



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

**Diseño de nano/micro carriers de ácido fólico para la mejora de su  
biodisponibilidad en alimentos.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Química Industrial

Lic. Paula Daniela Zema

Director de tesis: Dra. Ana M. R. Pilosof

Director Asistente: Dra. Carolina Arzeni

Consejero de Estudios: Dra. Marcela Tolaba

Lugar de trabajo: Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Fecha de defensa: 26 de Mayo de 2021.

Buenos Aires, 2021.

## **Diseño de nano/micro *carriers* de ácido fólico para la mejora de su biodisponibilidad en alimentos.**

### **Resumen**

En los últimos años, se ha investigado ampliamente el desarrollo de sistemas alimentarios capaces de preservar o incrementar la biodisponibilidad de una gran variedad de compuestos bioactivos (por ejemplo, vitaminas y nutracéuticos). Las nano/microestructuras basadas en proteínas se presentan como importantes herramientas para la encapsulación de compuestos bioactivos, mostrando características interesantes y el potencial de ser utilizadas como sistemas vehículo. El objetivo de este trabajo fue, en primer lugar, el desarrollo y caracterización de *carriers* de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Ig) y gelatina (G) para el transporte de ácido fólico (AF), una vitamina hidrosoluble con numerosas funciones biológicas fundamentales y un componente esencial de la dieta, pero cuya escasa estabilidad durante el procesamiento (sensibilidad al calor, oxígeno y luz UV, entre otros), limita su consumo en niveles adecuados. Se encontró que tanto la  $\beta$ -Ig como la G fueron capaces de unir AF mediante interacciones iónicas a pH 3 formando partículas de tamaños crecientes conforme el incremento de la relación molar AF/proteína. Dichas partículas resultaron reversibles al cambio de pH. En segundo lugar, se evaluó el impacto de esta interacción sobre la bioaccesibilidad del AF mediante ensayos de digestión gastroduodenal *in vitro* y de biodisponibilidad mediante un modelo microbiano. Se verificó la liberación del AF de los *carriers* de  $\beta$ -Ig y G, por HPLC-RP indicando la bioaccesibilidad del bioactivo en el sitio de absorción. Asimismo, se determinó que los productos de la digestión gastroduodenal *in vitro* evidenciaron ser biodisponibles para *L. rhamnosus*. Por otro lado, se estudió la capacidad de los *carriers* proteicos para proteger al AF de la fotodegradación, debido a la gran sensibilidad de este bioactivo a la luz UV. Se determinó que la interacción con G a pH 3 fue más eficiente para evitar su degradación. Finalmente, se analizó el efecto del AF sobre

las propiedades reológicas y funcionales de esta proteína, dada la importancia de las mismas a la hora de ser utilizada como ingrediente en alimentos. En términos generales, no se observaron grandes diferencias en los parámetros reológicos y funcionales analizados debido a la presencia de la vitamina, lo cual permitiría una amplia aplicación de los *carriers* desarrollados.

**Palabras clave:**  $\beta$ -lactoglobulina, gelatina, ácido fólico, nano/micro *carriers*.

## **Design of nano/micro carriers of folic acid for the improvement of its bioavailability in food.**

### **Abstract**

In recent years, the development of food systems that are capable of preserving or increasing the bioavailability of a wide variety of bioactive compounds (e.g. vitamins and nutraceuticals) is being extensively investigated. Protein-based nano/microstructures are presented as important tools for the encapsulation of bioactive compounds, showing interesting characteristics and the potential to be used as vehicle systems. The objective of this work was, in the first place, the development and characterization of carriers of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Ig) and gelatin (G) for the transport of folic acid (FA), a water-soluble vitamin with numerous fundamental biological functions and an essential component of the diet, but whose poor stability during processing (sensitivity to heat, oxygen and UV light, among others), makes it difficult to consume at adequate levels. It was found that both  $\beta$ -Ig and G were able to bind FA through ionic interactions at pH 3, forming particles of increasing sizes as the FA/protein molar ratio increased. These particles were reversible to the change of pH. Secondly, the impact of this interaction on FA bioaccessibility was evaluated by *in vitro* gastroduodenal digestion tests, and bioavailability was studied using a microbial model. The release of FA from the  $\beta$ -Ig and G carriers was verified by HPLC-RP indicating the bioaccessibility of the bioactive at the absorption site. Likewise, it was determined that the products of *in vitro* gastroduodenal digestion were shown to be bioavailable for *L. rhamnosus*. On the other hand, the ability of protein carriers to protect FA against photodegradation was studied, due to the high sensitivity of this bioactive to UV light. It was determined that the interaction with G at pH 3 was more efficient to avoid its degradation. Finally, the effect of FA on the rheological and functional properties of this protein was analyzed, given their importance when used as an ingredient in food. In general terms, no relevant differences were observed in the studied rheological and functional parameters

due to the presence of the vitamin, which would allow a wide application of the developed carriers.

**Keywords:**  $\beta$ -lactoglobulin, gelatin, folic acid, nano/micro carriers.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Ana Pilosof, por su valiosa guía durante estos años de trabajo compartidos. Por su paciencia ante mis incertidumbres y su franca firmeza siempre que la necesité. Por sus aportes y comentarios, fundamentales para el análisis de resultados y durante la redacción de esta tesis.

A la Dra. Carolina Arzeni, mi gran compañera desde que empezamos juntas este viaje tan especial de la investigación. Por su paciencia infinita para enseñarme a usar los equipos y su dedicación desinteresada para ayudarme a entender mis resultados. Por ser mi sostén durante la redacción de la tesis, por confiar en mí siempre que yo dudaba.

A mis padres, Patricia y Horacio, y a mi hermana Ceci, por su amor incondicional, por acompañarme en todo lo que emprendo y por estar siempre atentos a mi bienestar. A Franco y Bruno, mis sobrinos, por hacer mis días mucho más luminosos. A mis abuelas y abuelos, que, desde su lugar, siempre están cerca.

A mis compañeros y compañeras del laboratorio durante mi beca, con quienes compartimos infinidad de horas de trabajo y de disfrute, de viajes y congresos, de cursadas y de festejos. A Ro y Fer, con quienes compartimos materias y TPs, además de salidas y charlas. A Juli, Víctor, Juliet, y Marian por escucharme y ayudarme siempre que los necesité. A Oscar, Karina y Federico, porque de todos aprendí algo.

A mis amigas de la facu y de la vida, por bancarme siempre en esta experiencia del doctorado, que se me hizo bastante larga, y no siempre fue fácil. Por escucharme y acompañarme cuando todo se oscurecía.

A mis compañeros y compañeras del Departamento de Química Orgánica, con quienes comparto docencia desde hace años e investigación desde el fin de mi

beca. A la Dra. Laura Malec, por incentivar me y darme el espacio para que termine la tesis.

Al Dr. Jean Guy LeBlanc, del CERELA, por realizar los experimentos microbiológicos que fueron importantes para esta tesis.

A la Dra. Sandra Guerrero, por sus consejos para la realización de los ensayos con luz UV y por facilitarnos el uso de la cabina.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que me otorgó la beca para realizar el doctorado y porque junto con la Universidad de Buenos Aires brindaron el financiamiento necesario para llevar a cabo las tareas de investigación.

A todos los integrantes del Departamento de Industrias, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, con quienes compartí estos años de trabajo.

¡¡¡Muchas gracias a todos!!!

## Índice

INTRODUCCIÓN .....	1
1. Ácido fólico .....	2
1.1. Estructura y nomenclatura .....	2
1.2. Funciones bioquímicas y actividad biológica .....	4
1.3. Propiedades químicas .....	6
1.4. Fuentes de la vitamina .....	7
Folato natural de los alimentos y su estabilidad .....	7
Ácido fólico en alimentos fortificados .....	8
2.1 Nano-micropartículas proteicas para el suministro de compuestos bioactivos en alimentos funcionales .....	11
2.2. Métodos para fabricar nano-micropartículas .....	12
3. $\beta$ -lactoglobulina .....	15
4. Gelatina .....	17
5. Referencias .....	21
OBJETIVOS .....	28
Objetivo General .....	29
Objetivos específicos .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
1. Materiales .....	31
1.1 Proteínas .....	31
1.2. Ácido fólico .....	32
1.3 Preparación de soluciones .....	32
2. Métodos .....	33
2.1. Evaluación del grado de unión de AF .....	33
2.2. Distribución de tamaño y potencial zeta de las partículas .....	34
2.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS) .....	34
Tamaño de partícula .....	34
Estudio de agregación por calentamiento mediante DLS .....	36
Potencial zeta .....	36
2.2.2. Dispersión estática de luz (SLS) .....	39
2.3. Microscopía confocal .....	39
2.4. Tratamiento con ultrasonido de alta intensidad .....	41
2.5. Digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> .....	42
2.5.1. Fluidos que simulan las condiciones de digestión gástrica y duodenal .....	42

2.5.2. Proceso de simulación de la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> .....	43
2.6. Biodisponibilidad de AF en <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	44
2.7. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). .....	44
2.8. Tratamientos con luz ultravioleta de onda corta .....	45
2.9. Reología Dinámica .....	46
2.10. Micro-calorimetría diferencial de barrido ( $\mu$ DSC).....	48
2.11. Análisis de textura y turbidez de geles de gelatina.....	49
2.11.1. Preparación de los geles.....	49
2.11.2. Análisis de propiedades texturales .....	49
2.11.3. Análisis de turbidez .....	49
2.12. Análisis estadístico .....	50
3. Referencias.....	51
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo I .....</b>	<b>54</b>
I.1. Unión de ácido fólico a proteínas .....	55
I.2. Tamaño de partícula y microestructura de sistemas mixtos AF/proteína a pH 3.....	61
I.3. Comportamiento térmico de partículas de ácido fólico/proteína a pH 3.....	71
I.4. Reversibilidad frente al cambio de pH de partículas AF/proteína .....	73
I.5. Modificación del tamaño de partícula de los agregados formados.....	74
I.6. Conclusiones.....	78
I.7. Referencias.....	79
<b>Capítulo II .....</b>	<b>82</b>
II.1. Estudio de la bioaccesibilidad <i>in vitro</i> del ácido fólico.....	83
II.2. Determinación por HPLC de ácido fólico luego de la digestión gastroduodenal .....	85
II.3. Evaluación de la biodisponibilidad del AF luego de la digestión gastroduodenal <i>in vitro</i> en <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	93
II.4. Conclusiones.....	98
II.5. Referencias.....	99
<b>Capítulo III .....</b>	<b>102</b>
III.1. Fotoquímica del ácido fólico .....	103
III.2 Antecedentes de estrategias de fotoprotección de AF mediante proteínas .....	105
III.3. Efecto de los <i>carriers</i> proteicos sobre la fotodegradación del ácido fólico .....	106
III.4. Conclusiones.....	121
III.5. Referencias.....	122
<b>Capítulo IV .....</b>	<b>125</b>
IV.1. Propiedades y características de importancia tecnológica de la gelatina .....	126

IV.2. Dinámica de gelificación de la gelatina.....	128
IV.3. Calorimetría diferencial de barrido.....	133
IV.4. Textura de geles .....	136
IV.5. Turbidez de geles .....	139
IV.6. Conclusiones .....	142
IV.7. Referencias.....	143
CONCLUSIONES GENERALES .....	145
Conclusiones generales.....	146

# **INTRODUCCIÓN**

Uno de los desafíos de la industria alimentaria es el desarrollo de alimentos funcionales, cuya finalidad es la de aportar no sólo los nutrientes tradicionales, sino aquellos que contribuyan, además, con algún efecto beneficioso para la salud o en la prevención de enfermedades (Ashwell 2004). La biodisponibilidad, por su parte, se define como la cantidad ingerida de un nutriente que es absorbida y disponible para funciones fisiológicas, y depende de la digestión, de la liberación de la matriz alimentaria, de la absorción por las células intestinales y el transporte hacia las células del cuerpo (Etcheverry et al. 2012). En este contexto, constituye un reto preservar o incrementar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos (p. ej., vitaminas y nutracéuticos) que, en contacto con condiciones adversas (p. ej., fluidos gástricos con bajo pH, altas concentraciones de sales y fuerza iónica), y la baja solubilidad durante la digestión gastrointestinal da como resultado que solo quede una pequeña proporción disponible luego de la administración oral, lo cual limita la actividad y los potenciales beneficios para la salud de estos compuestos (Chen 2009). En los últimos años, se ha investigado ampliamente la producción de sistemas capaces de mantener la actividad de estas moléculas hasta el momento del consumo y el posterior aprovechamiento en el organismo. En este sentido, los sistemas de suministro basados en proteínas son prometedores para proporcionar dicha protección a las moléculas bioactivas y cumplir con el requisito del uso de compuestos “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS), que es obligatorio en la industria alimentaria.

## **1. Ácido fólico**

### **1.1. Estructura y nomenclatura**

Entre los bioactivos de interés, se encuentra la vitamina B9 o ácido fólico (AF). Los folatos constituyen una familia de compuestos que difieren en el estado de oxidación de la molécula, la longitud de la cadena lateral de glutamato, y las unidades específicas de un carbono unidas a la molécula. La molécula de folato, tetrahidrofolato (THF), deriva del 5,6,7,8-tetrahidropteroiloilglutamato, que

consiste en una porción de 2-amino-4-hidroxi-pteridina (pterina) unida mediante un grupo metileno en la posición del C-6 de un ácido p-aminobenzoilglutámico (pABG) (Figura 1). El anillo de pirazina en el THF está totalmente reducido en las posiciones 5, 6, 7 y 8 y las reducciones sólo en las posiciones 7 y 8 dan lugar al dihidrofolato. La forma monoglutamato de la vitamina contiene una molécula de ácido glutámico, que puede ser convertida a una cadena de glutamatos mediante la adición de residuos de glutamato por uniones  $\gamma$ -peptídicas. En la mayoría de los folatos que existen en la naturaleza, el número de unidades de glutamato en la cadena lateral varían entre 5 y 8.

El AF es la forma completamente oxidada de monoglutamato de la vitamina y es la forma empleada comercialmente en suplementos y alimentos fortificados. En contraste con el poliglutamil folato, el AF raramente existe naturalmente en los alimentos.

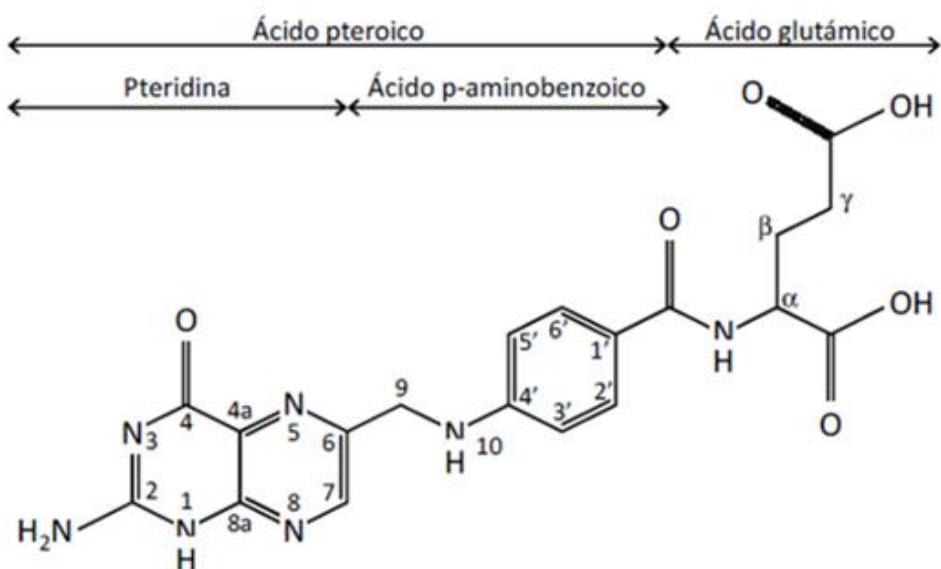
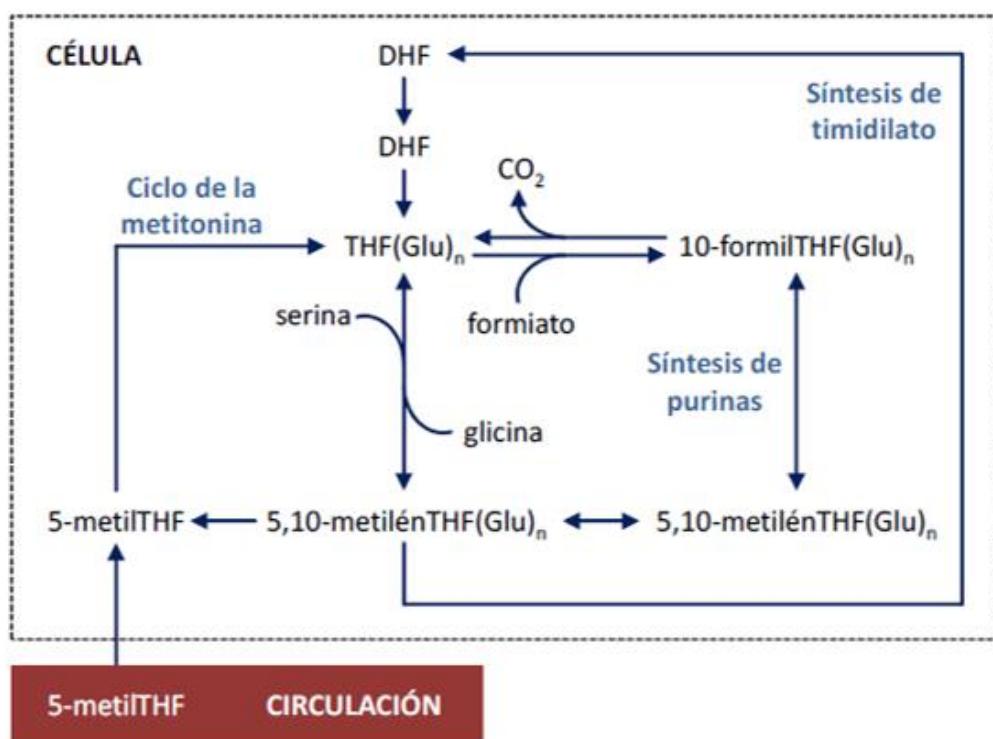


Figura 1. Estructura del ácido fólico.

## **1.2. Funciones bioquímicas y actividad biológica**

En la célula, la función de los folatos reside principalmente en su capacidad para donar y captar unidades de carbono. El THF es capaz de captar el grupo metilo de la serina en una reacción reversible catalizada por la serina hidroximetil transferasa que da lugar a 5,10-metilenTHF (Figura 2). El 5,10-metilenTHF es el derivado más inestable y se disocia enseguida en formaldehido y THF. El 5-metilTHF es el derivado que cede su grupo metilo en la síntesis de metionina a partir de homocisteína en una reacción catalizada por la metionina sintasa, enzima que además requiere la presencia de vitamina B12 como cofactor. Esta es una de las reacciones principales del ciclo de la metilación, en el cual se sintetiza S-adenosilmetionina, molécula que actúa como donante de grupos metilo en un sinfín de reacciones de transmetilación implicadas en el metabolismo celular. Además, es la única reacción en la que el 5-metilTHF puede perder su grupo metilo. Los folatos en la circulación se encuentran principalmente en la forma de 5-metilTHF. Para que puedan ser retenidos en la célula es necesario que adquieran residuos glutámicos adicionales, pero el 5-metilTHF no es buen sustrato de la folilpoliglutamato sintasa. El 5-metilTHF debe demetilarse en la reacción catalizada por la metionina sintasa para convertirse en THF y ser susceptible de poliglutamilación, por lo que esta reacción es también necesaria para la captación de los folatos circulantes (Selhub y Rosenberg 1996).



**Figura 2.** Metabolismo y función de los folatos en el organismo  
(Varela-Moreiras et al. 2000).

En resumen, los folatos participan en el metabolismo de ciertos aminoácidos, en la síntesis de S-adenosilmetionina y en la síntesis de purinas y pirimidinas. En cuanto a los aminoácidos, participan en el catabolismo de la histidina y la glicina, en la interconversión glicina-serina y en la síntesis de metionina. También participan en la síntesis de proteínas al actuar en la reacción de formilación de la metionina. La S-adenosilmetionina es la molécula donante de grupos metilo. Las purinas (adenina y guanina) y las pirimidinas (timina, citosina, uracilo) se unen a moléculas de azúcares (ribosa y desoxiribosa) y ácido fosfórico para formar los nucleótidos (AMP, GMP, TMP, CMP, UMP). Los nucleótidos forman parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de derivados de gran importancia metabólica (AMPcíclico, ATP, GTP, etc.) (Varela-Moreiras et al. 2000). Durante el embarazo, las células fetales y maternas se dividen rápidamente y conducen a mayores necesidades de folato para satisfacer las demandas de una mayor síntesis de ADN y reacciones de transferencia de un carbono (Scholl y Johnson 2000). Los niveles de folato materno deficientes, así como la hiperhomocisteinemia materna, se han

asociado con resultados deficientes del embarazo, incluidos parto prematuro, preeclampsia, bajo peso al nacer, retraso del crecimiento fetal (Tamura et al. 1997; Furness et al. 2012), defectos del tubo neural y cardíacos (Zempleni et al. 2013).

### **1.3. Propiedades químicas**

El peso molecular del AF es de 441,4 Da y aunque se suele denominar como hidrosoluble, la forma ácida es muy poco soluble en agua, en contraste con la forma de sal, que es bastante soluble. La molécula de THF es lábil en solución debido a su sensibilidad al oxígeno, la luz, y las condiciones extremas de pH. En soluciones oxigenadas, el THF se degrada y forma pterin-6-carboxilato, H<sub>2</sub>pterina, pterina y xantopterina. La molécula es rápidamente clivada en la unión del C-9-N-10 y forma pABG (Chippel y Scrimgeour 1970). A diferencia del THF y del THF N-10-sustituido, que son inestables en presencia del oxígeno, el AF y el THF sustituido en el N-5 (o N-5, N-10) son relativamente estables a la exposición al oxígeno. La inestabilidad a la luz es una característica de todas las formas de folato. En soluciones acuosas, el AF se vuelve cada vez más inestable al calor a medida que el pH desciende por debajo de 5,0 (Chen y Cooper 1979). También es sensible a la exposición a la luz en soluciones acuosas, principalmente en condiciones ácidas (Akhtar et al. 1999).

La estabilidad del AF se ha investigado en varias condiciones de pH (2-11) a temperatura ambiente durante diferentes tiempos (2,5 a 72 h). El AF se mantuvo estable en condiciones alcalinas (rango de pH 8,05-10,40), con solo 6,9% de degradación después de 72 h. La degradación fue de alrededor del 77% a valores de pH de 1,95 a 6,40 (Liang et al. 2013). La vida media de la degradación del AF a pH 5 o más a temperatura ambiente fue mayor de 700 h, pero la misma cayó dramáticamente de 24-64 h a valores de pH por debajo de 4 (O'Broin et al. 1975). En estos casos, se produjo la hidrólisis ácida del enlace C9-N10 del AF y se obtuvo 6-metilpterina o 6-metildihidropterina en condiciones aeróbicas (Kwee 1983).

## 1.4. Fuentes de la vitamina

### Folato natural de los alimentos y su estabilidad

Los mamíferos no son capaces de sintetizar folatos *de novo*. Por lo tanto, la ingesta a través de la dieta que incluya folatos naturales y AF sintético es la única forma de cumplir con los requisitos diarios. La ingesta diaria recomendada (IDR) de AF, según el grupo etario, se presenta en la Tabla 1. Los alimentos se agrupan según su contenido de folato en fuentes ricas (> 100 µg por ración), buenas (50-100 µg por ración) y moderadas (15-50 µg por ración). Las fuentes ricas en folatos son las legumbres con un contenido de folato de hasta 600 µg/ 100 g (porotos y garbanzos) y las verduras de hoja verde, que llegan hasta 200 µg/ 100 g (espinacas). Las fuentes moderadas de folatos incluyen otras verduras y frutas, excepto las frutillas con 65-100 µg / 100g. Los cereales son fuentes importantes debido a su alto consumo en muchos países. Una regla general es que los productos integrales o los productos con un alto grado de extracción contienen más folato que el endospermo almidonoso (Witthöft y Hefni 2016). Sin embargo, muchas dietas no logran alcanzar la IDR tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados, y especialmente aquellos de nivel socioeconómico más bajo no consumen alimentos con alto contenido de folato (Strobbe y Van Der Straeten 2017).

**Tabla 1.** Ingesta diaria recomendada para AF, expresada en equivalentes diarios de folato (EDF).

Grupo	IDR (μg/día)
<i>Lactantes y niños</i>	
0-6 meses <sup>a</sup>	80
7-12 meses	80
1-3 años	150
4-6 años	200
7-9 años	300
Adolescentes, 10-18 años	400
<i>Adultos</i>	
19-65 años	400
>65 años	400
Embarazo	600
Lactancia	500

Basado en una ingesta de leche materna de 0,75 L/día

Fuente: (WHO y FAO 2004)

Muchas frutas y verduras se consumen como productos procesados industriales o caseros, los cuales implican pérdidas de folato. Las mayores pérdidas de folatos fueron superiores al 90% para las espinacas picadas al hervir y escaldar (Bureau et al. 2015). El enlatado (DeSouza y Eitenmiller 1986; Delchier et al. 2013; Hefni y Witthöft 2014) y el remojo (Hawkes y Villota 1989; Dang et al. 2000) también afectan fuertemente el contenido de folato, con pérdidas de 50-70% para las espinacas y 84% para el coliflor, respectivamente. El recalentamiento resultó en una pérdida de folato del 7 al 50% en las comidas listas para el consumo (Williams 1996; Johansson et al. 2008).

### Ácido fólico en alimentos fortificados

Uno de los descubrimientos de salud pública más importantes de este siglo es que la administración periconcepcional diaria de suplementos de AF reduce significativamente el riesgo de defectos del tubo neural (Zempleni et al. 2013). La evidencia científica que vincula al AF como estrategia para la prevención de las

enfermedades de tubo neural condujo a estrategias de salud pública de alcance masivo que aseguraran en la población cantidades fisiológicas adecuadas de folato: suplementación farmacológica y fortificación de alimentos.

En Argentina, la harina de trigo destinada a consumo que se comercializa está enriquecida, según la Ley 25.630, con 2,2 mg AF/kg, entre otras vitaminas que también se adicionan (ANMAT 2002), con el fin de reducir los riesgos de defectos en la formación del tubo neural. A nivel mundial, 61 países (entre ellos, los Estados Unidos, Canadá, Australia, Cabo Verde, Indonesia y Kosovo) tienen legislación para exigir la fortificación de las harinas de maíz y/o trigo con AF a septiembre de 2019 (Wusigale y Liang 2020). Otros productos fortificados con AF se ofrecen en 17 países, incluidos China, Sudán, Perú e Irak, mediante el fortalecimiento voluntario (Food Fortification Initiative 2020).

En lo que respecta a la fortificación de harinas, Chandra-Hioe y colaboradores (2011) han reportado sobre importantes diferencias en el nivel de AF detectado en el análisis de panes (79 y 110 µg/ 100 g de pan) en relación a los valores requeridos por el programa de fortificación en Australia (200 a 300 µg/ 100 g de harina). Otros autores han reportado pérdidas de entre 12 y 25 % de AF durante la elaboración del pan, las cuales dependieron del tipo de pan, los tiempos de fermentación y de horneado (Gujksa y Majewska 2005; Anderson et al. 2010; Öhrvik et al. 2010). Por otro lado, el proceso de fermentación, en algunos casos ha permitido mejorar el contenido de folatos (Gujksa y Majewska 2005; Witthöft y Hefni 2016).

Por otra parte, bajo el concepto de desarrollo de productos novedosos con nuevos sabores y flavours, que signifiquen un beneficio para la salud, impliquen un incremento en la estrategia de ventas y que el consumidor sea capaz de disfrutar por su calidad, se han estudiado numerosos casos de alimentos populares fortificados con AF.

En la literatura científica se mencionan ejemplos de alimentos fortificados de origen vegetal como copos de maíz, harinas de trigo, avena y maíz, arroz y cacao, productos a base de frutas secas y cereales, germen de trigo, galletas de harina de trigo (Arcot et al. 2002). Se ha evaluado su rol para prevenir tumores en intestino de ratas adicionándolo a masas de panes hechas con diferentes formulaciones, encontrándose algunos resultados alentadores en cuanto a la prevención de la carcinogénesis (Omar et al. 2009).

También se ha adicionado AF a alimentos lácteos como quesos y yogures. En este sentido, Madziva, Kailasapathy, y Phillips (2006) encapsularon AF en microcápsulas formadas por alginato y pectina, sistemas que fueron agregados a la leche destinada a quesería. Se encontró que esta estrategia presentó una alta eficiencia de encapsulación, notable estabilidad en la leche, se incrementó significativamente la capacidad de retención del AF durante la elaboración y procesamiento de la masa de queso Cheddar. La adición del AF encapsulado, lo protegió durante la maduración, y la cantidad dosada fue mayor que la presente en los quesos en los que se había agregado el bioactivo sin encapsular. Otro producto muy popular que fue fortificado con AF fue el yogurt (Boeneke y Aryana 2008). Los autores estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de AF sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de un yogurt de limón, realizaron además estudios durante el tiempo de almacenamiento. El AF fue agregado antes y después de la pasteurización de la leche, encontrándose mayor concentración del mismo en muestras adicionadas con el ácido luego del proceso térmico, aunque la viscosidad de estas mismas muestras fue levemente menor y con mayor sinéresis del suero. El nivel de AF impactó en el perfil sensorial de los yogurts, a mayores concentraciones, el nivel de aceptación en lo que respecta al flavour decreció.

## 2.1 Nano-micropartículas proteicas para el suministro de compuestos bioactivos en alimentos funcionales

Tal como se ha descripto en los apartados anteriores, el AF es esencial en la dieta y una ingesta adecuada del mismo podría prevenir enfermedades tales como la anemia megaloblástica y los defectos del tubo neural durante el embarazo. No obstante, debido a su baja tasa de consumo y escasa estabilidad durante el procesamiento (sensibilidad al calor, oxígeno y luz UV, entre otros), o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes), la fortificación de alimentos con este bioactivo a través de la encapsulación se ha impuesto como una estrategia para la protección efectiva del mismo. El objetivo de estas nuevas estructuras sería proporcionar mecanismos de protección que mantengan la forma molecular activa hasta el momento del consumo y puedan vehiculizarla al sitio de absorción dentro del organismo (Chen et al. 2006).

Las proteínas alimentarias como vehículos de compuestos bioactivos están recibiendo un creciente interés científico e industrial por tratarse de materiales GRAS, que en general provienen de fuentes naturales abundantes y se utilizan ampliamente en alimentos formulados porque tienen un alto valor nutricional y son degradables por las enzimas digestivas. Sumado a ello, los péptidos bioactivos generados a partir de la degradación de las proteínas alimentarias pueden ejercer una serie de efectos fisiológicos *in vivo* sobre los sistemas gastrointestinal, cardiovascular, endocrino, inmunológico y nervioso (Chen 2009).

Las propiedades funcionales típicas de las proteínas en los alimentos incluyen la gelificación, emulsificación, espumado, textura, absorción de agua, adhesión y cohesión, y absorción y retención de lípidos y flavour. Las mismas están relacionadas con las propiedades físicas, químicas y estructurales intrínsecas de las proteínas, incluyendo tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta y distribución de las cargas y relación hidrofobicidad/hidrofilicidad (Damodaran 1996). Particularmente están definidas

por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, las uniones inter e intramoleculares, principalmente uniones disulfuro, la rigidez/flexibilidad molecular en respuesta a los cambios de las condiciones ambientales y la naturaleza y la extensión de las interacciones con otros componentes. Kinsella (1976; 1982) definió a las propiedades funcionales como “aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, el almacenamiento, la preparación y el consumo”.

Basados en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas, es posible estudiarlas como materiales para el desarrollo de sistemas de administración de bioactivos.

## 2.2. Métodos para fabricar nano-micropartículas

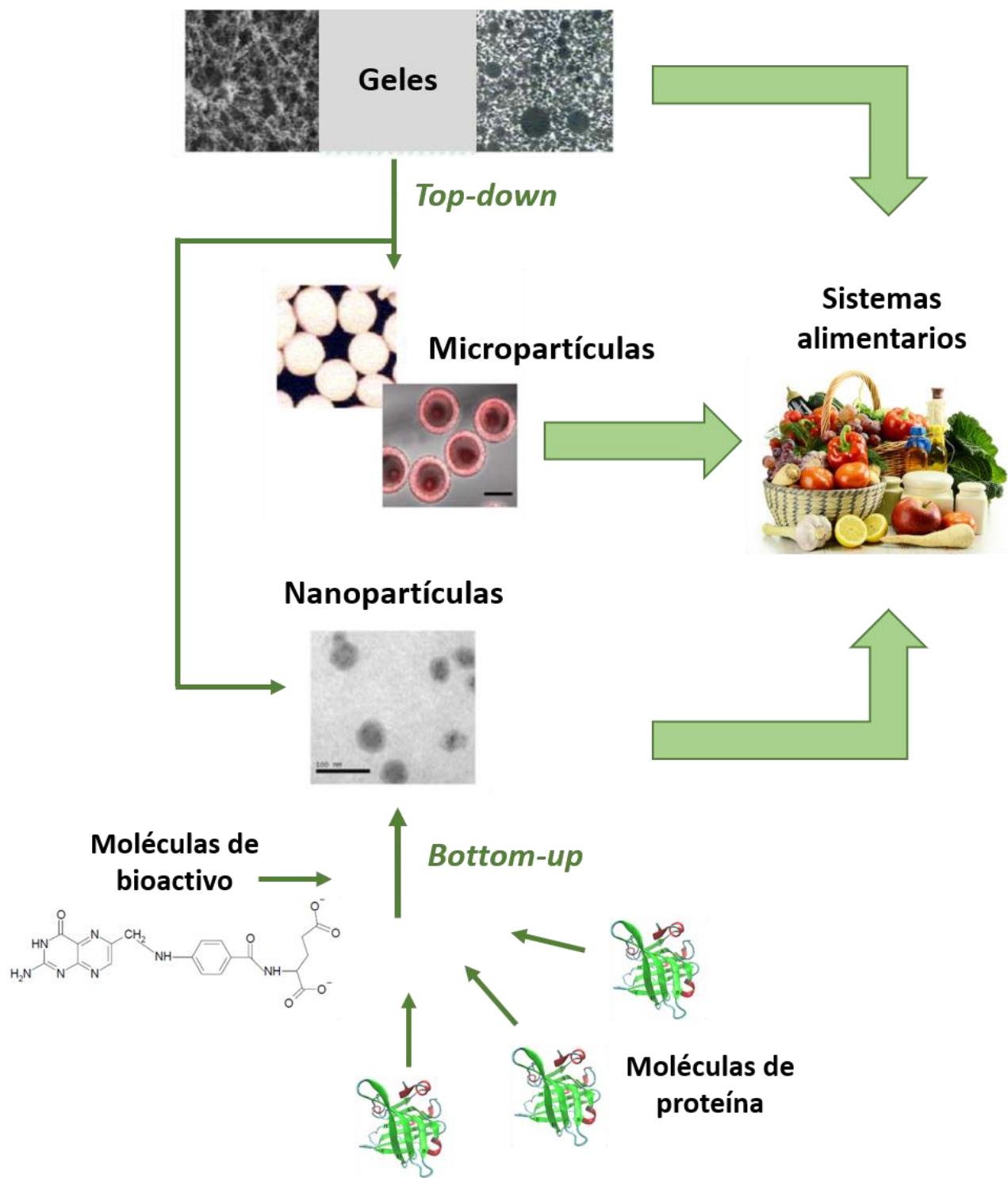
Se pueden emplear distintos métodos para fabricar nanopartículas, dependiendo de la naturaleza de los compuestos de partida y del desempeño funcional deseado (Figura 3). En general, estos métodos de producción pueden ser agrupados en tres categorías:

- Métodos “de arriba hacia abajo” (o *top-down*, en inglés): las partículas se forman por la ruptura de un material macroscópico en unidades de menor tamaño.
- Métodos “de abajo hacia arriba” (o *bottom-up*, en inglés): las partículas se forman por el ensamblaje de moléculas o partículas coloidales en estructuras específicas.
- Métodos combinados: en estos métodos, las partículas se forman mediante una combinación de métodos *top-down* y *bottom-up* (Lesmes y McClements 2009).

En general, el método de producción empleado demandará un conocimiento específico para su implementación correcta. Los métodos *bottom-up* requieren

una comprensión exhaustiva de la química y las interacciones de los componentes individuales de los alimentos, mientras que los métodos *top-down* requieren un profundo conocimiento del diseño y de los principios de operación de los equipamientos empleados para el procesamiento de alimentos (Velikov y Pelan 2008; Augustin y Hemar 2009).

En el presente trabajo se empleará el método *bottom-up* como estrategia para la formación de transportadores proteicos de AF, utilizando  $\beta$ -lactoglobulina y gelatina en los distintos sistemas estudiados.

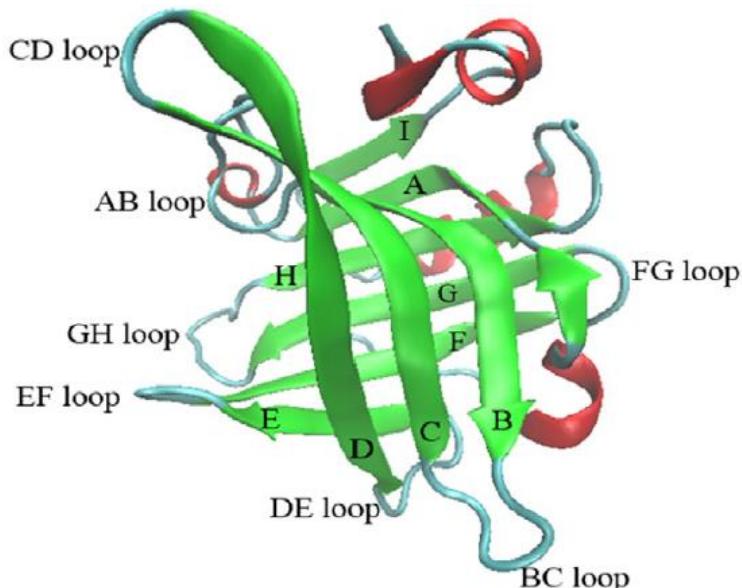


**Figura 3.** Representación esquemática de materiales basados en proteínas como vehículos de compuestos bioactivos. (Adaptado de Chen et al. (2006)).

### 3. $\beta$ -lactoglobulina.

La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Ig) es la proteína más abundante del suero lácteo (50 – 65% del suero y 7 – 12% del total de las proteínas de la leche). Es una proteína globular con una cadena polipeptídica simple de 162 aminoácidos y tiene un peso molecular de 18,4 kDa (Mollea et al. 2013).

La estructura nativa de una proteína resulta de un balance de varias fuerzas atractivas y repulsivas que ocurren entre diferentes partes de la cadena polipeptídica y entre la cadena polipeptídica y las moléculas del solvente (Relkin, 1996). La estructura secundaria de la  $\beta$ -Ig nativa consta de nueve láminas  $\beta$  y una hélice  $\alpha$ , tal como se muestra en la Figura 4. Ocho de las láminas  $\beta$  (A-H), se pliegan en un barril  $\beta$  aplanado, también denominado cáliz. Este cáliz es cónico e incluye dos superficies, una formada por las láminas A-D y la otra por las láminas E-H. Su interior es hidrofóbico y actúa como el principal sitio de unión de ligandos hidrofóbicos. La novena lámina (I) constituye una parte importante de la interfase del dímero y tiene un rol fundamental en las interacciones diméricas (Shafaei et al. 2017).



**Figura 4.** Estructura molecular de  $\beta$ -Ig y representación de sus 9 láminas  $\beta$  (A-I) (Shafaei et al. 2017).

El punto isoeléctrico (pI) de la  $\beta$ -Ig se encuentra entre 4,6 y 5,2 según la variante genética (Barnett y Bull 1960; Bromley et al. 2005; Das y Kinsella 1989; Harnsilawat et al. 2006; Haug et al. 2009; Townend et al. 1964). Por debajo de pH 3 y por encima de pH 7, la  $\beta$ -Ig existe como monómero. Entre pH 3,1 y 5,1 a bajas temperaturas y altas concentraciones de proteína, la  $\beta$ -Ig se asocia hasta en forma octamérica. A otros valores de pH, incluyendo el pH natural de la leche (pH 6,5), la  $\beta$ -Ig se presenta generalmente en forma dimérica (Martinez y Pilosof 2018).

La  $\beta$ -Ig pertenece a la familia de las lipocalinas, que poseen diferentes funciones, entre ellas la unión a ligandos. La presencia de diversos grupos, hidrofílicos, con carga, hidrofóbicos ( $-\text{CH}_3$  y anillos bencénicos,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ , y  $-\text{SH}$ ), en la estructura de la proteína proveen una base potencial para el desarrollo de enlaces de hidrógeno, puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con moléculas pequeñas (Swain et al. 2020).

Existen numerosos trabajos en los que se estudia la unión de  $\beta$ -Ig a ligandos anfifílicos e hidrofóbicos, entre ellos, Liang y col. (2008) investigaron la interacción con resveratrol, un compuesto polifenólico natural hallado en uvas y vino tinto, que muestra numerosos beneficios para la salud. Observaron la formación de un complejo 1:1 entre  $\beta$ -Ig y resveratrol, que provee ciertas ventajas con respecto a la molécula libre, como un ligero incremento en la fotoestabilidad y un incremento significativo en su solubilidad en medio acuoso.

Una investigación de Ghalandari y col. (2015) expone que el oxaliplatino, utilizado como droga antitumoral, puede unirse a la  $\beta$ -Ig en una relación molar de 1:1. Su trabajo revela que el oxaliplatino interacciona con la cavidad interna de la  $\beta$ -Ig mediante interacciones hidrofóbicas y, por tanto, proponen el uso del complejo  $\beta$ -Ig-oxaliplatino como un sistema avanzado de suministro de drogas contra el cáncer colorrectal.

Por su parte, Zhang y col. (2014), estudiaron la posibilidad de unir, simultáneamente, múltiples ligandos bioactivos a la  $\beta$ -Ig. Mediante el estudio del *quenching* o apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína, analizaron la unión simultánea de la misma a  $\alpha$ -tocoferol, resveratrol y AF a pH neutro, determinando que es posible la unión de dos o tres ligandos al mismo tiempo, aunque la secuencia en la que los mismos son incorporados afectan la afinidad de la unión. Asimismo, verificaron que la formación de estos complejos multi-ligando retrasaron la degradación oxidativa del  $\alpha$ -tocoferol y la fotodescomposición del AF.

Otros autores han reportado sobre las interacciones de la  $\beta$ -Ig con polifenoles del té (Kanakis et al. 2011; von Staszewski et al. 2012), fosfolípidos (Lefèvre y Subirade 2000), curcumina y diacetil curcumina (Mohammadi et al. 2009; Sneharani et al. 2010), retinol (Cho et al. 1994), vitamina D y colesterol (Wang et al. 1997), entre otros, de una larga lista de ligandos.

Por lo tanto, de acuerdo con lo que se ha discutido anteriormente, la  $\beta$ -LG podría emplearse como vehículo de AF porque su estructura secundaria le permite unirse a diferentes ligandos con variadas características.

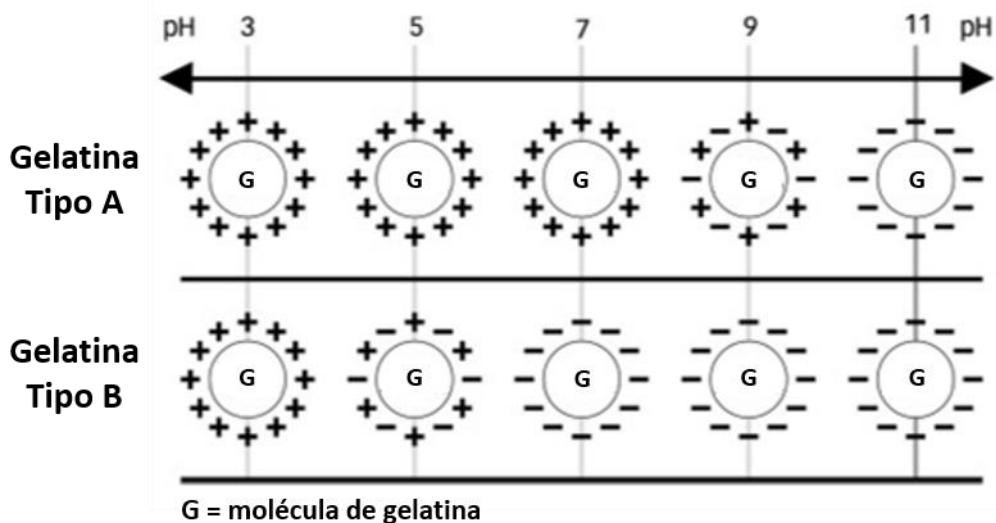
#### 4. Gelatina

La gelatina es una proteína que se obtiene mediante la hidrólisis parcial en condiciones ácidas o alcalinas del colágeno animal. Tiene una larga historia de uso seguro en productos farmacéuticos, cosméticos, y en alimentos, ya que es considerada como un material GRAS por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA) (Elzoghby et al. 2012). Es una proteína que ofrece numerosas ventajas, entre ellas, ser económica y fácilmente disponible. También resulta muy atractiva por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Asimismo, la gelatina tiene una antigenicidad relativamente baja debido a que está desnaturalizada, en contraste con el colágeno, que se sabe presenta antigenicidad (Kommareddy et al. 2007).

La gelatina es un polianfolito que tiene tanto grupos catiónicos, como aniónicos e hidrofóbicos presentes en una proporción aproximada 1:1:1, lo que hace que este polipéptido sea especial. La macromolécula de gelatina tiene aproximadamente 13% de carga positiva (lisina y arginina), 12% de carga negativa (ácido glutámico y aspártico) y 11% de la cadena de naturaleza hidrofóbica (que comprende a los aminoácidos leucina, isoleucina, metionina y valina). La glicina, la prolina y la hidroxiprolina forman el resto de la cadena. La representación (Gly-X-Pro)<sub>n</sub> es responsable de la estructura helicoidal triple de la gelatina, donde X representa el aminoácido, principalmente lisina, arginina, metionina y valina (~6%). Un tercio de la cadena está compuesto por glicina y otro tercio es prolina o hidroxiprolina. El resto son otros residuos. Comercialmente, la gelatina está disponible como catiónica (gelatina tipo A, pl 7–9, preparada por hidrólisis ácida de colágeno de piel de cerdo tipo I) o aniónica (gelatina tipo B, pl 4,8–5, preparada por hidrólisis alcalina del colágeno bovino) (Mohanty et al. 2005; Elzoghby 2013).

Si el pH del medio donde se encuentra la gelatina corresponde al pl, esta tiene carga neutra (Figura 5). Si el pH es más alto tiene carga negativa, y si es más bajo la gelatina tiene carga positiva. En soluciones de gelatina de pH en el rango de 5 a 9, la gelatina preparada por hidrólisis alcalina está, por tanto, cargada negativamente y la gelatina preparada por hidrólisis ácida, positivamente. Por debajo de pH 5,0, todos los tipos de gelatina están cargados positivamente y por encima de pH 9,0 todos son negativos (Schrieber y Gareis 2007).

En su pl, una molécula de gelatina, debido a su carga neutra, tiene una estructura al azar o *random coil*. Sin embargo, si el pH de la matriz se aleja del pl, la carga de la molécula, también cambiará, influyendo en su conformación. Este cambio estructural puede influir positivamente en las propiedades superficiales de la gelatina y en su capacidad de interaccionar con otros compuestos.



**Figura 5.** Patrón de distribución de carga de gelatinas tipo A y B en soluciones acuosas de diferente pH (Schrieber y Gareis 2007).

Debido a su versatilidad, bajo costo y sus numerosos grupos activos disponibles para unir moléculas blanco, la gelatina ha sido utilizada durante décadas por la industria farmacéutica en la síntesis de nanopartículas para la administración de drogas y genes. Se ha informado acerca de nanopartículas de gelatina para la administración exitosa de varios fármacos, incluidos anticancerígenos (Leo et al. 1997; Yeh et al. 2005), anti-VIH (Jain et al. 2008), antimicrobianos (Nahar et al. 2008; Lee et al. 2012), analgésicos (Taheri Qazvini y Zinatloo 2011), antiinflamatorios (Kumar et al. 2011), entre otros. No obstante, en estos últimos años, se ha incrementado el número de estudios que involucran a la gelatina como vehículo de compuestos bioactivos para su aplicación en alimentos.

Gómez-Mascaraque y colaboradores (2015) exploraron el potencial de la técnica de electropulverización para obtener cápsulas de gelatina de grado alimenticio en el rango submicrónico para la protección de bioactivos sensibles. En este trabajo se estudió la influencia de la concentración de proteína sobre el tamaño y morfología de las partículas obtenidas. Las matrices electropulverizadas se utilizaron para encapsular una molécula antioxidante modelo, el galato de epigalocatequina (EGCG). Se lograron eficiencias de encapsulación muy altas,

cercanas al 100%, y la actividad antioxidante del bioactivo se retuvo por completo tras la encapsulación. Además, mientras que el EGCG libre en PBS perdió un 30% de su actividad antioxidante y se degradó por completo en 100 h, el bioactivo encapsulado retuvo toda su actividad antioxidante dentro de este período de tiempo. Karimi y colaboradores (2020), por su parte utilizaron esta misma técnica para la encapsulación exitosa de ácido ursólico, un triterpeno pentacíclico con numerosas propiedades promotoras de la salud, pero muy poco soluble en agua y con baja biodisponibilidad.

El método de coacervación compleja entre goma de castaña de cajú y gelatina fue estudiado para encapsular aceite de café verde (GCO), rico en propiedades bioactivas, para su uso como ingrediente en jugos de frutas. Las partículas con 25% de GCO presentaron buena eficiencia de encapsulación, redujeron seis veces la oxidación del bioactivo y fueron resistentes a las condiciones de pasteurización (Oliveira et al. 2020).

Como se ha visto, mucho se ha investigado hasta el momento sobre el uso de proteínas como vehículos de bioactivos. Sin embargo, aún queda por explorar el empleo de  $\beta$ -lactoglobulina y Gelatina para unir AF, en concentraciones de aplicación tecnológica, con la finalidad de protegerlo durante el procesamiento de alimentos, preservar su actividad biológica y transportarlo hasta su liberación en el sitio de absorción del sistema digestivo.

## 5. Referencias

- Akhtar MJ, Khan MA, Ahmad I. 1999. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19:269-275.
- Anderson WA, Slaughter D, Laffey C, Lardner C. 2010. Reduction of folic acid during baking and implications for mandatory fortification of bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:1104-1110.
- ANMAT. 2002. Ley 25.630. Argentina.
- Arcot J, Shrestha AK, Gusanov U. 2002. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control* 13:245-252.
- Ashwell M. 2004. Conceptos sobre los Alimentos Funcionales. ILSI Europe Concise Monographs Series. International Life Science Institute, Pp. 24-29.
- Augustin MA, Hemar Y. 2009. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem. Soc. Rev.* 38:902-912.
- Barnett LB, Bull HB. 1960. Electrophoresis of ribonuclease and of  $\beta$ -lactoglobulin: Isoelectric points of proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 89(2), 167-172.
- Boeneke CA, Aryana KJ. 2008. Effect of folic acid fortification on the characteristics of lemon yogurt. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:1335-1343.
- Bromley EHC, Krebs MRH, Donald AM. 2005. Aggregation across the lengthscales in  $\beta$ -lactoglobulin. *Faraday Discussions*, 128, 13-27.
- Bureau S, Mouhoubi S, Touloumet L, Garcia C, Moreau F, Bédouet V, Renard CMGC. 2015. Are folates, carotenoids and vitamin C affected by cooking? Four domestic procedures are compared on a large diversity of frozen vegetables. *LWT - Food Sci. Technol.* 64:735-741.
- Chandra-Hioe MV, Bucknall MP, Arcot J. 2011. Folate analysis in foods by UPLC-MS/MS: development and validation of a novel, high throughput quantitative assay; folate levels determined in Australian fortified breads. *Anal. Bioanal. Chem.* 401:1035-1042.
- Chen L. 2009. 22 - Protein micro/nanoparticles for controlled nutraceutical delivery in functional foods. En: McClements DJ, Decker EA, editores. *Designing Functional Foods*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. p 572-600. Available from:

- http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B97818456943265002  
28
- Chen L, Remondetto GE, Subirade M. 2006. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 17:272-283.
- Chen T-S, Cooper RG. 1979. Thermal Destruction of Folacin: Effect of Ascorbic Acid, Oxygen and Temperature. *J. Food Sci.* 44:713-716.
- Chippel D, Scrimgeour KG. 1970. Oxidative degradation of dihydrofolate and tetrahydrofolate. *Can. J. Biochem.* 48:999-1009.
- Cho Y, Batt CA, Sawyer L. 1994. Probing the retinol-binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* 269:11102-11107.
- Damodaran S. 1996. Functional properties. En: Nakai S, Modler HW, editores. *Food proteins. Properties and characterization.* New York: VCH. p 167-234.
- Dang J, Arcot J, Shrestha A. 2000. Folate retention in selected processed legumes. *Food Chem.* 68:295-298.
- Delchier N, Ringling C, Le Grandois J, Aoudé-Werner D, Galland R, Georgé S, Rychlik M, Renard CMGC. 2013. Effects of industrial processing on folate content in green vegetables. *Food Chem.* 139:815-824.
- DeSouza SC, Eitenmiller RR. 1986. Effects of Processing and Storage on the Folate Content of Spinach and Broccoli. *J. Food Sci.* 51:626-628.
- Elzoghby AO. 2013. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *J. Controlled Release* 172:1075-1091.
- Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J. Controlled Release* 161:38-49.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. 2012. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3.
- Food Fortification Initiative. 2020. Country Profiles. Food Fortif. Initiat. [Internet]. Available from: <https://www.ffinetwork.org/country-profiles>
- Furness DLF, Yasin N, Dekker GA, Thompson SD, Roberts CT. 2012. Maternal red blood cell folate concentration at 10–12 weeks gestation and pregnancy outcome. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 25:1423-1427.

- Ghalandari B, Divsalar A, Eslami-Moghadam M, Saboury AA, Haertlé T, Amanlou M, Parivar K. 2015. Probing of the Interaction Between  $\beta$ -Lactoglobulin and the Anticancer Drug Oxaliplatin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175:974-987.
- Gómez-Mascaraque LG, Lagarón JM, López-Rubio A. 2015. Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods. *Food Hydrocoll.* 49:42-52.
- Gujska E, Majewska K. 2005. Effect of Baking Process on Added Folic Acid and Endogenous Folates Stability in Wheat and Rye Breads. *Plant Foods Hum. Nutr.* 60:37-42.
- Harnsilawat T, Pongsawatmanit R, McClements DJ. 2006. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids.* 20:577-585.
- Haug IJ, Skar HM, Vegarud GE, Langsrud T, Draget KI. 2009. Electrostatic effects on  $\beta$ -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids,* 23(8):2287-2293.
- Hawkes J, Villota R. 1989. Folates in foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28:439-538.
- Hefni M, Witthöft CM. 2014. Folate content in processed legume foods commonly consumed in Egypt. *LWT - Food Sci. Technol.* 57:337-343.
- Jain SK, Gupta Y, Jain A, Saxena AR, Khare P, Jain A. 2008. Mannosylated gelatin nanoparticles bearing an anti-HIV drug didanosine for site-specific delivery. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 4:41-48.
- Johansson M, Furuhagen C, Frølich W, Jägerstad M. 2008. Folate content in frozen vegetarian ready meals and folate retention after different reheating methods. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:528-536.
- Kanakis CD, Hasni I, Bourassa P, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi H-A. 2011. Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chem.* 127:1046-1055.
- Karimi A, Askari G, Yarmand MS, Salami M, EmamDjomeh Z. 2020. Development, modification and characterization of ursolic acid-loaded gelatin nanoparticles through electrospraying technique. *Food Bioprod. Process.* 124:329-341.

- Kinsella JE. 1982. Relationships between structure and functional properties of food proteins. *Food Proteins* [Internet]. Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302591611>
- Kinsella JE, Melachouris N. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7:219-280.
- Kommareddy S, Shenoy DB, Amiji MM. 2007. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. En: *Nanotechnologies for the Life Sciences*. American Cancer Society. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527610419.ntls0011>
- Kumar R, Nagarwal RC, Dhanawat M, Pandit JK. 2011. In-Vitro and In-Vivo Study of Indomethacin Loaded Gelatin Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7:325-333.
- Kwee S. 1983. Electrochemistry of the C(9)-N(10) bond in folic acid and related compounds. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 156:467-475.
- Lee EJ, Khan SA, Park JK, Lim K-H. 2012. Studies on the characteristics of drug-loaded gelatin nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35:297-307.
- Lefèvre T, Subirade M. 2000. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 28:59-67.
- Leo E, Angela Vandelli M, Camerini R, Forni F. 1997. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process. *Int. J. Pharm.* 155:75-82.
- Lesmes U, McClements DJ. 2009. Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* 20:448-457.
- Liang L, Tajmir-Riahi HA, Subirade M. 2008. Interaction of  $\beta$ -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules* 9:50-56.
- Liang XS, Zhao FQ, Hao LX. 2013. Research on stability of synthetic folic acid. *Adv. Mater. Res.* 781-784:1215-1218.
- Madziva H, Kailasapathy K, Phillips M. 2006. Evaluation of alginate–pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT - Food Sci. Technol.* 39:146-151.

- Martinez MJ, Pilosof AMR. 2018. On the relationship between pH-dependent  $\beta$ -lactoglobulin self assembly and gelation dynamics. *Int. Food Res. J.* 25:676-683.
- Mohammadi F, Bordbar A-K, Divsalar A, Mohammadi K, Saboury AA. 2009. Interaction of curcumin and diacetylcurcumin with the lipocalin member  $\beta$ -lactoglobulin. *Protein J.* 28:117-123.
- Mohanty B, Aswal VK, Kohlbrecher J, Bohidar HB. 2005. Synthesis of gelatin nanoparticles via simple coacervation. *J. Surf. Sci. Technol.* 21:149-160.
- Mollea C, Marmo L, Bosco F. 2013. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. *Food Ind.* [Internet]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/food-industry/valorisation-of-cheese-whey-a-by-product-from-the-dairy-industry>
- Nahar M, Mishra D, Dubey V, Jain NK. 2008. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 4:252-261.
- O'Briain JD, Temperley IJ, Brown JP, Scott JM. 1975. Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 28:438-444.
- Öhrvik V, Öhrvik H, Tallkvist J, Witthöft C. 2010. Folates in bread: retention during bread-making and in vitro bioaccessibility. *Eur. J. Nutr.* 49:365-372.
- Oliveira WQ de, Wurlitzer NJ, Araújo AW de O, Comunian TA, Bastos M do SR, Oliveira AL de, Magalhães HCR, Ribeiro HL, Figueiredo RW de, et al. 2020. Complex coacervates of cashew gum and gelatin as carriers of green coffee oil: The effect of microcapsule application on the rheological and sensorial quality of a fruit juice. *Food Res. Int.* 131:109047.
- Omar RM, Ismail HM, El-Lateef BMA, Yousef MI, Gomaa NF, Sheta M. 2009. Effect of processing on folic acid fortified Baladi bread and its possible effect on the prevention of colon cancer. *Food Chem. Toxicol.* 47:1626-1635.
- Scholl TO, Johnson WG. 2000. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1295S-303S.
- Schrieber R, Gareis H. 2007. From Collagen to Gelatine. En: *Gelatine Handbook*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 45-117. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527610969.ch2/summary>

- Selhub J, Rosenberg IH. 1996. Folic acid. En: Ziegler E, Filer LJ, editores. Present knowledge in nutrition. Washington, D.C.: ILSI Press, International Life Sciences Institute. p 206-219.
- Shafaei Z, Ghalandari B, Vaseghi A, Divsalar A, Haertlé T, Saboury AA, Sawyer L. 2017.  $\beta$ -Lactoglobulin: An efficient nanocarrier for advanced delivery systems. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 13:1685-1692.
- Sneharani AH, Karakkat JV, Singh SA, Rao AGA. 2010. Interaction of Curcumin with  $\beta$ -Lactoglobulin—Stability, Spectroscopic Analysis, and Molecular Modeling of the Complex. *J. Agric. Food Chem.* 58:11130-11139.
- von Staszewski M, Jara FL, Ruiz ALTG, Jagus RJ, Carvalho JE, Pilosof AMR. 2012. Nanocomplex formation between  $\beta$ -lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. *J. Funct. Foods* 4:800-809.
- Strobbe S, Van Der Straeten D. 2017. Folate biofortification in food crops. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44:202-211.
- Swain BC, Subadini S, Rout J, Sakshi, Mishra PP, Sahoo H, Tripathy U. 2020. Biophysical study on complex formation between  $\beta$ -Lactoglobulin and vitamin B12. *Food Chem.* 312:126064.
- Taheri Qazvini N, Zinatloo S. 2011. Synthesis and characterization of gelatin nanoparticles using CDI/NHS as a non-toxic cross-linking system. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22:63-69.
- Tamura T, Mizuno Y, Johnston KE, Jacob RA. 1997. Food Folate Assay with Protease,  $\alpha$ -Amylase, and Folate Conjugase Treatments. *J. Agric. Food Chem.* 45:135-139.
- Townend R, Herskovits TT, Swaisgood HE, Timasheff SN. 1964. The solution properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(12):4196-4201.
- Varela-Moreiras G, Alonso Aperte E, Póo Prieto R. 2000. La determinación «in vitro/in vivo» de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza. *Madr. Cent. Inf. Cerveza Salud.*
- Velikov KP, Pelan E. 2008. Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter* 4:1964-1980.
- Wang Q, Allen JC, Swaisgood HE. 1997. Binding of Vitamin D and Cholesterol to  $\beta$ -Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 80:1054-1059.

- WHO, FAO. 2004. WHO | Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Available from: <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241546123/en/>
- Williams PG. 1996. Vitamin Retention in Cook/Chill and Cook/Hot-Hold Hospital Foodservices. *J. Am. Diet. Assoc.* 96:490-498.
- Witthöft C, Hefni M. 2016. Folic acid and Folates: Physiology and Health Effects. En: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, editores. *Encyclopedia of Food and Health.* Oxford: Academic Press. p 724-730. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472003007>
- Wusigale, Liang L. 2020. Folates: Stability and interaction with biological molecules. *J. Agric. Food Res.* 2:100039.
- Yeh TK, Lu Z, Wientjes MG, Au JL-S. 2005. Formulating Paclitaxel in Nanoparticles Alters Its Disposition. *Pharm. Res.* 22:867-874.
- Zempleni J, Suttie JW, Gregory III JF, Stover PJ. 2013. Folate. En: *Handbook of Vitamins.* CRC Press. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b15413/handbook-vitamins-janos-zempleni-john-suttie-jesse-gregory-iii-patrick-stover>
- Zhang J, Liu X, Subirade M, Zhou P, Liang L. 2014. A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. *Food Chem.* 165:256-261.

## **OBJETIVOS**

## Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue desarrollar *carriers* proteicos, de  $\beta$ -lactoglobulina y gelatina, para el transporte de ácido fólico en alimentos, que aseguren su bioaccesibilidad. Ciertos alimentos se enriquecen con AF actualmente pero su estabilidad y biodisponibilidad se puede ver afectada por numerosos factores como el pH, el calor y la luz UV así como por las condiciones del tracto gastrointestinal.

## Objetivos específicos

- Caracterizar la interacción de las proteínas en estudio con el AF en distintas condiciones de pH y concentraciones.
- Evaluar el impacto de esta interacción sobre la bioaccesibilidad y actividad biológica del AF mediante ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro* y de biodisponibilidad mediante un modelo microbiano.
- Estudiar la capacidad de los *carriers* proteicos para proteger al AF de la fotodegradación.
- Analizar el efecto del AF en las propiedades reológicas y funcionales de la gelatina.

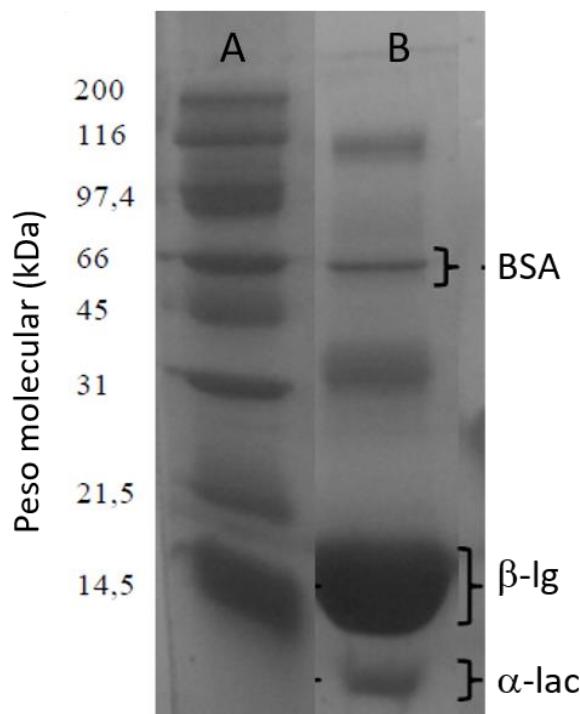
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Materiales

### 1.1 Proteínas

Las proteínas utilizadas fueron:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Ig) y Gelatina de tipo A (ácida) (G). Se utilizó una muestra de  $\beta$ -Ig BioPURE provista por Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos). Su composición fue: 97,8% de proteína (base seca) siendo  $\beta$ -lactoglobulina el 93,6% del total de proteínas, 0,3% de grasa, 1,8% de ceniza y 5,0% de humedad.

En la Figura 6 se muestra el perfil electroforético en condiciones disociantes (con SDS) de la  $\beta$ -Ig BioPURE (Martínez 2010). Ésta presenta una banda mayoritaria correspondiente a la forma monomérica de la  $\beta$ -Ig (PM 18,4 kDa). También se observan bandas débiles de  $\alpha$ -lactoalbúmina y BSA residual, y otra banda mayor, correspondiente a la forma dimérica de  $\beta$ -Ig (36,8 kDa).



**Figura 6.** Perfil electroforético de: (A) estándar de peso molecular de BioRad con sus valores correspondientes en kDa, (B)  $\beta$ -Ig BioPURE (Martínez 2010).

La muestra de Gelatina tipo A, proveniente de pieles porcinas mediante extracción en condiciones ácidas, fue gentilmente donada por Rousselot Argentina S.A. (Hurlingham, Argentina). El punto isoeléctrico de esta gelatina ácida es 7,5 y el pH de una solución 1% p/p en agua bidestilada fue de 5,5.

### **1.2. Ácido fólico**

El AF, elaborado por DSM Nutritional Products Argentina S.A., fue amablemente provisto por Laboratorios Bagó S.A. (La Plata, Argentina). La pureza del polvo (en base seca) fue de 99,5%.

### **1.3 Preparación de soluciones.**

Los polvos de  $\beta$ -Ig y AF se disolvieron en forma individual en agua bidestilada, mediante agitación, a temperatura ambiente. Las soluciones de proteína (0,1 – 10% p/p) se mantuvieron 24 h a 4 °C para alcanzar una mejor hidratación. Por otra parte, las soluciones de AF (0,025 – 2,5% p/p) se prepararon diariamente en la concentración adecuada para cada experimento y se cubrieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. El polvo de G se dispersó en agua bidestilada y se calentó con agitación hasta 70 °C, manteniendo esta temperatura por 10 min, para asegurar la disolución completa (0,5 – 5% p/p). Luego se enfrió hasta 35 °C y se mantuvo a esta temperatura hasta su medición. El pH fue ajustado a 7 con NaOH 1N o a 3 con HCl 1N.

Los sistemas proteína + AF se obtuvieron mezclando las soluciones a pH 7 bajo agitación para alcanzar la concentración final requerida de proteína y vitamina en la mezcla. Posteriormente el pH fue llevado a valores de pH más bajos con HCl 1N.

## 2. Métodos

### 2.1. Evaluación del grado de unión de AF

El porcentaje de AF unido a la  $\beta$ -Ig y G se determinó por diferencia entre la cantidad de AF agregada y la no asociada (AF libre), luego de una ultrafiltración, de acuerdo con Arzeni y col (2015a; b). Primero, se centrifugaron 5 ml de las mezclas o del blanco (AF 0,025%, pH 7) en tubos de plástico de 15 ml (12.857 x g, 15 min, 20 °C). A continuación, se trasvasaron 3 ml del sobrenadante a un tubo de ultrafiltración con filtros de corte molecular de 10K (Amicon® Ultra-15, Millipore, Ireland) previamente tarado, se pesó y se centrifugó (5.000 x g, 15 min, 20 °C). Luego se pesó el tubo donde se recuperó el filtrado. Este se diluyó al 50% en DMSO:H<sub>2</sub>O (50:50) y se realizó la lectura espectrofotométrica de su absorbancia a 365 nm (Zhang et al. 2011). Se realizó una curva de calibración de AF. La cantidad de AF unido (%AFU) se calculó, considerando la densidad de las soluciones igual a la del agua, de la siguiente manera:

$$\%AFU = \left[ 1 - \frac{(M_1 C_1 + F_{ad})}{M_0 C_0} \right] \times 100 \quad (1)$$

donde,  $F_{ad} = M_{0,F} C_{0,F} - M_{1,F} C_{1,F}$  es la cantidad de AF adsorbido en la membrana del filtro;  $M_{(X)}$  es la masa y  $C_{(X)}$  es la concentración de (X): (0) la solución inicial; (1) el filtrado; (0,F) la solución del blanco inicial; (1,F) el filtrado del blanco. Se informan los valores de dos duplicados por muestra.

## 2.2. Distribución de tamaño y potencial zeta de las partículas

### 2.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

#### Tamaño de partícula

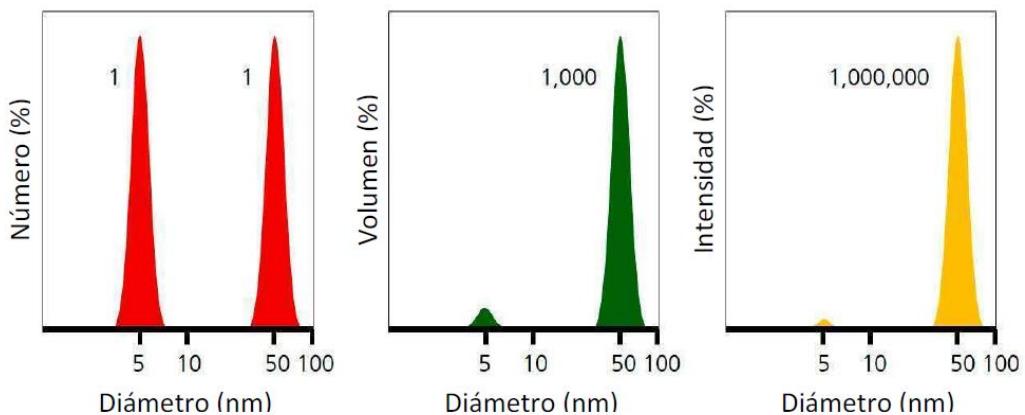
El tamaño de partícula de los sistemas  $\beta$ -Ig + AF, G + AF y de los compuestos puros se midió mediante DLS con un analizador Zetasizer Nano-Zs, de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). El equipo cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un dispositivo de correlación digital Modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173°, dentro de un rango de 0,6 nm a 6  $\mu$ m, según especificaciones del equipo. Las muestras fueron diluidas en agua bidestilada, de ser necesario, y colocadas dentro de cubetas de poliestireno descartables.

El fundamento de la medición se basa en el movimiento Browniano constante de las partículas, que se debe a la colisión al azar de las moléculas del líquido que rodea a la partícula. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente y las grandes lo hacen más lentamente. En DLS, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las mismas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones correlaciona el coeficiente de difusión de la partícula y a partir de este se calcula el tamaño de la partícula. La relación entre el tamaño y el coeficiente de difusión se define por la ecuación de Stokes-Einstein (2):

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

donde,  $d(H)$  es el diámetro hidrodinámico (m);  $D$  es el coeficiente de difusión translacional ( $m^2 s^{-1}$ );  $k$  es la constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} N m K^{-1}$ );  $T$  es la temperatura absoluta (K) y;  $\eta$  es la viscosidad del solvente ( $N s m^{-2}$ ).

Se utilizaron dos aproximaciones para obtener la información de tamaño. Primero, se empleó el algoritmo de CONTIN para analizar los datos de distribución porcentual de tamaños de partícula/agregados (Stepanek 1993). La distribución de tamaño obtenida es un gráfico de la intensidad relativa de luz dispersada por las partículas de varias clases de tamaño y es, por lo tanto, conocida como una distribución de tamaño en intensidad. Si la distribución presenta una “cola” sustancial o más de un pico, entonces puede aplicarse la teoría de Mie para convertir la distribución en intensidad en una distribución en volumen o en número. Estas darán una visión más realista de la importancia de la cola o la segunda población presente. En términos generales se verifica que  $d(\text{intensidad}) > d(\text{volumen}) > d(\text{número})$ , ya que la intensidad de dispersión es proporcional a  $d^6$ , de acuerdo con la aproximación de Rayleigh, mientras que el volumen de una esfera es proporcional a  $d^3$  y el número está ponderado por el  $d^1$  (Figura 7).



**Figura 7:** Distribución en número, volumen e intensidad de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad.

Fuente: Malvern Instruments Ltd. (2012).

Luego, se utilizó el método de cumulantes para calcular el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o *Z-average*). Los resultados que se obtienen mediante este análisis son aplicables para citar un único valor promedio con el propósito de realizar una comparación, pero son inadecuados para dar una

completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos.

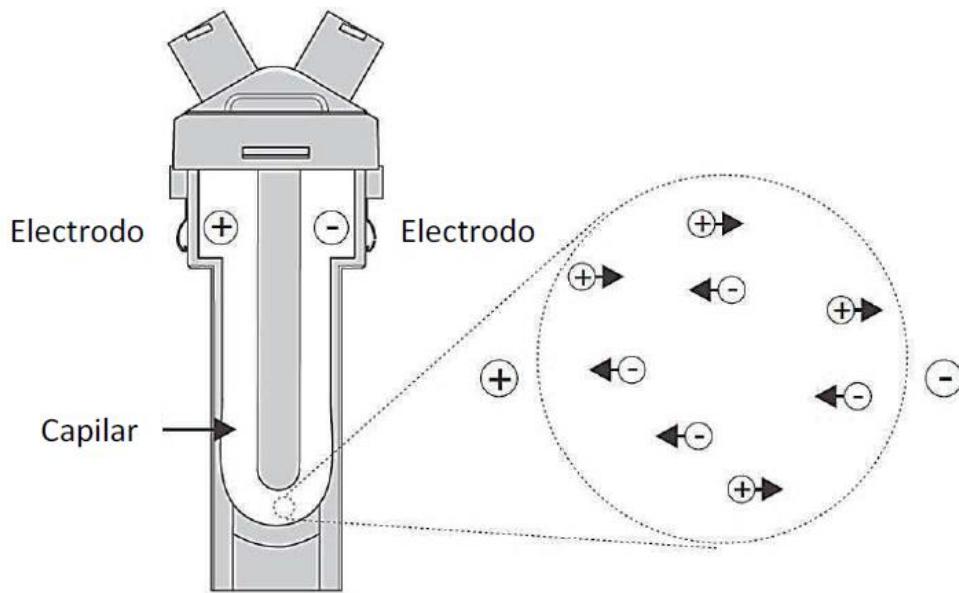
Se informa el promedio de dos repeticiones por muestra.

### **Estudio de agregación por calentamiento mediante DLS**

Las muestras correspondientes a  $\beta$ -Ig 5% + AF 0,025% p/p en comparación con  $\beta$ -Ig 5% p/p y G 0,5% - AF 0,0025% p/p en comparación con gelatina 0,5% p/p fueron calentadas en el equipo de DLS (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) desde 25 °C o 35°C, según si la muestra contenía  $\beta$ -Ig o G, respectivamente, hasta 75 °C, aumentando de a 10 °C y manteniendo cada etapa por 5 min, con el objetivo de evaluar la variación del tamaño de partícula con el incremento de la temperatura. Para este ensayo se seleccionaron los sistemas con la menor relación en peso de AF/proteína (0,005) de modo de obtener tamaños de partícula en el rango de medición del Zetasizer Nano-ZS.

### **Potencial zeta**

Con el mismo analizador se realizaron mediciones de potencial zeta ( $\zeta$ ) a un ángulo fijo de 17°. Las soluciones de  $\beta$ -Ig 5% y G 0,5% p/p, a las cuales se adicionaron cantidades crecientes de AF (concentraciones entre 0,025 y 0,125% p/p) fueron diluidas con agua bidestilada de modo de no superar los límites de conductividad (factor de dilución 1/5) y se colocaron en celdas capilares provistas de electrodos a cada lado (Figura 8). Se informa el promedio de dos repeticiones por muestra.



**Figura 8:** Celda capilar con electrodos a cada lado.

Fuente: Malvern Instruments Ltd. (2013).

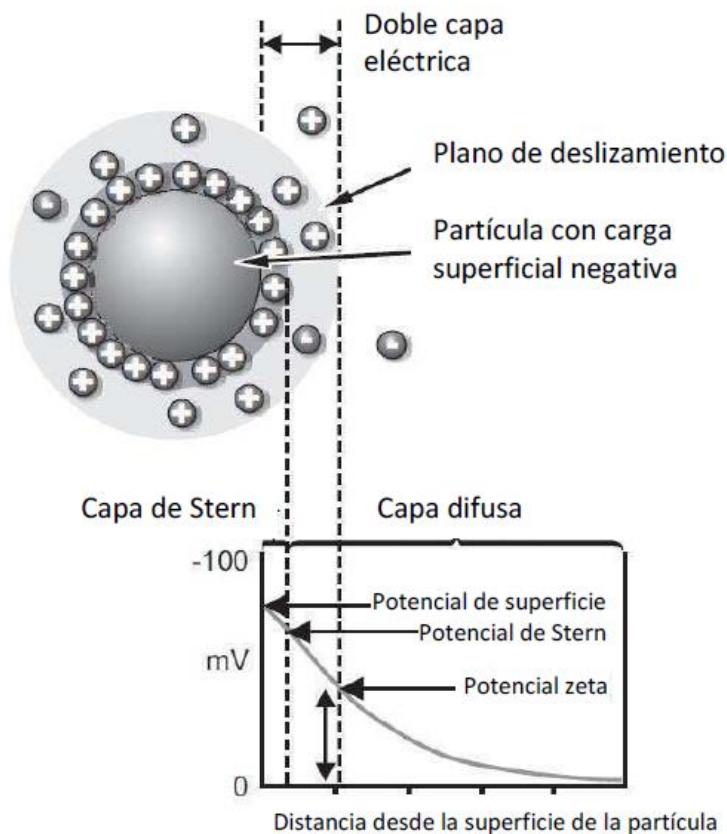
El fundamento físico de la técnica es el fenómeno de electroforesis. La dispersión se coloca en la celda y se aplica un campo eléctrico en los electrodos a 25 °C. Las partículas cargadas migrarán hacia el electrodo con carga opuesta. Las fuerzas viscosas que actúan sobre las partículas tienden a oponerse a este movimiento. Cuando se alcanza el equilibrio entre estas fuerzas opuestas, las partículas se mueven a una velocidad constante. La velocidad a la que migran las partículas se conoce como movilidad electroforética y está relacionada con su potencial zeta, mediante la ecuación de Henry (3):

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(ka)}{3\mu} \quad (3)$$

donde  $\zeta$  es el potencial zeta,  $U_E$  es la movilidad electroforética,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica,  $\mu$  es la viscosidad y  $f(ka)$  es la función de Henry. En medio acuoso y con baja concentración de electrolitos se usa una aproximación de  $f(ka)$  igual a 1,0 (aproximación de Huckel).

El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula (Figura 9).

La capa de líquido que rodea a la partícula tiene dos partes: una región interna, conocida como capa de Stern donde los iones están fuertemente ligados, y una región externa, conocida como capa difusa, donde los iones están ligados más débilmente. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula forman una entidad estable (capa de Stern).



**Figura 9:** Esquema de una partícula cargada y de la doble capa que la rodea.  
Fuente: Malvern Instruments Ltd. (2013).

Cuando una partícula se mueve (debido a la gravedad, por ejemplo), lo hace con los iones que conforman la capa de Stern y la difusa, pero los iones que se encuentran por fuera del límite no se mueven con la partícula. Este límite se conoce como plano de deslizamiento. El potencial que existe en este límite se conoce como potencial zeta (Figura 9).

La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad coloidal del sistema en estudio.

### 2.2.2. Dispersión estática de luz (SLS)

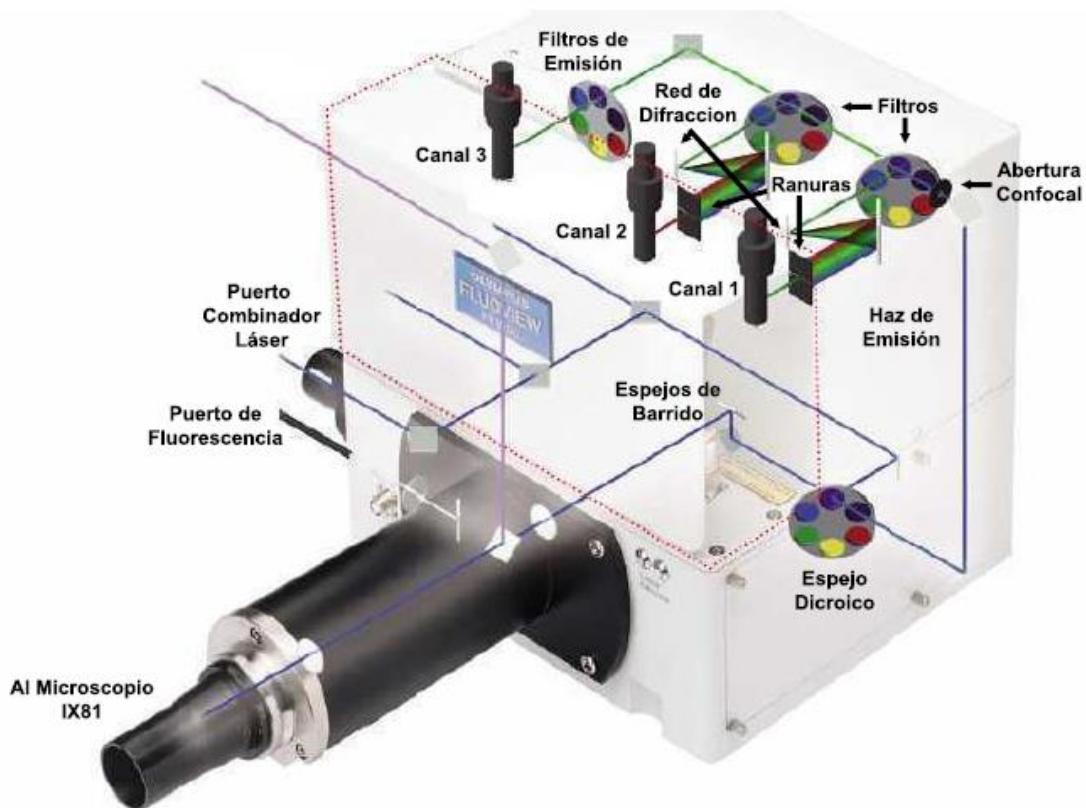
Los diámetros promedio y las curvas de distribución de tamaño de partícula se determinaron también por SLS en un equipo Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU provisto con un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). El rango de medición del equipo se encuentra entre los 0,1  $\mu\text{m}$  a 1.000  $\mu\text{m}$ . La velocidad de la hélice se mantuvo en 1.800 rpm. El tamaño de partícula se informa como diámetro promedio  $[D_{3,2}]$ .  $[D_{3,2}]$  es el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ( $[D_{3,2}] = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$ ) donde  $n_i$  es el número de partículas de diámetro  $d_i$  (Huang et al. 2001; Leroux et al. 2003).

### 2.3. Microscopía confocal

Se tomaron imágenes de los sistemas con y sin AF con un microscopio láser confocal (Modelo FV300, Olympus, UK), provisto de un láser He-Ne (543 nm). Se usó un objetivo PLAN APO 60X y un zoom digital de 2,5X. Se marcó la proteína de manera no covalente con unas gotas de solución de rodamina B al 0,02% p/p ( $\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} \text{ max} = 625 \text{ nm}$ ).

Con el objetivo de obtener imágenes simultáneas de los sistemas mixtos  $\beta$ -Ig y AF, se empleó un microscopio láser confocal espectral (Modelo FV1000, Olympus, Tokio, Japon). El microscopio tiene tres láseres que proveen en total cinco longitudes de onda: láser multilínea de Argón (457 nm, 488 nm, 515 nm), láser de

Helio-Neón (543 nm) y un láser diodo de estado sólido (635 nm). Una unidad combinadora de láseres permite iluminar a la muestra simultáneamente con tres longitudes de onda. En este caso, se empleó el láser de Argón de 457 nm, para el AF, y el láser de Helio-Neón (543 nm), para observar la proteína marcada mediante rodamina. Consta de tres canales de detección, dos de ellos espectrales. El sistema de detección, que se encuentra dentro de la unidad confocal, tiene dos sistemas de red de difracción (para los dos primeros canales) con una resolución de 2 nm que trabajan en todo el espectro visible, desde 400 nm a 700 nm. Un par de espejos galvanómetros permiten generar imágenes por barrido, con una velocidad máxima de 16 cuadros por s, para una imagen de 256 x 256 pixeles. En este caso, la detección se realizó simultáneamente mediante 2 canales, en el rango de 475-530 nm para el AF y en el rango 555-655 nm para la proteína. Las soluciones de AF puro también se observaron mediante excitación a 457 nm y detección en el rango de 475-530 nm. El microscopio cuenta con diversos objetivos, el empleado en los experimentos realizados en este trabajo es el objetivo 60x (UPlanSAPO, Olympus), apocromático de inmersión en aceite, apertura numérica 1,35 y zoom digital de 2,5x. En la Figura 10 se presenta un esquema de la unidad confocal con los elementos mencionados.



**Figura 10.** Esquema de la unidad confocal espectral del microscopio FV1000. Fuente: Sigaut (2011).

Las imágenes de ambos equipos se obtuvieron mediante el software FluoView™ en formato TIFF en 1024 x 1024 pixeles de resolución.

#### 2.4. Tratamiento con ultrasonido de alta intensidad

Se sonicaron 5 ml de soluciones de  $\beta$ -Ig (5% p/p) con concentraciones crecientes de AF (0,025-1,25% p/p) durante 20 min, usando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (potencia neta máx.: 750W) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20% (amplitud máx. 40%, 160  $\mu$ m). Se empleó una sonda de aleación de titanio de 13 mm de diámetro, acoplada a un microtip de 3 mm de diámetro. La muestra fue sonicada a temperatura controlada, colocándola en un tubo de vidrio de 15 ml sumergido en un baño de glicerina. El baño se mantuvo a

temperatura constante mediante una camisa con circulación de agua a 0,5 °C (Polystat, Cole-Parmer).

## 2.5. Digestión gastroduodenal *in vitro*

### 2.5.1. Fluidos que simulan las condiciones de digestión gástrica y duodenal

Las condiciones de digestión gástrica fueron simuladas a partir de la utilización de un fluido (fluido gástrico simulado (FGS)) que representa las condiciones de pH y fuerza iónica características del estómago humano (Kalantzi et al. 2006; Bellesi 2016). El mismo consistió en una mezcla de sales formadas por: NaCl (100 mM), CaCl<sub>2</sub> (3mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 mM) y KCl (22 mM), ajustada a pH 2,5 con cantidad suficiente de HCl (1M). En el FGS se diluyen los componentes característicos del medio gástrico como fosfatidilcolina (PC, P3556 Sigma Aldrich<sup>®</sup>) y pepsina (mucosa gástrica porcina, P7000 Sigma Aldrich<sup>®</sup>) a concentraciones fisiológicas (Macierzanka et al. 2009).

Por otra parte, las condiciones de digestión duodenal fueron simuladas a partir de la utilización del fluido intestinal simulado (FIS), consistente en una mezcla compleja de iones (39 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM de NaCl y 30 mM de CaCl<sub>2</sub>) ajustada a pH 7, según el protocolo reportado por Sarkar, Horne y Singh (2010a). En este último, se llevó a cabo la dilución de los diferentes componentes fisiológicos que participan en la digestión duodenal, entre ellos: sales biliares (Páncreas bovino, B3883 Sigma Aldrich<sup>®</sup>), tripsina (Páncreas bovino, T8003 Sigma Aldrich<sup>®</sup>) y  $\alpha$ -quimotripsina (Páncreas bovino, C4129 Sigma Aldrich<sup>®</sup>), todos a concentración fisiológica. En ensayos previos se determinó que la utilización de lipasa pancreática interfería en la detección del AF (datos no mostrados), por superposición del pico de la vitamina con otros picos de tiempos de retención similares, provenientes del extracto de lipasa empleado. Dado que las muestras del presente trabajo no contenían lípidos, se optó por excluir la lipasa del protocolo de digestión para lograr una mejor resolución del pico de AF.

### 2.5.2. Proceso de simulación de la digestión gastroduodenal *in vitro*

Los sistemas con la menor relación en peso AF/proteína (0,005), con 2,5% p/p de  $\beta$ -Ig o G y 0,0125% de AF, a pH 3, se sometieron a un proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, consistente en una etapa gástrica (1 hora a pH 2,5) seguida de una etapa duodenal (1 hora a pH 7,0). También se realizaron las digestiones *in vitro* del AF puro y de cada proteína a igual concentración y pH. Este proceso se llevó a cabo a temperatura fisiológica (37 °C), bajo agitación constante en un vaso de vidrio con doble camisa. En primer lugar, se colocaron 15 ml de cada sistema en el recipiente de reacción, donde fueron termostatizados a 37 °C durante 10 min. Luego, se incorporaron 15 ml de FGS en presencia de concentraciones fisiológicas de PC (proteína (1): PC (1,2)) y pepsina (182 U/mg de proteína) (Macierzanka et al. 2009). De ser necesario, la mezcla resultante se ajustó a pH 2,5 utilizando HCl 1M. Finalizada la digestión gástrica (1 h), la mezcla resultante se ajustó a pH 7 con NaOH 1M. El aumento de pH (de 2,5 a 7) pone fin a la etapa gástrica de la digestión, originando la inactivación de la pepsina (Piper y Fenton 1965).

A continuación, la etapa intestinal de la digestión comenzó con la incorporación a la mezcla del FIS en presencia de concentraciones fisiológicas de SB (5 mg/ml), y las proteasas, tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina en una proporción de 34,5 U y 0,44 U de enzima por mg de proteína, respectivamente. La mezcla se mantuvo por 1 hora en condiciones de digestión duodenal, manteniendo el pH en un valor constante (pH 7) a partir de la adición de cantidad necesaria de NaOH (0,5 M) (Sarkar et al. 2009, 2010b; McClements y Li 2010; Jiménez-Saiz et al. 2012). Para detener las reacciones y finalizar con el proceso de digestión *in vitro*, se inactivó la mezcla resultante en un baño de agua a 80 °C durante 5 min. Las soluciones digeridas fueron liofilizadas.

## 2.6. Biodisponibilidad de AF en *Lactobacillus rhamnosus*

*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (NCIMB10463) fue activada en medio MRS (Britania, Argentina) e incubada a 37 °C durante 24 h. Luego, el cultivo fue centrifugado (8.000 x g, 5 min, 21 °C) y las células se lavaron y resuspendieron a su volumen original con solución fisiológica (0,85% m/v). La suspensión celular fue inoculada al 2% (v/v) en un medio libre de vitamina FACM (Folic Acid Casei Medium, Difco, Argentina), y se incubó a 37 °C durante 24 h. A continuación, el cultivo fue lavado nuevamente e inoculado al 2% (v/v) en el medio FACM doblemente concentrado (2X), al que se le agregaron diferentes concentraciones de AF o la muestra de estudio (proteínas puras, y *carriers* proteicos, a pH 3, antes y después de la digestión gastroduodenal *in vitro*), en el mismo volumen que el medio 2X. La cepa con la muestra o el AF fue incubada durante 48 h a 37 °C y se midió la densidad óptica (DO) a 580 nm. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración de crecimiento microbiano (DO a 580 nm) en función de la concentración de AF agregado al medio de cultivo.

## 2.7. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

El AF, las proteínas, los *carriers* y los productos de la digestión gastrointestinal simulada de estos se diluyeron para alcanzar la concentración de 0,5% p/p de proteína y 0,0025% p/p de AF y se filtraron mediante un filtro de jeringa de Nylon de 0,45 µm (Sartorius AG, Alemania). Inmediatamente, se analizaron en un sistema Waters 1525 (Waters, EEUU) utilizando una columna BioSuite™ pC18 500, 7 µm (150 × 4,6 mm, Waters, EEUU), con un flujo de 1 ml/min y un volumen de inyección de 20 µl. La fase móvil empleada fue: Solvente A, 0,37 ml/L de ácido trifluoroacético (TFA) en agua bidestilada; Solvente B, 0,27 ml/L de TFA en acetonitrilo (ACN) grado HPLC. Todos los solventes fueron filtrados a través de membrana de 0,45 µm previo a su uso. Se utilizó un gradiente lineal de solvente B en A, de 0 a 65% en 55 min. Se registró la absorbancia a 220 y 280 nm con un

detector de arreglo de diodos 2998 (Waters, EEUU). Se empleó el Software Breeze Waters.

## **2.8. Tratamientos con luz ultravioleta de onda corta**

El dispositivo utilizado consistió en una cabina provista con 2 lámparas UV-C (TUV-15W G13 T8 55V, Philips, Holanda) colocadas en posición horizontal dentro de una caja de madera herméticamente cerrada, como muestra la Figura 11, con un estante de madera ubicado a 10 cm de distancia de las lámparas y un sistema de ventilación diseñado para evitar el aumento de temperatura de las muestras durante el tiempo de irradiación. Estas lámparas emiten con una longitud de onda de 254 nm, que corresponde a la banda resonante de mercurio. Poseen un recubrimiento de cristal de cuarzo, el cual permite el máximo de la transmisión de la radiación UV (aprox. 90% de la energía irradiada) (Schenk 2010).



**Figura 11.** Cabina de luz UV utilizada para la aplicación de los tratamientos de fotólisis.

Los sistemas ensayados fueron soluciones con 2,5% (p/p) de proteína ( $\beta$ -Ig y G) y 0,0125% (p/p) de AF a pH 3 y 7. Asimismo, se irradiaron soluciones de AF puro a ambos pHs. Las mismas se colocaron en placas de Petri de vidrio (7 ml en c/u) y se mantuvieron en oscuridad hasta el momento del tratamiento. La posición de las placas dentro de la cabina se mantuvo constante para todas las muestras, siendo ésta, en el centro geométrico entre ambas lámparas (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de vista superior de la cabina indicando ubicación de la muestra.

Los tiempos de irradiación se establecieron en 15 y 30 min. Inmediatamente después de finalizado el tratamiento, se ajustó a 7 el pH de las muestras que estaban a pH 3. Luego, todas las muestras se diluyeron a la concentración adecuada y se filtraron por filtro de 0,45  $\mu$ m previo a la medición por HPLC-RP según lo descripto en la sección 2.7.

## 2.9. Reología Dinámica

Las determinaciones reológicas se realizaron en un reómetro oscilatorio dinámico Phaar Physica MCR 300 (Graz, Austria), con esfuerzo de corte controlado (Figura 13). Se utilizó un sistema de platos paralelos (PP30/S) separados por un espacio (“gap”) de 1 mm, entre los cuales se colocó aproximadamente 0,7 ml de muestra, lo que permitió llenar completamente el espacio entre ellos. La temperatura del plato inferior fue controlada mediante un sistema Peltier y un baño termostatizado (Viscotherm VT2, Phaar Physica).



**Figura 13.** Reómetro oscilatorio con sistema de platos paralelos.

Luego de colocada la muestra, se aplicó silicona líquida con el objetivo de prevenir la evaporación de agua de la muestra y evitar su adherencia al sistema de platos. Las condiciones de medición fueron evaluadas en la región viscoelástica lineal y se definieron las siguientes:

- (i) Frecuencia: 1 Hz.
- (ii) Deformación: 0,01%.

Durante las mediciones se registró la evolución del módulo de almacenamiento o elástico ( $G'$ ), el módulo de pérdida o viscoso ( $G''$ ), y la tangente del ángulo de pérdida ( $\tan \delta$ ). La  $\tan \delta$  indica el carácter viscoelástico del material y fue calculada como la relación entre la componente viscosa y la elástica (ecuación 4):

$$\tan \delta = G''/G' \quad (4)$$

La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante el calentamiento o enfriamiento, es determinada por el punto de cruce entre el módulo viscoso ( $G''$ ) y el elástico ( $G'$ ), momento en el cual el ángulo de desfasaje

es de 45° y la tan  $\delta$  es igual a 1. Luego de este punto de cruce o “punto gel”,  $G'$  asciende notoriamente y se observa el consecuente descenso de la tan  $\delta$ .

Para todos los sistemas estudiados, que incluyen soluciones de gelatina pura y sistemas gelatina + AF a diferentes pHs entre 3 y 7, se utilizó una rampa con baja velocidad de enfriamiento. Las muestras se mantuvieron a 35 °C durante 5 min, luego se enfriaron de 35 °C a 5 °C a una velocidad de 2 °C/min para promover la gelificación, y por último, se mantuvieron a 5 °C durante 15 min, para que se alcance el equilibrio en  $G'$ . Se evaluó la temperatura en el “punto gel” ( $T_{gel}$ ), el  $G'$  y la tan  $\delta$  al finalizar la medición ( $G'_{fin}$  y tan  $\delta_{fin}$ ).

## 2.10. Micro-calorimetría diferencial de barrido ( $\mu$ DSC)

Se empleó micro-calorimetría diferencial de barrido ( $\mu$ DSC) para analizar las transiciones térmicas a pH 7 y 3 de la gelatina pura y con AF, mediante un calorímetro Setaram III (Calluire, Francia). Las mediciones se llevaron a cabo en cápsulas de Hastelloy® C276, con una capacidad de 1 ml, herméticamente selladas, donde se colocaron  $800,0 \pm 0,5$  mg de solución. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. La concentración total de proteína, tanto en los sistemas de proteína sola como en los mixtos fue de 15% p/p (AF 0,075% p/p).

Tanto la muestra como la referencia fueron sometidas al siguiente programa:

- 1) Etapa isotérmica a 35 °C por 4 min.
- 2) Enfriamiento de 35 °C a 4 °C, a una velocidad de 1 °C/min.
- 3) Etapa isotérmica a 4 °C por 4 min.
- 4) Calentamiento de 4 °C a 60 °C, a una velocidad de 1 °C/min.
- 5) Enfriamiento de 60 °C a 35 °C, a una velocidad de 3 °C/min.

Se registraron las etapas 2, 3 y 4 con el objetivo de obtener los parámetros calorimétricos a partir de los termogramas: Temperaturas de transición ( $T_{gel}$ ,  $T_{fus}$ ) y las entalpías ( $\Delta H_{gel}$ ,  $\Delta H_{fus}$ ) de gelificación y fusión, respectivamente.

## 2.11. Análisis de textura y turbidez de geles de gelatina

### 2.11.1. Preparación de los geles

Las soluciones de G y G + AF a pH 7 se prepararon tal como fue descripto en la sección 1.3, utilizando 2,5% p/p de proteína y 0,0125% p/p de AF, y se ajustaron a pH 3; 4,5 y 6. Se colocaron en recipientes cilíndricos de 55 mm de diámetro x 40 mm de altura para el análisis de textura y en celdas de poliestireno de 10 mm de paso óptico (volumen máximo 4,5 ml) para las determinaciones de turbidez. Las mismas se almacenaron a 4 °C por 24 h antes del análisis de los geles formados.

### 2.11.2. Análisis de propiedades texturales

Los geles de G y de las mezclas G+AF fueron evaluados mediante un ensayo de penetración por medio de un analizador de textura TA-XT2i (MicroSystems, Ltd., Godalming, Reino Unido) usando una sonda cilíndrica (P/0.5 de 12,7 mm de diámetro), a una velocidad de 1 mm/s, de acuerdo con Pang y col (2014). La altura de la muestra fue de 30 mm, en un contenedor cilíndrico 40 mm de alto. La sonda realizó un desplazamiento de 10 mm dentro de la muestra.

Los ensayos de textura se realizaron por triplicado sobre los geles, 24 h después de su elaboración, almacenados a 4 °C. La temperatura de medición fue de entre 10-12 °C (temperatura habitual de consumo de la gelatina). Se evaluó la fuerza del gel, definido como la fuerza máxima durante la penetración y la firmeza del gel, definida como la pendiente inicial de la curva de penetración en los primeros 2 segundos (Fiszman y Salvador 1999).

### 2.11.3. Análisis de turbidez

Los geles de G y de las mezclas G + AF a distintos pHs fueron medidos utilizando un espectrofotómetro UV/Visible T70 (PG Instruments Ltd., Reino Unido), a 550 nm, de acuerdo con Lau y col (2000).

Las mediciones de absorbancia se realizaron por duplicado sobre los geles contenidos en cubetas de poliestireno, 24 h después de su elaboración, almacenados a 4 °C (pH 3; 4,5; 6 y 7). La temperatura de medición fue de entre 10-12 °C.

## **2.12. Análisis estadístico**

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado, y cada valor representa el promedio de al menos dos mediciones. Las diferencias significativas entre los parámetros estudiados de las muestras fueron determinadas por análisis de varianza (*One Way ANOVA*) ( $p < 0,05$ ) usando el procedimiento de modelo lineal (Statgraphics 16.0). Los valores estadísticamente diferentes son indicados con diferentes superíndices.

### 3. Referencias

- Arzeni C, Pérez OE, LeBlanc JG, Pilosof AMR. 2015a. Egg albumin–folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *Journal of Functional Foods* 18, Part A:379-386.
- Arzeni C, Pérez OE, Pilosof AMR. 2015b. Power Ultrasound Assisted Design of Egg Albumin Nanoparticles. *Food Biophysics* 10:439-446.
- Bellesi FA. 2016. Comportamiento de interfasas y emulsiones submicrónicas estabilizadas por biopolímeros en simulaciones de procesos de digestión gastroduodenal *in vitro*. Available from: [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6088\\_Bellesi](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6088_Bellesi)
- Fiszman SM, Salvador A. 1999. Effect of gelatine on the texture of yoghurt and of acid-heat-induced milk gels. *Z Lebensm Unters Forsch* 208:100-105.
- Huang X, Kakuda Y, Cui W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids* 15:533-542.
- Jiménez-Saiz R, Ruiz-Henestrosa VMP, López-Fandiño R, Molina E. 2012. *In vitro* digestibility and allergenicity of emulsified hen egg. *Food Research International* 48:404-409.
- Kalantzi L, Goumas K, Kalioras V, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. 2006. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharm Res* 23:165-176.
- Lau MH, Tang J, Paulson AT. 2000. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. *Food Research International* 33:665-671.
- Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids* 17:455-462.
- Macierzanka A, Sancho AI, Mills ENC, Rigby NM, Mackie AR. 2009. Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. *Soft Matter* 5:538-550.
- Malvern Instruments Ltd. 2012. A basic guide to particle characterization. Available from: [www.malvern.com](http://www.malvern.com)
- Malvern Instruments Ltd. 2013. Zetasizer nano user manual. UK: Malvern Instruments Ltd.
- Martínez MJ. 2010. Impacto de la interacción entre  $\beta$ -lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios.

- McClements DJ, Li Y. 2010. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Funct* 1:32-59.
- Pang Z, Deeth H, Sopade P, Sharma R, Bansal N. 2014. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. *Food Hydrocolloids* 35:484-493.
- Piper DW, Fenton BH. 1965. pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance. *Gut* 6:506-508.
- Sarkar A, Goh KKT, Singh RP, Singh H. 2009. Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin in an *in vitro* gastric model. *Food Hydrocolloids* 23:1563-1569.
- Sarkar A, Horne DS, Singh H. 2010a. Pancreatin-induced coalescence of oil-in-water emulsions in an *in vitro* duodenal model. *International Dairy Journal* 20:589-597.
- Sarkar A, Horne DS, Singh H. 2010b. Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids* 24:142-151.
- Schenk ML. 2010. Preservación de productos frutales mínimamente procesados mediante la aplicación de luz UV y su combinación con otras tecnologías emergentes. Available from: [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4717\\_Schenk](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4717_Schenk)
- Sigaut L. 2011. Caracterización cuantitativa de señales intracelulares de calcio. Available from: [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n4826\\_Sigaut](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4826_Sigaut)
- Stepanek P. 1993. Data analysis in light scattering. En: *Dynamic light scattering. The Methods and Some Applications*. London, U. K: Clarendon Press. p 177-241.
- Zhang Y, Li J, Lang M, Tang X, Li L, Shen X. 2011. Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery. *Journal of Colloid and Interface Science* 354:202-209.

## **RESULTADOS**

# **Capítulo I**

## I.1. Unión de ácido fólico a proteínas

El primer paso para el diseño de nano-micropartículas proteicas que puedan vehiculizar AF es el estudio de las interacciones a nivel molecular entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la gelatina con el bioactivo, en solución. Para esto se llevaron a cabo ensayos de ultrafiltración, para determinar el grado de unión entre los *carriers* y el bioactivo. Asimismo, se emplearon técnicas de dispersión estática y dinámica de luz con el objetivo de determinar tamaño de partícula y potencial  $\zeta$  de los componentes puros y sus mezclas, complementando los análisis con observaciones mediante microscopía confocal.

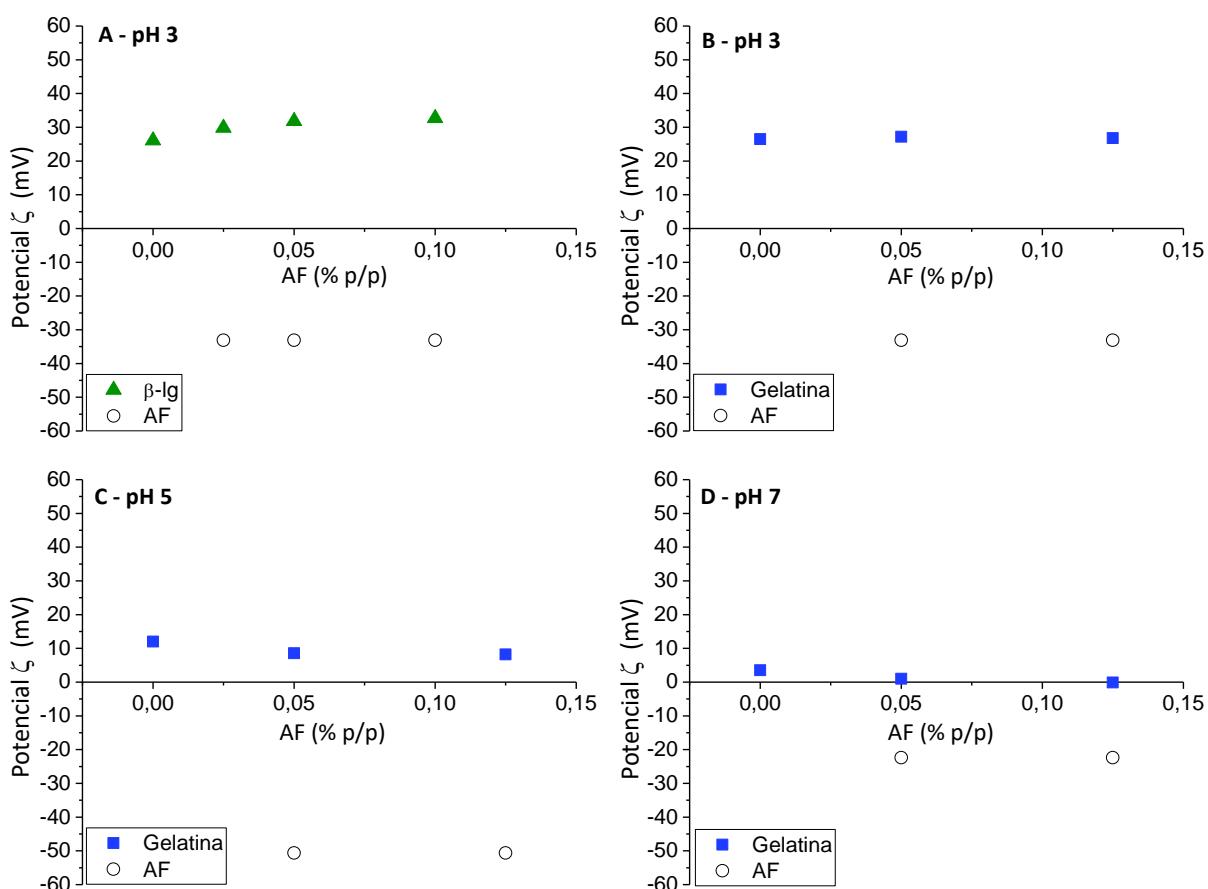
En primera instancia, se analizó la capacidad de la  $\beta$ -Ig para unir AF en condiciones que pudieran tener una aplicación tecnológica. Para ello, se utilizó una concentración de proteína de 5% p/p, a la cual se adicionaron cantidades crecientes de AF (concentraciones finales en la mezcla entre 0,025 y 1,25% p/p). Esto implica relaciones en peso AF/ $\beta$ -Ig entre 0,005 y 0,25 y relaciones molares entre 0,2 y 10. El grado de unión del AF a la proteína se evaluó mediante la determinación espectrofotométrica del AF libre en el permeado, luego de la ultrafiltración de las mezclas AF/proteína.

Independientemente de la concentración de AF, el porcentaje de unión del AF a la  $\beta$ -Ig fue nulo a pH 7 y 100% a pH 3.

La gelatina, debido a su alta viscosidad, fue utilizada en una concentración de 0,5% p/p, y todos los análisis se realizaron a 35 °C, temperatura por encima de la transición sol-gel de la gelatina (~30 °C) (Firoozmand et al. 2012). Se eligió la mayor relación en peso AF/proteína: 0,25. Al igual que para la  $\beta$ -Ig, a pH 3 el porcentaje de AF unido fue de 100%, mientras que a pH 7 fue 38,6%.

A pH 3, ambas proteínas tienen una carga neta positiva considerable ( $\approx$  20 – 30 mV) y el AF una importante carga neta negativa (Figura I.1.A y B). Independientemente de la concentración de AF, el potencial  $\zeta$  de las mezclas fue

similar al de las proteínas puras, sugiriendo que la unión de AF prácticamente no alteraría la carga superficial de las mismas. Otros autores han reportado resultados similares, al no observar diferencias en el potencial  $\zeta$  luego de la adición de AF a nanoesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), independientemente de la relación de PLGA/AF utilizada (Stevanović et al. 2008). Este comportamiento se debería a que sólo unas pocas cargas positivas de las proteínas serían neutralizadas por la interacción con el bioactivo y/o por la contribución de los cationes liberados de la sal del AF como consecuencia de la interacción iónica con la proteína.



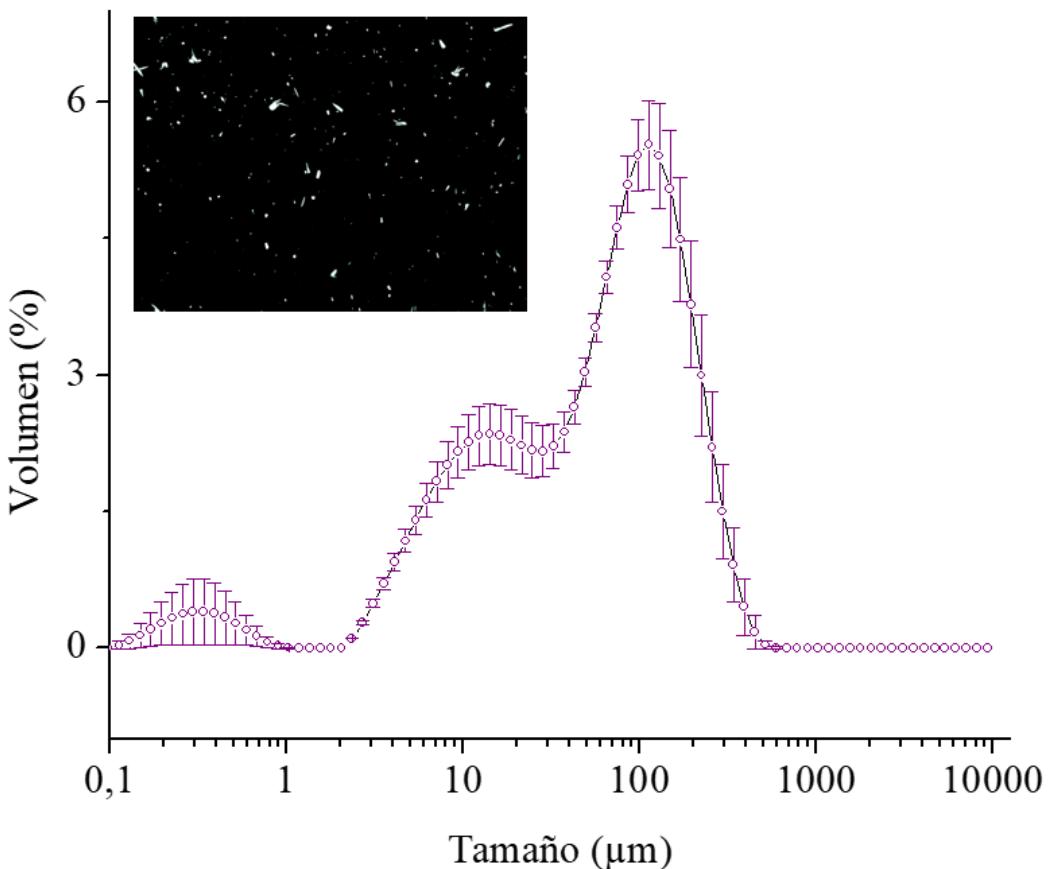
**Figura I.1.** Potencial  $\zeta$  de mezclas de  $\beta$ -Ig 5%+AF ( $\blacktriangle$ ) y G 0,5%+AF ( $\blacksquare$ ) y de soluciones de AF ( $\blacksquare$ ) a pH 3 (A y B), 5 (C) y 7 (D)

Entre los 162 aminoácidos de la  $\beta$ -Ig, lisina (9%), arginina (2%) e histidina (1%) (Kilara y Vaghela 2004) podrían estar potencialmente involucrados en

interacciones iónicas con el ácido glutámico del AF a pH 3. De forma análoga, los aminoácidos básicos principales en la gelatina que podrían estar involucrados en la unión son arginina (5%), lisina (3%) y en menor medida la histidina (0,4%) (Schrieber y Gareis 2007).

La estructura molecular del AF (ácido pteroil monoglutámico) consiste en un anillo de pterina unido al ácido para-aminobenzoico y a una molécula de ácido glutámico y exhibe una solubilidad dependiente del pH. En condiciones de neutralidad/alcalinidad es 1.000 veces más soluble que en un medio ácido ya que se encuentra en forma de sal. Por debajo de pH 5, debido a la protonación de los grupos carboxilos, el AF presenta muy baja solubilidad, generando precipitados. Datos experimentales de la solubilidad del AF a valores de pH entre 0 y 7, muestran que a pH 3 se alcanza la menor solubilidad (Wu et al. 2010). En la Figura I.2. se muestra la distribución en volumen del tamaño de partícula de soluciones de AF 0,5% p/p inmediatamente después de ajustar el pH a 3, donde se visualizan partículas de gran tamaño, de hasta 100  $\mu\text{m}$ , lo cual indica la asociación del AF inducida por el pH. Cuando esta solución se deja en reposo, se puede observar la cristalización del AF mediante un microscopio óptico (Inserto en la Figura I.2.). En esta micrografía podemos observar los cristales aciculares de AF mediante el uso de un polarizador.

En presencia de las proteínas no se observó cristalización de AF, como las mezclas de AF/proteína fueron preparadas a pH 7 y luego llevadas a pH 3, es probable que el AF negativamente cargado se una a las cargas positivas que surgen en las proteínas al descender el pH. Resultados similares han sido observados para nanopartículas de clara de huevo como *carriers* de AF (Arzeni et al. 2015a), aunque en este trabajo la estrategia utilizada para evitar la cristalización fue la de mezclar las soluciones de nanopartículas a pH 3 con la solución de AF a pH 7 con agitación suave y continua, ya que las nanopartículas se desestabilizaban a pH 7.



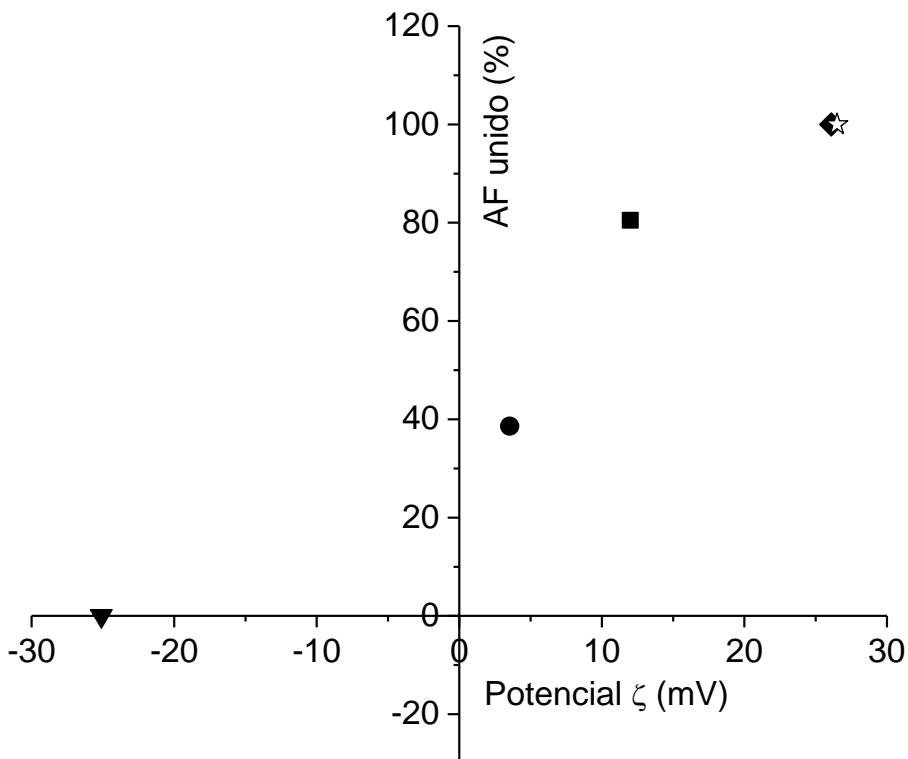
**Figura I.2.** Distribución de tamaño de partícula en volumen de AF (0,5% p/p) a pH 3.  
Inserto: Imagen de microscopía óptica con luz polarizada de cristales de AF a pH 3.

A pH 7, la  $\beta$ -Ig se encuentra por encima del  $\text{pI}$  (4,6 – 5,2) (Das y Kinsella 1989; Bromley et al. 2005; Harnsilawat et al. 2006)) y presentó una fuerte carga negativa (-25 mV), similar a la del AF (-20 mV). Las fuerzas electrostáticas repulsivas podrían explicar que el AF no pueda ser retenido por la proteína luego de la ultrafiltración. Sin embargo, la gelatina muestra un potencial  $\zeta$  levemente positivo a pH 7 (3,5 mV) (Figura I.1.D), ya que la gelatina tipo A utilizada tiene un punto isoeléctrico de 7,5. Esto podría explicar el grado de unión que el AF presenta con la gelatina a pH 7 (38,6%) luego de la ultrafiltración.

En forma análoga a lo observado a pH 3, el potencial  $\zeta$  de las mezclas AF/G a pH 5 y 7 (Figura I.1.C y D) fue similar al de la gelatina pura, sin que el AF altere la carga superficial de la proteína. Tavares y col. (2015) estudiaron la autoagregación de la lactoferrina (LF) inducida por su unión con AF. Dicha

proteína presenta un *pI* entre 8,6 y 8,9, por lo cual exhibe una carga neta positiva a valores neutros y ácidos de pH, de manera análoga a la G utilizada en el presente estudio, aunque ésta presenta un valor de *pI* algo menor (*pI* 7,5). Los autores propusieron un mecanismo de autoagregación de la LF inducido por la unión de AF que ocurre en dos etapas: primero, el AF se une a la LF hasta la saturación (10 moléculas de AF por cada molécula de LF) y, luego, las moléculas de LF saturadas se autoasocian formando agregados. Se determinó además que el proceso era espontáneo, con una fuerte participación de interacciones electrostáticas. Al valor de pH que estudiaron (pH 5,5) la unión del AF, cargado negativamente, a la LF, cargada positivamente, indujo una reducción continua en la carga neta de la proteína. A un determinado grado de saturación crítico, los complejos formados, que aún presentaban una leve carga positiva, se autoasociaron por medio de interacciones de corto alcance para formar agregados de un tamaño definido. El crecimiento adicional fue impedido por la repulsión generada por interacciones coulombicas de alto alcance, debidas a las cargas positivas presentes en la superficie de los agregados. Finalmente, los autores concluyeron que dichos agregados permitirían desarrollar un ingrediente nuevo que mantenga la solubilidad y bioaccesibilidad del AF a pH ácido.

Con el objetivo de verificar si la unión de AF a las proteínas guarda una relación con la carga superficial de las mismas, que es modulada por el pH, se representa el grado de unión del AF en función del potencial  $\zeta$  de las proteínas (Figura I.3.). La relación observada señala el rol predominante de la magnitud de carga neta positiva de las proteínas en esta interacción, ya que, al aumentar la carga neta positiva, se incrementa el porcentaje de AF unido.



**Figura I.3.** AF unido a las proteínas (%) en función del potencial  $\zeta$  de las proteínas puras.  $\beta$ -Ig 5% pH 7 (▼),  $\beta$ -Ig 5% pH 3 (◆), Gelatina 0,5% pH 7 (●), Gelatina 0,5% pH 5 (■), Gelatina 0,5% pH 3 (☆).

Estudios previos, que no involucran la técnica de ultrafiltración, muestran que aún a pH 7, numerosas proteínas pueden interactuar con AF, entre ellas la seroalbúmina humana y bovina,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, caseínas, zeína (Zhang y Jia 2006; Liang y Subirade 2010; Bourassa et al. 2011; Bourassa y Tajmir-Riahi 2012; Liang et al. 2013; Pérez et al. 2014; Peñalva et al. 2015a; b). La interacción entre el AF y las proteínas se ha investigado mediante apagamiento de fluorescencia, calorimetría de titulación isotérmica, dicroísmo circular y espectroscopía de absorción. Se ha reportado que el AF interacciona con la seroalbúmina bovina (BSA) por uniones hidrofílicas con el residuo de triptófano en posición 132 (Trp132) ubicado en la superficie de la proteína y por uniones hidrofóbicas con el Trp212 del interior de la molécula (Bourassa et al. 2011). Jha y Kishore (2011) sugirieron que la unión entre la BSA y el AF está dominada por interacciones electrostáticas con contribuciones de puentes de hidrógeno. La  $\beta$ -Ig, por su parte, podría ligar AF en su superficie, posiblemente en la hendidura

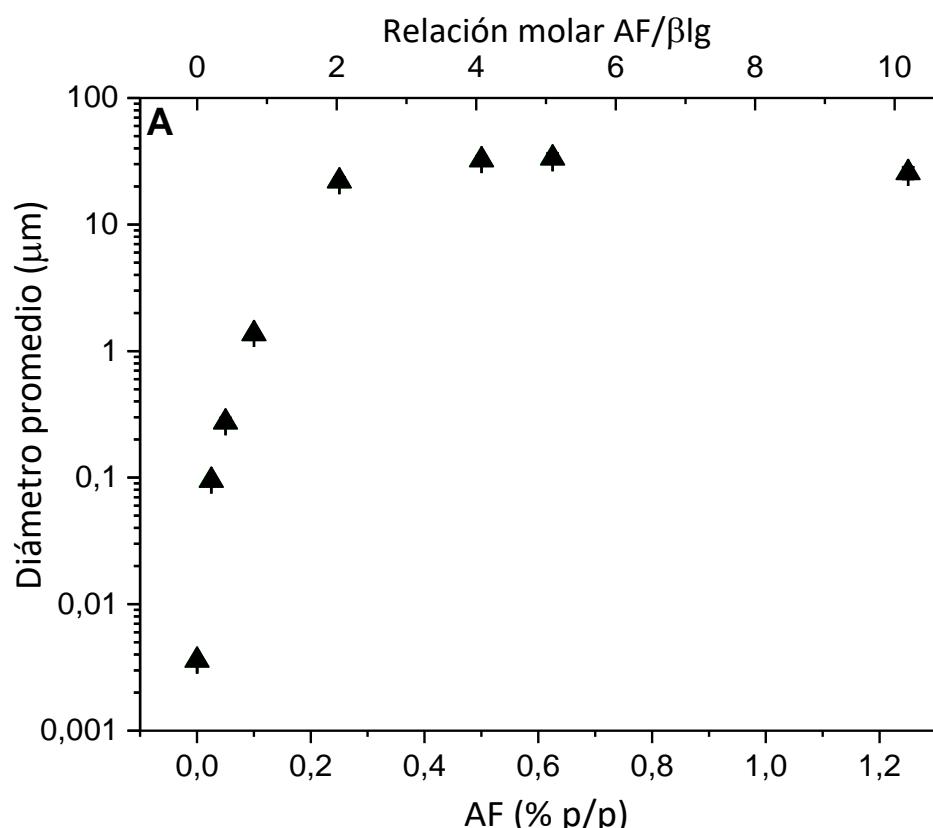
entre la hélice  $\alpha$  y el barril  $\beta$ , lo cual fue propuesto como una de las razones para el retraso en la fotodescomposición del AF (Liang y Subirade 2010). Entre las zonas externas de la  $\beta$ -Ig que se han sugerido como sitios de unión a ligandos se encuentra la superficie externa cercana a Trp19–Arg124, un sitio cercano a la apertura del barril  $\beta$  y un sitio en la interfase monómero – monómero del dímero (Liang et al. 2013).

Cualesquiera que sean los sitios exactos involucrados en estas interacciones a pH neutro, serían demasiado débiles como para ser determinados mediante el ensayo de ultrafiltración. A pH 7, sólo podrían tener lugar interacciones débiles entre las zonas positivas de las proteínas y los grupos carboxílicos negativos del AF. Sin embargo, a valores de pH donde las proteínas poseen carga neta positiva, las fuertes interacciones electrostáticas entre grupos con carga opuesta podrían explicar la fuerte unión observada entre el AF y las proteínas estudiadas. Un comportamiento similar ha sido previamente reportado para la unión del AF con proteínas de clara de huevo (Arzeni et al. 2015a; b).

## I.2. Tamaño de partícula y microestructura de sistemas mixtos AF/proteína a pH 3

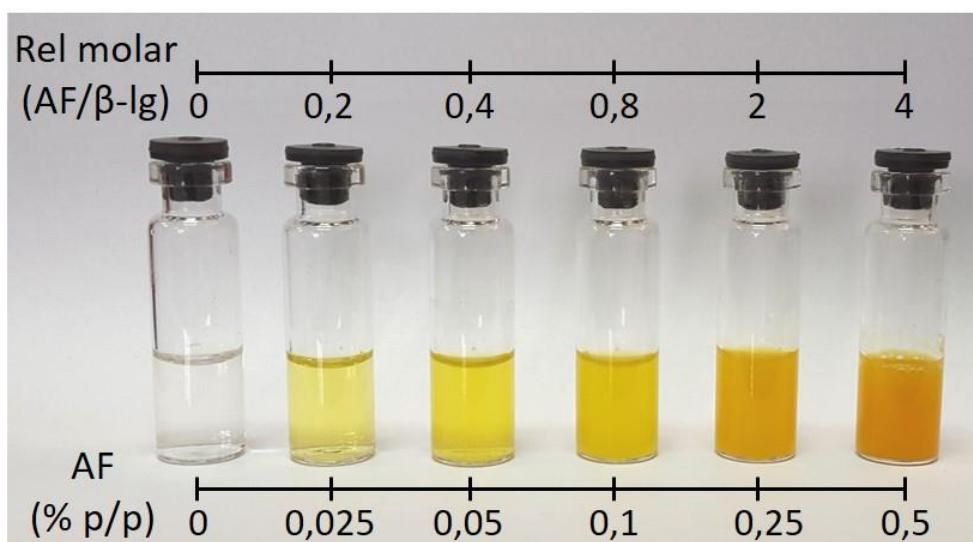
A los fines de conocer más detalles relacionados con las interacciones observadas en medio ácido, se evaluó cómo la unión a pH 3 de AF a  $\beta$ -Ig (5% p/p) afecta al tamaño de partícula. En la Figura I.4. se muestra el diámetro promedio de las partículas de AF/ $\beta$ -Ig formadas a pH 3, en función de la concentración de la vitamina y su relación molar. Cabe aclarar que, dado que el tamaño de partícula varía en un rango muy amplio en este ensayo, se utilizaron los equipos de dispersión dinámica (rango de 0,6 nm a 6  $\mu$ m) o estática de luz (rango de 0,1  $\mu$ m a 1000  $\mu$ m) según cuál fuera el indicado para cada muestra. A los fines de poder visualizar más claramente el efecto del incremento de la concentración de AF en el tamaño final de los agregados, se grafican los diámetros promedio proporcionados por cada equipo que, si bien presentan diferencias en el cálculo

que se realiza para su obtención, resultan adecuados para observar la tendencia en el cambio de tamaño en todo el rango de concentraciones evaluado.



**Figura I.4.** Tamaño promedio de partícula de  $\beta$ -Ig (5% p/p) a pH 3 en función del incremento de la concentración o relación molar de AF.

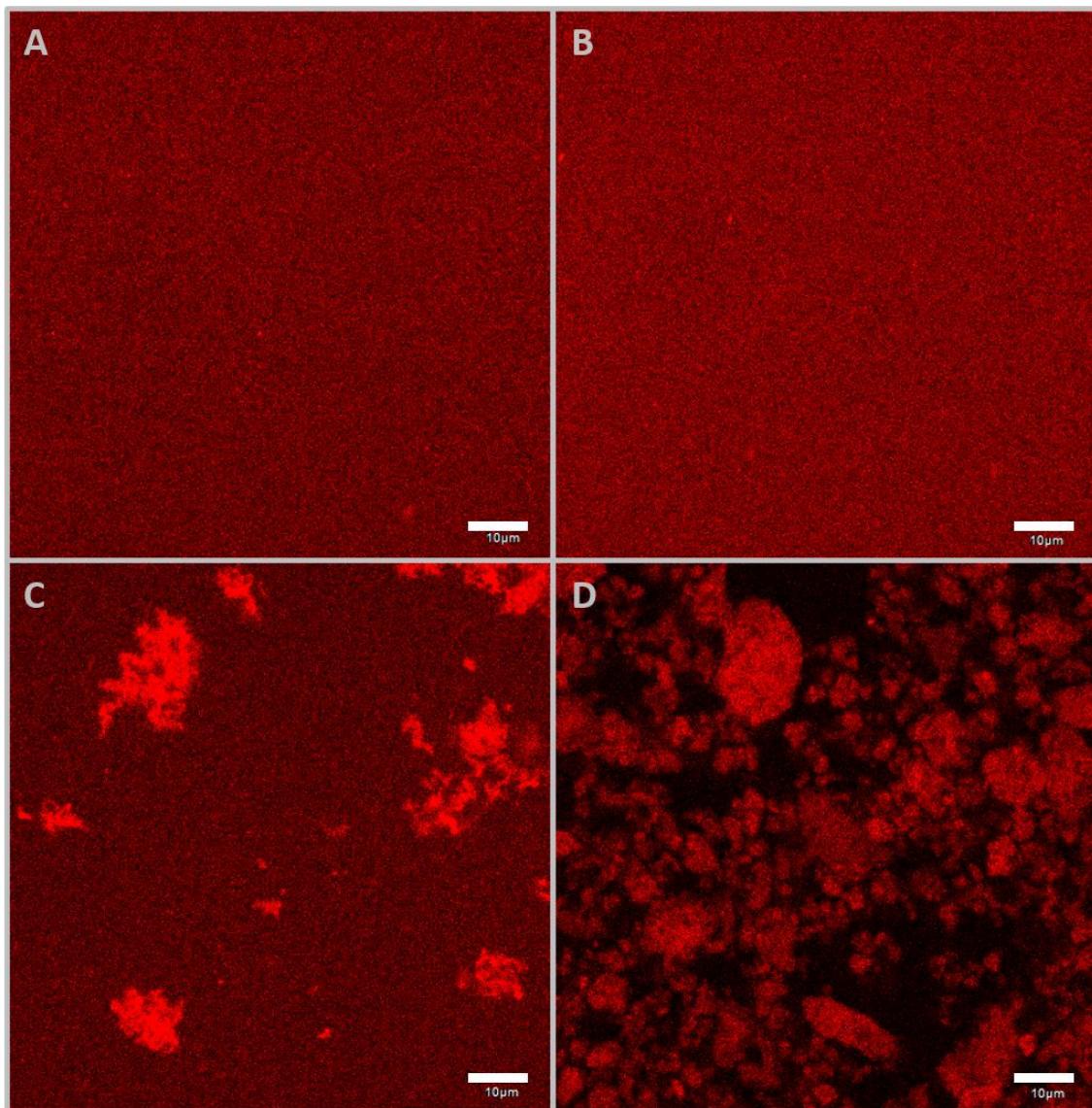
A bajas concentraciones de AF, las partículas formadas se encuentran en el rango submicrónico ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ). El diámetro promedio de partículas aumentó rápidamente hasta relaciones molares de 1- 1,5 y luego se mantuvo constante en un valor entre 25 y 33  $\mu\text{m}$ . Como se puede apreciar en la Figura I.5., las mezclas son inicialmente transparentes, hasta relaciones molares AF/ $\beta$ -Ig cercanas a 0,8, luego se vuelven turbias al incrementar el tamaño de los agregados y finalmente precipitan (resultados no mostrados).



**Figura I.5.** Apariencia visual de soluciones de  $\beta$ -Ig (5% p/p) a pH 3 en función del incremento de la concentración o relación molar de AF.

Las partículas de AF/ $\beta$ -Ig a pH 3 fueron posteriormente analizadas por microscopía confocal. La Figura I.6. muestra al AF (Fig. I.6.A) y a la  $\beta$ -Ig (Fig. I.6.B) con una apariencia homogénea. En el primer caso se debería a la sola presencia de la rodamina, que no tiene afinidad por la vitamina, mientras que en el caso de la proteína, como al pH estudiado ésta se encuentra en la forma monomérica (Uhrínová et al. 2000), no podría ser observada mediante esta técnica.

En los sistemas mixtos, (Fig. I.6.C y D), se pueden advertir los agregados proteicos de tamaño creciente al incrementar la concentración de AF.

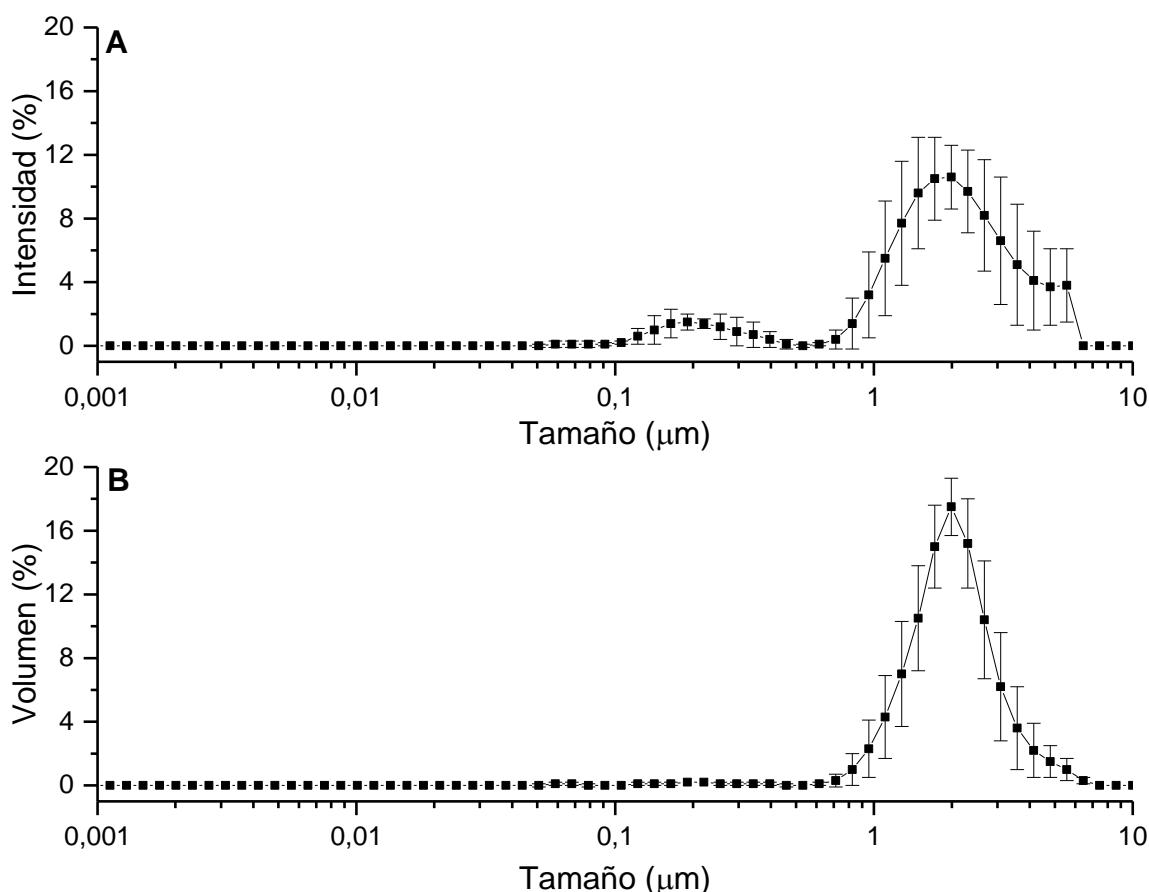


**Figura I.6.** Imágenes de microscopía confocal de A: AF 0,5% pH 3, B:  $\beta$ -Ig 5% pH 3, C:  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,1% pH 3, D:  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,5% pH 3. La barra representa 10  $\mu$ m.

Estas observaciones permiten corroborar los resultados obtenidos por dispersión de luz. En la Figura I.7. se muestran las distribuciones obtenidas por DLS para el sistema  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,1% pH 3. En la Figura I.7.A se observa la distribución en intensidad, la cual presenta una alta sensibilidad para la detección de partículas de gran tamaño, por ejemplo, agregados, incluso cuando estos se encuentran en una baja cantidad en la muestra. Se puede observar una distribución trimodal, con un máximo cercano a los 2  $\mu$ m correspondiente a la población principal, que guarda relación con el diámetro promedio informado en la Figura I.4., y una

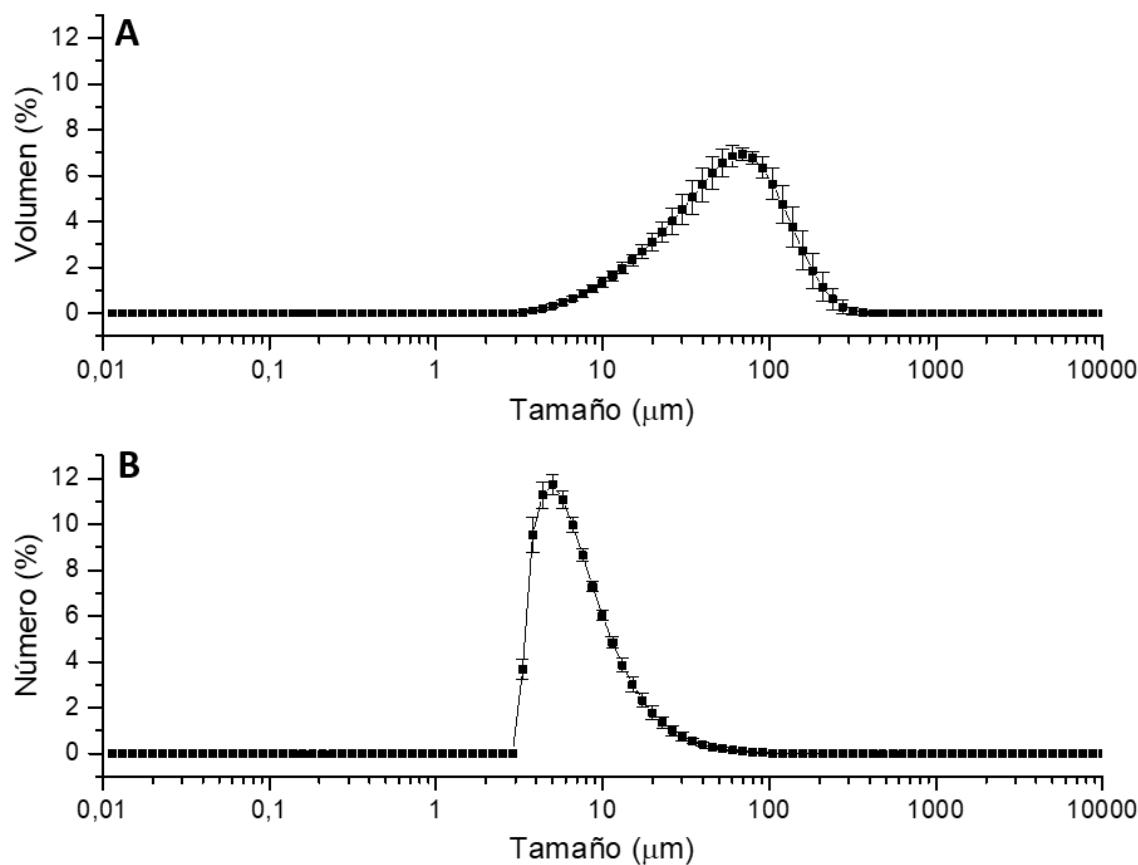
población de tamaños mayores sobre el límite de detección, que se distingue en el corte brusco a los  $6 \mu\text{m}$ . Estos agregados de mayor tamaño pueden observarse, asimismo, en la micrografía de la Figura I.6.C, mientras que la población principal de alrededor de  $2 \mu\text{m}$  correspondería al color de fondo observado en la imagen microscópica, dado que, no se logran visualizar con alta definición al nivel de magnificación que permite la técnica.

La Figura I.7.B muestra una distribución de tamaño de partícula en volumen monomodal con un máximo en  $2 \mu\text{m}$ , lo cual permite verificar que ésta es la población principal en la muestra y que los agregados de mayor tamaño observados en la microscopía corresponden a una población que se encuentra en muy baja proporción con respecto a la anterior.



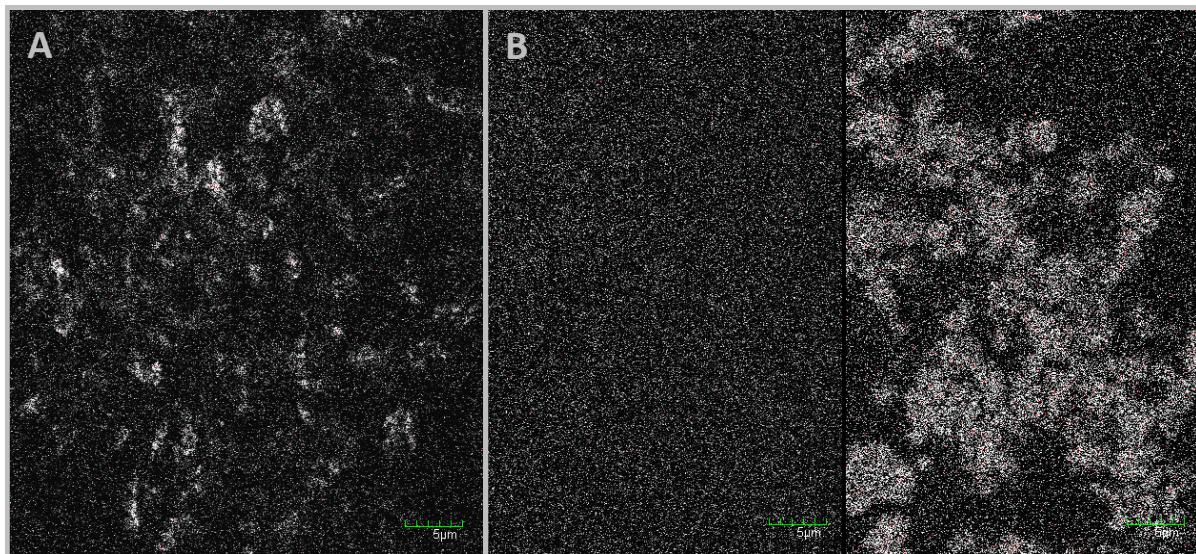
**Figura I.7.** Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A) y volumen (B) de  $\beta\text{-Ig}$  5% - AF 0,1% pH 3.

En la Figura I.8. se muestran las distribuciones obtenidas por SLS para el sistema  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,5% pH 3. La Figura I.8.A muestra una distribución de tamaño de partícula monomodal asimétrica, polidispersa, con un máximo cercano a los 70  $\mu\text{m}$ , que presenta una cola hacia tamaños menores, la cual cobra peso en el cálculo del diámetro promedio mostrado en la Figura I.4., correspondiente a 32  $\mu\text{m}$ . Esta distribución polidispersa se correlaciona con los agregados de diversos tamaños que pueden observarse en la micrografía de la Fig. I.6.D. Sin embargo, dado que en la imagen microscópica se observa una mayor proporción de agregados de pequeño tamaño que no parecen estar representados en la distribución en volumen mostrada, se realizó una conversión de dicha distribución expresada en volumen a número. En la Figura I.8.B se observa que la distribución en número es monomodal, con un máximo cercano a los 5  $\mu\text{m}$ , lo que verifica que es la población mayoritaria de este sistema y que correspondería a las partículas más pequeñas que se observan mediante microscopía confocal (Fig. I.6.D).



**Figura I.8.** Distribución de tamaño de partícula en volumen (A) y número (B) de  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,5% pH 3.

Con el objetivo de verificar que el AF no se autoensambla/ cristaliza a pH 3 en presencia de la proteína, se empleó la técnica de microscopía confocalpectral. Mediante esta técnica, se excita el sistema AF/ $\beta$ -Ig con dos fuentes de luz diferentes, un láser multilínea de Argón (417 nm) para el AF y un láser de Helio-Neón (543 nm) para la proteína marcada con rodamina. Estas imágenes se compararon con las obtenidas para la vitamina pura a pH 3. En la Figura I.9.A se evidencia la cristalización del AF a pH 3, sin embargo, en presencia de  $\beta$ -Ig, estas estructuras no se observan (Fig. I.9.B-izquierda) debido a la unión del bioactivo a la proteína, por lo cual se concluye que a pH 3 en presencia de proteína, el AF no cristaliza.



**Figura I.9.** Imágenes de microscopía confocal espectral de A: AF 0,5% pH 3, B:  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,5% (izquierda: canal del AF – derecha: canal de la rodamina).

En presencia de gelatina también se observó una tendencia similar en cuanto a la agregación. El tamaño de partícula se incrementó con la concentración de AF o relación molar AF/G (Tabla I.1.).

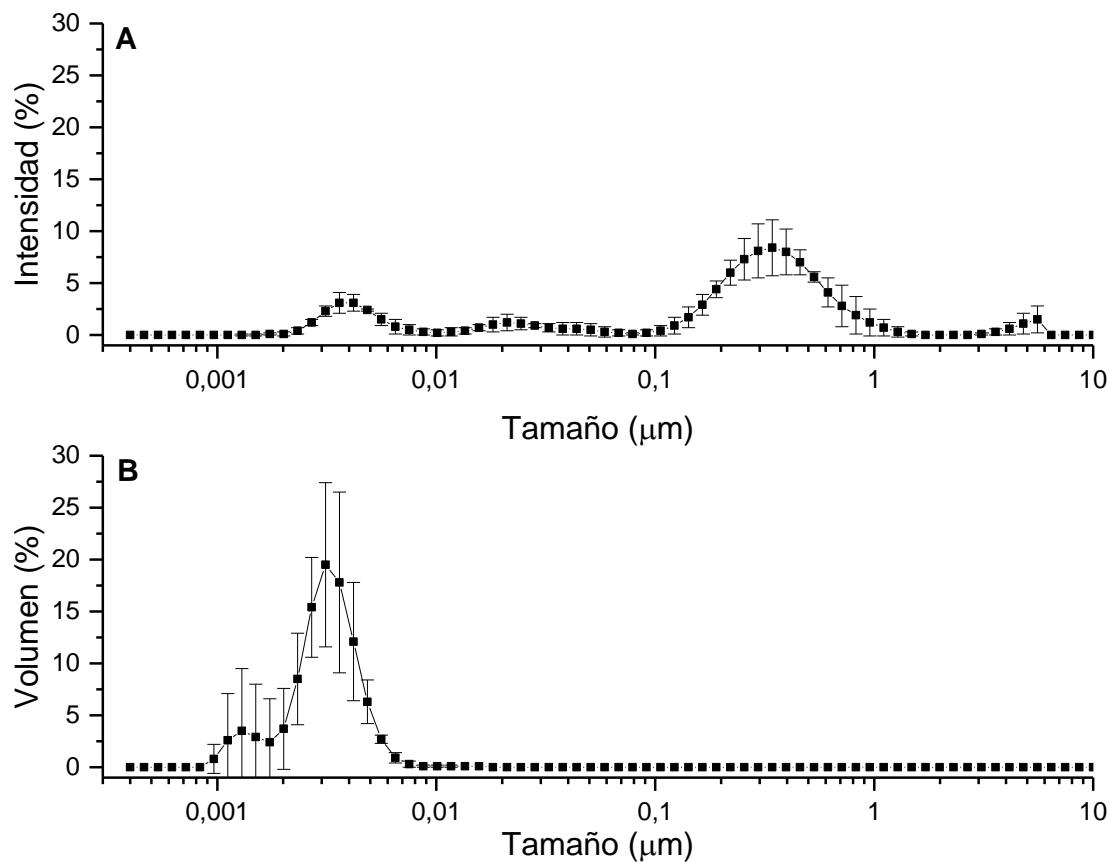
**Tabla I.1.** Diámetro promedio de partículas de gelatina (0,5% p/p) con concentraciones crecientes de AF, a pH 3.

AF (% p/p)	Relación molar AF/G	Diámetro promedio ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>
0	0	$0,13 \pm 0,05^{\text{a}}$
0,0025	0,57	$3,68 \pm 0,74^{\text{b}}$
0,125	28,32	$9,86 \pm 0,23^{\text{c}}$

<sup>1</sup> Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

En la Figura I.10. se muestran las distribuciones de tamaño de partícula correspondientes a la gelatina pura obtenidos por DLS. En la Fig. I.10.A se observa una distribución de tamaño de partícula en intensidad multimodal, evidenciando poblaciones de variados tamaños, incluso por encima del límite de detección del equipo. Esta característica es propia de la gelatina, que, debido a su forma de obtención, no le corresponde un único tamaño de partícula, sino un rango, que

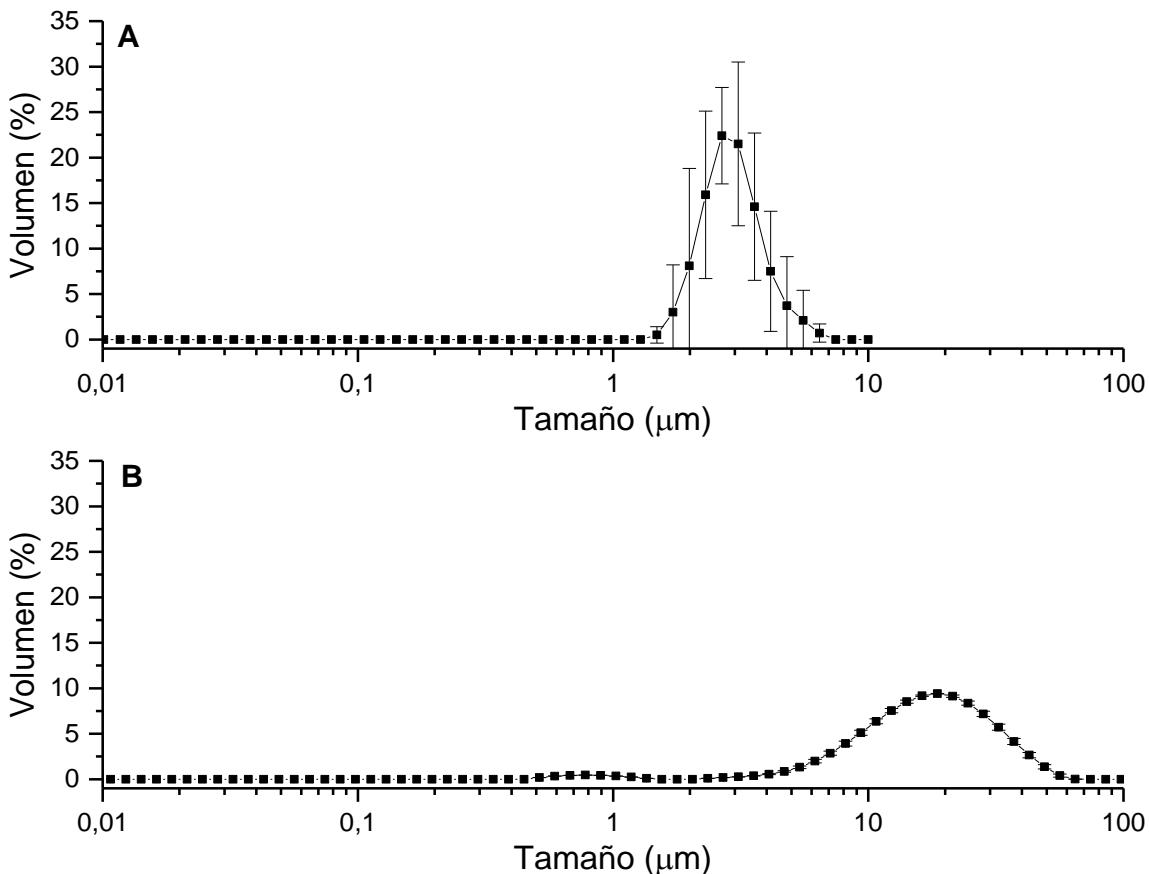
puede ser más o menos acotado de acuerdo a las condiciones durante el procesamiento (Schrieber y Gareis 2007). El valor del diámetro promedio (que se calcula a partir de la información de intensidad de luz dispersada) indicado en la Tabla I.1. está ampliamente influenciado por la población de gran tamaño que se observa en la distribución en intensidad. Sin embargo, la Figura I.10.B, evidencia, mediante la distribución en volumen de la misma muestra, que la población mayoritaria correspondería a tamaños menores a 0,01  $\mu\text{m}$ .



**Figura I.10.** Distribución de tamaño de partícula en intensidad (A) y volumen (B) de G 0,5% pH 3.

En la Figura I.11. se observan los distintos sistemas de AF/G medidos por DLS (Fig. I.11.A) (para la relación molar 0,57) y por SLS (Fig. I.11.B) (para relación molar 28,32). En la Figura I.11.A se observa una distribución de tamaño de partícula monomodal con un máximo cercano a los 3  $\mu\text{m}$ , la cual se encuentra en concordancia con el valor promedio calculado (Tabla I.1.). La Figura I.11.B

muestra una población principal cuyo máximo se encuentra en un valor aproximado de 19  $\mu\text{m}$  y una de menor relevancia en volumen, cercana a 1  $\mu\text{m}$ , que influye en el cálculo del diámetro promedio, que resulta de alrededor de 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura I.11.** Distribución de tamaño de partícula en volumen de G 0,5% - 0,0025 (A) y de G 0,5% - 0,125 (B), pH 3.

Por último, si se analizan los incrementos de tamaño observados para los distintos sistemas de AF/proteína evaluados (Fig. I.4. y Tabla I.1.) se puede distinguir que el diámetro promedio de partículas alcanzado para AF/ $\beta$ -Ig o AF/G fueron similares a relaciones molares AF/proteína de 0,57. A relaciones molares más altas, las partículas de AF/G fueron más pequeñas (9,86  $\mu\text{m}$ ) que aquellas obtenidas en los sistemas con  $\beta$ -Ig (25 – 33  $\mu\text{m}$ ).

### I.3. Comportamiento térmico de partículas de ácido fólico/proteína a pH 3

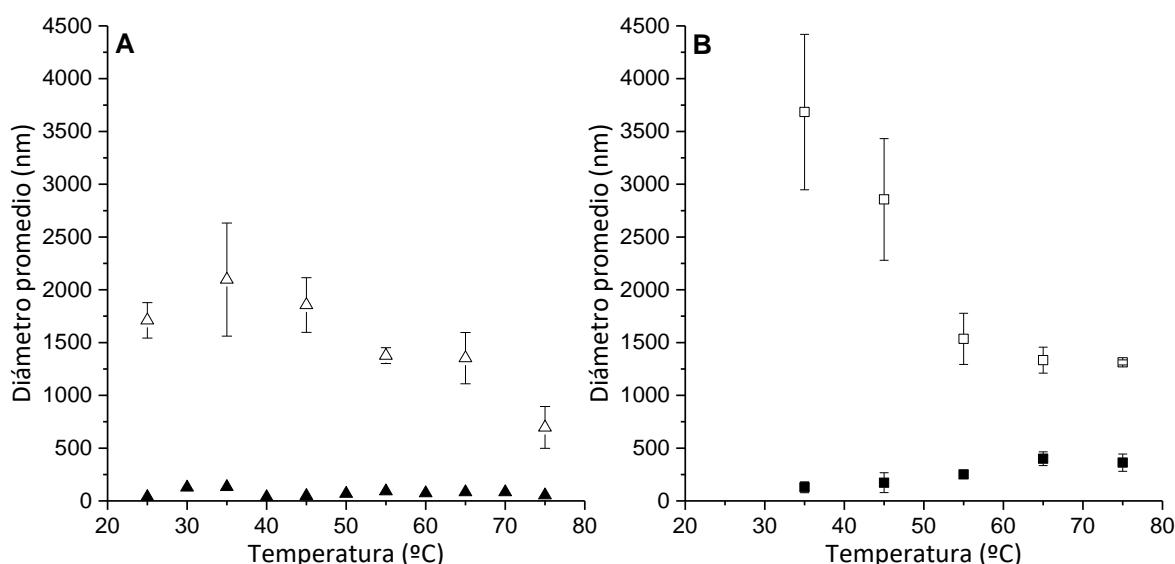
Luego de la evaluación de la interacción proteína/AF a 25 y 35 °C para la  $\beta$ -Ig y G, respectivamente, se estudió el efecto del incremento de la temperatura sobre la distribución de tamaño de partícula de los *carriers* proteicos. La finalidad de estas determinaciones fue evaluar la factibilidad de incorporar estos sistemas a productos que requieran ser sometidos a un tratamiento térmico, y verificar la estabilidad de la interacción en dichas condiciones de procesamiento. Con el objetivo de comparar la evolución del tamaño de partícula de las soluciones de  $\beta$ -Ig, G y de los sistemas mixtos proteína/AF durante toda la rampa de temperatura, se analizó la evolución del *z-average*. Este parámetro se obtiene mediante el análisis de Cumulantes en la determinación del tamaño de partícula, el cual ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño de diámetro promedio (diámetro hidrodinámico promedio o *z-average*). El valor del *z-average* corresponde a la media del tamaño de partícula en la distribución de intensidad. Este parámetro es adecuado para obtener una estimación del tamaño de partícula con el propósito de comparación, pero resulta inadecuado para dar una completa descripción de los resultados para sistemas polidispersos. Para este ensayo se seleccionaron los sistemas con la menor relación en peso de AF/proteína (0,005) de modo de obtener tamaños de partícula en el rango de medición del Zetasizer Nano-ZS.

La Figura I.12. muestra el tamaño promedio de partícula de las proteínas puras y sus mezclas con AF a pH 3 durante el calentamiento. El ensayo se realizó también para el AF puro, en solución a pH 3, pero el mismo experimenta una agregación dependiente de la temperatura, que excede el rango de medición del equipo y precipita. Se observaron variaciones muy pequeñas en el tamaño de partícula de la  $\beta$ -Ig pura con el incremento de la temperatura (Fig. I.12.A) sugiriendo que a este pH y en este rango de temperatura, no es susceptible a la agregación. De acuerdo con lo reportado por Martinez y Pilosof (2018), a pH 3 la proteína nativa se desnaturaliza por calentamiento recién a los 85 °C y luego las moléculas se

agregan mediante interacciones débiles de tipo van der Waals y puentes de hidrógeno. En este rango de pH, la desnaturización de las moléculas de  $\beta$ -Ig no promueve la exposición de residuos tiol y la reactividad de estos grupos es limitada. El tamaño de partícula inicial de las mezclas AF/ $\beta$ -Ig ( $\beta$ -Ig 5% - AF 0,025%) fue de 1.711 nm (Fig. I.12.A) debido a la agregación inducida por el AF. Al aumentar la temperatura por encima de los 45 °C, el tamaño disminuyó hasta estabilizarse en valores cercanos a 700 nm a 75 °C.

Para las mezclas con G (G 0,5% - AF 0,0025%) el tamaño promedio inicial fue de 3.684 nm y se observó un brusco descenso del mismo hasta los 60 °C, donde se estabilizó en valores cercanos a 1.300 nm (Fig. I.12.B).

Por lo tanto, para ambos sistemas AF/proteína a pH 3, el aumento de la temperatura se tradujo en una disminución del tamaño de partícula, lo cual podría ser atribuido a una disminución de las interacciones electrostáticas con el calentamiento, debido a la naturaleza exotérmica de este tipo de uniones.

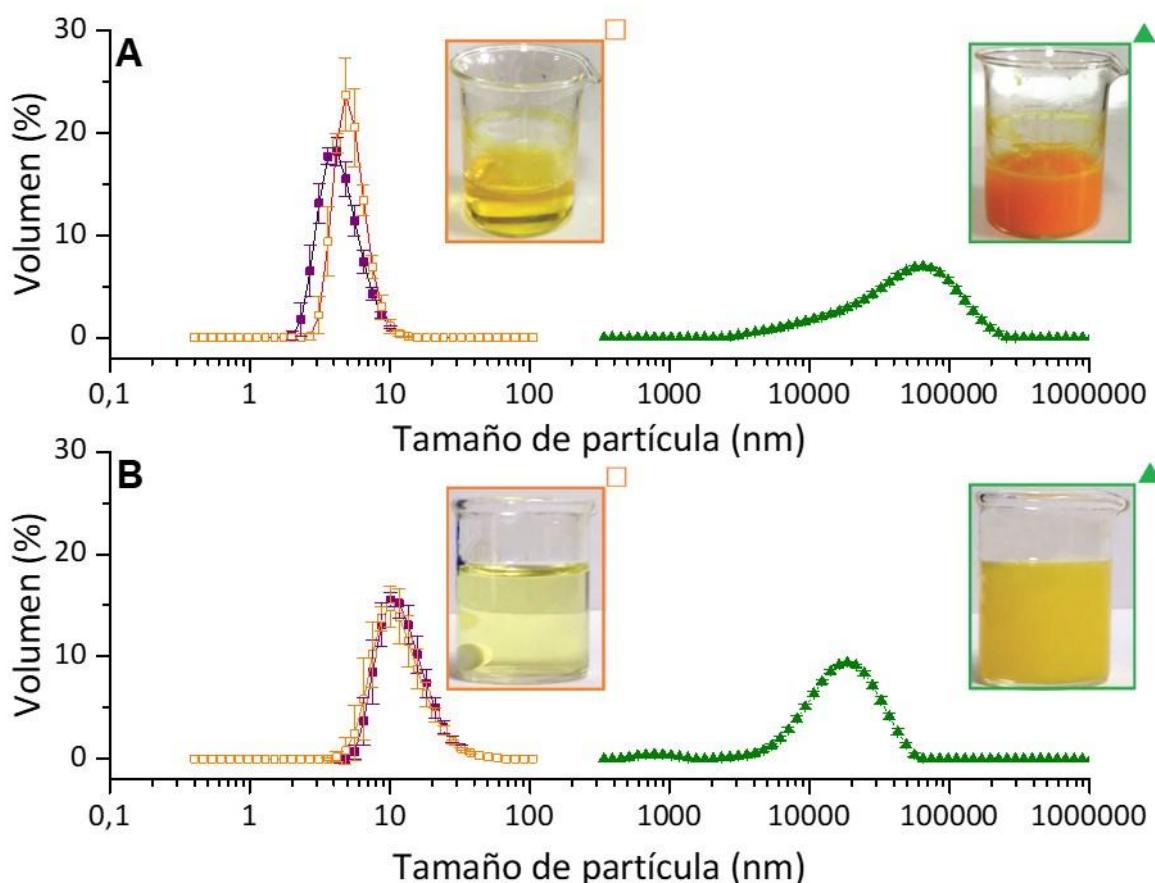


**Figura I.12.** Tamaño promedio de partículas de AF/proteína a pH 3 en función de la temperatura. A:  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,025% ( $\triangle$ ) en comparación con  $\beta$ -Ig 5% ( $\blacktriangle$ ); B: Gelatina 0,5% - AF 0,0025% ( $\square$ ) en comparación con gelatina 0,5% ( $\blacksquare$ ).

#### I.4. Reversibilidad frente al cambio de pH de partículas AF/proteína

Dado que las partículas se forman a un pH ácido (3) pero podrían ser utilizadas en productos que tengan un pH diferente resulta de importancia conocer cómo las variaciones de pH afectan a las partículas formadas. También estos estudios son relevantes a la hora de evaluar el comportamiento en condiciones de la digestión gastroduodenal, que incluyen el paso por la boca, el estómago (pH ácido) y el duodeno (pH neutro). Para este fin se ajustó a 7 el pH de las partículas de  $\beta$ -Ig de 33  $\mu\text{m}$  formadas a pH 3 ( $\beta$ -Ig 5% - AF 0,625%). En este ensayo se eligieron elevadas relaciones molares para ambas proteínas de modo que las diferencias entre los tamaños obtenidos a los distintos pHs fueran más evidentes, de manera que se facilite su medición en los equipos utilizados. La Figura I.13. muestra la apariencia visual de las soluciones que son turbias a pH 3 y se tornan transparentes a pH 7, indicando que los agregados formados a pH 3 revierten al aumentar el pH. Esta reversibilidad se corrobora analizando la distribución de tamaño de partícula, que resultó similar a la que tenía inicialmente la solución a pH 7, previo a la agregación (Fig. I.13.A).

De modo análogo, se ajustaron a pH 7 las partículas de AF/G de 10  $\mu\text{m}$  formadas a pH 3 (G 0,5% - AF 0,125%) y las distribuciones de tamaño de partícula fueron coincidentes con las distribuciones originales a pH 7, antes de la agregación por AF (Fig. I.13.B).



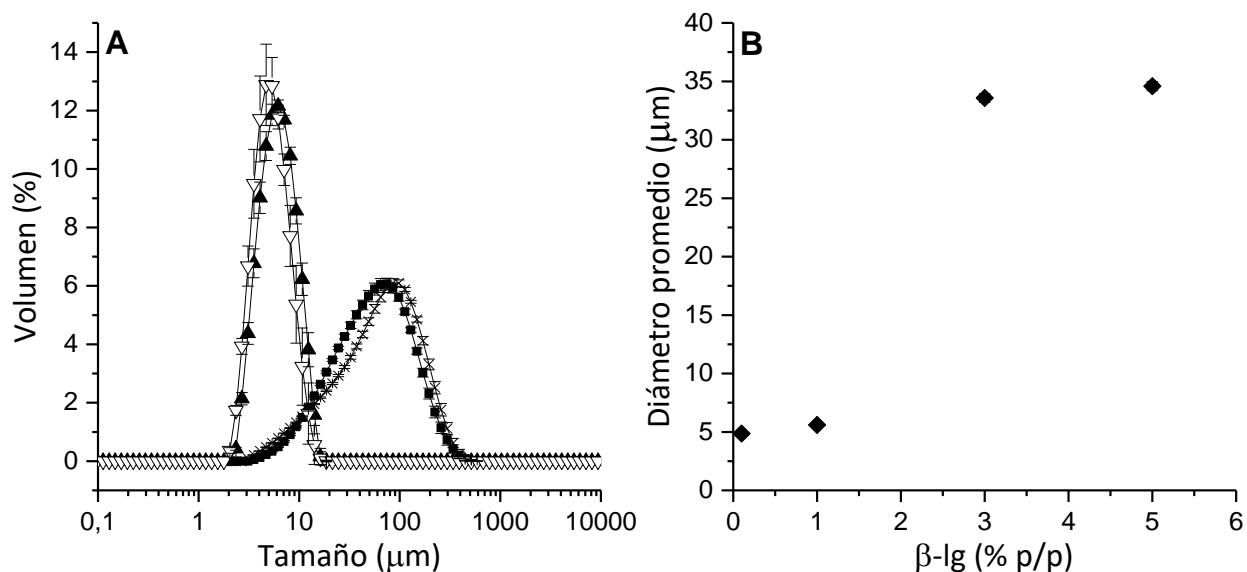
**Figura I.13.** Distribución de tamaño de partícula en volumen y apariencia visual de las soluciones de (A)  $\beta$ -Ig 5% - AF 0,625%, (B) Gelatina 0,5% - AF 0,125%. Con cambio de pH de 7 (■) a 3 (▲) y luego a 7 nuevamente (□).

La reversibilidad ante el cambio de pH de los agregados proteína/AF verifican el carácter iónico de la interacción entre las proteínas y el AF. La interacción sería reversible debido a la reversibilidad en el estado de ionización de los residuos de aminoácidos clave (lisina, histidina, arginina).

### I.5. Modificación del tamaño de partícula de los agregados formados

El tamaño de partícula de los agregados de AF/proteína es muy importante para la aplicación práctica de estas partículas como *carriers* de AF en alimentos, ya que, si las partículas son muy grandes, podrían aportar turbidez o también flocular y/o precipitar. Por lo tanto, se investigó si la disminución de la concentración total en las mezclas  $\beta$ -Ig + AF a pH 3, manteniendo la máxima

relación molar estudiada ( $AF/\beta\text{-Ig} = 10$ ), podría resultar en partículas de menor tamaño. La Figura I.14.A muestra la distribución del tamaño de partícula de cuatro sistemas, resultando monomodales y menos polidispersos aquellos correspondientes a  $\beta\text{-Ig} 0,1$  y 1%, con tamaños cercanos a los  $5 \mu\text{m}$ . Este rango podría resultar de utilidad para la aplicación de estas partículas como vehículos de AF en alimentos. La Figura I.14.B muestra que la disminución de la concentración de  $\beta\text{-Ig}$  conlleva a una disminución del tamaño promedio de partículas, constituyendo una herramienta para el control de este parámetro.



**Figura I.14.** A: Distribución de tamaño de partícula en volumen de mezclas AF/ $\beta\text{-Ig}$  pH 3 con relación molar constante = 10.  $\beta\text{-Ig } 5\% - \text{AF } 1,25\%$  (■),  $\beta\text{-Ig } 3\% - \text{AF } 0,75\%$  (×),  $\beta\text{-Ig } 1\% - \text{AF } 0,25\%$  (▲),  $\beta\text{-Ig } 0,1\% - \text{AF } 0,025\%$  (▽). B: Diámetro promedio de las mismas soluciones.

Sin embargo, desde un punto de vista industrial, no es usual trabajar con concentraciones totales tan bajas. En este contexto, se investigó la aplicación de ultrasonido de alta intensidad (USAI) como herramienta para modificar el tamaño de los agregados AF/proteína. La aplicación de USAI ha resultado efectiva para controlar el tamaño de partícula promoviendo, en general, su reducción en sistemas proteicos. Arzeni y col (2015b) reportaron que la aplicación de USAI

sobre soluciones de clara de huevo a una concentración 5% p/p a pH 3 causó una gran reducción del tamaño de partícula luego de 5 min de procesamiento, que continuó disminuyendo hasta los 20 min de sonicación, aunque a una tasa menor. La distribución de tamaño de partícula obtenida en estas condiciones (frecuencia de 20 kHz y amplitud de 20%) fue monomodal, siendo el sistema de partida, polidisperso. En la Tabla I.2. se muestra que, en efecto, el diámetro promedio de las partículas generadas por la interacción del AF con la  $\beta$ -Ig a pH 3, es reducido por el tratamiento con USAI, siendo el grado de reducción dependiente del tamaño inicial. El tamaño promedio inicial ( $D_o$ ) de las partículas en el rango submicrónico fue reducido entre 3 y 10 veces por la aplicación de USAI. Sin embargo, para las partículas de AF/  $\beta$ -Ig de mayor tamaño, entre 25 y 33  $\mu\text{m}$ , la máxima reducción alcanzada fue de 50%. Del mismo modo, Gordon y Pilosof (2010) encontraron que el tamaño de partícula de soluciones de un aislado proteico de suero (WPI) al 7,5% p/p disminuyó bajo los efectos del ultrasonido aplicado a temperatura ambiente y que esta reducción fue mayor durante los primeros 2 min de sonicación, de 0,73 a 0,36  $\mu\text{m}$ .

**Tabla I.2.** Diámetro promedio de partículas de  $\beta$ -Ig (5% p/p) a concentraciones crecientes de AF, antes ( $D_o$ ) y después de la aplicación de USAI ( $D_{US}$ ), pH 3.

AF (% p/p)	$D_o$ ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	$D_{US}$ ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>
0,025	$0,095 \pm 0,001^a$	$0,070 \pm 0,001^a$
0,050	$0,393 \pm 0,169^a$	$0,113 \pm 0,021^a$
0,100	$2,370 \pm 0,765^b$	$0,254 \pm 0,067^a$
0,500	$33,054 \pm 2,477^g$	$17,481 \pm 2,955^c$
0,625	$33,553 \pm 3,081^g$	$20,473 \pm 5,032^d$
1,25	$28,644 \pm 4,588^f$	$26,204 \pm 1,568^e$

<sup>1</sup>Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

En general, las partículas de mayor tamaño son más propensas a ser atacadas por la energía de cavitación, mientras que las partículas pequeñas tienen tiempos de relajación menores y, por lo tanto, pueden disipar el estrés impuesto por la sonicación más fácilmente (Tsaih y Chen 2003). Sin embargo, en este caso, debido

a la alta viscosidad de los sistemas constituidos por las partículas de mayor tamaño, el tratamiento con USAI sería menos efectivo. A mayor viscosidad, mayor es el umbral de intensidad del ultrasonido para el inicio de la cavitación (Behrend et al. 2000).

## **I.6. Conclusiones**

Tanto la  $\beta$ -lactoglobulina como la gelatina fueron capaces de unir AF mediante interacciones iónicas a pH ácido (3) formando partículas de tamaños crecientes conforme el incremento de la relación molar AF/proteína. Cabe destacar que las partículas de AF/proteínas formadas resultaron reversibles al cambio de pH, siendo esta característica favorable para protección del AF al pH ácido del estómago y la posterior liberación del mismo en el duodeno (pH 7).

Asimismo, se verificó la factibilidad de modificar el tamaño de las partículas de AF/proteína mediante la variación de la concentración total proteica o a través de la aplicación de ultrasonido de alta intensidad, resultando esta última, la vía más apropiada para controlar el tamaño de las partículas.

## I.7. Referencias

- Arzeni, C., Pérez, O. E., LeBlanc, J. G., & Pilosof, A. M. R. (2015). Egg albumin–folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 18, Part A, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.018>
- Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2015). Power Ultrasound Assisted Design of Egg Albumin Nanoparticles. *Food Biophysics*, 10(4), 439–446. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9407-2>
- Behrend, O., Ax, K., & Schubert, H. (2000). Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 7(2), 77–85. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(99\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(99)00029-2)
- Bourassa, P., Hasni, I., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry*, 129(3), 1148–1155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.094>
- Bourassa, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2012). Locating the Binding Sites of Folic Acid with Milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -Caseins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(1), 513–519. <https://doi.org/10.1021/jp2083677>
- Bromley, E. H., Krebs, M. R. H., & Donald, A. M. (2005). Aggregation across the length-scales in beta-lactoglobulin. *Faraday Discussions*, 128, 13–27.
- Das, K. P., & Kinsella, J. E. (1989). PH DEPENDENT EMULSIFYING PROPERTIES OF B-LACTOGLOBULIN. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 10(1), 77–102. <https://doi.org/10.1080/01932698908943160>
- Firoozmand, H., Murray, B. S., & Dickinson, E. (2012). Microstructure and elastic modulus of mixed gels of gelatin+oxidized starch: Effect of pH. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.007>
- Gordon, L., & Pilosof, A. M. R. (2010). Application of High-Intensity Ultrasounds to Control the Size of Whey Proteins Particles. *Food Biophysics*, 5(3), 203–210. <https://doi.org/10.1007/s11483-010-9161-4>
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.005>

- Jha, N. S., & Kishore, N. (2011). Thermodynamic studies on the interaction of folic acid with bovine serum albumin. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43(5), 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2010.12.024>
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2004). Whey proteins. *Proteins in Food Processing*, 72–99. <https://doi.org/10.1533/9781855738379.1.72>
- Liang, L., & Subirade, M. (2010).  $\beta$ -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological Implication. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(19), 6707–6712. <https://doi.org/10.1021/jp101096r>
- Liang, L., Zhang, J., Zhou, P., & Subirade, M. (2013). Protective effect of ligand-binding proteins against folic acid loss due to photodecomposition. *Food Chemistry*, 141(2), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.044>
- Martinez, M. J., & Pilosof, A. M. R. (2018). On the relationship between pH-dependent  $\beta$ -lactoglobulin self-assembly and gelation dynamics. *International Food Research Journal*, 25(2), 676–683.
- Peñalva, R., Esparza, I., Agüeros, M., Gonzalez-Navarro, C. J., Gonzalez-Ferrero, C., & Irache, J. M. (2015). Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, 44, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.004>
- Peñalva, R., Esparza, I., González-Navarro, C. J., Quincoces, G., Peñuelas, I., & Irache, J. M. (2015). Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, Part B, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.06.012>
- Pérez, O. E., David-Birman, T., Kesselman, E., Levi-Tal, S., & Lesmes, U. (2014). Milk protein–vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on in vitro gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids*, 38, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.010>
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). From Collagen to Gelatine. In *Gelatine Handbook* (pp. 45–117). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527610969.ch2>
- Stevanović, M., Radulović, A., Jordović, B., & Uskoković, D. (2008). Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid.

- Journal of Biomedical Nanotechnology, 4(3), 349–358.  
<https://doi.org/10.1166/jbn.2008.321>
- Tavares GM, Croguennec T, Lê S, Lerideau O, Hamon P, Carvalho AF, Bouhallab S. 2015. Binding of Folic Acid Induces Specific Self-Aggregation of Lactoferrin: Thermodynamic Characterization. *Langmuir* 31:12481-12488.
- Tsaih, M. L., & Chen, R. H. (2003). Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 90(13), 3526–3531. <https://doi.org/10.1002/app.13027>
- Uhrínová, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrín, D., Sawyer, L., & Barlow, P. N. (2000). Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the  $\beta$ -Lactoglobulin Dimer,  $\ddagger$ . *Biochemistry*, 39(13), 3565–3574. <https://doi.org/10.1021/bi992629o>
- Wu, Z., Li, X., Hou, C., & Qian, Y. (2010). Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(9), 3958–3961. <https://doi.org/10.1021/je1000268>
- Zhang, A., & Jia, L. (2006). Spectroscopic Study of the Interaction Between Folic Acid and Bovine Serum Albumin. *Spectroscopy Letters*, 39(4), 285–298. <https://doi.org/10.1080/00387010600779112>

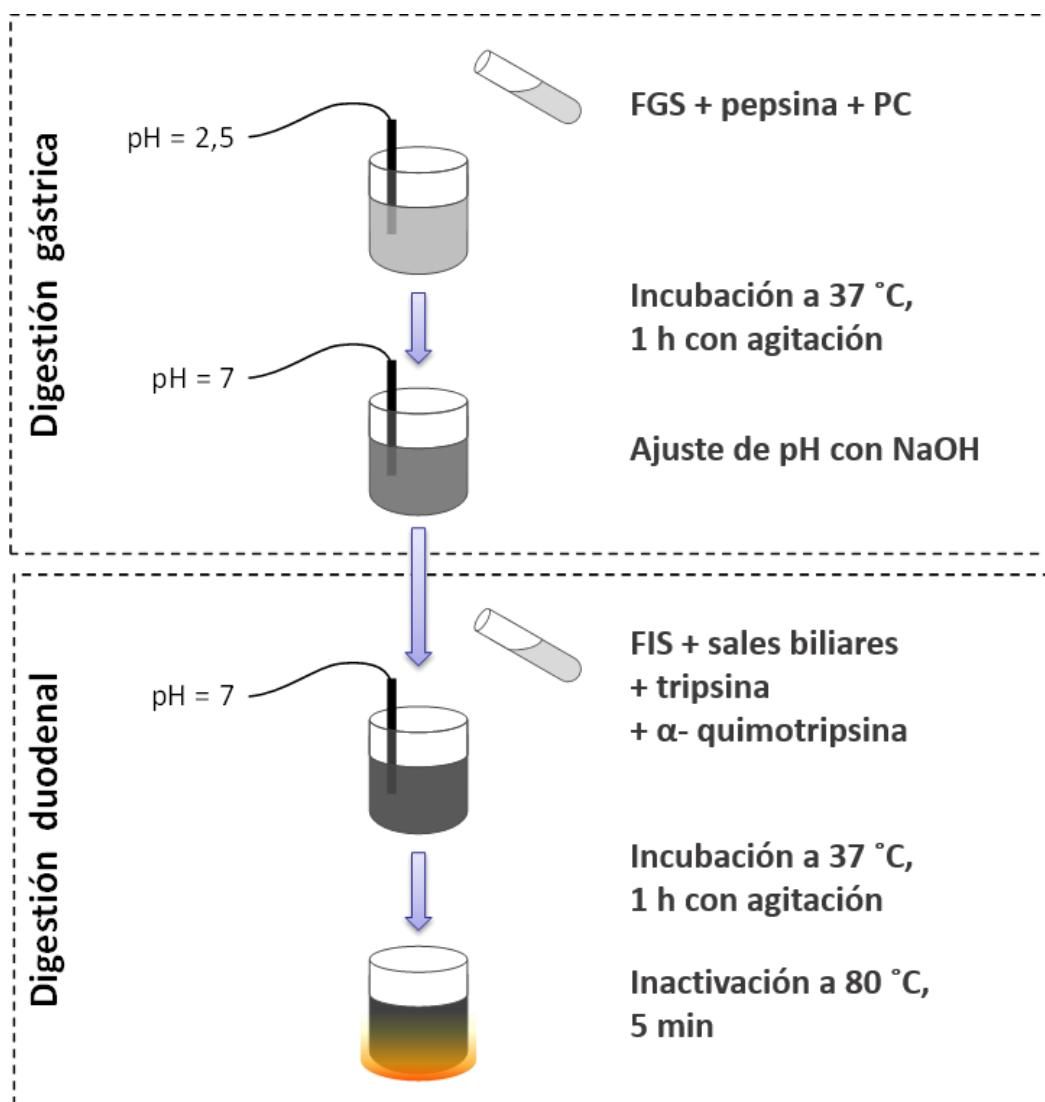
## **Capítulo II**

## II.1. Estudio de la bioaccesibilidad *in vitro* del ácido fólico

La interacción de las partículas de proteína con AF inherente a la formación de los nano/micro *carriers* proteicos podría modificar la biodisponibilidad de esta vitamina. El término biodisponibilidad incluye la digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución en los tejidos y bioactividad, y representa la fracción de un determinado nutriente que es utilizado por el organismo (Galanakis 2017). Considerando la reversibilidad de la interacción proteína/AF frente a los cambios de pH, resulta importante estudiar qué ocurre durante la digestión gastrointestinal, donde el alimento es sometido a este tipo de variaciones. Luego de la digestión parcial en la cavidad oral, el alimento pasa por un proceso de disolución en el estómago en condiciones ácidas (pH ~ 1 a 2), donde la pepsina degrada las proteínas. A medida que el alimento parcialmente digerido, o *quimo*, abandona el estómago y entra al duodeno, se mezcla con las sales biliares, que emulsifican las grasas y otros compuestos hidrofóbicos presentes en la suspensión. También se libera en el duodeno una solución de bicarbonato que contiene enzimas (tripsina, entre otras), lo que eleva el pH de la solución a 6-7. Luego, la suspensión ingresa a la parte más larga del intestino delgado, en donde reside por alrededor de 3 a 5 h antes de pasar al intestino grueso y continuar con el proceso de digestión (Arzeni 2014). Teniendo en cuenta estos procesos, resulta necesario elucidar si la bioaccesibilidad del AF se ve afectada por su interacción con los *carriers* proteicos. La bioaccesibilidad se define como la fracción de una determinada cantidad de folato que es liberada de la matriz del alimento y está disponible para ser absorbida en el intestino (Benito y Miller 1998). Es un parámetro fundamental a tener en cuenta en el diseño de alimentos funcionales, para los cuales no es suficiente declarar que el producto contiene la cantidad de bioactivo, sino que se debe verificar que el nutriente o componente bioactivo está, efectivamente, disponible para el organismo (Fernández-García et al. 2009).

Para evaluar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de nutrientes existen métodos *in vivo* e *in vitro*. Los primeros se realizan sobre seres vivos (utilizando animales o incluso humanos) y proveen información más real de la digestión de un alimento. Sin embargo, los resultados que se obtienen con estos son más difíciles de interpretar (ya que varían con la edad, sexo y estado de salud), requieren de mucho tiempo y son muy costosos, además de verse alcanzados por numerosas implicaciones bioéticas (Kong y Singh 2008). Por este motivo, la utilización de modelos de digestión *in vitro* resulta una alternativa simple, menos costosa y reproducible para simular el proceso de digestión de un alimento (Minekus et al. 2014). Los métodos para determinar bioaccesibilidad *in vitro* son útiles para estimar si las interacciones entre los nutrientes y los componentes de los alimentos, los factores del lumen (pH y enzimas), las prácticas de preparación y procesamiento de alimentos y la naturaleza de la matriz alimentaria pueden afectar la capacidad de determinado nutriente para ser absorbido. Y es por ello que, aunque los procesos biológicos *in vivo* e *in vitro* pueden ser muy diferentes, las investigaciones *in vitro* pueden proveer alguna evidencia preliminar de las ventajas del uso de *carriers* proteicos, entre otros.

En el presente trabajo, se utilizó un modelo *in vitro* para simular la digestión gastroduodenal de las partículas de proteína/AF cuyo protocolo se resume en la Figura II.1., a fin de evaluar la bioaccesibilidad del AF unido a los *carriers* proteicos. No se incluyó la etapa oral debido a que las proteínas analizadas no sufren una modificación significativa en esta etapa (Sousa et al. 2020). La bioaccesibilidad se evaluó como el AF presente en el fluido duodenal, determinado por HPLC-RP. En el humano, el intestino delgado en toda su extensión es capaz de absorber AF, sin embargo, ésta es mayor en la zona proximal del yeyuno (Said et al. 2000; Ball 2005; Milman 2012; Visentin et al. 2014).

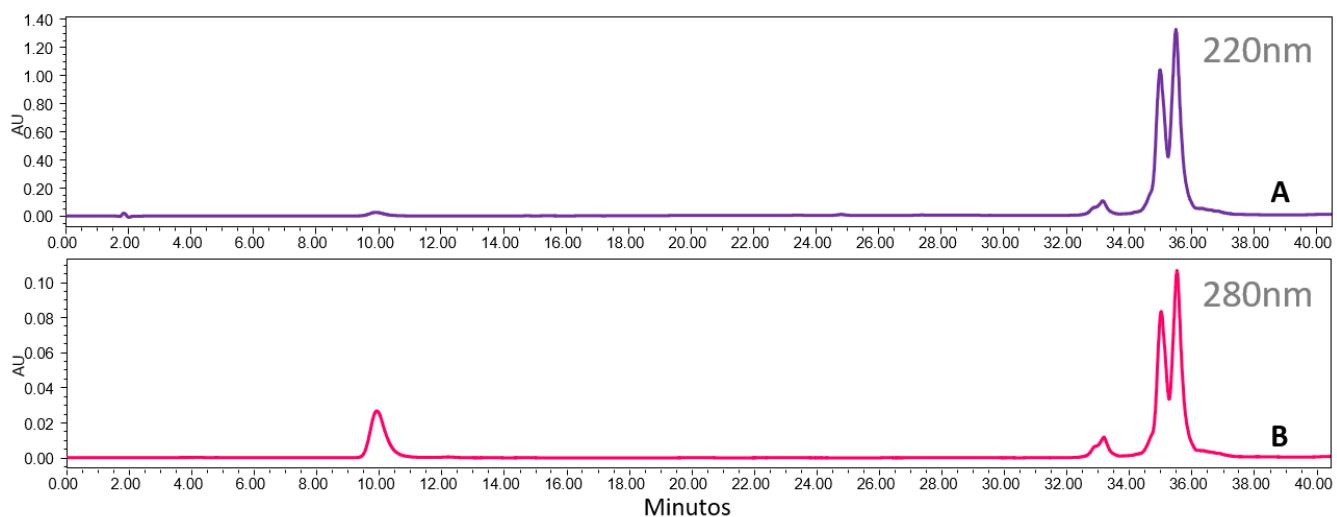


**Figura II.1.** Esquema de digestión gastroduodenal *in vitro*.

## II.2. Determinación por HPLC de ácido fólico luego de la digestión gastroduodenal

Para los ensayos de digestión gastroduodenal simulada se utilizaron los sistemas con la menor relación en peso AF/proteína (0,005), con 2,5% p/p de  $\beta$ -Ig o gelatina y 0,0125% de AF, a pH 3. También se realizaron las digestiones *in vitro* del AF puro y de cada proteína a igual concentración y pH. La evaluación sobre las proteínas puras se realizó para determinar si las proteínas presentan un patrón de digestión distinto al estar interaccionando con el AF.

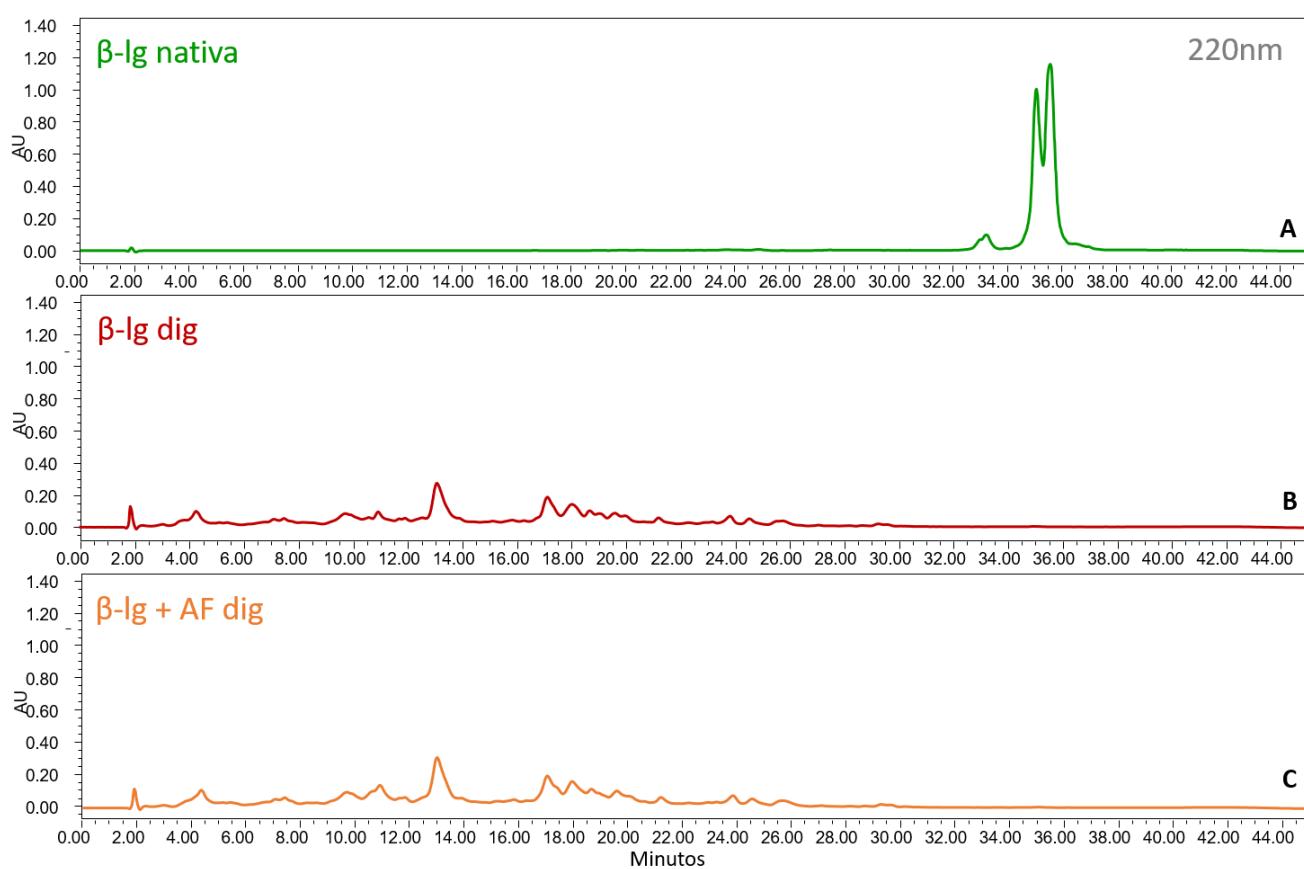
Para la detección de proteínas y péptidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es frecuente la utilización de longitudes de onda entre 210 y 220 nm, específicas del enlace peptídico, o a 280 nm, que corresponde a los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina (Aguilar 2006). Se ha reportado en numerosas publicaciones que el AF muestra un pico de absorción a 280 nm (Off et al. 2005; Qu et al. 2010; Aceituno-Medina et al. 2015; Rathinaraj et al. 2015; Chaudhary et al. 2018). Por lo tanto, en el presente trabajo, se utilizaron dos longitudes de onda para la detección: 220 nm para registrar los picos de proteínas y péptidos y 280 nm para el AF.



**Figura II.2.** Cromatogramas de HPLC-RP de micropartículas de  $\beta$ -Ig + AF (0,5%/0,0025%) pH 3 a 220 nm (A) y a 280 nm (B)

En la Figura II.2. se muestra, a modo de ejemplo, el chromatograma obtenido a 220 nm (A) de una solución de micropartículas de  $\beta$ -Ig + AF con una concentración de 0,5% de proteína y 0,0025% de vitamina. En él se observan dos picos principales correspondientes a las variantes genéticas A y B de la  $\beta$ -Ig, las cuales eluyen a un tiempo de retención entre 34 y 36 min y otro pico más pequeño correspondiente a la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -lac) (Martinez et al. 2016), a un tiempo de retención de 33 min. Esta proteína del suero lácteo constituye una impureza del aislado de  $\beta$ -Ig utilizado. Asimismo, se puede observar, a los 10 min, un pico muy pequeño que

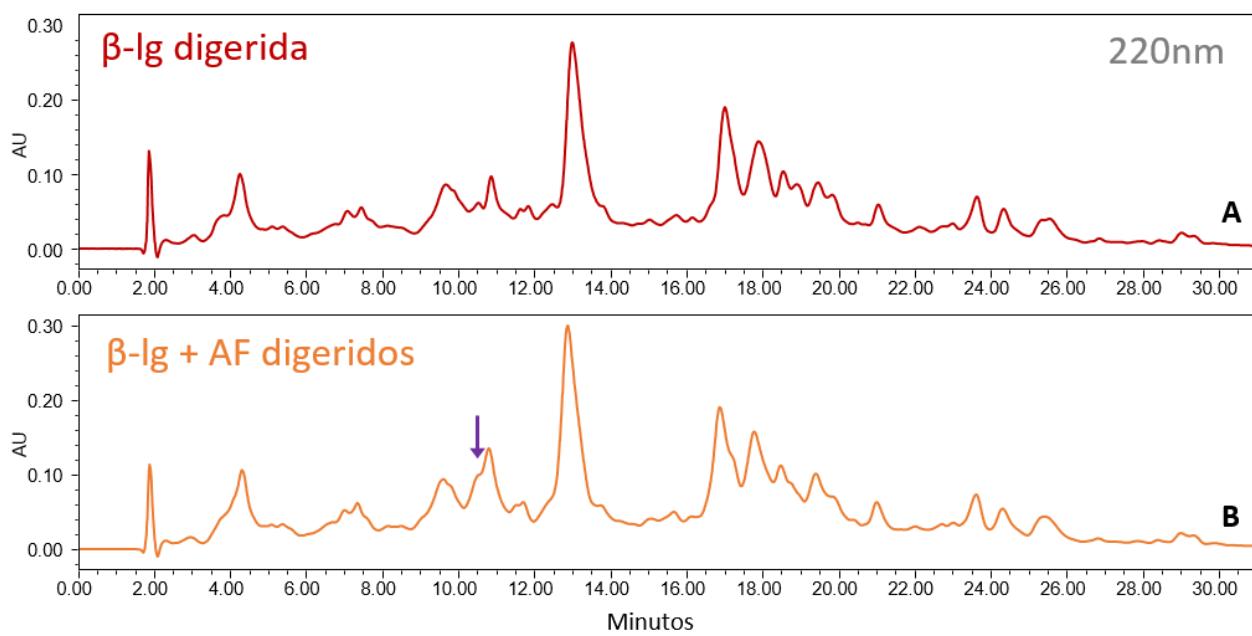
corresponde al AF, y que se advierte con mayor intensidad cuando el cromatograma se obtiene a 280 nm (Figura II.2.B).



**Figura II.3.** Cromatogramas de HPLC-RP a 220 nm de  $\beta$ -Ig nativa (A) y los productos de digestión *in vitro* de  $\beta$ -Ig (B) y  $\beta$ -Ig + AF (C).

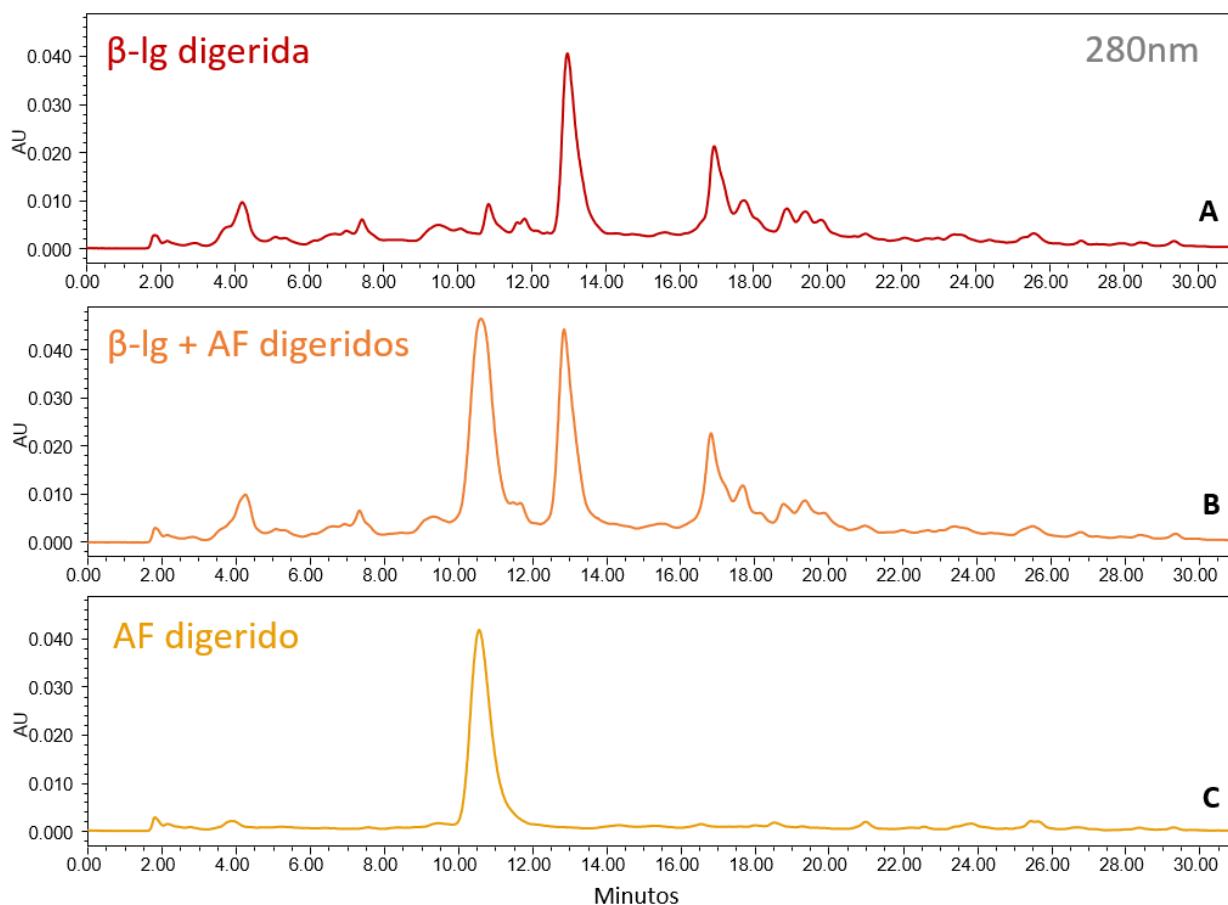
En la Figura II.3. se observan los cromatogramas obtenidos a 220 nm correspondientes a la  $\beta$ -Ig nativa (A), y a los productos obtenidos luego del proceso de digestión *in vitro* de  $\beta$ -Ig (B) y  $\beta$ -Ig + AF (C). Todas las muestras fueron diluidas de modo de obtener la misma concentración de proteína/AF (0,5% / 0,0025%), para poder realizar comparaciones entre las alturas y áreas de picos. La solución de  $\beta$ -Ig nativa muestra, tal como se describió previamente, los picos principales correspondientes a las variantes genéticas A y B, entre los 34 y 36 min y el pico más pequeño correspondiente a la  $\alpha$ -lac, a los 33 min. En la Figura II.3.B se observan los productos de la digestión gastroduodenal *in vitro* de la proteína. La desaparición de los picos característicos de la  $\beta$ -Ig, entre los 34 y 36 min (Fig.

II.3.A) indica que la proteína se ha digerido por completo. Lo mismo se ha reportado en trabajos anteriores en los que se analizó la digestibilidad *in vitro* de esta proteína mediante HPLC y electroforesis en gel de poliacrilamida y se observó que, a los 30 min de la etapa duodenal ya no se detecta proteína intacta (Mandalari et al. 2009; Martinez et al. 2016). En la Figura II.3.C se puede observar una digestión completa de la proteína cuando ésta interacciona con AF (pH 3).



**Figura II.4.** Acercamiento a los cromatogramas de HPLC-RP a 220 nm de  $\beta$ -Ig (A) y  $\beta$ -Ig + AF (B) sometidos a digestión *in vitro*.

La Figura II.4. muestra un acercamiento del chromatograma obtenido a 220 nm de la  $\beta$ -Ig sola (A) y la mezcla  $\beta$ -Ig + AF (B) luego de la digestión gastroduodenal *in vitro*, con el objetivo de observar más en detalle el perfil de los péptidos obtenidos. Los perfiles observados para la proteína pura y para la  $\beta$ -Ig + AF sólo se diferencian por la presencia del AF, que eluye a un tiempo de retención de 10,5 min (marcado con una flecha en la Fig. II.4.B), y tal como se explicó anteriormente, se observará mejor a 280 nm (Figura II.5.). De esta forma, se puede concluir que la presencia de la vitamina no afectaría el perfil de los péptidos obtenidos luego de la digestión gastroduodenal de la  $\beta$ -Ig.



**Figura II.5.** Cromatogramas de HPLC-RP a 280 nm de  $\beta\text{-Ig}$  (A),  $\beta\text{-Ig} + \text{AF}$  (B) y AF (C) sometidos a digestión *in vitro*.

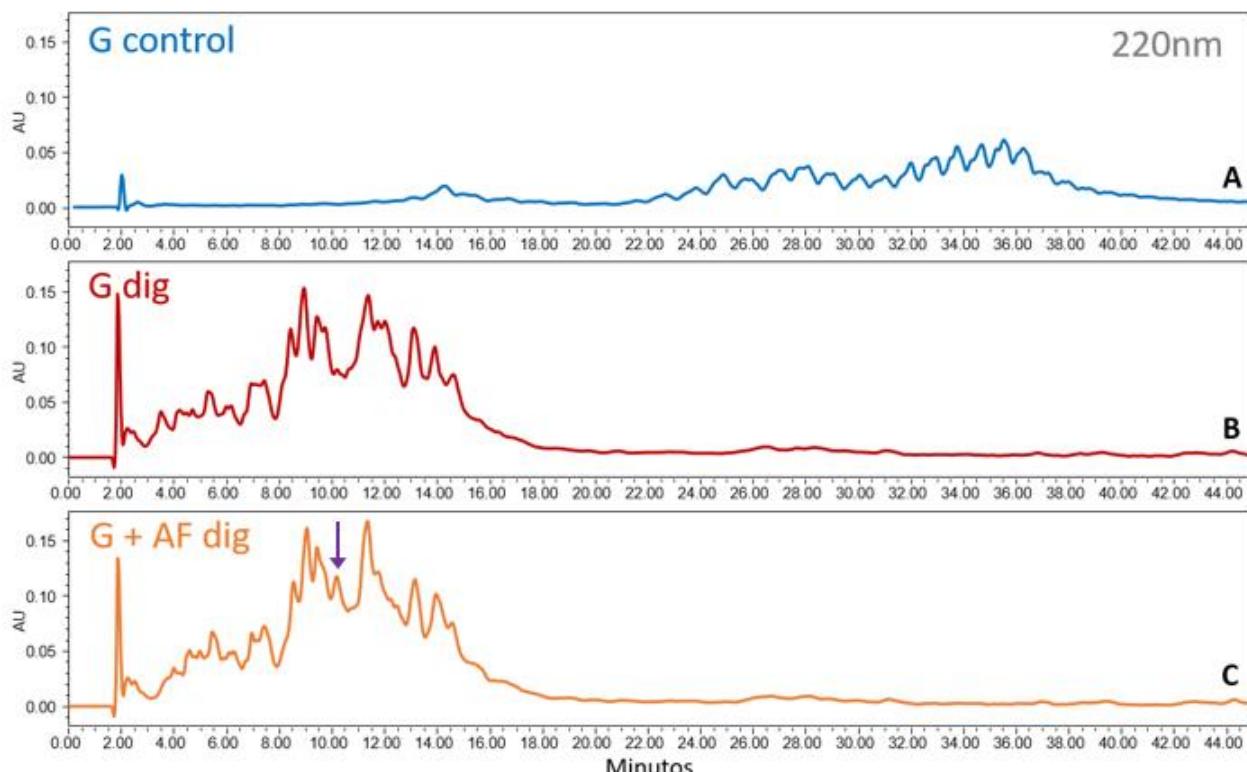
La Figura II.5. muestra los cromatogramas obtenidos a 280 nm para la  $\beta\text{-Ig}$  pura, la mezcla  $\beta\text{-Ig} + \text{AF}$  y el AF puro luego de la digestión gastroduodenal *in vitro*, donde se puede observar con mayor intensidad el pico correspondiente al AF, a un tiempo de retención de 10,5 min. Luego de la digestión gastroduodenal *in vitro*, el área del pico del sistema mixto (Tabla II.1.), no guarda diferencias con el correspondiente al AF puro, lo cual indicaría que la vitamina fue liberada del *carrier* proteico durante el proceso digestivo y se encontraría bioaccesible en el sitio de absorción.

**Tabla II.1.** Área de pico de AF obtenido de los cromatogramas registrados a 280 nm.

Muestra	Área de pico ( $\mu\text{V} \cdot \text{seg.}10^5$ )
AF	$17,16 \pm 0,10^a$
$\beta\text{-Ig} + \text{AF}$	$16,31 \pm 0,55^a$
$\text{G} + \text{AF}$	$16,28 \pm 0,27^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

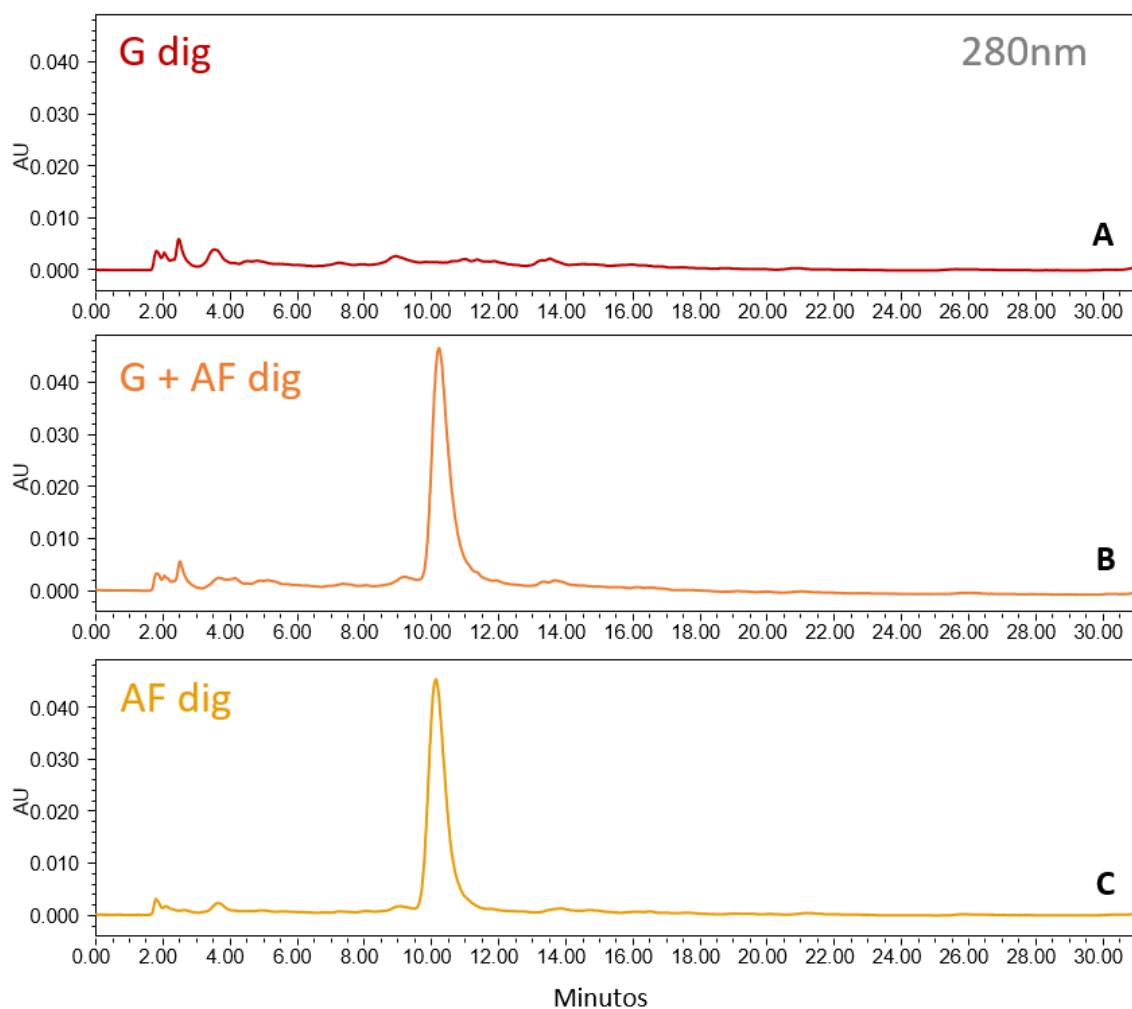
Tal como se describió previamente en el Capítulo I al estudiar la reversibilidad frente al cambio de pH de las partículas AF/proteína, debido al carácter iónico de esta interacción, se observa que, al pH neutro de la digestión en su etapa duodenal, la vitamina se liberaría del complejo formado a pH 3 y estaría disponible para ser absorbido.



**Figura II.6.** Cromatogramas de HPLC-RP a 220 nm de G control (A) y los productos de digestión *in vitro* de G (B) y G + AF (C).

En la Figura II.6. se observan los cromatogramas obtenidos a 220 nm correspondientes a la Gelatina control (A) y a los productos obtenidos luego del proceso de digestión *in vitro* de la misma (B) y del sistema G + AF (C), todos a pH 3. La Figura II.6.A muestra que la gelatina presenta numerosos picos, y la mayor parte de ellos eluyen entre los 22 y los 40 min. Estos corresponderían a los diferentes polipéptidos, con una amplia distribución de pesos moleculares, obtenidos a partir de la hidrólisis del colágeno (Zhang et al. 2008). En la Figura II.6.B se observan los productos de la digestión gastroduodenal *in vitro*, en el cual se verifica que la G se ha digerido por completo, obteniéndose péptidos de menor peso molecular. En la Figura II.6.C también se evidencia la digestión completa de la proteína en el sistema con AF. En ambos casos, la mayoría de los péptidos eluyen entre los 2 y los 18 min, no evidenciándose diferencias entre los perfiles proteicos en presencia y ausencia de AF, a excepción del pico correspondiente a la vitamina, a los 10,5 min (marcado con una flecha en la Fig. II.6.C).

En las Figuras II.7.B y C se observa el pico del AF al tiempo de retención de 10,5 min evaluado a 280 nm, tal como se describió previamente, correspondiente al sistema con G y al AF puro. De forma similar a lo observado en los sistemas con  $\beta$ -Ig, no se observan diferencias entre las áreas de los picos entre ambos sistemas (Tabla II.1.), lo cual nos indicaría que el AF fue liberado del *carrier* de gelatina y estaría disponible para poder ser absorbido en el intestino.



**Figura II.7.** Cromatogramas de HPLC-RP a 280 nm de G (A), G + AF (B) y AF (C) sometidos a digestión *in vitro*.

Estos resultados guardan similitud con los encontrados por otros autores que investigaron la liberación de AF de *nanocarriers* de clara de huevo luego de la digestión gastroduodenal *in vitro* (Arzeni y Pilosof 2019). En este trabajo no se hallaron diferencias significativas entre las áreas del pico de AF de los *nanocarriers* y del AF puro luego de la digestión gastroduodenal, determinados por HPLC-RP. Por su parte, Peñalva et al. estudiaron la liberación *in vitro* del AF de nanopartículas de caseína (Peñalva et al. 2015a) y de nanopartículas de zeína (Peñalva et al. 2015b). En estos últimos, el estudio de la liberación del bioactivo se realizó primero en fluido gástrico simulado (FGS) y luego en fluido intestinal simulado (FIS). Para ambas nanopartículas, no se detectó AF libre cuando se las

dispersó en FGS (pH 1,2), y si se observó la liberación gradual de un alto porcentaje de la vitamina cuando se las dispersó en FIS (pH 6,8).

Pamunuwa et al. (2020) también estudiaron las propiedades de liberación del AF encapsulado en nanopartículas de alginato y pectina al variar la composición de ambos polímeros en la matriz. Los autores encontraron que todas las formulaciones de nanopartículas estudiadas mostraron una liberación de AF nula o despreciable luego de 6 h a pH ácido (2). Sin embargo, a pH 7,4 se observaron porcentajes acumulativos de liberación de entre 50 y 86%, dependiendo de la composición de las nanopartículas. En base a estos resultados, los autores concluyen que la liberación de AF desde la nanopartícula no es únicamente dependiente del pH del medio sino también de la composición de la matriz. En el presente trabajo, la liberación del AF de los *carriers* no mostró diferencias entre ambas proteínas y fue completa luego de la digestión *in vitro*, por lo tanto, dichos sistemas no representarían un impedimento a la hora de considerar los efectos de la matriz en la liberación del bioactivo en el sitio activo de absorción.

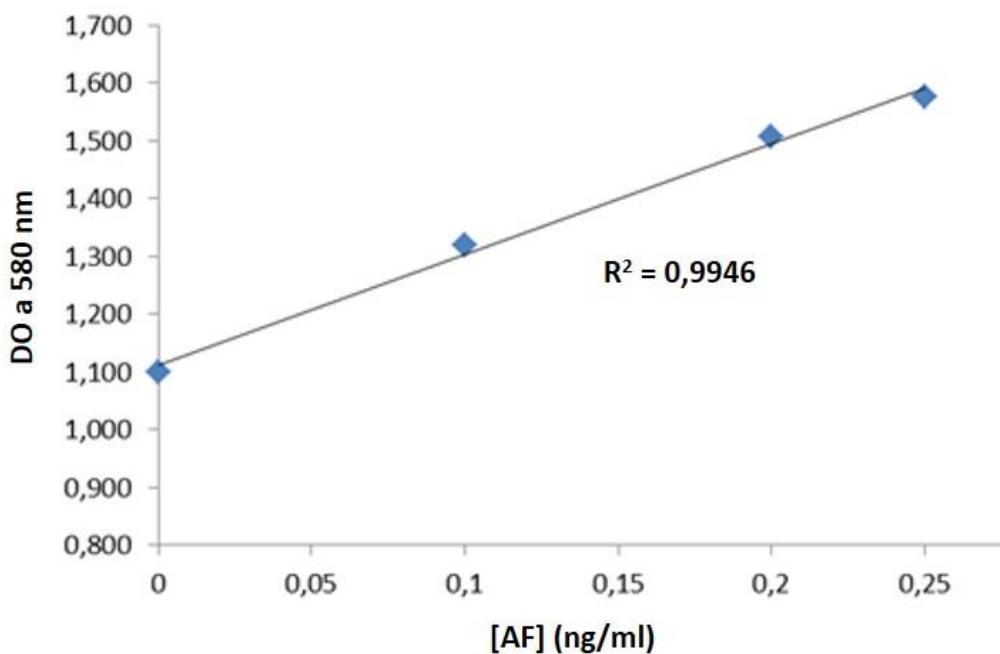
### **II.3. Evaluación de la biodisponibilidad del AF luego de la digestión gastroduodenal *in vitro* en *Lactobacillus rhamnosus***

En el presente trabajo, se utilizó un modelo microbiano para estimar la actividad biológica del AF luego de la digestión gastroduodenal *in vitro* y tener una primera indicación de su potencial biodisponibilidad, que se define como la cantidad ingerida de un nutriente que es absorbida y disponible para funciones fisiológicas (Etcheverry et al. 2012).

Dicho método microbiológico es el oficial aprobado por la “Association of Official Analytical Chemists”, AOAC, que permite valorar el contenido de folatos totales en alimentos (Arcot y Shrestha 2005). El método está basado en el uso de un microorganismo que tiene una respuesta al crecimiento que es folato-dependiente. La bacteria más utilizada es el *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*,

y actúa sobre todos los derivados de folatos encontrados en alimentos (Eitenmiller et al. 2007). A un pH adecuado, el crecimiento de *L. rhamnosus* es igual para todos los folatos mono-, di- y tri-glutamatos aunque no responde ante los ácidos pteroicos, producto común de la degradación de los folatos (Martin 1995). *L. rhamnosus* exhibe un crecimiento no solo en respuesta al folato sino también a los productos del metabolismo de un carbono, y crece en ausencia completa de folato si el medio contiene timidina, purinas, metionina, serina, glicina y pantoténato (Shane y Stokstad 1977). El plasma humano contiene concentraciones significativas de estos compuestos, excepto de timidina. Por esta razón, el medio para *L. rhamnosus* contiene aminoácidos, purinas y pantoténato. Bajo estas condiciones, el crecimiento de *L. rhamnosus* en respuesta al folato se debe al requerimiento del organismo de folato para la síntesis de timidilato (Shane 2011).

Luego del proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*, las muestras se incorporaron al medio de crecimiento manteniendo constante la concentración de AF. Por lo tanto, las diferencias que pudieran encontrarse en el crecimiento del microorganismo estarían relacionadas con una mayor o menor actividad biológica del AF en esas muestras, y esto sería una medida de la mayor o menor biodisponibilidad de la vitamina.



**Figura II.8.** Curva de calibración de crecimiento microbiano (medido por la DO a 580nm) en función de la concentración de AF.

Para el ensayo microbiológico se realizó una curva de calibración de crecimiento microbiano, cuantificado como densidad óptica (DO), en función de la concentración de AF agregado al medio de cultivo (Figura II.8.). Luego, a partir de los datos de DO medidos de los cultivos a los que se le agregaron las distintas muestras digeridas, se calcularon los valores correspondientes de concentración de AF empleando la curva de calibración. Los resultados del ensayo microbiológico se expresan como concentraciones de AF aparente ( $[AF]_{ap}$ ) y estos valores representan las diferencias en el crecimiento microbiano debidas a una mayor o menor actividad biológica del AF en cada muestra.

En la Tabla II.2. se observan los resultados de  $[AF]_{ap}$  obtenidos para el AF, las proteínas puras, y los carriers proteicos, a pH 3, antes y después de la digestión gastroduodenal *in vitro*. En todos los sistemas con AF, la concentración inicial de bioactivo fue de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se realizaron diluciones seriadas para incorporarlos al medio de cultivo. Cuando se incorporaron las proteínas puras digeridas al medio de cultivo, el microorganismo *L. rhamnosus* no evidenció crecimiento. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre la  $[AF]_{ap}$  digerido

puro en comparación con los productos de la digestión de los *carriers* de AF en base a  $\beta$ -Ig y G a pH 3. Esto indicaría que la presencia de las proteínas no afectaría al bioactivo en lo que respecta a su biodisponibilidad para *L. rhamnosus*. Tampoco se evidenciaron diferencias en la  $[AF]_{ap}$  entre los sistemas  $\beta$ -Ig + AF y G + AF control y aquellos que han sido sometidos a la digestión gastroduodenal *in vitro*. En el único caso donde se observan diferencias es en el AF, ya que el valor exhibido por el control es ligeramente superior al del resto de los sistemas.

**Tabla II.2.** Concentración aparente de AF determinada a partir del crecimiento de *L. rhamnosus*.

Muestra	$[AF]_{ap}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
AF	$46,0 \pm 0,3$ <sup>c</sup>
AF dig	$37,1 \pm 0,1$ <sup>b</sup>
$\beta$ -Ig + AF	$40,8 \pm 7,2$ <sup>b,c</sup>
$\beta$ -Ig dig	$0,0 \pm 0,0$ <sup>a</sup>
$\beta$ -Ig + AF dig	$36,6 \pm 0,5$ <sup>b</sup>
G + AF	$39,7 \pm 6,0$ <sup>b,c</sup>
G dig	$0,0 \pm 0,0$ <sup>a</sup>
G + AF dig	$38,0 \pm 1,0$ <sup>b</sup>

Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

En trabajos anteriores (Arzeni et al. 2015), se ha encontrado un efecto sinérgico entre *nanocarriers* de clara de huevo y AF en lo que respecta a la biodisponibilidad de la vitamina para *L. rhamnosus*, hallándose valores de  $[AF]_{ap}$  en los nano complejos digeridos superiores a los de la vitamina pura digerida. Cuando se proporcionó al microorganismo los digeridos de nano complejos, obtenidos mediante ultrasonido y calentamiento, el crecimiento de los mismos fue superior al control en un 180 y un 230 %, dependiendo del método de obtención de los mismos. En el presente trabajo, si bien no se observaron efectos sinérgicos para los *carriers* de  $\beta$ -Ig y G a pH 3, tampoco se encontró una disminución en la

biodisponibilidad para *L. rhamnosus* del AF en los mismos respecto del AF digerido, por lo tanto, el hecho de encontrarse interaccionando con las proteínas no afectaría su actividad biológica.

#### II.4. Conclusiones

La liberación del AF de los *carriers* de  $\beta$ -lactoglobulina y gelatina, verificado por HPLC-RP, sería un indicador de la bioaccesibilidad del bioactivo en el sitio de absorción. Además, los productos de la digestión gastroduodenal *in vitro* de los *carriers* de  $\beta$ -lactoglobulina y gelatina, evidenciaron ser biodisponibles para *L. rhamnosus*. Esto indica que el AF conservaría su actividad biológica durante el proceso de digestión y la presencia de las proteínas no afectaría al bioactivo en lo que respecta a su biodisponibilidad para *L. rhamnosus*.

## II.5. Referencias

- Aceituno-Medina M, Mendoza S, Lagaron JM, López-Rubio A. 2015. Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate – Pullulan electrospun fibers. *LWT - Food Science and Technology* 62:970-975.
- Aguilar M-I. 2006. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in Peptide and Protein Analysis. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. American Cancer Society. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470027318.a1631>
- Arcot J, Shrestha A. 2005. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 16:253-266.
- Arzeni C. 2014. Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico. Available from: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsdl-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis\\_5480\\_Arzeni](http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsdl-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_5480_Arzeni)
- Arzeni C, Pérez OE, LeBlanc JG, Pilosof AMR. 2015. Egg albumin–folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *Journal of Functional Foods* 18, Part A:379-386.
- Arzeni C, Pilosof AMR. 2019. Bioaccessibility of folic acid in egg white nanocarriers and protein digestion profile in solution and in emulsion. *LWT* 111:470-477.
- Ball GFM. 2005. Folate. En: *Vitamins In Foods*. Taylor & Francis Group. p 231-273. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/>
- Benito P, Miller D. 1998. Iron absorption and bioavailability: An updated review. *Nutrition Research* 18:581-603.
- Chaudhary A, Rindhe M, Bhusari S. 2018. Development and validation of UV-visible spectrometry method for water soluble vitamin Folic acid in pellet formulation. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3:107-110.
- Eitenmiller RR, Ye L, Landen Jr. WO. 2007. Folate and folic acid. En: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences* (2nd ed.). CRC Press. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781420009750/vitamin-analysis-health-food-sciences>

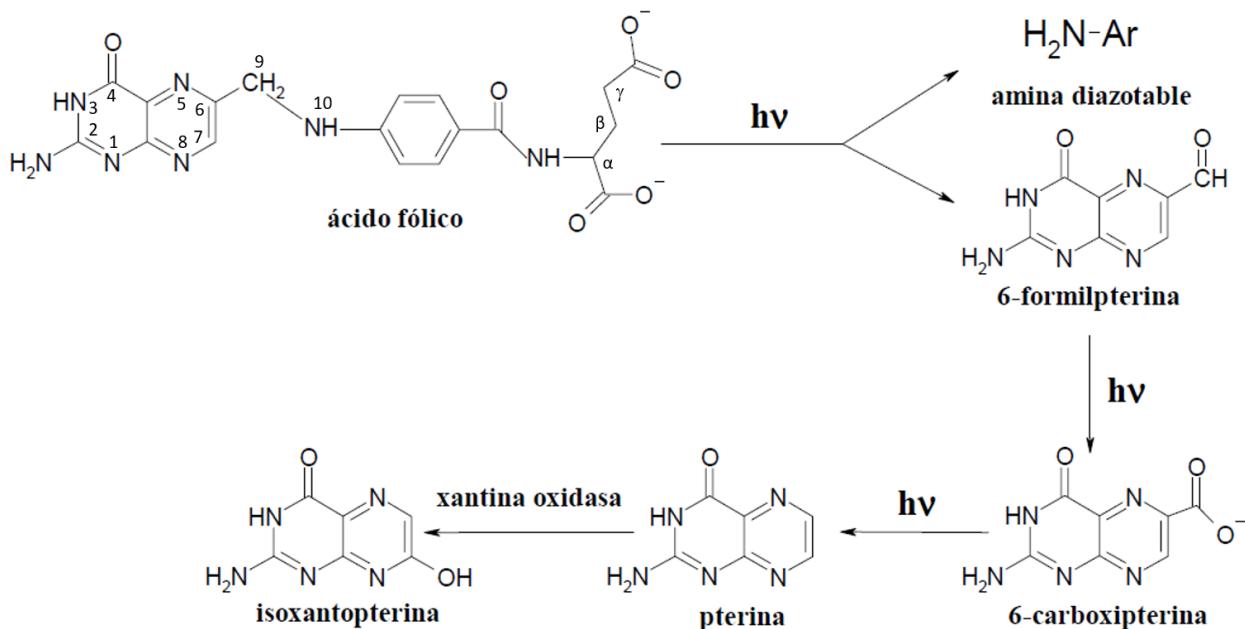
- Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE. 2012. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Front Physiol* [Internet] 3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3429087/>
- Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Pérez-Gálvez A. 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research* 29:751-760.
- Galanakis CM. 2017. Chapter 1 - Introduction. En: Galanakis CM, editor. *Nutraceutical and Functional Food Components*. Academic Press. p 1-14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128052570000016>
- Kong F, Singh RP. 2008. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science* 73:R67-R80.
- Mandalari G, Adel-Patient K, Barkholt V, Baro C, Bennett L, Bublin M, Gaier S, Graser G, Ladics GS, et al. 2009. In vitro digestibility of  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55:372-381.
- Martin CA. 1995. Folate analysis in foods How accurate is it? *Nutrition Bulletin* 20:8-15.
- Martinez MJ, Martos G, Molina E, Pilosof AMR. 2016. Reduced  $\beta$ -lactoglobulin IgE binding upon in vitro digestion as a result of the interaction of the protein with casein glycomacropeptide. *Food Chemistry* 192:943-949.
- Milman N. 2012. Intestinal absorption of folic acid - new physiologic & molecular aspects. *Indian J Med Res* 136:725-728.
- Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, et al. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 5:1113-1124.
- Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC, Juzeniene A, Vorobey A, Johnsson A, Moan J. 2005. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 80:47-55.
- Pamunuwa G, Anjalee N, Kukulewa D, Edirisinghe C, Shakoor F, Karunaratne DN. 2020. Tailoring of release properties of folic acid encapsulated

- nanoparticles via changing alginate and pectin composition in the matrix. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 1:100008.
- Peñalva R, Esparza I, Agüeros M, Gonzalez-Navarro CJ, Gonzalez-Ferrero C, Irache JM. 2015a. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids* 44:399-406.
- Peñalva R, Esparza I, González-Navarro CJ, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. 2015b. Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 30, Part B:450-457.
- Qu X, Yang C, Zhang J, Ding N, Lu Y, Huang L, Xiang G. 2010. In vitro evaluation of a Folate-bovine serum albumin-doxorubicin conjugate. *Journal of Drug Targeting* 18:351-361.
- Rathinaraj P, Lee K, Park S-Y, Kang I-K. 2015. Targeted images of KB cells using folate-conjugated gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 10:5.
- Said HM, Chatterjee N, Haq RU, Subramanian VS, Ortiz A, Matherly LH, Sirotnak FM, Halsted C, Rubin SA. 2000. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279:C1889-C1895.
- Shane B. 2011. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr* 94:337S-342S.
- Shane B, Stokstad ELR. 1977. Rate-limiting Steps in Folate Metabolism by *Lactobacillus casei*. *Journal of General Microbiology* 103:261-270.
- Sousa R, Portmann R, Dubois S, Recio I, Egger L. 2020. Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Research International*:108996.
- Visentin M, Diop-Bove N, Zhao R, Goldman ID. 2014. The Intestinal Absorption of Folates. *Annu Rev Physiol* 76:251-274.
- Zhang G-F, Liu T, Wang Q, Lei J-D, Ma G-H, Su Z-G. 2008. Identification of Marker Peptides in Digested Gelatins by High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36:1499-1504.

## **Capítulo III**

### III.1. Fotoquímica del ácido fólico.

En 1944 Bloom y colaboradores observaron, por primera vez, que la luz UV convertía al AF, que es un compuesto no fluorescente, en otro fluorescente (Bloom et al. 1944). Poco tiempo después, otro grupo de investigación descubrió que la luz solar provoca la liberación de una amina diazotable a partir de soluciones de AF (Stokstad et al. 1947). En base a estos resultados propusieron el clivaje fotoquímico del AF en un componente pterínico y ácido p-aminobenzoilglutámico (pABG). Teniendo en cuenta estos resultados previos, Lowry, Bessey y Crawford llevaron a cabo un estudio dirigido a la identificación de los productos de la fotólisis (Lowry et al. 1949). Estos estudios fueron realizados irradiando AF en soluciones acuosas de ácido acético 0,01 M. A partir del análisis de estos resultados experimentales, los autores propusieron la secuencia de reacciones mostrada en la Figura III.1. Si bien en esta publicación no se presenta un estudio de la fotólisis en función del pH, se advierte que, en medio alcalino, el aumento de la fluorescencia con el tiempo de irradiación se torna más lento. Asimismo, se reporta que en ausencia de O<sub>2</sub> las reacciones son mucho más lentas. Estas observaciones fueron confirmadas en estudios más recientes por Thomas y colaboradores, que establecieron los mecanismos de las reacciones de fotólisis del AF en medio ácido y básico, en presencia y ausencia de O<sub>2</sub> (Thomas et al. 2000, 2002).



**Figura III.1.** Esquema de reacciones propuesto por Lowry y colaboradores en 1949  
(Adaptado por Thomas (2001)).

El doble anillo de pterina del AF presenta, en solución acuosa y a valores de pH comprendidos entre 3 y 14, dos formas ácido-base. El equilibrio entre estas dos formas involucra un equilibrio entre un grupo amida y un grupo fenolato, con un  $\text{pK}_a$  de aproximadamente 8. Presenta sustituyentes en la posición 6 del doble anillo. Un grupo de reacciones que modifican la estructura de los mencionados sustituyentes consiste en fotooxidaciones en las cuales el  $\text{O}_2$  disuelto en el medio oxida el átomo de carbono unido al átomo C-6 del doble anillo. Este es el caso de las reacciones de fotolisis del AF para transformarse en ácido pABG y 6-formilpterina y la fotooxidación de ésta última para formar 6-carboxipterina (Thomas 2001). Ambas reacciones se producen tanto en medio ácido como en medio alcalino. No obstante, las dos reacciones transcurren a través de mecanismos muy distintos. En la primera participa el oxígeno singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ), una especie electrónicamente excitada del oxígeno molecular, como intermediario reactivo generado tanto por el AF como por la 6-formilpterina. Además, como este último compuesto presenta una mayor eficiencia en la producción del intermediario que el propio reactivo, en la fotolisis de AF se observa una

aceleración de la reacción a medida que avanza el tiempo de irradiación (Thomas et al. 2000).

La forma alcalina del AF se descompone fotoquímicamente no sólo transformándose en 6-formilpterina, sino también a través de otra vía. Esta segunda reacción también es una fotooxidación en la cual participa el  $^1\text{O}_2$  como intermediario reactivo. Sin embargo, no se produce la ruptura de la molécula, siendo el producto un compuesto de mayor peso molecular que el reactivo (Thomas et al. 2002).

### **III.2 Antecedentes de estrategias de fotoprotección de AF mediante proteínas**

Aceituno-Medina y colaboradores (2015) reportaron la encapsulación de AF mediante electrohilado en aislado de proteína de amaranto con fibras ultrafinas de pululano, con una eficacia de encapsulación muy alta (> 95%). En estos ensayos se observó un aumento de la estabilidad térmica del AF y no se observó degradación del compuesto encapsulado después de 2 h de exposición UV. Los autores atribuyen dicha protección a la encapsulación, sin embargo, no lograron vincularla a interacciones químicas específicas entre la vitamina y los materiales de la matriz. Por el contrario, sí observaron la aparición de los compuestos de fotodegradación del AF después de la irradiación UV de la vitamina desprotegida. Por su parte, Acevedo-Fani y colaboradores (2018) estudiaron nanolaminados de alginato-quitosano obtenidos por la técnica capa a capa como sistemas para la encapsulación y liberación controlada de AF. Los autores postularon que el mecanismo de carga de AF estaría gobernado por enlaces de hidrógeno. Los nanolaminados de alginato-quitosano pudieron proteger a la vitamina de la degradación por radiación UV.

En un trabajo reciente, do Evangelho y colaboradores (2019) desarrollaron nanocápsulas y fibras ultrafinas mediante procesos de electropulverización y electrohilado, respectivamente, a partir de soluciones de zeína conteniendo AF. En este estudio, las interacciones entre las matrices proteicas y el bioactivo se

analizaron mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, y, en el caso de las fibras, los autores sugieren que se deben a enlaces por puente de hidrógeno entre la zeína y el AF. Por otro lado, en el caso de las cápsulas, la interacción sería entre la amida II de la zeína y el carboxilo del AF. La fotodegradación de AF no encapsulado fue de aproximadamente 26% después de 1 h de irradiación UV-A; sin embargo, cuando el bioactivo se incorporó en cápsulas y fibras de zeína, se observó resistencia a la radiación.

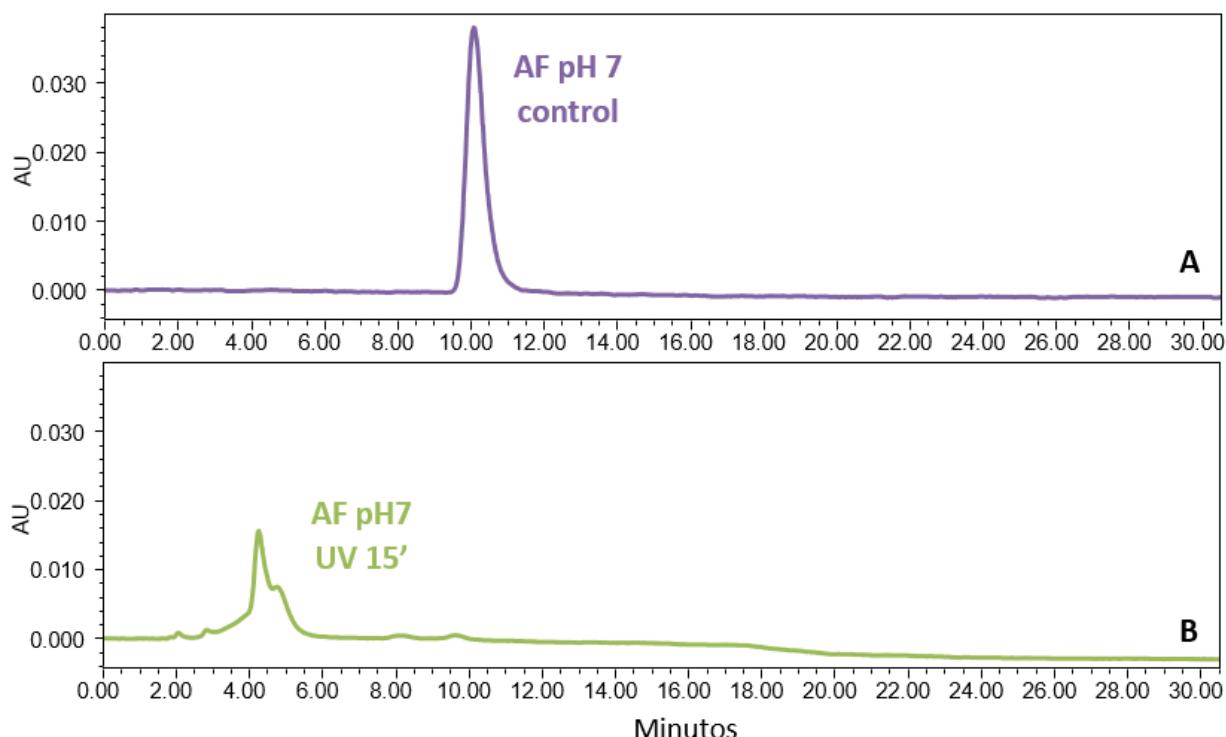
En vistas de la extensa evidencia científica que demuestra la efectividad de las proteínas como fotoprotectores del AF, resulta de suma importancia verificar dicha capacidad en los *carriers* proteicos desarrollados en el presente trabajo.

### **III.3. Efecto de los *carriers* proteicos sobre la fotodegradación del ácido fólico**

Luego de verificar mediante estudios *in vitro* la bioaccesibilidad del AF proveniente de los *carriers* proteicos (Capítulo II), se estudió la capacidad de estos (sistemas proteína/AF) para proteger al AF de la fotodegradación. El dispositivo utilizado para la irradiación de las muestras consiste en una cabina provista con 2 lámparas UV-C. Se ensayaron los sistemas con la menor relación en peso AF/proteína (0,005), al igual que para los ensayos de digestión gastroduodenal (2,5% (p/p) de proteína ( $\beta$ -Ig y G) y 0,0125% (p/p) de AF) a pH 3 y 7 a dos tiempos de exposición (15 y 30 min). Asimismo, se irradiaron soluciones de AF puro a ambos valores de pH a fin de interpretar el efecto protector de las proteínas.

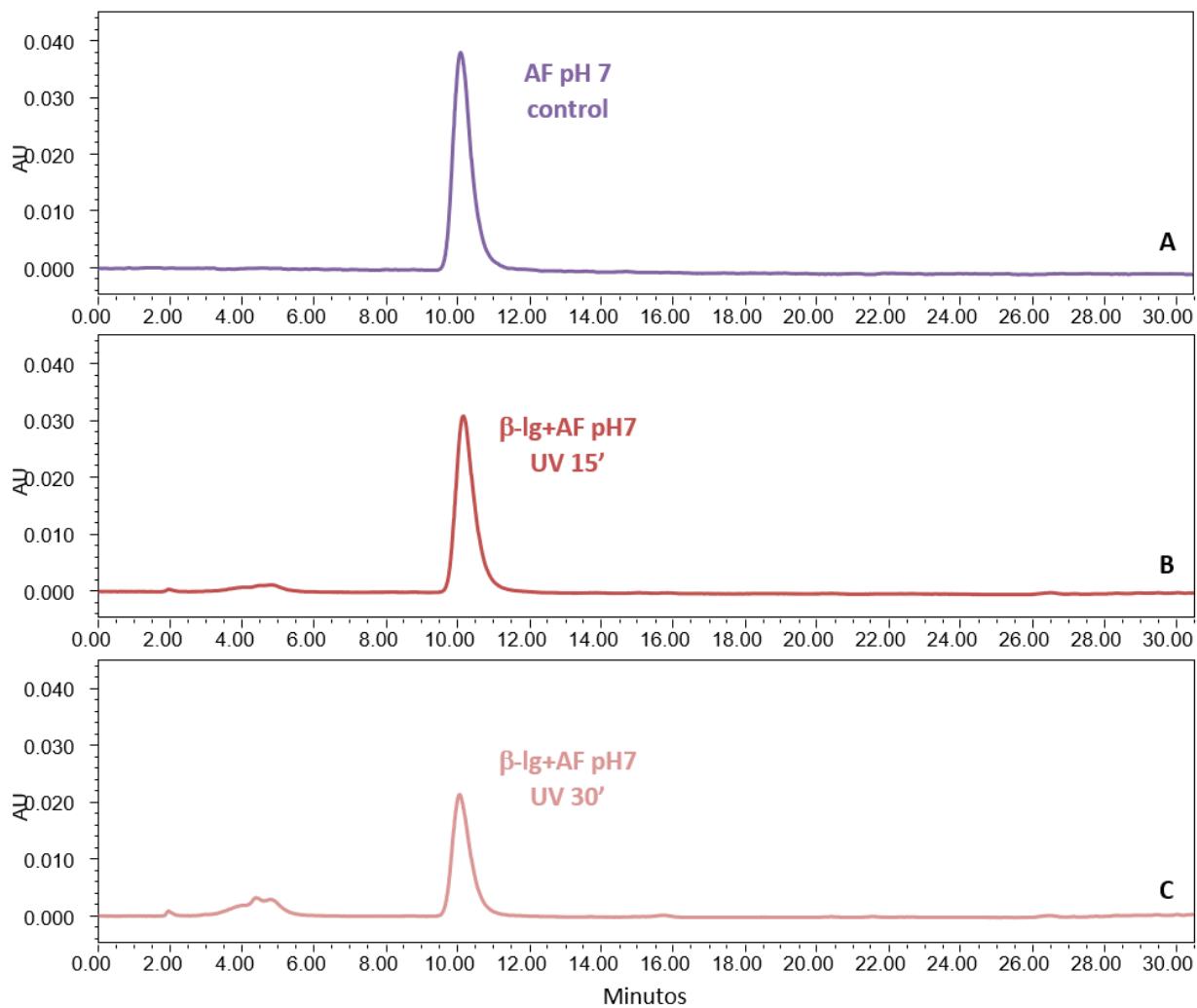
Los efectos de la irradiación sobre el AF puro o ligado a las proteínas, se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP) analizando la señal correspondiente al AF, luego de realizar una dilución 1/5 con agua a pH 7. Para ello se utilizó un detector de arreglo de diodos ( $\lambda = 280$  nm). A esta longitud de onda, tal como se mencionó anteriormente, el AF posee un máximo de absorción y es posible evaluar la altura del pico en los sistemas, luego de los distintos tiempos de exposición, con fines comparativos.

La Figura III.2. muestra el cromatograma obtenido a 280 nm correspondiente a la solución de AF 0,0125% a pH 7 sin irradiar (A) y del mismo sistema irradiado por 15 min con luz UV-C (B). En la solución control se observa el pico del AF a un tiempo de retención ( $t_r$ ) de 10,5 min, tal como se describió anteriormente en el Capítulo II. Por otra parte, en el sistema irradiado por 15 min, no se observó el pico característico del AF, sino que se observó un pico irregular entre los 3 y 5 min, que correspondería a los productos de fotodegradación, 6-carboxipterina y ácido pABG, cuyos picos individuales no serían resueltos por este método cromatográfico. Akhtar y col (1999, 2003) han reportado la sensibilidad del AF frente a la luz UV (254 nm) en solución, en presencia de  $O_2$ , en un amplio rango de pH (2-10) y la formación de estos fotoproductos, los cuales identificaron mediante cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución y técnicas espectrofotométricas.



**Figura III.2.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a: AF pH 7 control (A) y a AF pH 7 irradiado por 15 min (B).

En la Figura III.3. puede observarse el efecto protector que ejerce la presencia de  $\beta$ -Ig a pH 7 sobre el AF, cuando se expone el sistema con 2,5% de  $\beta$ -Ig y 0,0125% de AF por 15 (B) y 30 (C) min a la irradiación. En la Fig. III.3.A se muestra el cromatograma correspondiente al AF a pH 7 sin irradiar. En todos los casos, el pico mayoritario corresponde al AF ( $t_r = 10,5$  min). Para el menor tiempo de irradiación (B), se observa con escasa intensidad la aparición de los productos de fotodegradación provenientes del AF entre los 3 y 5 min.

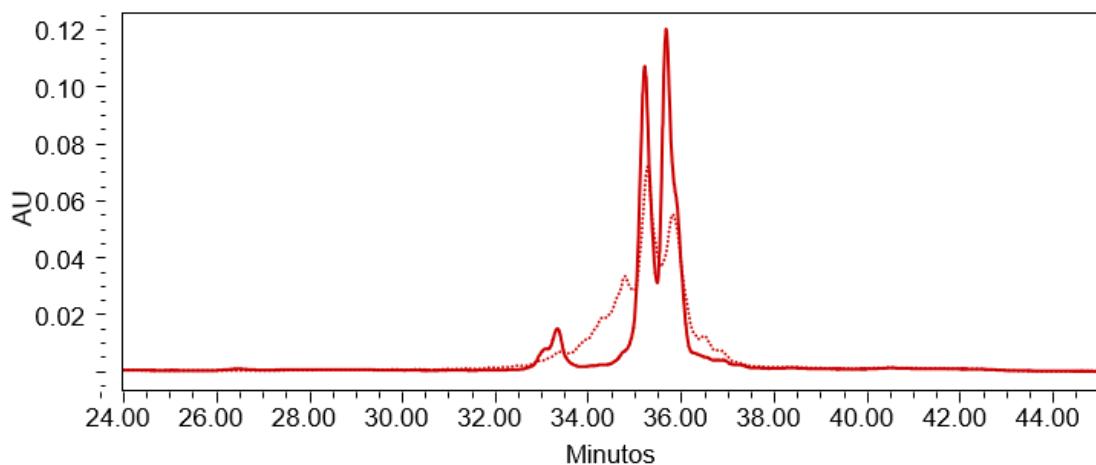


**Figura III.3.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a: AF pH 7 control (A), sistema  $\beta$ -Ig + AF pH 7 irradiado por 15 min (B) y por 30 min (C).

En el caso del sistema irradiado por 30 min (C), se observa una marcada disminución en la intensidad del pico mayoritario y un incremento en la

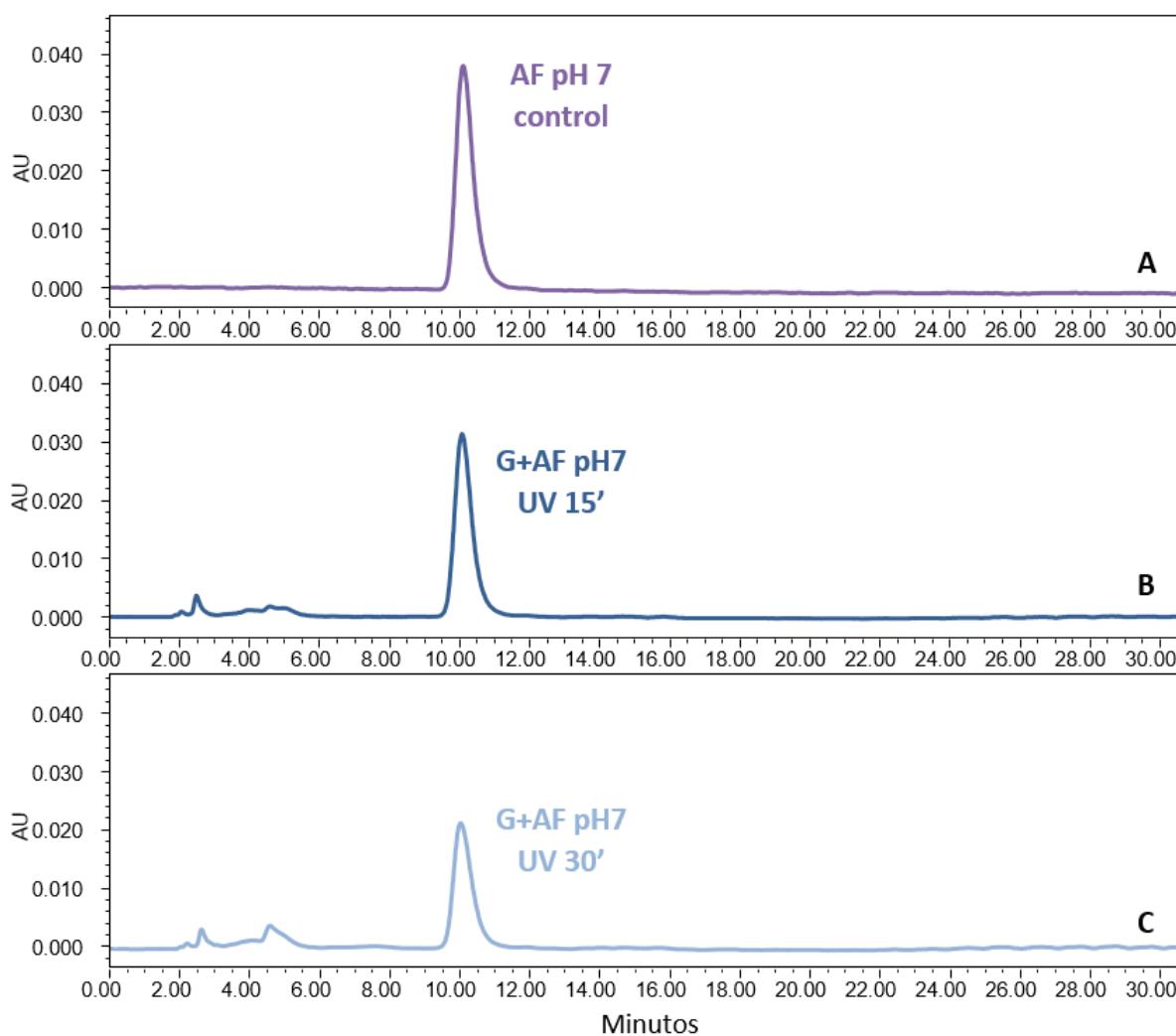
concentración de los productos de degradación de la vitamina. Cabe destacar que la presencia de la  $\beta$ -Ig en estos sistemas tiene un marcado efecto fotoprotector sobre el AF, ya que, tal como se observó en la Figura III.2., a pH neutro el AF se degrada masivamente, incluso a los 15 min de tratamiento.

La unión de folatos con proteínas puede causar en estas últimas, daño fotoquímico mediante reacciones de transferencia de carga. Varios estudios han demostrado que la fotodescomposición del AF fue capaz de fotosensibilizar aminoácidos libres y péptidos, resultando en la degradación, oxidación o inactivación de proteínas como BSA, tirosinasa y aislado de proteínas del suero (Dántola et al. 2010; Thomas et al. 2014; Fu et al. 2018). El proceso es iniciado por una transferencia de electrones desde la molécula blanco al estado triplete excitado de la pterina, produciendo el correspondiente par de iones radicales (anión radical pterina y catión radical molécula blanco). Luego, el catión radical de la molécula blanco conduce al daño y degradación de las proteínas (Wusigale y Liang 2020). Liang y col. (2013) han reportado acerca del efecto fotoprotector de proteínas del lactosuero ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y seroalbúmina bovina) sobre el AF en soluciones a pH 7,4 irradiadas mediante luz UV-A ( $\lambda= 365$  nm). En este trabajo, utilizando dicroísmo circular y espectroscopía de absorbancia y fluorescencia, se verificó la fotosensibilidad del AF y la ocurrencia de cambios estructurales (desnaturalización y fragmentación) en las proteínas por la exposición a la luz UV en presencia de AF. Estas proteínas, fueron capaces de interaccionar con el AF y sus productos de fotodescomposición retardando la degradación de la vitamina, en el siguiente orden de efectividad:  $\beta$ -LG > BSA >  $\alpha$ -lactoalbúmina.



**Figura III.4.** Perfil de elución de  $\beta$ -Ig en los cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a:  $\beta$ -Ig + AF pH 7 control (—),  $\beta$ -Ig + AF pH 7 irradiado por 30 min (.....).

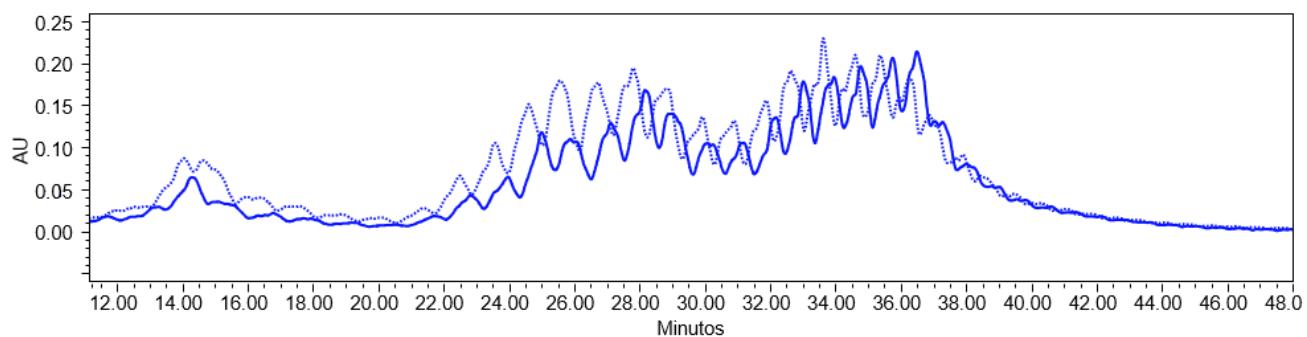
La Figura III.4. muestra el chromatograma a 280 nm en el rango de tiempos de retención donde eluye la  $\beta$ -Ig, entre 32 y 37 min, donde se aprecia, en línea llena a la proteína en el sistema con AF a pH 7 sin irradiar y en línea punteada a la  $\beta$ -Ig en el sistema con AF luego de la irradiación por 30 min. En el chromatograma de la muestra control se observan dos picos principales correspondientes a las variantes genéticas A y B de la  $\beta$ -Ig, y otro pico más pequeño correspondiente a la  $\alpha$ -lac, a un tiempo de retención de 33 min, tal como fue detallado anteriormente en el Capítulo II. Luego de la irradiación por 30 min, se observa una disminución en el tamaño de los picos principales, con la consiguiente aparición de picos de menor intensidad que serían correspondientes a los productos de degradación de la proteína.



**Figura III.5.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a: AF pH 7 control (A), sistema G + AF pH 7 irradiado por 15 min (B) y por 30 min (C).

En la Figura III.5. se observa el chromatograma obtenido a 280 nm para el sistema G + AF a pH 7, sometido a radiación por 15 (B) y 30 min (C). Se muestra, también como referencia, el chromatograma correspondiente al AF a pH 7 sin irradiar (A). En estos sistemas, se puede apreciar un comportamiento similar al descripto para la  $\beta$ -Ig, donde el pico mayoritario, correspondiente al AF disminuye conforme aumenta el tiempo de radiación, y se observa un incremento en los productos derivados de la fotólisis de este bioactivo. A este pH, no se observan diferencias entre el efecto protector ejercido por ambas proteínas. Gifani y col (2015) han reportado acerca del efecto fotoprotector de la gelatina utilizada como polímero

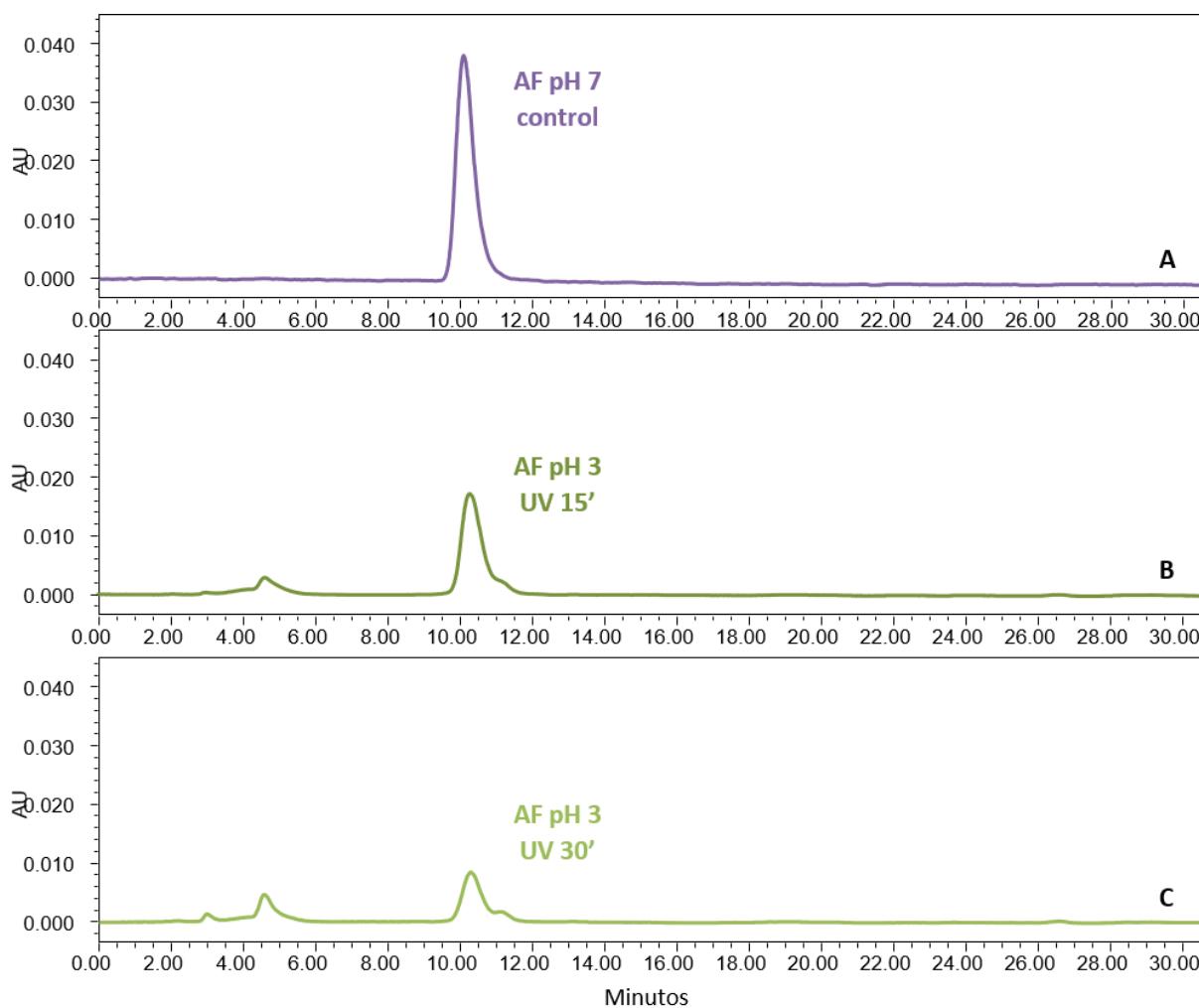
para la microencapsulación del virus de la poliedrosis nuclear de *Helicoverpa armigera*, utilizado como método de control biológico. En este trabajo, se evalúan tres polímeros como microencapsulantes para evaluar su efecto protector frente a la acción de la radiación UV-A y UV-C, gelatina, alginato de sodio y almidón, a dos concentraciones, 3 y 5% p/v. Entre los tres polímeros, la gelatina proporcionó las formulaciones más fotoestables. Se evaluó la actividad remanente del virus y, para las formulaciones de gelatina, no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de actividad de formulaciones de gelatina de 3% y 5% después de 72 h de exposición a los rayos UV-A (90% y 94%, respectivamente). La exposición a los rayos UV-C se evaluó durante 30 min para el sistema de gelatina al 5% como microencapsulante, y finalizado este período, la actividad remanente del virus microencapsulado fue de 90%, mientras que el virus sin encapsular retuvo sólo un 16% de actividad.



**Figura III.6.** Perfil de elución de G en los cromatogramas obtenidos a 205 nm correspondientes a: G + AF pH 7 control (—), G + AF pH 7 irradiado por 30 min (.....).

La Figura III.6. muestra el cromatograma a 205 nm en el rango de tiempos de retención en que eluye la G, donde se aprecia, en línea llena a la proteína en el sistema con AF a pH 7 sin irradiar y en línea punteada a la G en el sistema con AF luego de la irradiación por 30 min. Estos cromatogramas se obtuvieron a 205 nm, debido a que la G presenta mayor absorción a esta longitud de onda. Tal como se explicó anteriormente en el Capítulo II (Fig. II.6.), la gelatina presenta numerosos picos y la mayor parte de ellos eluyen entre los 22 y los 38 min. A los 30 min de

irradiación, se observan diferencias en el perfil de elución de estos péptidos, observándose un incremento más notorio en la intensidad de los picos cuyos tiempos de retención se ubican entre los 22 y los 30 min, debido a la acción de los rayos UV sobre la G.

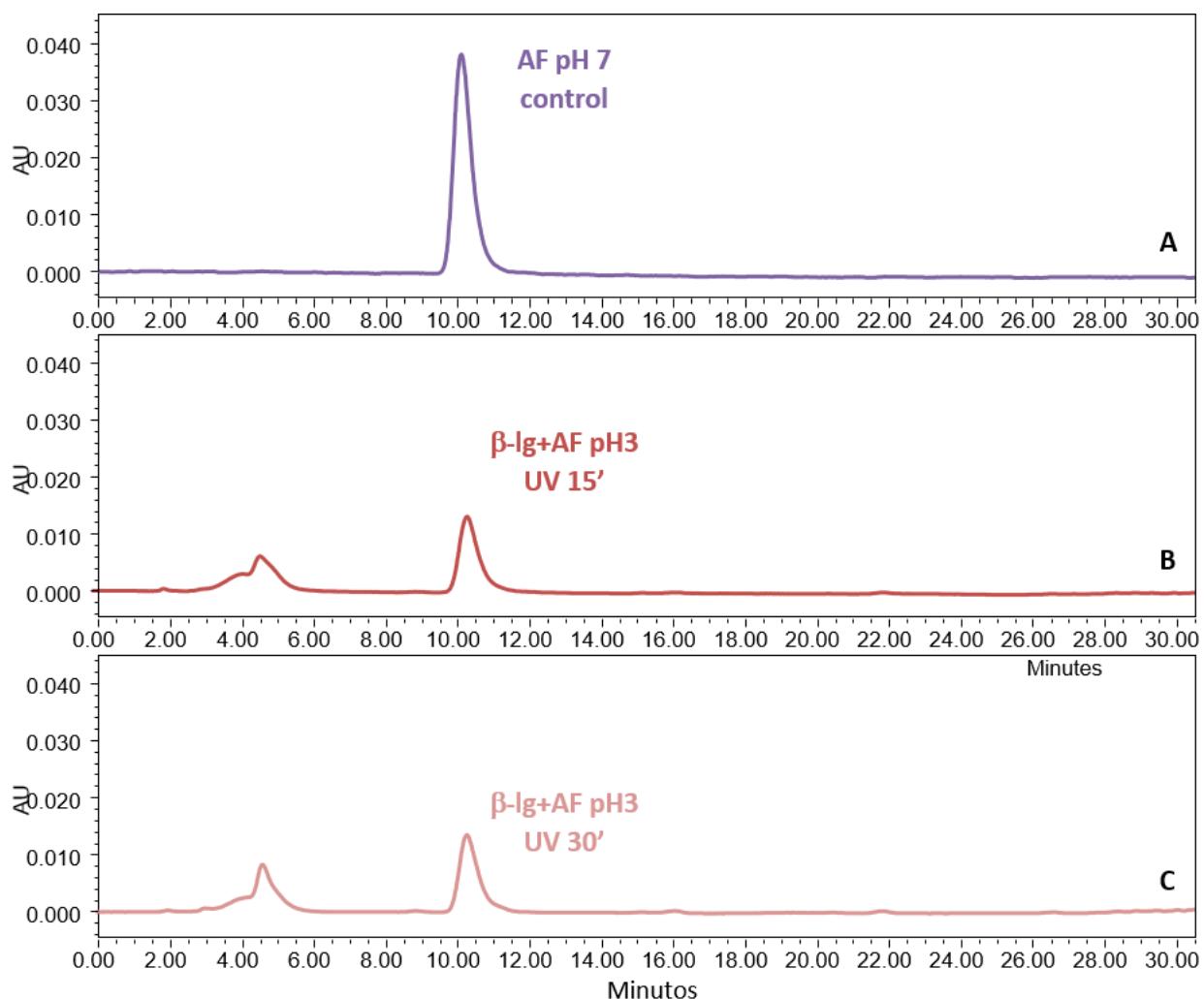


**Figura III.7.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a: AF pH 7 control (A), AF pH 3 irradiado por 15 min (B) y por 30 min (C).

A continuación, se realizaron los ensayos de exposición a luz UV en las muestras a pH ácido. En la Figura III.7. se observa el chromatograma correspondiente al AF irradiado a pH 3, por 15 (B) y 30 (C) min, en comparación con el control de AF a pH 7 (A). Tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos, las soluciones irradiadas a pH 3 fueron luego llevadas a pH 7 para poder ser

analizadas mediante HPLC-RP. De lo contrario, debido a la baja solubilidad del AF a este pH, éste quedaría retenido en la filtración previa a su inyección en el cromatógrafo. A pH 3, el AF puro presenta una mayor resistencia a la radiación que a pH neutro, ya que si comparamos la Figura III.7.B con la Figura III.2.B descripta anteriormente, podemos observar que, en la primera, a los 15 min de tratamiento aún se observa el pico correspondiente al AF, aunque también se advierten los productos de degradación del mismo, entre los 3 y 5 min. Por otro lado, a pH 7, a los 15 min de tratamiento no se observó AF intacto. Esto se debería a que, en condiciones ácidas, el AF es insoluble en agua lo cual provoca su asociación y eventual cristalización. Por este motivo, sería menos susceptible al efecto de la luz UV-C, que es fundamentalmente superficial (Gardner y Shama 1999). En la literatura se encuentra reportada la mayor susceptibilidad del AF a la fotólisis en medio ácido debido a la formación de especies predominantemente protonadas ( $pK_a$  2,3) que sufren una degradación fotolítica (Moorthy y Hayon 1976). La velocidad de la reacción es alta en el rango de pH de 2 a 4 y, a medida que el pH del medio se eleva hacia la zona neutra, la molécula se vuelve desprotonada y, en consecuencia, se observa una disminución gradual en la velocidad de la reacción. Dentro del rango comprendido entre 5 y 7, donde están involucradas especies predominantemente neutras, no hay un cambio significativo en la velocidad de reacción, lo cual sugiere que las especies neutras son menos susceptibles a la fotólisis. Luego, la velocidad de reacción continúa reduciéndose gradualmente hasta presentar una velocidad muy baja a pH 10, ya que la molécula se encuentra en una zona alcalina donde predomina su forma aniónica ( $pK_a$  8,3) (Roth et al. 1991). Esto puede ser explicado por la existencia de un anión estabilizado por efecto mesómero que resulta mucho menos susceptible al proceso de fotodegradación (Akhtar et al. 1999). Es preciso aclarar que en los trabajos en donde se reporta la alta susceptibilidad del AF en medio ácido se utilizan muy bajas concentraciones de la vitamina y buffers adecuados para asegurar su solubilidad. Por otro lado, cabe recordar que a pH 3, el AF

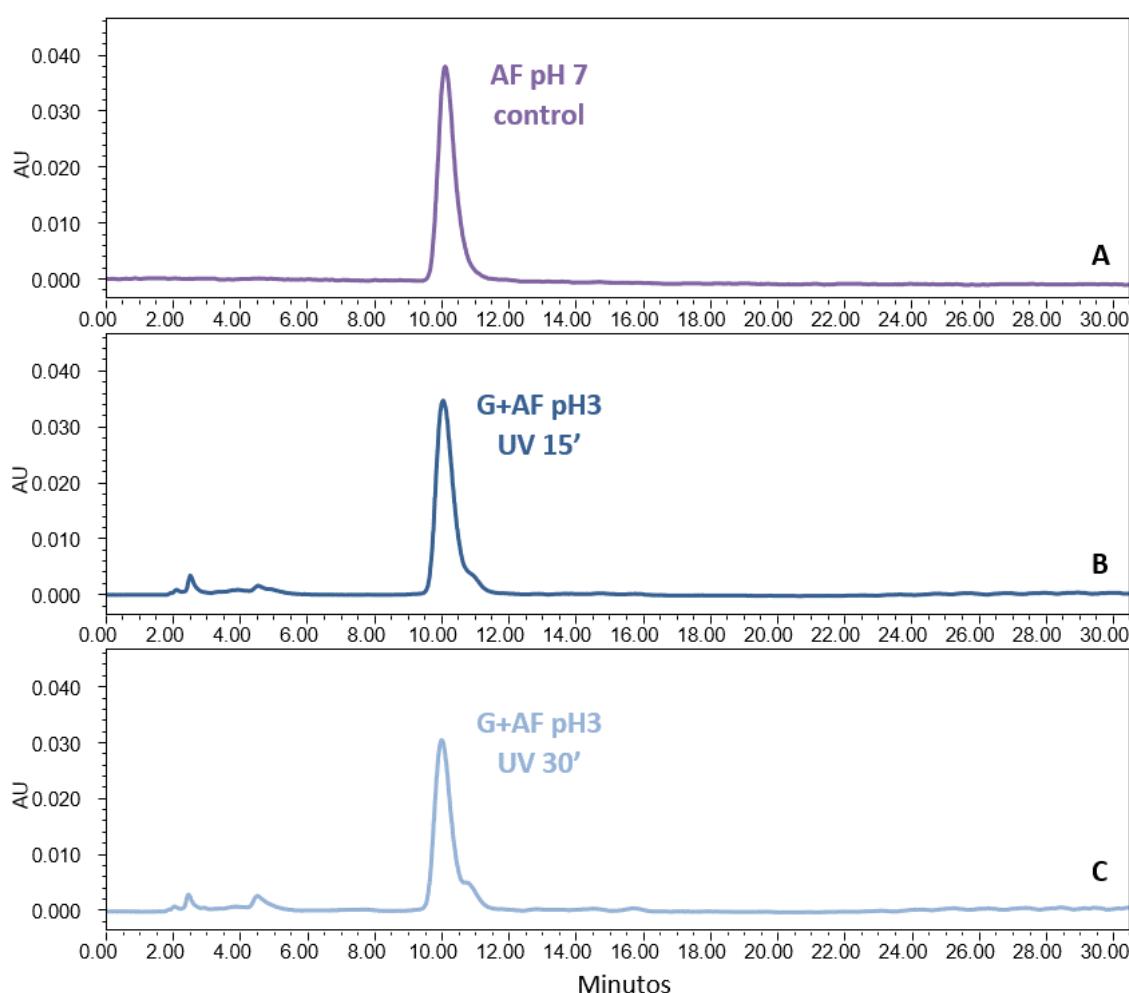
presenta un mínimo en su solubilidad en agua a 25°C, de acuerdo con lo cuantificado mediante HPLC-RP por Wu y col. (2010). Por su parte, Motkar y col. (2013), han descripto el autoensamblaje del AF a valores de pH menores a 6,2, a partir de 0,1% p/p y la formación de cristales líquidos a mayores concentraciones. Por lo tanto, en el presente trabajo, no se evidencia el efecto reportado en la literatura a pH ácido, dado que se trabajó con concentraciones de AF mayores y en medio acuoso, a fines de poder comparar los resultados entre muestras. Sin embargo, es necesario destacar que, si bien los efectos observados no fueron tan nocivos como a pH neutro, un mayor tiempo de exposición podría ocasionar pérdidas significativas de la vitamina, lo cual podría retardarse mediante el complejamiento con los *carriers* proteicos. De hecho, con el incremento del tiempo de tratamiento (Figura III.7.C), se observó una disminución del área del pico correspondiente al AF y el consecuente aumento del área de los picos de los productos de fotodegradación.



**Figura III.8.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a: AF pH 7 control (A), sistema  $\beta$ -Ig + AF pH 3 irradiado por 15 min (B) y por 30 min (C).

En la Figura III.8. se observan los resultados obtenidos para el control de AF sin irradiar (A), y el sistema  $\beta$ -Ig + AF a pH 3 irradiado por 15 (B) y 30 (C) min. En primer lugar, si bien existe un efecto protector sobre el AF por parte de la proteína a este pH, se observa que dicho efecto es menor que a pH neutro, ya que la altura del pico ( $t_r = 10.5$  min) a ambos tiempos de tratamiento es menor que a pH 7 (Figura III.3.B y C). Asimismo, a ambos tiempos de irradiación se observan entre los 3 y 5 min, picos correspondientes a los productos de degradación de la vitamina. Por otra parte, no se detectaron diferencias importantes entre ambos tiempos de irradiación. Hasta el momento, no existe en bibliografía información acerca del efecto de los rayos UV sobre  $\beta$ -Ig ni sobre la

proteína interaccionando con AF, a pH ácido, por lo que se necesitarían estudios moleculares (por ejemplo, mediante dicroísmo circular, espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, etc.) sobre estos sistemas para poder concluir en base a los resultados experimentales obtenidos a qué se atribuyen específicamente las diferencias encontradas para los distintos valores de pH evaluados. Sin embargo, la  $\beta$ -Ig, por tratarse de una proteína globular, experimenta numerosos cambios conformacionales según el pH del medio. A pH 3 se ha reportado un incremento de la hidrofobicidad superficial, cambios en el contenido de grupos tiol, entre otros (Shimizu et al. 1985; Alizadeh-Pasdar y Li-Chan 2000; Wada et al. 2006; Rahaman et al. 2015). Dichos cambios podrían ser responsables de la menor capacidad de la proteína para amortiguar los efectos de la radiación UV sobre la degradación del AF en medio ácido.



**Figura III.9.** Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes a: AF pH 7 control (A), sistema G + AF pH 3 irradiado por 15 min (B) y por 30 min (C).

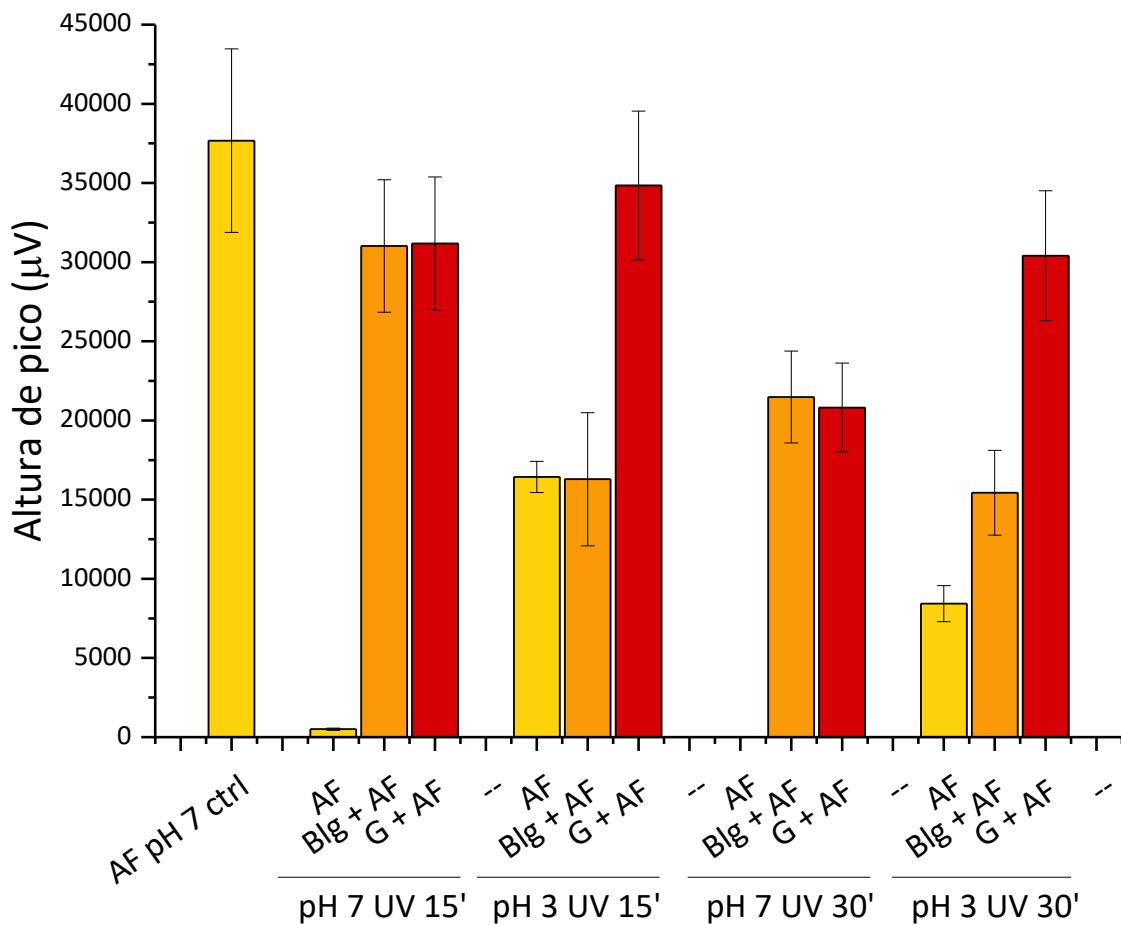
En la Figura III.9. se presenta el cromatograma obtenido a 280 nm correspondiente al pico de AF de los sistemas G + AF a pH 3 irradiado por 15 y por 30 min. Se puede destacar que la gelatina a este pH ejerce un gran efecto protector de la vitamina frente a la fotodegradación, ya que las pérdidas observadas con respecto al control de AF a pH 7 (sin tratamiento de irradiación), serían sólo del 7% a los 15 min de tratamiento y 19% a los 30 min de tratamiento, calculadas a partir de la altura del pico de AF. No se han hallado trabajos en los que se reporte el poder de penetración de los rayos UV en las moléculas de gelatina, sin embargo, Sizer and Balasubramaniam (1999) han observado que en jugos de fruta, la irradiación con rayos UV presenta un camino óptico pequeño, ya que los mismos se absorben a una corta distancia de la superficie. Estas observaciones parecen consistentes con los *carriers* analizados, que presentan cierto grado de opacidad, y la penetración de los rayos UV dependerá de su coeficiente de absorción, del contenido de sólidos solubles y de las partículas en suspensión. El hecho de que los sistemas G + AF a pH 3 presenten partículas agregadas de mayor tamaño, podría resultar en una menor penetración de los rayos UV, lo cual constituye un sistema más resistente a la fotodegradación.

Otro efecto que es ampliamente reportado en la bibliografía es el entrecruzamiento o *cross-linking* de la gelatina por acción de los rayos UV. Yamamoto (2007) observó en microcápsulas de gelatina de origen porcino un incremento del punto de fusión de las mismas, como resultado de la escisión y entrecruzamiento de las moléculas de gelatina. Este efecto es provocado por la acción de los radicales generados por la radiación sobre los residuos de tirosina y fenilalanina de la proteína. Por su parte, Sung y Chen (2014) observaron un incremento en la fuerza de los geles de gelatina de pescado y de cerdo luego de la exposición a los rayos UV-C. Los autores adjudicaron este efecto al entrecruzamiento entre los grupos alquilo o fenilo de las cadenas laterales de la proteína. Si bien no se ha estudiado cómo este entrecruzamiento podría afectar

al bioactivo complejado con la proteína, es posible que le otorgue una mayor protección frente a la fotodegradación.

En lo que respecta al perfil de elución de las proteínas y sus productos de degradación a pH 3, se observó un comportamiento similar al previamente descripto a pH 7.

A efectos comparativos se presentan en la Figura III.10. los resultados de todos los sistemas descriptos con el objetivo de resumir la información y obtener una visión más clara de los efectos de la irradiación con luz UV sobre el AF y el efecto protector que ejercen la  $\beta$ -Ig y la Gelatina sobre esta vitamina. Para ello se graficó la altura de cada pico cromatográfico, el cual correlaciona directamente con la cantidad de AF remanente luego de los tratamientos con luz UV-C. Se observa claramente que, en los sistemas mixtos a pH 7 ambas proteínas lograron proteger a la vitamina en forma semejante, siendo mayores las pérdidas a mayor tiempo de exposición. A pH 3, la gelatina resulta muy eficiente en su acción frente a la fotodegradación del AF, posiblemente debido la mayor opacidad que presenta este sistema o bien por el entrecruzamiento que induce la radiación en la proteína, como se discutió anteriormente. Ambos factores podrían actuar como barrera de protección para el bioactivo, protegiéndolo de la radiación UV.



**Figura III.10.** Efecto del UV sobre el AF puro y en sistemas mixtos con  $\beta$ -Ig y G a pH 3 y 7.

### III.4. Conclusiones

El AF se degrada masivamente tras la exposición a la luz UV-C a pH 7 y en un 77% a pH 3 cuando el tiempo de exposición llega a 30 min. A pH ácido se observó un porcentaje menor de pérdida atribuido a la baja solubilidad del AF y su eventual cristalización, lo cual lo haría menos susceptible al efecto de la luz UV-C, fundamentalmente superficial.

En las condiciones de formación de los *carriers* de AF/proteína (pH 3), se verificó que la interacción con gelatina fue más eficiente para evitar su fotodegradación ya que el AF sólo se degrada en un 25% transcurridos los 30 min de exposición. En este sentido, se plantean dos factores que podrían contribuir a esta mayor fotoprotección del AF: una menor penetración de los rayos UV debido a la turbidez propia del sistema, y el entrecruzamiento producido en las moléculas de gelatina por acción de los rayos UV, ampliamente reportado en bibliografía.

La menor eficiencia de la  $\beta$ -Ig a pH 3, con relación a su comportamiento a pH neutro, podría ser atribuida al cambio conformacional que sufre esta proteína a pH ácido, que afectaría su capacidad para proteger al AF de la fotodegradación.

### III.5. Referencias

- Aceituno-Medina M, Mendoza S, Lagaron JM, López-Rubio A. 2015. Photoprotection of folic acid upon encapsulation in food-grade amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) protein isolate – Pullulan electrospun fibers. *LWT - Food Sci. Technol.* 62:970-975.
- Acevedo-Fani A, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. 2018. Photo-protection and controlled release of folic acid using edible alginate/chitosan nanolaminates. *J. Food Eng.* 229:72-82.
- Akhtar MJ, Khan MA, Ahmad I. 1999. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19:269-275.
- Akhtar MJ, Khan MA, Ahmad I. 2003. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31:579-588.
- Alizadeh-Pasdar N, Li-Chan ECY. 2000. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* 48:328-334.
- Bloom ES, Vandenbelt JM, Binkley SB, O'Dell BL, Pfiffner JJ. 1944. The Ultraviolet Absorption of Vitamin Bc and Xanthopterin. *Science* 100:295-297.
- Dántola ML, Denofrio MP, Zurbano B, Gimenez CS, Ogilby PR, Lorente C, Thomas AH. 2010. Mechanism of photooxidation of folic acid sensitized by unconjugated pterins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9:1604-1612.
- do Evangelho JA, Crizel RL, Chaves FC, Prietto L, Pinto VZ, Miranda MZ de, Dias ARG, Zavareze E da R. 2019. Thermal and irradiation resistance of folic acid encapsulated in zein ultrafine fibers or nanocapsules produced by electrospinning and electrospraying. *Food Res. Int.* 124:137-146.
- Fu X, Wusigale, Cheng H, Fang Z, Liang L. 2018. Mechanism for improved protection of whey protein isolate against the photodecomposition of folic acid. *Food Hydrocoll.* 79:439-449.
- Gardner DWM, Shama G. 1999. UV Intensity Measurement and Modelling and Disinfection Performance Prediction for Irradiation of Solid Surfaces with UV Light. *Food Bioprod. Process.* 77:232-242.
- Gazzali AM, Lobry M, Colombeau L, Acherar S, Azaïs H, Mordon S, Arnoux P, Baros F, Vanderesse R, et al. 2016. Stability of folic acid under several parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* 93:419-430.

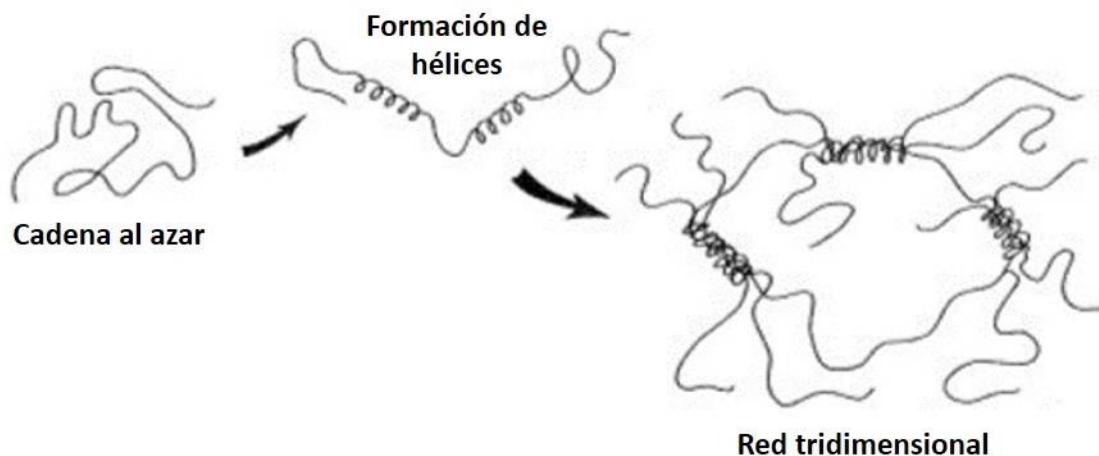
- Gifani A, Marzban R, Safekordi A, Ardjmand M, Dezianian A. 2015. Ultraviolet protection of nucleopolyhedrovirus through microencapsulation with different polymers. *Biocontrol Sci. Technol.* 25:814-827.
- Liang L, Zhang J, Zhou P, Subirade M. 2013. Protective effect of ligand-binding proteins against folic acid loss due to photodecomposition. *Food Chem.* 141:754-761.
- Lowry OH, Bessey OA, Crawford EJ. 1949. Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid. *J. Biol. Chem.* 180:389-398.
- Moorthy PN, Hayon E. 1976. One-electron redox reactions of water-soluble vitamins. II. Pterin and folic acid. *J. Org. Chem.* 41:1607-1613.
- Motkar G, Lonare M, Patil O, Mohanty S. 2013. Self-assembly of folic acid in aqueous media. *AIChE J.* 59:1360-1368.
- Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC, Juzeniene A, Vorobey A, Johnsson A, Moan J. 2005. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *J. Photochem. Photobiol. B* 80:47-55.
- Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. 2015. Conformational changes of  $\beta$ -lactoglobulin induced by shear, heat, and pH—Effects on antigenicity. *J. Dairy Sci.* 98:4255-4265.
- Roth HJ, Eger K, Troshütz R. 1991. *Pharmaceutical chemistry*. Vol. 2, Vol. 2,. London: Ellis Horwood.
- Shimizu M, Saito M, Yamauchi K. 1985. Emulsifying and Structural Properties of  $\beta$ -Lactoglobulin at Different PHs. *Agric. Biol. Chem.* 49:189-194.
- Sizer CE, Balasubramaniam BE. 1999. New Intervention Processes for Minimally Processed Juices. *Food Technol. Mag.* 53:64-67.
- Stokstad ELR, Fordham D, De GRUNIGEN A. 1947. The inactivation of pteroylglutamic acid (liver *Lactobacillus casei* factor) by light. *J. Biol. Chem.* 167:877.
- Sung W-C, Chen Z-Y. 2014. UV treatment and  $\gamma$  irradiation processing on improving porcine and fish gelatin and qualities of their premix mousse. *Radiat. Phys. Chem.* 97:208-211.
- Thomas AH. 2001. Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa. Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2215>

- Thomas AH, Suárez G, Cabrerizo FM, García Einschlag FS, Martino R, Baiocchi C, Pramauro E, Capparelli AL. 2002. Photochemical Behavior of Folic Acid in Alkaline Aqueous Solutions and Evolution of Its Photoproducts. *Helv. Chim. Acta* 85:2300-2315.
- Thomas AH, Suárez G, Cabrerizo FM, Martino R, Capparelli AL. 2000. Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 135:147-154.
- Thomas AH, Zurbano BN, Lorente C, Santos J, Roman EA, Laura Dántola M. 2014. Chemical changes in bovine serum albumin photoinduced by pterin. *J. Photochem. Photobiol. B* 141:262-268.
- Wada R, Fujita Y, Kitabatake N. 2006. Effects of heating at neutral and acid pH on the structure of  $\beta$ -lactoglobulin A revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1760:841-847.
- Wu Z, Li X, Hou C, Qian Y. 2010. Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) *K. J. Chem. Eng. Data* 55:3958-3961.
- Wusigale, Liang L. 2020. Folates: Stability and interaction with biological molecules. *J. Agric. Food Res.* 2:100039.
- Yamamoto T, Koike M, Dobashi T. 2007. Melting and Swelling Behaviors of UV-Irradiated Gelatin Gel Microcapsules. *Langmuir* 23:8531-8537.

## **Capítulo IV**

#### IV.1. Propiedades y características de importancia tecnológica de la gelatina

La gelatina forma soluciones coloidales con agua, que desde el punto de vista físico químico, son consideradas "soluciones coloidales ideales". Tecnológicamente, la gelatina es, por lo tanto, un hidrocoloide. Los hidrocoloides se usan en la industria alimentaria, no tanto por su valor nutricional sino más por su multifuncionalidad. Sin embargo, un solo hidrocoloide es incapaz de cumplir con todas las funciones deseadas o conocidas. La gelatina no es la excepción; pero, en comparación con otros hidrocoloides, es mucho más multifuncional (Schrieber y Gareis 2007). Esta proteína tiene la capacidad de formar un gel homogéneo con concentraciones en un rango aproximado de 1–50% (debajo de este rango no hay moléculas suficientes para soportar una red tridimensional infinita) (Djabourov et al. 1988). El diagrama de fase de la gelatina en solución acuosa se ha establecido a través de calorimetría y enfoques ópticos (Djabourov et al. 1988; Bohidar y Jena 1993). Por encima de la temperatura de gelificación, típicamente alrededor de 30 ° C, existe una mezcla de gelatina y agua (sol). Para temperaturas suficientemente altas (superiores a los 50° C) las partículas dispersas son monómeros de gelatina. A medida que disminuye la temperatura, a unos pocos grados por encima de la temperatura de gelificación ( $T_{gel}$ ) comienzan a aparecer segmentos helicoidales en las moléculas de gelatina; esta es una transición de primer orden a nivel de unas pocas cadenas. Las hélices generalmente involucran tres hebras moleculares, ya que esta es la configuración más estable (una triple hélice tipo colágeno) (Pelc et al. 2013). Debido a la hidrofobicidad de los segmentos helicoidales y las interacciones electrostáticas atractivas entre ellos, se agregan formando redes de fibras (Djabourov et al. 1988; Kornyshev et al. 2007). Dado que las moléculas que forman las fibras actúan como sitios de nucleación para una mayor formación de hélices (Gornall y Terentjev 2007), las estructuras crecen hasta que se crea una red macroscópica: el gel (Figura IV.1.).



**Figura IV.1.** Modelo de formación del gel de gelatina (desde el sol al gel). *Adaptado de Schrieber y Gareis (2007).*

Dado que la gelatina mostró una gran eficiencia en la protección del AF frente a la fotodegradación, y que sus propiedades funcionales son muy importantes a la hora de ser utilizada como ingrediente en alimentos, se analizó el efecto del AF en las propiedades reológicas y funcionales de esta proteína. El posible impacto del complejamiento con AF se evaluó mediante mediciones de reometría dinámica durante la gelificación, calorimetría diferencial de barrido, análisis de textura de geles y de su turbidez.

Cabe recordar que las soluciones de G durante su preparación fueron calentadas con agitación hasta 70 °C, para asegurar la desagregación completa al estado de monómeros. Luego se enfrió hasta 35 °C y se mantuvo a esta temperatura hasta su medición. En las soluciones de G pura, el pH fue ajustado a 6 y 7 con NaOH 1N y a 4,5 y 3 con HCl 1N. Paralelamente, los sistemas G + AF se obtuvieron mezclando las soluciones de ambos componentes individuales a pH 7 bajo agitación para alcanzar la concentración final requerida de proteína y vitamina en la mezcla. Posteriormente, el pH fue llevado a los valores de pH más bajos con HCl 1N.

La concentración ensayada para la gelatina fue de 2,5% p/p, concentración habitual de uso de la misma como agente de gelificación y el AF se utilizó al 0,0125% p/p, a excepción de los ensayos de micro calorimetría diferencial de barrido. Estas concentraciones representan una relación en masa de AF/proteína 1:200, que es la relación utilizada tanto en los ensayos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad, como en la evaluación de la protección frente a la fotodegradación.

#### **IV.2. Dinámica de gelificación de la gelatina**

Para determinar el comportamiento viscoelástico de la gelatina durante la gelificación, se utilizó un reómetro oscilatorio dinámico. Éste permite medir simultáneamente la viscosidad y las propiedades elásticas en función del tiempo y la temperatura. Idealmente, la viscosidad está representada por el denominado módulo de pérdida o viscoso ( $G''$ ) y las propiedades elásticas por el módulo de almacenamiento o elástico ( $G'$ ). Durante la gelificación, hay un punto donde el módulo de pérdida  $G''$  y el módulo de almacenamiento  $G'$  están en equilibrio. Este punto de cruce de  $G'$  y  $G''$  en la curva de enfriamiento se define como la temperatura de la transición del sol-gel, es decir, el punto de gelificación. En la curva de calentamiento, en contraste, este punto de cruce representa la temperatura de transición gel-sol o el punto de fusión del gel.

Se determinó la dinámica de gelificación de soluciones de gelatina pura (2,5% p/p) y del sistema gelatina + AF (2,5% / 0,0125% p/p) a pH 3; 4,5; 6 y 7. La Figura IV.2. muestra los reogramas obtenidos para todos los sistemas analizados, mostrando las etapas de estabilización inicial de la solución (5 min a 35 °C), enfriamiento y gelificación (desde 35 °C a 5 °C a 2 °C/min), y templado del gel formado (15 min a 5 °C).

El cruce de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) indica el punto de gelificación y a partir del mismo se obtuvo el valor de la temperatura de gelificación ( $T_{gel}$ ) (Clark 1992).

Luego de este punto,  $G'$  aumenta bruscamente, y ese incremento se hace más leve durante la estabilización a 5 °C. Para poder comparar los geles formados, se tomó el valor de  $G'$  al finalizar la medición ( $G'_{fin}$ ). Simultáneamente, se registró el valor de la viscoelasticidad relativa ( $\tan \delta$ ), que es la relación entre  $G''$  y  $G'$ , y se utilizó el valor final ( $\tan \delta_{fin}$ ) para comparar los distintos sistemas. Los valores de  $T_{gel}$ ,  $G'_{fin}$  y  $\tan \delta_{fin}$  a todos los pHs evaluados se resumen en la Tabla IV.1..

En este punto, es conveniente destacar algo que se observa en los reogramas en todos los sistemas analizados y es que en los tiempos de análisis no se alcanza un valor constante de  $G'$ . Djabourov y colaboradores (1993) determinaron la existencia de una relación entre el valor de  $G'$  y la cantidad de triples hélices en la estructura de los geles de gelatina, siendo estas últimas las responsables de consolidar el gel. Asimismo, observaron, mediante mediciones de rotación óptica que la cantidad de hélices no alcanza un valor constante, sino que luego de un rápido aumento inicial, el incremento continúa con una dependencia del tiempo logarítmica por períodos de cientos y miles de horas. De los resultados de sus experimentos, los autores concluyeron que los geles de gelatina no están en equilibrio (Djabourov et al. 1988).

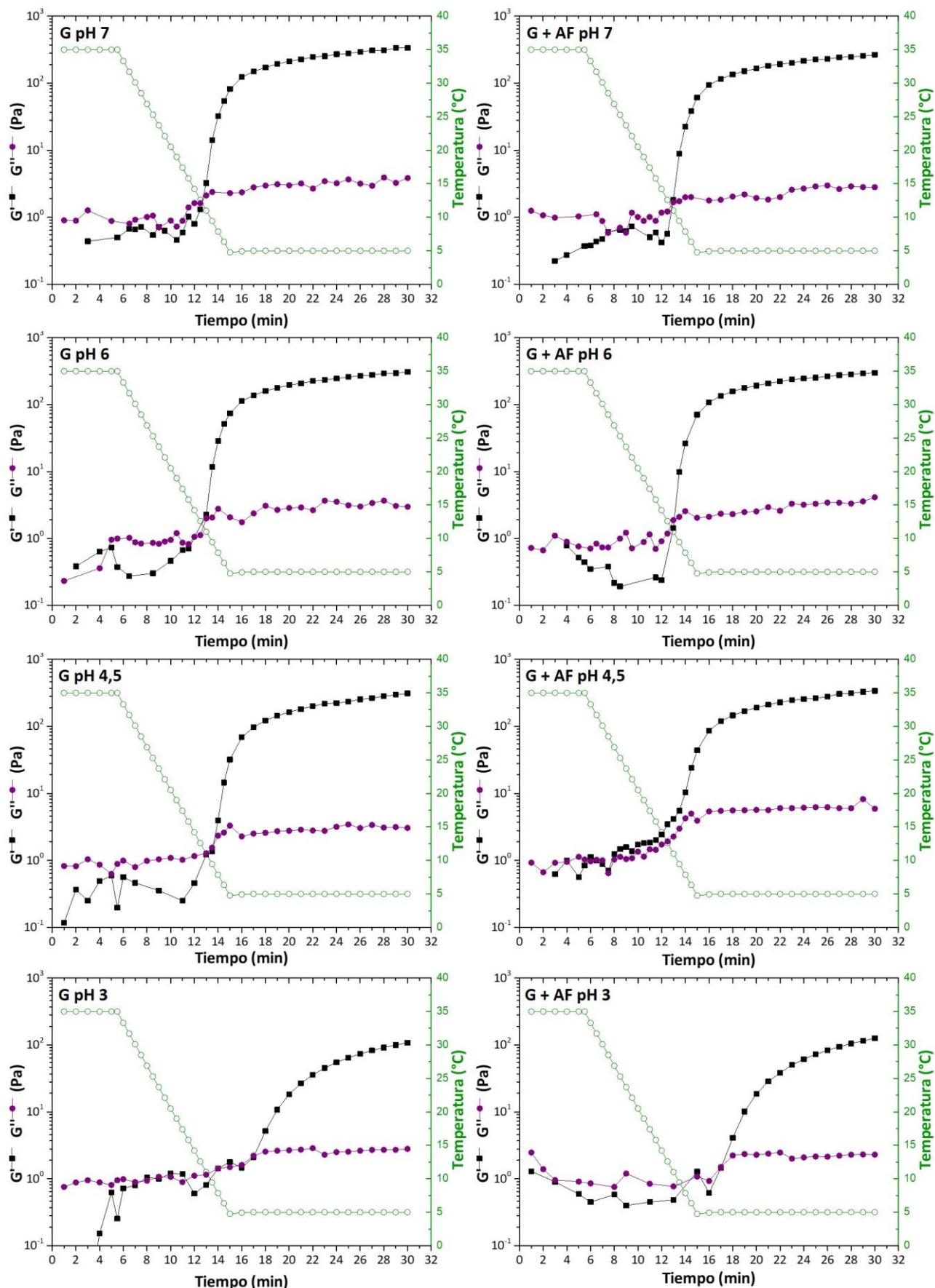


Figura IV.2. Reogramas de sistemas G y G + AF a distintos pHs en el rango 3-7.

**Tabla IV.1.** Efecto de la presencia de AF en los parámetros reológicos que caracterizan la gelificación de la gelatina.

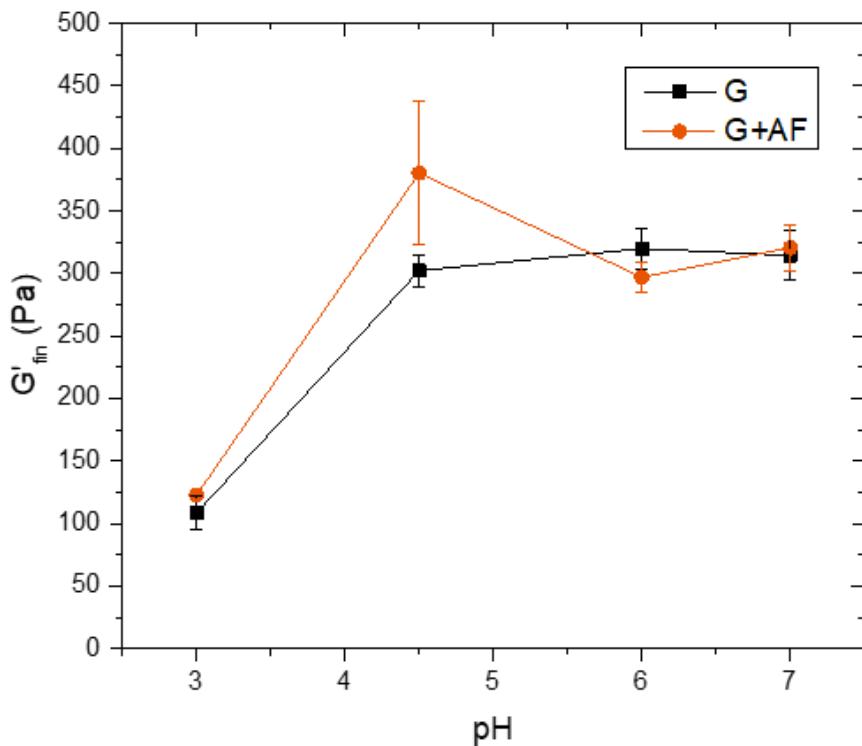
Muestra	$T_{gel}$ (°C)	$G'_{fin}$ (Pa)	$\tan \delta_{fin} (*10^3)$
<b>G pH 7</b>	$11,5 \pm 0,9^c$	$314,4 \pm 20,3^b$	$9,92 \pm 1,39^a$
<b>G + AF pH 7</b>	$11,0 \pm 0,1^c$	$320,6 \pm 18,7^b$	$9,10 \pm 2,13^a$
<b>G pH 6</b>	$11,0 \pm 0,1^c$	$319,9 \pm 16,0^b$	$8,95 \pm 0,97^a$
<b>G + AF pH 6</b>	$11,0 \pm 0,1^c$	$297,0 \pm 12,3^b$	$13,9 \pm 0,90^{ab}$
<b>G pH 4,5</b>	$9,5 \pm 0,1^b$	$302,2 \pm 12,6^b$	$11,71 \pm 2,67^a$
<b>G + AF pH 4,5</b>	$9,5 \pm 0,1^b$	$380,2 \pm 57,5^c$	$22,20 \pm 6,79^{bc}$
<b>G pH 3</b>	$5,0 \pm 0,1^a$	$108,3 \pm 13,7^a$	$25,8 \pm 0,85^c$
<b>G + AF pH 3</b>	$5,0 \pm 0,1^a$	$122,7 \pm 4,1^a$	$20,25 \pm 2,90^{bc}$

Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Para la G pura, se observa una disminución de la  $T_{gel}$  y  $G'_{max}$  a medida que disminuye el pH, lo cual se atribuiría a la protonación de aminoácidos de la gelatina al acidificarse el medio. Esto interfiere con la formación de enlaces de hidrógeno, los cuales son muy importantes en la consolidación de la estructura del gel de gelatina (Bello et al. 1962). A pH 3, este efecto se hace más notorio, ya que impide la gelificación en la etapa de enfriamiento, ocurriendo entre los 2 y 3 min de la etapa de templado (5 °C) (Figura IV.2.). Pang y col (2014), reportaron resultados análogos al analizar la gelificación de una gelatina de origen bovino de tipo B a diferentes concentraciones (1; 2,5 y 5% p/p) y a distintos valores de pH entre 3 y 8. A las menores concentraciones de proteína, la gelificación se vio inhibida a pH 3.

En lo que respecta a la viscoelasticidad relativa, a los mayores valores de pH se observa una predominancia del comportamiento elástico, en efecto, cuanto mayor es  $G'$  más resistente es el material y mayor es la energía necesaria para deformarlo. Los materiales elásticos presentan una baja pérdida de energía durante su fluencia y presentan valores pequeños de  $\tan \delta$ . A pH 3, se observa una disminución de la viscoelasticidad relativa (mayor  $\tan \delta$ , menor

viscoelasticidad relativa). Esto está de acuerdo con lo descripto anteriormente, ya que, al constituirse una red más débil, el material muestra mayor pérdida de energía por fluencia y se incrementa el módulo viscoso ( $G''$ ).



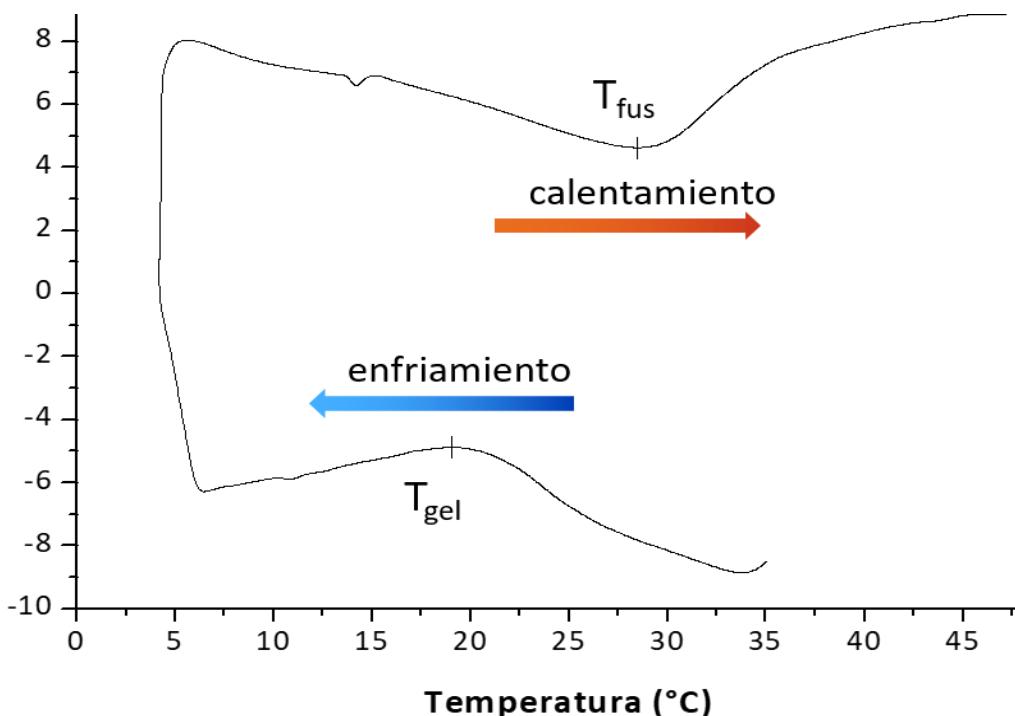
**Figura IV.3.** Variación de  $G'_{fin}$  en función del pH.

Por otra parte, en lo que respecta al comportamiento de la G en presencia de AF, no se observó una modificación del  $T_{gel}$  en presencia del bioactivo, mientras que el  $G'_{fin}$  y la tan  $\delta_{fin}$  mostraron, únicamente a pH 4,5, diferencias respecto a la gelatina pura (Figura IV.3.). En el Capítulo I se determinó que a pH 5, el AF se unió en un 80% a una solución de G 0,5% (Figura I.3.). Por lo tanto, asumiendo un comportamiento similar a este pH, las diferencias encontradas podrían atribuirse a que, a pH 4,5, el AF no unido a la G presenta cargas negativas, con lo cual el balance global de cargas entre éste y la proteína cargada positivamente favorecería la asociación de las cadenas de gelatina para la formación de más triples hélices respecto a la proteína sola a ese pH. Otros autores han informado que las propiedades viscoelásticas de los geles de gelatina mejoraron enormemente con cantidades más altas de estructura de triple hélice (Boedtker

y Doty 1954; Sarabia et al. 2000). Asimismo, varios autores han reportado la influencia de iones y otros compuestos cargados en la gelificación de la gelatina (Xing et al. 2014; Wu et al. 2018; Qiao et al. 2021), aunque se deberían realizar estudios moleculares sobre estos sistemas para concluir fehacientemente sobre los efectos de la interacción entre la G y el AF a pH 4,5 sobre la dinámica de gelificación.

#### **IV.3. Calorimetría diferencial de barrido**

Se empleó micro-calorimetría diferencial de barrido ( $\mu$ DSC) como una técnica complementaria a la reometría para caracterizar la transición sol/gel a pH 7 y 3 de la gelatina pura (15% p/p) y con AF (15% p/p / 0,075% p/p). Esta técnica implica el uso de concentraciones mayores de proteína que los ensayos de reología dinámica, pero se mantuvo la relación en masa de AF/proteína 1:200. Se realizó un enfriamiento de las muestras de 35 °C a 4 °C para registrar la temperatura de gelificación y la entalpía involucrada en el proceso ( $T_{gel}$ ,  $\Delta H_{gel}$ ). Luego, se mantuvieron a 4 °C por 4 min y, finalmente, se calentaron de 4 °C a 60 °C, con el fin de determinar, además, la temperatura y entalpía de fusión ( $T_{fus}$ ,  $\Delta H_{fus}$ ). En la Figura IV.4. podemos observar, a modo de ejemplo, el termograma obtenido para la G al 15% p/p a pH 7, donde se observan las etapas recientemente enumeradas y los puntos donde se determinaron las temperaturas de gelificación y fusión.



**Figura IV.4.** Termograma de G 15% a pH 7 mostrando las etapas de enfriamiento y calentamiento.

La Tabla IV.2. resume los parámetros obtenidos para todas las muestras analizadas. En ella se puede observar que no se hallaron diferencias significativas en  $T_{gel}$ ,  $\Delta H_{gel}$  y  $T_{fus}$ , y que la entalpía de fusión ( $\Delta H_{fus}$ ) fue levemente superior para las muestras a pH 7. Yoshimura y col. (2000), determinaron por calorimetría diferencial de barrido la temperatura de fusión en una gelatina ácida de origen porcino en solución al 6% p/v, pH 6 y el resultado fue 28,5 °C. Por su parte, Bohidar y Jena (1993), analizaron las transiciones térmicas de una gelatina comercial al 10% p/p, pH 7, y la temperatura de fusión en este caso, resultó ser 37 °C. Los resultados obtenidos en el presente trabajo presentan similitud con los obtenidos por Yoshimura y col. (2000) para una gelatina de las mismas características.

Cabe destacar que, en todas las muestras analizadas, la temperatura de gelificación fue menor que la correspondiente a la fusión. Este fenómeno de histéresis, ha sido descripto en gelatina por numerosos autores y se debería a un efecto cooperativo entre los enlaces de hidrógeno de las triple hélices, en el cual

se necesitaría mayor energía para romper ( fusión), que para formar (gelificación) estas hélices (Eagland et al. 1974; Djabourov et al. 1988; Michon et al. 1993; Schrieber y Gareis 2007).

Por otra parte, el calor intercambiado durante la gelificación o fusión está relacionado con los enlaces de hidrógeno que estabilizan la triple hélice. Como puede observarse en la Figura IV.4., el flujo de calor muestra un máximo alrededor de los 20°C y luego disminuye, lo que indica que la velocidad de cambios conformacionales decrece luego de cierta temperatura o de una cierta cantidad de hélices. Luego, en el rango de bajas temperaturas, no se vuelve a alcanzar la línea de base, ya que aún existe un flujo de calor positivo que indica que la formación de hélices continúa (Elharfaoui et al. 2007). Las diferencias registradas en los valores de  $\Delta H_{fus}$  a los valores de pH evaluados podrían deberse a una mayor formación de hélices a pH 7 respecto a pH 3 que ocurriría en la etapa isotérmica a 4 °C previa a la rampa de calentamiento.

En lo que respecta al comportamiento de la gelatina en presencia de AF, no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados, por la presencia de la vitamina, tal como fue observado para los ensayos de reometría dinámica. Por otra parte, si comparamos los valores de  $T_{gel}$  obtenidos por calorimetría con aquellos determinados mediante reometría, observamos que estos últimos son considerablemente menores. Esta diferencia podría atribuirse a que la concentración de proteínas empleada en cada ensayo es distinta, 2,5% en los ensayos reológicos y 15% en DSC. Morales et al. (2016), analizaron la  $T_{gel}$  en soluciones de gelatina tipo B y hallaron que este valor aumentó significativamente al incrementarse la concentración. De hecho,  $T_{gel}$  aumentó de 5 °C a 17 °C con una concentración creciente de 1,5 a 5%. Por su parte, Pang et al. (2014) han reportado en su estudio de geles de gelatina con y sin proteínas lácteas, que la solución de gelatina al 5% con o sin proteínas de la leche gelificó a temperaturas en el rango de 20 a 22 °C mientras que las soluciones al 2,5% lo hicieron en el rango de 15 a 18 °C.

**Tabla IV.2.** Efecto del AF en las temperaturas de transición y entalpías de la gelatina.

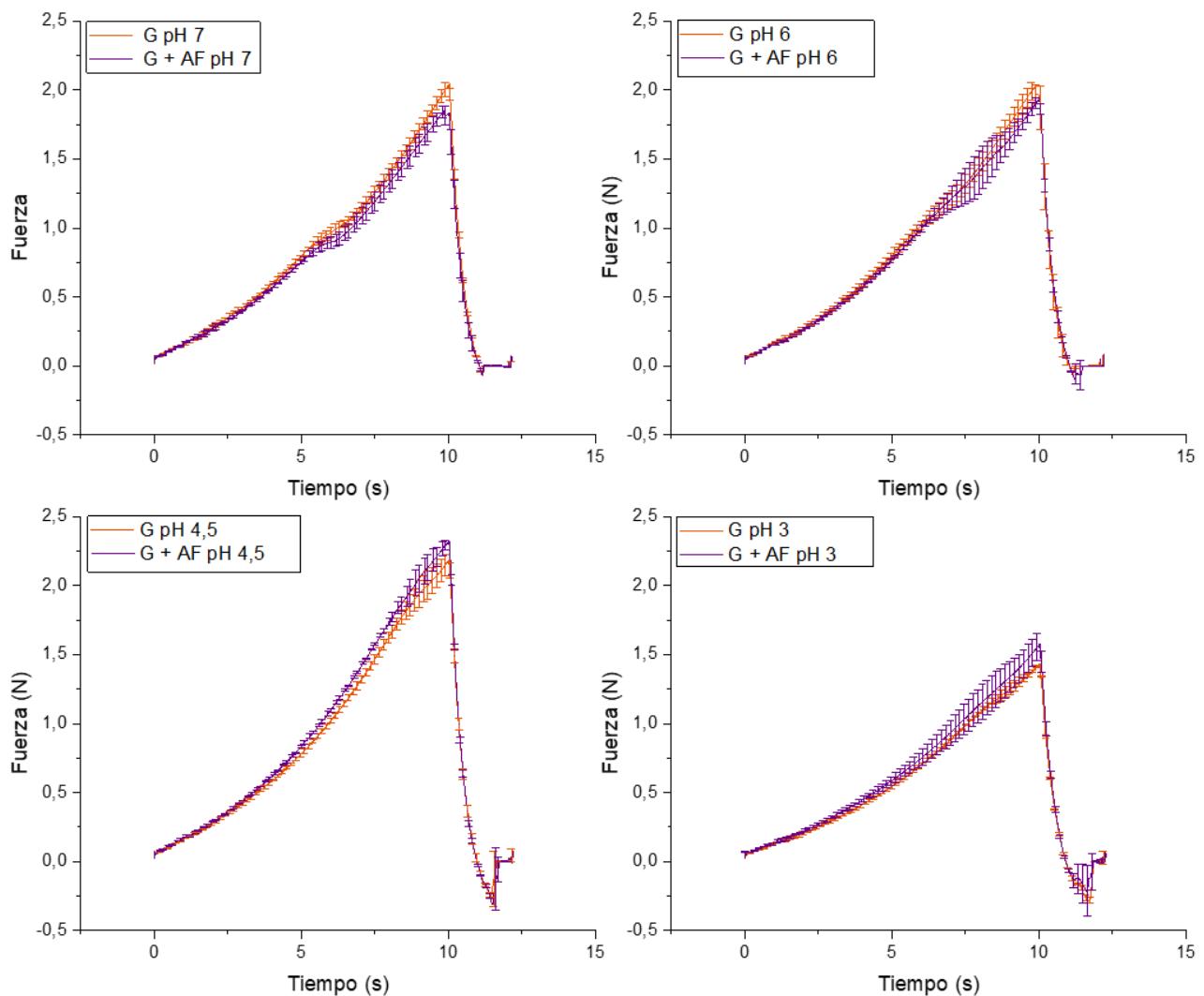
Muestra	$T_{gel}$ (°C)	$\Delta H_{gel}$ (J/g)	$T_{fus}$ (°C)	$\Delta H_{fus}$ (J/g)
<b>G pH 7</b>	$19,84 \pm 1,39^a$	$-1,16 \pm 0,08^a$	$28,73 \pm 2,01^a$	$2,31 \pm 0,16^b$
<b>G+AF pH 7</b>	$19,52 \pm 1,37^a$	$-1,04 \pm 0,07^a$	$28,58 \pm 2,00^a$	$2,20 \pm 0,15^b$
<b>G pH 3</b>	$17,43 \pm 1,22^a$	$-1,06 \pm 0,07^a$	$25,74 \pm 1,80^a$	$1,65 \pm 0,12^a$
<b>G+AF pH 3</b>	$16,69 \pm 1,17^a$	$-1,12 \pm 0,08^a$	$25,07 \pm 1,76^a$	$1,64 \pm 0,11^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4. Textura de geles

A continuación, se prepararon geles de G (2,5% p/p) y de G + AF (2,5% / 0,0125% p/p) a pH 3; 4,5; 6 y 7, y luego de ser almacenados por 24 h a 4 °C, su textura fue evaluada mediante un ensayo de penetración. En la Figura IV.5., se observa la evolución de la fuerza en función del tiempo durante el ensayo, para todos los geles evaluados. Los parámetros elegidos para comparar los distintos sistemas fueron la fuerza del gel, definido como la fuerza máxima durante la penetración y la firmeza del gel, definida como la pendiente inicial de la curva de penetración en los primeros 2 s (Fiszman y Salvador 1999).

Todos los geles mostraron un rápido aumento de la fuerza durante un corto período de tiempo a medida que la sonda se desplazaba hacia el interior de las muestras, aunque la pendiente inicial mostró variaciones en algunos casos.



**Figura IV.5.** Fuerza de penetración en geles de G y G + AF a distintos pHs en el rango 3-7.

En la Tabla IV.3. se resumen los valores de fuerza y firmeza de gel obtenidos para todos los sistemas. Se observa que a pH 3, tanto la fuerza como la firmeza de los geles de G fue significativamente menor que a pH 7, 6 y 4,5. La baja pendiente inicial indicó que los geles a pH 3 se deforman fácilmente y tienden a fluir más que a romperse. Estos resultados guardan correspondencia con los obtenidos mediante reología dinámica, en los cuales se observó una gran disminución de la viscoelasticidad a este pH lo cual muestra un incremento del carácter viscoso. Similares resultados han sido reportados para geles de gelatina por numerosos

autores (Fiszman y Salvador 1999; Pang et al. 2014; Morales et al. 2016) y lo atribuyen a cambios en las interacciones electrostáticas del sistema.

**Tabla IV.3.** Valores de fuerza y firmeza obtenidos mediante un ensayo de penetración para los distintos sistemas de G pura y G + AF.

Muestra	Fuerza (N)	Firmeza (N/mm)
<b>G pH 7</b>	$2,04 \pm 0,05^d$	$0,111 \pm 0,010^{bc}$
<b>G + AF pH 7</b>	$1,89 \pm 0,03^c$	$0,108 \pm 0,008^{bc}$
<b>G pH 6</b>	$2,05 \pm 0,03^d$	$0,109 \pm 0,006^{bc}$
<b>G + AF pH 6</b>	$1,94 \pm 0,03^c$	$0,102 \pm 0,002^b$
<b>G pH 4,5</b>	$2,18 \pm 0,06^e$	$0,115 \pm 0,006^c$
<b>G + AF pH 4,5</b>	$2,32 \pm 0,02^f$	$0,116 \pm 0,005^c$
<b>G pH 3</b>	$1,44 \pm 0,01^a$	$0,079 \pm 0,007^a$
<b>G + AF pH 3</b>	$1,58 \pm 0,10^b$	$0,082 \pm 0,005^a$

Diferentes letras indican una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, a pH 4,5 se observa un leve incremento en la fuerza del gel y en la firmeza respecto de los otros valores de pH estudiados, aunque en este último parámetro, no se hallaron diferencias significativas por la presencia del AF ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar que las diferencias medidas, en todos los casos, fueron menores al 10%, las cuales, en la práctica, serían despreciables.

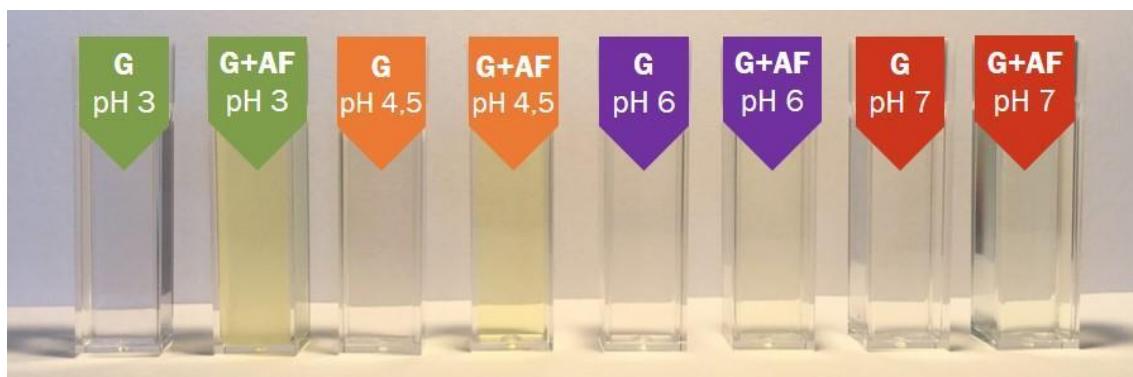
Además de los parámetros descriptos, otra característica importante que se puede analizar en las curvas de penetrometría es el punto de ruptura, que es una medida de la fracturabilidad del gel. Como puede observarse en la Figura IV.5., no se advirtió ningún punto de ruptura para los geles analizados y la fuerza de penetración siguió aumentando hasta finalizar el ensayo a los 10 s, lo que indica que los geles no tenían fracturabilidad. A pH 7, tanto el perfil del gel de G pura como el de G + AF mostraron un hombro a aproximadamente 6 s, lo que indicó que tenía una resistencia inicial a la penetración; sin embargo, esto se consideró como un punto de ruptura cuestionable porque la fuerza de penetración no mostró una disminución aparente después de este punto. La pequeña inflexión

también indicó un cambio estructural que no fue lo suficientemente fuerte como para romper el gel. Esta diferencia en el perfil de penetración de los geles a pH 7 podría estar relacionada con la cercanía al punto isoeléctrico (7,5). La agregación molecular podría deberse a la fuerte atracción de grupos con carga opuesta en las cadenas de gelatina alrededor del *pI* (Boedtker y Doty 1954), lo que da lugar a geles más frágiles. Estas observaciones concuerdan con estudios previos de Pang et al. (2014) y Salvador y Fiszman (1998), aunque se obtuvieron diferentes perfiles de textura debido a que se utilizaron diferentes tipos de gelatina y condiciones experimentales.

#### IV.5. Turbidez de geles

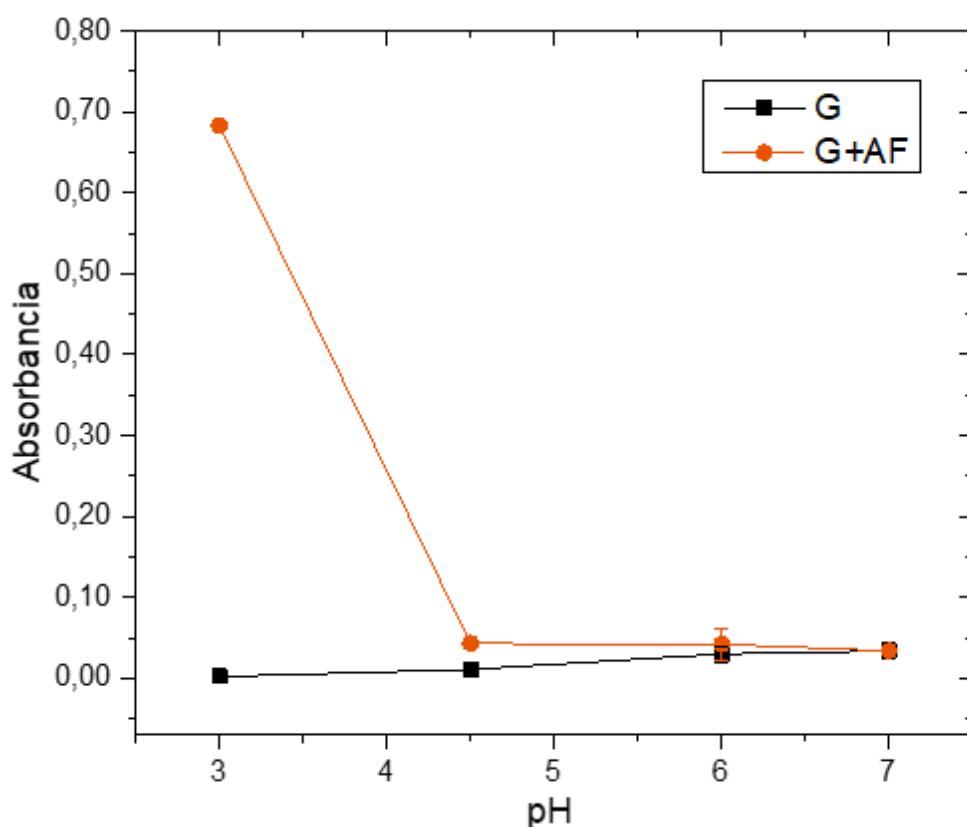
La influencia del AF sobre la turbidez de los geles de G (2,5% p/p) y de G + AF (2,5% / 0,0125% p/p) fue analizada mediante un espectrofotómetro UV/Visible T70 (PG Instruments Ltd., Reino Unido), a 550 nm, de acuerdo con Lau et al. (2000). Las mediciones de absorbancia se realizaron por duplicado sobre los geles contenidos en cubetas de poliestireno, 24 h después de su elaboración, almacenados a 4 °C (pH 3; 4,5; 6 y 7). La temperatura de medición fue de 10-12 °C (temperatura habitual de consumo de la gelatina).

La Figura IV.6 muestra la apariencia de los geles de G con y sin AF. Puede destacarse, que el AF confiere una ligera coloración amarilla a los geles a pH ácido.



**Figura IV.6.** Apariencia de geles de G (2,5% p/p) y de G + AF (2,5% / 0,0125% p/p) a distintos pHs

La Figura IV.7. resume los resultados obtenidos mediante espectrofotometría para todas las muestras analizadas. Los geles de G pura mostraron un ligero incremento en la turbidez con el aumento del pH. A pH 7, la G se encuentra muy cercana a su punto isoeléctrico (7,5), por lo cual es esperado un aumento en la turbidez debido a la agregación hélice-hélice (Schrieber y Gareis 2007). Walkenstrom y Hermansson (1996) han reportado, también, sobre una tendencia hacia la opacidad para un gel de gelatina a pH 7,5. Y explicaron que este comportamiento se debía a la proximidad al  $pI$  de la muestra de gelatina, estando éste, cerca de pH 7,5. En esa situación, así como en el presente trabajo, la repulsión en el sistema es pequeña a este valor de pH y, por lo tanto, la tendencia a la agregación es alta.



**Figura IV.7.** Turbidez de geles de G y G+AF (Abs a 550 nm) a distintos pHs en el rango 3-7

Con respecto a los geles conteniendo AF a pH 6 y 7, no se hallaron diferencias significativas debido a la presencia de la vitamina, mientras que a pH 3, el AF tuvo un efecto negativo, aumentando la turbidez de los geles. Este efecto se debería a la presencia de agregados de G + AF de mayor tamaño, que son formados debido a la interacción con la vitamina previo a la gelificación de la gelatina, tal como fue demostrado en el Capítulo I de la presente tesis. Cabe destacar que el aumento de la turbidez se produce cuando la luz se dispersa y el sensor del espectrofotómetro detecta una intensidad de luz más baja. En la mayoría de los casos, la turbidez del gel es causada por la dispersión de la luz por partículas atrapadas dentro de la matriz del gel (Kitabatake et al. 1994). Kasapis et al. (1993), por su parte, indicaron que la turbidez de geles mixtos de gelatina/ maltodextrina puede ser causada por una asociación intermolecular que implica una agregación hélice-hélice masiva. Basándose en las propiedades ópticas de los geles de  $\beta$ -lactoglobulina, Paulsson y colaboradores (1990) afirmaron que los geles transparentes de proteínas consistían en una red molecularmente homogénea, mientras que los geles no transparentes consistían en partículas coloidales o agregados. El estudio de agregados de miosina usando microscopía de contraste de fase reveló que el aumento de la turbidez de las soluciones de miosina de pescado calentadas fue causado por la formación de más y mayores agregados (Gill et al. 1992).

#### IV.6. Conclusiones

En términos generales, no se observaron grandes diferencias en los parámetros reológicos debido a la presencia de la vitamina. La única excepción fueron el  $G'_{fin}$  y la tan  $\delta_{fin}$ , que mostraron, a pH 4,5, un incremento en la muestra con AF respecto a la gelatina pura. Estas diferencias podrían atribuirse a que, a este pH, el balance global de cargas entre el AF y la proteína favorecería la asociación de las cadenas de gelatina para la formación de más triples hélices respecto a la proteína sola.

Asimismo, todos los geles a pH 3 mostraron un menor carácter sólido, menor  $T_{gel}$  y propiedades texturales ligeramente más pobres, debido a un incremento en la repulsión electrostática que interferiría en las uniones hélice-hélice y la consolidación del gel.

En lo que respecta a la turbidez de los geles, no se hallaron diferencias significativas debido a la presencia de la vitamina a pH 7, 6 y 4,5, mientras que a pH 3, el AF tuvo un efecto ligeramente negativo, aumentando la turbidez de estos.

Cabe destacar que, las diferencias encontradas en las propiedades funcionales de la gelatina por la interacción con AF son mínimas y, por lo tanto, a los fines tecnológicos, pueden ser despreciadas y, en todo caso, si son consideradas, éstas representaron mejoras en sus características reológicas y de textura.

#### IV.7. Referencias

- Bello J, Bello HR, Vinograd JR. 1962. The mechanism of gelation of gelatin. The influence of pH, concentration, time and dilute electrolyte on the gelation of gelatin and modified gelatins. *Biochim. Biophys. Acta* 57:214-221.
- Boedtker H, Doty P. 1954. A Study of Gelatin Molecules, Aggregates and Gels. *J. Phys. Chem.* 58:968-983.
- Bohidar HB, Jena SS. 1993. Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatin. *J. Chem. Phys.* 98:8970-8977.
- Djabourov M, Leblond J, Papon P. 1988. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *J. Phys.* 49:319-332.
- Djabourov M, Lechaire J-P, Gaill F. 1993. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology* 30:191-205.
- Eagland D, Pilling G, Wheeler RG. 1974. Studies of the collagen fold formation and gelation in solutions of a monodisperse alpha gelatin. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*:181-200.
- Elharfaoui N, Djabourov M, Babel W. 2007. Molecular Weight Influence on Gelatin Gels: Structure, Enthalpy and Rheology. *Macromol. Symp.* 256:149-157.
- Fiszman SM, Salvador A. 1999. Effect of gelatine on the texture of yoghurt and of acid-heat-induced milk gels. *Z. Für Leb. -Forsch. A* 208:100-105.
- Gill TA, Chan JK, Phonchareon KF, Paulson AT. 1992. Effect of salt concentration and temperature on heat-induced aggregation and gelation of fish myosin. *Food Res. Int.* 25:333-341.
- Gornall JL, Terentjev EM. 2007. Concentration-Temperature Superposition of Helix Folding Rates in Gelatin. *Phys. Rev. Lett.* 99:028304.
- Kasapis S, Morris ER, Norton IT, Clark AH. 1993. Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems — Part I: gelation of individual components. *Carbohydr. Polym.* 21:243-248.
- Kitabatake N, Doi E, Kinekawa Y-I. 1994. Simple and Rapid Method for Measuring Turbidity in Gels and Sols from Milk Whey Protein. *J. Food Sci.* 59:769-772.
- Kornyshev AA, Lee DJ, Leikin S, Wynveen A. 2007. Structure and interactions of biological helices. *Rev. Mod. Phys.* 79:943-996.
- Lau MH, Tang J, Paulson AT. 2000. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. *Food Res. Int.* 33:665-671.

- Michon C, Cuvelier G, Launay B. 1993. Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheol. Acta* 32:94-103.
- Morales R, Martinez MJ, Pilosof AMR. 2016. Dynamics of gelation, textural and microstructural properties of gelatin gels in the presence of casein glycomacropeptide. *Food Res. Int.* 84:102-107.
- Pang Z, Deeth H, Sopade P, Sharma R, Bansal N. 2014. Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. *Food Hydrocoll.* 35:484-493.
- Paulsson M, Dejmek P, Van Vliet T. 1990. Rheological Properties of Heat-Induced  $\beta$ -Lactoglobulin Gels. *J. Dairy Sci.* 73:45-53.
- Pelc D, Marion S, Požek M, Basletić M. 2013. Role of microscopic phase separation in gelation of aqueous gelatin solutions. *Soft Matter* 10:348-356.
- Qiao C, Wang X, Zhang J, Yao J. 2021. Influence of salts in the Hofmeister series on the physical gelation behavior of gelatin in aqueous solutions. *Food Hydrocoll.* 110:106150.
- Salvador A, Fiszman SM. 1998. Textural Characteristics and Dynamic Oscillatory Rheology of Maturation of Milk Gelatin Gels with Low Acidity. *J. Dairy Sci.* 81:1525-1531.
- Sarabia AI, Gómez-Guillén MC, Montero P. 2000. The effect of added salts on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. *Food Chem.* 70:71-76.
- Schrieber R, Gareis H. 2007. From Collagen to Gelatine. En: *Gelatine Handbook*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 45-117. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527610969.ch2/summary>
- Walkenström P, Hermansson A-M. 1996. Fine-stranded mixed gels of whey proteins and gelatin. *Food Hydrocoll.* 10:51-62.
- Wu B, Siglreitmeier M, Debus C, Schwahn D, Cölfen H, Pipich V. 2018. Ionic Dependence of Gelatin Hydrogel Architecture Explored Using Small and Very Small Angle Neutron Scattering Technique. *Macromol. Biosci.* 18:e1800018.
- Xing Q, Yates K, Vogt C, Qian Z, Frost MC, Zhao F. 2014. Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal. *Sci. Rep. [Internet]* 4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3988488/>
- Yoshimura K, Terashima M, Hozan D, Ebato T, Nomura Y, Ishii Y, Shirai K. 2000. Physical Properties of Shark Gelatin Compared with Pig Gelatin. *J. Agric. Food Chem.* 48:2023-2027.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

## Conclusiones generales

En este trabajo se demostró que tanto la  $\beta$ -lactoglobulina como la gelatina resultaron vehículos eficientes para el ácido fólico mediante interacciones iónicas a pH 3, en forma de nano o micropartículas que pueden tener aplicación práctica en alimentos ácidos. Ejemplo de ellos serían bebidas o alimentos semisólidos, como los postres de gelatina y yogures. El tamaño de estos *carriers* puede ser modulado por la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad.

El mayor beneficio de los *carriers* proteicos fue disminuir la fotodegradación que podría sufrir el ácido fólico durante el almacenamiento de los alimentos a los cuales se podría agregar, siendo la gelatina mucho más eficiente para evitar su deterioro.

La reversibilidad de la interacción proteína/AF ante el cambio de pH, resultó una característica favorable para la protección de la vitamina durante el tránsito gastrointestinal asegurando su liberación en el intestino delgado (pH 7) donde es absorbido. Se verificó que el ácido fólico de los nano/micro *carriers* proteicos es bioaccesible en el sitio de absorción y, en particular, es biodisponible para *Lactobacillus rhamnosus*.

La gelatina sería la alternativa más viable como *carrier* de AF por su bajo costo, alta disponibilidad, baja alergenicidad y alta protección ante la fotodegradación. Una de las características tecnológicas más importantes de la gelatina en alimentos es su capacidad de formar geles viscoelásticos, transparentes y termoreversibles. Se corroboró que su interacción con el ácido fólico no afecta estas funcionalidades por lo cual se concluye que la gelatina constituye un *carrier* accesible y de posible aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales fortificados con ácido fólico.