

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

**“Efectos de algunos tratamientos sobre la capacidad de
formación de nanopartículas de α -lactalbúmina bovina”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA

M. en C. IZLIA JAZHEEL ARROYO MAYA

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Humberto Hernández Sánchez

Dr. Andrés Hernández Arana



México, D.F. Enero 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 12:00 horas del día 07 del mes de septiembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Alimentos para examinar la tesis de titulada:

Efectos de algunos tratamientos sobre la capacidad de formación de nanopartículas de α -lactalbúmina bovina.

Presentada por el alumno:

ARROYO

Apellido paterno

MAYA

Apellido materno

IZLIA JAZHEEL

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	4	9	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

Dr. Humberto Hernández Sánchez

Dr. Andrés Hernández Arana

Dra. Liliana Alamilla Beltrán

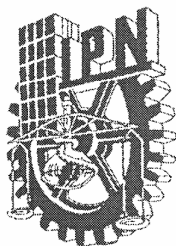
Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio

Dr. Reynold Ramón Farrera Rebollo

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Manuel Jesús Piñón López

S. E. P.
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado
e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 05 del mes de septiembre del año 2011, el (la) que suscribe **Arroyo Maya Izlia Jazheel** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **A080496**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Humberto Hernández Sánchez y Dr. Andrés Hernández Arana** y ceden los derechos del trabajo intitulado: **"Efectos de algunos tratamientos sobre la capacidad de formación de nanopartículas de α -lactalbúmina bovina"**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: izlia27@yahoo.com.mx hhernan55@yahoo.com.mx aha@xanum.uam.mx ; si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

M. en C. Izlia Jazheel Arroyo Maya
Alumno

Vo. Bo

Dr. Humberto Hernández Sánchez
Director (a) de Tesis

Dr. Andrés Hernández Arana
Director (a) de Tesis



Effects of high hydrostatic pressure on the structure of bovine α -lactalbumin

J. O. Rodiles-López,* I. J. Arroyo-Maya,* M. E. Jaramillo-Flores,* G. F. Gutiérrez-López,*
A. Hernández-Arana,† G. V. Barbosa-Cánovas,‡ K. Niranjana,§ and H. Hernández-Sánchez*¹

*Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala, CP. 11340, México, DF, México

†Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, DF, México

‡Department of Biological Systems Engineering, Washington State University, Pullman 99164-6120

§School of Food Biosciences, University of Reading, Reading, United Kingdom

ABSTRACT

The effects of high hydrostatic pressure (HHP) processing (at 200 to 600 MPa, 25 to 55°C, and from 5 to 15 min) on some structural properties of α -lactalbumin was studied in a pH range of 3.0 to 9.0. The range of HHP processes produced a variety of molten globules with differences in their surface hydrophobicity and secondary and tertiary structures. At pH values of 3 and 5, there was a decrease in the α -helix content concomitant with an increase in β -strand content as the pressure increased. No changes in molecular size due to HHP-induced aggregation were detected by sodium dodecyl sulfate-PAGE. All samples showed higher thermostability as the severity of the treatment increased, indicating the formation of a less labile structure related to the HHP treatment.

Key words: α -lactalbumin, high hydrostatic pressure, molecular property, protein structure

INTRODUCTION

The processes in which products are submitted to pressures from 200 to 800 MPa are known as high hydrostatic pressure (HHP) technologies. In general, the process is batch operated and applied to several liquid and semisolid prepacked foods and food ingredients. High-pressure processing is carried out in 3 steps as follows: an initial period required for reaching the treatment pressure or come-up time, the time of processing at the desired pressure or holding time, and finally, a short time necessary for releasing the pressure or release time (Hogan et al., 2005). Such HHP processes are very effective for inactivation of vegetative microorganisms but less effective for certain bacterial spores and some enzymes (Devlieghere et al., 2004).

In the case of proteins, it has been reported that covalent bonds are not affected by HHP, thus maintaining intact primary structure under normal HHP operating conditions. However, secondary, tertiary, and quaternary structures are affected to different extents. In the range of 100 to 300 MPa, these changes are reversible, but pressures >300 MPa can bring on irreversible denaturation (Rastogi et al., 2007). Very high pressures (>700 MPa) can induce irreversible denaturation by disrupting the secondary structure of the proteins (Balny and Masson, 1993). Tertiary structure undergoes changes at pressures >200 MPa because of alterations in hydrophobic and ionic bonds, whereas quaternary structure, which depends on noncovalent unions, is affected by pressures of 100 to 150 MPa (Huppertz et al., 2004). These changes in the protein structure have profound effects on a protein's functionality and on its possible food applications (Krešić et al., 2006). In general, HHP-induced changes in proteins are dependent on additional parameters such as temperature, pH, the solvent used for processing, and the final state of the protein preparation (Nabhan et al., 2004).

Whey proteins have been used as food ingredients because of their functional properties, and HHP-induced changes may improve these properties for different applications in the food industry (López-Fandiño, 2006). α -Lactalbumin is one of the main components of whey protein, and its role in lactose biosynthesis is well documented. The concentration of α -LA in cow milk varies from 1.2 to 1.5 g/L, and it is the second largest component by concentration (20%) in the whey protein fraction after β -LG. α -Lactalbumin has 4 intramolecular disulfide bonds with no free thiol groups (Farrell et al., 2004) and shows the best characterized molten globule (MG) state, which is highly stable and is therefore a favorite model for studying the folding of proteins. The MG is the partially folded state of a protein that resembles the intermediate structure formed during the protein folding process. These MG are also referred to as proteins in a semidenatured state. α -Lactalbumin can form MG under different conditions, including a low pH

Received October 1, 2009.

Accepted December 24, 2009.

¹Corresponding author: hhernan1965@yahoo.com

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por haberme permitido formar parte en sus filas y continuar con mi realización profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la llevar a cabo éste trabajo de Investigación (No. de becario 205169).

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por la beca otorgada a través de proyectos 20080955 y 20090583 dirigidos por el Dr. Humberto Hernández Sánchez.

A mis directores de tesis:

Dr. Humberto Hernández Sánchez gracias por el tiempo, la paciencia y amistad que encontré en ti.

Dr. Andrés Hernández Arana agradezco el apoyo y la buena disposición durante todo este tiempo.

A mi comité tutorial por todas las atenciones que me han brindado, sus aportaciones a éste trabajo son invaluable:

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

Dra. Liliana Alamilla Beltrán

Dr. Antonio Aparicio Jiménez

Dr. Reynold Farrera Rebollo

DEDICATORIAS

A mis padres Martha y Víctor por ser un ejemplo de amor y perseverancia gracias por estar siempre a mi lado.

A mis hermanas Paulina, Cristina y Grecia por todo su amor y por los buenos momentos.

A toda mi familia, me siento tan afortunada de pertenecer a ustedes.

A Luis, gracias por todo este tiempo.

A mis amigos, que tengo el privilegio de tener muchos, les agradezco cada experiencia que nos ha tocado vivir juntos... y las que faltan. Su amistad es muy valiosa para mí.

Y de manera muy especial dedico ésta tesis a mi querido tío Guillermo. Agradezco a Dios por tenerte en mi familia y seguiremos juntos siempre.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Nanotecnología	1
1.2 Aplicaciones de la Nanotecnología en la Industria Alimentaria	3
1.3 Nanopartículas	8
1.4 Nanopartículas de Proteína	10
1.5 Proteínas de la Leche	11
1.5.1 α-Lactalbúmina	11
1.5.2 Estabilidad de la α-Lactalbúmina	14
1.6 Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP)	15
1.7 Actividad Antioxidante	18
2. Justificación	20
3. Hipótesis	21
4. Objetivo General	21
4.1 Objetivos Específicos	21
5. Materiales y Métodos	22
5.1 Materia Prima	22
5.2 Reactivos y Material de Laboratorio	22
5.3 Equipo	22
5.4 Desarrollo Experimental	23
5.5 Metodología	24
5.5.1 Dicroísmo Circular (DC)	24
5.5.2 Preparación de las Nanopartículas de α-Lactalbúmina bovina	25
5.5.3 Determinación de la proteína no ensamblada en Nanopartículas después de la Desolvatación (Proteína soluble)	26
5.5.4 Microscopia Electrónica de Transmisión	26
5.5.5 Caracterización de las Nanopartículas de α-Lactalbúmina bovina	27
5.5.6 Potencial Zeta	28
5.5.7 Hidrofobicidad Superficial	29

5.5.8 Digestibilidad de las Nanopartículas por Simulación del Tracto Gastrointestinal	29
5.5.9 Determinación de la Actividad Antioxidante de la α -Lactalbúmina y de las Nanopartículas Utilizando el Compuesto ABTS ⁺	30
6. Resultados y Discusión	32
6.1 Estudios de Dicroísmo Circular (DC): Determinación del Impacto del Tratamiento con HHP en la Termoestabilidad de la α -Lactalbúmina	32
6.2 Nanopartículas de α -Lactalbúmina y su Análisis por MET	35
6.3 Proteína no ensamblada en Nanopartículas después de la Desolvatación	38
6.4 Tamaño de Nanopartícula (Diámetro Hidrodinámico)	40
6.5 Peso Molecular de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	43
6.6 Densidad de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	44
6.7 Potencial Zeta de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	47
6.8 Hidrofobicidad Superficial de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	53
6.9 Simulación de la Digestibilidad de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	58
6.10 Actividad Antioxidante de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	63
7. Conclusiones	67
8. Bibliografía	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicaciones de la Nanotecnología en la Industria Alimentaria	2
Figura 2. Mecanismos de Absorción de Moléculas Bioactivas	9
Figura 3. Micrografías de Nanopartículas de α -Lactalbúmina	10
Figura 4. Preparación de Nanopartículas de α -Lactalbúmina	11
Figura 5. Estructura de la α -Lactalbúmina	13
Figura 6. Diagrama de Desarrollo Experimental	23
Figura 7. Espectropolarímetro Jasco J-715	24
Figura 8. Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol JEM1010	26
Figura 9. Cambios en la Señal de DC de la α -Lactalbúmina (T) a pH 7	32
Figura 10. Cambios en la Señal de DC de la α -Lactalbúmina (CP) a pH 7	33
Figura 11. Cambios en la Señal de DC de la α -Lactalbúmina (17) a pH 7	33
Figura 12. Nanopartículas Preparadas por el Método de Desolvatación Utilizando Acetona como Agente Desolvatante	36
Figura 13. Nanopartículas Preparadas por el Método de Desolvatación Utilizando Etanol como Agente Desolvatante	36
Figura 14. Nanopartículas Preparadas por el Método de Desolvatación Utilizando Isopropanol como Agente Desolvatante	36
Figura 15. Nanopartículas Preparadas por el Método de Desolvatación Utilizando Acetona como Agente Desolvatante	37
Figura 16. Nanopartículas Preparadas por el Método de Desolvatación Utilizando Etanol como Agente Desolvatante	37
Figura 17. Nanopartículas Preparadas por el Método de Desolvatación Utilizando Isopropanol como Agente Desolvatante	37
Figura 18. Curva Estándar de α -Lactalbúmina	38
Figura 19. Variación del Potencial Zeta de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina con respecto al pH	47

Figura 20. Valores de Diámetro Hidrodinámico (Z-average) de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina preparadas en diferentes condiciones	51
Figura 21. Valores de Potencial Zeta para las Nanopartículas de α -Lactalbúmina preparadas en diferentes condiciones	51
Figura 22. Relación entre el Diámetro Hidrodinámico y el Potencial Zeta	52
Figura 23. Valores de Hidrofobicidad Superficial de las Nanopartículas y de la Proteína sin ensamblar (ALA) a pH de 3	56
Figura 24. Valores de Hidrofobicidad Superficial de las Nanopartículas y de la Proteína sin ensamblar (ALA) a pH de 5	56
Figura 25. Valores de Hidrofobicidad Superficial de las Nanopartículas y de la Proteína sin ensamblar (ALA) a pH de 7	57
Figura 26. Valores de Hidrofobicidad Superficial de las Nanopartículas y de la Proteína sin ensamblar (ALA) a pH de 9	57
Figura 27. Simulación de Digestibilidad Gástrica de Nanopartículas de α -Lactalbúmina Tratada con HHP y con TT	58
Figura 28. Simulación de Digestibilidad Gástrica de Nanopartículas de α -Lactalbúmina Tratada con HHP y sin TT	59
Figura 29. Simulación de Digestibilidad Gástrica de Nanopartículas de α -Lactalbúmina nativa y con TT	59
Figura 30. Simulación de Digestibilidad Gástrica de Nanopartículas de α -Lactalbúmina nativa y sin TT	60
Figura 31. Simulación de Digestibilidad Intestinal de Nanopartículas de α -Lactalbúmina Tratada con HHP y con TT	60
Figura 32. Simulación de Digestibilidad Intestinal de Nanopartículas de α -Lactalbúmina Tratada con HHP y sin TT	61
Figura 33. Simulación de Digestibilidad Intestinal de Nanopartículas de α -Lactalbúmina nativa y con TT	61
Figura 34. Simulación de Digestibilidad Intestinal de Nanopartículas de α -Lactalbúmina nativa y sin TT	62
Figura 35. Variación de la Actividad Antiradical Libre Expresada	63

como Disminución de la Absorbancia a 734 nm de la Suspensión de Nanopartículas Preparadas a partir de Proteína Nativa y Tratada con HHP sin TT

Figura 36. Variación de la Actividad Antiradical Libre Expresada como Disminución de la Absorbancia a 734 nm de la Suspensión de Nanopartículas Preparadas a partir de Proteína Nativa y Tratada con HHP con TT 64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ejemplos de Investigación en Nanotecnología	5
Cuadro 2. Análisis Químico de la α -Lactalbúmina	22
Cuadro 3. Valores de Temperatura Media de Desnaturalización (Tm) de la α -Lactalbúmina bajo Diferentes Condiciones de Tratamiento con HHP y a Diferentes Valores de pH	34
Cuadro 4. Rendimiento en la Preparación de Nanopartículas de α -Lactalbúmina Nativa y Tratada con HHP sin TT	39
Cuadro 5. Rendimiento en la Preparación de Nanopartículas de α -Lactalbúmina Nativa y Tratada con HHP con TT	39
Cuadro 6. Efecto de Algunos Tratamientos en el Tamaño de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	41
Cuadro 7. Peso Molecular de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina Determinado por Difusión Estática de Luz	44
Cuadro 8. Valores de Densidad de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina	45
Cuadro 9. Comparación de Algunas Características de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina y Micelas de Caseína	46
Cuadro 10. Valores de Potencial Zeta para los Diferentes Sistemas de Nanopartículas	49
Cuadro 11. Valores de Hidrofobicidad Superficial de los Diferentes Sistemas de Nanopartículas Determinada con el Reactivo ANS	55
Cuadro 12. Valores de Actividad Antioxidante de la α -Lactalbúmina y de las Nanopartículas Preparadas a partir de la Proteína Nativa y Tratada con HHP sin TT y Expresados como mMol equivalentes de Trolox	65
Cuadro 13. Valores de Actividad Antioxidante de la α -Lactalbúmina y de las Nanopartículas Preparadas a partir de la Proteína Nativa y Tratada con HHP con TT y Expresados como mMol equivalentes de Trolox	66

RESUMEN

La proteína α -lactalbúmina (α -LA) es una de las principales proteínas presentes en la leche, comprendiendo el 20 % del total de las proteínas del suero. Posee cuatro puentes disulfuro, además, es fundamental en para la biosíntesis de lactosa. La α -lactalbúmina es una proteína con una alta proporción de aminoácidos esenciales como el triptófano, lisina y cisteína comparada con otras proteínas de la leche. Las proteínas del suero son utilizadas en la industria alimentaria principalmente debido a su valor nutritivo y a sus propiedades funcionales. Las propiedades funcionales más importantes de estas proteínas son solubilidad, viscosidad, formación de gel, emulsificación, espumado y como muchas otras albúminas, capacidad de formación de nanopartículas, las cuales se definen como dispersiones de partículas o partículas sólidas con un diámetro en un intervalo de 10 a 1000 nm. Las nanopartículas de proteína poseen interesantes propiedades fisicoquímicas como tamaño, potencial de superficie, equilibrio hidrofóbico-hidrofílico, liberación controlada y características de degradación de las partículas. Éstas también son biodegradables, no antigénicas, metabolizables y fácilmente modificables al alterar la superficie y fijar covalentemente otras moléculas. Estas son algunas de las razones para considerar a las nanopartículas de proteína como potenciales acarreadores de ingredientes bioactivos como péptidos, vitaminas, antioxidantes, etc. Hay dos métodos para la preparación de nanopartículas de proteína: emulsificación y desolvatación. Los métodos basados en emulsificación tienen la desventaja en el uso de disolventes orgánicos para la remoción de los residuos lipídicos y los emulsificantes utilizados en el proceso. Una alternativa es el método de desolvatación, el cual se deriva del método de microencapsulación por coacervación. Este método toma ventaja de la desolvatación que ocurre después de la adición de un agente desolvatante (alcohol, acetona o una sal inorgánica) a altas concentraciones. Esta adición normalmente conduce a la coacervación y se microcapsulas son formadas por este proceso. Sin embargo, si la adición del agente desolvatante se suspende poco después de la separación de fases, las moléculas se encuentran estrechamente empacadas y una conformación

enrollada se puede fijar con glutaraldehído, así ésta estructura se puede mantener y dar lugar a la formación de nanopartículas. La mayoría de las nanopartículas preparadas por este método poseen tamaño subcelular y por lo tanto, tienen potencial para liberar compuestos funcionales especialmente poco solubles como lípidos o antioxidantes hidrofóbicos dentro de las células. Las propiedades de las nanopartículas de proteína preparadas por el método de desolvatación son afectadas por muchos factores como pH, temperatura, velocidad de agitación. Sin embargo, otros factores como los pretratamientos dados a la proteína también son importantes. Se ha visto que tratamientos con alta presión hidrostática (HHP) tiene una fuerte influencia sobre la estructura y las propiedades funcionales de la α -lactalbúmina, así que es posible que la capacidad de formación de nanopartículas también se vea afectada. Además, el tipo de agente desolvatante, tratamiento térmico o el tratamiento con HHP previo al proceso de desolvatación son parámetros que pueden influenciar la estructura y propiedades de las nanopartículas de α -lactalbúmina.

ABSTRACT

Bovine α -lactalbumin is one of the main proteins in cheese whey, making up approximately 20 % of the total protein. It is then, quantitatively, the second most important protein in whey possesses four intramolecular disulfide bonds without free thiol groups and has a fundamental role in lactose biosynthesis. α -lactalbumin is a protein with relatively high proportions of essential amino acids such as tryptophan, lysine and cysteine compared to other milk proteins. Whey proteins are commonly used in the food industry due to their nutritive value and functional properties. The most important functional properties of these proteins are solubility, viscosity, gel formation, emulsification, foaming and like many other albumins, nanoparticle formation capacity. Nanoparticles of bovine α -lactalbumin prepared by desolvation and ensuing glutaraldehyde crosslinking are promising Carriers for bioactive compounds in foods. The objective of this work was to study the effect of the kind of desolvating agent (acetone, ethanol or isopropanol) and the use of a heat or high pressure treatment step previous to the desolvation process on the structure and properties of α -lactalbumin nanoparticles. In all cases, a high average particle yield of 99.63% was obtained. Smaller sizes (152.3 nm) can be obtained with the use of acetone as the desolvating agent and without any pretreatments. These nanoparticles with a pI of 3.61 are very stable at pH values above 4.8, based on their zeta potential, although their antioxidant activity is weak. The use of isopropanol produced the biggest nanoparticles (293.4-324.9 nm) in all cases. All the types of nanoparticles are easily degraded by the proteolytic enzymes assayed, so the design of stabilizing coatings could be necessary for an adequate targeted bioactive compounds delivery.

1. Introducción

1.1 Nanotecnología

Los organismos vivos no son sólo un conjunto de materiales a escala nanométrica: sus átomos y moléculas están organizados en estructuras superiores y sistemas dinámicos que son el resultado de millones de años de evolución. Iones con un diámetro de 0.1 nm como sodio y potasio generan impulsos nerviosos. El tamaño de biomoléculas (azúcares, aminoácidos, hormonas y ADN) están en el orden de los nanómetros. La mayoría de las moléculas de proteínas y polisacáridos tienen dimensiones nanométricas. Cada organismo en la tierra existe por la presencia, ausencia, concentración, localización e interacción de estas nanoestructuras. La naturaleza hace extensivo el uso de los principios de autoensamblaje para crear estructuras a escala nanométrica. Mas que requerir grandes cantidades de energía libre para la creación y ensamblaje, las nanoestructuras se forman a través de una serie de procesos optimizados que permiten reducir la energía libre total al minimizar la energía de activación requerida.

Nanociencia y nanotecnología se definen como el entendimiento y la manipulación de materiales a escalas atómica, molecular y macromolecular. Además, la nanotecnología involucra la investigación y desarrollo de tecnología en un intervalo de 1 a 100 nm y la creación y uso de estructuras que poseen propiedades novedosas debido a su tamaño. La mayor superficie de área por masa comparada con partículas de mayor tamaño permite obtener partículas más activas biológicamente (Oberdörster, 2005). Estas tecnologías emergentes han mostrado un gran potencial en el desarrollo de alimentos funcionales, como la liberación de compuestos bioactivos para mejorar la salud (Chen, Weiss y Shahidi, 2006). Los principales productos diseñados con nanotecnología son para el cuidado de la salud, seguidos por los electrónicos, así como para el hogar y jardín. Estados Unidos tiene el mercado líder en éste rubro, teniendo tres veces más nanoprodutos en el mercado que Asia y Europa (ElAmin, 2006a).

La mayor parte de investigaciones en nanotecnología se centran en el desarrollo y aplicaciones a biociencias e ingeniería, por lo tanto es necesario implementar el uso de estrategias para aplicar la nanotecnología a la industria alimentaria. El procesamiento de alimentos es una industria multitecnológica, la cual involucra una gran variedad de materias primas, altos requerimientos de bioseguridad y procesos tecnológicamente bien regulados. Las cuatro áreas principales en la producción de alimentos que pueden beneficiarse con la nanotecnología son el desarrollo de nuevos materiales funcionales, procesamiento a microescala y nanoescala, desarrollo de productos, y diseño de métodos e instrumentación para mejorar la seguridad y bioseguridad de los alimentos (Weiss, 2006). La Figura 1, muestra las posibles aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria.

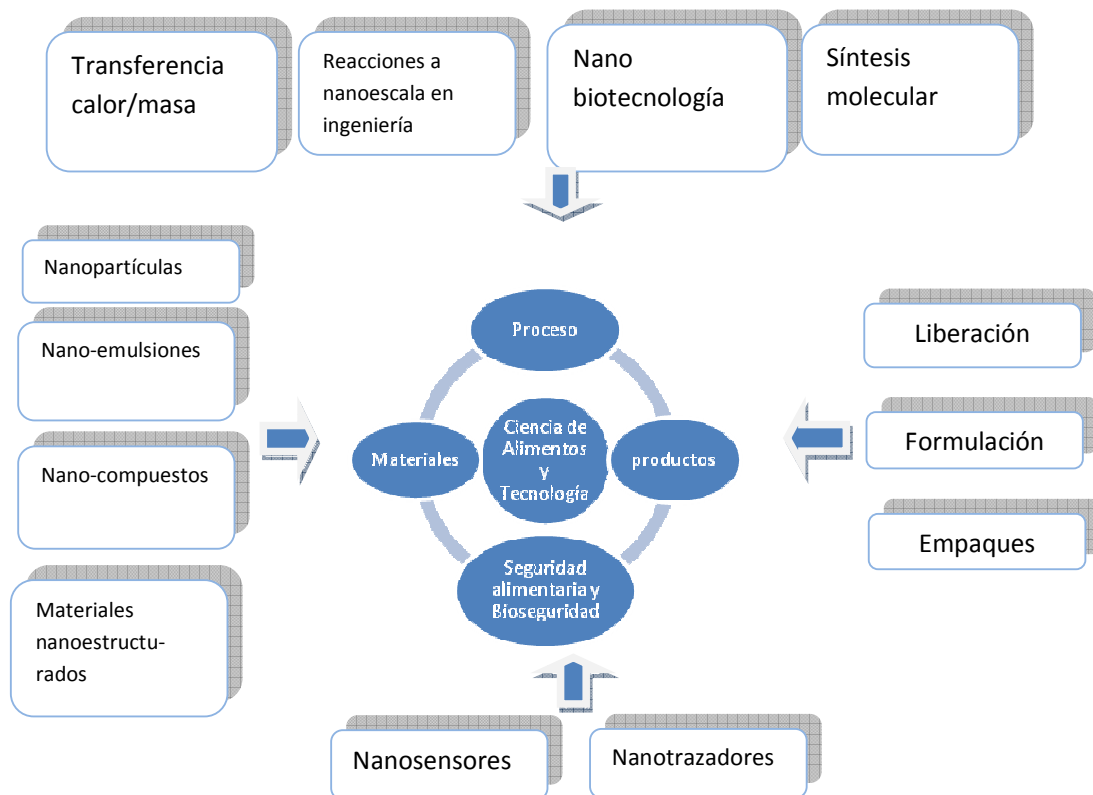


Figura 1. Aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria.

1.2 Aplicaciones de la Nanotecnología en la Industria Alimentaria

La nanotecnología ha sido llamada la siguiente revolución en muchas industrias, incluyendo procesamiento y empaque de alimentos. Las aplicaciones de la nanotecnología en la industria de alimentos incluye sistemas de liberación de nanopartículas (micelas, liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas biopoliméricas y cubosomas), seguridad alimentaria y bioseguridad (nanosensores) y nanotoxicidad (Chen *et al.*, 2006; HSE, 2006; IFST, 2006; Maynard, 2006). En todo el mundo, las ventas de productos alimenticios y bebidas que incluyeron nanotecnología en su proceso de empaque aumentaron de 150 mdd en el 2002 a 860 en el 2004, y se espera que se eleve a 20400 mdd en el 2010 (Fletcher, 2006a; Kaiser).

Se ha resaltado la influencia de las propiedades del material del alimento a una escala nanométrica sobre su biodisponibilidad y valor nutricional (Blundell y Thurlby, 1987; Aguilera, 2005). También se ha investigado la relación entre la morfología de los materiales y sus propiedades fisicoquímicas (Losche, 1997) por ejemplo: biopolímeros en soluciones, geles y películas (Chinnan y Park, 1995; Janaswamy y Chandrasekaran, 2005). Las nanoestructuras funcionales pueden incorporar moléculas biológicas, las cuales son útiles en el desarrollo de biosensores que pueden utilizar azúcares o proteínas como grupos de reconocimiento (Charych et al., 1996).

En suma, existen una gran variedad de potenciales aplicaciones de la nanotecnología en la industria alimentaria por ejemplo:

- a) Asociación de coloides, micelas, vesículas, bicapas, micelas inversas y cristales líquidos, los cuales son usados para encapsular y liberar ingredientes funcionales ya sea polares o no polares (Garti et al., 2004, 2005; Golding y Sein, 2004; Flanagan y Singh, 2006).
- b) Nanoemulsiones, con un diámetro de gota de entre 100 y 500 nm y dentro de ella se pueden encapsular ingredientes funcionales tanto en el interior de la gota, la región interfacial y la fase continua (McClements, 2004).
- c) Emulsiones múltiples nanoestructuradas, como sistemas de encapsulación y liberación, los ejemplos más comunes son aceite-en-agua-en-aceite y agua-en-aceite-en-agua (Garti y Benichou, 2001, 2004).

- d) Emulsiones multicapa nanoestructuradas, para su utilización como sistemas de liberación. El sistema consiste en gotas de aceite (centro) rodeadas de capas, las cuales tienen un espesor del orden de nanómetros (la cubierta/caparazón) formadas por diferentes polielectrólitos (Gu et al., 2005; Mun et al., 2005; Guzey y McClements, 2006).
- e) Partículas biopoliméricas, para encapsular ingredientes funcionales. Este tipo de partículas se pueden producir usando biopolímeros como proteínas o polisacáridos (Chang y Chen, 2005; Gupta y Gupta, 2005; Ritzoulis et al., 2005).
- f) Nanoláminas. Éstas consisten en dos o más capas de material con dimensiones nanométricas de 1 a 100 nm de espesor por capa, las cuales están unidas unas a otras física o químicamente (Decher y Schlenoff, 2003). Esta tecnología permite la elaboración de películas comestibles con múltiples aplicaciones en la industria alimentaria, como su uso en vegetales, frutas, carne, chocolate, dulces, productos de panadería y papas fritas (Morillon et al., 2002; Cagri et al., 2004; Cha y Chinnan, 2004; Rhim, 2004).
- g) Nanopartículas biopoliméricas, uno de los principales usos para este tipo de partículas es la formación de polímeros biodegradables a los cuales se les ha encontrado una gran variedad de aplicaciones en el campo de la biomedicina, como la utilización de hilos biodegradables que eliminan la necesidad de quitar los puntos de sutura, así como la encapsulación y liberación de una gran variedad de compuestos como medicamentos, vacunas y proteínas (Weiss, 2006).
- h) Polisacáridos / nanocompuestos de arcilla. Éstas son preparaciones de arcilla que contienen películas de carbohidrato (<http://www.pre.wur.nl/UK/Research/Food+Structuring/Microstructured/>). Estas capas son impermeables al agua y solo puede migrar a través de la matriz de polisacárido, como consecuencia, la película de polisacárido con nanocompuesto reduce sustancialmente la migración de vapor de agua.
- i) Nanopartículas a base de proteína. Se han empezado a aplicar en la industria alimentaria, debido a su tamaño subcelular. Las nanopartículas ofrecen mejorar la biodisponibilidad de compuestos nutraceuticos. También se ha visto que ciertas proteínas globulares de la leche (α -lactoalbúmina)

puede ser un excelente material para formar éste tipo de estructuras (Kawashim, 2001).

- j) Algunos ejemplos sobre investigación en nanotecnología, nanoproduitos y aplicaciones de nanotecnología en relación a la industria alimentaria (principalmente de 2004 a 2006) se resumen en la Tabla 1. Esta muestra que la nanotecnología ha sido aplicada exitosamente a varios procesos como la purificación de agua, ruptura de pared celular, liberación lenta de sustancias activas, microencapsulación, deodorización, desinfección, acción antimicrobiana y antifúngica las cuales conllevan a un incremento de la vida de anaquel. Estas aplicaciones están divididas en varias categorías, las cuales incluyen procesamiento de alimentos, liberación de sustancias activas, empackado, seguridad y uso de sensores, en los cuales se han utilizado diferentes tipos de materiales (membrana, nanocápsula, nanoemulsión, nanovesícula liposomal, nanopartícula, nanotubo, nanoesfera, material nanocerámico, nano-arcilla, o nanoacable).

Cuadro 1. Ejemplos de investigación en nanotecnología, nanoproduitos y aplicaciones de la nanotecnología con respecto a la industria alimentaria.

Procesamiento de Alimentos	• Desarrollo de alimentos y bebidas interactivos que presentan sabor y color deseados (liberación según la demanda) por la adición de nanocápsulas las cuales se abren a diferentes frecuencias de microondas. • Aplicación de la nanotecnología en purificación y tratamiento de agua, enfocándose en las áreas de membranas y procesos de membrana, desinfección y remoción de contaminantes. • Desarrollo de formulaciones a escala nano de diferentes hierbas tradicionales al reducir a tamaño nano los polvos o emulsiones de las hierbas como la micronización de la espora de <i>Ganoderma</i> a un polvo ultrafino resultando en una ruptura de las paredes celulares y la liberación de ingredientes
-----------------------------------	--

	potencialmente activos. • Refinación de aceite para freír por un dispositivo catalítico (hecho de material nanocerámico) inhibe la polimerización por calor y elimina los olores indeseables. • Diseño de tubos huecos hechos de proteína de leche por autoensamblaje tienen potencial para ser usados como ingredientes novedosos para incrementar la viscosidad, gelificación, nanoencapsulación y propósitos de liberación controlada.
Empaques	• Adición de nanopartículas (plata, dióxido de titanio, dióxido de silicio y nano-arcilla) dentro de los empaques para asegurar la protección de los alimentos al modificar el comportamiento de permeación de las hojuelas, deodorizando, incrementando las propiedades de barrera, bloqueando la luz uv, mejorando las propiedades mecánicas y de resistencia al calor, y desarrollando superficies antimicrobianas y antifúngicas. • Incorporación de nanocompuestos de Nylon que ofrecen barreras al flujo de oxígeno y dióxido de carbono y han sido usados en empaque para alimentos (botellas de multicapas PET para cerveza y otras bebidas alcohólicas) lo que permite mantener la frescura y bloquear olores.
Liberación de Sustancias Activas	• Mejoramiento de la solubilidad de compuestos al incorporar nanopartículas de algunos ingredientes funcionales (carotenoides, fitoesteroles y antioxidantes) que al ser dispersados en agua o bebidas de frutas mejoren su absorción.

Seguridad y Sensores

- Uso de micelas (nanocápsulas) como acarreadores de aceites esenciales, sabores, antioxidantes, coenzima Q10, vitaminas, minerales y fitoquímicos que mejoran su biodisponibilidad.
- Encapsulación de nanopartículas de ingredientes activos (polifenoles, minerales y micronutrientes) para protegerlos de la oxidación y reducir sabores indeseables en su aplicación final.
- Obtención de nanoesferas (40 nm) de proteína de suero de leche, las cuales entran a las células y son degradadas ahí para liberar compuestos nutraceuticos, pueden ser usadas como acarreadores para administración oral de agentes nutraceuticos.
- Desarrollo de dispositivos como el “Nanocantilever” (nanopuente) cubierto de proteína, el cual vibra a una frecuencia específica, es una nueva clase de sensores de silicio ultra pequeños para detectar rápidamente virus, bacterias y otros patógenos cuando los contaminantes se ponen en contacto con el dispositivo, el cambio en la masa puede causar que el nanopuente vibre a una frecuencia diferente y ser rápidamente detectados.
- Fabricación de DNA sintético etiquetado con códigos de color (nanocódigo de barras) que hace posible la identificación de patógenos en alimentos.
- Incorporación de nanopartículas de plata en diversos productos desde vendajes hasta refrigeradores para suprimir la diseminación de bacterias y otros microorganismos.

Fuente: Chau et al., 2007.

1. 3 Nanopartículas

De la misma manera que el prefijo “micro” fue ampliamente utilizado en los 80's, el prefijo “nano” está siendo utilizado para describir a las actuales generaciones de tecnologías que permiten la reducción de tamaño (The Royal Society, 2004). Aunque la aplicación de partículas del orden de los nanómetros ha sido ampliamente utilizada en la industria farmacéutica, las nanotécnicas son relativamente nuevas en la industria alimentaria.

Como se ha mencionado, debido a su tamaño subcelular las nanopartículas ofrecen la posibilidad de mejorar la biodisponibilidad de compuestos nutraceuticos, por ejemplo sustancias poco solubles como algunos lípidos funcionales (carotenoides, fitosteroles, ácidos grasos omega, etc.), antioxidantes naturales y muchos otros ingredientes activos utilizados en alimentos.

Estas nanoestructuras pueden incrementar dramáticamente el tiempo de residencia del compuesto en el tracto gastrointestinal (GI) al disminuir la influencia de los mecanismos de limpieza intestinal e incrementando la superficie disponible para interactuar con el componente biológico (Arbos y col., 2002). Este tipo de estructuras puede penetrar profundamente dentro de los tejidos a través de los capilares y pueden ser tomados efectivamente por las células (Lamprecht y col., 2004). En la Figura 2 se muestran algunos mecanismos de absorción de moléculas bioactivas.

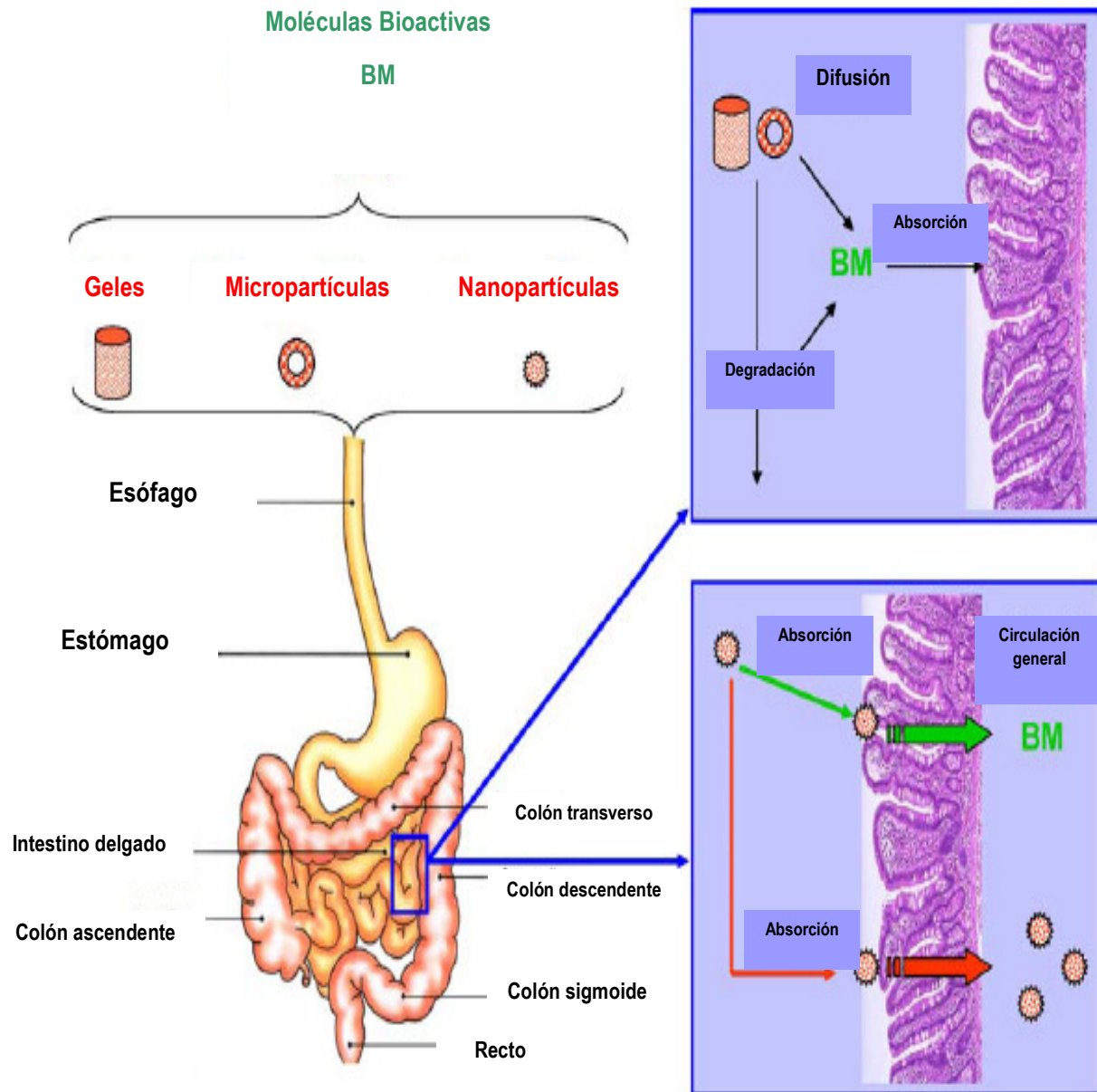


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de absorción de moléculas bioactivas.

1.4 Nanopartículas de Proteína

Entre los diferentes materiales naturales o sintéticos de los que pueden obtenerse nanopartículas para su aplicación en la industria de alimentos, las proteínas son particularmente interesantes por que pueden prepararse fácilmente y la distribución de tamaño puede ser monitoreada (MacAdam y col., 1997). Además, varias modificaciones les permiten formar complejos con polisacáridos, lípidos y otros biopolímeros, gracias a la estructura primaria de las proteínas (Weyermann y col., 2005). En la Figura 3 se muestran imágenes de nanopartículas de proteína α -lactalbúmina bovina (α -LA).

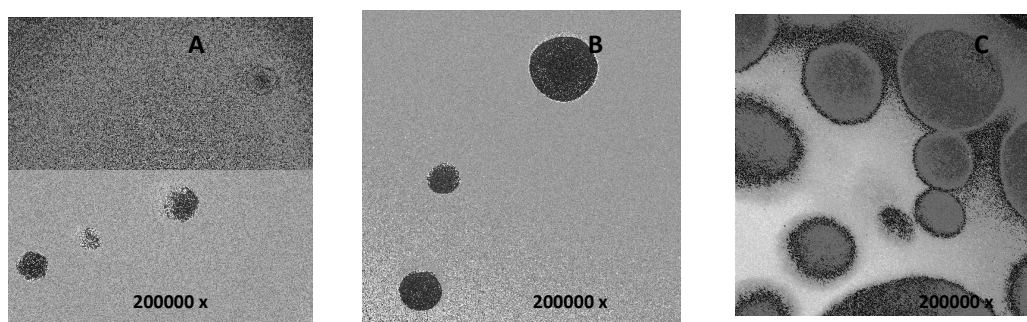


Figura 3. Micrografías obtenidas por Microscopia de Transmisión Electrónica de nanopartículas de proteína (α -lactalbúmina bovina) obtenidas por el método de desolvatación utilizando diferentes agentes desolvatantes (A) Acetona, (B) Alcohol etílico y (C) Alcohol isopropílico. (Trabajo de tesis).

Uno de los métodos utilizados para la obtención de nanopartículas es el proceso de desolvatación, el cual se desarrollo a partir del método de microencapsulación por coacervación, donde las partículas en solución acuosa se forman por coacervación y después se estabilizan con un agente entrecruzador como el glutaraldehído.

En el proceso de desolvatación (Marty y col., 1978) se utiliza un agente desolvatante como una sal o alcohol, el cual debe adicionarse a la solución de proteína lentamente. Al adicionar este factor, la estructura terciaria de la proteína cambiará. En el siguiente estado, las nanopartículas se formaran al polimerizarse por entrecruzamiento las moléculas de proteína desnaturalizada con un agente químico como el glutaraldehído. Con el objetivo de obtener

partículas dispersas y no en masa, se debe parar el sistema antes de que las partículas empiecen a acumularse. La turbidez del sistema también aumentará debido al agente desolvatante. La acumulación de partículas iniciará al aumentar la turbidez del sistema. La Figura 4 muestra la preparación de nanopartículas de α -LA de leche bovina usando etanol como agente desolvatante.

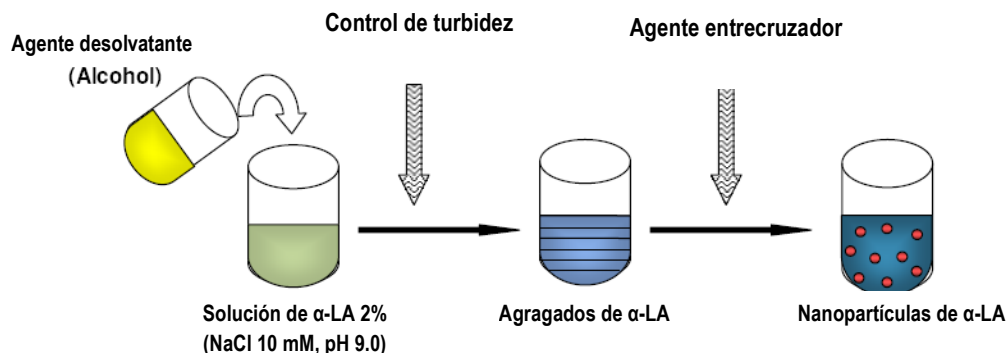


Figura 4. Preparación de nanopartículas de α -LA por el método de coacervación.

1.5 Proteínas de la Leche

Las proteínas de la leche están divididas en dos grupos de acuerdo con su estado de dispersión: las caseínas, que representan el 80% del total, y las proteínas del suero, con el 20% restante, dentro de las cuales la α -lactalbumina representa el 3.5% del total de las proteínas de la leche (Badui, 2006).

1.5.1 α -Lactalbúmina

La α -lactalbúmina es por orden de importancia, la segunda proteína del suero (después de la β -lactoglobulina), y tiene actividad biológica, ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de lactosa, dentro del aparato de Golgi interacciona con la enzima β -1,4-galactosiltransferasa y se forma un complejo que genera la síntesis de lactosa. La lactosa se sintetiza al unirse la glucosa y la UDP-galactosa, y es el principal osmoregulador de la leche (Kuhn et al., 1990). No tiene grupos sulfhidrilo libres, pero sí cuatro puentes disulfuro provenientes de cistinas, lo que la hace tener 2.5 veces más

azufre que las caseínas. Entre sus características se cuenta su bajo peso molecular (14.2 kDa), está constituida por 123 aminoácidos, su alto contenido de triptófano y una secuencia de aminoácidos muy parecida a la lisozima del huevo (62.6% a nivel estructural y 35.8% a nivel de secuencia de aminoácidos), por lo que se considera que las aves y los bovinos tuvieron un tronco común.

Tiene una estructura globular compacta debido a los cuatro puentes disulfuro (posiciones 6-120; 28-111; 61-77 y 73-91) y se desnaturaliza a 63°C, pero vuelve a su estado natural con el enfriamiento. Su punto isoeléctrico teórico es de 4.8 y la unión de calcio es necesario para los plegamientos de la forma nativa y la formación de los puentes disulfuro (Chrysina et al., 2000; Boyer, 2000).

La α -lactalbúmina está constituida por dos subdominios: α y β . El α está formado por la sección amino- y carboxil- terminal de la cadena polipéptidica (residuos del 1-34 y del 86-123). Consiste en cuatro α -hélices denotadas como A (residuos 5-1), B (23-34), C (86-98) y D (105-110) y tres hélices 3_{10} (12-16, 101-104 y 115-119). La región más pequeña conformada por el dominio β está formada por una sección central de la cadena polipéptidica (residuos del 35-85) y abarca a tres pequeñas láminas β antiparalelas (residuos 41-44, 47-50 y 55-56) y a una hélice 3_{10} corta (77-80) además de algunas estructuras irregulares (Chrysina et al., 2000). La proteína posee dos centros hidrofóbicos. Uno formado por las α -hélices A, B y C y contenido dentro del dominio α . El otro centro hidrofóbico, conocido como la caja hidrofóbica, está formado por las α -hélices C y D y residuos del dominio β (Demarest et al., 1999).

En la Figura 5 se observa la estructura de la α -lactalbúmina bovina y la secuencia de aminoácidos y se resalta el sitio de unión del calcio en la proteína.

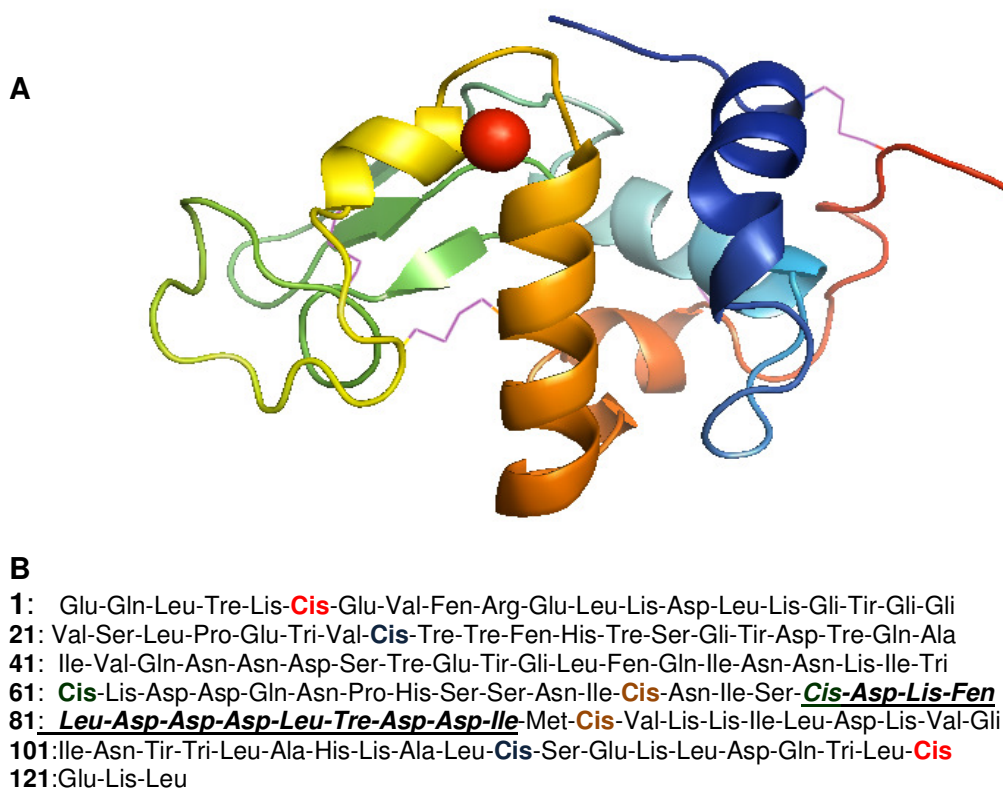


Figura 5. α -lactalbúmina bovina: (A) Estructura cristalina: en el lado izquierdo el dominio β (amarillo/verde) y en lado derecho el dominio α (azul/rojo) el calcio es representado por la esfera roja. (B) Secuencia de aminoácidos (123). Las cisteínas resaltadas con colores son las que forman las cuatro cistinas.

El sitio de unión del calcio que posee la mayor afinidad de enlace está localizado en la unión de los subdominios y está compuesto de una sección contigua de la cadena, uniendo la hélice 3_{10} del subdominio (residuos 77-80) y la hélice H3 del subdominio helicoidal (residuos 86-98). El ion de calcio es coordinado a tres ácidos aspárticos de la cadena lateral (Asp82, Asp87, Asp88), dos oxígenos de grupos carbonilo (Lis79 y Asp84) y a dos moléculas las cuales contribuyen con otros dos oxígenos para formar una estructura bipiramidal pentagonal (Stuart et al., 1986). Las distancias entre el enlace calcio-oxígeno son relativamente cortas: 2.4 Å. El complejo es por lo tanto compacto y el bucle donde se encuentra el calcio unido es la parte más ordenada de la molécula de la α -lactalbúmina. El bucle de unión del calcio está cerrado por un puente disulfuro entre los residuos 73 y 91, el cual mantiene a

los dos dominios juntos además de un segundo puente disulfuro (residuos 61-77). En resumen, como se mencionó antes, la estructura de la α -lactalbúmina es estabilizada por cuatro puentes disulfuro: 6-120, 61-77, 73-91 y 28-111. Sin embargo, la arquitectura global del plegamiento de la proteína está determinada por la secuencia polipeptídica misma (Redfield et al., 1999).

La α -lactalbúmina es una proteína globular compacta cuya forma asemeja a una elipse achatada, con dimensiones de 2.5x3.7x3.2 nm. El radio de giro de la holo- α -lactalbúmina nativa es de 1.57 nm, pero en la conformación de glóbulo fundido tiene un radio de 1.72 nm (Kataoka et al 1997). La conformación de glóbulo fundido retiene significativamente su estructura en el dominio α , mientras que el dominio β está desordenado (Polverino et al., 2005).

1.5.2 Estabilidad de la α -Lactalbúmina

A bajos valores de pH la titulación de los carboxilatos lleva a un desplazamiento del calcio por protones. A temperatura ambiente y baja fuerza iónica, la apo- α -lactalbúmina sufre una transformación conformacional al estado de glóbulo fundido, la cual carece de una estructura terciaria fija, pero mantiene mucha de su estructura secundaria. Este clásico estado de glóbulo fundido, ha sido muy estudiado por que se considera un prototipo de las proteínas parcialmente plegadas. La transición de la desnaturalización de la α -lactalbúmina depende de la concentración de los iones metálicos, especialmente calcio. La temperatura de la desnaturalización de la holo- α -lactalbúmina es de 63°C y para su forma apo es 27°C (Hendrix, 2000).

Una de las características más notables de esta proteína como modelo para los estudios de plegamiento es la alta estabilidad que presenta su estado de glóbulo fundido (Ku wajima, 1989), la cual se puede observar bajo las siguientes condiciones (Ku wajima, 1989): 1) un equilibrio de un intermediario parcialmente desdoblado a una concentración moderada de un desnaturalizante fuerte [cloruro de guanidino hidratado (GdnHCl) o urea], 2) un estado ácido-desnaturalizado y 3) un estado parcialmente desdoblado producido por la eliminación del calcio de la molécula a pH neutro y a baja concentración de sal. Las características estructurales conocidas del glóbulo fundido son: 1) una estructura secundaria como la de la proteína nativa, 2) una estructura

compacta que comprende solo del 10-20% del radio total de la molécula nativa y 3) la ausencia de una estructura terciaria al no haber interacciones específicas con los aminoácidos de las cadenas laterales (Ku wajima, 1989).

Muchas de las propiedades de este tipo de proteínas se pueden modificar por medio de tratamientos térmicos o de altas presiones hidrostáticas.

1.6 Tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP)

Los cambios en estructura molecular originan cambios en las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas, como la gelificación, emulsificación y espumado, así como la solubilidad, viscosidad y adsorción de agua (Yang et al., 2001; Needs et al., 2000).

Aunque los primeros estudios sobre la aplicación de alta presión (HP) en la industria alimentaria fueron realizados a finales del siglo XIX (Hite, 1899) no fue sino hasta los 70s cuando hubo un desarrollo en esta tecnología, ya que anteriormente se carecía del equipo apropiado. En 1990 el primer alimento tratado con HP, una jalea de fruta con tratamiento HHP se introdujo en el mercado japonés (Mertens y Deplace, 1993). Recientemente, otros productos tratados con HP han sido lanzados al mercado, incluyendo ostras en EUA, jugo de naranja en Francia y guacamole en México y California.

El procesamiento de alimentos por HP ofrece grandes ventajas sobre los tratamientos térmicos tradicionales, como efectos antimicrobianos sin cambiar la calidad nutritiva y sensorial de los alimentos. La mayor ventaja para el procesamiento y conservación de los alimentos es la significativa eliminación de tratamientos térmicos, disminuyendo así, la degradación térmica de los componentes de los alimentos: alta retención de sabor, color y valor nutritivo, tratamiento uniforme e instantáneo del producto bajo presión, reducción del uso de aditivos químicos y el desarrollo de nuevos productos, debido a la creación de nuevas textura, sabores y propiedades funcionales (Datta y Deeth, 1999).

Esta tecnología se basa en la exposición de alimentos a HP por diferentes periodos de tiempo. Las presiones de operación van desde los 200 hasta los 800 MPa y los tiempos de procesamiento varían desde algunos segundos hasta varios minutos. Los equipos HP pueden generar la presión por métodos

directos o indirectos y utilizando principalmente agua como medio para transmitir la presión. Otros fluidos se han usado para transmitir la presión dentro del contenedor incluyendo glicerol, aceites comestibles y emulsiones de aceites comestibles con agua (Meyer et al., 2000; Mertens y Deplace, 1993). Este es un proceso no térmico que involucra incrementos menores de temperatura por el proceso mismo de la presurización, por ejemplo, para un proceso de 600 MPa el incremento de la temperatura del agua pura es de aproximadamente 15°C. Normalmente, estos equipos poseen un sistema de control de temperatura (Denys et al., 2000).

Es de particular interés, en el procesamiento de alimentos conocer el efecto de las HP sobre las proteínas. En su estado nativo las proteínas son estabilizadas por enlaces covalentes (incluyendo puentes disulfuro), interacciones electrostáticas (grupos polares), puentes de hidrogeno e interacciones hidrofobicas. Los enlaces covalentes no son afectados por el tratamiento de HP, al menos a temperaturas relativamente bajas (0-40°C), es decir, la estructura primaria de las proteínas permanece intacta durante los tratamientos HHP (Mozhaev, 1994; Chapleau et al., 2004).

Por otra parte, a altas presiones ocurren cambios en la estructura secundaria y se presenta una desnaturalización irreversible, debido a que los puentes de hidrógeno se rompen con las altas presiones (Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broek y Weemaes, 1998; Chapleau et al., 2004). A presiones por arriba de 200 MPa se observan cambios significantivos en la estructura terciaria de las proteínas debido a cambios en las interacciones aniónicas e hidrofobicas (Hendrickx et al., 1998; Huppertz et al., 2004). Los enlaces iónicos en soluciones acuosas se desestabilizan por la presión (Gross & Jaenicke, 1994). Las interacciones alifáticas entre grupos aromáticos se caracterizan por un incremento en el volumen, por lo tanto, se desestabilizan a presiones incrementadas (Mozhaev et al., 1994). Las proteínas multiméricas que están unidas por enlaces no covalentes, se disocian a relativamente bajas presiones ($\cong$ 150 MPa), por consiguiente, hay una pérdida de la estructura cuaternaria.

La desnaturalización de las proteínas por HHP es un fenómeno complejo, ya que los cambios producidos en la estructura de las proteínas dependen de varios factores como la temperatura, composición del disolvente, pH, fuerza iónica, así como de la estructura nativa de la proteína, la presión y el tiempo de tratamiento (Tedford y Schaschke, 2000). Estos cambios en estructura molecular altera sus propiedades físicas como la solubilidad y la viscosidad e influencia la funcionalidad de la proteína como en procesos como gelificación, emulsificación y espumado (Krësić et al., 2006).

Las proteínas del suero son ingredientes alimenticios muy importantes debido a sus propiedades funcionales. El tratamiento con HHP es conocido por inducir cambios en las propiedades funcionales de algunas proteínas para diferentes aplicaciones alimentarias (López-Fandiño, 2006). Una de los componentes mas importantes de las proteínas del suero es la proteína α -lactalbúmina (α -LA). En cuanto a los tratamientos de HHP sobre esta proteína, se ha observado que es más estable que la β -lactoglobulina. El desplegamiento reversible de la proteína inicia a los 200 MPa y pierde su estructura nativa irreversiblemente a los 400 MPa, comparándola con los 50 y 150 MPa, respectivamente para la β -lactoglobulina (Tanaka y Kunugi, 1996). La α -lactoalbúmina presenta un estado de glóbulo fundido en un intervalo de 200 a 400 MPa (Jonas, 2002). Los diferentes comportamientos de ambas proteínas pueden explicarse por sus diferencias en su estructura secundaria, que lleva a una alta hidrofobicidad en la β -lactoglobulina y por el número de enlaces disulfuro (4 en la α -lactoalbúmina y 2 en la β -lactoglobulina) y los sitios de unión de calcio (Tanaka and Kunugi, 1996). De hecho, el calcio estabiliza a la proteína en tratamientos donde la presión llega a 200 MPa (Dzwolak et al., 1999; Hosseini-nia et al., 2002). La presión induce la formación de polímeros. En mezclas de α -lactalbúmina y β -lactoglobulina y debido a los grupos SH- libres en la molécula de β -lactoglobulina, esta proteína puede promover la oligomerización de la α -lactolbúmina lo que resulta en la formación de un complejo heterogéneo de oligómeros, probablemente compuestos de varios cientos de moléculas de α -lactalbúmina y β -lactoglobulina (Jegouic et al., 1997; Grinberg y Haertlé, 2000).

Sin embargo, la α -lactalbúmina no forma polímeros cuando se somete a tratamientos térmicos sola (Schokker et al., 2000).

En cuanto a las propiedades funcionales de la α -lactalbúmina (solubilidad, capacidad espumante, capacidad emulsificante), éstas mejoran con tratamientos de HHP. Un tratamiento a 600 MPa, 55°C por 10 minutos incremento la solubilidad de la α -lactalbúmina en un 5.75%, la capacidad espumante en un 62.23%, la estabilidad de la espuma en un 19.39%, el índice de actividad emulsificante 4.5% y la estabilidad de la emulsión con un 24.8%, cuando la muestra tratada fue reconstituida a pH 7 (Rodiles et al., 2008).

1.7 Actividad Antioxidante

Las reacciones de oxidación en alimentos conllevan al deterioro de la calidad de algunos atributos de los alimentos como aroma, sabor, textura y color. Los principales objetivos de las reacciones de oxidación en los alimentos son los lípidos y las proteínas. Sin embargo la habilidad de las proteínas para interactuar con los radicales libres en alimentos puede llevar al desarrollo de novedosas tecnologías antioxidantes si las proteínas pudieran ser utilizadas para inhibir las reacciones oxidativas. El número de tecnologías antioxidantes en alimentos es limitado y puede disminuir aún más al incrementar la demanda de productos “todo natural”, así que nuevas tecnologías en la materia son claramente necesarias (Elias et al., 2008).

La habilidad de las proteínas para inhibir la oxidación lipídica las hace componentes importantes como defensa antioxidante y podrían utilizarse como aditivos en alimentos al introducirse como péptidos o proteínas con actividad antioxidante o utilizarse para encapsular a un antioxidante.

Hay muchos estudios que demuestran la habilidad de las proteínas para inhibir la oxidación lipídica en alimentos. Se ha demostrado que proteínas como las de la leche, plasma sanguíneo y soya tienen actividad antioxidante (Shantha y Decker, 1995). Los concentrados de proteína de suero mostraron tener

actividad antioxidante en carne de res cocinada (Shantha y Decker, 1995). Además, se encontró que las proteínas del suero de leche inhiben la oxidación lipídica en emulsiones de aceite en agua (Taylor y Richardson, 1980; Allen y Wrieden, 1982 a y b; Donnelly et al., 1998; Tong et al., 2000; Elias et al., 2005).

Los péptidos también pueden inhibir la oxidación en alimentos. Se ha demostrado que el suero de leche, caseína, soya e hidrolizados de clara de huevo pueden proteger a los alimentos contra la oxidación, por ejemplo a la carne de res, el cerdo y el atún (Sakanaka y Tachibana, 2006; Diaz et al., 2005; Sakanaka et al., 2005; Pena-Ramos y Xiong, 2003). Se ha visto que los péptidos obtenidos de la digestión de las proteínas de la leche poseen actividad antioxidante. Dichos péptidos están compuestos de entre 5 y 11 aminoácidos que incluyen en su secuencia aminoácidos hidrofóbicos como Pro, His, Tyr o Trp (Pihlanto 2006). La capacidad antioxidante del triptófano y la tirosina puede ser explicada por la capacidad de donar electrones por parte de sus grupos fenólico e indólico.

2. Justificación

La nanotecnología se ocupa de la caracterización, fabricación y manipulación de estructuras biológicas y no biológicas menores a los 100 nm, debido a que se ha demostrado que las estructuras de este tamaño poseen propiedades funcionales únicas y novedosas. Como consecuencia de lo anterior, el interés en el campo de aplicación en ésta área de investigación se ha incrementado grandemente en los últimos años.

Los beneficios potenciales de la nanotecnología han sido reconocidos por muchas industrias y ya se han fabricado productos a nivel comercial. Sin embargo, el uso de la nanotecnología apenas empieza a ser aceptada en la industria alimentaria, desde la seguridad de los alimentos hasta la síntesis molecular de nuevos productos e ingredientes.

En el pasado, las proteínas del suero lácteo eran consideradas como un desecho en la fabricación de quesos, pero actualmente son usadas en la formulación de muchos alimentos por su alta calidad nutritiva y sus propiedades funcionales. También, se ha demostrado que ciertas proteínas globulares de la leche (α -lactalbúmina) pueden formar nanopartículas bajo condiciones apropiadas. Las aplicaciones de este tipo de estructuras han despertado interés en diferentes áreas como en la encapsulación de varios compuestos entre los cuales se encuentran saborizantes, medicamentos o prebióticos. Lo anterior podría ser útil para acarrear compuestos de liberación dirigida. Además, de prevenir el deterioro o pérdida de éstos. Desde el punto de vista comercial, los altos costos que implican purificar a una proteína del suero como la α -lactalbúmina hacen que la aplicación de la α -lactalbúmina sea destinada solo para algunos productos. Así que, la fabricación de nanopartículas de α -lactalbúmina permitiría la utilización de ésta proteína en una amplia gama de aplicaciones. Debido a que la α -lactalbúmina es una proteína presente en la leche su utilización podría centrarse en la industria farmacéutica y de alimentos.

Además, que la aplicación de altas presiones hidrostáticas modifican la estructura y las propiedades funcionales de la α -lactalbúmina podría considerarse que su capacidad para formación de nanopartículas también se ve alterada, pudiéndose obtener nanoestructuras con propiedades novedosas.

3. Hipótesis

El tratamiento con HHP combinado con diferentes valores de temperatura menores a 60°C al alterar la estructura secundaria y terciaria de la α -lactalbúmina también podrán alterar su capacidad de formación de nanopartículas y algunas de las propiedades de éstas.

4. Objetivo General

Estudiar el efecto de la HHP combinadas con temperaturas menores a 60°C de la α -lactalbúmina sobre la capacidad de formación de nanopartículas y algunas otras propiedades fisicoquímicas.

4.1 Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de la tecnología de la HHP a diferentes valores de presión, temperatura y tiempo de procesamiento sobre la sensibilidad a la desnaturalización por diferentes métodos de la α -lactalbúmina.
- Estudiar el efecto de la tecnología de la HHP a diferentes valores de presión, temperatura y tiempo de procesamiento sobre la capacidad de formación de las nanopartículas de α -LA obtenidas por el método de desolvatación.
- Estudiar la estructura y características fisicoquímicas de las nanopartículas de α -LA.
- Estudiar la digestibilidad por simulación del Tractogastrointestinal de las nanopartículas de α -LA.
- Estudiar la capacidad antioxidante de las nanopartículas de α -LA.

5. Materiales y Métodos

5.1 Materia Prima

La muestra de α -lactalbúmina bovina es proporcionada por la compañía norteamericana “Daviisco Foods International” (www.DaviiscoFoods.com) con sede en Minesota, Estados Unidos. El lote de producción fue el JE-027-5-410. La muestra contiene 97.2% de proteína base seca, de la cual 91.1 % es α -lactalbúmina. La proteína procede de un suero lácteo dulce y fue aislada por cromatografía de intercambio iónico y secada posteriormente por aspersion. La ficha técnica menciona que la proteína se encuentra en forma nativa. En el Cuadro 2 se presenta el análisis químico de la misma realizado por Davisco.

Cuadro 2. Análisis Químico de la proteína α -lactalbúmina bovina.

Componente	%
Humedad	5.4
Proteína base seca*	97.2
α -lactalbúmina	91.1
Grasa	0.4
Lactosa	0.5
Cenizas	2.3

*Referida a proteína total.

Las muestras de α -lactalbúmina tratadas con alta presión hidrostática (HHP) fueron preparadas por el Dr. Octavio Rodiles L. utilizando una prensa isostática (Engineered Pressure Systems, Inc., Haverhill, Mass., EUA) en la Universidad Estatal de Washington en Pullman Wa., EUA).

5.2 Reactivos y Material de Laboratorio

Se utilizaron reactivos de grado analítico y grado microscopía y material de uso común de laboratorio.

5.3 Equipo

Espectropolarímetro. Jasco J-715 Easton MD, EUA.

Espectrofluorómetro. Iss Mod. K2 Champagne, EUA.

Microtomo. Leica Ultracut. EUA.

Microscopio Electrónico de Transmisión. JEM 1010, JEOL, Japón.

Sistema Zetasizer Nano ZS90. Malvern Instruments. Reino Unido.

5.4 Desarrollo Experimental

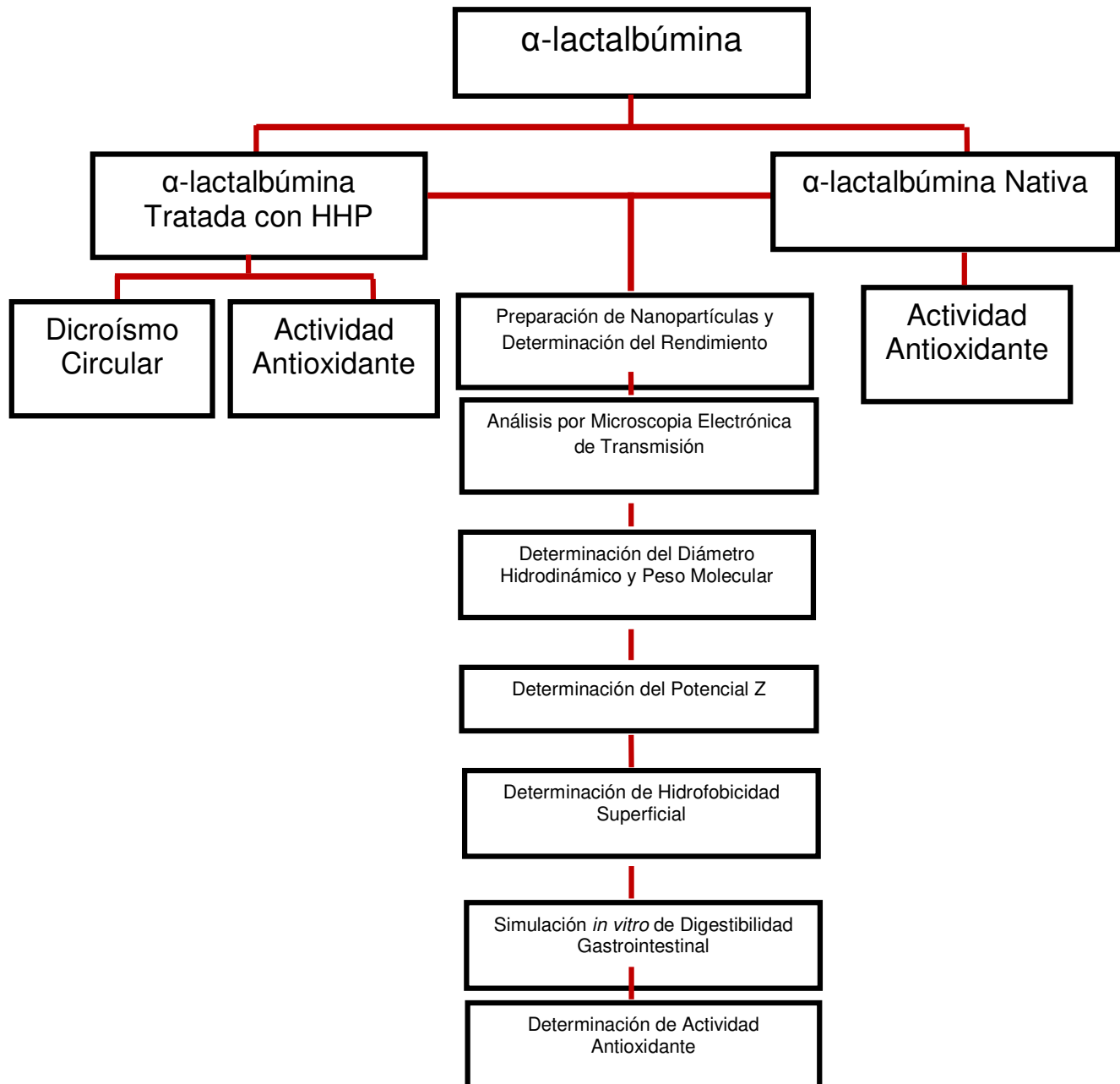


Figura 6. Diagrama de desarrollo experimental.

5.5 Metodología (DC)

5.5.1 Dicroísmo Circular

Los cambios en estructura molecular a nivel de estructura secundaria y terciaria de la α -lactoalbúmina se evaluaron por esta técnica. Las respuestas de DC se obtienen generalmente en regiones del ultravioleta cercano (250-350 nm) y del ultravioleta lejano (180-250 nm). En la región del ultravioleta cercano los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina y fenilalanina. Estos aminoácidos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula proteica, por tanto, durante los procesos de desnaturalización se pueden evaluar cambios a nivel de estructura terciaria. Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe al arreglo espacial de la cadena principal de la proteína, por lo cual, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presentes, es decir, del porcentaje de residuos que se encuentran en alguna conformación estructural (hélices α , hojas β , giros y otros tipos estructurales) (Lugo-Ríos, 1995). Los estudios se realizaron en un Espectropolarímetro Jasco J715 Easton, MD, EUA (Figura 8), ubicado en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Izatapalapa.



Figura 7. Espectropolarímetro Jasco J-715.

Los estudios de dicroísmo realizados a la α -lactalbúmina fueron a diferentes valores de pH (3, 5 y 7) y utilizando reguladores de fosfato con una molaridad

de 0.02 M. Las muestras de proteína recibieron un tratamiento previo con alta presión hidrostática (HHP) bajo las siguientes condiciones: 400 MPa a 40°C por 10 minutos y 600 MPa a 55°C por 10 minutos, además, se utilizó un testigo (proteína sin tratamiento con HHP).

Para el estudio de DC en el UV lejano, se prepararon soluciones de las proteínas en estudio a una concentración de 0.15 mg/mL con el regulador de fosfatos específico para el pH en estudio y con una molaridad de 0.02 M. La solución se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.45 μm . Se realizó un barrido en el ultravioleta lejano de 185 a 250 nm usando una celda de 1 mm de paso óptico y a una temperatura de 25°C. Con el software del equipo se recabó la información. Los resultados se expresan como cambios en Elipticidad Molar con respecto al barrido de la luz ultravioleta. La Elipticidad Molar tiene como unidades $\text{grados-cm}^2/\text{dmol}$ y es simbolizada como (Θ) .

5.5.2 Preparación de las Nanopartículas (NPs) de α -Lactalbúmina (α -LA) bovina

Las nanopartículas se obtienen por el método de desolvatación utilizando diferentes agentes desolvatantes (Langer y col., 2003; Gunasekaran y col., 2007 ; Weber y col., 2000).

En principio, 2 g de α -LA (proteína nativa y tratada con HHP, respectivamente) se disolverán en 100 mL de una solución de NaCl 10 mM, pH 9 para convertirse en nanopartículas bajo la adición continua de un agente desolvatante (acetona, alcohol etílico o isopropílico) a una velocidad de 1 mL/min y con agitación constante a 500 rpm y temperatura ambiente. Después del proceso de desolvatación se adiciona glutaraldehído al 8% en agua (1 μL /mg de proteína) para inducir la reacción de entrecruzamiento. El entrecruzamiento se realiza bajo agitación constante por 3 h y temperatura ambiente. La purificación de las nanopartículas se lleva a cabo por 5 ciclos de centrifugación (25000 xg, 30 min) y redispersión del pellet a su volumen original en la solución de NaCl 10 mM, pH 9. Al final del proceso de purificación las muestras se almacenan en NaCl 10 mM, pH 9 a 4°C.

5.5.3 Determinación de la Proteína no Ensamblada en NPs después de la Desolvatación (Proteína Soluble)

Para la determinación del porcentaje de α -LA no deshidratada (desolvatada), las NPs fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 16,000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente. Se tomó una alícuota del sobrenadante (100 μ L) y se cuantificó la cantidad de α -LA libre en el sobrenadante utilizando el ácido bicinónico (BCA), la mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos, las muestras se analizaron espectrofotométricamente a 562 nm (Langer y col., 2003). El contenido de proteína de las muestras se calculó con referencia a una curva estándar de α -LA de concentraciones conocidas.

5.5.4 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET)

Las muestras para el estudio TEM se toman después de la purificación de las nanopartículas. Las muestras se diluyen 10 veces y 5 μ L de la solución de nanopartículas se coloca sobre rejillas de cobre cubiertas con Formvar. La examinación se realiza utilizando un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM1010 marca JEOL (Figura 8), operado a 60 kV.



Figura 8. Microscopio electrónico de transmisión, modelo JEM1010 marca JEOL.

5.5.5 Caracterización de las NPs de Proteína

Tamaño de partícula

Se ha demostrado que el tamaño y distribución del tamaño de partícula son las características más importantes en los sistemas de nanoestructuras (Jahanshahi et al., 2007).

Uno de los métodos más utilizados para determinar el tamaño de partícula es la difusión dinámica de luz (DLS) ésta técnica permite medir el tamaño de partícula en un intervalo que va de nanómetros a micrómetros. El fundamento se basa en que partículas pequeñas en suspensión se mueven en un patrón aleatorio. La observación de partículas más grandes comparadas con las pequeñas mostrará que las partículas de mayor tamaño se mueven más lentamente que las pequeñas a la misma temperatura. Esta técnica permite evaluar el radio de la partícula, su peso molecular aproximado, que tan homogéneas son las partículas en cuanto a sus tamaños (polidispersidad) y el potencial zeta (Alexander y Dalgleish, 2006).

Para el análisis las muestras se diluyeron (1:400) con agua destilada y se llevaron a sonicación durante 20 minutos a temperatura ambiente, entonces se midieron a 25°C con un ángulo de difusión de 90° (Langer y col., 2003). Las mediciones se realizaron por triplicado. Esta determinación se lleva a cabo utilizando el Sistema Zetasizer Nano modelo ZS90 de Malvern Instruments. Ubicado en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Peso molecular

En términos prácticos, conocer el peso de los componentes de un polímero o, en este caso, una matriz de proteína como son las NPs obtenidas de α -lactalbúmina puede ayudar a determinar muchas de sus características físicas como la densidad, flexibilidad y dureza. El peso molecular de las NPs se determinó con la técnica de difusión estática de luz. Para la determinación de esta propiedad, la suspensión de NPs se sonicó durante 30 minutos y se llevó a una concentración de 0.00002 g de proteína por litro en agua destilada. Esta determinación se lleva a cabo utilizando el Sistema Zetasizer Nano

modelo ZS90 de Malvern Instruments. Ubicado en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.5.6 Potencial Zeta

La principal razón para medir el potencial zeta es predecir la estabilidad coloidal. Las interacciones entre las partículas juega un papel importante en la estabilidad del coloide y el uso de las mediciones del potencial zeta para predecir la estabilidad es un intento para cuantificar éstas interacciones. El potencial zeta es una medida de las fuerzas repulsivas entre las partículas, y como, la mayoría de los sistemas coloidales acuosos son estabilizados por repulsiones electrostáticas, entre más grandes sean las fuerzas repulsivas entre las partículas, menos probabilidades habrá de que las moléculas formen agregados. Nanopartículas con un potencial zeta arriba de (+/-) 30 mV han mostrado ser estables en suspensión, debido a que la carga superficial previene la agregación de las partícula. El zeta potencial también puede ser utilizado para determinar si un material activo es encapsulado en la nanopartícula o adsorbido en la superficie (Mohanraj and Chen, 2006).

Los experimentos de titulación se llevaron a cabo en un intervalo de pH entre 3.0 y 9.0 (Langer y col., 2003). Para el análisis, la suspensión de nanopartículas se diluyó 1:400 con agua destilada y el pH de la suspensión se ajusta automáticamente por la unidad de titulación del equipo al adicionar ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N. Las mediciones se realizaron por triplicado. Esta determinación se lleva a cabo utilizando el Sistema Zetasizer Nano modelo ZS90 de Malvern Instruments. Ubicado en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.5.7 Hidrofobicidad Superficial

Esta prueba permite conocer la carga global externa de una proteína. Las proteínas globulares normalmente en su estado nativo tienen en su exterior una carga hidrofílica, pero al ser desnaturalizadas, la carga exterior tiende a ser hidrofóbica. Esta propiedad se determinará por la técnica de hidrofobicidad fluorescente empleando el reactivo ANS (sulfonato 1-anilino-8-naftaleno) (Liu, 2005). El equipo que se utilizará es un Espectrofluorómetro marca Iss Mod. K2 Champaign, Ill, EUA, ubicado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Se usará la técnica propuesta por Hayakawa y Nakai (1985). Se prepararan soluciones de las NPs en estudio a una concentración de 2 mg/mL en regulador de fosfatos 0.1 M a pH 7. Se pasarán todas las soluciones por una unidad de filtración de 0.45 μ m. se tomarán 75 μ L de la suspensión de Nps y se le agregarán 25 μ L del reactivo ANS a una concentración de 15 mM. La muestra se llevará a 3 mL usando el regulador de fosfatos correspondiente al pH de estudio dentro de una celda de 1 cm de paso óptico. Se correrá a 25°C con una excitación de 380 nm y una emisión de 400 a 600 nm. Utilizando el software del equipo se recabarán los datos de los experimentos. Se evaluarán los cambios en la intensidad de respuesta con respecto a la muestra testigo. Los cambios en intensidad se expresaran como unidades arbitrarias.

5.5.8 Digestibilidad de las NPs por Simulación del Tracto Gastrointestinal

Entre una de las muchas aplicaciones de las nanopartículas, la encapsulación es una de las técnicas que puede tener muchas ventajas en la industria alimentaria, y como el objetivo es su aplicación en alimentos, sería de gran utilidad saber cómo se comporta este tipo de estructuras en el tracto gastrointestinal. El sitio de liberación específico para la liberación de la sustancia encapsulada dependerá de la naturaleza de ésta.

El tracto gastrointestinal (TGI) incluye procesos fisiológicamente dinámicos y fisicoquímicos del estomago y del intestino delgado y grueso. Los parámetros fisiológicos comprenden el pH, concentración de enzimas gástricas,

concentraciones de sales biliares y la cinética del quimo pasando a través del estomago y del intestino (Alander, M.,1999).

Las nanopartículas se obtienen por el método de desolvatación previamente mencionado. La simulación de la digestión gástrica e intestinal se realizaron de acuerdo a Charteris et al., (1998) con algunas modificaciones.

Para la simulación gástrica se suspende la pepsina (3g/L) en una solución de cloruro de sodio (0.85%) y se ajusta el pH a 2.0 con HCl concentrado. Se toman 0.5 mL de la suspensión de nanopartículas y 1 mL de la solución gástrica y se mantienen con agitación constante (150 rpm) a 37°C durante 1 h. La simulación intestinal se lleva a cabo al suspender pancreatina (1g/L) en una solución de cloruro de sodio (0.85%) a pH de 8.0. Se toman 0.5 mL de la suspensión de nanopartículas y 1 mL de la solución intestinal y se mantienen con agitación constante (150 rpm) a 37°C durante 4 h. Los cambios en la estructura de las nanopartículas se analizaron por Microscopia Electrónica de Transmisión durante el tratamiento con jugo gástrico (1h) y del intestino delgado (1 y 4h), respectivamente.

5.5.9 Determinación de la Actividad Antioxidante de la α -Lactalbúmina utilizando el compuesto ABTS⁺

Para la determinación de la actividad antioxidante de la α -lactalbúmina se utilizara el método del ABTS⁺. Y se llevará a cabo de la siguiente manera (Almajano et al., 2007): primero se prepara la solución de ABTS en solución salina de buffer de fosfatos (PBS) 5mM, pH 7.4, el cual se obtiene al hacer reaccionar 10 mL de 2,2'-Azino-bis(3-benzotiazolina-6-ácido sulfónico sal de diamonio (ABTS⁺) 7mM y 10 mL de peroxodisulfato de potasio 2.45 mM por 16 h en ausencia de luz (Re et al., 1999). Antes de utilizar la solución, ésta se diluye con PBS (2.5:100) hasta que alcance una absorbancia de 0.7 a 734 nm en una celda espectrofotométrica de 1 cm y a 25°C. Se toman 50 μ L de la suspensión de nanopartículas y se adicionan a la solución de ABTS⁺ (2mL). La PBS, pH 7.4 es el blanco experimental. Se procede a leer la absorbancia a 734 nm inmediatamente después de mezclar la muestra con la solución de ABTS⁺,

para posteriormente tomar lectura de absorbancia cada minuto durante 7 minutos. Las mediciones se realizaron por triplicado. El análogo de la vitamina E soluble en agua (Trolox) se utilizó como estándar.

El porcentaje de inhibición se calcula a partir de los valores de la absorbancia a los 7 minutos y se hace la corrección para la absorbancia del disolvente. El cambio en la absorbancia de la muestra se calcula de acuerdo a la ecuación (2):

$$\Delta A_{\text{muestra}} = \frac{A_{t=0(\text{muestra})} - A_{t=7(\text{muestra})}}{A_{t=0(\text{muestra})}} - \frac{A_{t=0(\text{disolvente})} - A_{t=7(\text{disolvente})}}{A_{t=0(\text{disolvente})}} \quad (2)$$

El porcentaje de secuestro de radicales libres se obtiene al multiplicar los valores de $\Delta A_{\text{muestra}}$ por 100 y se compara con un testigo (sin capacidad antioxidante). La interpretación se basó en el desarrollo de una coloración azul/verde de la muestra determinando la absorbancia a 734 nm en un intervalo de 7 minutos. El resultado se comparó con el antioxidante considerado como patrón (Trolox) a una concentración de 2.5 mmol y finalmente, aplicando la siguiente relación se obtuvieron los mmol Equivalentes de Trolox/mL en la muestra en cuestión:

$$\text{CAT} = [2.5 \text{ mmolequiv. Trolox} / (\Delta \text{abs1} - \Delta \text{abs2})] * (\Delta \text{abs1} - \Delta \text{abs3}) \quad (3)$$

Donde,

CAT: Capacidad antioxidante total

Δabs1 , Δabs2 , Δabs3 = Diferencia de la absorbancia a 734 nm a cero y 3 minutos, para el blanco, para el Trolox y para la muestra en estudio respectivamente.

6. Resultados y Discusión

6.1 Estudios de DC: Determinación del Impacto de la HHP en la Termoestabilidad de la Proteína α -Lactalbúmina

El tratamiento previo con HHP al que fue sometida la proteína α -lactalbúmina (α -LA) fue el siguiente: las muestras de proteína fueron diluidas en agua destilada a una concentración del 5% w/v y sometidas posteriormente a los tratamientos con el equipo de HHP (Engineered Pressure System Inc.). Los tratamientos utilizados para éste estudio fueron: proteína testigo (T) sin ningún tratamiento con HHP, proteína tratada a 400 MPa, 40°C, 10 min (CP) y proteína tratada a 600 MPa, 55°C, 10 min (17). Además, se utilizaron diferentes valores de pH (3, 5 y 7).

Es bien conocido que el uso de HHP induce cambios en la estructura de las proteínas del suero de leche que tienen como consecuencia un efecto positivo en las propiedades funcionales de éstas, como es el caso de la α -LA, la cual puede ser utilizada en diferentes alimentos (Rodiles y col., 2008). La mayoría de los cambios en funcionalidad (espumante, estabilidad de la espuma, capacidad emulsificante, estabilidad de la emulsión, etc.) de las soluciones de α -LA tratadas con HHP son atribuidas a las modificaciones en solubilidad. En las Figuras 9, 10 Y 11 se muestran las variaciones en unidades de DC de la α -LA (T), α -LA (CP) y la α -LA (17) a pH 7.0 respectivamente

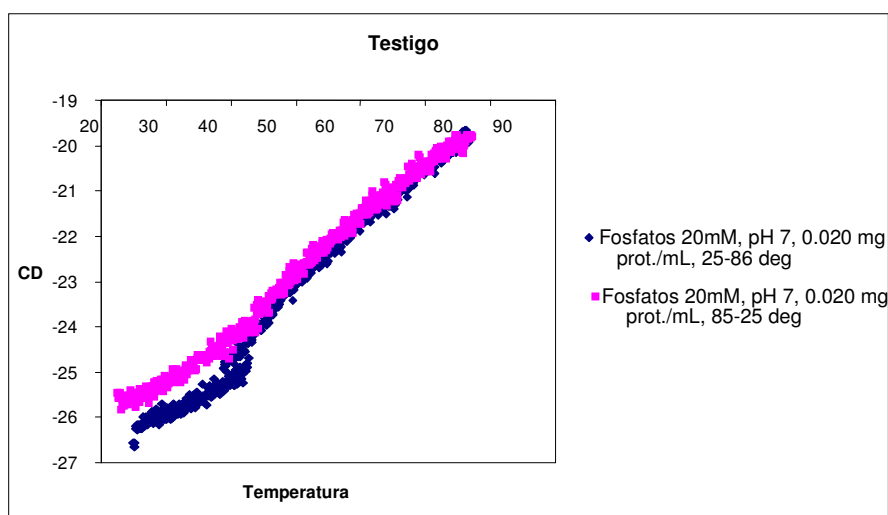


Figura 9. Cambios en la señal de DC de la α -LA (T) a pH de 7.

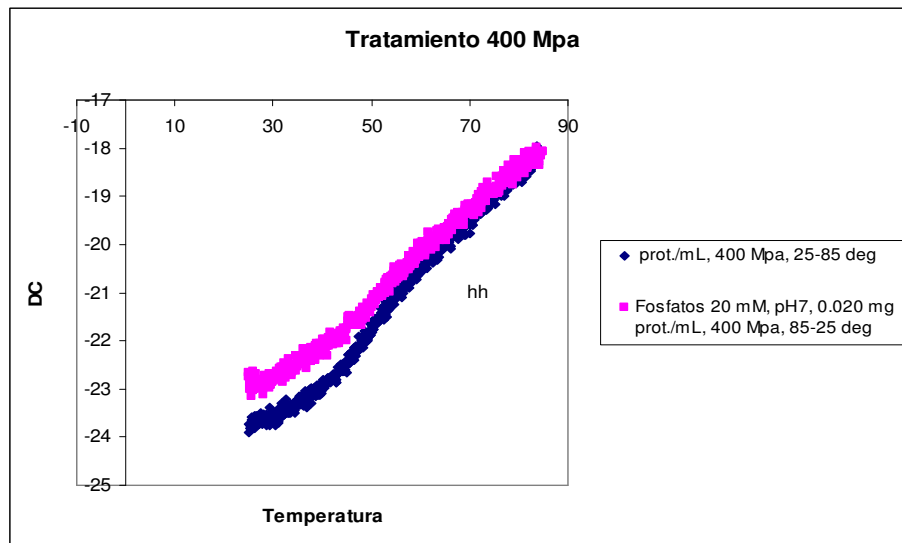


Figura 10. Cambios en la señal de DC de la α -LA (CP) a pH de 7.

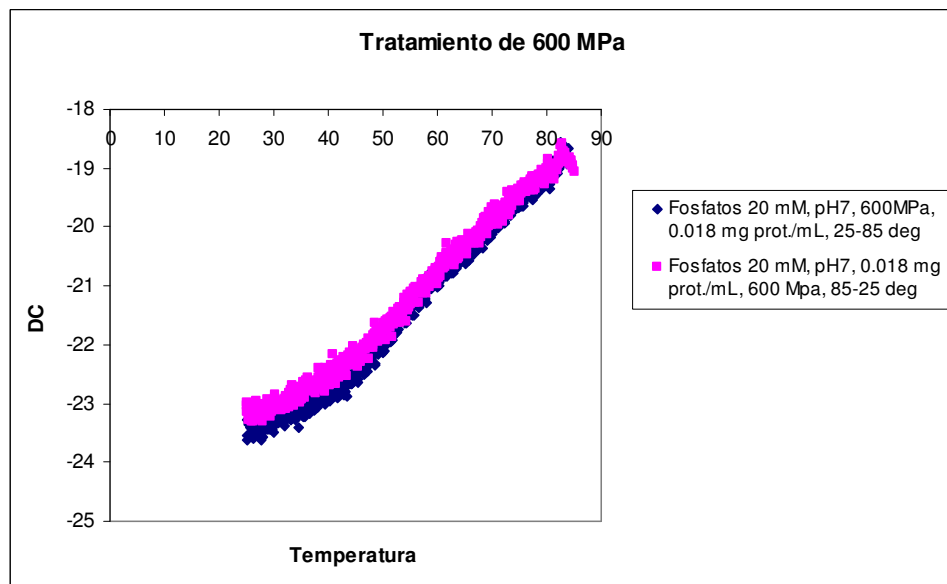


Figura 11. Cambios en la lectura de DC de la α -LA (17) a pH de 7.

La Figura 10 muestra los cambios en las lecturas de DC para la α -LA tratada a 400 MPa, pH 7 y como se puede apreciar, se ve una ligera histéresis, lo cual indica un cambio irreversible en su estructura secundaria.

Todas las muestras presentaron alta termoestabilidad (valores de temperatura media de desnaturalización (T_m) elevados) como se puede observar en el Cuadro 3. El parámetro T_m incrementa al incrementar la severidad del tratamiento con HHP, posiblemente indicando la generación de una estructura más termoestable debido al tratamiento con HHP. El producto más termoestable fue obtenido a 600 MPa, 55°C y 10 min, a pH de 3 con un valor de T_m de 70.49 °C.

Cuadro 3. Valores de temperatura media de desnaturalización (T_m) de la α -LA bajo diferentes condiciones de tratamiento con HHP y pH.

Tipo de tratamiento HHP	pH	Valor de T_m (°C)
T	3	61.97
T	5	56.40
T	7	53.12
CP	3	66.98
CP	5	52.40
CP	7	53.80
17	3	70.49
17	5	54.52
17	7	55.43

T: proteína testigo; CP: proteína punto central con tratamiento con HHP (400 MPa, 40°C, 10 min) y 17: proteína con tratamiento HHP (600MPa, 55°C, 10 min).

Aunque se tendrían que realizar más experimentos, estos resultados indican que se pueden obtener estructuras más estables y que además posean buenas propiedades funcionales al tratar a la proteína α -LA con HHP con el objetivo de incluirla en diferentes sistemas alimenticios.

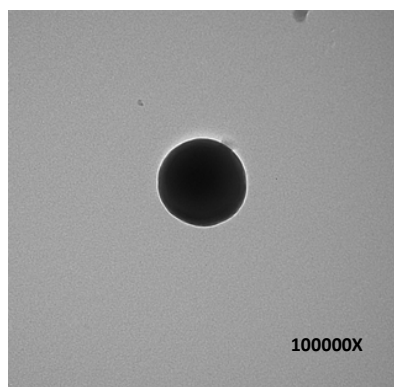
6.2 Preparación de NPs de α -Lactalbúmina y su Análisis por MET

La obtención de nanopartículas de α -LA se realizó por el método de desolvatación, utilizando diferentes agentes desolvatantes (acetona, alcohol etílico y alcohol isopropílico) y un tratamiento térmico (TT) (60°C, 30 min), además, se utilizó proteína nativa (sin tratamiento de HHP) y proteína tratada con HHP (600 MPa, 55°C, 10 min). En las Figuras 12-17 se observan imágenes de nanopartículas de α -LA obtenidas por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

Como se observa en las imágenes siguientes, las nanopartículas (NPs) se muestran bien definidas, con bordes regulares y forma circular, además, se aprecia que las NPs poseen una estructura en general densa y uniforme, ya que no se observan huecos en su estructura. En lo referente a las NPs obtenidas a partir de α -LA tratada con HHP, éstas mostraron cierto grado de aglomeración en comparación con las NPs obtenidas a partir de α -LA nativa, las cuales se ven más separadas unas de otras.

Aparentemente, ni la aplicación de un tratamiento térmico previo a la desolvatación de la α -LA ni la naturaleza del agente desolvatante (acetona, etanol, isopropanol) parecen tener un efecto notable sobre la morfología de las NPs.

α -LA tratada con HHP sin TT



α -LA Nativa sin TT

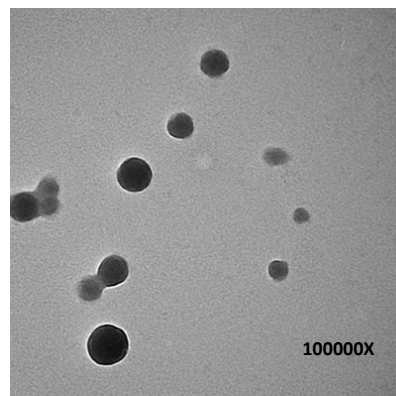


Figura 12. Nanopartículas preparadas por el método de desolvatación utilizando acetona como agente desolvatante.

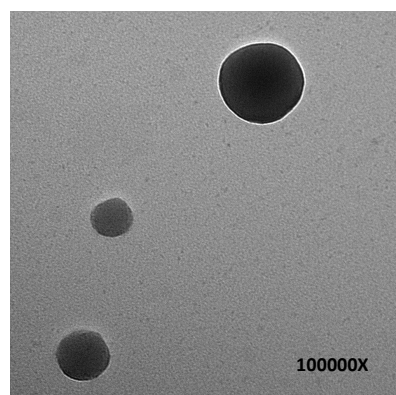
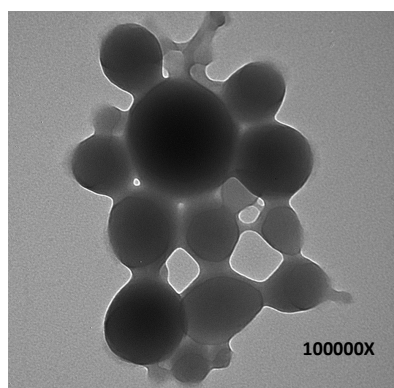


Figura 13. Nanopartículas preparadas por el método de desolvatación utilizando etanol como agente desolvatante.

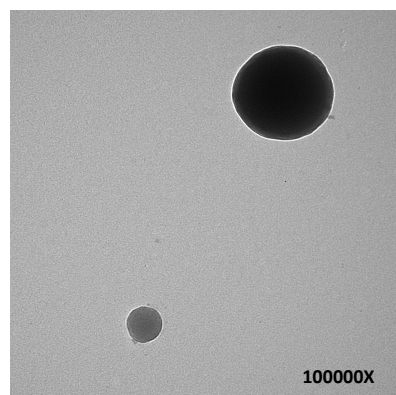
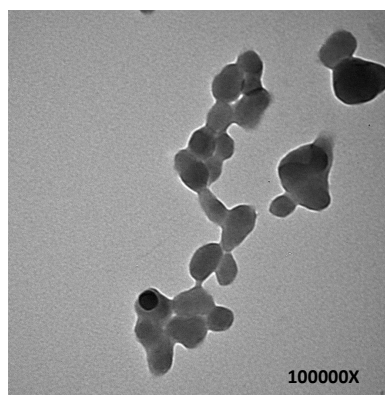
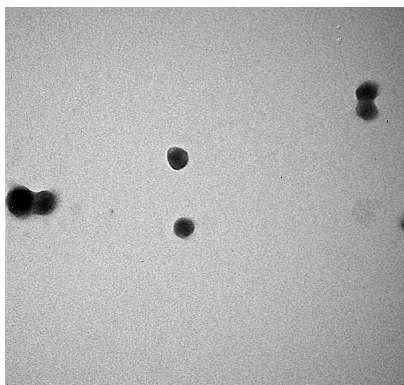


Figura 14. Nanopartículas preparadas por el método de desolvatación utilizando isopropanol como agente desolvatante.

α -LA tratada con HHP con TT



α -LA Nativa con TT

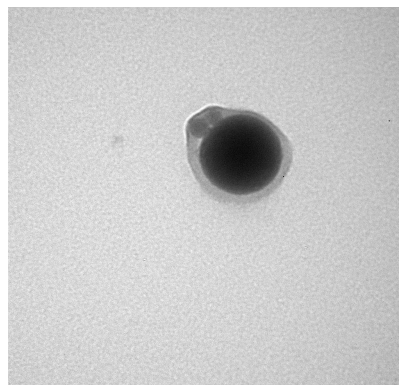


Figura 15. Nanopartículas preparadas por el método de desolvatación utilizando acetona como agente desolvatante.

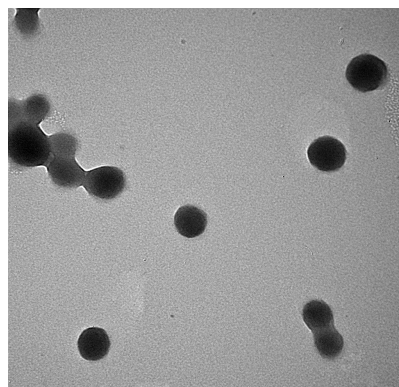
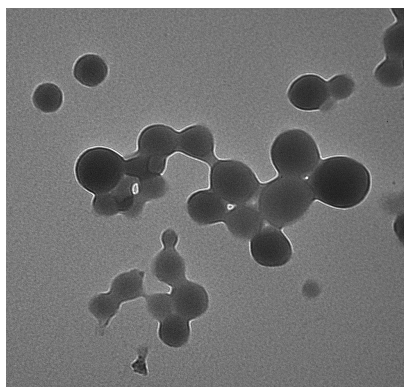


Figura 16. Nanopartículas preparadas por el método de desolvatación utilizando etanol como agente desolvatante.

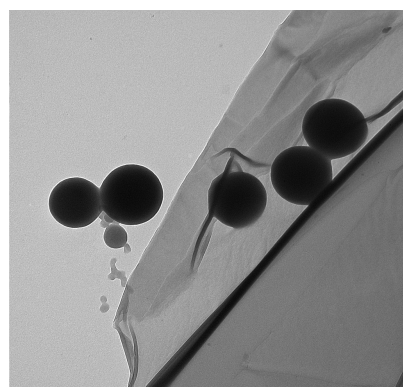
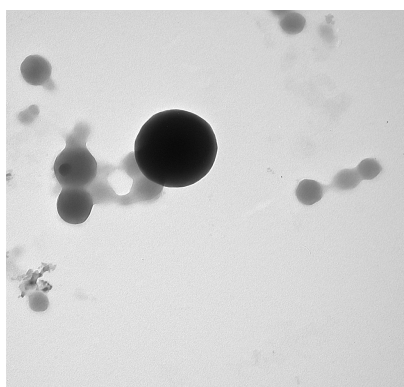


Figura 17. Nanopartículas preparadas por el método de desolvatación utilizando isopropanol como agente desolvatante.

6.3 Proteína no ensamblada en NPs después de la Desolvatación

La determinación del rendimiento de NPs se llevó a cabo por la reacción de proteína libre (después del proceso de desolvatación para la obtención de NPs) con ácido bicinconínico, en la Figura 18 se muestra la curva estándar de α -LA que se utilizó para la cuantificación de proteína.

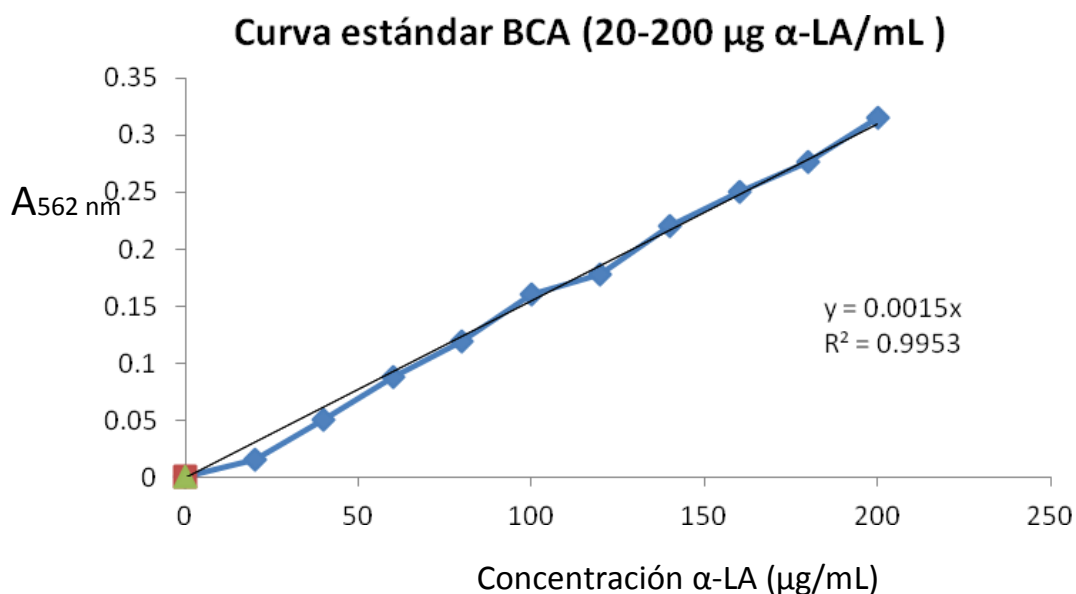


Figura 18. Curva estándar de α -Lactalbúmina

Utilizando el método del ácido bicinconínico se determinó en la preparación de las nanopartículas a partir de muestras sometidas a diferentes tratamientos (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Rendimiento en la preparación de NPs de α -LA (nativa y tratada con HHP) sin tratamiento térmico (TT).

Muestra	Rendimiento (%)
lastA	99.87
lastE	99.88
lastI	98.98
HpstA	99.82
HpstE	99.84
HpstI	99.38

Cuadro 5. Rendimiento en la preparación de NPs de α -LA (nativa y tratada con HHP) con tratamiento térmico TT.

Muestra	Rendimiento (%)
lactA	99.82
lactE	99.89
lactI	99.17
HpctA	99.88
HpctE	99.87
HpctI	99.12

Como se observa en los resultados mostrados, un rendimiento por arriba del 99 % se observa para todas las muestras, lo que indica que la mayor parte de la proteína en la solución inicial se ensambla en NPs, y estos resultados son congruentes con lo encontrado por Langer y col., (2003), que determinaron un rendimiento de 95% en la obtención de NPs a partir de albúmina sérica bovina por el método de desolvatación, utilizando etanol como agente desolvatante.

6.4 Tamaño de Partícula (Diámetro Hidrodinámico) de las Nanopartículas de α -Lactalbúmina

En el siguiente Cuadro (6) se muestra la relación entre las condiciones experimentales para la obtención de NPs y su efecto en el tamaño de dichas estructuras. La determinación del tamaño se hace a través de la medición del diámetro hidrodinámico y se define como el tamaño hipotético de una esfera que se difunde de una manera muy similar que la partícula que está siendo analizada. En la práctica las moléculas en solución no son totalmente esféricas, se mueven y están hidratadas, así que el diámetro calculado a partir de las propiedades difusivas de las partículas será indicativo del tamaño aparente de una partícula dinámica e hidratada/solvatada. y se muestra también el índice de polidispersidad para cada muestra, dicho parámetro indica que tan polidispersa es una muestra, siendo valores menores a 0.5 los más confiables para una muestra determinada (Malvern Instruments, Inc., 2004).

Al comparar el tamaño (Diámetro Hidrodinámico) de las NPs obtenidas de α -LA nativa con las NPs obtenidas de α -LA tratada con HHP y sin tratamiento térmico, para ambos casos, se puede ver que el uso de altas presiones sobre la α -LA influye en la formación de partículas de mayor tamaño cuando se utiliza acetona como agente desolvatante. Cuando se utilizó etanol, las NPs formadas presentaron el mismo tamaño. Con el uso de isopropanol como desolvatante, el tamaño de las NPs se ve reducido cuando las NPs se obtienen a partir de α -LA tratada con HHP. Los diferentes tamaños de NPs obtenidos se pueden atribuir al hecho de que el tratamiento con altas presiones provoca la exposición de grupos cargados del interior de la proteína y éstos interactúan de manera diferente con cada uno de los desolvatantes utilizados.

Cuando se aplica un tratamiento térmico antes de la desolvatación de la α -LA, las NPs formadas presentan un comportamiento similar al antes mencionado para el caso de acetona, es decir, las NPs obtenidas de α -LA tratada con HHP son más grandes que las obtenidas de α -LA nativa, y este efecto se observó también cuando se utilizó isopropanol como desolvatante. En el caso del etanol, las NPs de α -LA tratada con HHP son más pequeñas que las obtenidas de α -LA nativa.

Cuadro 6. Efecto de algunos tratamientos en el tamaño de las nanopartículas de α -Lactalbúmina.

Muestra	Diámetro Hidrodinámico (nm)	Pdl	Muestra	Diámetro Hidrodinámico (nm)	Pdl
LastA (proteína nativa, ST, agente desolvatante Acetona)	152.3	0.166	HpstA (proteína HHP, ST, agente desolvatante Acetona)	207.6	0.169
LastE (proteína nativa, ST, agente desolvatante Etanol)	246	0.214	HpstE (proteína HHP, ST, agente desolvatante Etanol)	245.8	0.302
LastI (proteína nativa, ST, agente desolvatante Isopropanol)	324.9	0.179	HpstI (proteína nativa, ST, agente desolvatante Isopropanol)	298.4	0.383
LactA (proteína nativa, CT, agente desolvatante Acetona)	163.1	0.104	HpctA (proteína nativa, CT, agente desolvatante Acetona)	237.3	0.198
LactE (proteína nativa, CT, Etanol)	205.1	0.121	HpctE (proteína HHP, CT, agente desolvatante Etanol)	185.6	0.126
LactI (proteína nativa, CT, agente desolvatante Isopropanol)	293.4	0.088	HpctI (proteína HHP, CT, agente desolvatante Isopropanol)	335.3	0.264

CT: con tratamiento térmico (60 °C, 30 min); **HHP:** proteína tratada con Alta Presión Hidrostatica (600 MPa, 55 °C, 30 min); **ST:** sin tratamiento térmico.

Como se observa en el Cuadro 4, el uso de los diferentes desolvatantes da como resultado la obtención de partículas que poseen un Diámetro Hidrodinámico que está en un intervalo entre 152.3-335.3 nm y estos resultados coinciden con lo encontrado por Weber (2000), el cual menciona la obtención de nanopartículas de la proteína albúmina sérica humana (HSA) cuyo tamaño es de 315-344 nm utilizando etanol como agente desolvatante.

El uso de acetona como agente desolvatante en el proceso de obtención de NPs de α -LA es debido a que permite la formación de partículas de menor tamaño, de acuerdo con Lin et al., (1993), quienes obtuvieron NPs del orden de 90-250 nm, utilizando la proteína HSA y acetona como agente desolvatante. Esto coincide con los datos obtenidos en este trabajo, ya que las NPs de α -LA tanto, nativa como tratada con HHP obtenidas con acetona son de menor tamaño para la mayoría de los casos (152.3-237.3 nm), comparadas con las obtenidas con los otros desolvatantes (etanol e isopropanol).

El pH elevado puede contribuir a este efecto en la reducción del tamaño de las partículas, aparentemente debido a un incremento en la ionización de la α -LA ($pI = 4.8$), lo que da como consecuencia la repulsión entre las moléculas de α -LA y la agregación durante la formación de las NPs. Además, las proteínas en general se encuentran con una mayor desnaturalización a pH básico, el cual expone los sitios reactivos para el entrecruzamiento (Kinsella y Whitehead, 1989).

Gunasekaran et al., (2007) estudiaron la formación de nanopartículas de β -lactoglobulina (BLG) con acetona como agente desolvatante a pH de 9.0, además, se aplicó un tratamiento térmico a la proteína previo a la formación de las partículas, encontrando que el tamaño de las mismas se ve influenciado por este tratamiento térmico, ya que, cuando sometió a la proteína a 60°C por 30 minutos se obtuvieron partículas con un tamaño promedio de 59 ± 5 nm, mientras que sin tratamiento térmico el tamaño promedio fue de 127 ± 4 nm, estos resultados concuerdan con los obtenidos en éste trabajo, ya que las partículas obtenidas de α -LA nativa resultaron ser de menor tamaño cuando se sometieron a un tratamiento térmico previo a la adición de etanol e isopropanol (de 246 a 205 y de 324 a 293 nm respectivamente), al mismo pH (9.0). No obstante, cuando se utilizó acetona las NPs formadas aumentaron ligeramente de tamaño con el tratamiento térmico (de 152 a 163). Lo cual indica que la α -LA es más estable que la BLG y que el tratamiento con calor previo a la formación de las partículas no es suficiente para modificar el tamaño de las mismas cuando se utiliza acetona como agente desolvatante. Para las NPs obtenidas a partir de α -LA tratada con HHP, solo cuando se utilizó etanol se observó un efecto en la disminución de tamaño de las NPs (de 245 a 185 nm). El tratamiento

térmico en combinación con los otros desolvatantes permitió la formación de NPs de mayor tamaño (acetona de 207 a 237 nm e isopropanol de 298 a 335 nm).

6.5 Peso Molecular de las NPs de α -Lactalbúmina

Conocer el peso molecular de las NPs de α -lactalbúmina permitirá tener mayor conocimiento de la forma en que la proteína se ensambla durante el proceso de formación de las NPs, así como el número de moléculas de α -lactalbúmina que conforman las NPs. En el Cuadro 7 se muestra el peso molecular de las diferentes NPs.

Como se puede ver en la Cuadro siguiente, las Nps podrían considerarse como partículas compactas por el elevado numero de moléculas de proteína que conforman la matriz de éstas y lo anterior coincide con las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observan partículas bien definidas y con ausencia de espacios dentro de ellas. Durante el proceso de preparación de las NPs, en la parte final, se realiza el entrecruzamiento químico de las moléculas de α -lactalbúmina con una solución de glutaraldehído, siendo la lisina el principal aminoácido que reacciona con el glutaraldehído para consolidar la formación de una estructura compacta y homogénea y debido a que por cada molécula de proteína hay 12 lisinas (9.8% de la composición total) la unión química se considera que queda definida.

Cuadro 7. Peso molecular de las NPs de α -Lactalbúmina determinado por Difusión Estática de Luz.

Peso molecular (x10⁶ kDa)	Número de moléculas de α-lactalbúmina (PM 14 kDa) involucradas en la formación de las NPs
lastA 1.74	124,285.7
lactA 1.07	76, 428.6
HpstA 1.39	99,285.7
HpctA 3.95	282,142.9
lastE 3.96	282,857.2
lactE 4.14	295,714.3
HpstE 7.44	531,428.6
HpctE 1.02	72,857.2
lastI 2.7	192,857.2
lactI 1.37	97,857.2
HpstI 4.27	305,000
HpctI 1.65	117,857.2

LastA: proteína nativa (pN), sin tratamiento térmico (sT), acetona como desolvatante; LactA: pN, con tratamiento térmico (cT), acetona como desolvatante; HpstA: proteína tratada con alta presión hidrostática (Hp), sT, acetona como desolvatante; HpctA: Hp, cT, acetona como desolvatante; E: etanol e I: isopropanol como agentes desolvatantes respectivamente. Concentración de proteína: 0.00002 g/L.

6.6 Densidad de las NPs de α -Lactalbúmina

Otra propiedad que permite la caracterización y un mejor entendimiento del ensamble de la proteína α -lactalbúmina en NPs es la densidad de las partículas. Conociendo el diámetro hidrodinámico y el peso molecular se puede

obtener la densidad. En el Cuadro 8 se muestran los valores de densidad para cada una de las NPs.

Cuadro 8. Valores de densidad de las NPs de α -Lactalbúmina.

Muestra	Diámetro (nm)	Masa (kDa$\times 10^6$)	Volumen (cm³)	Densidad (g/cm³)
LastA	152.3	1.74	1.85×10^{-15}	1.56
HpstA	207.6	1.39	4.68×10^{-15}	0.49
LastE	246	3.96	7.80×10^{-15}	0.84
HpstE	245.8	7.44	7.77×10^{-15}	1.58
LastI	324.9	2.70	1.80×10^{-14}	0.24
HpstI	298.4	4.27	1.40×10^{-14}	0.50
LactA	163.1	1.07	2.27×10^{-15}	0.78
HpctA	237.3	3.96	7×10^{-15}	0.93
LactE	205.1	4.14	4.51×10^{-15}	1.52
HpctE	185.6	1.02	3.35×10^{-15}	0.50
LactI	293.4	1.37	1.32×10^{-14}	0.17
HpctI	335.3	1.65	1.97×10^{-14}	0.13

Nota: para la determinación del volumen se considero a las NPs como esferas ($v = 4/3 * \pi * r^3$).

Al comparar los valores de densidad entre las NPs obtenidas de proteína nativa y tratada con alta presión hidrostática (HP), se observa que cuando se utiliza acetona como desolvatante y sin la aplicación de tratamiento térmico las NPs de proteína nativa presentan una mayor densidad, pero lo contrario ocurre en el caso del etanol como desolvatante y al observar a las NPs de proteína nativa y tratada con HP pero con isopropanol como desolvatante no hay diferencia significativa en el valor de la densidad.

Siguiendo con el análisis de NPs obtenidas con los mismo desolvatantes pero con un tratamiento térmico previo a la formación de las NPs (sobre la solución de proteína) se nota que en el caso de etanol la mayor densidad la presentan las NPs obtenidas de proteína nativa, con la acetona no se ve diferencia en cuanto a esta propiedad y con el isopropanol tampoco.

Se puede considerar que el principal factor que determina la magnitud de la densidad es el tamaño de las NPs (diámetro), ya que los valores de peso molecular son muy parecidos entre sí.

Si comparamos a las NPs con un sistema complejo que se presenta de forma natural en un alimento tan particular como la leche, se tendría que mencionar a las micelas de caseína, las cuales representan el 80% de las proteínas de la leche (Badui, 2004). En el Cuadro 9, se hace la comparación entre estos dos sistemas.

Cuadro 9. Comparación de algunas características de las NPs de α -Lactalbúmina y micelas de caseína.

Muestra	Diámetro (nm)	Masa (kDa $\times 10^6$)	Volumen (cm³)	Numero de moléculas de proteína	Densidad (g/cm³)
LastA	152.3	1.74	1.85×10^{-15}	124,285.7	1.561
HpstA	207.6	1.39	4.68×10^{-15}	99,285.7	0.492
LastE	246	3.96	7.80×10^{-15}	282,857.2	0.843
HpstE	245.8	7.44	7.77×10^{-15}	531,428.6	1.588
LastI	324.9	2.70	1.80×10^{-14}	192,857.2	0.249
HpstI	298.4	4.27	1.40×10^{-14}	305,000	0.509
LactA	163.1	1.07	2.27×10^{-15}	76,428.6	0.782
HpctA	237.3	3.96	7×10^{-15}	282,142.9	0.939
LactE	205.1	4.14	4.51×10^{-15}	295,714.3	1.521
HpctE	185.6	1.02	3.35×10^{-15}	72,857.2	0.505
LactI	293.4	1.37	1.32×10^{-14}	97,857.2	0.171
HpctI	335.3	1.65	1.97×10^{-14}	117,857.2	0.138
Caseína	50-450	2×10^{10}- 2×10^{13}	-	1×10^3-1×10^6	1.114

Haciendo referencia al Cuadro anterior se ve que todas las NPs se encuentran dentro del intervalo correspondiente al sistema de las micelas de caseína, aproximadamente la mitad de los valores de densidad son parecidos a la densidad de las micelas, los demás corresponden desde una tercera parte (HpstA, HpstI, HpctE) hasta una décima parte (LactI, HpctI) con respecto a la micela. De lo anterior se puede mencionar que al parecer la densidad menor se presenta en las NPs obtenidas a partir de proteína tratada con HP, pudiendo ser éste un factor que determina que tanto se compactan las moléculas de α -lactalbúmina durante la formación de las NPs. Ya que la densidad se determina tomando en cuenta el tamaño de las NPs, se observa que las NPs que

presentaron menor densidad también son las más grades como sucede con las muestras: Lastl, Lactl, Hpctl. También se podría inferir, de acuerdo a estos resultados que el agente desolvatante influye en el tamaño de las NPs, ya que se observa que cuando se utiliza isopropanol las NPs presentan un mayor tamaño, es decir, cada desolvatante interacciona con la proteína de diferente manera induciendo propiedades un tanto diferentes en las NP.

6.7 Potencial Zeta de las NPs de α -Lactalbúmina

El potencial zeta (pZ) puede ser un indicador para evaluar el comportamiento de las NPs puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre dichas partículas, es decir, es útil para predecir la estabilidad de un sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta grande, ya sea positivo o negativo, tenderán a repelerse entre sí y a no flocular.

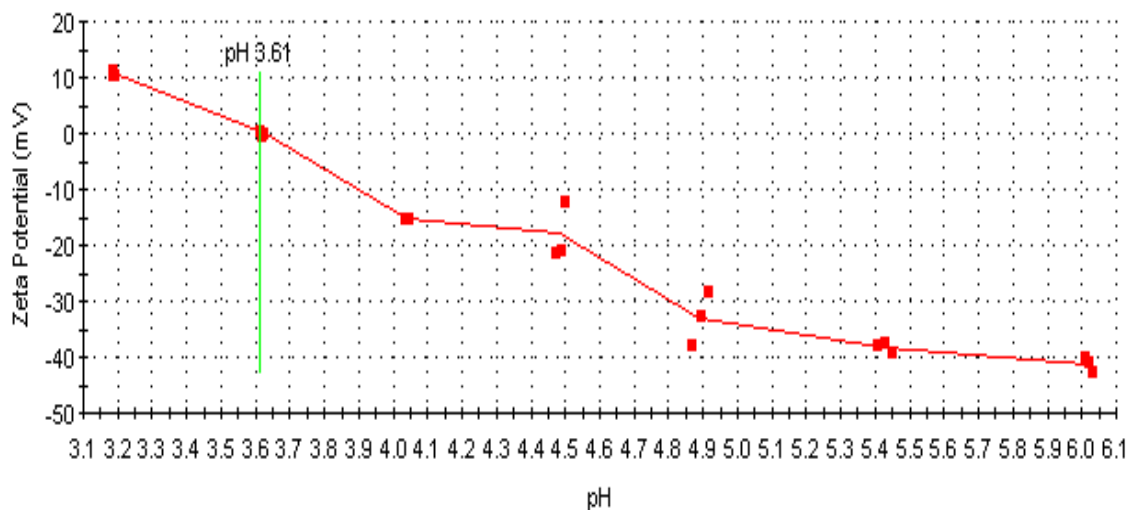


Figura 19. Variación del potencial zeta de las NPs con respecto al pH. Lastl (proteína α -Lactalbúmina nativa, sin tratamiento termico y agente desolvatante isopropanol).

El factor más importante que afecta al potencial zeta es el pH, así, una partícula en suspensión con un potencial zeta negativo a la que se le adiciona más álcali tenderá a cargarse más negativamente, si se adiciona ácido a ésta suspensión llegará un punto en que las cargas se neutralizaran e incluso se puede alcanzar un potencial zeta positivo.

Como se menciona antes, al graficar potencial zeta contra pH se obtiene una curva que es positiva a bajos valores de pH y negativa para valores de pH elevados. El punto donde la curva cruza en cero se denomina punto isoeléctrico y es muy importante para consideraciones prácticas, ya que es en este punto donde el sistema coloidal es menos estable.

En cuanto a los valores del pZ, se conoce que valores > 30 mV indican partículas coloidales positivas muy estables y que valores < -30 mV corresponden a partículas negativas estables (Malvern Instrument, 2004). Se puede inferir de los resultados que en todas las muestras prevalecen partículas negativas. De acuerdo a estos valores se puede indicar que las partículas más estables serían aquellas con un pZ menor a -30 mV. En el Cuadro anterior se observa que bajo condiciones alcalinas (pH 5.3 – 9.0) las NPs son muy estables. En todas ellas los valores de pZ oscilan entre -30 y -51 mV.

En el Cuadro 10 se muestran los valores de pZ de las NPs obtenidas a partir de α -LA (nativa y tratada con HHP) por el método de desolvatación utilizando diferentes desolvatantes.

Cuadro 10. Valores de pZ para los diferentes sistemas de NPs.

Muestra	Intervalo de pH (titulación)	Intervalo de pZ (mV) (inicial-final)	pZ (mV) (promedio)	Muestra	Intervalo de pH (titulación)	Intervalo de pZ (mV) (inicial-final)	pZ (mV) (promedio)
LastA	6.01-3.19	-40 a 11.3	-19.3 pI 3.61	HpstA	6.28-3.14	-31.4 a -0.482	-12.3
	5.29-8.8	-39.5 a -55.8	-44.4		6.18-9.02	-26.6 a -38.8	-30.05
LastE	5.3-3.2	-34.8 a -4.07	-18.1	HpstE	6.19-3.82	-37.2 a 11.8	-14.3 Pi 3.75
	5.18-9.09	-31.4 a -47.9	-46.4		5.55-8.82	-29.1 a -47.2	-37.8
LastI	6.41-3.18	-47 a -0.096	-21.4	HpstI	6.01-3.19	-31.7 a -8.03	-16.2
	6.45-8.74	-55.7 a -48	-51.19		6.04-9.77	-35.7 a -36.7	-35.7
LactA	6.2-3.06	-39.9 a 3.69	-12.9 pI 3.72	HpctA	5.97-3.2	-39.7 a -2.75	-15.9 pI 3.65
	6.3-8.75	-39.8 a -32	-33.7		6.32-8.75	-43.3 a -38.1	-42.8
LactE	6.0-3.07	-18.9 a -7.16	-11.5	HpctE	5.25-3.14	-26.5 a 2.14	-8.69 pI 3.12
	6.2-8.69	-31.9 a -31.6	-30.4		6.01-8.82	-33.6 a -35	-37.6
LactI	5.41-3.06	-24 a -6.91	-12.4	HpctI	5.82-3.17	-35 a -7.01	-15.4
	5.96-9.86	-31.2 a -40.8	-40.3		5.46-9.0	-37.2 a -51.8	-44.1

La titulación inicio a pH de 3.0 y en el intervalo entre 3.0 a 6.0, las NPs obtenidas de α -LA utilizando acetona como desolvatante mostraron tener un pZ de -19.3 (sin TT) y -12.9 (con TT) y presentaron un punto isoeléctrico (pI) a pH de 3.61 y 3.72 respectivamente. A valores de pH cercanos al pI las NPs pueden presentar un comportamiento inestable debido a que la carga en la superficie de éstas es cero y pueden agregarse al no haber fuerzas de repulsión que eviten este fenómeno. Utilizando los otros desolvatantes (etanol e isopropanol) no se llegó al pI, ya que el valor del pZ siempre se mantuvo negativo. Al incrementar el pH el valor del pZ de las NPs se redujo para todas las muestras.

Las NPs formadas a partir de α -LA tratada por HHP (con TT) y con acetona presentaron el pI a pH de 3.65. Pero no fue así con las NPs obtenidas bajo las mismas condiciones pero sin TT. En el caso de las NPs de proteína tratada con HHP y etanol, tanto con TT y sin TT presentaron pI a pH de 3.12 y 3.75 respectivamente. De igual forma, al incrementar el pH el valor del pZ de las NPs se redujo. Estos resultados son congruentes con lo encontrado con Langer (2003) donde las NPs obtenidas de albumina sérica humana (HSA) y etanol como desolvatante mostraron un pZ de +35 mV a pH de 3.0 y al incrementar el pH a valores entre 7.2 y 10 el pZ se redujo de -40 a -50 mV. Así, se puede decir que es preferible evitar valores de pH que provoquen que las NPS tengan una superficie de carga neutra. Gunasekaran (2007) encontró para NPs obtenidas de beta-lactoglobulina (BLG) que el pZ decrece al incrementar el pH mostrando valores de entre -30 a -40 en un intervalo de pH de 7.0 a 11.0.

El punto isoeléctrico de la α -lactalbúmina nativa es 4.2, los resultados obtenidos muestran una ligera disminución de éste valor cuando la proteína forma NPs. Esto podría indicar que más grupos hidrofílicos con carga negativa están expuestos en la superficie de la nanopartícula comparado a la proteína nativa y se necesita más ácido para neutralizarlos.

En conclusión, las NPs de α -lactalbúmina son una mejor opción para su uso en alimentos debido a su estabilidad en un intervalo amplio de pH.

En la siguientes Figuras se observa la relación del tamaño de partícula y el potencial zeta.

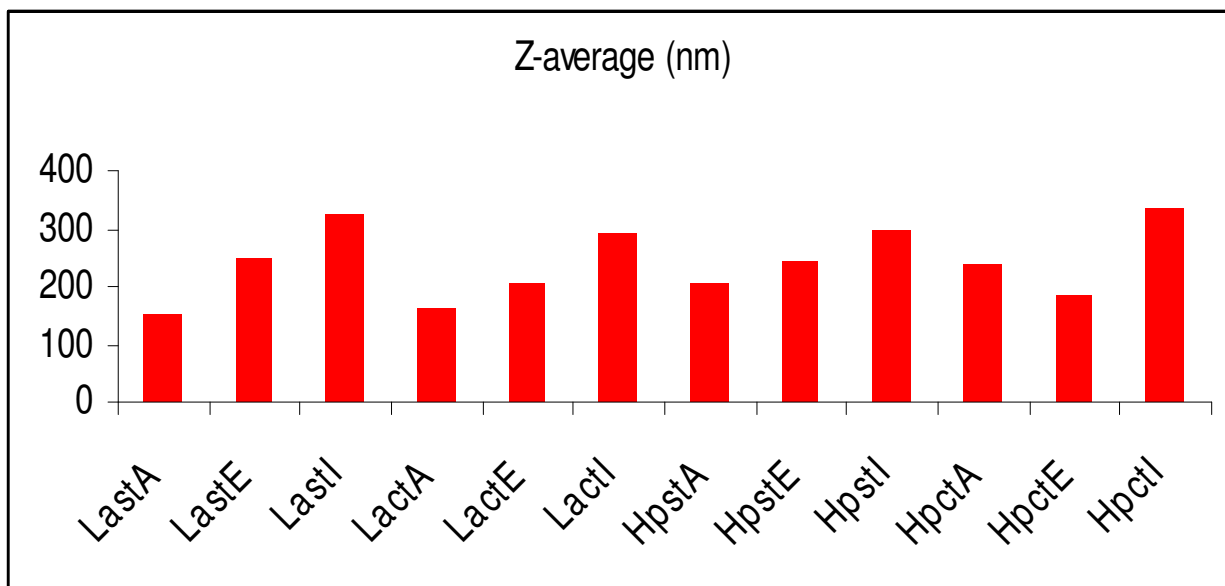


Figura 20. Valores de diámetro hidrodinámico (Z-average) de las NPs de α -lactalbúmina obtenidas bajo diferentes condiciones.

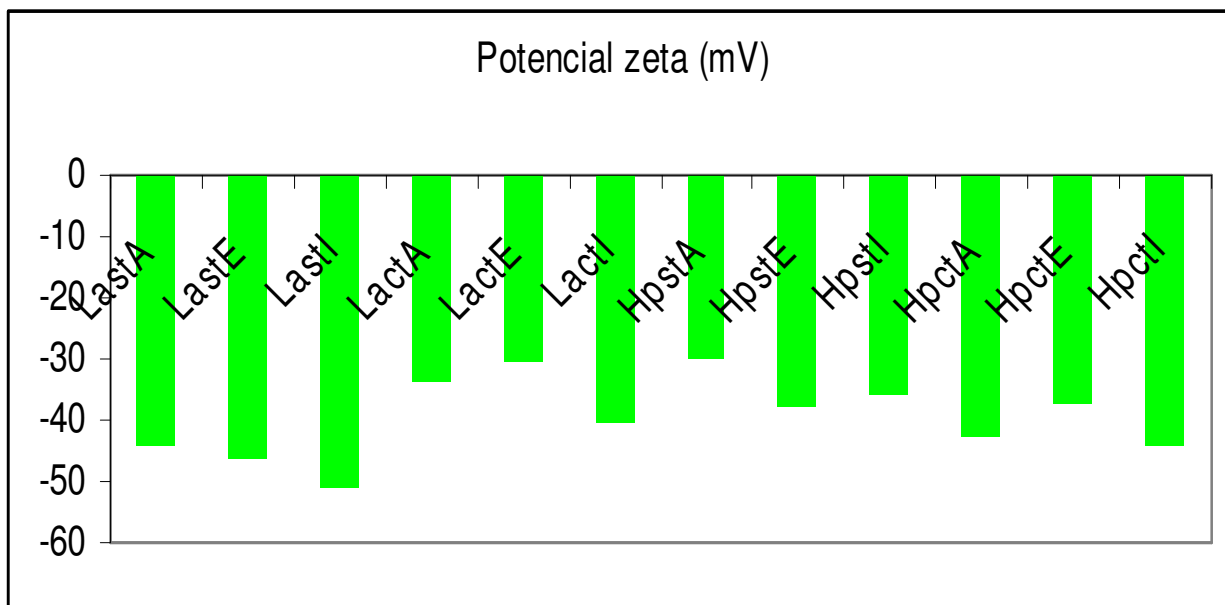


Figura 21. Valores de pZ a pH básico de las NPs de α -lactalbúmina obtenidas bajo diferentes condiciones.

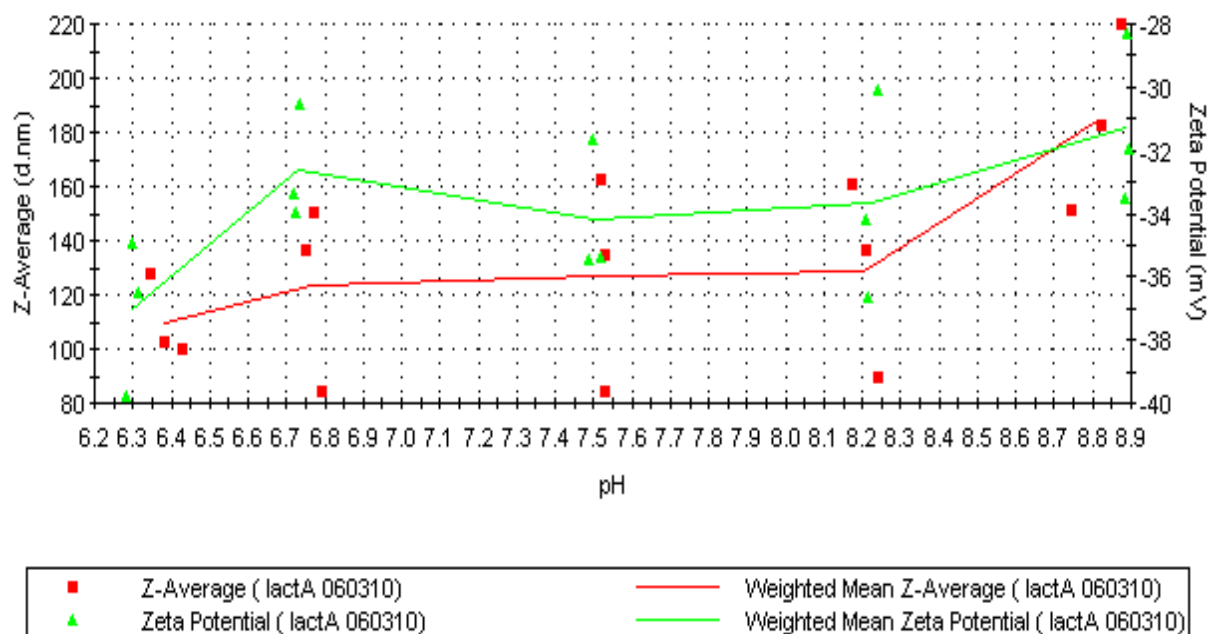


Figura 22. Relación entre el diámetro hidrodinámico y el pZ de la nanopartícula LactA (proteína nativa, con tratamiento térmico y con acetona como agente desolvatante).

El tamaño de las NPs de α -lactalbúmina puede explicarse por su carga e hidrofobicidad superficial. La α -lactalbúmina contiene un elevado número de aminoácidos cargados (13 asparaginas, 12 lisinas, 7 glutamatos, 3 histidinas) (Fox, 1992). A valores de pH básicos, el tamaño de la proteína así como los espacios en el interior de algunas estructuras como los geles y nanopartículas generalmente decrece (Schmidt, 1986). Las NPs de obtenidas de α -lactalbúmina fueron preparadas bajo estas condiciones a pH de 9.0 por lo tanto tendrían carga negativa, lo anterior se puede corroborar con los valores obtenidos de pH, que muestran mayor estabilidad a pH básico, cuando las NPs están cargadas negativamente, además, ésta condición permite reducir el tamaño de las NPs y evitar la precipitación por coacervación. En la Figura 21 se puede notar que tanto el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta permanecen relativamente constantes a valores de pH básicos para la muestra LactA y el comportamiento se encontró muy parecido en las otras NPs.

6.8 Hidrofobicidad Superficial de las NPs de α -Lactalbúmina

Los resultados de hidrofobicidad se expresaron como cambios en la intensidad de fluorescencia y reportados como unidades arbitrarias (UA). En ésta determinación se utilizó como marcador de fluorescencia el compuesto ANS. Este compuesto presenta fluorescencia al unirse a compuestos no polares. La unión de ANS-NPs es excitada a cierta longitud de onda (λ) lo que permite que presente una emisión característica. En el caso de las proteínas globulares como la α -lactalbúmina, al desnaturalizarse ésta tiende a abrirse y exponer sitios hidrofobicos que al unirse con el ANS presentan un valor de fluorescencia (Liu, 2005).

Los datos obtenidos de esta medición se graficaron y presentaron la forma de una campana de Gauss mediante la relación λ contra UA. La comparación realizada es entre los valores de intensidad expresados en UA de las diferentes NPs a diferente pH (3.0, 5.0, 7.0 y 9.0). Se evaluó el cambio de intensidad entra la muestra testigo (proteína sin ensamblar) y las NPs. En el Cuadro 9 se presentan los valores en UA a una λ específica, la cual se seleccionó en funcion al pico máximo en UA presentada por las muestras a cada uno de los pH en estudio.

Las longitudes de onda seleccionadas fueron de 477 para pH 3.0, 400 para pH 5.0, 460 para pH 7.0 y 474 para pH 9.0. Los valores en UA a pH de 3.0 y 9.0, son muy bajos que podría considerarse que los residuos hidrofobicos quedaron en el interior de la matriz proteica durante la formación de las NPs, sin embargo, cuando la determinación de fluorescencia se realizó a pH de 5.0 y 7.0 se observaron lecturas en un intervalo entre las 893 y las 24,056 UA, lo que sugiere que el pH posiblemente modifica la superficie de las NPs ya que en los pH extremos tanto ácido (3.0) como básico (9.0) no se tiene señal de fluorescencia. Si se comparan estos resultados con los valores de fluorescencia obtenidos de la α -lactalbúmina sin ensamblar, se ve que para el caso de la proteína las UA se encuentran en un intervalo de 30,000 a 34,000 a pH 3.0, debido a la presencia de la estructura de glóbulo fundido (Rodiles, 2008), pero como las NPs están unidas químicamente por el glutaraldehído, al

parecer se mantienen compactas y estables evitando la exposición de grupos hidrofobicos que se puedan unir al ANS para dar la señal de fluorescencia. En el caso de la determinación de fluorescencia a pH 3.0, las unicas muestras que presentaron una debil señal de fluorescencia fueron las NPs obtenidas con etanol como agente desolvatante, las obtenidas con acetona e isopropanol no mostraron señal de fluorescencia, mientras que la muestra testigo (proteína sin ensamblar fue la que presento la mayor señal de fluorescencia 879,754 UA, y esto es comparable con lo mencionado anteriormente sobre el estado de glóbulo fundido que presenta la α -lactalbúmina a pH de 3.0 (Yang et al., 2001). Para pH de 9.0 las Nps obtenidas con isopropanol fueron las que no dieron señal de fluorescencia, la muestra LactE fue la que presento mayor señal con 14, 694 UA, mientras que la proteína testigo presento un valor de UA de 10, 453.

Para la determinación a pH de 5.0 el valor máximo se encontró en la muestra LactA 14,775, mientras que la proteína testigo no presento señal de fluorescencia debido a que el pH en estudio esta muy cerca del punto isoeléctrico de la α -lactalbúmina, todas la NPs presentaron señal de fluorescencia, siendo la NPs obtenidas con isopropanol las más estables o compactas debido a que mostraron menos grupos hidrofobicos en la superficie de la partícula y en consecuencia una menor señal de intensidad de fluorescencia.

En referencia al pH de 7.0 la muestra que presentó mayor intensidad de fluorescencia fue la LactI, además de que todas las NPs presentaron señal en un intervalo de 3,464 a 24,056 UA.

En lo referente al tamaño e hidrofobicidad superficial determinada a diferentes valores de pH no se encontró una correlación significativa para las NPs de α -lactalbúmina preparadas bajo diferentes condiciones. El valor positivo más alto de hidrofobicidad superficial se encontró en las NPs preparadas con etanol y un pretratamiento con HHP y el pH de estudio fue de 3. El valor negativo más alto se encontró otra vez a pH de 3 en las NPs preparadas con isopropanol y un pretratamiento con HHP. No obstante, el tamaño de estas dos NPs fue similar.

Se necesitan hacer más investigación al respecto para conocer el efecto de la hidrofobicidad superficial sobre el tamaño y la estabilidad de las NPs de α -lactalbúmina. En el siguiente Cuadro se presentan los valores de fluorescencia a los diferentes pH para cada una de las muestras de NPs.

Cuadro 11. Valores de hidrofobicidad superficial determinada con el reactivo ANS de las NPs de α -lactalbúmina.

MUESTRA	UA pH 3.0		UA pH 5.0		UA pH 7.0		UA pH 9.0	
	λ		λ		λ		λ	
a-lactalbúmina	477	879754.1	400	-80.1	460	5205.664	474	10453.47
LastA	477	-30404.72	400	11031.4	460	4603.964	474	1403.07
LactA	477	-21786.42	400	14775.1	460	5202.464	474	2780.47
HpstA	477	-32302.92	400	4132.2	460	4303.464	474	2231.37
HpctA	477	-33016.02	400	8472.1	460	8484.664	474	1914.27
LastE	477	45799.08	400	6181.8	460	9130.664	474	-11452.7
LactE	477	35268.08	400	5248.6	460	7579.264	474	14694.9
HpstE	477	49855.08	400	5693.7	460	8555.364	474	2906.6
HpctE	477	49801.08	400	7596.7	460	8721.764	474	-4901.2
LastI	477	-32932.12	400	1910.6	460	5513.464	474	-1367.83
LactI	477	-38032.02	400	893.3	460	24056.664	474	-373.63
HpstI	477	-39819.92	400	4196.6	460	3464.564	474	-324.03
HpctI	477	-31243.52	400	5207.8	460	3916.264	474	-2130.93

LastA: proteína nativa (pN), sin tratamiento térmico (sT), acetona como desolvatante.

LactA: pN, con tratamiento térmico (cT), acetona como desolvatante.

HpstA: proteína tratada con alta presión hidrostática (Hp), sT, acetona como desolvatante.

HpctA: Hp, cT, acetona como desolvatante.

E: etanol e I: isopropanol como agentes desolvatantes respectivamente.

UA: Unidades Arbitrarias.

γ : Longitud de onda.

Celdas resaltadas: Valor máximo de intensidad de fluorescencia observado por las muestras de Nps y de la proteína sin ensamblar.

En las siguientes Figuras se representa gráficamente la magnitud en intensidad de fluorescencia para cada una de las muestras en estudio a los diferentes valores de pH.

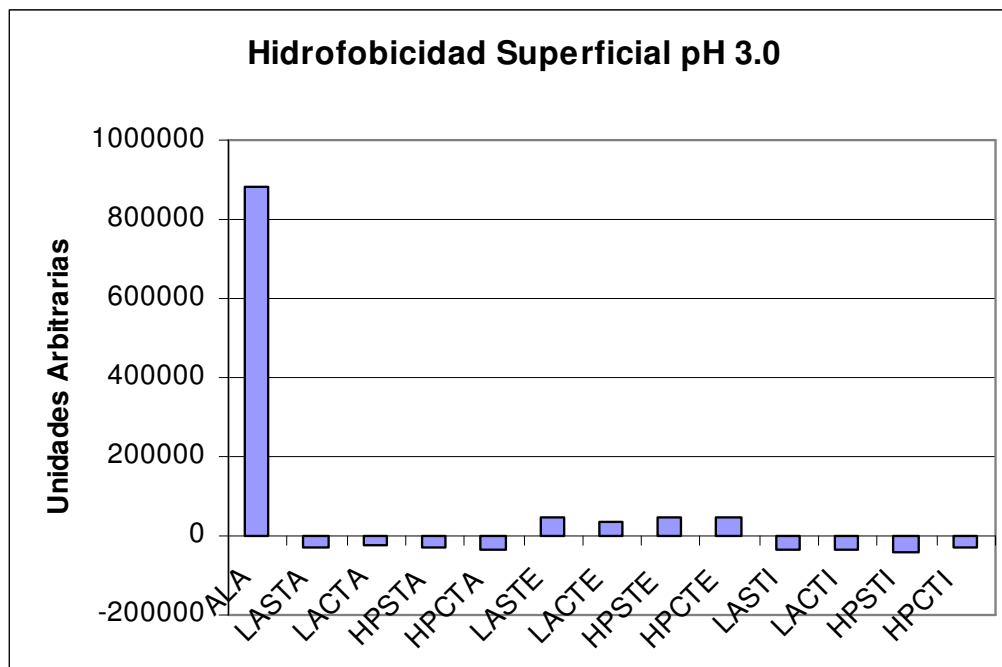


Figura 23. Valores de hidrofobicidad superficial a pH de 3 de las NPs de α -lactalbúmina y de la proteína sin ensamblar (ALA).

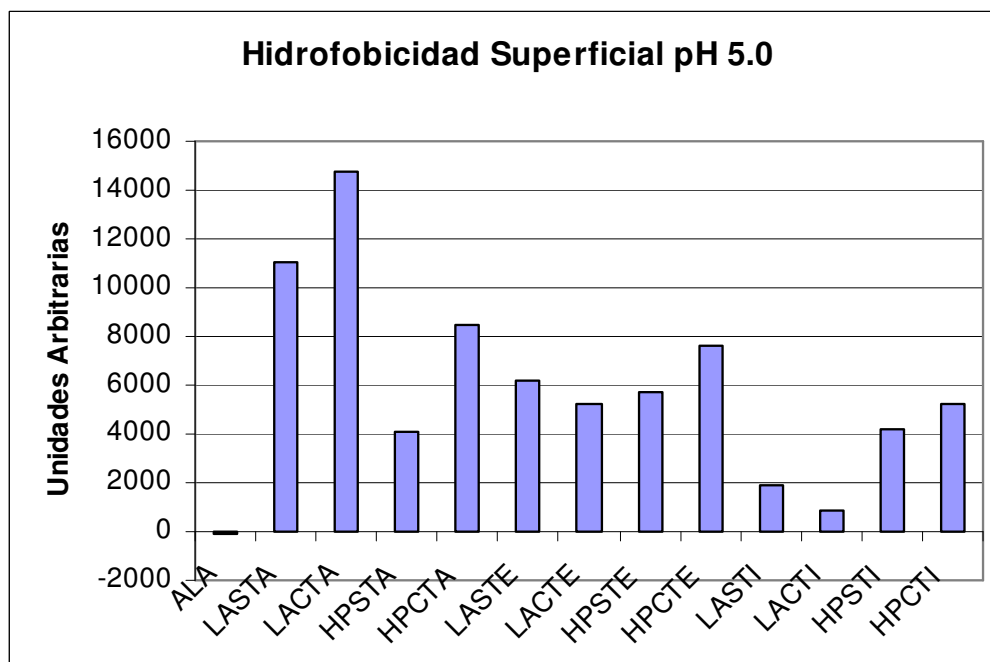


Figura 24. Valores de hidrofobicidad superficial a pH de 5.0 de las NPs de α -lactalbúmina y de la proteína sin ensamblar (ALA).

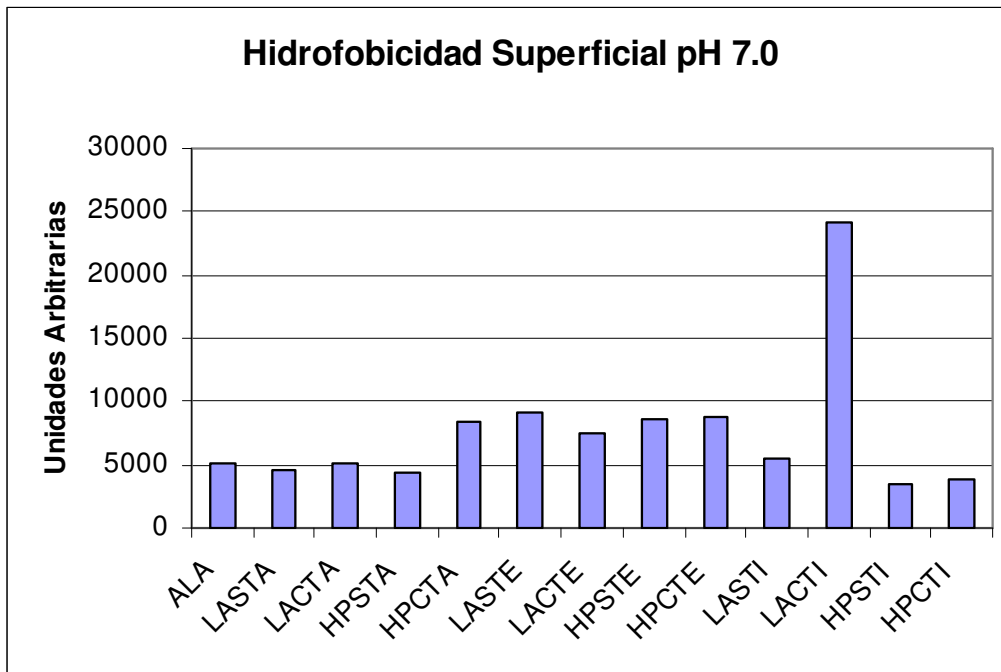


Figura 25. Valores de hidrofobicidad superficial a pH de 7 de las NPs de α -lactalbúmina y de la proteína sin ensamblar (ALA).

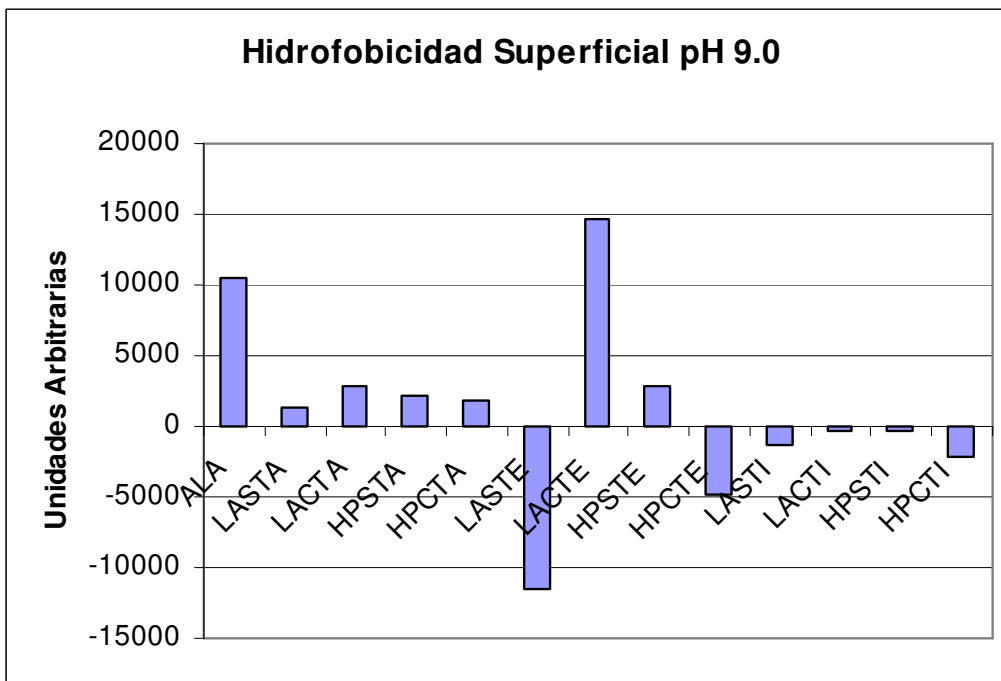


Figura 26. Valores de hidrofobicidad superficial a pH de 9 de las NPs de α -lactalbúmina y de la proteína sin ensamblar (ALA).

6.9 Simulación de la Digestibilidad de las NPs de α -Lactalbúmina

El presente estudio *in vitro* tuvo como objetivo determinar el grado de hidrolisis de las NPs de α -LA utilizando enzimas digestivas (pepsina y pancreatina). La quimotripsina rompe enlaces peptídicos entre a.a. hidrofóbicos, la tripsina rompe enlaces entre a.a. cargados positivamente (Antal et al., 2001) y la pepsina es una proteasa que tiene preferencia por enlaces entre fenilalanina, tirosina, triptófano y leucina en posición P1 y P1' (Fujimoto et al., 2004).

Para la simulación gástrica e intestinal, se utilizaron NPs obtenidas de α -LA (nativa y tratada con HHP) con y sin TT, pero solo se usaron las NPs obtenidas con etanol. La simulación gástrica se llevó a cabo durante 1 hora, para la digestión intestinal el tiempo requerido fue de 4 horas y posteriormente, las muestras de NPs se analizaron por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

En las Figuras 27-34 se observa el efecto de la simulación de la digestión gástrica de las NPs de α -LA obtenidas bajo diferentes condiciones.

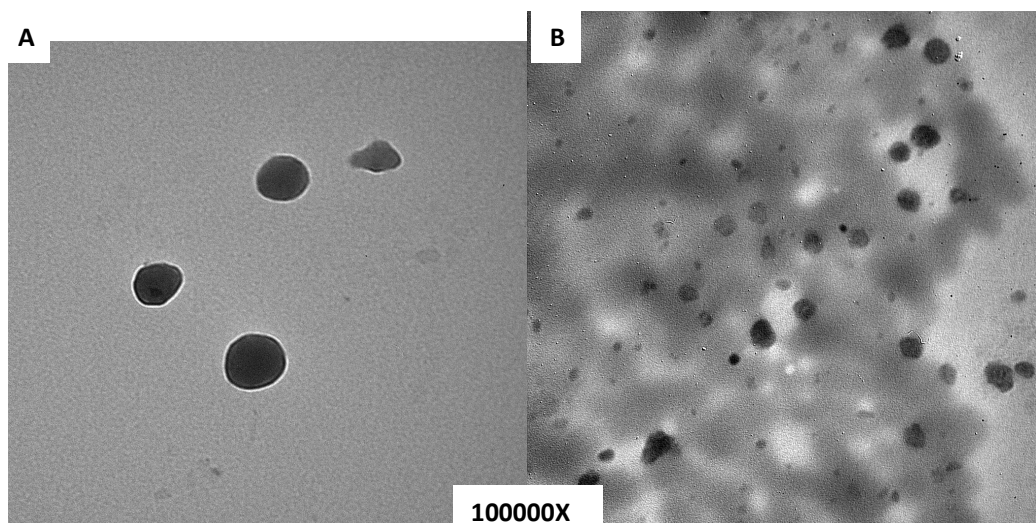


Figura 27. Simulación de digestibilidad gástrica de NPs de α -lactalbúmina tratada con HHP y con TT. (A): NPs a tiempo cero; (B): NPs después de 1 hora de digestión gástrica (enzima pepsina).

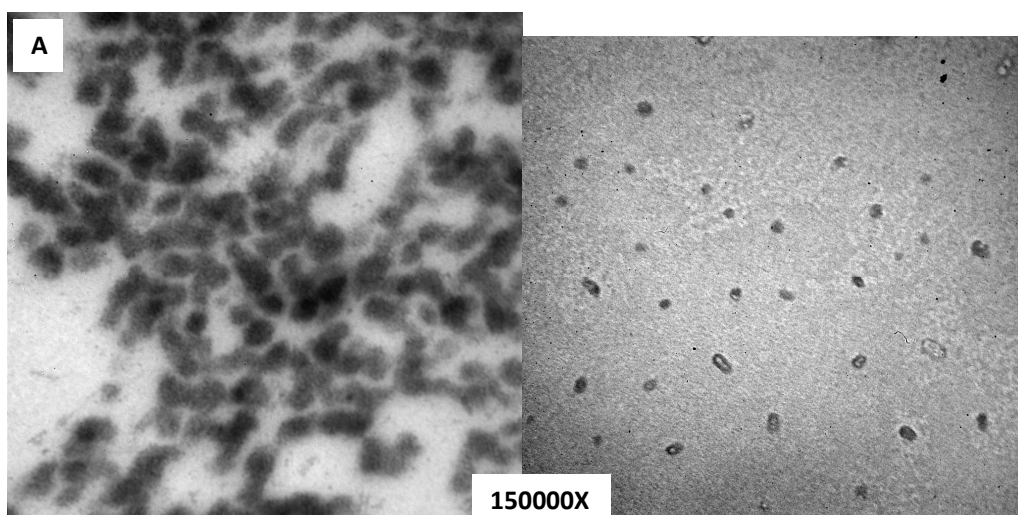


Figura 28. Simulación de digestibilidad gástrica de NPs de α -lactalbúmina tratada con HHP y sin TT. (A): NPs a tiempo cero; (B):NPs después de 1 hora de digestión gástrica (enzima pepsina).

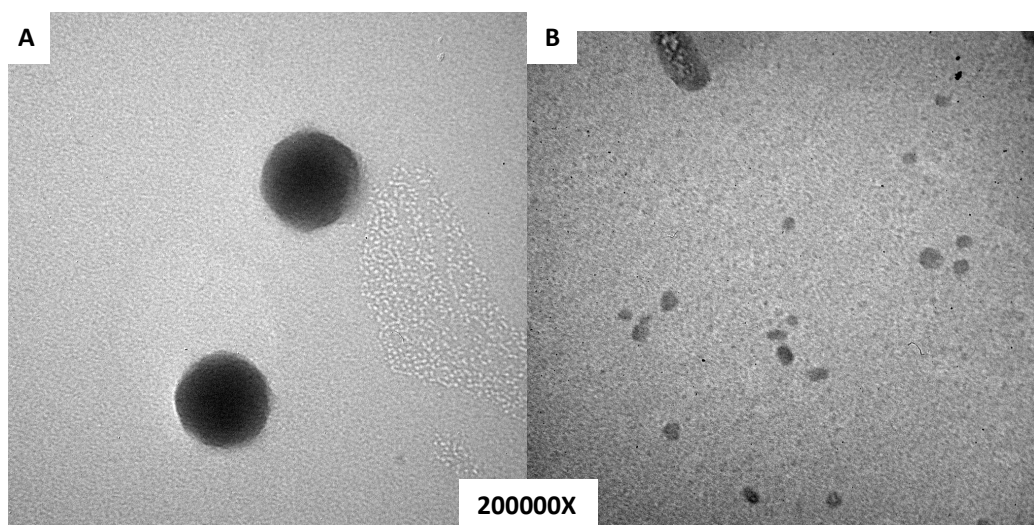


Figura 29. Simulación de digestibilidad gástrica de NPs de α -lactalbúmina nativa y con TT. (A): NPs a tiempo cero; (B):NPs después de 1 hora de digestión gástrica (enzima pepsina).

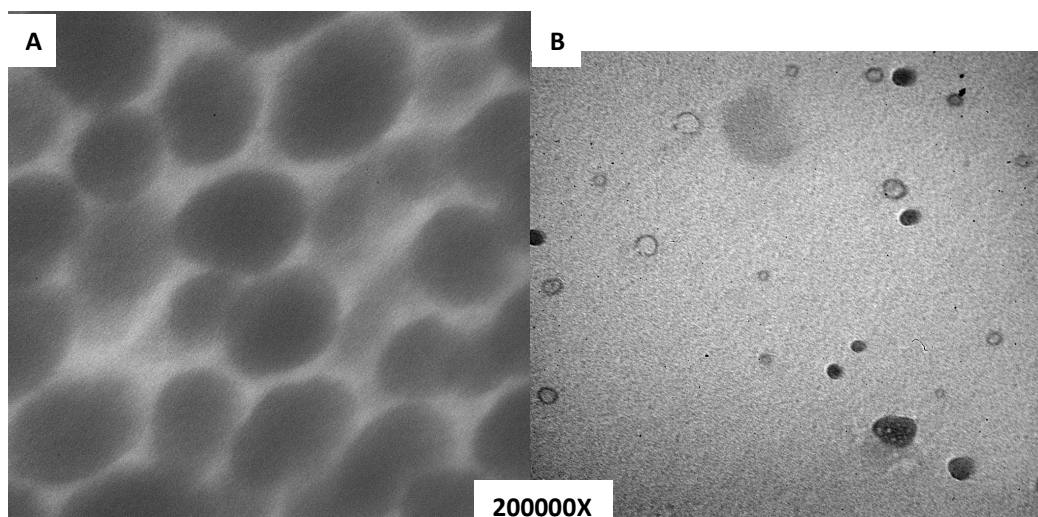


Figura 30. Simulación de digestibilidad gástrica de NPs de α -lactalbúmina nativa y sin TT. (A): NPs a tiempo cero; (B):NPs después de 1 hora de digestión gástrica (enzima pepsina).

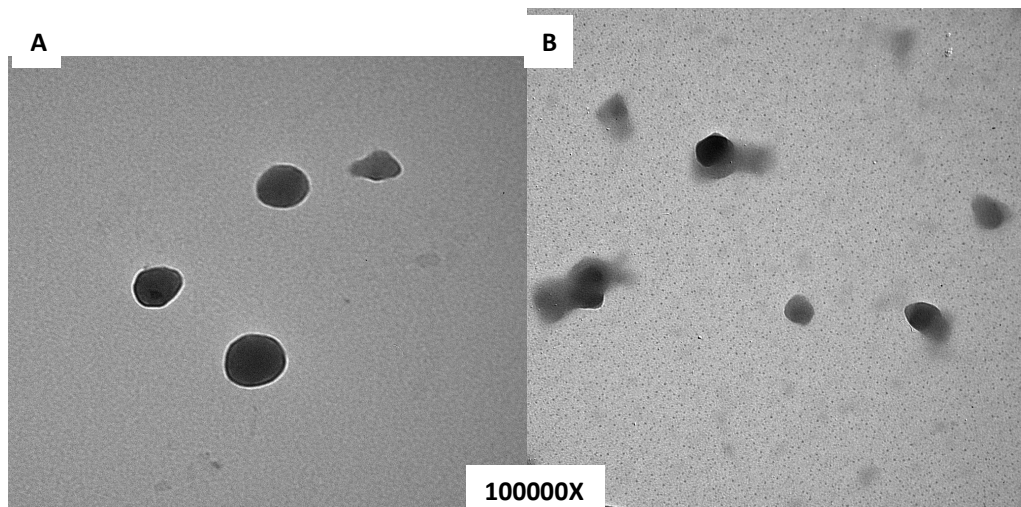


Figura 31. Simulación de digestibilidad intestinal de NPs de α -lactalbúmina tratada con HHP y con TT. (A): NPs a tiempo cero; (B):NPs después de 4 horas de digestión intestinal (enzimas pancreatina).

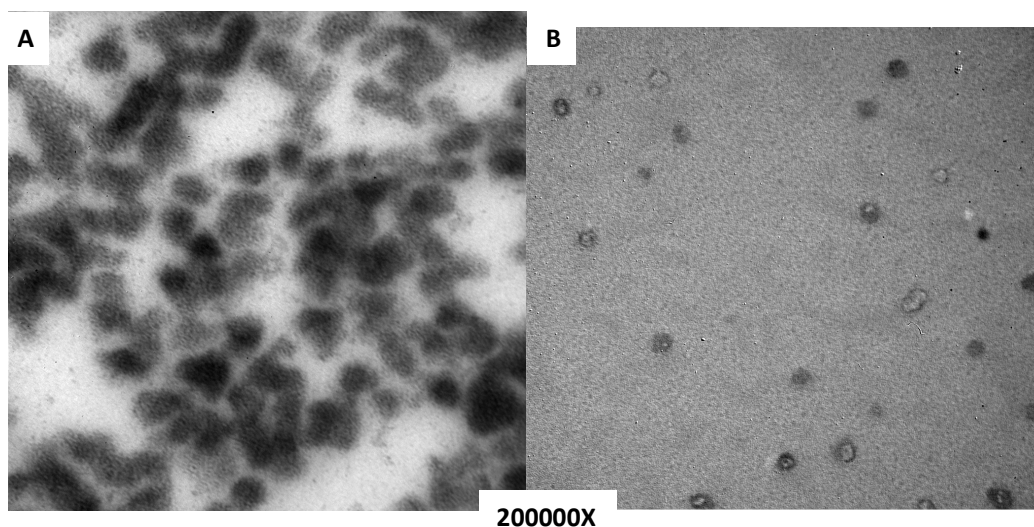


Figura 32. Simulación de digestibilidad intestinal de NPs de α -lactalbúmina tratada con HHP y sin TT. (A): NPs a tiempo cero; (B):NPs después de 4 horas de digestión intestinal (enzimas pancreatina).

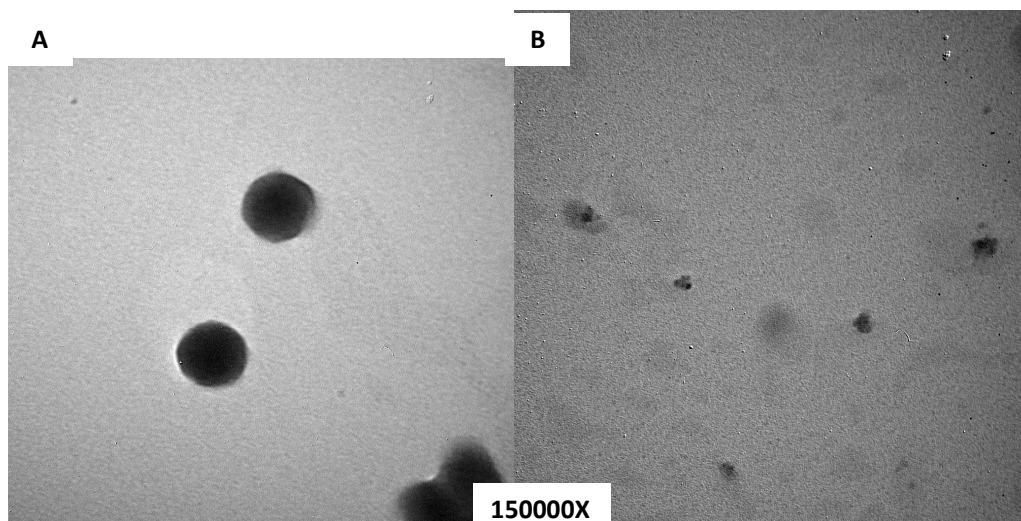


Figura 33. Simulación de digestibilidad intestinal de NPs de α -lactalbúmina nativa y con TT. (A): NPs a tiempo cero; (B):NPs después de 4 horas de digestión intestinal (enzimas pancreatina).

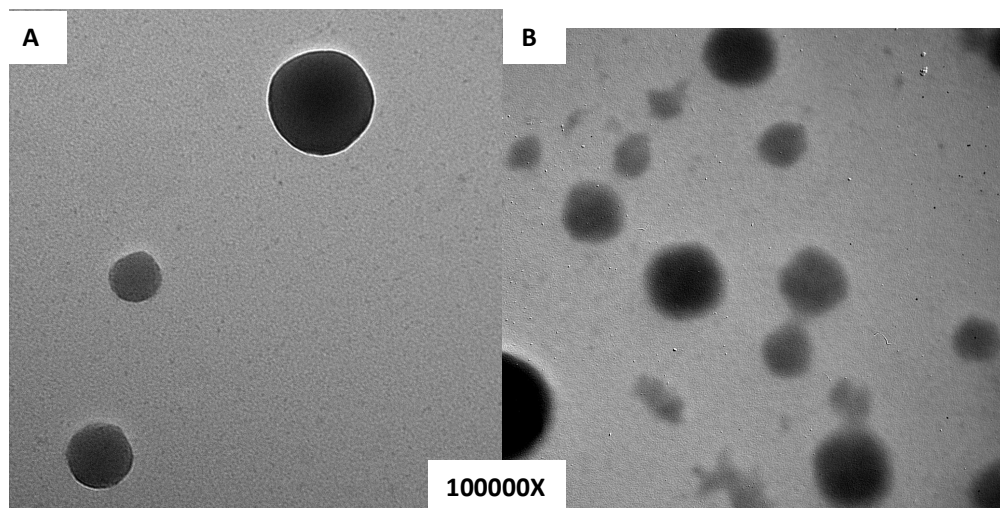


Figura 34. Simulación de digestibilidad intestinal de NPs de α -lactalbúmina nativa y sin TT. (A): NPs a tiempo cero; (B): NPs después de 4 horas de digestión intestinal (enzimas pancreatina).

Como se observa en las micrografías, durante la digestión gástrica e intestinal se presenta una marcada disminución en el tamaño de las NPs, lo cual indica que a son digeribles y que a pesar de que la α -LA se entrecruza con glutaraldehído ($1\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína) durante la obtención de las mismas éstas uniones no evitan la degradación de las partículas. Además, por el patrón de degradación, se puede deducir que las NPs presentan una consistencia compacta, es decir, que no son huecas.

Una de las funciones importantes de las NPs sería su utilización como sistemas para la liberación intracelular de compuestos activos, los cuales se podrían incorporar a las NPs siempre y cuando se conociera el efecto de la degradación enzimática sobre las partículas, ya que este efecto es decisivo para la liberación intracelular de los compuestos de interés.

Tomando los resultados de la degradación enzimática (gástrica e intestinal) se puede decir que las enzimas pepsina y pancreatina son adecuadas para una rápida degradación de las NPs de α -LA. Lo anterior podría ser útil para el análisis de posibles compuestos a incorporarse en la matriz de las NPs.

Estos resultados concuerdan con Langer et al., (2008) que encontró que la degradación enzimática de NPs de HSA es posible con diferentes enzimas. La digestión más rápida fue con pepsina a pH de 2.0 y encontrándose las NPs completamente degradadas después de 30 minutos, mientras que a condiciones neutras, la digestión con tripsina se llevó 24 horas.

6.10 Actividad Antioxidante de las NPs de α -Lactalbúmina

Las proteínas poseen actividad antioxidante debida a los residuos de a.a. con actividad antiradical libre. Hay reportes previos (Salami y col., 2009) de que la cisteína, el triptófano y la metionina poseen la más alta actividad antioxidante de todos los a.a. y la α -LA los contiene en cantidades importantes. Para la determinación de actividad antioxidante (AA) se utilizó el método de Almajano et al., (2007). En éste análisis se siguió la disminución en la absorbancia para monitorear el consumo del radical ABTS⁺ coloreado. El análogo de la vitamina E soluble en agua (Trolox) se utilizó como estándar.

En base a los resultados obtenidos podemos decir que el tratamiento con HHP sobre la α -LA expone a los a.a. con AA presentes en la proteína, entre los que seguramente están metionina y triptófano, ya que la proteína tratada con HHP presenta mayor AA que la proteína nativa. En las Figuras 35 y 36 se observa el comportamiento antiradical de las NPs de proteína tanto nativa como tratada con HHP, además de las NPs obtenidas a partir de la α -lactalbúmina nativo como de la tratado por HHP.

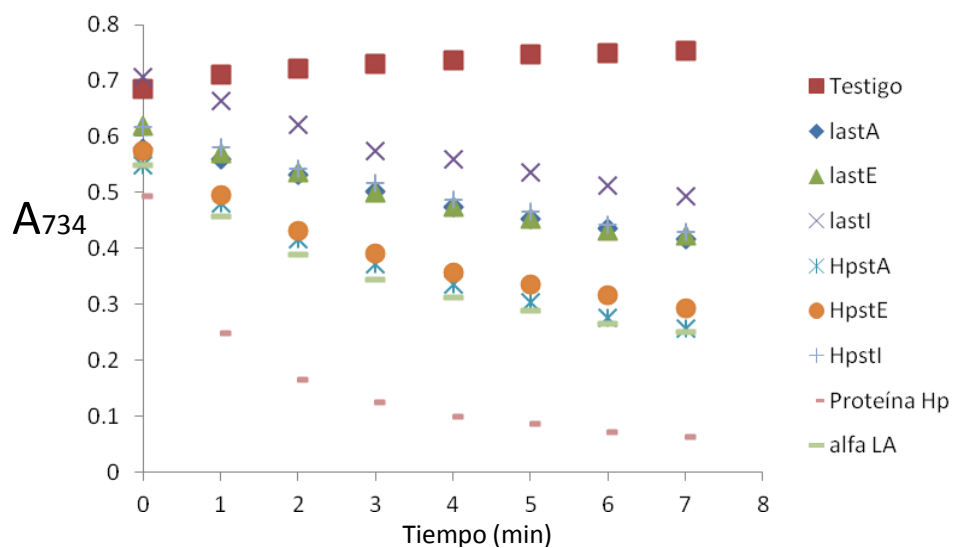


Figura 35. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como disminución de la Absorbancia a 734 nm de las soluciones de NPs preparadas a partir de proteína nativa y tratada con altas presiones hidrostáticas sin TT comparada con un testigo.

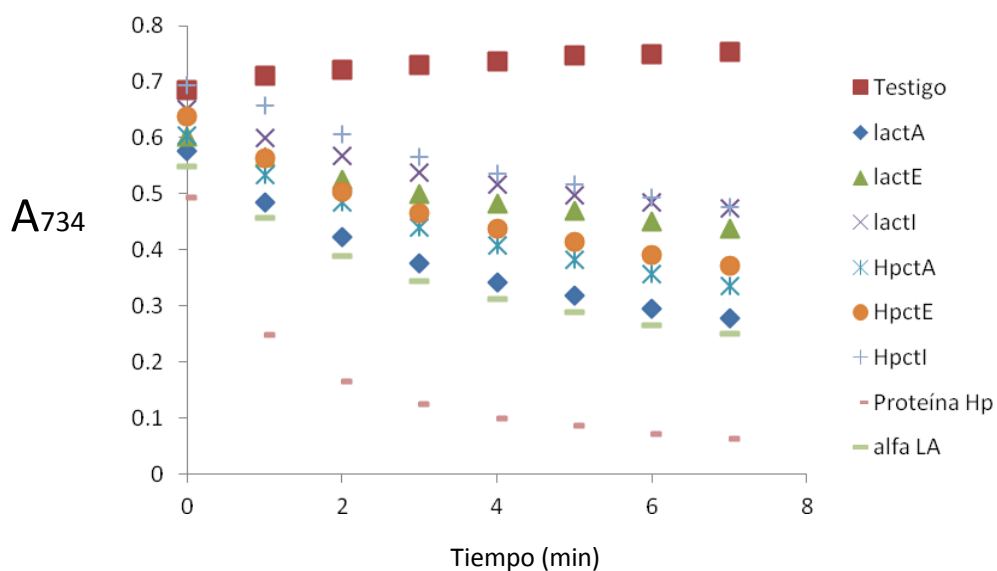


Figura 36. Variación de la actividad de secuestro de radicales libres expresada como disminución de la Absorbancia a 734 nm de las soluciones de NPs obtenidas a partir de proteína nativa y tratada con altas presiones hidrostáticas con TT comparada con un testigo.m

En los Cuadros 12 y 13 se muestran los valores de AA expresados como porcentaje de inhibición de radicales libres ABTS⁺ (Ecuación 2). Y como se menciona arriba, la AA de la α -LA se ve incrementada cuando la proteína es tratada con HHP, en el caso de las NPs, las obtenidas a partir de α -LA tratada con HHP con y sin TT también mostraron mayor AA en la mayoría de los casos.

Cuadro 12. Actividad antioxidante de la α -lactalbúmina (nativa y tratada con HHP) sin TT de las NPs preparadas a partir de la proteína expresada en mMol equivalentes de Trolox.

Muestra	% de inhibición de radicales libres ABTS ⁺	mMol equivalentes de Trolox/mL
α -Lactalbúmina (α -LA)	72.56	89,56
Proteína tratada con HHP	97.35	134,62
lastA	37.76	53.85
lastE	41.47	66,21
lastI	53.11	69,51
HpstA	63.04	81,59
HpstE	58.95	83,79
HpstI	40.49	61,26

La actividad antioxidante de muchas proteínas depende de su composición de aminoácidos . Se ha reportado que cisteína y metionina poseen el valor más alto de actividad antioxidante de todos los aminoácidos y están involucrados en el secuestros de radicales libres (Salami et al., 2009). La exposicion de estos aminoácidos con actividad antioxidante en proteínas involucra la disrupcion de la estructura terciaria de éstas (desnaturalización parcial) ya sea por tratamientos termicos, con aplicación de altas presiones (HHP) o el uso de hidrólisis enzimática (Elias et al., 2008).

Cuadro 13. Actividad antioxidante de la α -lactalbúmina (nativa y tratada con HHP) con TT y de las NPs obtenidas a partir de la proteína expresada en mMol equivalentes de Trolox..

Muestra	% de inhibición de radicales libres ABTS⁺	mMol equivalentes de Trolox/mL
α -Lactalbúmina (α -LA)	72.56	89,56
Proteína tratada con Hp	97.35	134,62
lactA	61.55	88,19
lactE	37.10	61,81
lactI	37.09	64,29
HpctA	44.46	78,30
HpctE	51.44	80,49
HpctI	41.32	68,68

Los valores de TEAC encontrados para la α -lactalbúmina nativa y la α -lactalbúmina tratado por HHP fueron 89.56 y 13462 mmol Trolox equivalents/mL, respectivamente. Este incremento en capacidad antioxidante es seguramente debido a los cambios en estructura terciaria provocado por los tratamientos por HHP como se demostró previamente (Rodiles-López et al., 2010).

Una correlación positiva se encontró entre la señal de fluorescencia del ANS y actividad antioxidante en el caso de α -lactalbúmina de camella y bovina (Salami et al., 2009). Sin embargo, no se encontró correlación significativa en el caso de las NPs de α -lactalbúmina, indicando que probablemente la hidrofobicidad superficial se debe principalmente a los aminoácidos como tirosina, triptófano e histidina los cuales tienen una débil actividad en el secuestro de radicales libres en comparación con metionina y cisteína (los cuales no están disponibles ya que se encuentran formando enlaces disulfuro).

7. Conclusiones

- En el caso de la α -LA bovina es posible obtener estructuras más estables a la desnaturalización por medio del tratamiento con HHP.
- El uso de diferentes agentes desolvatantes y pretratamientos durante el proceso de desolvatación de la α -LA bovina resultaron en la obtención de nanopartículas con una amplia variedad de propiedades.
- Los valores de rendimiento obtenidos durante la obtención de NPs indican que los agentes desolvatantes permiten una conversión casi total de la proteína a NPs.
- Las nanopartículas con un menor tamaño pueden obtenerse utilizando acetona como agente desolvatante y sin ningún pretratamiento.
- Las nanopartículas con mayor tamaño se obtienen utilizando isopropanol como agente desolvatante.
- Las nanopartículas que presentaron un menor índice de polidispersidad fueron aquellas preparadas con etanol e isopropanol.
- Los valores de densidad y el número de moléculas de proteína que conforman a las NPs es comparable con los sistemas que se pueden presentarse en un alimento como son las micelas de caseína.
- Las nanopartículas de menor tamaño también presentaron mayor estabilidad, de acuerdo a los valores de potencial zeta obtenidos para estos sistemas.
- La determinación del potencial zeta muestra que las NPs de α -LA son más estables en condiciones alcalinas.
- La magnitud de señal de fluorescencia para las pruebas de hidrofobicidad superficial indican que las NPs poseen pocos grupos hidrofóbicos externos, debido principalmente a su estructura compacta que impide que éstos queden expuestos al solvente.
- Todos los tipos de nanopartículas fueron fácilmente degradados por enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal.
- La α -LA tanto nativa como tratada con HHP y las NPs mostraron una clara actividad antioxidante cuando se les comparó con un testigo

8. Bibliografía

- Aguilera JM. 2005. Why food microstructure? *J Food Eng* 67(1–2):3–11.
- Alander, M., Smet, L. Nollet, L., Verstraete, W., Wright, Sandholm, M. 1999. The effect of probiotic strains on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) *Int. J. Food Microbiol.* 46:71–79.
- Alexander, M. and Dalgleish, D.G. 2006. Dynamic light scattering techniques and their applications in Food Science. *Food Biophysics* 1: 2-13.
- Allen, J. C., and Wriedan, W. L. 1982b. Influence of milk proteins on lipid oxidation in aqueous emulsion II. lactoperoxidase, lactoferrin, superoxide dismutase and xanthine oxidase. *J. Dairy Res.*, 49:249–263.
- Allen, J. C., and Wrieden, W. L. 1982a. Influence of milk proteins on lipid oxidation in aqueous emulsion I. Casein, whey protein and α -lactalbumin. *J. Dairy Res.*, 49:239–248.
- Almajano, P., Delgado, E., Gordon, M. 2007. Changes in the antioxidant properties of protein solutions in the presence of epigallocatechin gallate. *J. Food Chem.* 101:126-130.
- Antal, J., Pál, G., Asbóth, B., Buza's, Z., Patthy, A., Gráf, L., 2001. Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library. *Analytical Biochemistry* 288, 156–167.
- Arbos, P., Arango, M. A., Campanero, M. A., & Irache, J. M. 2002. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 129–136.
- Badui S. 2006. *Química de los alimentos*. Ed. Pearson. 4a. Edición. Pp. 603-622.
- Bellucci, S., Gaggiotti, G., Marchetti, M., Micciulla, F., Mucciato, R. and Regi, M. 2007. Atomic Force Microscopy Characterization of Carbon Nanotubes. *J. Physics* 61: 99-104.
- Birktoft, J.J., Breddam, K. 1994. Glutamyl endopeptidases. *Methods Enzymol.* 244: 114-126.

- Bittner, A.M. 2005. Biomolecular rods and tubes in nanotechnology. *Naturwissenschaften* 92:51-64.
- Blundell, JE, Thurlby PL. 1987. Experimental manipulations of eating—advances in animal models for studying anorectic agents. *Pharmacol Ther* 34(3):349–401.
- Boyer, R. 2000. Experiment 4. Isolation and Characterization of bovine milk α -lactalbumin. *Modern Experimental Biochemistry*. 3^o Edition. Edit. Addison Wesley Longman. 256-277.
- Bramaud, C., Aimar, P. and Daufin, G. 1997. Whey protein fractionation: isoeléctrico precipitation of alpha-lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 56:391-397.
- Breddam, K. 1992. Isolation and amino acid sequence of a glutamic acid specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* 204: 165-171.
- Breddam, K., Meldal, M. 1992. Substrate preferences of glutamic-acid-specific endopeptidases assessed by synthetic peptide substrates based on intramolecular fluorescence quenching. *Eur. J. Biochem.* 206: 103-107.
- Bush, A.I. 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 26: 207-214.
- Cagri, A., Ustunol Z, Ryser ET. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot* 67:833–48.
- Caspar, D.L.D., Namba, K. 1990. Switching in the self-assembly of Tobacco mosaic virus. *Adv. Biophys.* 26:157-185.
- Cha, D.S, Chinnan MS. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:223–37.
- Chandra, N., Brew, K., Acharya, K.R. 1998. Structural evidence for the presence of a secondary calcium binding site in human α -lactalbumin. *Biochemistry* 37: 4767-4772.
- Chang, Y. C, Chen D.G. H. 2005. Adsorption kinetics and thermodynamics of acid dyes on carboxymethylated chitosan-conjugated magnetic nano-adsorbent. *Macromol Biosci* 5(3):254–61.

- Charych, D., Cheng Q, Reichert A, Kuziemko G, Stroh N, Nagy J, Spevak W, Stevens R. 1996. A "litmus test" for molecular recognition using artificial membranes. *Chem Biol* 3:113.
- Chau, C. F., Wu, S., Yen, G. C. 2007. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science and Technology*. 18:269-280.
- Chinnan MS, Park HJ. 1995. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. *J Food Process Eng* 18(4):417–29.
- Chrysina, E., Brew, K., Acharya, K. 2000. Crystal structures of apo and holo bovine α -lactalbumin at 2.2 angstrom resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *J. Biol. Chem.* 37021.
- Creusot, N., Gruppen, H., van Koningsveld, G.A., de Kruif, C.G., Voragen, A.G.J. 2005 Peptide-peptide and protein-peptide interactions in mixtures of whey protein isolate and whey protein isolate hydrolysates. Submitted.
- Dai, Q.Y., Castellino, F.J., Prorok, M. 2004. A single amino acid replacement results in the Ca^{2+} -induced selfassembly of a helical conantokin-based peptide. *Biochemistry* 43:13225-13232.
- Datta, N., and Deeth, H. C. 1999. High pressure processing of milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54, 41–48.
- Decher G, Schlenoff JB. 2003. Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. p 543.
- Demarest, S., Boice, J., Fairman, R., Raleigh, D. 1999. Defining the core structure of the α -lactalbumin molten globule state. *J. Mol. Bio.* 294:213-221.
- Denys, S., Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Hendrickx, M. 2000. Modeling conductive heat transfer and process uniformity during batch high-pressure of food Biotechnology. *Program* 16: 92-101.
- Diaz, M., and Decker, E. A. 2005. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J. Agric. Food Chem.*, 52:8208–8213.

- Donnelly, J. L., Decker, E. A., McClements, D. J. 1998. Iron-catalyzed oxidation of Menhaden oil as affected by emulsifiers. *J. Food Sci.*, 63:997–1000.
- Dzwolak, W., Kato, M., Shimizu, A., and Taniguchi, Y. 1999. Fourier-transform infrared spectroscopy study of the pressure-induced changes in the structure of the bovine α -lactalbumin: The stabilizing role of the calcium ion. *Biochim. Biophys. Acta*, 1433:45–55.
- Elias, R. J., McClements, D. J., and Decker, E. A. Impact of thermal processing on the antioxidant mechanisms of continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Food Chem.* (in press).
- Elias, R. J., McClements, D. J., Decker, E. A. 2005. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase beta lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *J. Agric Food Chem.*, 53:10248–10253.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S. and Decker, E.A. 2008. Antioxidant Activity of proteins and peptides. *Crit. Revs. Food Sci. Nutr.* 48:430-441.
- Flanagan J, Singh H. 2006. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(3):221–37.
- Fujimoto, Z., Fujii, Y., Kaneko, S., Kobayashi, H., Mizuno, H., 2004. Crystal structure of aspartic proteinase from *Irpex lacteus* in complex with inhibitor pepstatin.
- Garti N, Benichou A. 2001. Double emulsions for controlled-release applications: progress and trends. In: Sjoblom J, editor. *Encyclopedic handbook of emulsion technology*. New York:Marcel Dekker. p 377–407.
- Garti N, Benichou A. 2004. Recent developments in double emulsions for food applications. In: Friberg S, Larsson K, Sjoblom J, editors. *Food emulsions*, 4th ed. New York:Marcel Dekker. p 353–412.
- Garti N, Spernath A, Aserin A, Lutz R. 2005. Nano-sized self-assemblies of nonionic surfactants as solubilization reservoirs and microreactors for food systems. *Soft Matter* 1(3):206–18.
- Golding M, Sein A. 2004. Surface rheology of aqueous casein-monoglyceride dispersions. *Food Hydrocoll* 18(3):451–61.
- Graveland-Bikker J, de Kruif C. 2005. Self-assembly of hydrolysed alpha lactalbumin into nanotubes. *FEBS J* 272(Suppl 1):550.

- Graveland-Bikker JF, de Kruif CG. 2006. Unique milk protein-based nanotubes: food and nanotechnology meet. *Trends Food Sci Technol* 17(5):196–203.
- Graveland-Bikker JF, Schaap IAT, Schmidt CF, de Kruif CG. 2006. Structural and mechanical study of a self-assembling protein nanotube. *Nano Lett* 6(4):616–21.
- Grinberg, V.Y., and Heartl'e, T. 2000. Reducer driven baric denaturation and oligomerisation of whey proteins. *J. Biochem.* 79:205–209.
- Gu YS, Decker AE, McClements DJ. 2005. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by multilayer membranes. *Trends in Food Sci.* 6:214-220.
- Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L. 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering* 83, 31-40
- Gupta AK, Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26(18):3995–4021.
- Guzey, D., McClements D. J. 2006. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Adv Colloid Interface Sci.* Forthcoming.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broek, I., and Weemaes, C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 197–203.
- Hendrix, T., Griko, Y.V., Privalov, P.L. 2000. A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine alpha-lactalbumin. *Biophys. Chem.* 84:27-34.
- Hennessey, J.P. & Johnson, W.C. 1981. Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry*, 20, 1085-1094.
- Hite B H 1899. The effect of high pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin* 58: 15–35.
- Hosseini-nia, T., Ismail, A.A., and Kubow, S. 2002. Effect of high hydrostatic pressure on the secondary structures of BSA and Apo- and

- Holo- α -lactalbumin employing Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Food Sci.* 67:1341–1347.
- Ipsen, R.; Otte, J.; Lomholt, S. T.; Qvist, K. B. 2000. Standardized reaction times used to describe the mechanism of enzyme-induced gelation in whey protein systems. *J. Dairy Res.* 67:403-413.
 - Jahanshahi, M. 2007. “Molecular Nanotechnology & Nanobiotechnology”, Book: Academic University (Mazandaran) publications. ISBN: 964-2571-10-2
 - Janaswamy S, Chandrasekaran R. 2005. Cation-induced polymorphism in *iota*-carrageenan. *Carbohydr Polym* 60(4):499–505.
 - Jegouic, M., Grinberg, V.Y., Guingant, A., and Hartl'e, T. 1997. Baric oligomerization in α -lactalbumin/ β -lactoglobulin mixtures. *J. Agric. Food Chem.*, 45:19–22.
 - Jochenweiss, Takhisto, P., McClements, D. 2006. Functional Materials in Food Nanotechnology. *J. Food Sci.* 71(9):107-116.
 - Jonas, J. 2002. High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1595:145–159.
 - *Journal of Molecular Biology* 341, 1227–1235.
 - Kakudo, S., Kikuchi, N., Kitadokoro, K., Fujiwara, T., Nakamura, E., Okamoto, H., Shin, M., Tamaki, M., Teraoka, H., Tsuzuki, H., Yoshida, N. 1992. Purification, characterisation, cloning and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *J. Biol. Chem.* 267: 23782-23788.
 - Kataoka, N., Kuwajima, K., Tokunaga, F., Goto, Y. 1997. Structural characterization of the molten globule of α -lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Sci.* 6, 422-430.
 - Kawashim, Y. 2001. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 1–2.
 - Khazanovich, N., Granja, J.R., McRee, D.E., Milligan, R.A., Ghadiri, M.R. 1994. Nanoscale tubular ensembles with specified internal diameters. Design and self-assembled nanotube with a 13-A pore. *J. Am. Chem. Soc.* 116:6011-6012.

- Kinsella, J. E., Whitehead, D. M. 1989. Protein in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 343–391.
- Kinsella, J. E.; D. M. Whitehead. 1989. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Advanced food and nutrition Res.* 33: 343-438.
- Kronman, M. 1989. Metal ion binding and the molecular conformational properties of α -lactalbumin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24: 565-667.
- Kuhn, N., Carrick, D., Wilde, C. 1980. Lactose synthesis: Possibilities of regulation. *J. Dairy Sci.* 63:328-336.
- Kuwajima, K. 1989. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* 6:87-103.
- Laemli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-686.
- Lamprecht, A., Saumet, J.-L., Roux, J., & Benoit, J.-P. 2004. Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 407–414.
- Langer, K., Anhorn, M.G., Steinhäuser, I., Dreis, S., Celebi., D., Schrickel, N., Faust, S., Vogel, V. 2008. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and Kinetics of enzymatic degradation. *Int. J. of Pharmaceutics.* 347:109-117.
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinäuer, N., Briesen, H. v., Schubert, D. 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 169–180.
- Lin, W., Coombes, A.G.A., Davies, M.C., Davis, S.S., Illum, L. 1993. Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method. *J. Drug Target.* 1, 237–243.
- Liu, X., Powers, J., Swanson, B., Hill, H., Clark, S. 2005. Modification of whey protein concentrates hydrophobicity by high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 6:310-317.
- Losche M. 1997. Protein monolayers at interfaces. *Curr Opin Solid State Mater Sci*

- MacAdam, A. B., Shafi, Z. B., James, S. L., Marriott, C., & Martin, G. P. 1997. Preparation of hydrophobic and hydrophilic albumin microspheres and determination of surface carboxylic acid and amino residues. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 47–55.
- Malisauskas, M., Zamotin, V., Jass, J., Noppe, W., Dobson, C.M., Morozovaroche, L.A. 2003. Amyloid protofilaments from the calcium-binding protein equine lysozyme: Formation of ring and linear structures depends on pH and metal ion concentration. *J. Mol. Biol.* 330: 879-890.
- Malvern Instrument, Inc. 2004. Potencial Zeta. Un curso completo en cinco minutos. Ed. Malver Inst. Catálogo Zeta-Meter. Westborough, MA 01581-1042, USA.
- Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P 1978. Nanoparticles - a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta. Helv.* 53(1): 17-23.
- Matsui, H., Porrata, P., Douberly, G.E. 2001. Protein tubule immobilization on self-assembled monolayers on Au substrates. *Nano Lett.* 1: 461-464.
- McClements DJ. 2004. Food emulsions: principles, practice and techniques, 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Mertens, B., and Deplace, G. 1993. Engineering aspects of highpressure technology in the food industry. *Food Technology*, 47(6): 164–169.
- Meyer, R.S., Cooper, K.L., Knorr, D., and Lelieveld, H.L.M. 2000. Highpressure sterilization of foods. *Food Technol.*, 54:67–72.
- Mohanraj, V.J., Chen, Y. 2006. Nanoparticles – A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 5(1): 561-573.
- Morillon V, Debeaufort F, Blond G, Capelle M, Voilley A. 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:67–89.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., & Balny, C. 1994. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12:493–501.
- Mun S, Decker EA, McClements DJ. 2005. Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Langmuir* 21:6228–34.

- Needs, E. R., Stenning, R., Gill, A., Ferragut, V., and Rich, G. 2000. High pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *J. Dairy Research*. 67:31-42.
- Nitta, K., Sugai, S. 1989. *Eur. J. Biochem*. 182: 111-118.
- of beta-lactoglobulin, iota-carrageenan and gelatin. *Langmuir* 21:5752–60.
- Otte, J., Lomholt, S.B., Ipsen, R., Stapelfeldt, H., Bukrinsky, J.T., Qvist, K.B. 1997. Aggregate formation during hydrolysis of beta-lactoglobulin with a Glu and Asp specific protease from *Bacillus licheniformis*. *J. Agric. Food Chem*. 45: 4889-489
- Pena-Ramos, E. A., Xiong, X. L. 2000. Whey and soy protein hydrolysates
- Polverino de Laureto, P., Frare, E., Battaglia, F., Mossuto, M.F., Uversky, V.N., Fontana, A. 2005. Protein dissection enhances the amyloidogenic properties of α -lactalbumin. *FEBS J*. 272, 2176-2188.
- Qasim, M.A. 1998. Glutamyl endopeptidase I. In *Handbook of proteolytic enzymes* A. S. Bennet, N. D. Rawlings, J. F. Woessner and J. Fred, eds. Academic Press.
- Rajagopal, K., Schneider, J.P. 2004. Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 14: 480-486.
- Rao, K.R., Brew, K. 1989. Calcio regulates folding and disulfide-bond formation un α -lactalbumin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 163:1390-6.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26)9-10), 1231-1237.
- reaction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 18:33–39.
- Reches, M., Gazit, E. 2003. Casting metal nanowires within discrete self assembled peptide nanotubes. *Science*. 300:625-627.

- Redfield, C., Schulman, B. A., Milhollen, M. A., Kim, P. S., Dobson, C.M. 1999. Alpha-lactalbumin forms compact molten globule in the absence of disulfide bonds. *Nat. Struct. Biol.* 10:948-952.
- Rhim JW. 2004. Increase in water vapor barrier property of biopolymer-based edible films and coatings by compositing with lipid materials. *J Food Sci Biotechnol* 13:528–35.
- Rodiles-López, O., Arroyo-Maya, I., Jaramillo-Flores, M.E., Gutiérrez-López, G., Hernández-Arana, A., Barbosa-Cánovas, G., Hernández-Sánchez, H. 2010. Effect of high hydrostatic pressure on the structure of bovine α -lactalbumin. *J. Dairy Sci.* 93:1420-1428.
- Rodiles-López, O., Jaramillo-Flores, M., Gutiérrez-López, G., Hernández-Arana, A., Fosado-Quiroz, R., Barbosa-Cánovas, G. & Hernández-Sánchez, H. 2008. Effect of high hydrostatic pressure on bovine α -lactalbumin functional properties. *J. Food Eng.* 87: 363-370
- Sakanaka, S., Tachibana, Y. 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chem.*, 95:243–249.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. R. 2005. Antioxidant properties of casein calcium peptides and their effects on lipid oxidation in beef homogenates. *J. Agric. Food Chem.*, 53:464–468.
- Salami, M., Yousefi, R., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Chobert, J. M., Haertlé, T., Saboury, A.A., Atri. M.S., Naslaji, A., Ahmad, F., Moosavi-Movahedi, A. 2009. Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel α -lactalbumin: Possible significance for use in infant formula. *Int. Dairy J.* 19:518-523.
- Schokker, E. P., H. Singh, and L. K. Creamer. 2000. Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *Int. Dairy J.* 10:843–853.
- Shantha, N. C., Crum, A. D., and Decker, E. A. 1994. Conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef containing antioxidants and hydrogen donors. *J. Food Lipids* 2:57–64.

- Stuart, D. I., Acharya, K. R., Walker, N. P. C., Smith, S. G., Lewis, M., Philips, D. C. 1986. Alpha-lactalbumin possesses a novel calcium binding loop. *Nature* 324: 84-87.
- Syme, C.D., Nadal, R.C., Rigby, S.E.J., Viles, J.H. 2004. Copper binding to the amyloid-beta (A beta) peptide associated with Alzheimer's disease - Folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A beta-(1-28): Insights from a range of complementary spectroscopic techniques. *Journal of Biological Chemistry* 279:18169-18177.
- Tanaka, N., and Kunugi, S. 1996. Effect of pressure on the denaturation exchange
- Taylor, M. J., and Richardson, T. 1980. Antioxidant activity of skim milk – Effect of heat and resultant sulfhydryl-groups. *J. Dairy Sci.*, 63:1783–1795.
- Tedford, L.-A., and Schaschke, C.J. 2000. Induced structural change to β -Lactoglobulin by combined temperature and pressure. *Biochem Eng J.* 5:73–76.
- The Royal Society. 2004. Nanomanufacturing and the industrial application of nanotechnologies. In *The Royal Society, & The Royal Academy of Engineering, Nanoscience and nanotechnologies, opportunities and uncertainties* (pp. 25–34). London: The Royal Society & The Royal Academy of Engineering.
- Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., Decker, E. A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.*, 48:1473–1478.
- Tourbez, M., Firanescu, C., Yang, A., Unipan, L., Duchambon, P., Blouquit, Y., Craescu, C.T. 2004. Calcium dependent self-assembly of human centrin 2. *J. Biol. Chem.* 279: 47672-47680.
- Viney, C. (2004) Self-assembly as a route to fibrous materials: concepts, opportunities and challenges. *Curr. Opin. Solid State & Mat. Sci.* 8:95-101.
- Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., Langer, K., 2000. Desolvation process and surface characteristics of protein nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 194, 91–102.

- Weyermann, J., Lochmann, D., Georgens, C., Zimmer, A. 2005. Albumin–protamine–oligonucleotide-nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 2: Cellular uptake and effect. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59, 431–438.
- Woehrle, G.H., Hutchison, J.E., Özkar, S. and Finke, R.G. 2006. Analysis of nanoparticle Transmission Electron Microscopy data using a Public-Domain Image-Processing Program, Image. *Turk. J. Chem.* 30: 1-13.
- Yang, J., Dunker, A., Powers, J., Clark, S. and Swanson, B. 2001. β -lactoglobulin molten globule induced by high pressure. *J. Agric. Food Chem.* 49:3236-3243.
- Yasui, M., Miyahara, T., Aizawa, T., Demura, M., Nitta, K. 2006. Differential Scanning Calorimetry of a metalloprotein under controlled metal-ion activity. *The Protein Journal*. 25:475-482.
- Zamyatnin, A. A. 1995. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:109-123.
- Zhang, S. 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* 21: 1171-1178.

Paginas web:

Lugo-Rios, J. 1995. [Http://www.galeon.com/scienceeducation/dicroísmo.htm](http://www.galeon.com/scienceeducation/dicroísmo.htm)
[http://www.pre.wur.nl/UK/Research/ Food+Structuring/Microstructured/](http://www.pre.wur.nl/UK/Research/Food+Structuring/Microstructured/)).