la degradación dentro del tracto gastrointestinal (lo que implica una disminución de su biodisponibilidad oral). Asimismo, el uso de CUR libre en elevadas concentraciones puede afectar a los atributos sensoriales del alimento, incrementando el sabor amargo y la sensación de astringencia (Rafiee y col., 2019).

Con el fin de superar estas barreras, se han desarrollado numerosas estrategias y técnicas de encapsulación en sistemas dispersos, entre los que se incluyen emulsiones, nanoemulsiones, encapsulación en micropartículas o en NPs. El uso de NPs como sistema de encapsulación y *delivery* de CUR es una tecnología innovadora que permite aumentar la solubilidad de la CUR en la matriz alimentaria, aumentar la estabilidad termodinámica o frente a los procesos térmicos, aumentar la biodisponibilidad tras la administración oral y mejorar los atributos sensoriales. Asimismo, las NPs podrían mejorar la eficiencia terapéutica de la CUR y otorgarían la capacidad de controlar el sitio específico en donde la misma se libera de manera sostenida (Yi y col., 2021; Rafiee y col., 2019). Hasta el momento, diversos tipos de NPs se han estudiado como sistemas de encapsulación de CUR, entre ellos: exosomas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas de proteínas, de polisacáridos o de la combinación de ambos biopolímeros.

Gómez-Estaca y col. (2012) han estudiado la formación de NPs de zeína por atomización electrohidrodinámica, con el objetivo de encapsular CUR. Como resultado, obtuvieron nanoestructuras compactas a partir de soluciones de zeína al 2,5 % y 5,0 %, capaces de encapsular CUR. En dicho trabajo, la morfología de las partículas en estudio no sufrió modificaciones luego de incorporar CUR en proporciones CUR:zeína desde 1:500 hasta 1:10. Por su parte, la eficiencia de encapsulación fue cercana a 85-90 %. Además, luego de 3 meses de almacenamiento a 23 °C y 43 % de humedad relativa en oscuridad, no hubo cambios significativos en el tamaño ni en la morfología de las NPs. A partir de este trabajo, gracias a la encapsulación, la CUR se pudo dispersar en una matriz acuosa como lo es la leche semidesnatada (Gómez-Estaca y col., 2012).

En cuanto a los complejos proteínas-polisacáridos, se ha demostrado que presentan ventajas sobre las NPs basadas solo en proteínas, debido a que la presencia de polisacáridos evita la posible agregación y precipitación de las mismas en el alimento, así como también retrasa la liberación y digestión en el tracto gastrointestinal. Además, los complejos proteínas-polisacáridos presentan una elevada solubilidad y estabilidad en matrices alimentarias,

capacidad de modificar sus propiedades en función del pH y de incrementar el tiempo de residencia a nivel intestinal, lo que en conjunto permitiría la encapsulación, protección y liberación eficiente del compuesto bioactivo (Wei y col., 2019).

Por todo lo mencionado anteriormente, se plantea estudiar a las NPs de WPI-SSPS como sistema de encapsulación de CUR, de forma tal de lograr una mayor estabilidad y biodisponibilidad de dicho compuesto bioactivo.

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo es desarrollar nanopartículas autoensambladas de proteínas aisladas del lactosuero (WPI) y polisacáridos solubles de soja (SSPS), capaces de encapsular y estabilizar compuestos bioactivos hidrofóbicos, como la curcumina (CUR).

Para cumplir dicho objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Optimizar las condiciones de pH y relación proteínas:polisacáridos para asegurar la interacción de WPI y SSPS y la obtención de nanopartículas autoensambladas.

2. Determinar los efectos del pH, la relación másica WPI:SSPS y el tratamiento térmico en las características de las nanopartículas obtenidas.

3. Evaluar la eficiencia de las nanopartículas autoensambladas para encapsular y estabilizar la CUR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

El aislado de proteínas del lactosuero (WPI, Lacprodan® DI-9224) fue donado por Arla (Martínez, Buenos Aires, Argentina). Según el proveedor, la composición del WPI es de 86,5 % m/m de proteína, 0,1 % m/m de lactosa, 0,1 % m/m de grasas totales y 1,25 % m/m de sal. Los polisacáridos solubles de soja (SSPS, Soyafibe-S-CA100) fueron donados por Fuji Oil Co. Ltd (Osaka, Japón). Según el proveedor, la composición del SSPS es de 7,8 % m/m de proteína cruda (N×6,25), 75,1 % m/m de fibra dietaría total, 5,8 % m/m de humedady 7,8 % m/m de cenizas. La curcumina (CUR, CAS 458-37-7) fue comprada a Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA), según el proveedor la misma posee una pureza mayor al 97%. La sonda *N*,*N*-dimetil-6-propionil-2-naftilamina (PRODAN) fue comprada en Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA). Para preparar las soluciones y suspensiones se utilizó agua bidestilada. Los otros reactivos fueron de grado analítico y comprados a distribuidores locales (Buenos Aires, Argentina).

3.2 Optimización de las condiciones de pH y relación proteínas:polisacáridos para asegurar la interacción de WPI y SSPS y obtener NPs

3.2.1 Dispersiones de WPI y SSPS

Las dispersiones de WPI y SSPS al 4,0 % m/m fueron preparadas mezclando los polvos comerciales con agua bidestilada con agitación constante a 200 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). A dichas dispersiones se les añadió azida sódica hasta llegar a una concentración final del 0,02 % m/m, con la finalidad de prevenir el crecimiento microbiano. Ambas dispersiones fueron almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta su uso.

3.2.2 Preparación de las mezclas WPI-SSPS

Para optimizar las condiciones de interacción de WPI y SSPS, se combinaron dichos biopolímeros en distintas relaciones másicas WPI:SSPS (1:1, 1:0,5, 1:0,25, 1:0,17, 1:0,125, y 1:0,1) y distintas condiciones de pH (7,0 a 2,0 cada 0,5 unidades de pH), manteniendo fija la concentración de WPI al 1,0 % m/m y variando la concentración de SSPS desde 1,0 a 0,1

m/m. Como control se utilizaron WPI y SPPS libres al 1,0 % m/m (relaciones 1:0 y 0:1).

Específicamente, se mezclaron las cantidades adecuadas de los stock de WPI (4,0 % m/m), de SSPS (4,0 % m/m) y agua bidestilada para obtener las distintas relaciones de WPI:SSPS. Las dispersiones combinadas se mezclaron con agitador magnético durante 1 hora a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Luego, para obtener las distintas condiciones de pH, se adicionó HCl 1 M gota a gota. El pH se determinó con un pHmetro C861 Consort con electrodo Sartorius PY-P10-25 calibrado cada día previo a su uso. A modo de ejemplo, para la preparación de una mezcla 1:0,25 WPI-SSPS a pH 3,0, se mezclaron 25,00 g de WPI 4,0 % m/m, 6,25 g de SSPS 4,0 % m/m y 50,00 g de agua bidestilada. Luego, se le ajustó el pH hasta 3,0 añadiendo gotas de HCl 1 M. Finalmente, se añadió la cantidad necesaria de agua bidestilada para obtener 100,00 g finales de mezcla.

Todas las mezclas obtenidas fueron caracterizadas por turbidimetría, diagrama de fases y potencial ζ como se describe a continuación.

3.2.3 Caracterización de las mezclas WPI-SSPS

3.2.3.1 Potencial ζ

3.2.3.1.1 Fundamentos teóricos

El potencial ζ es una medida de la carga superficial de las partículas que, en este trabajo, fue determinada utilizado el equipo Nano Zetasizer ZEN 5600 (Malvern Instrument, UK). La presencia de una carga neta en la superficie de la partícula afecta la distribución de los iones en la región interfacial que la rodea, resultando en una concentración creciente de iones de carga opuesta a la partícula, cerca de su superficie. La capa líquida que rodea la zona interfacial se divide en dos: una región interna, en donde los iones se encuentran fuertemente unidos entre sí, y una externa y difusa, donde la unión entre iones es de menor intensidad. De este modo, se halla una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula. Dentro de esta última capa, existe un límite teórico dentro del cual los iones y las partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se encuentra en movimiento, los iones en su proximidad se mueven con ella. Sin embargo, los iones más allá del límite teórico no lo hacen. Este límite se denomina superficie de corte hidrodinámico y, el potencial que existe en este se denomina potencial ζ (Figura 3.1).

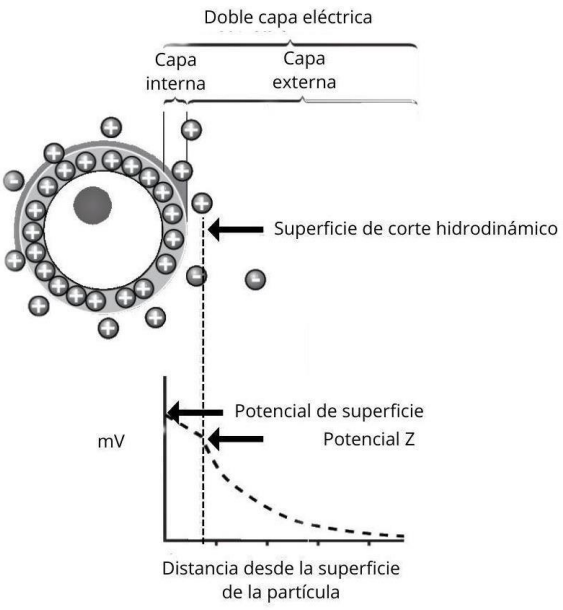

Figura 3.1 - Definición gráfica del potencial ζ. Fuente: adaptada del manual de usuario del equipo Zetasizer.

El potencial ζ puede ser determinado por la medición de la movilidad electroforética, con la consiguiente aplicación de la ecuación de Henry. La movilidad electroforética es obtenida a través de la realización de una electroforesis a la muestra y la medición de la velocidad de las partículas, utilizando *Laser Doppler Velocimetry* (LDV). En la Figura 3.2 se pueden observar los componentes del sistema de medición del potencial ζ.

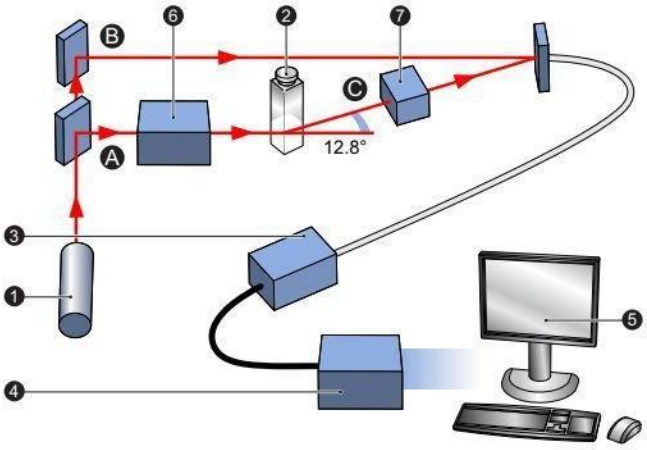

Figura 3.2 - Componentes del sistema de medición del potencial ζ. 1. Láser. 2. Celda. 3. Detector. 4. Procesador digital de señal. 5. Computadora. 6. Atenuador. 7. Ópticas de compensación. Fuente: manual de usuario del equipo Zetasizer.

La electroforesis consiste en el movimiento de una partícula cargada en un líquido bajo la influencia de un campo eléctrico. Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de un electrolito, las partículas cargadas suspendidas en el electrolito son atraídas hacia el electrodo

de carga opuesta. Las fuerzas viscosas actúan en oposición a este movimiento, por lo que, al llegar al equilibrio entre estas fuerzas, las partículas se mueven a velocidad constante, denominada movilidad electroforética.

En la Figura 3.3 se puede observar la celda utilizada para medir la movilidad electroforética. Las partículas de la muestra se mueven en dirección al electrodo con carga opuesta y su velocidad se mide mediante la técnica de LDV. Esta técnica consiste en medir la fluctuación en la intensidad de la señal de la luz dispersada, la cual es proporcional a la velocidad de las partículas. En la Figura 3.4 se muestra la incidencia del láser en la muestra y la luz dispersada por las partículas.

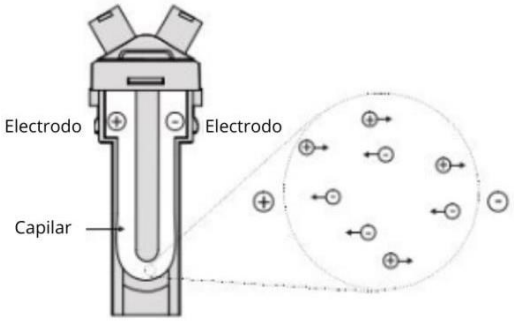

Figura 3.3- Celda para medir la movilidad electroforética. Fuente: adaptada del manual de usuario del equipo Zetasizer.

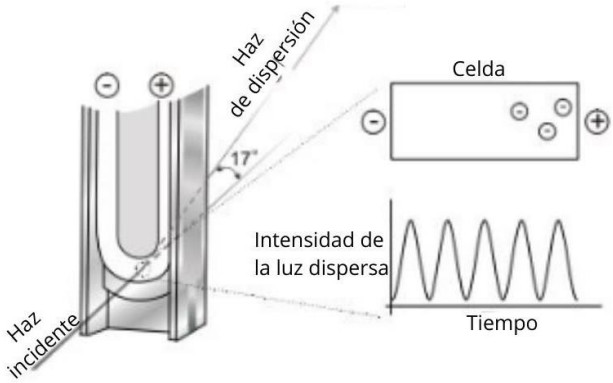

Figura 3.4 - Incidencia del láser y detección de la luz dispersada. Fuente: adaptada del manual de usuario del equipo Zetasizer.

La velocidad de las partículas depende de la fuerza del campo eléctrico, de la constante dieléctrica y viscosidad del medio y del potencial ζ. Conociendo la movilidad electroforética se puede obtener el potencial ζ aplicando la ecuación de Henry (Ecuación 3.1).

$$U_E = \frac{2\ \varepsilon\ \zeta\ f(ka)}{3\eta}$$

Ecuación 3.1. Ecuación de Henry, donde ζ es Potencial ζ, U_E es movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, η es la viscosidad y $f(ka)$ es la función de Henry.

3.2.3.1.2 Condiciones experimentales

Para llevar a cabo la medición del potencial ζ en nuestras muestras, se realizaron diluciones 1:3 v/v de cada mezcla con agua bidestilada previamente ajustada a cada pH con HCl 1,0 M. Luego, se determinó la carga superficial utilizando el equipo Nano Zetasizer ZEN 5600 (Malvern Instrument, UK). Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), utilizando un índice de refracción de 1,54 para los biopolímeros (WPI, SSPS y mezclas de WPI-SSPS) y de 1,33 para el dispersante (agua).

3.2.3.2 Turbidimetría

A cada mezcla se le midió la absorbancia a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Biochrom Libra S4 (Biochrom Instruments; UK). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

A partir de los resultados de absorbancia en función del pH, se calcularon los pH críticos de las mezclas: (1) pH_c, el pH en donde se comienzan a formar los complejos intermoleculares solubles fue determinado como un ligero incremento en la turbidez respecto de la línea de base; (2) pH_Φ, el pH en donde comienza la formación de complejos intermoleculares insolubles fue determinado extendiendo la recta tangente en ambos lados del punto de inflexión en el pH mayor al pH óptimo; (3) $pH_{opt,}$ el pH donde se da la máxima formación de complejos fue determinado en el punto de máxima absorbancia; (4) pH_d, el pH en donde se comienzan a desensamblar los complejos fue determinado extendiendo la recta tangente en ambos lados del punto de inflexión en el pH menor al pH óptimo (Zhong y col., 2021). En la Figura 3.5, se ejemplifican los puntos de pH críticos para una curva de absorbancia en función del pH.

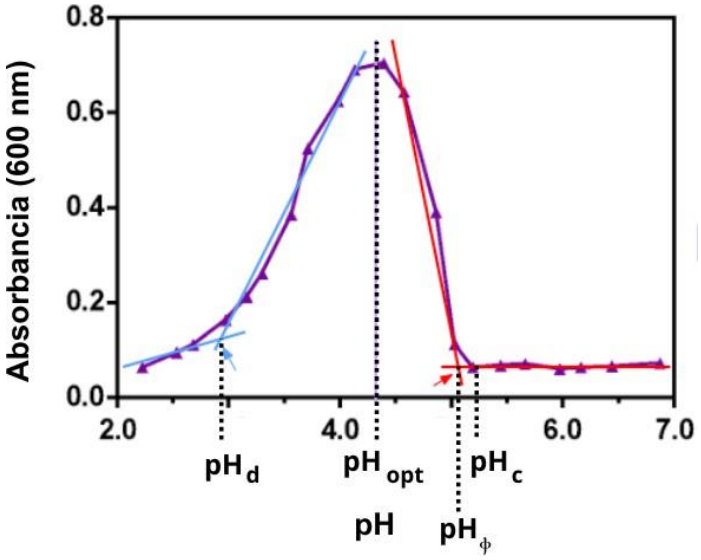

Figura 3.5 - Diagrama de cálculo de los pH críticos.

3.2.3.3 Diagrama de fases

Una porción de cada mezcla fue colocada en tubos transparentes de los cuales se tomaron fotografías en los días 0, 1, 7 y 14 luego de la preparación. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y al resguardo de la luz. A partir de estas fotografías, se catalogó el estado de dispersión de cada mezcla según la Figura 3.6.

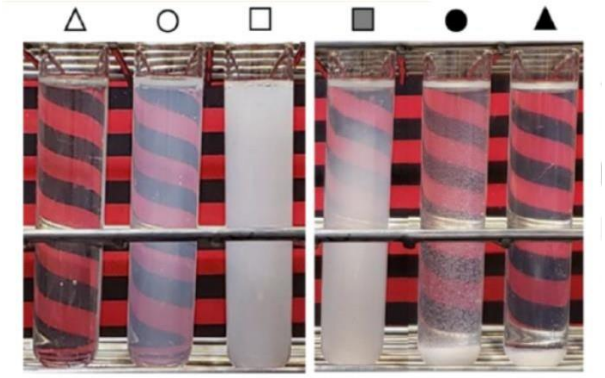

Figura 3.6 - Clasificación del estado de dispersión de las mezclas para la construcción de los diagramas de fase. Donde: Δ Suspensión traslúcida; ○ Suspensión turbia (se ve a través del tubo); □ Suspensión muy turbia (no se ve a través del tubo); ▲Precipitado y suspensión traslúcida; ● Precipitado y suspensión turbia; ■ Clarificación (sin precipitado, clarificación de la parte superior del tubo).

3.3 Determinación de los efectos del pH, la relación másica WPI:SSPS y el tratamiento térmico en las características de las NPs obtenidas

3.3.1 Preparación de las NPs WPI-SSPS

En función de los resultados obtenidos previamente, se seleccionaron 3 condiciones de pH (3,0, 3,5 y 4,0) y 3 relaciones WPI:SSPS (1:0,5, 1:0,25 y 1:0,17) en donde se obtuvieron complejos electrostáticos solubles, para analizar en profundidad el efecto de estos parámetros en las características de las NPs. Asimismo, se estudió el efecto de la aplicación de un tratamiento térmico (90 °C, 20 min). Las condiciones del tratamiento térmico fueron seleccionadas en base a resultados previos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (Cabezas y col., 2019), donde se observó que a 90 °C el WPI está completamente desnaturalizado.

Las NPs de WPI-SSPS fueron preparadas como se describió en la sección 3.2.2, mezclando la proporción apropiada de las dispersiones stock de cada biopolímero y ajustando el pH hasta el valor deseado. Además, para estudiar el efecto del tratamiento térmico, se tomaron porciones de 35,0 g de cada muestra y se calentaron en un baño térmico a 90 ± 1 °C por 20 minutos. Luego, las muestras se enfriaron hasta alcanzar temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Finalmente, la masa de agua perdida durante el calentamiento fue restituida adicionando agua bidestilada. Dispersiones de WPI y SSPS al 1,0 % m/m sin y con tratamiento térmico fueron utilizadas como muestras control.

3.3.2 Caracterización de las NPs WPI-SSPS

3.3.2.1 Distribución de tamaño de partícula

3.3.2.1.1 Fundamentos teóricos

Para medir la distribución de tamaño de partícula (DTP) se utilizó el equipo Nano Zetasizer ZEN 5600 (Malvern Instrument, UK). Este equipo determina la DTP basándose en el método denominado *Dynamic Light Scattering* (DLS). Este método mide el movimiento Browniano de las partículas y lo relaciona con el tamaño de las mismas. El movimiento Browniano se debe a las colisiones de las partículas entre ellas y con las moléculas del líquido que las rodea. Las partículas más pequeñas se mueven rápidamente, mientras que las partículas más grandes lo hacen lentamente. La relación entre el tamaño de partícula y su velocidad debido al movimiento Browniano se define mediante la ecuación Stokes-Einstein (Ecuación 3.2).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Ecuación 3.2 - Ley de Stokes-Einstein. Donde D es el coeficiente de difusión, k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad dinámica y r el radio esférico de la partícula.

Para medir su tamaño, las partículas son iluminadas con un láser (Figura 3.7) y se analiza la intensidad de la luz dispersada utilizando un detector (Figura 3.8). Cuando las partículas son iluminadas por el láser, dispersan la luz en todas las direcciones. Esta luz llega a un detector, formando un patrón con áreas brillantes y oscuras causadas por las fases constructivas y destructivas de la luz dispersada. El equipo determina la relación de la intensidad de fluctuación de la luz dispersada y la utiliza para calcular el tamaño de partícula. En el caso de las partículas grandes que se mueven lentamente, la fluctuación de la intensidad del patrón será lenta. Por otro lado, como las partículas más pequeñas se mueven rápidamente, la intensidad del patrón va a fluctuar rápidamente.

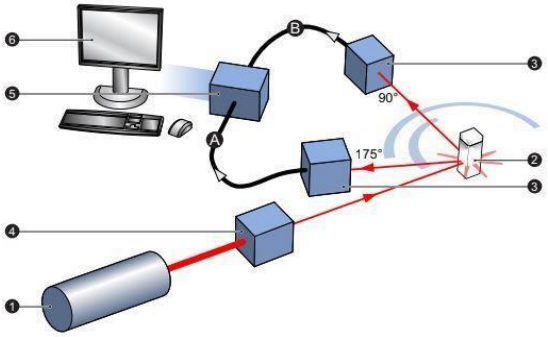

Figura 3.7 - Componentes del sistema *Dynamic Light Scattering* (DLS). 1. Láser. 2. Celda. 3. Detector. 4. Atenuador. 5. Correlacionador. 6. Computadora. Fuente: manual de usuario del equipo Zetasizer.

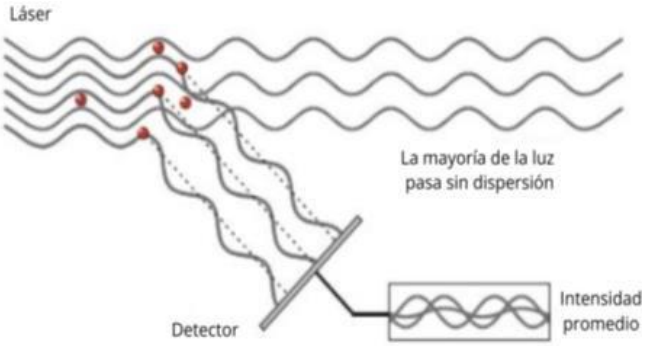

Figura 3.8 - Incidencia de la luz dispersada por las partículas en el detector. Fuente: adaptada del manual de usuario del equipo Zetasizer.

Además de la DTP, el software permite calcular el valor “tamaño promedio”, que es el diámetro hidrodinámico medio ponderado por la intensidad del conjunto de partículas medido para cada muestra. El mismo deriva de una análisis cumulante de la curva de correlación medida, en el que se supone un tamaño de partícula único y se aplica un ajuste exponencial único a la función de autocorrelación. El tamaño promedio es un valor adecuado para caracterizar muestras que presentan una única población en su DTP y puede ser un valor inadecuado para representar poblaciones multimodales (con más de una población en su DTP).

3.3.2.1.2 Condiciones experimentales

De cada muestra se realizó una dilución 1:3 v/v en agua bidestilada previamente ajustada al pH adecuado. A partir de estas diluciones, se determinó la distribución de tamaño departícula utilizando el equipo Nano Zetasizer ZEN 5600 (Malvern Instrument, UK) a 25 ± 2 °C. El láser empleado es de He-Ne y emite a 633 nm. El índice de refracción utilizado para las medidas de las muestras (WPI, SSPS o NPs WPI-SSPS) fue 1,54, mientras que el del medio dispersante (agua) fue 1,33. La determinación de tamaño se realizó en el día 0, en el día 28 y en el día 56 de almacenamiento. Durante este periodo, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y protegidas de la luz.

3.3.2.2 Potencial ζ

El potencial ζ de los controles y las NPs WPI-SSPS fue determinado como se indicó en la sección 3.2.3.1. Esta medición se realizó únicamente en el día de preparación de lasmuestras.

3.3.2.3 Hidrofobicidad aromática superficial

3.3.2.3.1 Fundamentos teóricos

En la mayoría de los trabajos publicados, para la determinación de la hidrofobicidad aromática superficial en proteínas o partículas proteicas, se utiliza la sonda 1- anilinonaftaleno-8-sulfonato (ANS); ésta es capaz de modificar su intensidad de emisión de fluorescencia dependiendo si se encuentra o no unida a parches hidrofóbicos en la superficie de dichas proteínas o partículas proteicas. Sin embargo, ANS es una molécula ionizable que puede presentar carga negativa a pH ácido cuando su grupo sulfonato se encuentra desprotonado. La presencia de carga negativa en la molécula sonda interfierecon los ensayos de hidrofobicidad que se realizan a distintos pH, dado que puede existir interacción iónica entre la sonda y las proteínas cargadas positivamente, además de las posibles

interacciones hidrofóbicas. Por ello, en este trabajo, se utilizó la sonda *N*,*N*-dimetil- 6-propionil-2-naftilamina (PRODAN).

PRODAN (Figura 3.9) es una molécula no ionizable muy sensible a la polaridad del medio en el que se encuentra. La ausencia de carga en la molécula elimina la posibilidad de que haya interacción electrostática con la fracción proteica cargada positivamente de los NPs, haciendo que la medida sea dependiente solo de la hidrofobicidad de la NPs e independiente de la carga neta de la misma y del valor de pH del medio. La sensibilidad a la polaridad del medio en el que se encuentra se puede determinar a partir de su espectro de emisión de fluorescencia, dado que presenta intensidad de fluorescencia diferencial según se encuentre en suspensión o unida a parches hidrofóbicos en la superficie de las proteínas. Es decir que, a través de la determinación de los cambios en la intensidad de fluorescencia, se puede comparar la hidrofobicidad en diversas muestras. A diferencia del ANS y debido a su insolubilidad en agua, la solución PRODAN debe ser solubilizadainicialmente en metanol.

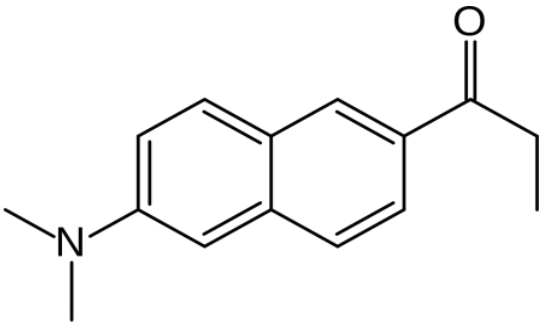

Figura 3.9 – Estructura química de la molécula de PRODAN.

3.3.2.3.2 Preparación y almacenamiento del stock de sonda PRODAN

Para la preparación de la solución se llevó a cabo el método propuesto por Alizadeh-Pasdar y Li-Chan (2000), con ligeras modificaciones. La solución stock de PRODAN se preparó en metanol grado HPLC con una concentración de 1,41 mM. Las condiciones de almacenamiento de la misma fueron en freezer a -20 °C, con una vida útil de hasta 6 meses. Al momento de realizar la determinación, se realizó una dilución 1/20 del stock en metanol (50 µL del stock y 950 µL de metanol grado HPLC). Este procedimiento se realizó cada día en que se realizó la determinación de hidrofobicidad, manteniéndose la solución diluida en baño de hielo hasta su uso.

3.3.2.3.3 Condiciones experimentales

A partir de cada muestra de NPs WPI-SSPS se realizaron 5 diluciones seriadas al medio (1/2) en agua bidestilada al pH correspondiente. Se depositaron 200 µL de cada dilución por pocillo

en una placa negra de 96 pocillos y luego se determinó la emisión de fluorescencia en el lector Cytation 5 (BioTek Instruments, EE.UU.) en su función de espectrofluorómetro. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 365 ± 9 nm y longitud de onda de emisión de 465 ± 20 nm. Luego, se agregaron 20 µL por pocillo de la sonda PRODAN diluida en metanol. Las placas se agitaron levemente por 10 minutos y se determinó nuevamente la emisión de fluorescencia. La hidrofobicidad aromática superficial (H0) se determinó como la pendiente de la recta obtenida al graficar la diferencia de emisión de fluorescencia en presencia y ausencia de la sonda (intensidad de fluorescencia con PRODAN – intensidad de fluorescencia sin PRODAN) en función de la concentración de proteína en cada muestra. Un esquema del procedimiento se presenta en la Figura 3.10.

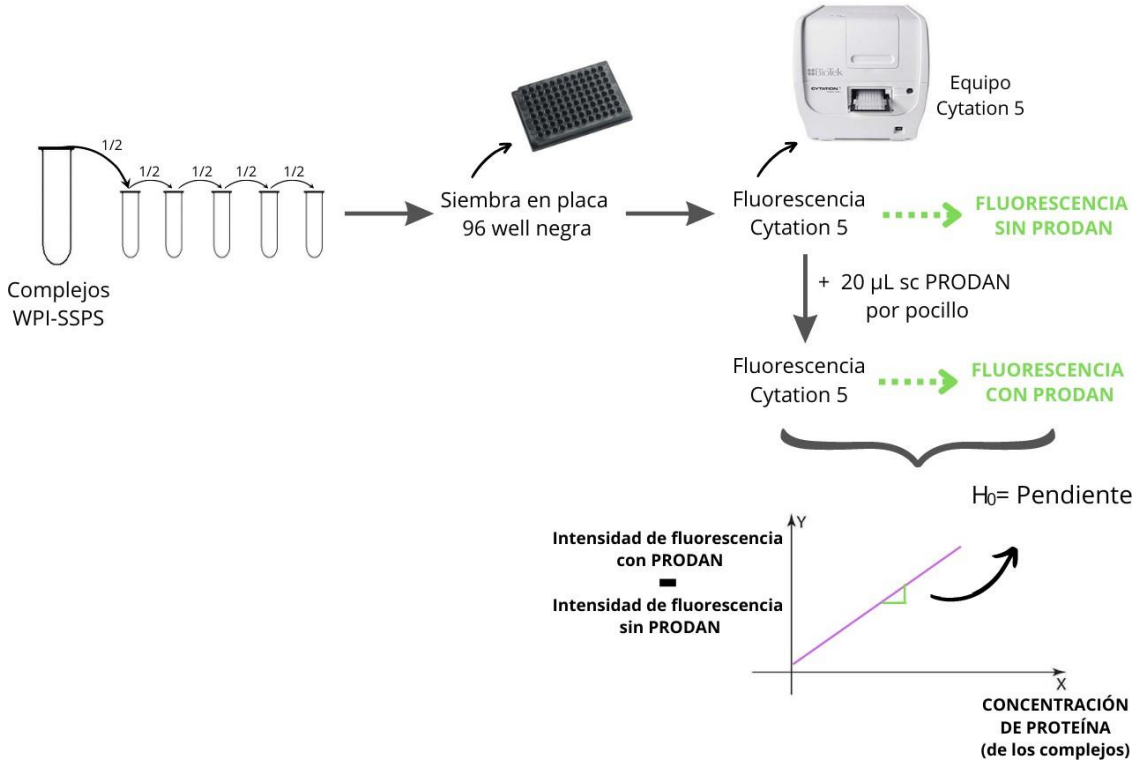

Figura 3.10 - Diagrama del método de medición de hidrofobicidad con sonda PRODAN.

Fuente:elaboración propia.

3.3.2.4 Estabilidad física

3.3.2.4.1 Fundamentos teóricos

Para analizar la estabilidad física de las NPs WPI-SSPS en dispersión se utilizó el analizador vertical de barrido Turbiscan LAB (Formulaction, Francia). Este equipo permite analizar la estabilidad física de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento, basándose en la tecnología de dispersión múltiple de la luz. Este permite monitorizar y cuantificar fenómenos de inestabilidad antes de ser detectable a simple vista.

Turbiscan LAB tiene un cabezal de detección que se mueve hacia arriba y hacia abajo a lo largo de una celda cilíndrica de vidrio de fondo plano (Figura 3.11). El cabezal de detección se compone de una fuente de luz del infrarrojo cercano (λ = 850 nm) y dos detectores síncronos. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra (0° del haz incidente), mientras que el detector de retrodispersión recibe la luz dispersada por la muestra (135° del haz incidente).

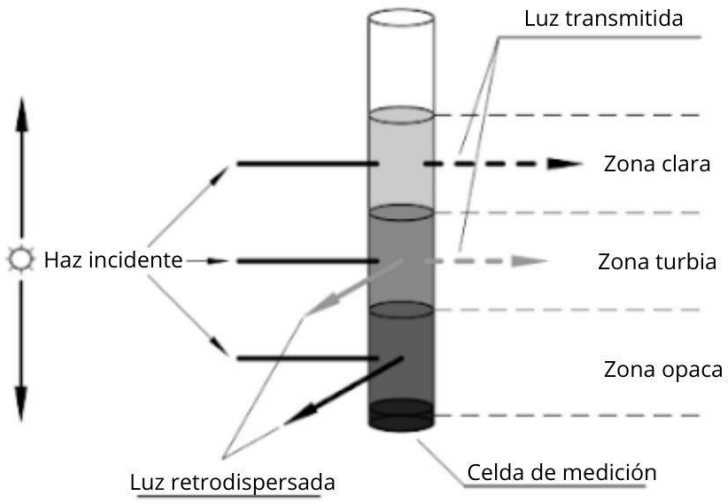

Figura 3.11 - Principios de operación del Turbiscan LAB. Fuente: adaptada de Bru y col. (2004).

Los perfiles de luz transmitida (% T) y luz retrodispersada (% BS, por *backscattering*) en función de la altura del tubo y el índice de estabilidad de Turbiscan (TSI, por *Turbiscan Stability Index*) se determinan en función del tiempo de almacenamiento y se utilizan para analizar y comparar la estabilidad de las muestras.

A través del análisis de los perfiles de % T y % BS, es posible determinar el tipo de desestabilización que cada muestra está sufriendo. Por ejemplo, si ocurriera sedimentación en una dispersión, se observaría un aumento del % BS en la zona inferior del tubo. Esta sedimentación puede ir acompañada o no de un proceso de clarificación, que se observa como un aumento del % T en la zona alta del tubo (Figura 3.12). Por otro lado, si la muestra se mantuviera estable en suspensión, no se observarían fluctuaciones en los % BS y % T a lo largo del tiempo de almacenamiento.

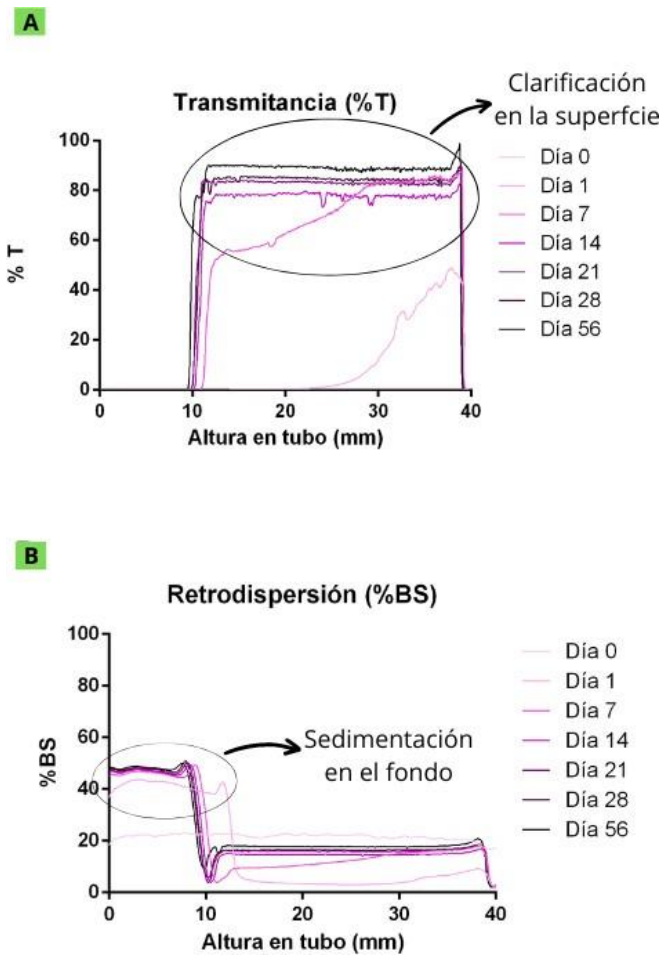

Figura 3.12 - Perfiles de (A) % T y (B) % BS para ejemplificar sedimentación y clarificación, dos posibles mecanismos de desestabilización de dispersiones.

Finalmente, el TSI resume las variaciones ocurridas en el BS de una muestra en función del tiempo, dando un número sin unidades que refleja la desestabilización del sistema. El método de cálculo de este coeficiente es el que se indica en la Ecuación 3.3. Cuanto menor sea el valor de TSI, significa que la muestra fue más estable.

$$TSI = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - x_m)^2}{N-1}}$$

Ecuación 3.3 - Cálculo de TSI. Donde x_i (i = 1, . . ., N) es la medida de BS, x_m es el valor promedio de x_i, y N es el número de escaneos.

3.3.2.4.2 Condiciones experimentales

Las dispersiones de NPs WPI-SSPS fueron colocadas en los tubos transparentes provistos por el Turbiscan LAB hasta alcanzar una altura máxima de 40 mm. Se determinaron los perfiles de % T y % BS y el TSI para cada muestra a los días 0, 1, 7, 14, 21, 28 y 56. Durante este periodo de tiempo, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y al resguardo de la luz.

3.4 Encapsulación y estabilización de CUR en las NPs de WPI-SSPS

A partir de los resultados obtenidos en la sección anterior, se seleccionaron las condiciones para obtener NPs de WPI-SSPS con las características más adecuadas para actuar como sistemas de encapsulación (menor tamaño de partícula, mayor estabilidad física y mayor hidrofobicidad aromática superficial). Las condiciones seleccionadas fueron la relación másica WPI:SSPS 1:0,5, pH 3,5, con realización de un tratamiento térmico (90 °C, 20 min). En esta sección, se evaluó la capacidad de encapsulación y estabilización de CUR en dichas NPs.

3.4.1 Cuantificación de la CUR

Para la cuantificación de la sustancia bioactiva se utilizó el lector Cytation 5 (BioTek Instruments, EE.UU.) en su función de espectrofotómetro. Inicialmente, se preparó una suspensión stock de CUR en etanol absoluto con una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente, se realizaron 11 diluciones seriadas al medio (1/2) en agua ajustada a pH 3,5 y se determinó su absorbancia a 430 nm. Por regresión lineal de los datos de absorbancia en función de la concentración de CUR se determinó la ecuación de la curva de calibración que fue y = 0,003253 * x + 0,07318, con un R^2 de 0,99 y linealidad entre 80 y 1,25 µg/mL de CUR.

Por otro lado, debido a que las NPs WPI-SSPS aportan turbidez al medio, la cual puede interferir con la medida de absorbancia de la CUR, se realizó una curva de calibración de la CUR en presencia de una concentración fija de dichas NPs WPI-SSPS. Para ello, sepreparó una suspensión de WPI-SSPS-CUR con una concentración de CUR de 100 µg/mL, mezclando proporciones adecuadas de la suspensión de NPs WPI-SSPS a pH 3,5 con el stock de CUR en etanol absoluto descrito previamente. A partir de dicha mezcla, se realizaron 9 diluciones seriadas al medio (1/2) en la suspensión de NPs WPI-SSPS a pH 3,5

y se determinó la absorbancia a 430 nm. Por regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación de la curva de calibración, que fue y = 0,01722 * x + 0,009038, con un R^2 de 0,99 y linealidad entre 100 y 1,56 µg/mL de CUR.

Ambas curvas de calibración se prepararon por duplicado en cada día de ensayo. En la Figura 3.13 se ejemplifican las curvas de calibración de CUR en agua y en presencia de las NPs WPI-SSPS.

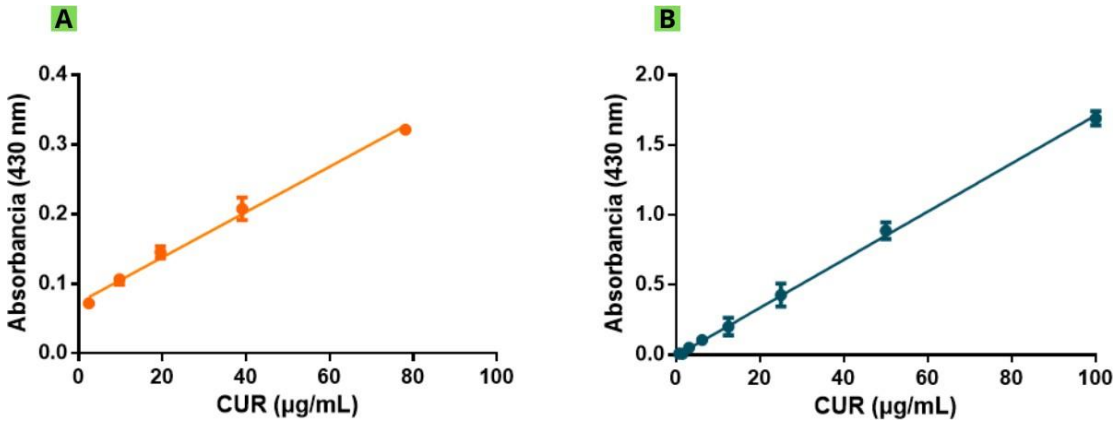

Figura 3.13 - Curvas de calibración de la CUR en agua (A) y en presencia de las NPs WPI-SSPS (B).

3.4.2 Preparación de las NPs WPI-SSPS

Para preparar las NPs WPI-SSP se siguió el protocolo descrito en la sección 3.2.2. Específicamente, los stock de WPI y SSPS se mezclaron en proporciones adecuadas para obtener una relación másica WPI:SSPS de 1:0,50, con una concentración final de 1,0 % m/m de WPI y 0,5 % m/m de SSPS. Luego, se ajustó el pH a 3,50 con una solución de HCl 1,0 M. Finalmente, se tomaron alícuotas de 35,0 g de los complejos y fueron llevadas abaño térmico a 90 ± 1,0 °C por 20 minutos. Luego, se dejaron enfriar hasta alcanzartemperatura ambiente (25 ± 2 °C). Finalmente, se ajustó la masa final a 35,0 g adicionando el agua bidestilada que se perdió durante el tratamiento térmico. Las dispersiones de NPs obtenidas se almacenaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C), protegidos de la luz, hasta que su uso fue requerido.

3.4.3 Determinación de la eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de CUR en NPs

Para el encapsular la CUR en NPs WPI-SSPS, se utilizó el método descrito previamente en Yi y col. (2021), con pequeñas modificaciones. Específicamente, se tomó el volumen apropiado de la suspensión de CUR en etanol (10 mg/ml) y se agregó gota a gota a la dispersión de NPs WPI-SSPS en agitación, para alcanzar diferentes concentraciones de bioactivo (20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml). La concentración máxima de etanol se estableció en 1,0 % v/v. Como control, se realizó el mismo procedimiento adicionando el volumen adecuado de suspensión de CUR en agua a pH 3,5 (en reemplazo de la dispersión de NPs). Las dispersiones obtenidas se agitaron por dos horas a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 6790 RFC durante 10 minutos a 10 °C para precipitar la CUR que quedó libre e insoluble (no encapsulada en las NPs). Finalmente, se cuantificó la cantidad de CUR en suspensión a través de la determinación de absorbancia a 430 nm, utilizando las respectivas curvas de calibración.

La eficiencia de encapsulación (EE, %) y la capacidad de carga (LC, por *loading capacity*, µg/mg) se calcularon utilizando las ecuaciones 3.4 y 3.5, respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{(Cantidad\ de\ CUR\ encapsulada, \mu g)}{(Total\ de\ CUR\ agregada, \mu g)} * 100$$

Ecuación 3.4 - Ecuación para el cálculo de la eficiencia de encapsulación (EE).

$$LC(\mu g/mg) = \frac{(Cantidad\ de\ CUR\ encapsulada, \mu g)}{(Masa\ de\ NPs, mg)} * 100$$

Ecuación 3.5 - Ecuación para el cálculo de la capacidad de carga (LC).

3.4.4 Caracterización de las NPs-CUR

La distribución de tamaño de partícula (DTP), el tamaño promedio y el potencial ζ de las NPs y NPs-CUR se determinaron a temperatura ambiente (25 ± 2°C) en Nano ZetasizerZEN 5600, según los métodos descritos previamente en las secciones 3.3.2.1 y 3.2.3.1, respectivamente.

3.4.5 Determinación de la estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas

Para este ensayo, se prepararon tres muestras diferentes: NPs-CUR (100 µg/ml de CUR en NPs de WPI-SSPS), NPs WPI-SSPS (sin CUR) y CUR libre (100 µg/ml de CUR en agua a pH 3,5). Para estudiar la estabilidad, se decidió someter cada muestra a distintas temperaturas de almacenamiento, según:

- 4 °C para recrear un ambiente de refrigeración en heladera.
- 25 °C (temperatura ambiente) para recrear las condiciones de góndola.
- 37°C para recrear el ambiente dentro del cuerpo humano una vez ingerido.

En intervalos de tiempos predeterminados de 0, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 horas, se tomaron muestras para su análisis. Particularmente, para determinar la estabilidad de las NPs en dispersión, se realizó un seguimiento del tamaño de partícula según los métodos descritos anteriormente en la sección 3.3.2.1. Por otro lado, para determinar la estabilidad química de la CUR, se realizó un seguimiento de su absorbancia a 430 nm según se describió en la sección 3.4.1.

3.4.6 Determinación de la estabilidad frente al proceso de pasteurización

Para este ensayo, se prepararon tres muestras diferentes: NPs-CUR (100 µg/ml de CUR en NPs de WPI-SSPS), NPs WPI-SSPS (sin CUR) y CUR libre (100 µg/ml de CUR en agua a pH 3,5). Estas muestras se pasteurizaron en baño térmico a 65 °C por 30 minutos y luego se dejaron enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Para determinar la estabilidad de las NPs frente a este proceso, se realizó un seguimiento del tamaño de partícula y del potencial ζ según los métodos descritos anteriormente en las secciones 3.3.2.1 y 3.2.3.1, respectivamente. Por otro lado, para determinar la estabilidad química de la CUR, se realizó un seguimiento de su absorbancia a 430 nm según se describió en la sección 3.4.1.

3.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Todas las preparaciones y los ensayos fueron realizados al menos por duplicado y los resultados fueron expresados como promedio ± desvío estándar.

El procesamiento de los datos, las representaciones gráficas y el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo fueron realizados utilizando el programa Graph Pad Prism 6.0. Dependiendo de la naturaleza de los datos, para el análisis estadístico de los resultados se utilizaron análisis de varianza de una (*one-way* ANOVA) o dos vías (*two-way* ANOVA), seguidos por el correspondiente análisis de múltiples comparaciones (Dunnet, Tukey o Bonferroni). Sólo se consideraron como significativos los valores de $p < 0,05$.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en la sección 3.3 fueron analizados por la metodología de superficie de respuesta utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI v16.1.18 (StatPoint Technologies Inc., USA). Es decir que los efectos de cada factor experimental (pH, relación másica WPI:SSPS y tratamiento térmico) sobre los resultados experimentales obtenidos en la caracterización (potencial ζ, tamaño promedio, hidrofobicidad superficial y TSI) se examinaron utilizando el diseño multifactorial 3x2. Para cada factor experimental se determinaron los niveles, según:

- pH: bajo (3,0), central (3,5) y alto (4,0).
- Relación WPI:SSPS: bajo (1:0,5, corresponde a 2 veces más WPI que SSPS), medio (1:0,25, corresponde a 4 veces más WPI que SSPS) y alto (1:0,17, corresponde a 6 veces más de WPI que SSPS).
- Tratamiento térmico: bajo (sin tratamiento, 25 °C) y alto (con tratamiento, 90 °C).

Para cada uno de estos niveles, se le brindó al software el resultado experimental (respuesta) obtenido para cada parámetro de caracterización correspondiente. Con esta información, se generaron las superficies de respuestas que expresan la variable respuesta como una función de los factores experimentales. Además, se obtuvo la información vinculada a si el efecto de cada factor era significativo ($p < 0,05$) y si existían interacciones entre los factores.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización de las condiciones de pH y relación proteínas: polisacáridos para asegurar la interacción de WPI y SSPS y obtener NPs

Con el fin de optimizar las condiciones de interacción entre WPI y SSPS y asegurar la obtención de nanopartículas (NPs) autoensambladas, se estudiaron distintas condiciones de pH (7,0 a 2,0 cada 0,5 unidades de pH) y distintas relaciones másicas WPI:SSPS (1:1, 1:0,5, 1:0,25, 1:0,17, 1:0,125, y 1:0,1). Las mezclas obtenidas en cada condición fueron caracterizadas por potencial ζ, turbidimetría y diagrama de fases obteniendo los resultados que se detallan y analizan a continuación.

4.1.1 Potencial ζ

El control de WPI presentó un pH inicial de 7,00 ± 0,02 y un potencial ζ inicial negativo. A medida que se fue acidificando el medio, el potencial ζ se fue incrementando hasta alcanzar valores positivos (Figura 4.1). A partir de estos resultados, se pudo estimar que el pI del WPI es 4,33, ya que es el valor de pH en el que el potencial ζ fue cero. Es decir que, al aumentar el pH por sobre 4,33, el WPI presentó carga neta negativa, mientras que, al disminuir el pH por debajo de 4,33, presentó carga neta positiva. Esto se debió a que, en medios ácidos (pH < 4,33), ocurre la protonación de los grupos carboxílicos de las cadenas proteicas, dando lugar a que tengan un balance de carga positivo, mientras que en medios por encima del pI (pH > 4,33), los grupos carboxílicos de las cadenas proteicas se desprotonan, dando lugar a un balance negativo. Si el pH se continuase aumentando hacia medios básicos (pH > 9), ocurriría la desprotonación de los grupos aminos de las cadenas proteicas, incrementando aún más la carga negativa de las proteínas, sin embargo, esta situación de pH no es común en alimentos. Estos resultados concuerdan los estudios previos que reportaron un pI para WPI de 4,3 - 4,5 (Behrouzain y col., 2020; Yi y col., 2021; Zhong y col., 2021).

Por otro lado, el control de SSPS presentó un pH inicial de 5,80 ± 0,04. Los SSPS presentaron un potencial ζ negativo en todo el intervalo de pH analizado y un pKa cercano a 2,50 (Figura 4.1). Cabe destacar que la intensidad de la carga negativa del SSPS disminuyó a medida que disminuyó el pH. Este fenómeno se fundamenta a partir de que cuanto más ácido es el medio, mayor será la cantidad de grupos carboxílicos del SSPS que se encuentran protonados y, por ende, dejen de aportar carga negativa a las cadenas de polisacáridos. Estos resultados

concuerdan con los reportados previamente por Zhao y col. (2018).

Considerando los resultados de potencial ζ de ambos controles, se logró definir un rango de pH de compatibilidad termodinámica entre 2,50 y 4,33 (entre el pKa del SSPS y el pI del WPI), dado que en dicho rango ambos biopolímeros poseen cargas netas opuestas (Figura 4.2). Para confirmar dichos resultados, se determinó el potencial ζ de una mezcla WPI:SSPS 1:0,25 en función del pH (Figura 4.1). Se observó un potencial ζ cercano a cero en todo el rango de pH previamente mencionado, lo que confirma la interacción de los biopolímeros en dichas condiciones. Se asume que las interacciones proteínas- polisacáridos más fuertes ocurren cuando la carga eléctrica de las mezclas se encuentra cercana a la neutralidad.

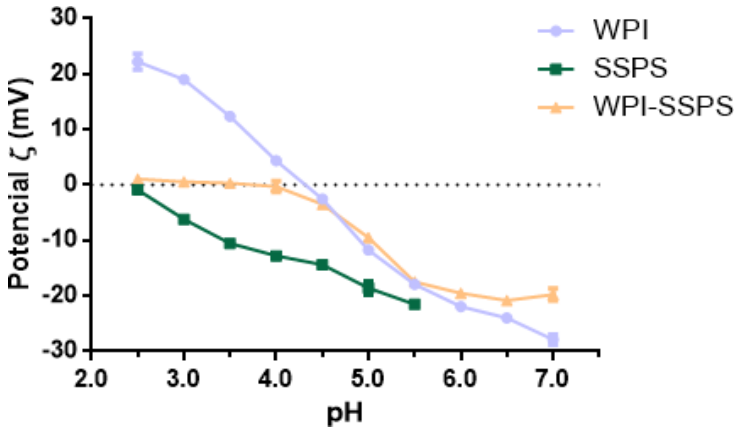

Figura 4.1 - Potencial ζ de WPI, SSPS y WPI-SSPS 1:0,25 en función del pH.

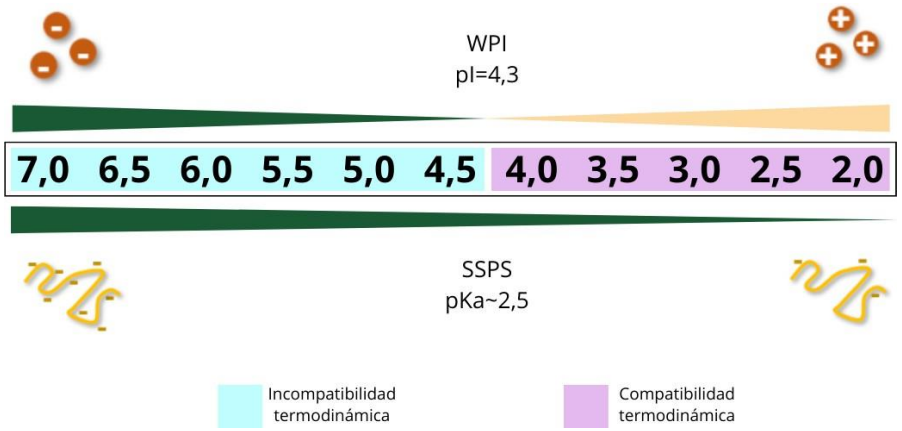

Figura 4.2 - Escala de pH donde se evidencia el rango de compatibilidad termodinámica entre WPI y SSPS debido a la oposición de cargas.

4.1.2 Turbidimetría

En la Figura 4.3 se presentan los resultados obtenidos por turbidimetría para los controles WPI y SSPS y las mezclas en diferentes condiciones de pH.

Para el control de WPI se observaron cambios marcados en la turbidez a medida que se fue acidificando el medio (Figura 4.3 A). Específicamente, en el rango de pH entre 3,5 y 5,0, la turbidez de las muestras se vio incrementada sustancialmente. Este incremento en la turbidez en condiciones de pH cercanas al pI podría deberse a la formación de agregados proteicos de gran tamaño capaces de dispersar la luz. Estos agregados proteicos se podrían formar debido a la menor repulsión entre las proteínas en dichas condiciones de pH (Behrouzain y col., 2020; Zhong y col., 2021).

Por otro lado, para el control de SSPS no se observaron cambios significativos en la turbidez de las muestras a medida que se fue acidificando el medio, lo que se correlaciona con muestras traslúcidas y estables en todo el rango de pH estudiado (Figura 4.3 A).

Finalmente, para las mezclas WPI:SSPS con relaciones másicas desde 1:1 hasta 1:0,1 se observaron distintos patrones de turbidez. Particularmente, se observó que todas las mezclas de WPI-SSPS presentaron una turbidez marcadamente menor a la del control de WPI en los valores de pH cercanos al pI, lo cual se puede deber a que los complejos formados presentan un menor tamaño de partícula que los agregados proteicos formadosen ausencia de polisacárido, que serían los responsables de aumentar la turbidez (Figura 4.3 A).

Adicionalmente, se observó que a medida que aumentó la concentración de SSPS disponible (de 1:0,1 a 1:1), la mayor turbidez se obtuvo a pH menores que para el control de WPI (Figura 4.3 B). Esto podría significar que la interacción WPI-SSPS da lugar a complejos con un pI menor al pI de la proteína libre (Ghadermazi y col., 2019 y 2020). Resultados similares fueron reportados por Klemmer y col. (2012) para mezclas entre PPI y alginato de sodio en relaciones másicas proteínas:polisacáridos desde 20:1 a 1:1.

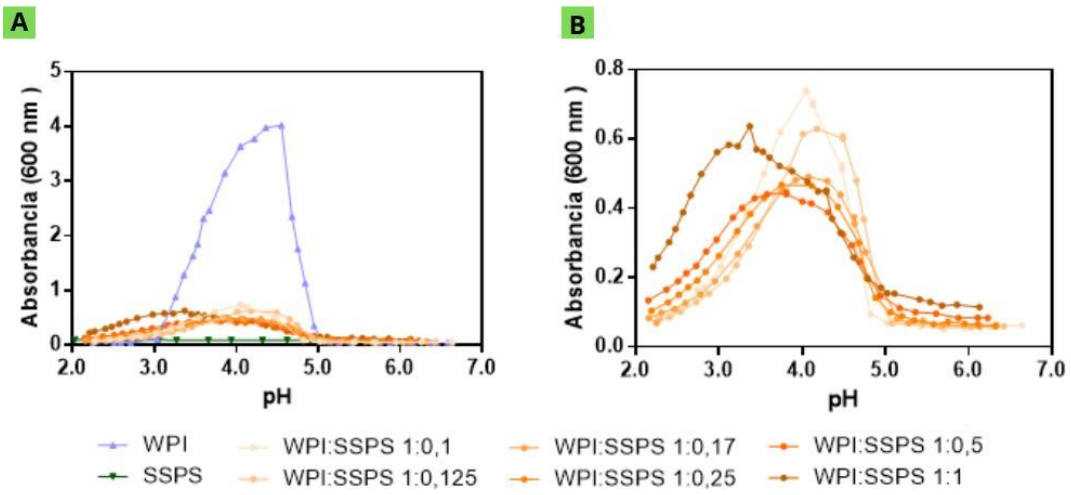

Figura 4.3 - (A) Absorbancia a 600 nm de WPI, SSPS y las mezclas WPI:SSPS en distintas condiciones de pH. (B) Absorbancia a 600 nm de las mezclas WPI:SSPS en distintas condiciones de pH.

En la Figura 4.4 se presentan los valores de pH críticos calculados a partir de los resultados de absorbancia en función del pH.

En primer lugar, en condiciones de $pH>pH_c$, WPI y SSPS coexisten como moléculas individuales (co-solubilidad) debido a la repulsión electrostática entre biopolímeros fuertemente negativos y por impedimentos estéricos debido a la elevada hidratación de cada biopolímero. No se hallaron diferencias significativas en los pH_c para ninguna relación WPI:SSPS ($p > 0,05$).

En segundo lugar, cuando $pH_c>pH>pH_\Phi$, WPI y SSPS interactúan entre sí formando complejos intramoleculares solubles. Esto puede suceder incluso por encima del pI del WPI, ya que los SSPS pueden unirse a las zonas positivas de la superficie de la proteína, aunque tanto la proteína como el polisacárido tengan una carga neta negativa (Behrouzain y col., 2020; Jones, Decker y McClements, 2010). De acuerdo con esto, Hadian y col. (2016), reportaron interacciones entre β-lactoglobulina y la fracción soluble de la goma persa en condiciones de pH mayores al pI. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en pH_Φ para ninguna de las relaciones WPI:SSPS.

En tercer lugar, cuando $pH_\Phi>pH> pH_d$, pasando por el pH_{opt}, WPI y SSPS interactúan entre sí formando complejos insolubles. Es importante resaltar que estos complejos son estables en suspensión (como discutiremos en el diagrama de fases), presumiblemente por presentar un pequeño tamaño. El rango en el cual se forman los complejos electrostáticos (entre pH_c y pH_d) fue ampliándose a medida que aumentó la relación WPI:SSPS desde 1:0,10 a 1:1 (variando la cantidad de SSPS y dejando fija la cantidad de WPI), debido a que pH_d fue

disminuyendo significativamente desde 3,0 en WPI:SSPS 1:0,10 a 2,5 en WPI:SSPS 1:1 ($p<0,01$). Específicamente, tanto pH_{opt} como pH_d presentaron diferencias significativas ($p<0,05$) para las proporciones 1:1, 1:0,50, 1:0,25 y 1:0,17, mientras que no se hallaron diferencias significativas para estos parámetros en las proporciones 1:0,17, 1:0,125, y 1:0,10. Las mismas tendencias fueron observadas en otros sistemas biopoliméricos como WPI-alginato de sodio en relaciones 6:1 y 2:1 y en PPI-HMP en relaciones entre 20:1 y 1:1 (Fioramonti y col., 2014; Lan, Chen y Rao, 2018).

En último lugar, cuando $pH < pH_d$, los complejos WPI-SSPS se desensamblan probablemente debido a la pérdida de carga de las moléculas de SSPS, las cuales alcanzanel pKa de sus grupos ácidos.

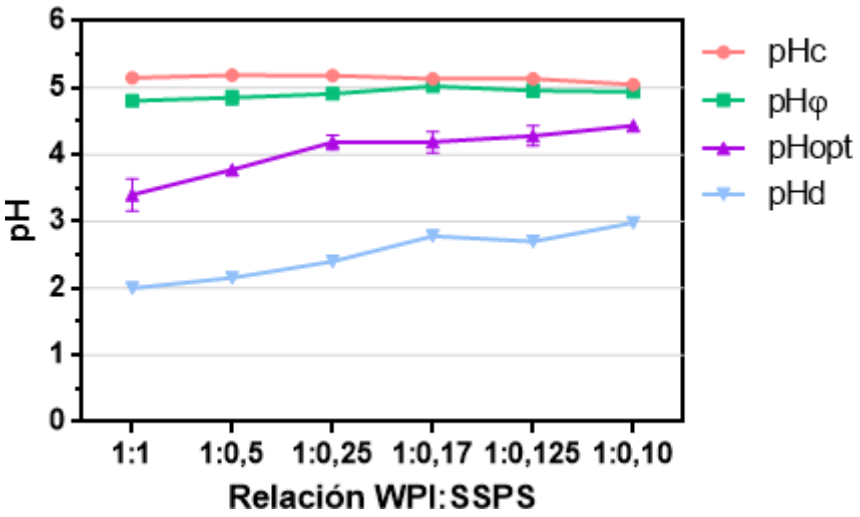

Figura 4.4 – Valores de pH críticos en la formación de complejos WPI-SSPS para distintas relaciones másicas WPI:SSPS.

4.1.3 Diagrama de fases

En la Figura 4.5 se presentan las fotografías realizadas a lo largo del almacenamiento para los controles de WPI. En el día de preparación, se observó un incremento de la turbidez en condiciones de pH cercanas al pI (entre 3,5 y 5,0). Luego de un día de almacenamiento, se observó la aparición de precipitados en dicho rango de pH. La precipitación del WPI es consistente con la formación de agregados proteicos de gran tamaño con una elevada capacidad de dispersar la luz, lo que coincide con los resultados obtenidos por turbidez en el día de preparación. Además, la precipitación del WPI en condiciones ácidas es uno de los grandes desafíos para incorporar esta fuente proteica en alimentos de carácter ácido. Este hecho, sumado a los resultados obtenidos sobre el potencial ζ del control de WPI, permiten asociar a la turbidez inicial de las muestras y a la posterior precipitación de las mismas durante

el almacenamiento con fuerzas electrostáticas de repulsión débiles entre las moléculas de proteínas a pH cercanos al pI (4,33).

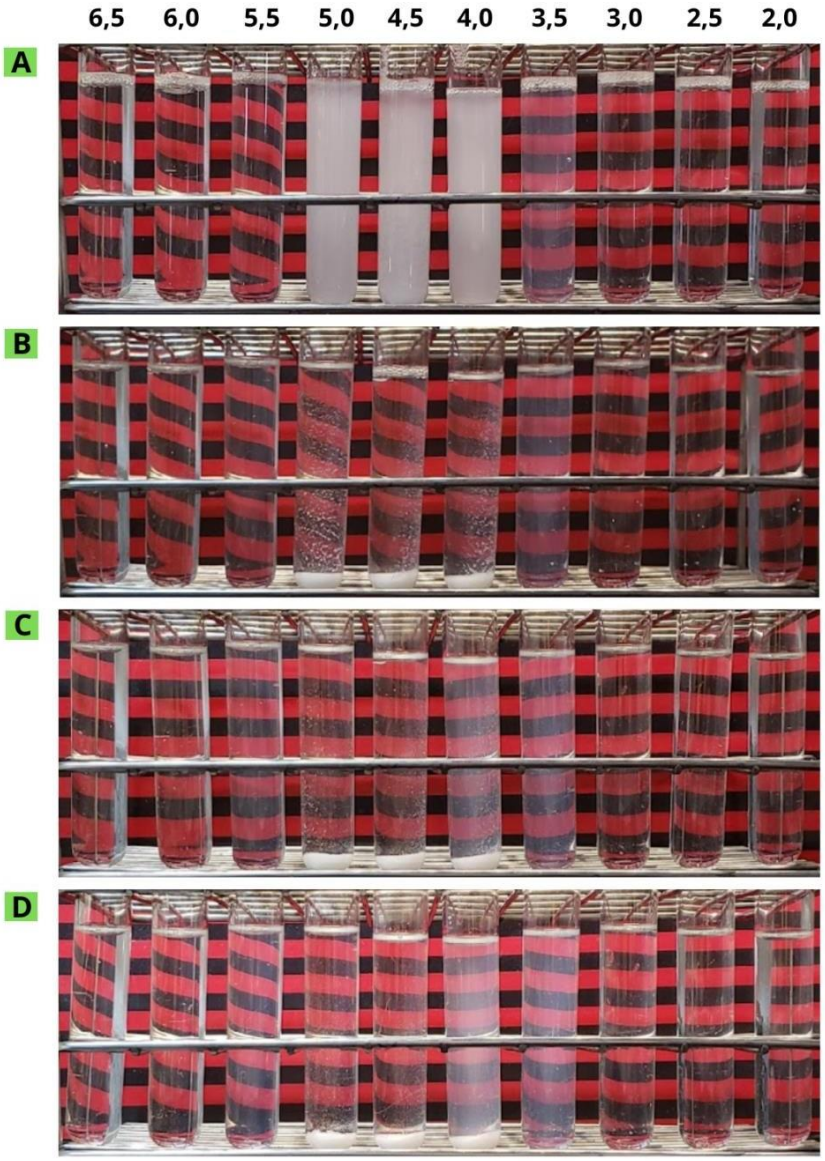

Figura 4.5 - Fotografías de los controles de WPI en función del pH al día (A) 0, (B) 1, (C) 7 y (D) 14 luego de la preparación.

En la Figura 4.6 se presentan las fotografías realizadas a lo largo del almacenamiento para los controles de SSPS. En este caso, no se observaron cambios en la turbidez ni en la estabilidad de las muestras ni siquiera luego de los 14 días de la preparación, demostrando la gran dispersabilidad y estabilidad de este polisacárido.

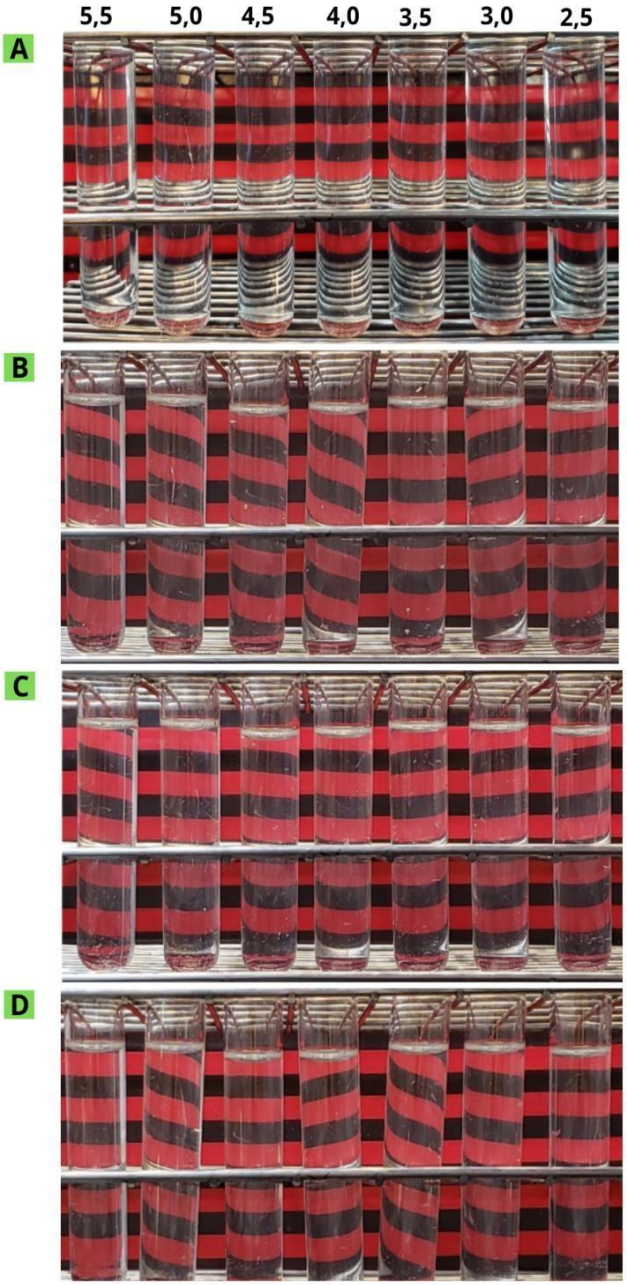

Figura 4.6 - Fotografías de los controles de SSPS en función del pH al día (A) 0, (B) 1, (C) 7 y (D) 14 luego de la preparación.

En la Figura 4.7 se presentan las fotografías realizadas a lo largo del almacenamiento para las mezclas WPI:SSPS. A partir de las mismas se observan diferentes grados de turbidez dependiendo del pH. Del mismo modo que para WPI, la mayor turbidez se presentó en el rango de pH de formación de complejos (2,5 - 4,3). Notablemente, para las mezclas WPI-SSPS, se visualizaron suspensiones turbias o muy turbias, pero sin la presencia de precipitado en todos los días de estudio. Este resultado demuestra que los SSPS interaccionan exitosamente con el WPI, dando lugar a complejos que se mantienen estables en dispersión incluso cuando se alcanza el pI de WPI. Por otro lado, se observó que a

medida que aumentó la concentración de SSPS utilizada (desde 1:0,1 a 1:1), la mayor turbidez se obtuvo a pH menores que para el control de WPI. Esto podría significar que la interacción WPI-SSPS da lugar a complejos con un pI menor al de la proteína libre. Así también, se puede observar que a medida que se incrementó la concentración de SSPS utilizada, el rango de pH en el que los complejos se forma es mayor (pasando de un rango 5,0 a 3,0 en la relación 1:0,1 a un rango de 5,0 a 2,5 en la relación 1:1). Azarikia y Abbasi (2016) reportaron comportamientos de fases similares para mezclas de WPI y la fracción soluble de la goma tragacanto y goma persa.

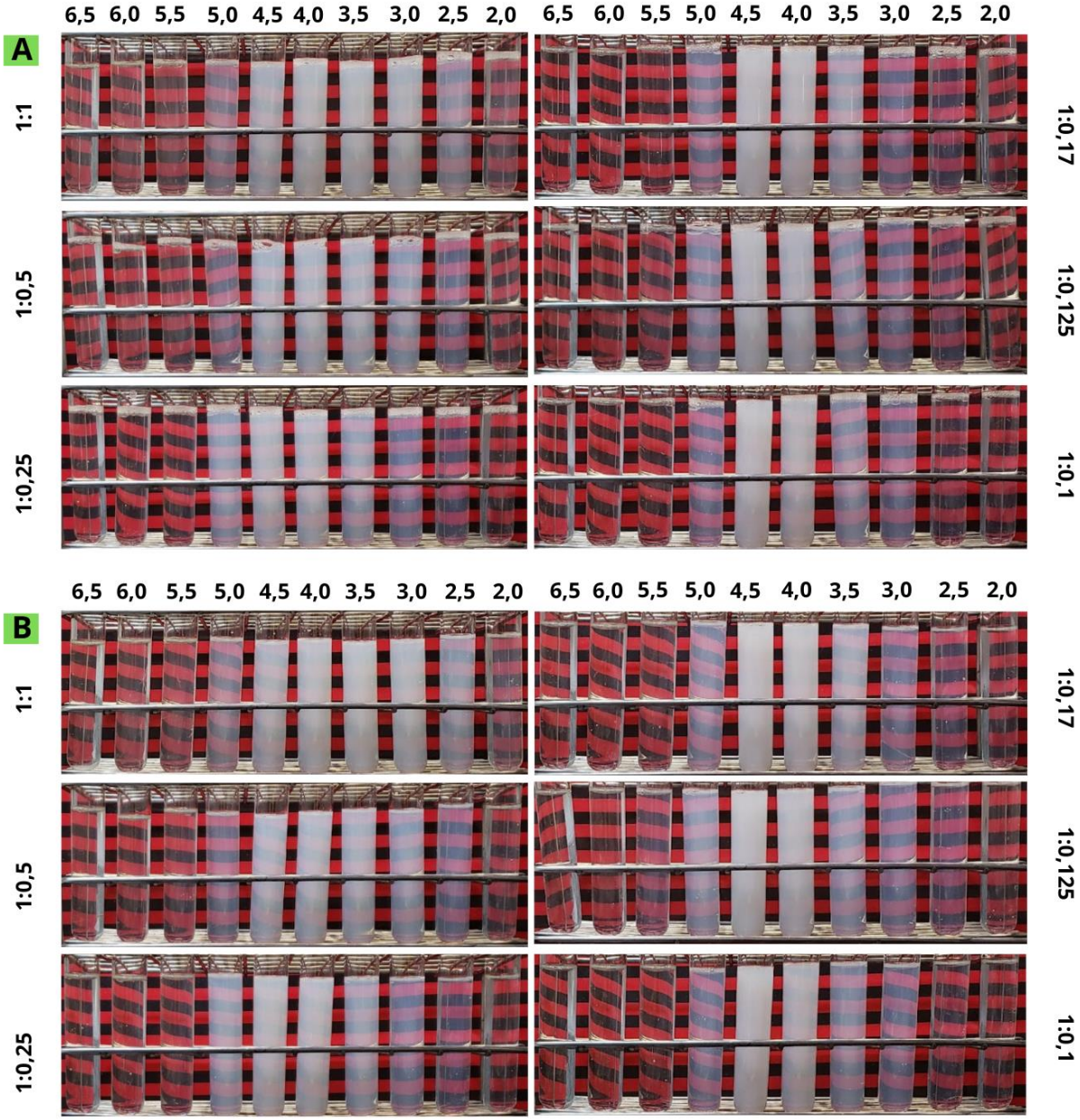

Figura 4.7 - Fotografías de las mezclas de WPI:SSPS en función del pH al día (A) 0, (B) 1, (C) 7 y (D) 14 luego de la preparación.

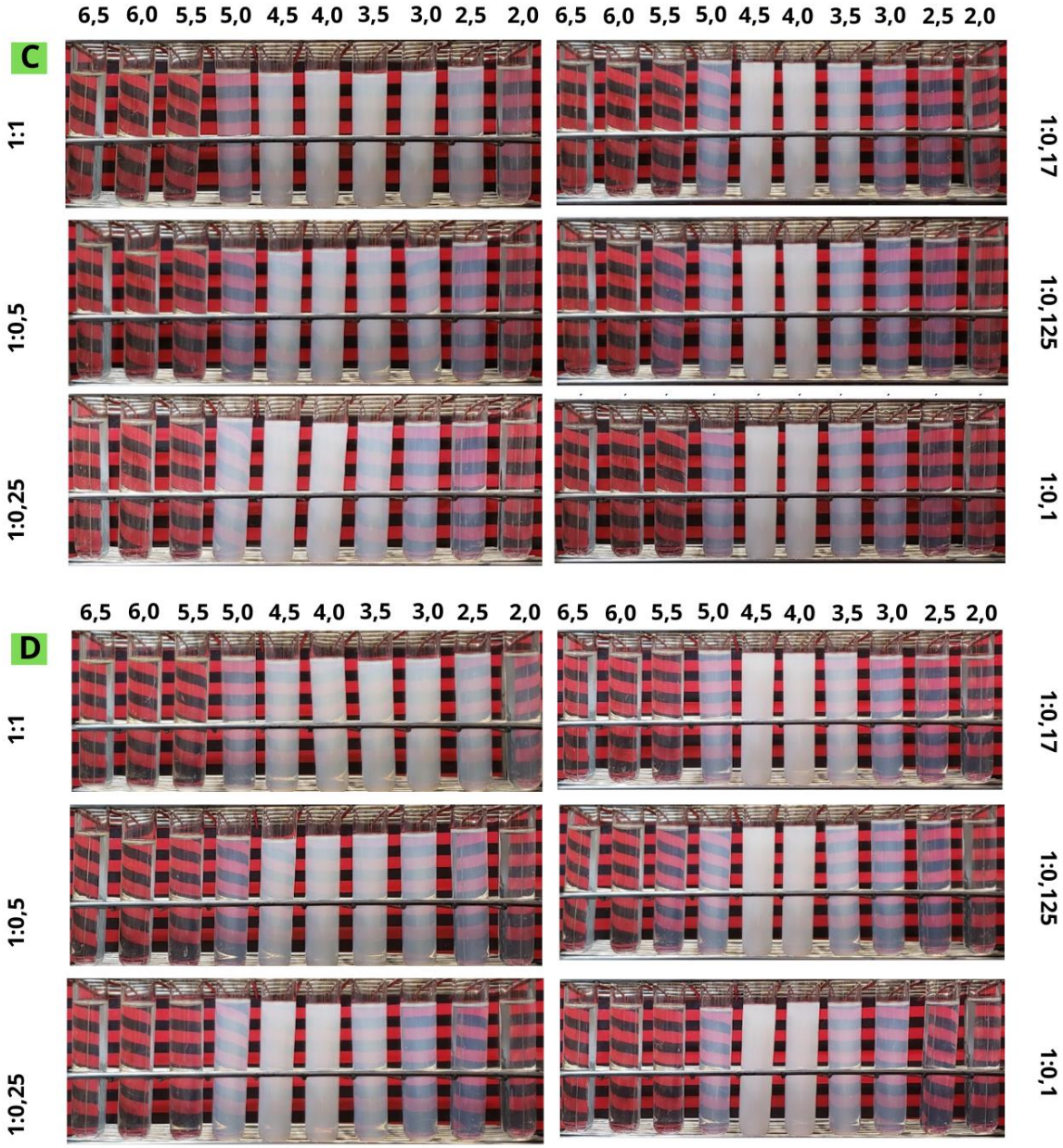

Figura 4.7 – (continuación) Fotografías de las mezclas de WPI:SSPS en función del pH al día (A) 0, (B) 1, (C) 7 y (D) 14 luego de la preparación.

En la Figura 4.8 se presentan los diagramas de fases construidos a partir de las fotografías descritas para cada día de almacenamiento. Al comparar los diagramas de fase, se puede ver que no hubo modificaciones en las muestras entre el día 7 y el día 14. La estabilidad incrementada de las mezclas se debió a la interacción entre el WPI y el SSPS, la cual evitó que el WPI precipitase en condiciones de pH cercanas a su pI.

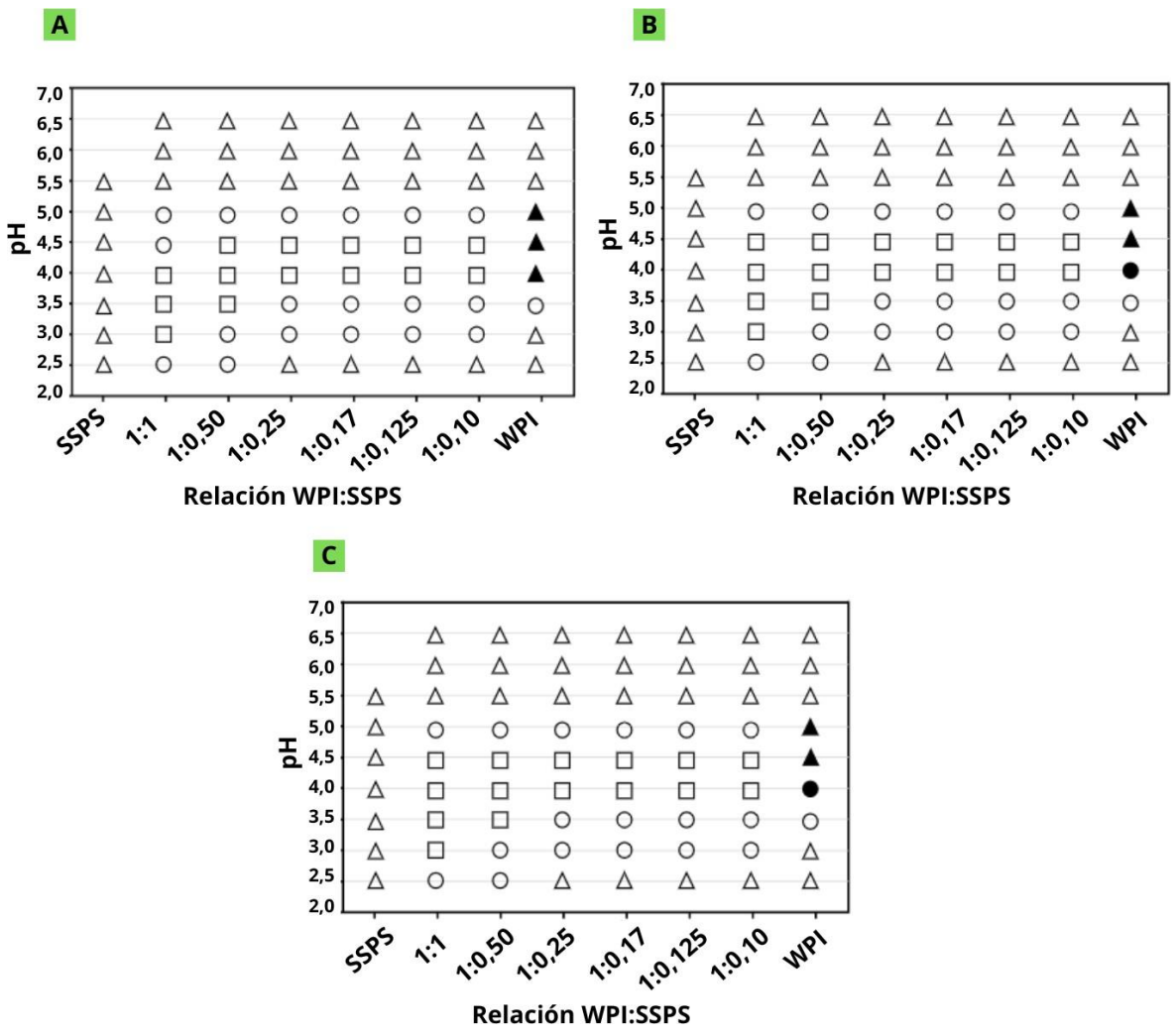

Figura 4.8 - Diagrama de fases obtenidos por clasificación de las muestras según: Δ Suspensión traslúcida; ○ Suspensión turbia (se ve a través del tubo); □ Suspensión muy turbia (no se ve a través del tubo); ▲ Precipitado y suspensión traslúcida; ● Precipitado y suspensión turbia; ■ Clarificación (sin precipitado, clarificación de la parte superior del tubo), al día 1 (A), 7 (B) y 14 (C) de almacenamiento.

4.1.4 Selección de condiciones para obtención de NPs WPI-SSPS

A partir de los resultados obtenidos, se eligieron las condiciones para asegurar el autoensamblaje electrostático entre WPI y SSPS y la formación de NPs.

Específicamente, se seleccionaron condiciones de pH de 3,0, 3,5 y 4,0 debido a que las interacciones de atracción electrostáticas están aseguradas en ese rango, es decir, se asegura que WPI tenga carga neta positiva para que interactúe con los SSPS con carga neta negativa.

Por otro lado, se seleccionaron las relaciones másicas WPI:SSPS 1:0,5; 1:0,25 y 1:0,17 porque dieron lugar a suspensiones estables en el tiempo de almacenamiento, evitando la precipitación de WPI en medio ácido, y porque fueron en las que se observaron mayores diferencias en sus pH críticos de acuerdo con la Figura 4.4.

4.2 Determinación de los efectos del pH, la relación másica WPI:SSPS y el tratamiento térmico en las características de las nanopartículas obtenidas

Para realizar una caracterización más profunda, se evaluaron los efectos del pH y la relación WPI:SSPS, en los rangos previamente seleccionados, sobre las características de las NPs WPI-SSPS. Además, se evaluó el efecto de un tratamiento térmico a 90 °C durante 20 minutos. Las NPs WPI-SSPS obtenidas en cada condición fueron caracterizadas por potencial ζ, distribución de tamaño de partícula, hidrofobicidad superficial y estabilidad física obteniendo los resultados que se detallan y analizan a continuación.

4.2.1 Potencial ζ

En la Figura 4.9 se presentan los valores de potencial ζ obtenidos en el día de preparación de las NPs.

El control de SSPS presentó un potencial ζ negativo en todo el rango de pH, observándose una disminución de su módulo a medida que el pH se acercó al pKa. Además, en el control de SSPS, no se observó un cambio significativo en el potencial ζ luego de realizar el tratamiento térmico. Estos resultados concuerdan con los descriptos anteriormente en la sección 4.1.1.

Por su parte, el control de WPI presentó un potencial ζ positivo en todas las condiciones de pH estudiadas, cuyo módulo se incrementó a medida que el pH se alejó del pI. En este caso, el tratamiento térmico generó un incremento significativo del potencial ζ en las muestras de WPI a pH 3,0 y pH 3,5. Esto podría deberse a que el despliegue de las cadenas proteicas modifica la cantidad de grupos cargados expuestos en la superficie delas proteínas o de los agregados proteicos. Resultados análogos fueron reportados para la α-lactoalbúmina luego del tratamiento a 70 °C (Li y Zhao, 2018).

Por otro lado, en las NPs WPI-SSPS se observó que el potencial ζ se modificó en función del pH, de la relación másica WPI:SSPS y del tratamiento térmico. Según el análisis estadístico realizado en estos datos, el tratamiento térmico ejerció un efecto significativo en el potencial ζ para la mayoría de las muestras, observándose un incremento del módulo luego del tratamiento térmico. Esta variación podría significar que, luego del tratamiento térmico, existe una mayor cantidad de grupos cargados expuestos en la superficie o bien que se modifica el patrón de grupos ácidos y básicos expuestos en la superficie de las NPs WPI-SSPS.

Con respecto a la relación WPI-SSPS, dentro de un mismo valor de pH se observó que, a medida que disminuyó la concentración de SSPS en la mezcla, el potencial ζ se tornó cada vez más positivo. Esto puede explicarse debido a la menor cantidad de grupos con carga negativa aportados por el SSPS que no logra contrarrestar las cargas positivas del WPI. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos previamente para complejos WPI- ácido hialurónico a diferentes relaciones proteínas:polisacáridos, donde el potencial ζ se tornó negativo al aumentar la cantidad de ácido hialurónico debido al incremento de grupos aniónicos provistos por el polisacárido (Zhong y col., 2021). Del mismo modo, resultados similares se han reportado para complejos WPI-pectina, donde el potencial ζ pasó de valores negativos a positivos al incrementar la relación pectina:WPI desde 1:2 hasta 1:30,es decir, al disminuir la concentración de pectina (Zamani y col., 2020).

Con respecto al pH, para una misma relación WPI:SSPS, se observó que, a medida que disminuyó el pH, el potencial ζ se tornó más positivo. Esto se explica a partir del comportamiento que tiene WPI ante cambios de pH. A medida que el mismo disminuye, hay una mayor cantidad de grupos de carga positiva aportados por la proteína para contrarrestar la carga negativa aportada por SSPS.

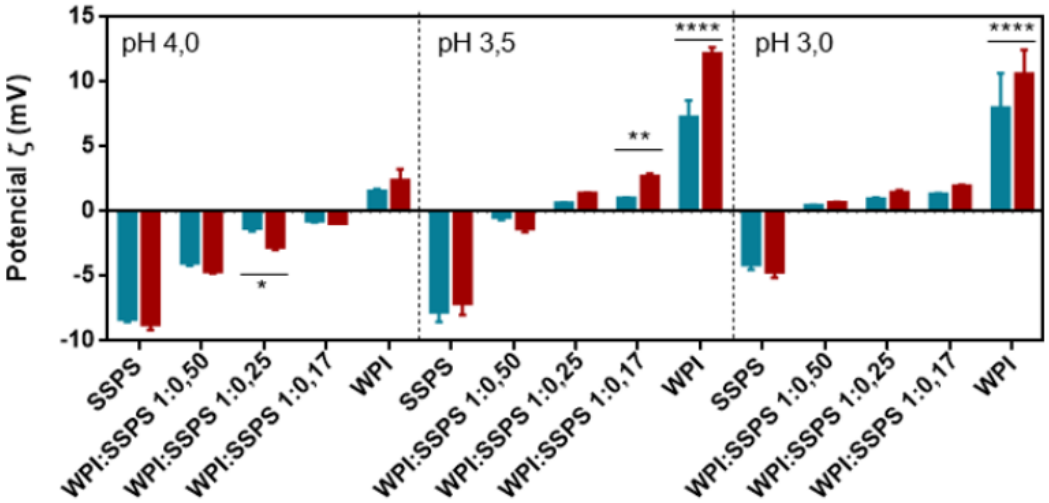

Figura 4.9 - Potencial ζ de WPI, SSPS, WPI:SSPS 1:0,5, WPI:SSPS 1:0,25 y WPI:SSPS 1:0,17 antes (azul) y después (rojo) del tratamiento térmico. Las diferencias significativas para cada muestra antes y después del tratamiento térmico se expresan con *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 y ****p < 0,0001 según ANOVA de dos vías, seguido de la prueba Sidak de comparaciones múltiples.

En la Figura 4.10 se presentan las superficies de respuesta de potencial ζ de las muestras con y sin tratamiento térmico y la malla de distribución de la función potencial ζ, según el análisis realizado en Statgraphics.

Este análisis determinó que el pH y la relación WPI:SSPS presentan un efecto significativo en el potencial ζ de las NPs WPI-SSPS, mientras que el tratamiento térmico no. A medida que se incrementó el pH (desde 3,0 a 4,0), el potencial ζ de los complejos se hizo más negativo. Esto podría deberse a que a pH 4,0, las proteínas aportan una menor cantidad de carga positiva, por lo que el SSPS otorga carga negativa que no se neutraliza, dando lugara complejos con una mayor carga negativa. Por otro lado, a medida que disminuyó la relación WPI:SSPS (desde 1:0,17 a 1:0,5), también se incrementó el potencial ζ, lo que podría deberse a una mayor cantidad de SSPS disponible para neutralizar la carga positiva de las proteínas.

La diferencia para el efecto significativo o no del tratamiento térmico arrojados por el análisis estadístico ANOVA de dos vías y los resultados obtenidos a través de las superficies de respuesta, respectivamente, radica en que el primer método de análisis se realiza comparando los resultados obtenidos experimentalmente entre sí, mientras que las superficies de respuesta reflejan un resultado esperado, es decir, una predicción generada a partir de los datos experimentales. Según esta predicción, el tratamiento térmico no generaría un efecto significativo en el potencial ζ de las muestras, demostrando que esté

parámetro tiene una influencia menor que el pH y la relación WPI:SSPS en la características de estas NPs.

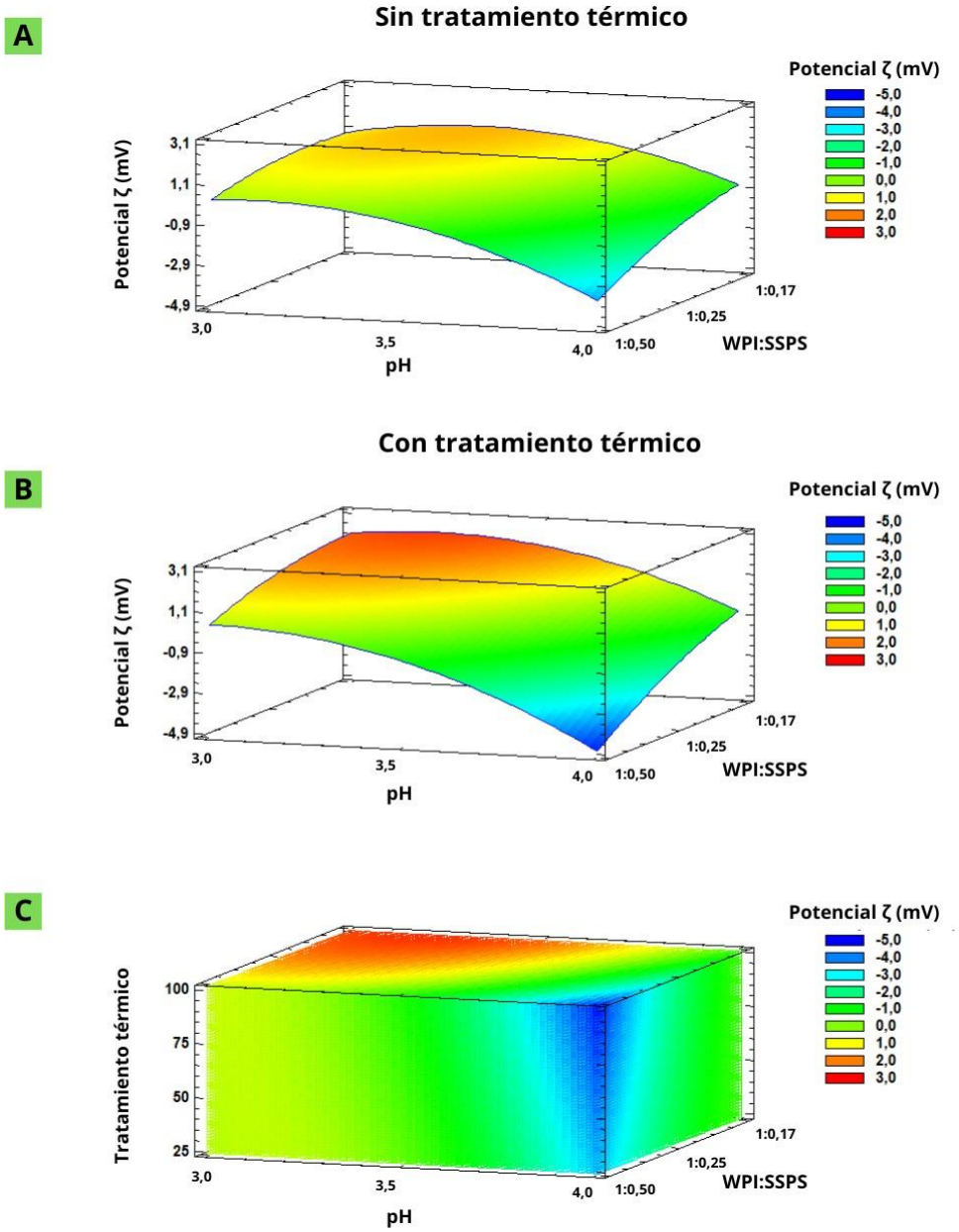

Figura 4.10 - Potencial ζ de las NPs WPI-SSPS. (A) Superficie de respuesta para las muestras sin tratamiento térmico; (B) Superficie de respuesta para las muestras con tratamiento térmico; y (C) Malla de distribución de la función potencial ζ para el diseño multifactorial.

4.2.2 Tamaño de partícula

En la Figura 4.11 se presentan las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) en intensidad (%) para cada muestra en el día de preparación. Adicionalmente, en la Figura 4.12 se presentan los tamaños promedio y el PDI de cada muestra en el día de preparación.

En cuanto al control de SSPS, se observó que ni el tratamiento térmico ni el pH indujeron cambios significativos en el tamaño de partícula. En todas las muestras de SSPS, el PDI fue mayor 0,6, lo que indica que la población fue multimodal. Además, las DTP en intensidad y en volumen de dichas muestras fueron multimodales, presentando una población centrada en los 40 - 60 nm y otra en los 400 - 600 nm. Estos resultados se condicen con la estructura ramificada del SSPS y su gran capacidad de hidratación.

En cuanto al control de WPI, se puede observar que WPI a pH 4,0 presentó un tamaño promedio muy superior que a pH 3,5 y 3,0. Asimismo, el tamaño de partícula promedio del control de WPI a pH 4,0 fue significativamente mayor que el de las mezclas WPI:SSPS. Esto confirma los resultados de turbidez descriptos en la sección 4.1.2 y la tendencia a la agregación de estas proteínas en condiciones de pH cercano a su pI. Adicionalmente, en el control a pH 4,0 con tratamiento térmico, se observó un incremento significativo del tamaño de partícula promedio, en comparación a la misma muestra sin tratamiento térmico. Esto permitiría suponer que el tratamiento térmico en esta condición de pH induce la agregación del WPI.

Por su parte, los controles de WPI a pH 3,5 y pH 3,0 presentaron valores de tamaños promedio menores a 300 nm, sin cambios significativos debidos al tratamiento térmico. Sin embargo, las DTP medidas en intensidad para las muestras de WPI a pH 3,5 y 3,0 fueron multimodales, presentando poblaciones de tamaño pequeño (proteína libre) y de diversos tamaños superiores (agregados de distintos tamaños). Esto último se corresponde con el resultado de PDI, el cual fue mayor a 0,4, lo que indica una población multimodal. En cuanto a las DTP medidas en volumen (resultados no presentados), estas fueron monomodales con una población centrada en los 4 - 6 nm, lo que podría corresponder a proteína libre.

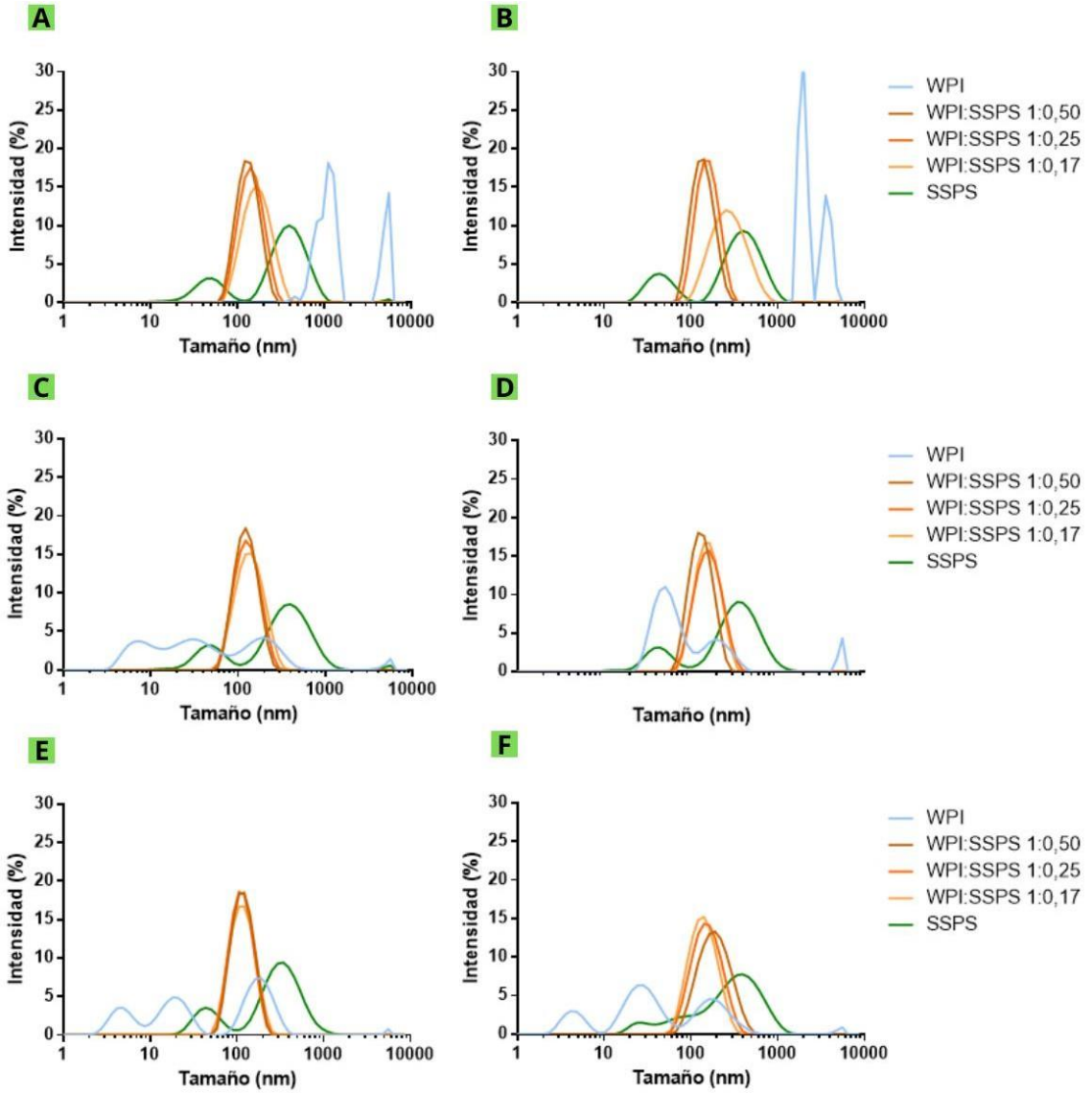

Figura 4.11 - Distribuciones de tamaño de partícula de las NPs WPI-SSPS y los controles obtenidos a pH 4,0 sin (A) y con (B) tratamiento térmico, a pH 3,5 sin (C) y con (D) tratamiento térmico y a pH 3,0 sin (E) y con (F) tratamiento térmico.

Finalmente, las NPs WPI-SSPS, independientemente del pH y del tratamiento térmico, presentaron valores de tamaños promedio entre los 100 y 200 nm, confirmando la formación de complejos nanométricos (NPs). Por su parte, los valores de PDI de todas las muestras de WPI-SSPS fueron menores a 0,2 y las DTP, tanto en intensidad como en volumen fueron monomodales, centradas en dicho tamaño de partícula promedio. Estos resultados se correlacionan con la menor turbidez aportada por las mezclas WPI-SSPS en la sección 4.1.2 y con la mayor estabilidad que presentaron las muestras respecto del control según el diagrama de fases de la sección 4.1.3. Según el análisis estadístico, el tratamiento térmico dio lugar a un incremento significativo del tamaño de partícula en todas las mezclas respecto de su control sin dicho tratamiento, excepto para la muestra con relación 1:0,5 a pH 4,0.

Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico ejercería un efecto sobre el estado de agregación de las partículas, lo que provoca el aumento de su tamaño. De todos modos, es importante resaltar que el tamaño promedio de todas las NPs WPI-SSPS se mantuvo por debajo de los 200 nm, a pesar del tratamiento térmico. El incremento en los tamaños promedio puede deberse a distintos fenómenos, incluyendo procesos de agregación (ya sea de proteínas o de complejos proteínas-polisacáridos), procesos de hinchamiento y de reorganización en la estructura de los complejos, entre otros. Sin embargo, resultados similares fueron obtenidos para complejos lactoferrina-pectina y β-lactoglobulina-pectina durante procesos de calentamiento (Bengoechea y col, 2011; Jones ycol., 2010).

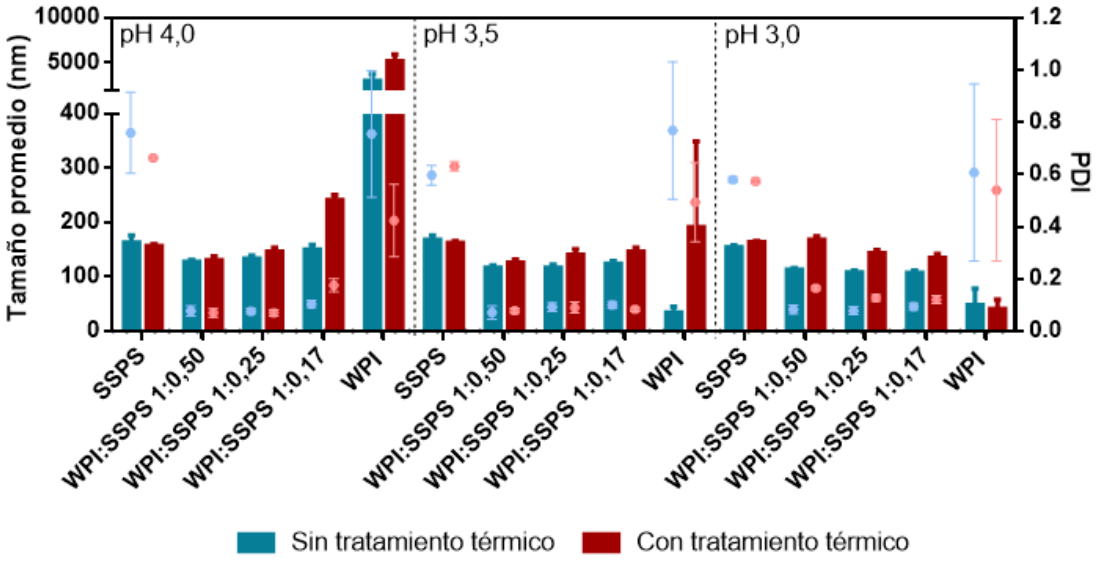

Figura 4.12 - Tamaño promedio (eje izquierdo, barras) y PDI (eje derecho, puntos) de las NPs WPI-SSPS y controles en el día de preparación, antes (azul) y después (rojo) del tratamiento térmico.

En la Figura 4.13 se presentan las superficies de respuesta del tamaño de partícula de las muestras con y sin tratamiento térmico en el día de preparación, junto a la malla de distribución de respuesta de la función tamaño, obtenidas por el programa Statgraphics. Según este análisis, el tratamiento térmico y el pH generaron un efecto significativo en el tamaño de partícula de los complejos, mientras que la relación WPI:SSPS no influyó significativamente en dicho parámetro. En este sentido, al aplicar un tratamiento térmico sobre los complejos, el tamaño promedio de partícula aumentó. Sin embargo, luego del tratamiento térmico, el PDI fue bajo y las NPs presentaron una distribución monomodal. Por lo tanto, el aumento del tamaño promedio de partícula puede deberse al aumento del diámetro hidrodinámico de los complejos y no a un efecto de agregación. Como mencionamos, estos resultados son similares a los obtenidos previamente para los complejos de lactoferrina-pectina y β-lactoglobulina-pectina durante el tratamiento térmico (Bengoechea y col., 2011; Jones y col.,

2010). Dichos autores hipotetizaron que la pectina inhibe la agregación proteica debido a que restringe la interacción entre las cadenas proteicas desplegadas por efectos estéricos. Por otro lado, mientras el pH descendió (de 4,0 a 3,0), el tamaño de partícula promedio de los complejos WPI-SSPS disminuyó. Esto puede deberse a la formación de una red interconectada fuertemente entre las proteínas y los polisacáridos.

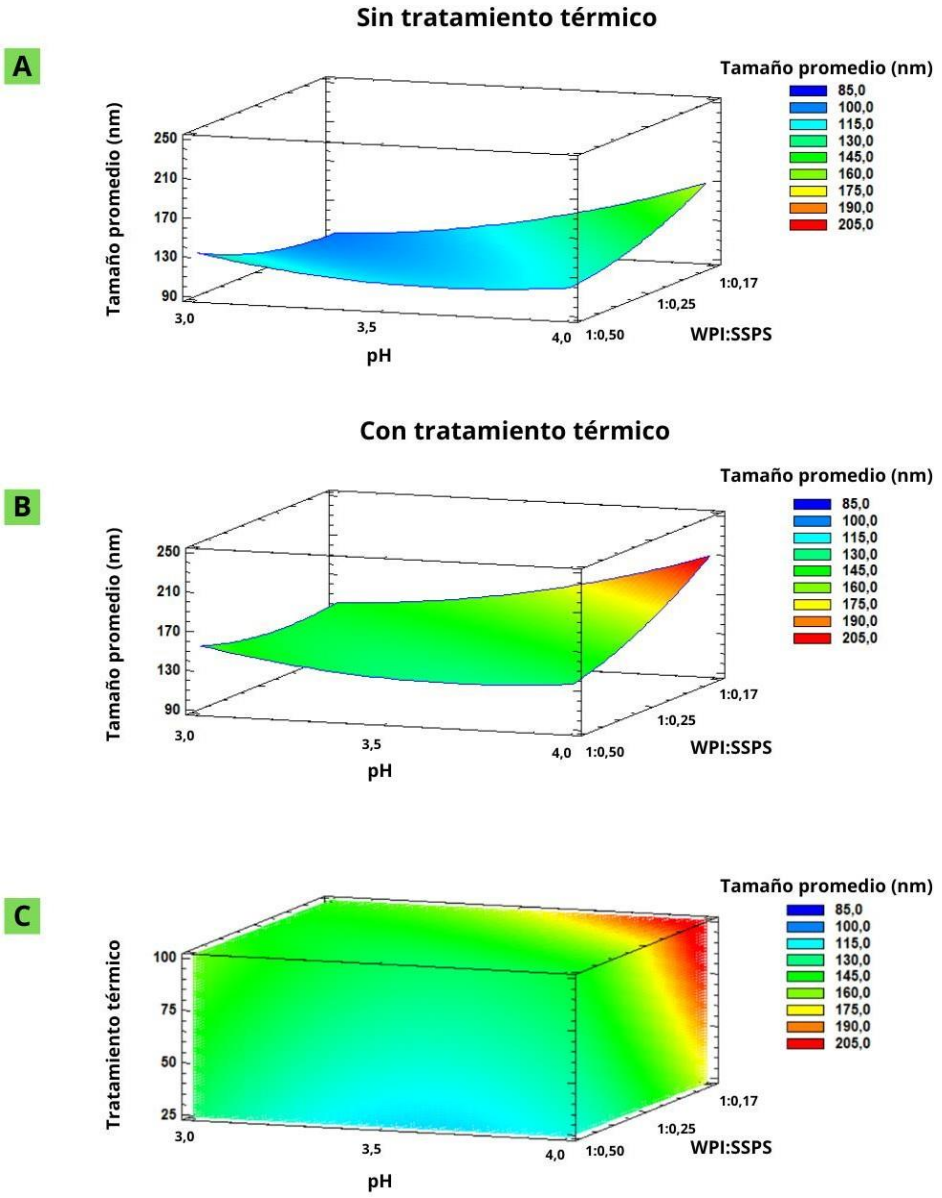

Figura 4.13 - Tamaño promedio de las NPs WPI-SSPS. (A) Superficie de respuesta para las muestras sin tratamiento térmico; (B) Superficie de respuesta para las muestras con tratamiento térmico; y (C) Malla de distribución de la función tamaño promedio para el diseño multifactorial.

Finalmente, en la Figura 4.14 se presentan los resultados de tamaño de partícula promedio obtenidos a lo largo del tiempo de almacenamiento (días 0, 28 y 56 luego de la preparación de las muestras).

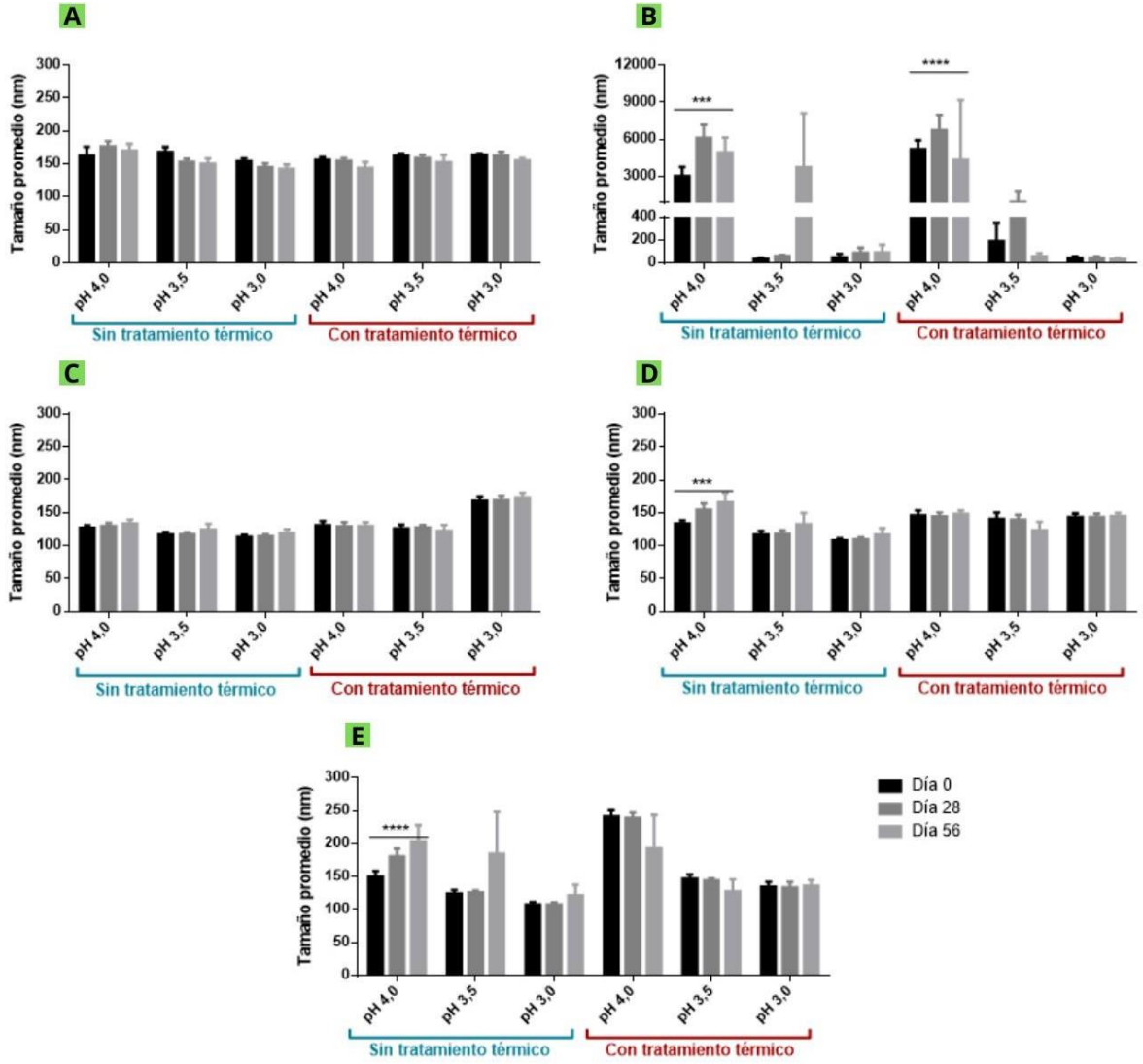

Figura 4.14 - Tamaño promedio de los controles SSPS (A), WPI (B) y las NPs WPI:SSPS 1:0,50 (C), 1:0,25 (D) y 1:0,17 (E) en función del tiempo de almacenamiento.

Los controles de SSPS no presentaron cambios en el tamaño promedio a lo largo del tiempo de almacenamiento, denotando su estabilidad. Por otro lado, el control de WPI a pH 4,0 presentó variaciones importantes en el tamaño de partícula promedio y en las distribuciones de tamaño de partícula, siendo todas multimodales y con elevados valores de PDI. Esto podría significar que las proteínas continúan agregándose durante el periodo de almacenamiento. Finalmente, para las NPs WPI:SSPS todos los tamaños de partícula se mantuvieron entre los 100 y 200 nm, sin presentar cambios significativos al día 56 (con respecto al día 0), excepto en las relaciones 1:0,25 y 1:0,17 a pH 4,0 sin tratamiento térmico. Considerando estos resultados, se podría concluir que el tratamiento térmico estabilizaría el tamaño de las NPs a lo largo del tiempo.

4.2.3 Hidrofobicidad aromática superficial

En la Figura 4.15 se presentan los resultados de hidrofobicidad aromática superficial (H_0) de las NPs WPI-SSPS y los controles.

Para el control de WPI se observó que la H_0 varió con el pH, siendo mayor a pH 3,5 con y sin tratamiento térmico, que a los pH 4,0 y 3,0. Además, en todos los casos, la H_0 fue significativamente mayor luego del tratamiento térmico, lo que podría deberse a la exposición de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos que originariamente se ubicaban en el interior de la proteína (Fioramonti y col., 2014; Liu y col., 2020).

Por su parte, la interacción del WPI con los SSPS no inhibió el proceso de desplegamiento y reorganización de la estructura de las proteínas, por lo que las NPs WPI-SSPS también presentaron un incremento de la H_0 luego de haber recibido un tratamiento térmico. Sin embargo, la interacción entre el WPI y los SSPS redujo el proceso de agregación, estabilizando las partículas en un tamaño nanométrico hasta por 56 días, tal como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, no se observaron efectos marcados del pH ni la relación WPI:SSPS en la H_0 de los complejos sin tratamiento térmico. Sin embargo, en los complejos WPI-SSPS con tratamiento térmico, se observó una reducción significativa de la H_0 de la muestra a pH 3,0 con respecto a la de las muestras a pH 3,5 y 4,0.

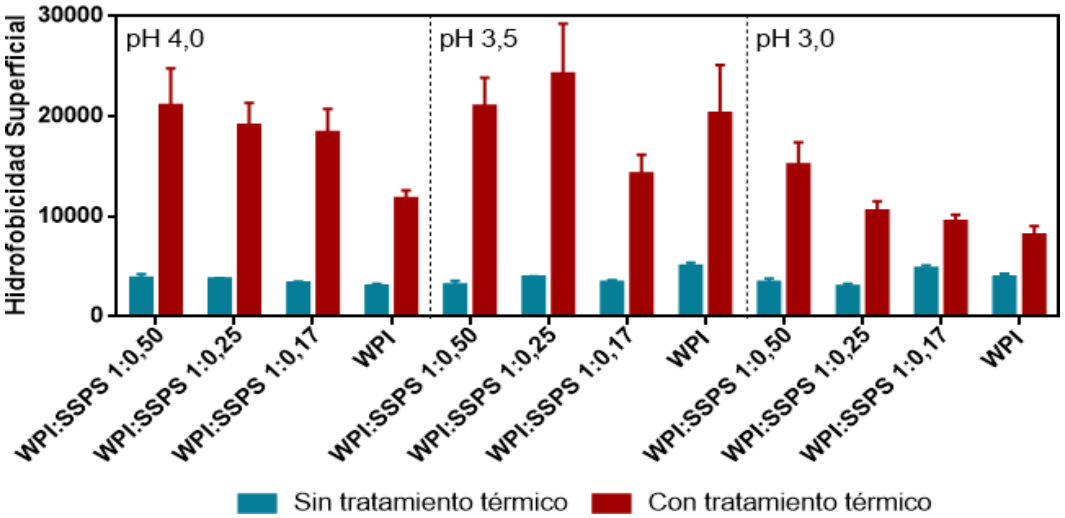

Figura 4.15 - Hidrofobicidad superficial de las NPs WPI-SSPS y controles en el día de preparación, antes (azul) y después (rojo) del tratamiento térmico.

Siguiendo la misma línea, la superficie estadística de respuesta (Figura 4.16) indicó que el tratamiento térmico y el pH tuvieron efectos significativos en la H_0 de los complejos, mientras que la relación WPI:SSPS no significó cambios.

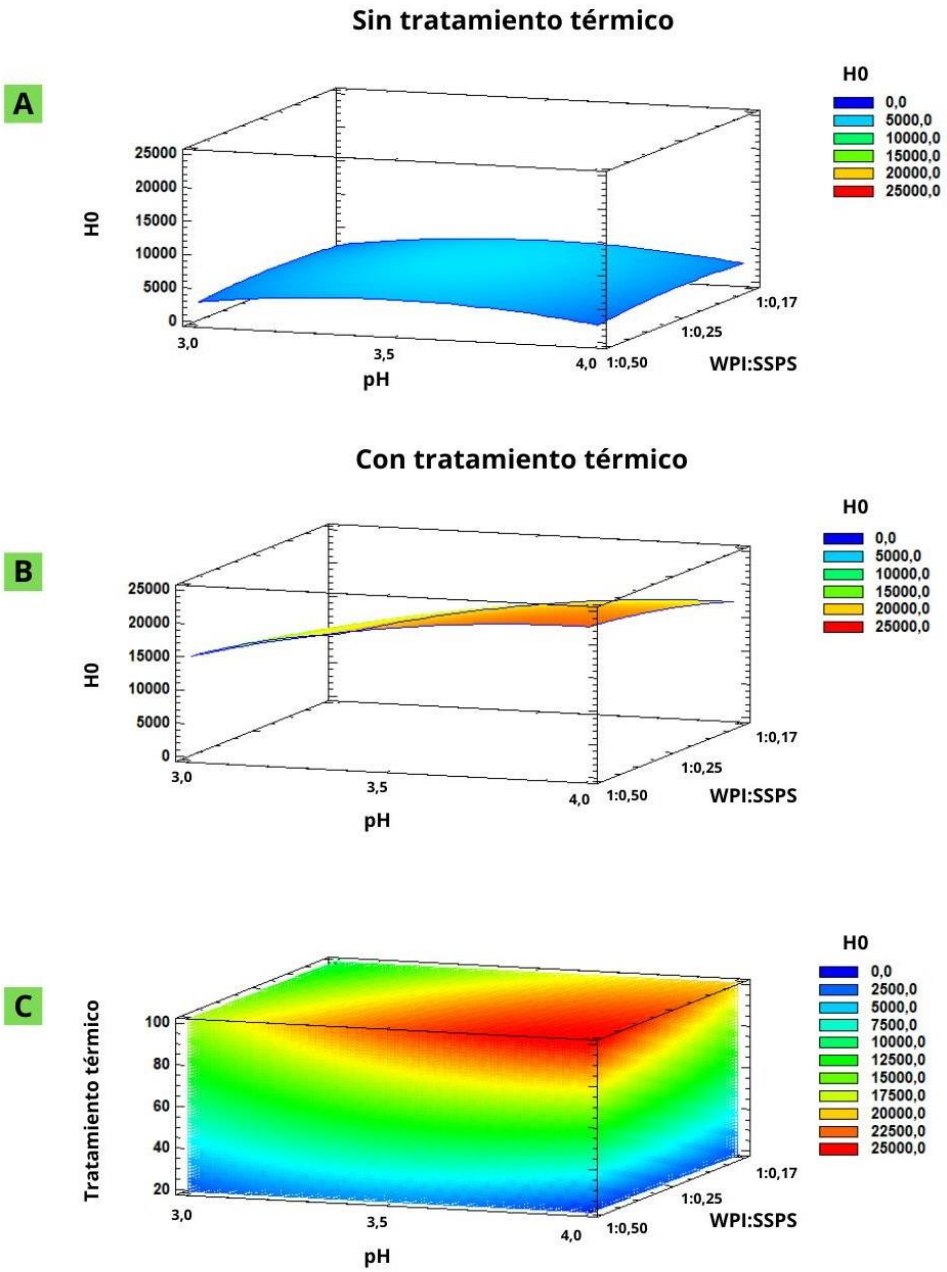

Figura 4.16 - Hidrofobicidad superficial (H_0) de las NPs WPI-SSPS. (A) Superficie de respuesta para las muestras sin tratamiento térmico; (B) Superficie de respuesta para las muestras con tratamiento térmico; y (C) Malla de distribución de la función H_0 para el diseño multifactorial.

En las muestras sin tratamiento térmico, al modificarse el pH de 4,0 a 3,5 y de 3,5 a 3,0, la H_0 de los complejos primero incrementó y luego disminuyó, respectivamente para cada rango de pH. Por otro lado, en las muestras con tratamiento térmico, al incrementar el pH (de 3,0 a 4,0), la H_0 de los complejos aumentó. Estos resultados confirman que las condiciones de pH

en las que se realiza el tratamiento térmico modifican las características de los complejos WPI-SSPS.

Por último, la H_0 del control de SSPS no se pudo cuantificar debido a que no se encontró una zona lineal donde la emisión de fluorescencia dependiera de la concentración de polisacáridos. Los SSPS, debido a su estructura, no deberían presentar zonas hidrofóbicas, sin embargo, estos cuentan con una pequeña fracción proteica que podría aportar hidrofobicidad. De todos modos, la cantidad es tan pequeña, que no se pudo cuantificar su hidrofobicidad utilizando este método comparativo.

4.2.4 Estabilidad física en el tiempo

En la Figura 4.17 se presenta un ejemplo de perfiles de transmitancia (T) y retrodispersión (BS) en función del tiempo de almacenamiento, que corresponde a la muestra control de SSPS a pH 4,0 con la aplicación de un tratamiento térmico. Todos los controles de SSPS, a todos los pH analizados, antes y después del tratamiento térmico (resultados no mostrados), presentaron perfiles T y BS similares a los de la Figura 4.17. A partir de estos resultados se puede observar que los controles de SSPS presentaron una elevada T y baja BS, lo que se debe a que sonsuspensiones traslúcidas. Asimismo, los perfiles de T y BS se mantuvieron estables a lo largo del tiempo de almacenamiento, lo que se debe a que estos controles se mantienen estables en dispersión durante el periodo analizado.

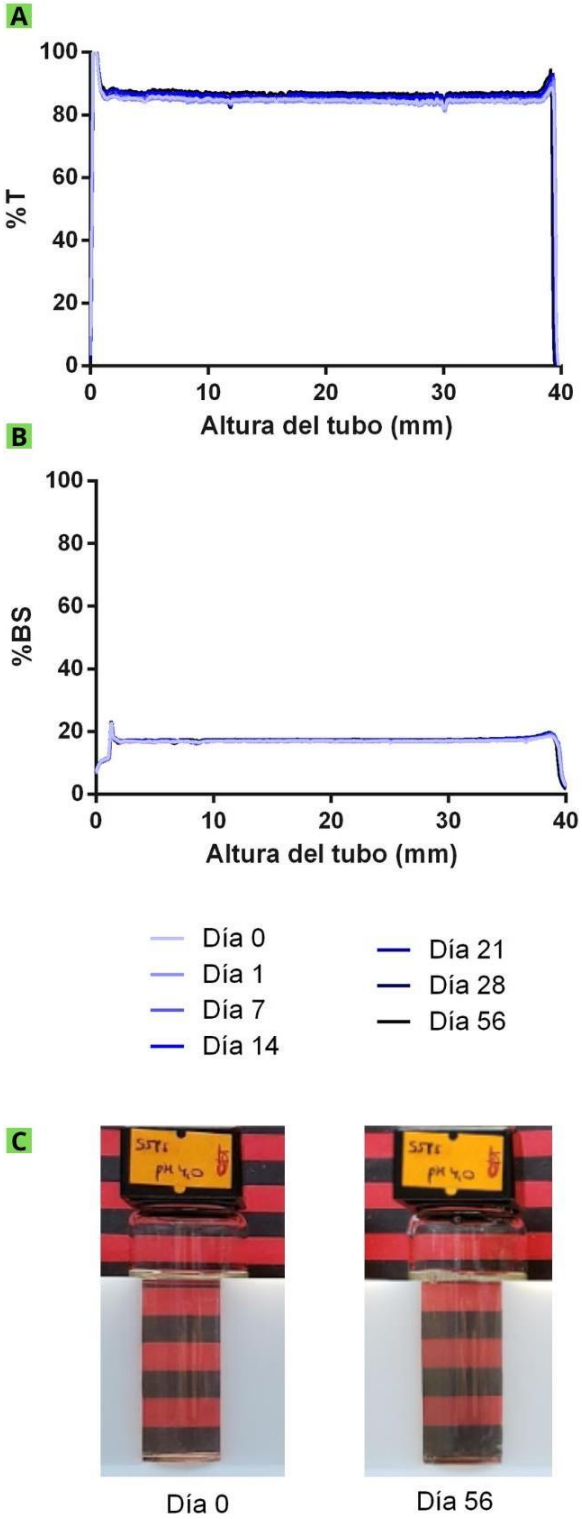

Figura 4.17 - Perfiles de T (A) y BS (B) a lo largo del tiempo de almacenamiento del control de SSPS a pH 4,0 luego del tratamiento térmico (ejemplos de perfiles estables en el periodo de tiempo analizado). (C) Fotos de la muestra tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

Los controles de WPI a pH 3,0 con y sin tratamiento térmico y el control de WPI a pH 3,5 sin tratamiento térmico (resultados no mostrados), también presentaron perfiles estables en el tiempo, como los mostradosen la Figura 4.17. Los perfiles de T y BS para el control de WPI a pH 3,5 luego del tratamiento térmico se presentan en la Figura 4.18. Al comparar los perfiles del día de preparación con los obtenidos a las 24 horas (día 1), se puede observar que existió un rápido fenómeno de desestabilización de esta muestra, que condujo a la precipitación (como se observa en la Figura 4.18 C) y a los cambios en los perfiles de T y BS. Por otro lado, los perfiles de T y BS para el control de WPI a pH 4,0 antes y después del tratamiento térmico se presentan en la Figura 4.19. En estas muestras se observó un incremento de los valores de BS y disminución de los valores de T en la zona baja del tubo, lo que corresponde a la presencia de precipitados, aún más marcado en la muestra con aplicación del tratamiento térmico. En las zonas medias y altas del tubo, por el contrario, se observan valores menores de BS y elevados valores de T, lo que corresponde a la formación de una suspensión traslúcida. Estos resultados se condicen con el hecho de que es el valor de pH más cercano al pI de las proteínas, lo cual provoca su consecuente desestabilización, agregación y precipitación; proceso que se ve exacerbado luego del tratamiento térmico. Considerando los resultados obtenidos para todos los controles de WPI, se puede observar que, al disminuir el pH y realizar un tratamiento térmico, aumenta la estabilidad de la dispersión de proteínas en ausencia de SSPS.

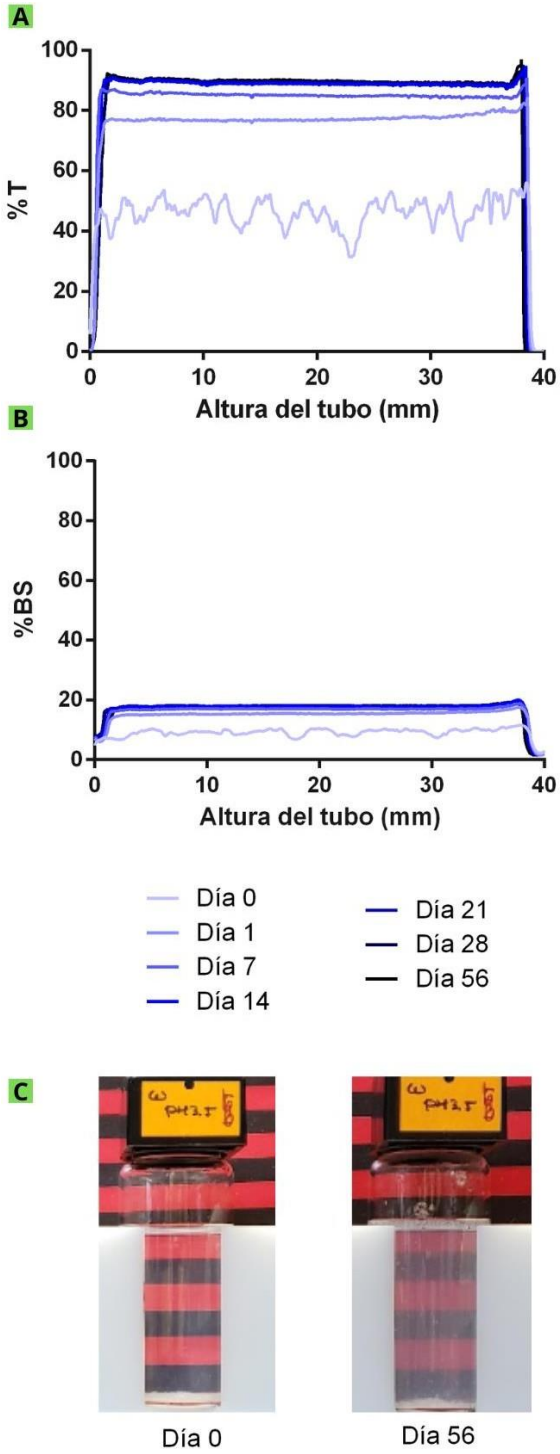

Figura 4.18 - Perfiles de T (A) y BS (B) a lo largo del tiempo de almacenamiento del control de WPI a pH 3,5 luego del tratamiento térmico. (C) Fotos de la muestra tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

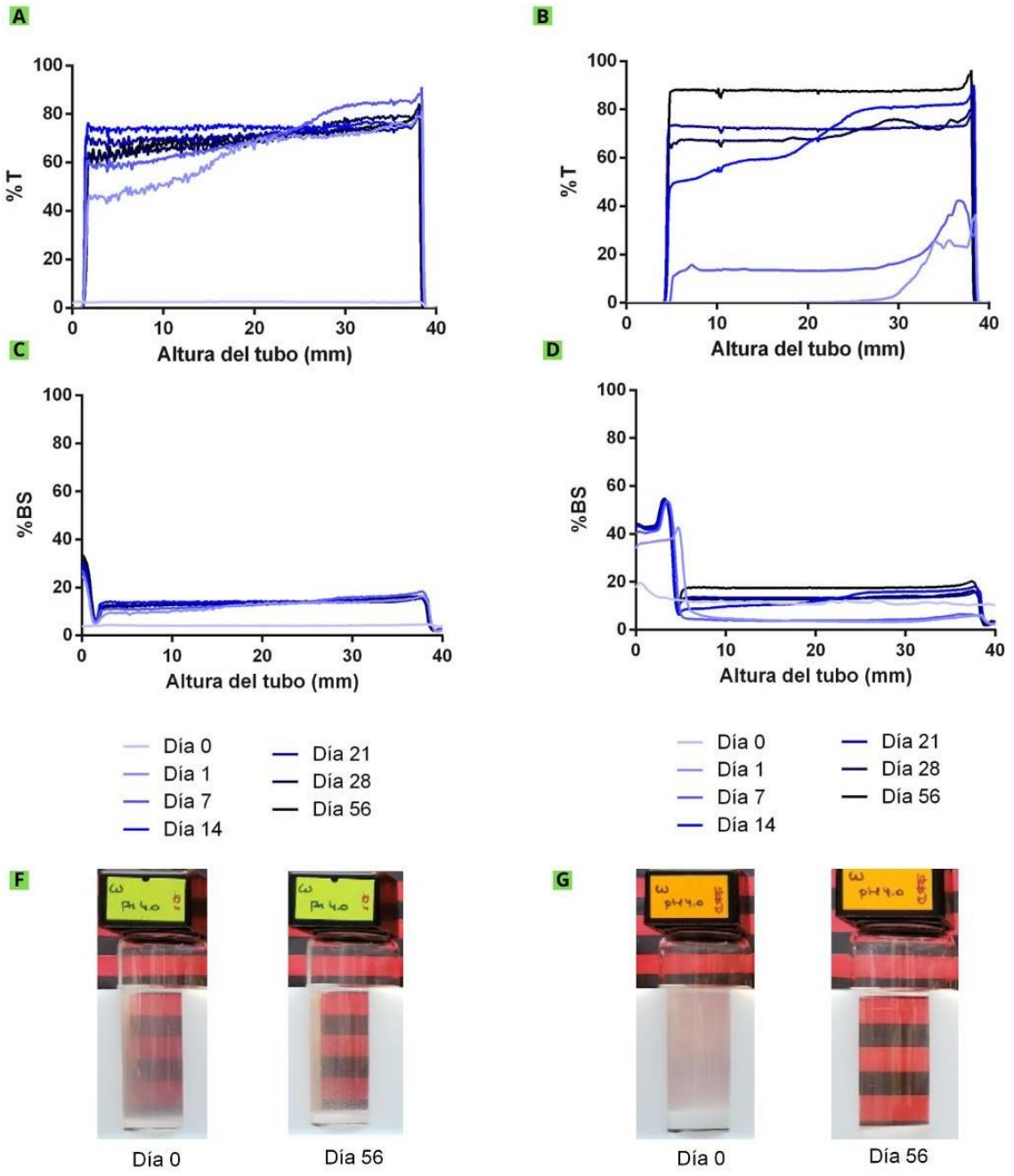

Figura 4.19 - Perfiles de T (A y B) y BS (C y D) del control WPI pH 4,0 sin y con la aplicación de un tratamiento térmico, respectivamente, a lo largo del tiempo de almacenamiento. (C) Fotos del control WPI pH 4,0 tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento sin (F) y con (G) la aplicación de un tratamiento térmico.

En cuanto a los perfiles de T y BS obtenidos para las NPs WPI-SSPS, se observaron diversos comportamientos.

Las NPs WPI-SSPS obtenidas a pH 3,0 con y sin tratamiento térmico (resultados no mostrados) presentaron perfiles estables similares a los presentados en la Figura 4.17, sin importar la relación WPI:SSPS (1:0,50, 1:0,25 o 1:0,17), demostrando la estabilidad en dispersión de estas NPs al pH mencionado.

Respecto de las NPs obtenidas a pH 3,5, en la Figura 4.20 se presentan los perfiles de T y BS de la muestra WPI:SSPS 1:0,50 con tratamiento térmico. Esta muestra presentó una leve variación en los valores de T y BS a través del tiempo, lo que se correlaciona con un incipiente proceso de clarificación (en el día 56 de almacenamiento los valores de T comienzan a subir en la zona superior del tubo y a disminuir en la zona inferior del tubo). De todos modos, como los cambios fueron mínimos, se podría decir que se trata de una muestra estable. Perfiles similares a los mostrados en la Figura 4.20 se observaron también para la NPs obtenidas a las relaciones WPI:SSPS 1:0,50, 1:0,25 y 1:0,17 a pH 3,5 sin tratamiento térmico (resultados no mostrados). Por otro lado, las NPs WPI:SSPS 1:0,25 y 1:0,17 a pH 3,5 con tratamiento térmico (resultados no mostrados) presentaron los perfiles de T y BS que se muestran en la Figura 4.21. A diferencia de las muestras sin la aplicación del tratamiento térmico, en la que se obtuvieron resultados relativamente estables, en estos caso se observaron procesos de clarificación más rápidos que se intensificaron conforme fue pasando el tiempo de almacenamiento. En este sentido, es importante resaltar que las NPs obtenidas en la relación 1:0,17 presentaron mayores diferencias en sus perfiles a lo largo del tiempo que las muestras con 1:0,25 y 1:0,50, lo que demuestra que al aumentar la concentración de SSPS disponible, se incrementa la estabilidad coloidal de estas dispersiones.

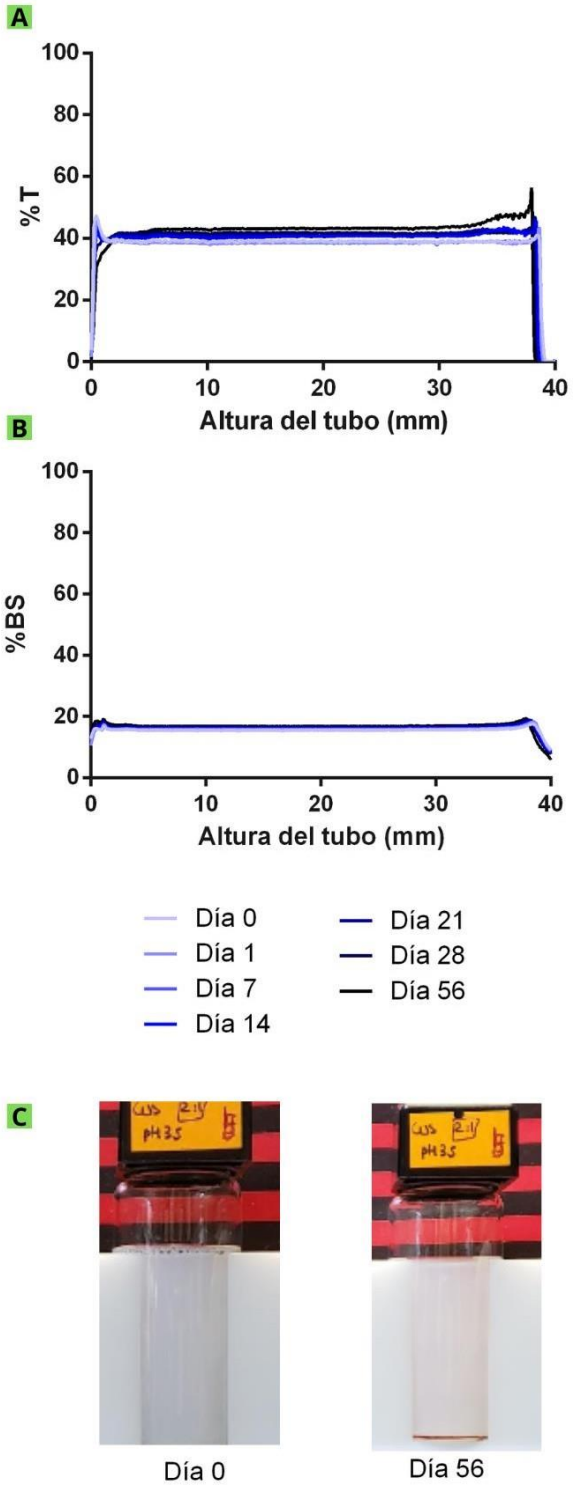

Figura 4. 20 - Perfiles de T (A) y BS (B) a lo largo del tiempo de almacenamiento de NPS WPIS:SSPS 1:0,50 pH 3,5 luego del tratamiento térmico. (C) Fotos de la muestra tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

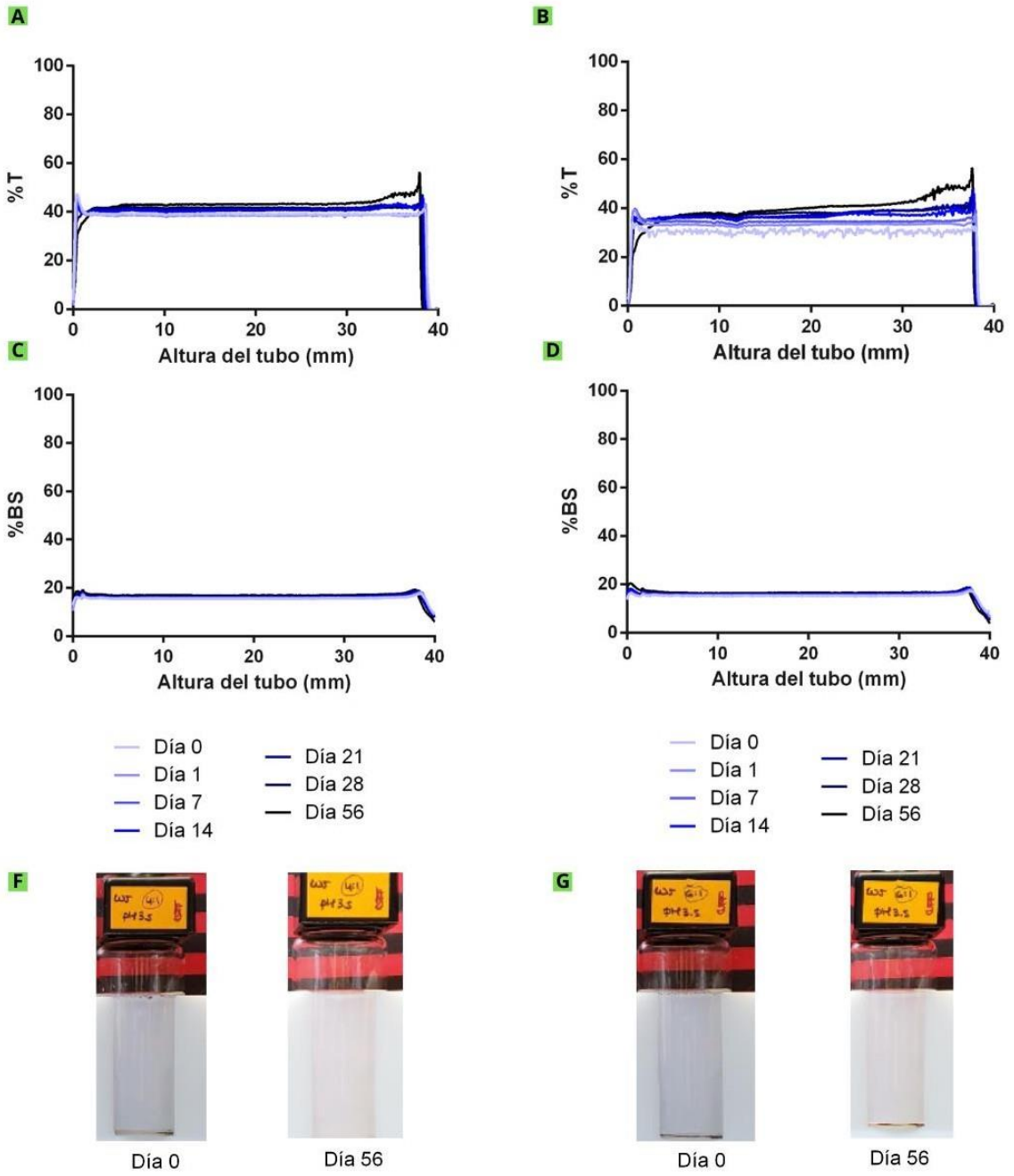

Figura 4.21 - Perfiles de T (A y B) y BS (C y D) de NPs WPI:SSPS 1:0,25 y 1:0,17 a pH 3,5, respectivamente, a lo largo del tiempo de almacenamiento luego de la aplicación de un tratamiento térmico. (C) Fotos de las muestras de NPs WPI:SSPS 1:0,25 (F) y 1:0,17 a pH 3,5 (G) luego de la aplicación de un tratamiento térmico, tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

Respecto de las muestras obtenidas a pH 4,0, podemos decir que sólo la muestra de WPI:SSPS 1:0,50 sin tratamiento térmico se mantuvo relativamente estable (resultados no mostrados), presentando perfiles similares a los observados en Figura 4.20. La muestra

obtenida con tratamiento térmico presentó cambios en los perfiles de T y BS (Figura 4.22) que se correlacionan con un proceso de clarificación en la zona superior del tubo y sedimentación en la parte inferior del tubo mucho más marcado que su contraparte sin tratamiento térmico. Por otro lado, las NPs obtenidas en una relación WPI:SSPS 1:0,25 a pH 4,0 sin y con tratamiento térmico presentaron los perfiles mostrados en la Figura 4.23. En este caso, en ausencia del tratamiento térmico, la muestra presentó una desestabilización por clarificación. Por su parte, en presencia del tratamiento térmico, la estabilidad se incrementó significativamente, presentando perfiles de T y BS comparables con una muestra relativamente estable. Por último, en la Figura 4.24, se presentan los perfiles de T y BS de las NPs obtenidas con relación WPI:SSPS 1:0,17 a pH 4,0 sin y con tratamiento térmico. A partir de estos resultados podemos demostrar que la muestra con la menor relación WPI:SSPS (1:0,17) y sin tratamiento térmico, fue la más inestable de las NPs obtenidas, presentando procesosde clarificación y sedimentación importantes. Asimismo, podemos demostrar que la aplicación de un tratamiento térmico incrementa la estabilidad de la dispersión coloidal. De todos modos, es importante resaltar que la muestra WPI:SSPS 1:0,17 sin tratamiento térmico resultó mucho más estable que el respectivo control de WPI, lo que demuestra el potencial estabilizador de la formación de complejos electrostáticos.

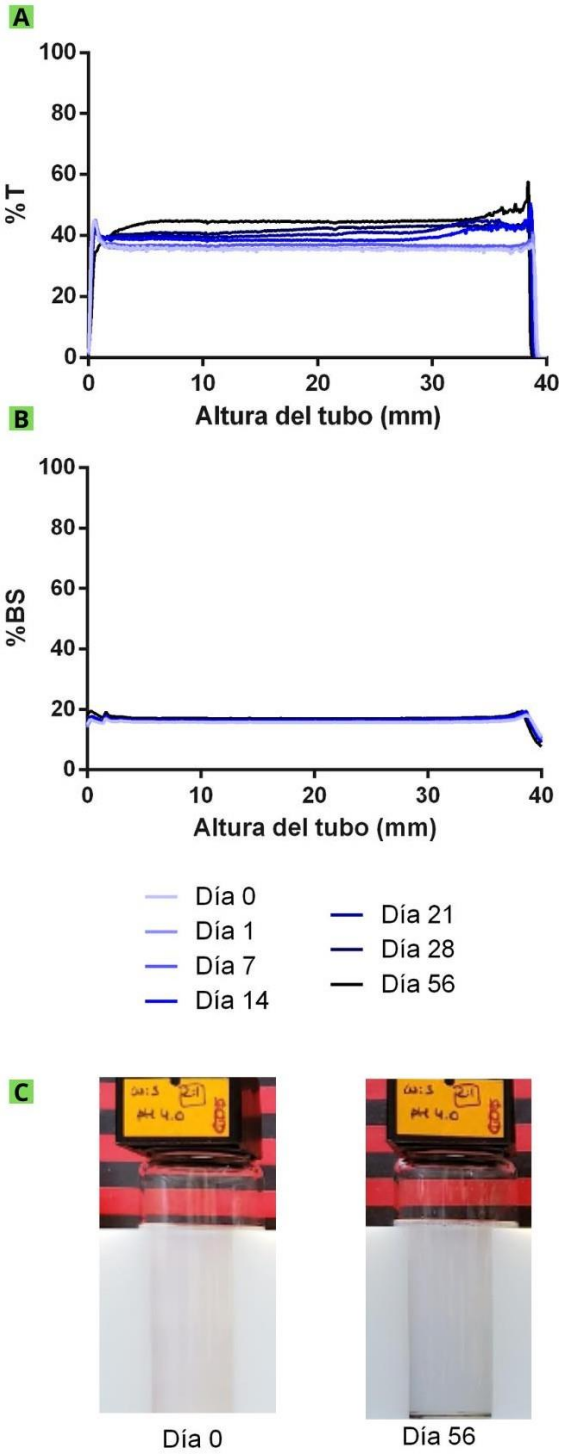

Figura 4.22. - Perfiles de T (A) y BS (B) a lo largo del tiempo de almacenamiento de NPs WPIS:SSPS 1:0,50 pH 4,0 con la aplicación de un tratamiento térmico. (C) Fotos de la muestra tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

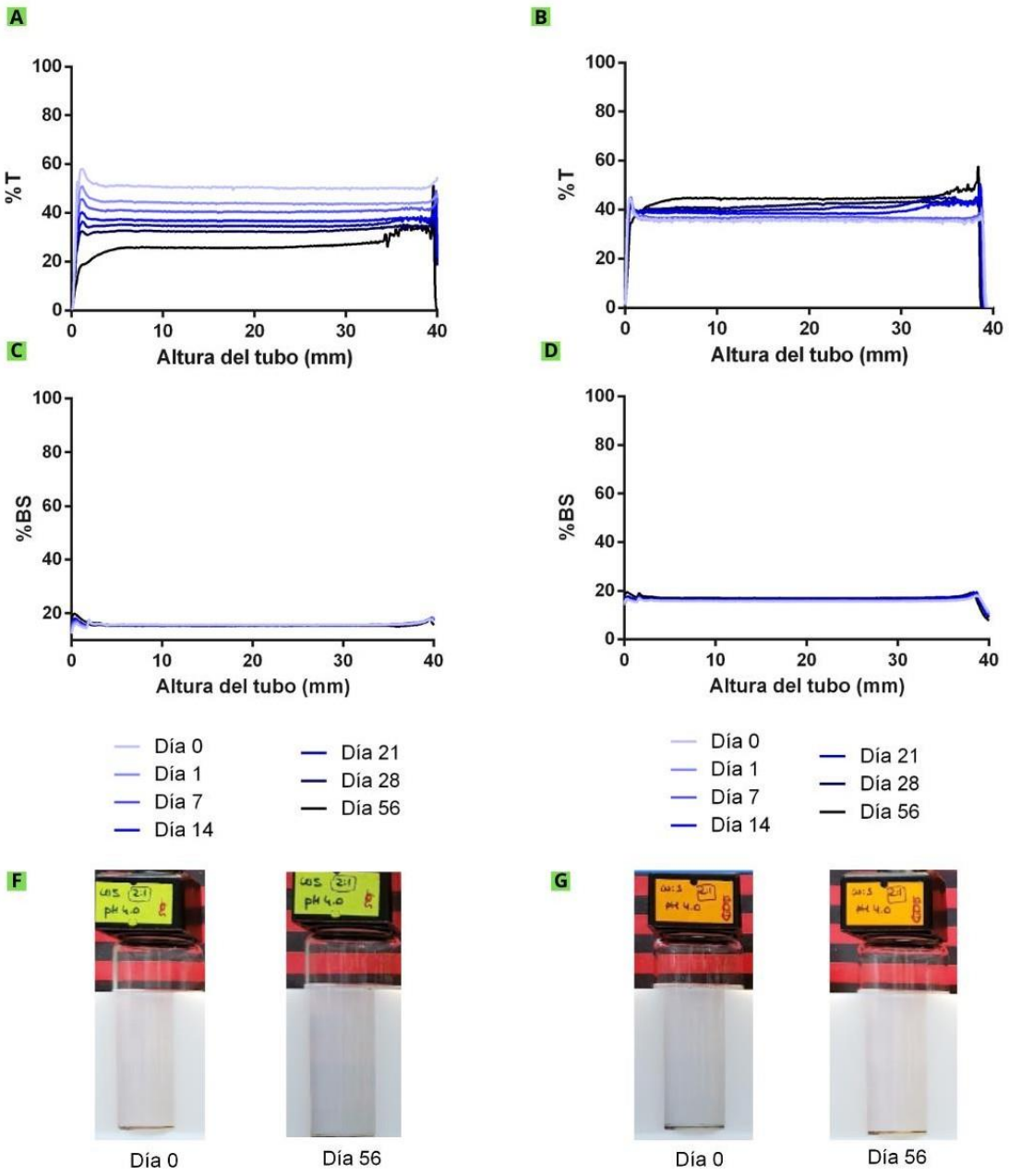

Figura 4.23 - Perfiles de T (A y B) y BS (C y D) de NPs WPI:SSPS 1:0,25 a pH 4,0 sin y con la aplicación de un tratamiento térmico, respectivamente, a lo largo del tiempo de almacenamiento. (C) Fotos de las muestras de NPs WPI:SSPS 1:0,25 (F) y 1:0,17 a pH 3,5 (G) luego de la aplicación de un tratamiento térmico, tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

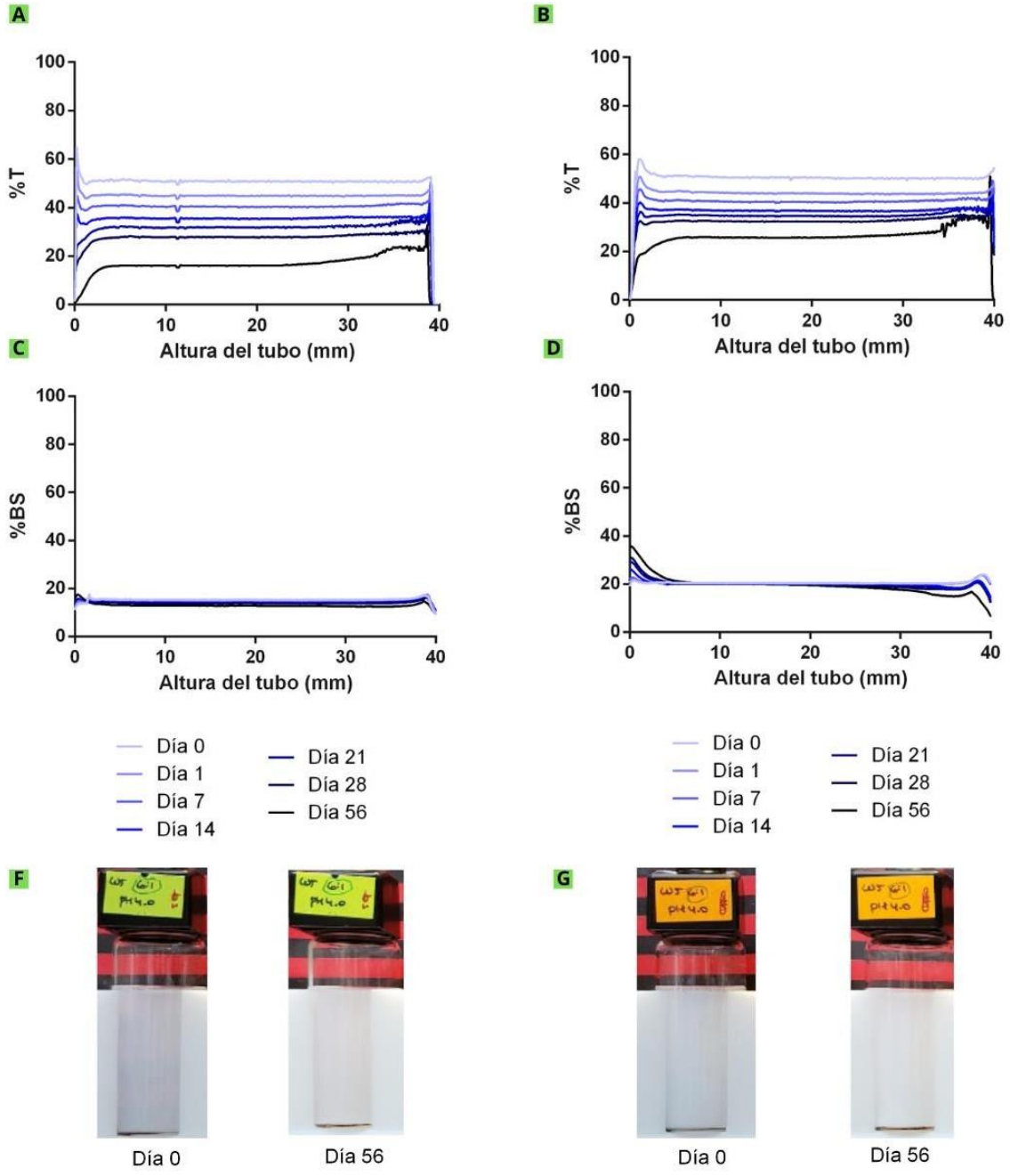

Figura 4.24 - Perfiles de T (A y B) y BS (C y D) de NPs WPI:SSPS 1:0,17 pH 4,0 sin y con la aplicación de un tratamiento térmico, respectivamente a lo largo del tiempo de almacenamiento. (C) Fotos de las muestras de NPs WPI:SSPS 1:0,17 pH 4,0 sin (F) y con la aplicación de un tratamiento térmico (G), tanto para el día 0 como para el día 56 de almacenamiento.

Adicionalmente, en la Figura 4.25 se presentan los valores de TSI globales de las muestras a lo largo de 56 días de almacenamiento.

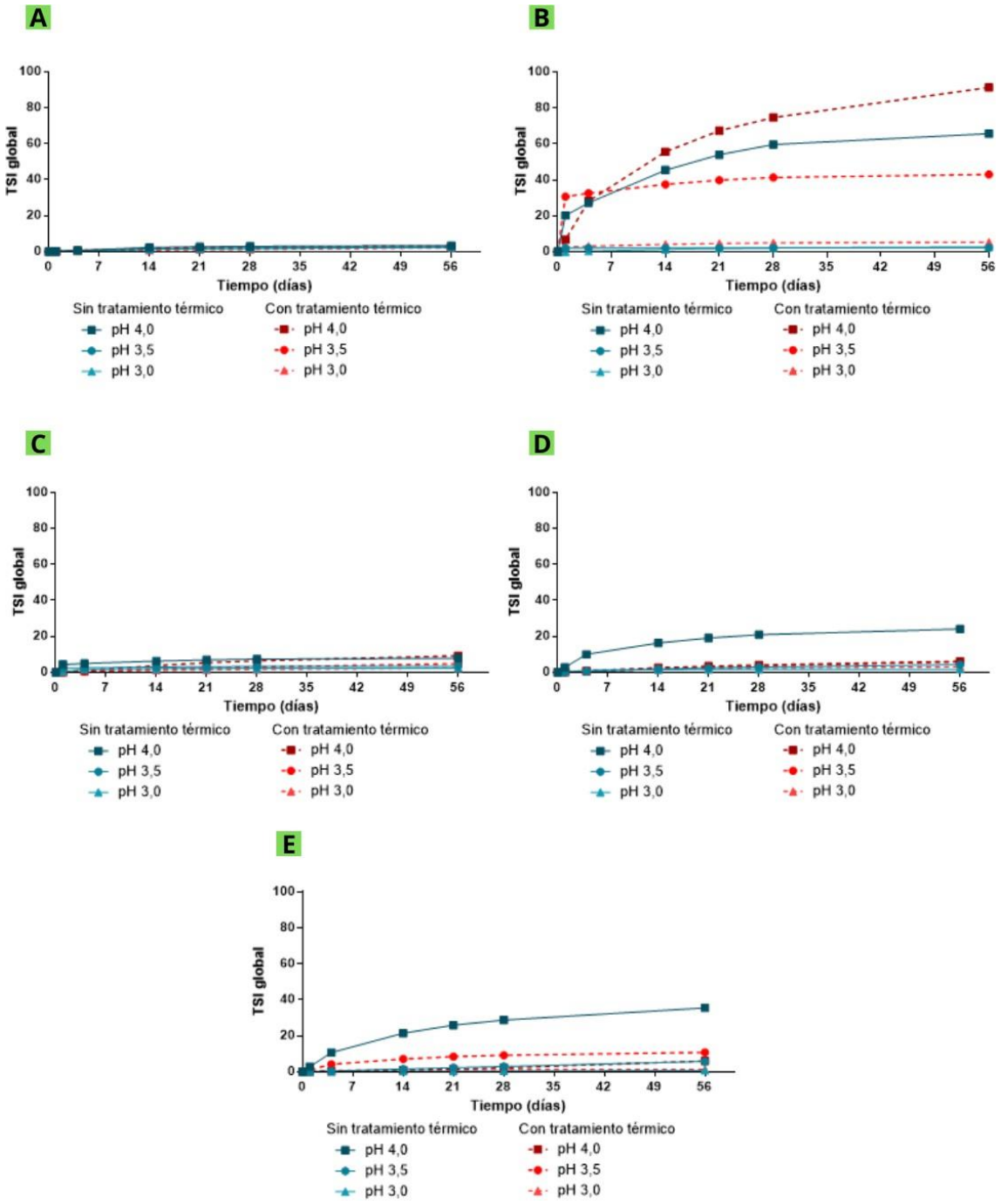

Figura 4.25 - TSI de los controles SSPS (A) y WPI (B) y de las NPs WPI:SSPS 1:0,50 (C), 1:0,25 (D) y 1:0,17 (E) a lo largo de 56 días de almacenamiento, antes (azul) y después (rojo) del tratamiento térmico.

Según los resultados obtenidos, los controles de SSPS se mantuvieron estables a lo largo de los 56 días analizados, presentando TSI menores a 5. Estos resultados se condicen con los perfiles de T y BS. Por otro lado, los controles de WPI presentaron valores de TSI significativamente diferentes, dependiendo del pH y el tratamiento térmico. El control de WPI a pH 4,0 presentó una desestabilización rápida en el día de preparación, lo que se reflejó en la sedimentación y precipitación de las partículas de gran tamaño, independientemente del tratamiento térmico. La precipitación de las partículas se evidenció por el incremento del BS en la zona inferior del tubo y por el incremento de la T en la zona superior del tubo, como discutimos anteriormente (Figura 4.19). Por otro lado, el control de WPI a pH 3,5 fue estable en ausencia de tratamiento térmico, mientras que la realización de un tratamiento térmico llevó a la agregación de las proteínas presentes y a la consecuente desestabilización del sistema, evidenciando una desventaja en la implementación de WPI en matrices alimentarias ácidas que lleven un tratamiento térmico. Por su parte, el controlde WPI a pH 3,0 con y sin tratamiento térmico resultó ser estable a lo largo del tiempo de estudio. A raíz de estos resultados, se puede decir que mientras más se acerca el pH al pIde la proteína, menos estable es la muestra.

Las NPs WPI-SSPS mostraron una mayor estabilidad que el control de WPI, independientemente del pH, de la relación WPI:SSPS y el tratamiento térmico. En este sentido, las NPs presentaron valores de TSI menores a 20 a lo largo del tiempo, indicando mejor estabilidad del WPI en presencia de los SSPS, en comparación con el WPI. Resultados similares fueron reportados anteriormente para complejos de WPI-polisacáridos de *Flammulina velutipes* y de PPI-alginato propilenglicol, los cuales mostraron mejor estabilidad Turbiscan que las respectivas proteínas control (Guo y col., 2019; Shang y col., 2020).

En la Figura 4.26 se presentan las superficies de respuesta del TSI a los 56 días de almacenamiento para las muestras sin y con tratamiento térmico y la malla de distribución de TSI, según el análisis realizado en Statgraphics. Según este análisis, solo el pH y la interacción entre los factores de pH y tratamiento térmico tuvieron efectos significativo en el TSI global obtenido a los 56 días de almacenamiento, mientras que la relación WPI:SSPS y el tratamiento térmico no tuvieron un efecto significativo por sí solos. A pH 3,0 y 3,5, todos los complejos mostraron una tendencia estable, con valores de TSI global menores a 10. A pH 4,0, sin tratamiento térmico, las muestras con las relaciones WPI:SSPS más altas(1:0,17 y 1:0,25) presentaron valores de TSI más altos que aquellos obtenidos a una relación WPI:SSPS más baja (1:0,50). Esta tendencia podría deberse a que, a medida que aumenta la concentración de SSPS, la estabilidad de los complejos aumenta debido a la presencia de polisacáridos interactuando con la proteína a través de interacción electrostática y repulsiones estéricas, debido a la estructura ramificada de los SSPS, la cual es similar a la

estructura de la pectina (Li y col., 2020). Además, luego del tratamiento térmico, las muestras con las relaciones WPI:SSPS más altas (1:0,17 y 1:0,25) presentaron una reducción en los valores de TSI, indicando una estabilización gracias al tratamiento térmico. Resultados similares fueron obtenidos para complejos de WPI-pectina a pH 4,5 (Gentés, St-Gelais y Turgeon, 2010).

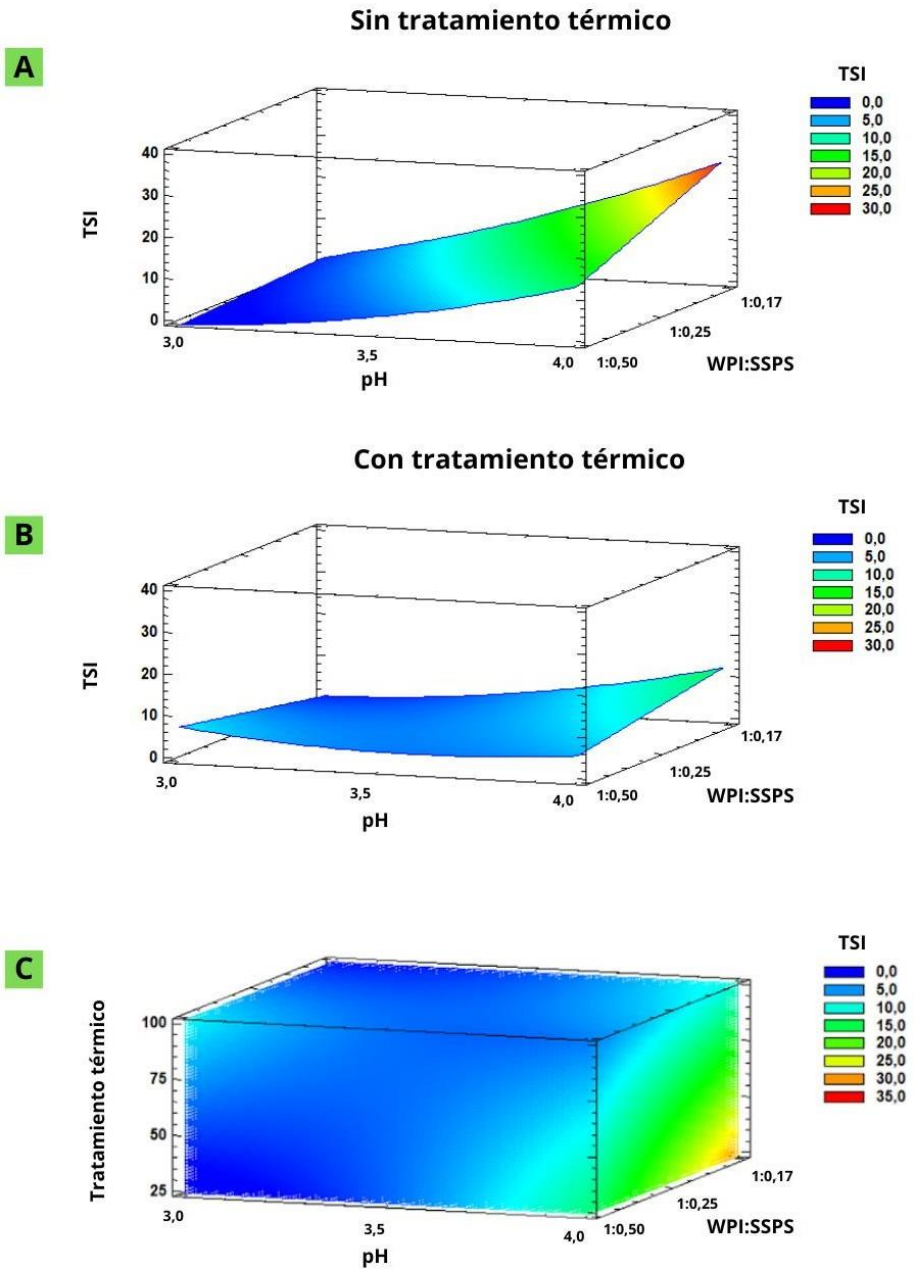

Figura 4.26 - TSI de las NPs WPI-SSPS. (A) Superficie de respuesta para las muestras sin tratamiento térmico; (B) Superficie de respuesta para las muestras con tratamiento térmico; y (C) Malla de distribución de la función TSI para el diseño multifactorial.

4.2.5 Selección de la condición óptima para la obtención de NPs

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que las características de las NPs WPI-SSPS pueden ser reguladas en función del pH, la relación másica WPI:SSPS y la realización de un tratamiento térmico. Sin embargo, considerando que las NPs WPI-SSPS serán utilizadas para encapsular y estabilizar un compuesto bioactivo hidrofóbico, se debe seleccionar una condición adecuada en la cual el tamaño promedio de partícula y el TSI fueran mínimos, la hidrofobicidad aromática superficial fuera máxima y el potencial ζ cercano a cero.

Utilizando la opción de "optimización de múltiples respuestas" provista por Statgraphics, fue posible encontrar la condición capaz de cumplir dichas premisas. En la Figura 4.27 se presenta el gráfico de deseabilidad obtenido, donde al aproximarse el valor de deseabilidad a 1, se estarán cumpliendo las premisas configuradas.

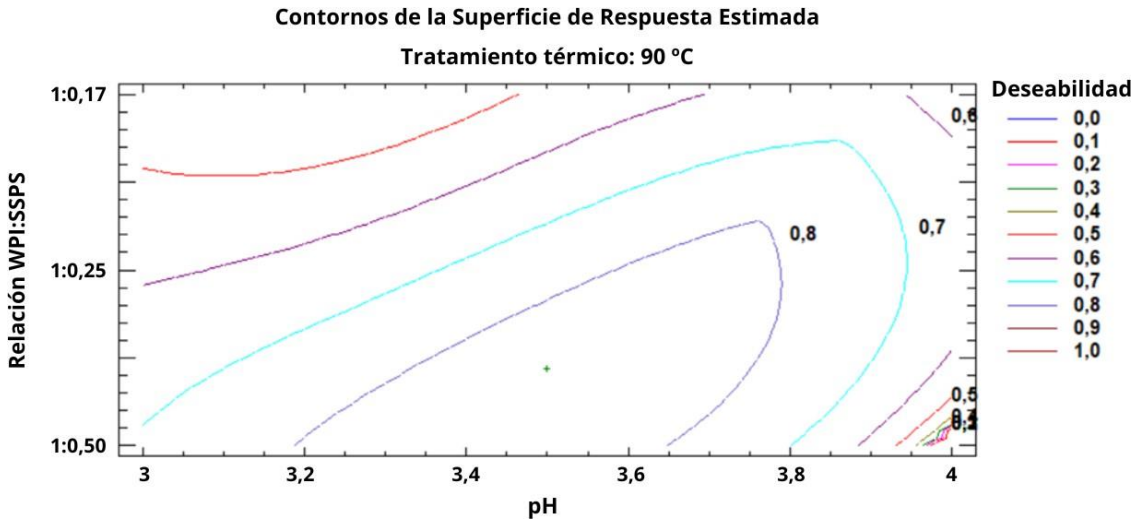

Figura 4.27 - Gráfica de deseabilidad obtenida por optimización de múltiples respuestas (mínimo tamaño y TSI, máximo H0 y potencial ζ cercano a 0).

A partir de este análisis, los nanocomplejos autoensamblados WPI-SSPS con menor tamaño de partícula (126,1 ± 0,5 nm), potencial ζ cercano a la neutralidad (-1,26 ± 0,15mV), mayor hidrofobicidad superficial (20.989,8 ± 5.748,4) y mayor estabilidad física (con un valor de TSI de 4,77 a los 56 días de almacenamiento) se obtuvieron luego del tratamiento térmico en condiciones de pH 3,5 y relación WPI:SSPS 1:0,50.

Por lo tanto, dichas condiciones fueron seleccionadas para obtener las NPs WPI-SSPS y evaluar su capacidad de interacción y estabilización de compuestos bioactivos hidrofóbicos.

4.3 Encapsulación y estabilización de CUR en las NPs de WPI-SSPS

Una vez seleccionada la condición óptima de preparación de NPs WPI-SSPS, se procedió a evaluar la capacidad de las mismas para encapsular y estabilizar curcumina (CUR) en medios acuosos ácidos. A continuación, se detallan y analizan los resultados obtenidos.

4.3.1 Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de CUR en NPs

En la Figura 4.28 se presentan los resultados de eficiencia de encapsulación (EE, %) y capacidad de carga (LC, µg CUR/mg de NPs) de CUR en las NPs WPI-SSPS.

Según los resultados obtenidos se puede observar que, a medida que aumentó la concentración inicial de CUR, también lo hizo la LC de los complejos. En este sentido, al utilizar la mayor concentración inicial de CUR se obtuvo una LC del 5,5 ± 0,2 µg CUR/mg de NPs. Por su parte, la EE se mantuvo cerca del 80 % al utilizar una concentración inicial de CUR mayor o igual a 40 µg/ml. Particularmente, cuando la concentración inicial de CUR fue la más alta (100 µg/mL) se obtuvo una EE del 83,3 ± 3 %. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Yi y col. (2021) para nanocomplejos de WPI y alginato de sodio, donde la LC fue incrementando a medida que se incrementó la concentración inicial de CUR. Estos autores reportaron una EE del 76,28% y una capacidad de carga de 15,26 µg CUR/mg de complejo WPI-alginato al utilizar una concentración inicial de CUR de 100 µg/ml (Yi y col., 2021). Por otro lado, Yi y col. (2016) también estudiaron la encapsulación de CUR en complejos de α-lactoalbúmina y dextrano, reportando una EE del 97,5% y una LC de 1,95µg CUR/mg. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo para la encapsulación de CUR en NPs WPI-SSPS permiten balancear la EE y LC, respecto de los resultados reportados por otros autores.

A partir de estos resultados, se decidió continuar trabajando con NPs-CUR obtenidas con una concentración inicial de CUR de 100 µg/ml.

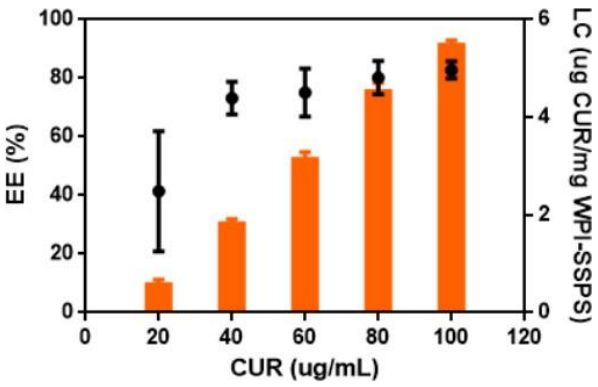

Figura 4.28 - Eficiencia de encapsulación (EE%, eje izquierdo, puntos) y capacidad de carga (LC, eje derecho, barras) de CUR de las NPs WPI-SSPS.

4.3.2 Caracterización de las NPs-CUR

En la Figura 4.29 se presentan los resultados de tamaño promedio de partícula, PDI y potencial ζ de las NPs WPI-SSPS sin y con CUR.

Según los resultados obtenidos, se puede observar que las NPs sin y con CUR no presentaron diferencias significativas en cuanto al tamaño promedio de partícula, el PDI y el potencial ζ. Por lo tanto, se puede confirmar que el agregado de CUR no modifica significativamente las características de las partículas WPI-SSPS. Además, estos resultados sugieren que no se vería modificada la estabilidad física probada anteriormente en presencia de CUR, durante el tiempo de almacenamiento estudiado.

En concordancia con los resultados obtenidos, estudios realizados por Xu y col. (2020) para complejos de caseína-SSPS-CUR demostraron que no hubo diferencias en el potencial ζ de los complejos sin y con CUR. Sin embargo, los autores reportaron un aumento del diámetro promedio de los complejos con CUR con respecto a los complejos sin CUR.

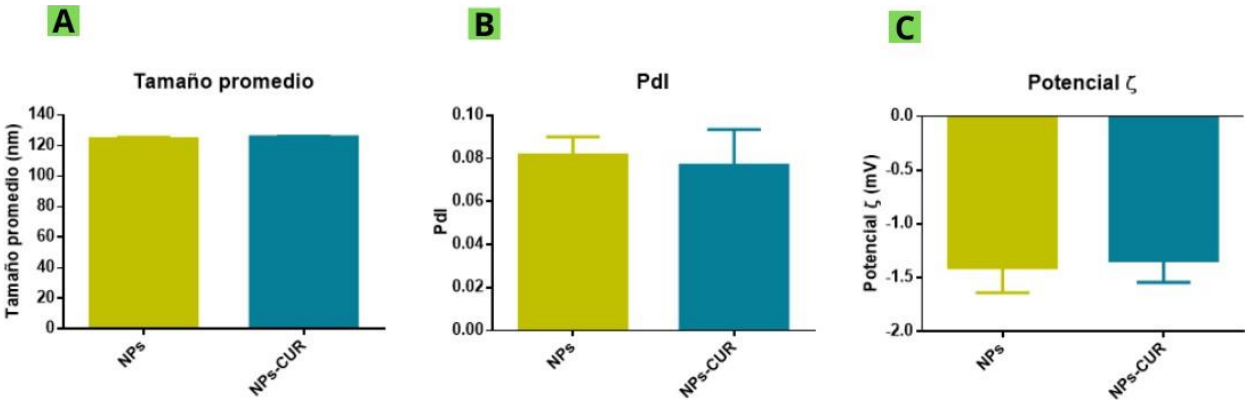

Figura 4.29 - (A) Tamaño de partícula promedio, (B) PDI y (C) potencial ζ de las NPs con y sin CUR.

4.3.3 Determinación de la estabilidad durante el almacenamiento a distintas temperaturas

En la Figura 4.30 se presentan los resultados de tamaño promedio de partícula de las muestras a las diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento.

Frente a estos resultados, se puede decir que no hubo diferencias significativas entre los tamaños de las partículas sin y con CUR, en todas las temperaturas de almacenamiento y en la totalidad del período de estudio. Esto indica que el tamaño de las NPs se mantuvo estable por al menos 72 horas, tanto en un ambiente refrigerado como en un ambiente con

temperatura similar a la del organismo humano.

Resultados similares fueron obtenidos por Xu y col. (2020) para complejos caseína-SSPS-CUR. En su estudio, los autores reportaron que los valores de tamaño de partícula de los complejos no se modificaron significativamente durante 30 días a una temperatura de almacenamiento de 4 °C (Xu y col., 2020).

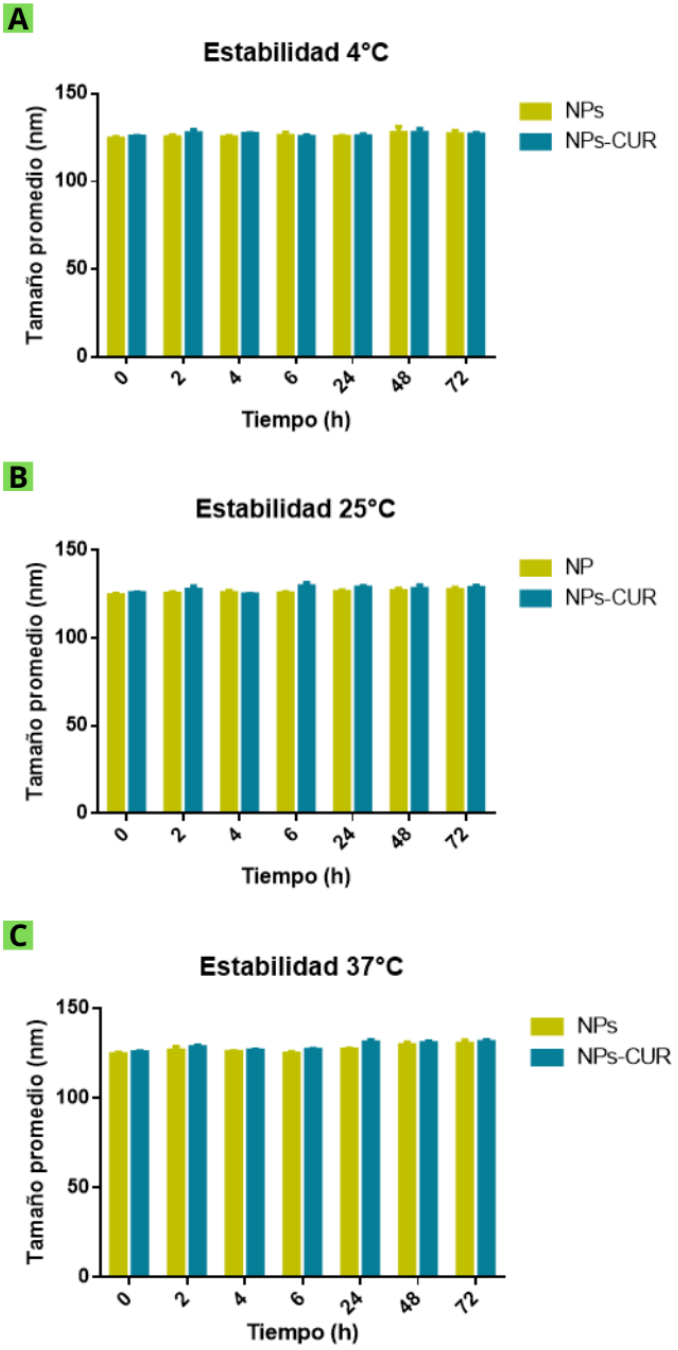

Figura 4.30 - Tamaño de partícula promedio de las NPs sin y con CUR almacenadas a (A) 4 °C, (B) 25 °C y (C) 37 °C.

En la Figura 4.31 se presentan los resultados obtenidos en relación a la estabilidad química de la CUR en las distintas temperaturas y tiempos de almacenamiento. En la Figura 4.32 se

presentan fotografías de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento.

En el caso de la CUR libre, se puede observar que ésta se degradó rápidamente en el periodo de tiempo estudiado, perdiéndose aproximadamente un 90% de CUR antes de las 10 horas de almacenamiento, para todas las condiciones de temperatura. Es importante mencionar que la disminución de la concentración de CUR en solución podría ocurrir pordos factores: en primer lugar, debido a su baja solubilidad en agua, ocurriría el fenómeno de precipitación, y en segundo lugar, debido a su baja estabilidad química, ocurriría la degradación. Según los resultados obtenidos, a medida que aumentó la temperatura (de 4 a 37°C) se observó que la velocidad de degradación aumentó. Este hecho se puede apreciar al ver una disminución más rápida de la concentración de CUR a la temperatura de almacenamiento de 37°C (Figura 4.31), acompañada de una menor cantidad de precipitado(Figura 4.32).

Por otro lado, para la CUR encapsulada en NPs WPI-SSPS, se observó cómo las NPs protegen a la CUR y retrasan e impiden su degradación y precipitación, al menos durante 72 horas en las muestras desde 4 a 37°C. Para todas las temperaturas de almacenamiento, se obtuvieron valores de retención de CUR mayores al 95 %. Cabe destacar que para las NPs-CUR almacenadas a 4 y 25°C, se realizó una determinación adicional luego de 8 días de almacenamiento, donde se observó que la concentración de CUR inicial continuaba siendo mayor al 95 % y remarcando la estabilización mediada por las NPs.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Xu y col. (2020) para complejos caseína-SSPS-CUR, los cuáles demostraron que la CUR libre se degradó en un 94 % luego de 5 días de almacenamiento a 25°C, mientras que los complejos presentaron una degradación de CUR de aproximadamente 3 % luego de 30 días de almacenamiento a 25°C.

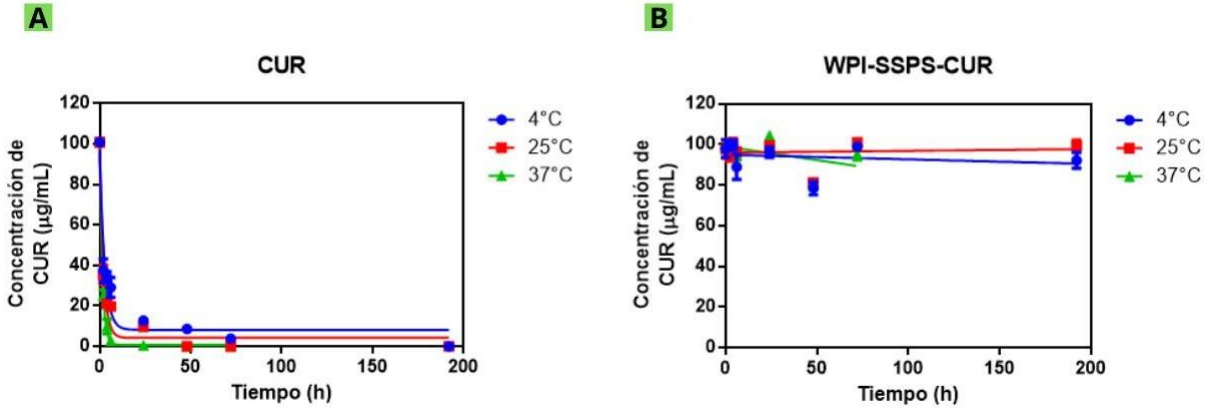

Figura 4.31 - Concentración de CUR en agua a pH 3,5 (A) y en NPs WPI-SSPS (B) a lo largo del tiempo de almacenamiento a 4 °C, 25 °C y 37 °C.

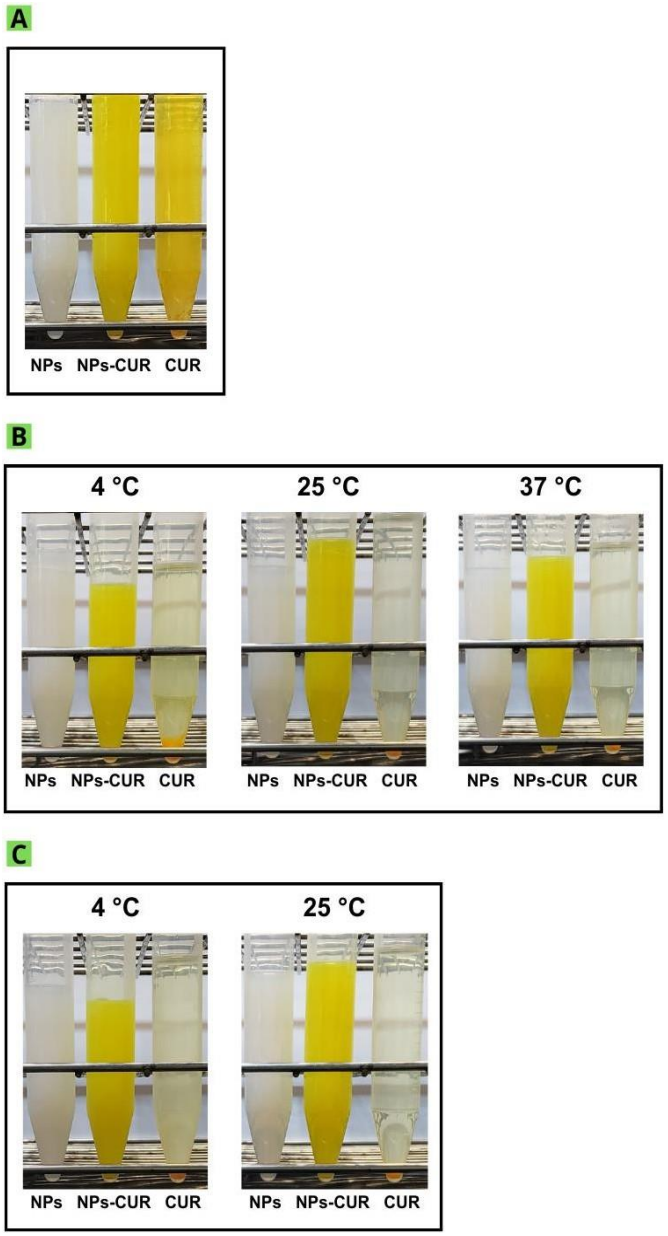

Figura 4.32 - Fotografías de las muestras de NPs, NPs-CUR y CUR al tiempo 0 (A) y luego de 72 h (B) y 192 h (C) de almacenamiento a 4 °C, 25 °C y 37 °C.

4.3.4 Determinación de la estabilidad frente al proceso de pasteurización

En la Figura 4.33 se presentan los resultados obtenidos luego del proceso de pasteurización comúnmente utilizado en alimentos bebibles.

En primer lugar, en comparación con el control de CUR libre, se observó cómo las NPs protegieron y evitaron la degradación de la CUR ante el tratamiento térmico aplicado, con una retención de CUR del 99,69 ± 0,46 % para los complejos NPs-CUR y del 25,89 ± 3,85 %

para la CUR libre. Estos resultados siguen la línea de los obtenidos por Xu y col. (2014) para complejos formados por lisozima, κ-carragenina y CUR. En dicho trabajo, los autores reportan que, al realizar un tratamiento de 60 °C durante 30 minutos, la retención de CURfue de 12,7 % para la CUR libre y de 25,1 % para los complejos lisozima-k-carragenina-CUR (Xu y col., 2014). Es interesante resaltar que la retención de CUR por parte de las NPs WPI-SSPS fue ampliamente mayor que la de los complejos lisozima-k-carragenina. Por su parte, en un estudio realizado por Zhang y col. (2023), tras someter a complejos de zeína, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina y CUR a un tratamiento de pasteurización a 65 °C por 30 minutos, se obtuvo una retención de CUR menor al 60 % para la CUR libre y mayor al 90 % para la CUR encapsulada (Zhang y col., 2023).

En segundo lugar, se observó que el potencial ζ, el tamaño de partícula y el PDI de las NPs se mantuvieron sin cambios significativos luego de la pasteurización, tanto en presencia como en ausencia de CUR. En conjunto, todos estos resultados continúan evidenciando la estabilidad incrementada de las NPs WPI-SSPS respecto de WPI y su potencialidad para encapsular y estabilizar compuestos bioactivos hidrofóbicos en matrices alimentarias ácidas.

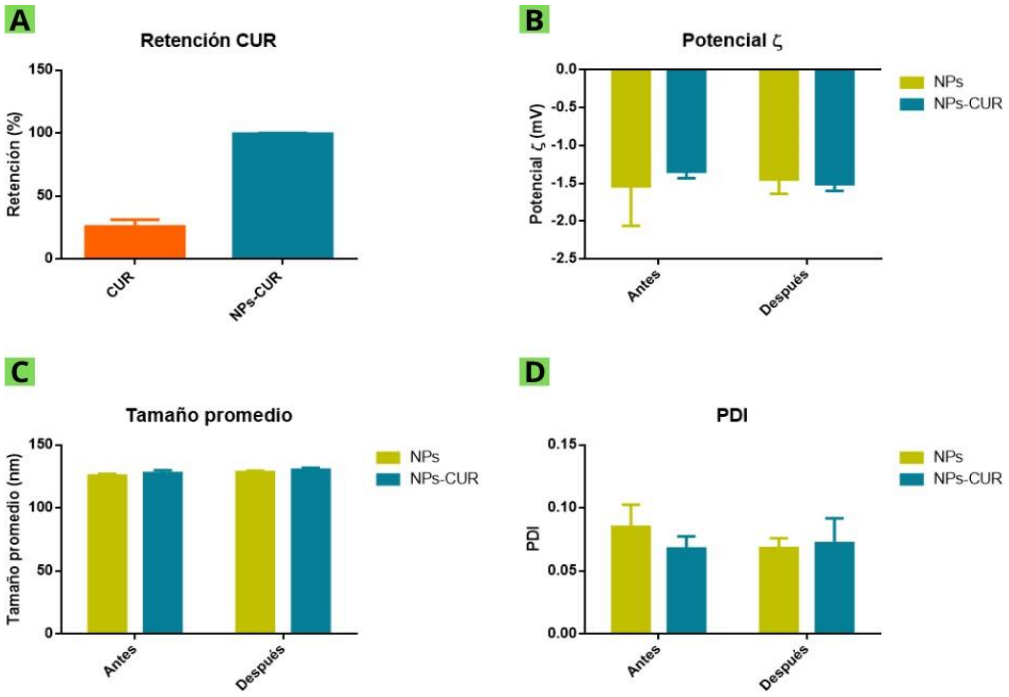

Figura 4.33 - (A) Retención de CUR luego del proceso de pasteurización en el control de CUR en agua pH 3,5 o en las NPs WPI-SSPS, (B) Potencial ζ, (C) tamaño de partícula promedio y (D) PDI de las NPs y NPs-CUR antes y después de la pasteurización.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron cumplir tanto con el objetivo general como con los objetivos específicos planteados al inicio de esta investigación.

En primer lugar, a partir de los resultados que se obtuvieron al estudiar diferentes condiciones de pH (2,0 a 7,0) y relaciones másicas WPI:SSPS (1:1 a 1:0,10), se pudo demostrar que, independientemente de la relación másica, ocurrió el autoensamblaje electrostático de los biopolímeros en condiciones de pH entre 2,0 y 4,3, donde el WPI presentó carga neta positiva y los SSPS presentaron carga neta negativa. Adicionalmente, se demostró que los rangos de pH para la formación de complejos autoensamblados (pH críticos) dependieron de la relación másica WPI:SSPS y que la estabilidad de las proteínas en condiciones ácidas se incrementó a medida que aumentó la concentración de SSPS disponible (diagrama de fases). A partir de estos resultados, fue posible cumplir el primer objetivo específico y seleccionar los rangos de pH y relación WPI:SSPS de interés para obtener nanopartículas autoensambladas.

En segundo lugar, se estudiaron los efectos del pH en el rango seleccionado (3,0, 3,5 y 4,0), de la relación másica WPI:SSPS en el rango seleccionado (1:0,50, 1:0,25 y 1:0,17) y el efecto de un tratamiento térmico (90 °C, 20 min) en las características de las NPs WPI- SSPS, cumpliendo con el segundo objetivo específico. A partir de estos resultados fue posible demostrar que:

- A medida que se disminuyó el pH (4,0 a 3,0):
    - Se tornó más positivo el potencial ζ de las NPs, debido a que existe una mayor cantidad de grupos de carga positiva aportados por WPI que no son contrarrestados por la carga negativa aportada por SSPS.
    - Disminuyó el tamaño de partícula promedio de las NPs, debido a la formación de una red interconectada fuertemente entre las proteínas y los polisacáridos.
    - No se modificó sustancialmente la hidrofobicidad aromática superficial en las muestras que no recibieron tratamiento térmico.
    - Se incrementó la estabilidad física de las NPs en dispersión, posiblemente debido a que las partículas presentan menor tamaño de partícula y menor tendencia a la agregación (por la lejanía con el pI de WPI).

- A medida que se disminuyó el contenido de SSPS (1:0,50, 1:0,25 y 1:0,17):
    - Se tornó más positivo el potencial ζ de las NPs, debido a que existe una menor cantidad de grupos con carga negativa aportados por el SSPS para contrarrestar las cargas positivas del WPI.
    - No se modificó sustancialmente el tamaño de partícula promedio ni la hidrofobicidad aromática superficial.
    - Se disminuyó levemente la estabilidad física de las NPs en dispersión, posiblemente debido a la menor cantidad de zonas de SSPS hidrofílicas en la superficie de las NPs que podrían estabilizar las partículas en dispersión por efectos estéricos.

- Cuando se realizó un tratamiento térmico (90 °C por 20 min):
    - Se incrementó el módulo del potencial ζ de las NPs, posiblemente debido a reorganizaciones en la estructura proteica, pero según el análisis de superficie este efecto no fue significativo.
    - Se incrementó levemente el tamaño de partícula, pero manteniéndolo en un rango nanométrico, posiblemente debido a una reorganización de laestructura de los complejos. Asimismo, la realización de un tratamiento térmico permitió estabilizar el tamaño promedio por al menos 56 días de almacenamiento.
    - Se incrementó la hidrofobicidad aromática superficial, posiblemente por el desplegamiento de la fracción proteica y la exposición de zonas hidrofóbicas hacia el exterior de las NPs.
    - Se incrementó la estabilidad física durante el almacenamiento, posiblemente debido a la estabilización del tamaño a lo largo del tiempo de almacenamiento.

A partir de estos resultados y utilizando la metodología de superficie de respuesta fue posible optimizar las condiciones de autoensamblaje de WPI y SSPS para obtener NPs con menor tamaño de partícula, potencial ζ cercano a la neutralidad, mayor hidrofobicidad superficial y mayor estabilidad física. Dichas condiciones se obtuvieron luego del tratamiento térmico en condiciones de pH 3,5 y relación WPI:SSPS 1:0,50.

Finalmente, se estudió la capacidad de estas NPs WPI-SSPS optimizadas para encapsular CUR. Estos estudios derivaron en la conclusión de que las mismas tienen una elevada eficiencia de encapsulación, acompañado de una buena capacidad de carga. Asimismo, se demostró que las NPs WPI-SSPS incrementaron la estabilidad química de la CUR en condiciones normalmente utilizadas para el procesamiento (pasteurización) y en almacenamiento de alimentos (4 y 25 °C) comparado con el control de CUR sin encapsular, el cual se degrada y/o precipita en tiempos considerablemente inferiores. Estos resultados permitieron cumplir con el tercer objetivo específico.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que es posible obtener complejos autoensamblados de WPI y SSPS con características adecuadas para encapsular y estabilizar curcumina en matrices alimentarias ácidas, confirmando nuestra hipótesis general de trabajo.

Como perspectivas, se propone estudiar la capacidad de las NPs WPI-SSPS-CUR de incrementar la bioaccesibilidad de CUR durante la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* por el método estandarizado INFOGEST 2.0. Se espera que la presencia de SSPS (polisacárido no digerible que se comporta como fibra alimentaria en el tracto digestivo humano), impida la degradación de las NPs a nivel gástrico y consecuente liberación de la CUR, aumentando la bioaccesibilidad del bioactivo a nivel intestinal. Además, en el caso de que las NPs estudiadas tengan dicha capacidad, se plantea la posibilidad de obtener productos sólidos por liofilización o secado por spray, para facilitar su incorporación en matrices alimentarias ácidas, obteniendo así alimentos funcionales.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, A., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, M. A. E., & Davoodi, D. (2014). Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate. Food Chemistry, 143, 379-383.

Alizadeh-Pasdar, N. y Li-Chan, E. C. (2000). *Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(2), 328-334.

Arroyo Castellón, Y. y Jiménez Farak, Y. (2013).*Evaluación de rendimiento de la alfa lactoalbumina extraída del lacto suero dulce evaporado* (Doctoral dissertation, Universidad de Cartagena).

Assadpour, E. y Mahdi Jafari, S. (2018). *A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59, 1-23.

Azarikia, F. y Abbasi, S. (2016). *Mechanism of soluble complex formation of milk proteins with native gums (tragacanth and Persian gum)*. Food Hydrocolloids, 59, 35-44.

Behrouzain, F., Razavi, S. M. A. y Joyner, H. (2020). *Mechanisms of whey protein isolate interaction with basil seed gum: Influence of pH and protein-polysaccharide ratio*. Carbohydrate Polymers, 232, 115775.

Bengoechea, C., Peinado, I. y McClements, D. J. (2011). *Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: Factors affecting particle characteristics*. Food Hydrocolloids, 25(5), 1354-1360.

Benichou, A., Aserin, A. y Garti, N. (2002). *Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions.*Journal of Dispersion Science and Technology, 23(1-3), 93- 123.

Boland, M. (2011). *Whey proteins.*Handbook of food proteins (pp. 30-55).Woodhead Publishing.

Bru P., Brunel L., Buron H., Cayré I., Ducarre X., Fraux A., Mengual O., Meunier G., de Sainte Marie A. y Snabre P. (Eds.), (2004). P*article size and rapid stability analyses of concentrated dispersions*: *Use of multiple light scattering technique.* Particle Sizing and Characterization. American Chemical Society, 45-60.

Cabezas, D. M., Pascual, G. N., Wagner, J. R. y Palazolo, G. G. (2019). *Nanoparticles assembled from mixtures of whey protein isolate and soluble soybean polysaccharides.*

Structure, interfacial behavior and application on emulsions subjected to freeze-thawing. Food Hydrocolloids, 95, 445–453.

Chen, S., Ma, X., Han, Y., Wei, Y., Guo, Q., Yang, S., Zhang, Y., Liao, W. y Gao, Y. (2020). *Effect of chitosan molecular weight on zein-chitosan nanocomplexes: Formation, characterization, and the delivery of quercetagetin.* International Journal of Biological Macromolecules, 164, 2215-2223.

Chungchunlam, S. M. S., Henare, S. J., Ganesh, S. y Moughan, P. J. (2016). *Effect of whey protein and a free amino acid mixture simulating whey protein on measures of satiety in normal-weight women.* British Journal of Nutrition, 116 (09), 1666–1673.

Davis, J. P. y Foegeding, E. A. (2007). *Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, *54*(2), 200-210.

De Kruif, C. G., Weinbreck, F. y De Vries, R. (2004). *Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides*. Current Opinion in Colloid and Interface Science, 9, 340-349.

Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. y Borges, S. V. (2017). *Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods.* Current Opinion in Food Science, 13, 31-37.

Dickinson, E. (2008). *Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions*. Soft Matter, 4(5), 932-942.

Dong, D., Qi, Z. y Cui, B. (2020). *Complex Formation between Soy Proteins and Potato Starch: Effect of pH, Biopolymer Ratio, and Biopolymer Concentration.* Starch/Staerke, 72(1-2), 1900020.

Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D. y Sanchez, C. (2000). *Protein-polysaccharide interactions.* Current Opinion in Colloid and Interface Science, 5, 202-214.

Du, Q., Zhou, L., Lyu, F., Liu, J. y Ding, Y. (2022). *The complex of whey protein and pectin: Interactions, functional properties and applications in food colloidal systems – A review.*Colloids Surfaces B Biointerfaces, 210, 112253.

Damodaran, S. y Parkin, K. L. (2017). *Characteristics of Milk.* Fenemma's food chemistry, (Edición 5ta, pp. 1018-1020). CRC Press.

Edwards, P. J. y Jameson, G. B. (2014). *Structure and stability of whey proteins.* Milk Proteins, 201-242.

Fioramonti, S. A., Perez, A. A., Aríngoli, E. E., Rubiolo, A. C. y Santiago, L. G. (2014). *De- sign and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate.* Food Hydrocolloids, 35, 129–136.

Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., & Morris, E. R. (2007). Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. Food hydrocolloids, 21(4), 638-644.

Furuta, H., Takahashi, T., Tobe, J., Kiwata, R. y Maeda, H. (1998). *Extraction of water- soluble soybean polysaccharide under acidic conditions.* Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 62(12), 2300-5.

Furuta, H. y Maeda, H. (1999). *Rheological properties of water-soluble soybean polysaccharides extracted under acidic condition*. Food Hydrocolloids, 13, 267-74.

Gaber, M., Mabrouk, M. T., Freag, M. S., Khiste, S. K., Fang, J. Y., Elkhodairy, K. A. y Elzoghby, A. O. (2018). *Protein-polysaccharide nanohybrids: Hybridization techniques and drug delivery applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 133, 42-62.

García, A. y Mayorga, E. (2015). *Correlación de glicomacropéptido de lactosuero dulce con proteasas de bacterias psicrótrofas e identificación de leche adulterada.* Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE (Vol. 10, No. 1, pp. 267-270).

Gentés, M. C., St-Gelais, D. y Turgeon, S. L. (2010). *Stabilization of whey protein isolate−pectin complexes by heat.*Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(11), 7051-7058.

Gentile, L. (2020).*Protein–polysaccharide interactions and aggregates in food formulations.* Current Opinion in Colloid and Interface Science,48, 18–27.

Gharanjig, H., Gharanjig, K., Hosseinnezhad, M. y Jafari, S. M. (2020). *Development and optimization of complex coacervates based on zedo gum, cress seed gum and gelatin.* International Journal of Biological Macromolecules, 148, 31-40.

Goff, H. D., Kinsella, J. E. y Jordan, W. K. (1989). *Influence of various milk protein isolates on ice cream emulsion stability.* Journal of Dairy Science, *72*(2), 385-397.

Goh, K. K. T., Teo, A., Sarkar, A. y Singh, H. (2019). *Milk protein-polysaccharide interactions.* Milk Proteins: From Expression to Food (pp. 499–535). Academic Press.

Gómez-Estaca, J., Balaguer, M. P., Gavara, R. y Hernandez-Munoz, P. (2012). F*ormation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin.* Food Hydrocolloids, 28(1), 82-91.

Guo, Q., Su, J., Shu, X., Yuan, F., Mao, L., Liu, J. y Gao, Y. (2020). *Production and characterization of pea protein isolate-pectin complexes for delivery of curcumin: Effect of esterified degree of pectin*. Food Hydrocolloids, 105, 105777.

Guo, Q., Su, J., Yuan, F., Mao, L. y Gao, Y. (2019). *Preparation, characterization and stability of pea protein isolate and propylene glycol alginate soluble complexes*. Lwt, *101*, 476-482.

Hadian, M., Hosseini, S. M. H., Farahnaky, A., Mesbahi, G. R., Yousefi, G. H. y Saboury, A. A. (2016). *Isothermal titration calorimetric and spectroscopic studies of β-lactoglobulin-water-soluble fraction of Persian gum interaction in aqueous solution*. Food Hydrocolloids, 55, 108-118.

Hanna, D. H., Lotfy, V. F., Basta, A. H. y Saad, G. R. (2020). C*omparative evaluation for controlling release of niacin from protein-and cellulose-chitosan based hydrogels.* International Journal of Biological Macromolecules, 150, 228-237.

Hansen, M. M., Maidannyk, V. A., Roos, Y. H. (2020). *Thermal gelation and hardening of whey protein beads for subsequent dehydration and encapsulation using vitrifying sugars*.Journal of Food Engineering, 279, 109966.

Heckert Bastos, L. P., de Carvalho, C. W. P. y Garcia-Rojas, E. E. (2018). Fo*rmation and characterization of the complex coacervates obtained between lactoferrin and sodium alginate.* International Journal of Biological Macromolecules, 120, 332-338.

Hu, C., Xiong, Z., Xiong, H., Chen, L., Zhang, Z. y Li, Q. (2020). *The formation mechanism and thermodynamic properties of potato protein isolate–chitosan complex under dynamic high-pressure microfluidization (DHPM) treatment.* International Journal of Biological Macromolecules, 154, 486-492.

Huang, W., Wang, L., Wei, Y., Cao, M., Xie, H. y Wu, D. (2020). *Fabrication of lysozyme/κ-carrageenan complex nanoparticles as a novel carrier to enhance the stability and in vitro release of curcumin.* International Journal of Biological Macromolecules, 146, 444-452.

Iosca, G., Turetta, M., De Vero, L., Bang-Berthelsen, C. H., Gullo, M. y Pulvirenti, A. (2023). *Valorization of wheat bread waste and cheese whey through cultivation of lactic acid bacteria for bio-preservation of bakery products*. LWT - Food Science and Technology, 176, 114524.

Jin, B., Zhou, X., Zheng, Z., Liang, Y., Chen, S., Zhang, S. y Li, Q. (2020). *Investigating on the interaction behavior of soy protein hydrolysates/β-glucan/ferulic acid ternary complexes under high-technology in the food processing: High pressure homogenization versus microwave treatment*. International Journal of Biological Macromolecules, *150*, 823–830.

Jones, O., Decker, E. A. y McClements, D. J. (2010). *Thermal analysis of β-lactoglobulin complexes with pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles.* Food Hydrocolloids, 24 (2–3), 239–248.

Jones, O. G. y McClements, D. J. (2011). *Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes.* Advances in Colloid and Interface Science, 167(1-2), 49-62.

Ju, Z. Y. y Kilara, A. (1998). *Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(5), 1830-1835.

Katouzian, I. y Jafari, S. M. (2016). *Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins*. Trends in Food Science & Technology, 53, 34-48.

Kawamura, S., Kobayashi, T., Osima, M. y Mino, M. (1955). *Studies on the carbohydrate of soybeans*. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan, 19, 69-76.

Kasaai, M. R. (2018). *Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: A review.* Trends in Food Science and Technology, 79, 184–197.

Klemmer, K. J., Waldner, L., Stone, A., Low, N. H. y Nickerson, M. T. (2012). *Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides.* Food Chemistry, 130 (3), 710–715.

Laclair, C. y Etzel, M. (2010). *Ingredients and pH are key to clear beverages that contain whey protein.*Journal of Food Science, 75(1), C21-C27.

Lan, Q., Li, L., Dong, H., Wu, D., Chen, H., Lin, D., Qin, W., Yang, W., Vasanthan, T. y Zhang, Q. (2019). *Effect of Soybean Soluble Polysaccharide on the Formation of Glucono-δ-Lactone-Induced Soybean Protein Isolate Gel.* Polymers, 11(12), 1997.

Lan, Y., Chen, B. y Rao, J. (2018). *Pea protein isolate–high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: Effect of pH, biopolymer ratio and concentrations.* Food Hydrocolloids, 80, 245–253.

Legrand, D., Elass, E., Carpentier, M. y Mazurier, J. (2005). *Lactoferrin*. Cellular and Molecular Life Sciences, *62*, 2549-2559.

Li, H., Yuan, Y., Zhu, J., Wang, T., Wang, D. y Xu, Y. (2020). *Zein/soluble soybean polysaccharide composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of lutein.* Food Hydrocolloids, 103, 105715.

Li, Q. y Zhao, Z. (2018). *Characterization of the structural and colloidal properties of α-lactalbumin/chitosan complexes as a function of heating.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66 (4), 972-978.

Li, Y., Liu, J., Ma, S., Yang, M., Zhang, H., Zhang, T., ... y Du, Z. (2022). *Co-assembly of egg white-derived peptides and protein-polysaccharide complexes for curcuminencapsulation: The enhancement of stability, redispersibility, and bioactivity.* Food Chemistry, 394, 133496.

Liu, J., Yang, J., Abliz, A., Mao, L., Yuan, F. y Gao, Y. (2020). *Influence of thermal treatment on physical, structural characteristics and stability of lactoferrin, EGCG and highmethoxylated pectin aggregates.* LWT, 125, 109221.

Liu, K., Hettiarachchy, N. y Kalapathy, U. (1997). *Soybean protein products.* Soybeans: chemistry, technology, and utilization, 379-411.

Ma, X., Yan, T., Hou, F., Chen, W., Miao, S. y Liu, D. (2019). *Formation of soy protein isolate (SPI)-citrus pectin (CP) electrostatic complexes under a high-intensity ultrasonic field:Linking the enhanced emulsifying properties to physicochemical and structural properties.* Ultrasonics Sonochemistry, *59*, 104748.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E. y Xavier Malcata, F. (2007). *Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties.* Food Research International, 40(10), 1197-1211.

Maeda, H. y Nakamura, A. (2009). *Soluble soybean polysaccharide* en Phillips y Williams (Ed.), Handbook of hydrocolloids (2da ed., pp. 693-706). Woodhead Publishing Limited.

McClements, D. J. (2005). *Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions*. Langmuir, 21, 9777-9785.

McClements, D. J. (2006). *Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides*. Biotechnology Advances, 24, 621-625.

McClements, D. J. (2020). *Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals.* Biotechnology Advances, 38, 107287.

Morita, M. (1965). *Polysaccharides of soybean seeds: Polysaccharide constituents of hot-water-extract fraction of soybean seed and an arabinogalactan as its major component*. Agricultural and Biological Chemistry, 29 564-73.

Nakamura, A., Furuta, H., Kato, M., Maeda, H. y Nagamatsu, Y. (2003). *Effect of soluble soybean polysaccharides on the stability of milk protein under acidic conditions.* Food Hydrocolloids, 17(5) 333-43.

Nakamura, A., Takahashi, T., Yoshida, R., Maeda, H. y Corredig, M. (2004). *Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide.* Food Hydrocolloids, 18(5), 795-803.

Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H. y Corredig, M. (2006). *The stabilizing behavior of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages*.International Dairy Journal, 16, 361-69.

Piculell, L. y Linfman, B. (1992) *Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences.* Advances in Colloids and Interface Science, 41, 149-178.

Poveda, E. (2013). *Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad.* Revista Chilena de Nutrición, 40(4), 397–403.

Rafiee, Z., Nejatian, M., Daeihamed, M. y Jafari, S. M. (2019). *Application of different nanocarriers for encapsulation of curcumin*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59(21), 3468–3497.

Rodríguez Patino, J. M. y Pilosof, A. M. R. (2011). *Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces.* Food Hydrocolloids, 25(8), 1925–1937.

Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P. y Cornacchia, L. (2017). *Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability.* Food Hydrocolloids, 73, 129-140.

Semenova, M (2017). *Protein–polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles.* Current Opinion in Colloid and Interface Science, 28, 15-21.

Shang, J., Liao, M., Jin, R., Teng, X., Li, H., Xu, Y., Zhang, L. y Liu, N. (2020).*Molecular Properties of flammulina velutipes polysaccharide–whey protein isolate (WPI) complexes via noncovalent interactions.* Foods, 10(1), 1.

Silva, S. (2013). *Calibración de refractómetro Brix para la determinación del contenido de Inmunoglobulina G en calostro bovino* (Doctoral dissertation, Thesis. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile).

Turgeon, S. L., Schmitt, C. y Sanchez, C. (2007). *Protein-polysaccharide complexes and coacervates.* Current Opinion in Colloid and Interface Science, 12, 166-178.

Tolstoguzov, V. B. (1991). *Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction.* Food Hydrocolloids, 4, 429-468.

Verma, D., Gulati, N., Kaul, S., Mukherjee, S. y Nagaich, U. (2018). P*rotein Based Nanostructures for Drug Delivery.* Journal of Pharmaceutics, *2018*, 1-18.

Wagoner, T. B. y Foegeding, E. A. (2017). *Whey protein–pectin soluble complexes for beverage applications*. Food Hydrocolloids, 63, 130-138.

Wang, S., Shao, G., Yang, J., Zhao, H., Qu, D., Zhang, D., Zhu, D., He, Y. y Liu, H. (2020). *Contribution of soybean polysaccharides in digestion of oil-in-water emulsion-based delivery system in an in vitro gastric environment.* Food Science and Technology International, 26(5), 444-452.

Wei, Z. y Huang, Q. (2019). *Assembly of protein–polysaccharide complexes for delivery of bioactive ingredients: A perspective paper.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(5), 1344-1352.

Wu, C. L., Chen, Q. H., Li, X. Y., Su, J. H., He, S., Liu, J. y Yuan, Y. (2020). *Formation and characterization of food protein–polysaccharide thermal complex particles: effects of pH, temperature and polysaccharide type.* International Journal of Food Science & Technology, *55*(3), 1368-1374.

Xu, W., Jin, W., Zhang, C., Li, Z., Lin, L., Huang, Q., Ye, S. y Li, B. (2014). *Curcumin loaded and protective system based on complex of k-carrageenan and lysozyme.* Food Research International, 59 61-66.

Xu, G., Li L., Bao, X. y Yao, P. (2020). *Curcumin, casein and soy polysaccharide ternary complex nanoparticles for enhanced dispersibility, stability and oral bioavailability of curcumin*. Food Bioscience, 35, 100569.

Xu, Y. T., y Liu, L. L. (2016). *Structural and functional properties of soy protein isolates modified by soy soluble polysaccharides.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, *64*(38), 7275-7284.

Yi, J., Fan, Y., Zhang, Y., Wen, Z., Zhao, L. y Lu, Y. (2016). *Glycosylated α-lactalbumin- based nanocomplex for curcumin: Physicochemical stability and DPPH-scavenging activity.* Food Hydrocolloids, 61, 369-377.

Yi, J., Peng, G., Zheng, S., Wen, Z., Gan, C. y Fan, Y. (2021). *Fabrication of whey protein isolate-sodium alginate nanocomplex for curcumin solubilization and stabilization in a model fat-free beverage.* Food Chemistry, 348 (2021), 129102.

Yoshii, H., Furuta, T., Maeda, H. y Mori, H. (1996). *Hydrolysis kinetics of okara and characterization of its water-soluble polysaccharides*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60(9) 1406-9.

Zamani, H., Zamani, S., Zhang, Z., y Abbaspourrad, A. (2020). *Exceptional colloidal stability of acidified whey protein beverages stabilized by soybean soluble polysaccharide.* Journal of Food Science, *85*(4), 989-997.

Zhang, Z., Li, X., Sang, S., McClements D. J., Chen, L., Long, J., Jiao, A., Jin, Z. y Qiu, C. (2023). *Preparation, properties and interaction of curcumin loaded zein/HP-β-CD nanoparticles based on electrostatic interactions by antisolvent co-precipitation.* Food Chemistry, 403, 134344.

Zhao, R. X., Qi, J. R., Liu, Q. R., Zeng, W. Q. y Yang, X. Q. (2018). *Fractionation and characterization of soluble soybean polysaccharide esterified of octenyl succinic an-hydride and its effect as a stabilizer in acidified milk drinks.* Food Hydrocolloids, 85, 215-221.

Zhong, W., Li, C., Diao, M., Yan, M., Wang, C. y Zhang, T. (2021). *Characterization of interactions between whey protein isolate and hyaluronic acid in aqueous solution: Effects of pH and mixing ratio.* Colloids and Surfaces B Biointerfaces, 203, 111758.