

## Conservación de alimentos orgánicos de alto contenido lipídico mediante tecnologías de biomateriales nano y microestructurados

*Pérez Adrián A. \*, Locaso Delia\*\*, Bof María Julieta\*\*, Bordagaray Valeria C.\*\*, Suárez Gustavo D.\*\*, Bordenave Lauro\*\*, Lare Vanesa\*\*.*

Autores: \*Instituto de Tecnología de Alimentos FIQ-U.N.L. \*\*Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos. Monseñor Tavella 1450 - Concordia, Entre Ríos, Argentina.

Contacto: [aperezrubin@gmail.com](mailto:aperezrubin@gmail.com) y/o [julieta.bof@uner.edu.ar](mailto:julieta.bof@uner.edu.ar)

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/vwu2gmaf6>

### RESUMEN

El presente proyecto intentó reunir conocimientos científicos que permitan el desarrollo de tecnologías basadas en biomateriales para preservar la calidad e inocuidad de alimentos orgánicos de alto contenido lipídico de la región de Entre Ríos, como la nuez pecán. Dichas tecnologías implicaron la obtención de nano y microestructuras capaces de vehiculizar compuestos bioactivos provenientes de aceites esenciales y su incorporación en matrices alimenticias por espolvoreo. Los objetivos específicos que se plantearon fueron los siguientes:

1. Obtención de nano y microestructuras biopoliméricas.
2. Caracterización y obtención de polvos de nano y microestructuras biopoliméricas.
3. Evaluación del impacto de la aplicación de nano y microestructuras por espolvoreo sobre la oxidación lipídica de nuez pecán.

El conocimiento adquirido podría promover el desarrollo de tecnologías innovadoras para la conservación de alimentos orgánicos de alto contenido lipídico y su extensión para la conservación de otros alimentos. Al mismo tiempo, se espera favorecer al sector agroindustrial implicado mediante la valorización de sus productos y su empleo en aplicaciones de creciente interés a nivel nacional e internacional.

Palabras clave: Nuez pecán, Encapsulación, Compuestos Bioactivos, Actividad antioxidante, Oxidación lipídica

### Objetivos propuestos y cumplidos

Objetivos	Año 1						Año 2					
	Semestre 1			Semestre 2			Semestre 1			Semestre 2		
Búsqueda bibliográfica y análisis crítico de trabajos científicos	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Obtención de nano y microestructuras biopoliméricas	■	■	■	■	■	■						
Caracterización y obtención de polvos de nano y microestructuras biopoliméricas				■	■	■	■	■	■	■	■	■
Incorporación de nano y microestructuras en formulaciones de recubrimientos							■	■	■	■	■	■
Aplicación de nano y microestructuras por recubrimiento y espolvoreo en nuez pecán y semillas de lino										■	■	■
Análisis de los resultados obtenidos.				■	■	■	■	■	■	■	■	■

Objetivos propuestos   
 Objetivos cumplidos   
 Objetivos no cumplidos por pandemia COVID-19

### Marco teórico y metodológico

La nuez pecán [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] es nativa de América del Norte. Su producción mundial ronda entre 230.000 y 250.000 toneladas anuales siendo Estados Unidos y México los principales productores con 130.000 y 100.000tn de nuez con cáscara respectivamente (USDA NASS, 2011). Otros países productores incluyen Australia, Israel, Brasil y Argentina.

A escala mundial, la Argentina ocupa el tercer lugar en superficie con 6.000 hectáreas implantadas con nuez pecán, de las cuales sólo el 25 % son plantaciones en plena producción, en tanto el 75 % restante está formado por árboles que recién comienzan a producir o aún se encuentran en una etapa juvenil. Por su parte, Estados Unidos y México representan más del 90 % de la superficie y producción global. La producción de Pecán en Argentina alcanza las 1.800tn, siendo la provincia de Entre Ríos la mayor productora del país con una producción estimada total de 990 toneladas anuales (Ccappecan 2013). El mercado de nuez pecán está en constante expansión. En la actualidad genera U\$S 2,4 millones anuales y tiene un potencial de U\$S 30 millones en los próximos seis años, cuando la totalidad de la superficie implantada se encuentre en plena producción. El INTA apoya el crecimiento y competitividad del sector y, en esa línea con 20 nuevos cultivares adaptados a diferentes regiones climáticas del país (INTA, 2015)

Las nueces presentan un alto valor alimenticio debido a la composición de sus ácidos grasos, al ser alimentos con alto contenido lipídico (60-65%), son susceptibles al deterioro oxidativo (Labuckas y col. 2008). La nuez pecán es un producto natural con propiedades antioxidantes y un alto valor proteico y contenido de calcio, potasio, fósforo, hierro y vitaminas A, B1, B2, B3, C y E. Asimismo, es un excelente proveedor de fibras naturales y de aceites no saturados que el cuerpo humano requiere. Excelente proveedor de fibras naturales y de ácidos grasos no saturados. Se las utiliza en la elaboración de productos

de panadería, confitería, heladería, chocolatería y se extrae su aceite rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados, como los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, que tienen funciones protectoras en la prevención de coágulos de sangre y reducen el riesgo de cardiopatía coronaria, además contribuyen en el desarrollo normal del sistema nervioso, fuente de proteína que contiene vitamina E, vitaminas del Complejo B y Hierro, entre otros.

Debido a su elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), la nuez pecan se convierte en un alimento altamente susceptible al deterioro oxidativo. Se conoce que una composición química rica en lípidos insaturados induce el desarrollo de aromas indeseables, generando productos de la oxidación secundaria que son tóxicos y que paralelamente disminuyen el tiempo de vida útil del alimento (Pereira de Abreu y col. 2011). A nivel industrial se utilizan, como antioxidantes, productos de origen sintético que, a pesar de la superior eficacia, bajo costo y alta estabilidad en los alimentos, existe la preocupación sobre si son o no perjudiciales para la salud humana, por lo que hay una mayor tendencia en el uso de productos naturales como ingredientes funcionales en alimentos y bebidas (Shahidi y Zhong 2010). En este contexto, surge la necesidad de plantear estrategias tecnológicas que permitan la protección de nuez pecan frente a factores que promueven su deterioro oxidativo, fundamentalmente, en su periodo postcosecha, incluido su almacenamiento.

Por lo tanto, el presente proyecto intentó reunir conocimientos científicos acerca de una estrategia para preservar la calidad lipídica de nuez pecán. Dicha estrategia implicó la obtención de nano y microestructuras capaces de vehiculizar compuestos bioactivos antioxidantes provenientes de aceites esenciales y su incorporación en estas matrices alimenticias por espolvoreo.

En primer lugar, se obtuvieron nanocápsulas formadas por nanopartículas de clara de huevo (PCHn) y aceites esenciales (AE) y/o compuestos bioactivos (CB) derivados de los mismos. Para ello, se emplearon un conjunto de técnicas complementarias para verificar la formación de las mismas y para cuantificar la eficiencia de encapsulación de los compuestos vehiculizados (espectroscopía de fluorescencia intrínseca, extrínseca y espectroscopia UV-Vis). Por otro lado, se obtuvieron microcápsulas empleando un proceso de emulsificación y las mismas PCHn como agentes tensioactivos de tipo *Pickering*. Como fase dispersa se empleó aceite de girasol alto oleico (AO) que sirvió como vehiculizador de AE de orégano (AEO). El proceso de emulsificación consistió en una homogenización primaria de alta velocidad seguido de una homogenización secundaria en homogeneizador a válvula. El tamaño de gota y la estabilidad en el tiempo de las emulsiones se determinaron por dispersión de luz estática (SLS) y retrodispersión de luz.

En segundo lugar, se evaluaron algunas características fisicoquímicas de los nano y microcápsulas generadas. En el caso de las nanocápsulas se examinó: tamaño de partícula (DLS), potencial zeta y ultraestructura por microscopía de fuerza atómica (AFM). Las nanocápsulas fueron liofilizadas con el objeto de facilitar su manipulación. Por otra parte, las emulsiones fueron obtenidas en polvo mediante secado por aspersión para dar origen a las microcápsulas. Las nano y microcápsulas en polvo facilitaron su manipulación en técnicas de conservación de nuez pecán por espolvoreo. Además, se evaluó la actividad antioxidante in vitro (ABTS) y la actividad antimicrobiana in vitro (antifúngica) por medio de técnicas microbiológicas de inhibición.

Por último, se evaluó el desempeño de las nano y microcápsulas en sus formas en polvo como agentes antioxidantes para la conservación de la calidad lipídica de nuez pecán por la técnica de espolvoreo. La preservación de calidad lipídica se evaluó en condiciones de almacenamiento aceleradas (40°C, 30 días) teniendo en cuenta la evolución de la rancidez, la cual fue determinada instrumentalmente (Rancimat).

## Síntesis de resultados y conclusiones

### Obtención de nano y microestructuras biopoliméricas

### Obtención de PCHn

Inicialmente, se planteó seguir el protocolo desarrollado por [Santiago y col. 2016 \(Patente en trámite AR20160103823\)](#). Sin embargo, dado que se observó la necesidad de obtener PCHn en un régimen de mayor concentración, un nuevo método de obtención de PCHn fue desarrollado ([Sponton y col. 2020](#)). En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración y del tiempo de calentamiento sobre la gelificación de PCH, a fin de poder encontrar condiciones óptimas de producción de PCHn, fundamentalmente, la máxima concentración de PCH a utilizar para obtener PCHn de elevada hidrofobicidad superficial y tamaño nanométrico. Para realizar este ensayo (comúnmente llamado *Tiltin test*) se prepararon soluciones de PCH a diferentes concentraciones (4, 5 y 6%p/p) y a pH 11,4 diluyendo la solución stock de PCH con agua desionizada. Las soluciones se colocaron en tubos de 10 mL con tapa y se colocaron en baño termostático de agua a 85°C. Los tubos se retiraron a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20 y 30 min) y fueron colocados en baño de agua a temperatura ambiente para su enfriamiento. Cabe mencionar que el pH 11,4 fue elegido debido a que se ha demostrado que permite la obtención de agregados de tamaño nanométrico (diámetro <100 nm) dada la alta repulsión electrostática que se produce entre las moléculas proteicas durante el tratamiento térmico ([Sponton y col. 2017](#)).

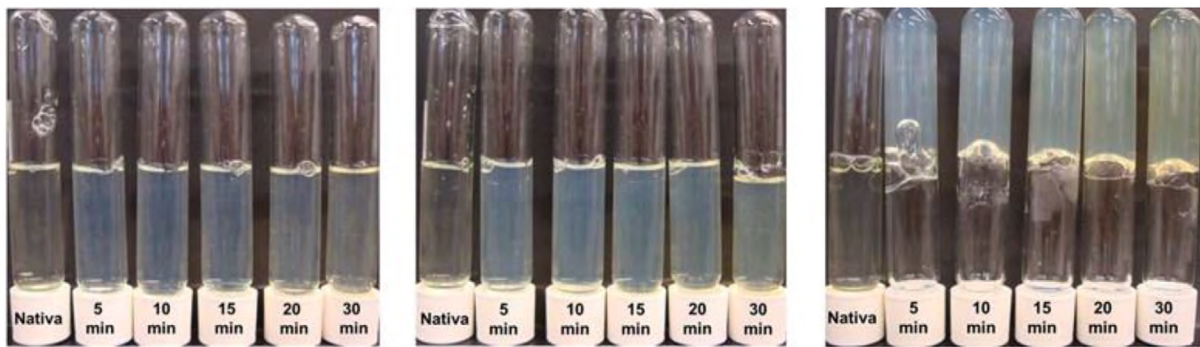
Por otro lado, para estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento se preparó una solución de PCH a pH 11,4 diluyendo la solución stock de PCH con agua desionizada. Esta solución se colocó en un reactor de vidrio de 1 L y se calentó por circulación de agua mediante un equipo termo-circulador (**Fig. 1**).



**Fig. 1:** Proceso de obtención de PCHn mediante reactor batch (1 L) acoplado a equipo termo-circulador.

Durante el calentamiento, se tomaron muestras (~10 mL) a diferentes temperaturas (65, 70, 75, 80 y 85°C) y una vez llegado a 85°C se tomaron a diferentes tiempos (5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min), las cuales se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis. El análisis de las mismas contempló la evaluación de las siguientes características, fundamentales, para vislumbrar su aplicación en la obtención de nano y microcápsulas: tamaño de partícula e hidrofobicidad superficial.

En la **Fig. 2** se presenta la apariencia visual de soluciones de PCH a pH 11,4 calentadas a 85°C a diferentes tiempos y concentraciones.

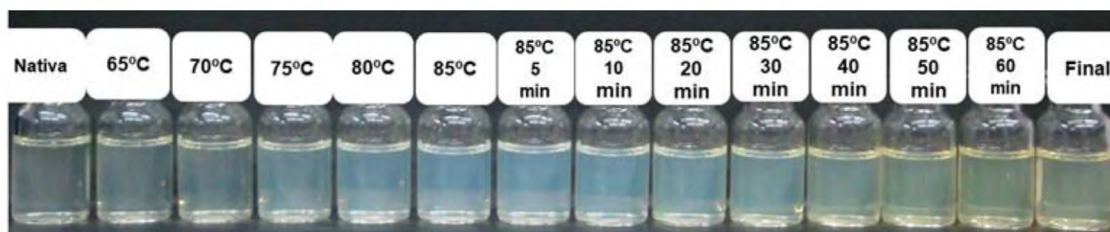


**Fig. 2:** Ensayo de Tiltin test para la determinación de la máxima concentración de PCH requerida para la obtención de nanopartículas PCHn.

En primer lugar, puede observarse que, para una misma concentración, al someter la solución al calentamiento se produjo un aumento en la turbidez en comparación con la muestra nativa. Esto es debido a la desnaturalización de las proteínas que tiene lugar por el aumento de la temperatura, que produce una pérdida de la conformación nativa (despliegamiento) exponiéndose grupos hidrofóbicos, los que conducen finalmente a la formación de agregados, produciendo un aumento de la turbidez.

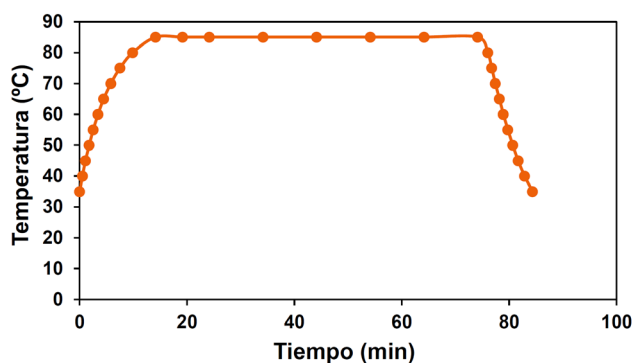
Por otro lado, puede observarse que el aumento de turbidez fue directamente proporcional a la concentración, lo que indica que cuanto mayor fue la concentración de proteína mayor fue la magnitud de la agregación. Además, se observa que a una concentración del 6% hubo gelificación, la cual se produjo porque la concentración fue lo suficientemente alta como para que los agregados proteicos se unan entre sí formando una red tridimensional. A esta concentración, se observó que el gel se volvió más firme con el tiempo de calentamiento. Teniendo en cuenta que se buscó obtener agregados proteicos de tamaño nanométrico la concentración del 6% fue descartada debido a que produjo formación de gel. Por lo tanto, se eligió la concentración del 5% ya que es la máxima concentración ensayada en la que no se registró gelificación.

En la **Fig. 3** se presenta la apariencia visual de muestras de solución de PCH a pH 11,4 y concentración 5% tomadas a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento.



**Fig. 3:** Apariencia visual de soluciones de PCH tratadas térmicamente a diferentes temperaturas y tiempos.

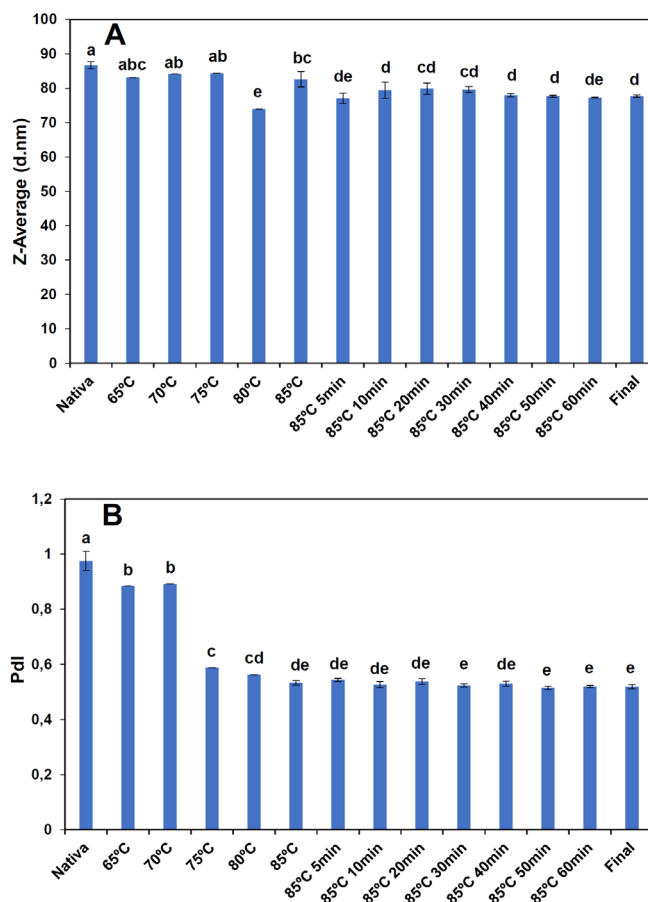
Puede observarse que a partir de los 75°C hubo un aumento considerable de la turbidez lo que se debe a la desnaturalización y posterior agregación de las proteínas. Además, a partir de los 30 min de calentamiento a 85°C se produjo desarrollo de coloración amarilla producto de la reacción de Maillard entre los grupos de aminoácidos libres y azúcares reductores presentes en la clara de huevo. Posteriormente, se registró la temperatura de la solución en función del tiempo. Una vez que la temperatura llegó a los 85°C se mantuvo por 60 min. Luego se realizó el enfriamiento por circulación de agua (baño de hielo) midiéndose también la temperatura de la solución en función del tiempo (**Fig. 4**).



**Fig. 4:** Evolución de la temperatura de calentamiento durante el proceso *batch* para la obtención de PCHn.

Se determinó el tamaño de partículas de las muestras de PCH al 5% obtenidas a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento.

En la **Fig. 5** se muestra el diámetro hidrodinámico (Z-average) de muestras de solución de PCH a pH 11,4 y concentración 5% tomadas a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento.



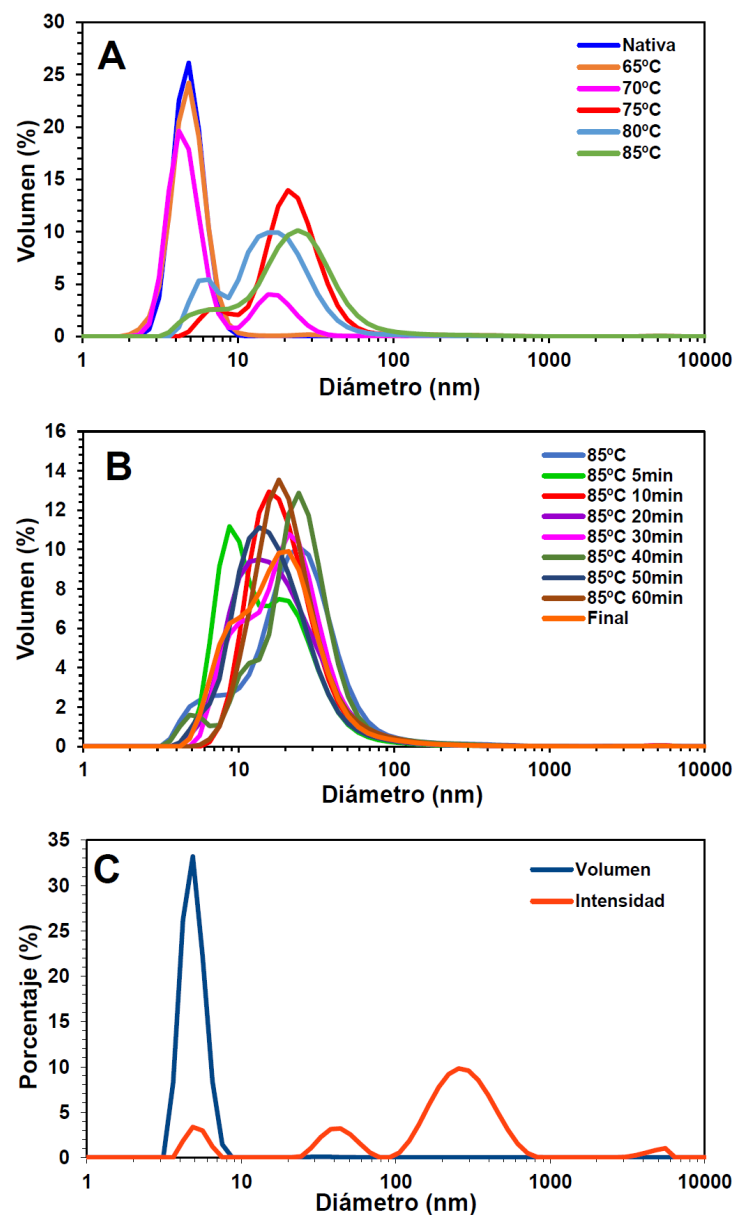
**Fig. 5:** Efecto de la temperatura y tiempo de calentamiento sobre el tamaño promedio, Z-average (A) e índice de polidispersidad, Pdl (B).

Como puede observarse, los valores de Z-average no presentaron una tendencia clara con respecto al tiempo y a la temperatura de calentamiento manteniéndose en un rango de tamaño de 75 a 85 nm, correspondiente a la presencia de agregados proteicos. Por otro lado, en la Fig. 5.B se observa el índice de polidispersidad (Pdl) de muestras de solución de PCH a pH 11,4 y concentración 5% tomadas a dife-



rentes. temperaturas y tiempos de calentamiento. En este caso, se observó un Pdl mayor para la muestra nativa que para las tratadas térmicamente. A 65-70°C el Pdl disminuyó levemente. Luego hubo un decaimiento hasta valores que se mantuvieron constantes en torno a  $\sim 0,53$ . En todos los casos, los valores de Pdl indican que las muestras poseen polidispersidad intermedia debido a que  $Pdl > 0,4$ , es decir que existen partículas de tamaños diversos.

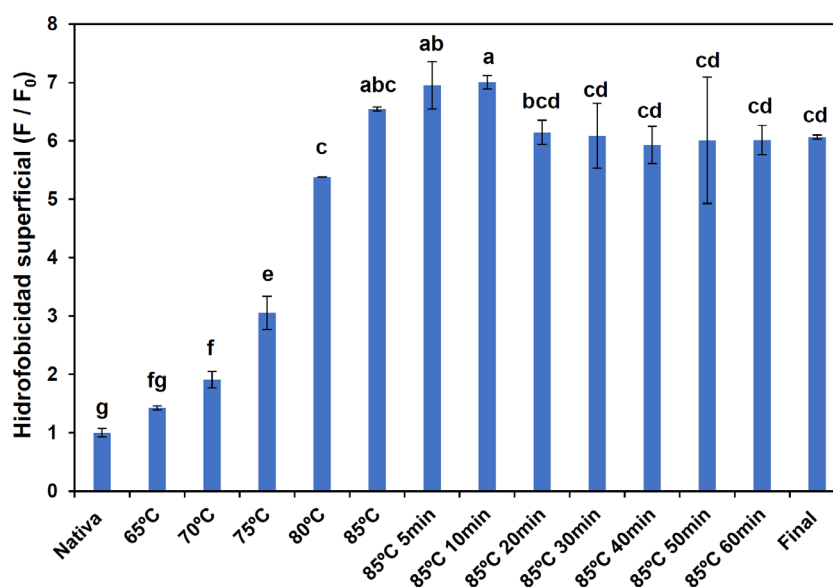
En la **Fig. 6** se presentan las distribuciones de tamaño de partícula en volumen (PSDv) de muestras de solución de PCH a pH 11,4 y concentración 5% tomadas a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento. En la **Fig. 6.A** se observó que a partir de los 70°C tiene lugar la formación de agregados. Por otro lado, en la **Fig. 6.B** se observó que, en todos los casos, hasta un 97% del volumen (masa) de las partículas presentaron un tamaño menor a 100 nm. No se observó una tendencia clara con la temperatura ni con el tiempo de calentamiento.



**Fig. 6:** Efecto de la temperatura (A) y tiempo de calentamiento (B) sobre la distribución de tamaño de partícula basada en volumen (PSDv, %). Comparación entre PSDv y PSDi (C).

Como puede notarse, el valor de Z-average de la proteína nativa fue de 87 nm mientras que en la PSDv correspondiente, solo se observa proteína nativa de ~6 nm. Para comprender esta diferencia, se debe tener en cuenta que el Z-average corresponde a un único valor de tamaño informado para una muestra. Por lo tanto, no da información acerca de si existen varias poblaciones de tamaño de partícula. En este sentido, en la **Fig. 6.C** se presentan las distribuciones de tamaño de partícula en volumen (PSDv) e intensidad (PSDi) correspondientes a una lectura del equipo de la muestra de PCH nativa a pH 11,4 y concentración 5%. En dicha lectura el Z-average fue de 84 nm. Puede observarse que para la PSDv hubo una sola población, mientras que en la PSDi hubo tres poblaciones detectadas (5 nm, 43 nm y 291 nm). Esto se debe a que las partículas de mayor tamaño dispersan la luz en mayor proporción y aún si se encuentran en muy pequeña cantidad producen una importante contribución al total de luz dispersada. De hecho, la intensidad de luz dispersada es directamente proporcional a la sexta potencia del diámetro, lo cual hace a la técnica de DLS, ideal para la detección de trazas de agregados o partículas de mayor tamaño. Estas poblaciones de mayor tamaño incidirán sobre la función de autocorrelación, a partir de la cual el Z-average es obtenido.

Por otro lado, la **Fig. 7** presentan los resultados fluorescencia extrínseca (como una medida de la hidrofobicidad superficial) de muestras de solución de PCH a pH 11,4 y concentración 5% tomadas a diferentes temperaturas y tiempos de calentamiento.



**Fig. 7:** Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre la hidrofobicidad superficial de PCH.

Se puede observar que el tratamiento térmico produjo un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia ( $F/F_0$ ) respecto a la muestra nativa alcanzando un máximo a 85°C, 5 y 10 min. El incremento en la hidrofobicidad superficial fue directamente proporcional a la temperatura de calentamiento. Esto se debe a la desnaturalización de las PCH y consecuente desplegamiento de la estructura molecular y exposición de las regiones hidrofóbicas ocultas, lo que confiere una mayor hidrofobicidad superficial a la proteína.

A partir de los resultados presentados, se eligió el *tratamiento térmico de 85°C, 5 min, concentración de PCH de 5%p/p y pH 11,4*, debido a que, en primer lugar, esta fue la máxima concentración a la cual no presentó gelificación y además, a esta temperatura y tiempo de calentamiento hubo mayor exposición de regiones hidrofóbicas ocultas de la proteína.



### Obtención y características de nanocápsulas PCHn-CB

La espectroscopia de fluorescencia es una herramienta ampliamente utilizada para estudiar las interacciones proteína-ligando. El comportamiento de fluorescencia de las proteínas se atribuye a la emisión de los aminoácidos aromáticos triptófano (Trp), fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) (Albani, 2004, Lakowicz, 2006). Se sabe que la OVA, la principal fracción proteica de la clara de huevo, tiene tres residuos de triptófano (Trp<sub>148</sub>, Trp<sub>267</sub> y Trp<sub>184</sub>) que contribuyen globalmente a la intensidad de la emisión de fluorescencia (Visentini y col., 2017). A partir del ajuste de los datos de intensidad de fluorescencia al modelo de Scatchard modificado, se calcularon el número de moléculas de CB unidos por monómero de proteína (n) y la constante de asociación (Ka) para las nanocápsulas PCH-CB (control) y PCHn-CB (Tabla 1). Los CB evaluados fueron: carvacrol (CAR), timol (THY) y cinamaldehído (CIN). Se observó que los valores de n para las nanocápsulas PCHn-CB fueron significativamente más altos que los obtenidos para las nanocápsulas EWP-BC. Esto sugiere que el tratamiento térmico aumentó la capacidad de PCH para unir un mayor número de moléculas de CB. Según Sponton y col. (2017), el tratamiento térmico de PCH promueve la exposición de dominios hidrófobos inicialmente ocluidos en la estructura nativa de la proteína, lo que conduce a un aumento en el número de sitios de unión para ligandos lipófilos. Por otro lado, como se puede deducir de los valores de Ka, la afinidad de los CB por PCH nativa y PCHn fue similar, excepto para el complejo PCH-THY cuyo valor de Ka fue significativamente mayor (p < 0.05). En general, se pudo concluir que los parámetros n y Ka no dependieron de la naturaleza química de los CB.

Nanocápsulas	n	Ka (M <sup>-1</sup> )	ΔH° (J mol <sup>-1</sup> )	ΔS° (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	ΔG° (J mol <sup>-1</sup> )
PCH-CAR	128 ± 10 <sup>c</sup>	(7,3 ± 3,5)E5 <sup>b</sup>	-(7,0 ± 0,9)E4 <sup>c,d</sup>	-(1,3 ± 2,3)E2 <sup>c,d</sup>	-(3,2 ± 0,9)E4 <sup>a,b</sup>
PCH-THY	139 ± 27 <sup>c</sup>	(1,6 ± 8,6)E6 <sup>a</sup>	-(4,0 ± 0,8)E4 <sup>b</sup>	-(2,9 ± 0,5)E1 <sup>b</sup>	-(3,1 ± 0,8)E4 <sup>a,b</sup>
PCH-CIN	114 ± 3 <sup>c</sup>	(5,8 ± 2,4)E5 <sup>b</sup>	(4,4 ± 1,4)E4 <sup>a</sup>	(2,8 ± 0,5)E2 <sup>a</sup>	-(3,3 ± 0,5)E4 <sup>b</sup>
PCHn-CAR	207 ± 21 <sup>b</sup>	(3,4 ± 2,9)E5 <sup>b</sup>	-(8,3 ± 1,3)E4 <sup>d</sup>	-(1,7 ± 0,0)E2 <sup>d</sup>	-(3,2 ± 0,1)E4 <sup>a,b</sup>
PCHn-THY	264 ± 52 <sup>a</sup>	(8,8 ± 6,6)E4 <sup>b</sup>	-(6,0 ± 1,3)E4 <sup>c</sup>	-(1,1 ± 0,4)E2 <sup>c</sup>	-(2,7 ± 0,0)E4 <sup>a</sup>
PCHn-CIN	230 ± 13 <sup>a,b</sup>	(5,2 ± 3,3)E5 <sup>b</sup>	(6,2 ± 0,3)E4 <sup>a</sup>	(3,1 ± 0,0)E2 <sup>a</sup>	-(2,3 ± 0,0)E4 <sup>a,b</sup>

**Tabla 1:** Parámetros estequiométricos y termodinámicos involucrados en el proceso de obtención de nanocápsulas PCHn-CB. Las nanocápsulas PCH-CB fueron contempladas como controles.

Por otro lado, los valores de los parámetros termodinámicos involucrados en la formación de las nanocápsulas se muestran en la **Tabla 1**. Como puede verse, los valores negativos de ΔG° a 25 ° C para los sistemas PCH-CB y PCHn-CB indicaron que la formación de nanocápsulas se llevó a cabo de forma espontánea. Las fuerzas de interacción involucradas en la formación de las mismas se dedujeron a partir de los signos de los parámetros termodinámicos (Ross & Subramanian, 1981). Los signos negativos de ΔH° y ΔS° correspondientes a las nanocápsulas de CAR y THY sugirieron una unión exotérmica determinada por interacciones atractivas como Van der Waals y enlaces de hidrógeno. Estas interacciones se

han descrito para nanocápsulas basadas en compuestos fenólicos y OVA,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina de suero bovino, zeína y caseinato de sodio (Abbasi y col., 2018, Chen y col., 2021, Xie y col., 2017, Lu y col., 2009, Wu y col., 2011). Por otro lado, para las nanocápsulas de CIN, los signos positivos de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  sugirieron una unión endotérmica gobernada por interacciones hidrofóbicas. Estos resultados destacan el papel de la naturaleza química de los CB en las fuerzas intermoleculares implicadas en la formación de nanocápsulas. Debido a la gran capacidad de PCHn para la vehiculización de CB, se eligieron los complejos PCHn-BC para los estudios posteriores.

El tamaño de partícula promedio (Z-av) y el potencial  $\zeta$  de PCHn y las nanocápsulas PCHn-CB se determinaron a pH 7.0 (Tabla 2). Además, este valor de pH está por encima del punto isoeléctrico de PCHn (-5.0) (Sponton y col., 2020), lo que promueve la estabilidad coloidal relativa de los sistemas de proteínas debido a las repulsiones electrostáticas entre cargas netas negativas y tamaños de partículas más pequeños. Como se puede observar en la Tabla 2, el tratamiento térmico a pH alcalino (pH 11,4) produjo agregados nanométricos (<100 nm) como resultado de un equilibrio entre la atracción hidrofoba y la formación de enlaces disulfuro (promovida por el calentamiento) y la repulsión electrostática (favorecido a pH  $\gg$  pi) entre las proteínas (Wang y col., 2010). Luego, la nanoencapsulación de CB a PCHn produjo un aumento en los valores de Z-av, lo que confirmó la formación de nanocápsulas. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores de Z-av para las nanocápsulas PCHn-CAR y PCHn-THY. De lo contrario, la nanocápsula PCHn-CIN fue más pequeña que las demás. Por otro lado, la PSDv y la apariencia visual de cada sistema se muestran en la Fig.8. Tanto PCHn como las nanocápsulas PCHn-BC evidenciaron un comportamiento monomodal y los valores Z-av fueron consistentes con los diámetros hidrodinámicos (dH) registrados (correspondiente a los picos PSDv). Finalmente, se determinó el potencial  $\zeta$  de los sistemas y se consideró como una medida de la carga neta superficial. El potencial  $\zeta$  para PCHn presentó un signo negativo, que no fue modificado por la nanocomplejación de CB, lo que sugiere que PCHn gobernaría el comportamiento coloidal de las nanocápsulas. Sin embargo, la magnitud de los potenciales  $\zeta$  para las nanocápsulas PCHn-CAR y PCHn-THY fue significativamente mayor que la de PCHn, lo que podría estar relacionado con una exposición de residuos cargados negativamente debido a ligeras modificaciones conformacionales en PCHn. Por otro lado, la nanocomplejación de CIN a PCHn no alteró significativamente la carga neta de la superficie, lo que indica una ausencia de modificaciones conformacionales en PCHn.

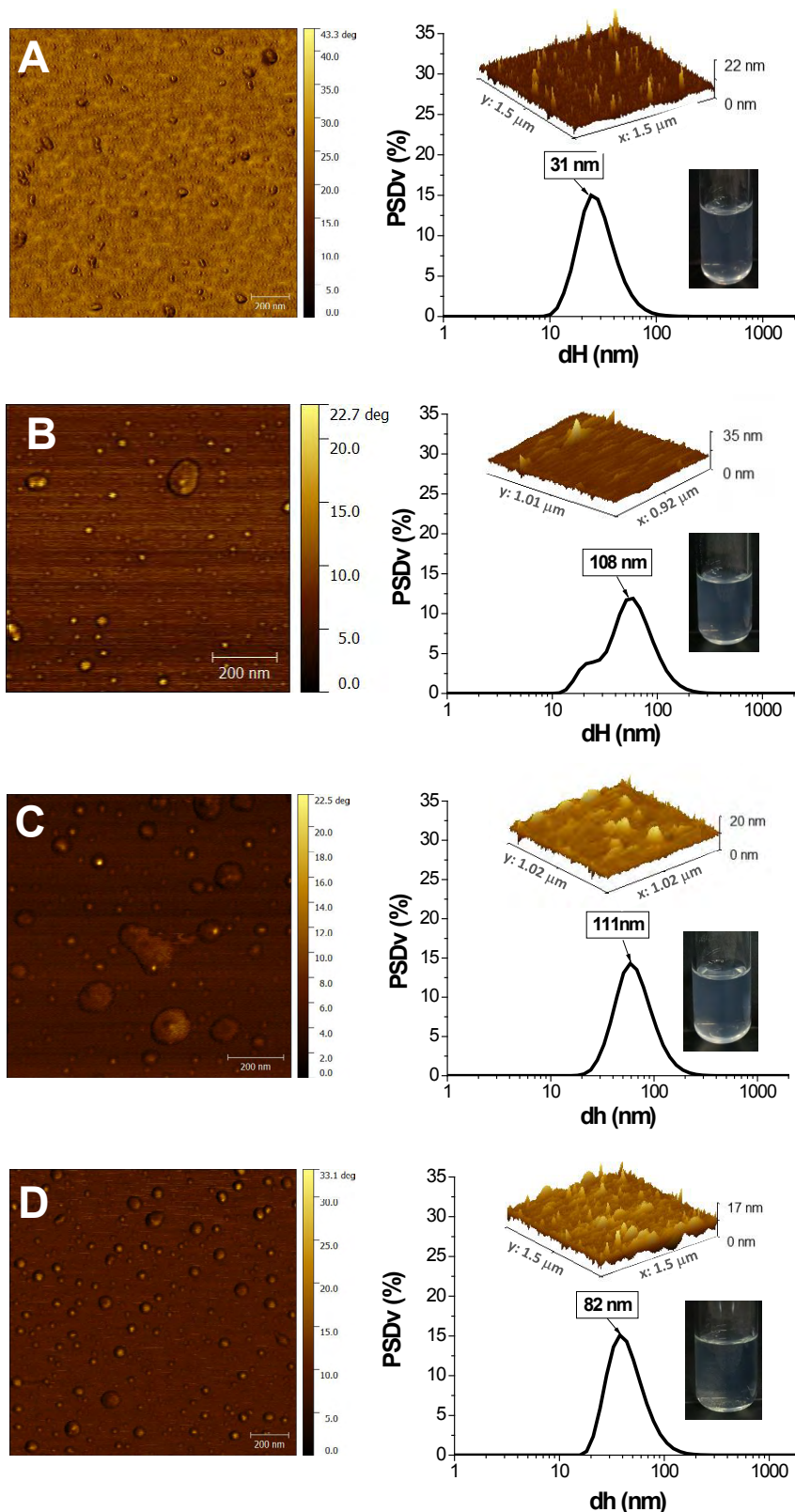
Nanocápsulas	Z-av (nm)	Potencial (mV)	EE (%)
<b>PCHn (control)</b>	48 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	-12,6 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	-
<b>PCHn-CAR</b>	89 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	-21,4 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	83,25 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
<b>PCHn-THY</b>	91 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	-18,3 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	83,24 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>
<b>PCHn-CIN</b>	67 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	-16,7 $\pm$ 0,6 <sup>a,b</sup>	98,92 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>

**Tabla 2:** Valores de tamaño de partícula promedio (Z-av), potencial z y eficiencia de encapsulación para las nanocápsulas PCHn-CB.

La morfología de PCHn antes y después de la nanocomplejación con los CB se caracterizó por microscopía de fuerza atómica (AFM), las iconografías se muestran en la Fig.8. Las imágenes de fase se muestran en los paneles principales y las imágenes topográficas 3D se incluyen como insertos además

de su correspondiente PSDv. Las imágenes de fase y la topografía 3D para PCHn (**Fig. 8- A**) revelaron la presencia de una población mayoritaria con un diámetro de partícula estimado de ~ 50 nm y una población minoritaria de ~ 10 nm. Ambas poblaciones presentaron formas redondeadas con leve rugosidad. De lo contrario, la nanocomplejación de CB a PCHn (**Fig.8-BCD**) produjo estructuras con morfología similar, pero con una relación diámetro/altura más alta en comparación con PCHn. Esto podría deberse a la etapa de secado en la preparación de la muestra, en la que las partículas podrían aplastarse sobre la superficie de la mica, aumentando la relación diámetro/altura (Arzeni y col., 2015). Las imágenes de las nanocápsulas de PCHn-BC también revelaron la presencia de una población minoritaria de menor tamaño (~ 10 nm). Rao y col. (2020) observaron una morfología similar para nanocápsulas obtenidas con OVA nativa y CAR, teniendo un tamaño de 132,2 nm. En general, el tamaño de partícula estimado por AFM se correspondió con los resultados obtenidos por DLS (PSDv). Sin embargo, la población correspondiente a las partículas más pequeñas (~ 10 nm) no fue detectada por DLS, ya que las poblaciones más pequeñas comúnmente se superponen con las más grandes (Bhattacharjee, 2016).

Para conocer la cantidad de CB nanoencapsulado por PCHn y su potencial aplicación en matrices alimentarias, se calculó la eficiencia de encapsulación (EE, %) (**Tabla 2**). Para todas las nanocápsulas PCHn-BC, los valores de EE fueron superiores al 83%, lo que sugiere que el proceso de nanoencapsulación de CB se desarrolló con éxito. El mayor valor de EE se obtuvo para nanocápsula PCHn-CIN ( $p < 0.05$ ), mientras que para las nanocápsulas PCHn-THY y PCHn-CAR no se observaron diferencias significativas. Algunos autores han informado valores de EE para estos CB encapsulados en varias matrices biopoliméricas. Por ejemplo, los geles OVA se examinaron recientemente para determinar la nanoencapsulación de CAR produciendo un 51,41% de EE (Rao y col., 2020). Pan y col. (2014) THY encapsulado en caseinato de sodio mediante homogeneización de alto esfuerzo de cizallamiento, produjo 89% de EE. Wu y col. (2012) evaluaron la encapsulación de THY y CAR en nanopartículas de zeína alcanzando el 80% de EE. CIN se encapsuló en nanopartículas biopoliméricas a base de proteína de suero, dextrano y condroitin sulfato con un 76,57% de EE (Liu y col., 2020) y en nanopartículas de alginato-quitosano alcanzaron un 72,92% de EE (Ji y col., 2019). Las diferencias encontradas entre los valores de EE para estos CB podrían atribuirse al uso de diferentes materiales biopoliméricos y métodos de encapsulación. Por lo tanto, se puede concluir que el método de nanoencapsulación de CB propuesto en este proyecto fue bastante efectivo en comparación con otros reportados en la literatura.



**Fig. 8:** Imágenes de fase AFM y distribución del tamaño de partícula basadas en el volumen (PSDv) para las nano-cápsulas PCHn (A), PCHn-CAR (B), PCHn-THY (C) y PCHn-CIN (D) a pH 7,0, respectivamente. Las inserciones en los paneles PSDv corresponden a las imágenes 3D topográficas de AFM.

Por último, se determinaron los valores de MIC y MFC para CB puros. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3**.

Sistemas	MIC (mg mL <sup>-1</sup> )	MFC (mg mL <sup>-1</sup> )
THY	0,030	0,040
CAR	0,030	0,040
CIN	0,040	0,050
PCHn	-	-
PCHn-THY	0,010	0,020
PCHn-CAR	0,010	0,020
PCHn-CIN	0,020	0,030

**Tabla 3:** Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima de fungicida (MFC) para CB puros (en solución etanólica) y nanocápsulas PCHn-BC.

Se observó que THY y CAR mostraron las mayores actividades antifúngicas, seguidas de CIN. En general, la actividad antifúngica de estos CB está relacionada con su hidrofobicidad, que se correlaciona directamente con el parámetro LogP (coeficiente de partición de compuestos lipofílicos en octanol/agua) y con su partición en las membranas citoplasmáticas microbianas (Ben Arfa y col., 2006, Ultee y col., 2002, Xu y col., 2008, Sun y col., 2020). Por tanto, los valores altos de LogP para THY (3,30) y CAR (3,49), en comparación con el de CIN (1,90), podrían explicar sus mayores actividades antifúngicas. Luego, se evaluó la actividad antifúngica para las nanocápsulas PCHn-CB (**Tabla 3**). La actividad antifúngica de PCHn (sin CB) también se examinó siendo esta nula. Los valores de MIC y MFC para las nanocápsulas fueron notablemente más bajos que los de CB puro. La mejora de las propiedades antifúngicas se puede atribuir al proceso de nanoencapsulación, que promovería una mayor solubilización y retención de CB en medios acuosos. Los valores más bajos de MIC y MFC se registraron para las nanocápsulas PCHn-THY y PCHn-CAR, siendo este comportamiento similar al observado para CB puros.

#### Obtención y características de nanocápsulas PCHn-AE

En la **Tabla 4** se presentan los valores de Z-av y Pdl con sus respectivas desviaciones estándar correspondientes a PCHn (como sistema control) y a las nanocápsulas PCHn-AE a pH del medio acuoso igual a 11,4, 9 y 7.

pH	Nanocápsulas	Z-av (nm)	Pdl (nm)
11,4	PCHn (control)	5,7 ± 1,9 a	0,538 ± 0,028
	PCHn-CAN	17,4 ± 1,4 b	0,643 ± 0,126
	PCHn-COM	22,9 ± 3,1 b,c	0,592 ± 0,066
	PCHn-LIM	29,5 ± 6,6 d,e	0,954 ± 0,058
	PCHn-TOM	35,3 ± 2,6 e	0,586 ± 0,007
	PCHn-ORE	25,8 ± 4,2 c,d	0,561 ± 0,012

9	PCHn (control)	10,1 ± 0,0 a	0,523 ± 0,003
	PCHn-CAN	20,2 ± 4,3 b	0,506 ± 0,008
	PCHn-COM	31,6 ± 6,8 c	0,817 ± 0,230
	PCHn-LIM	22,5 ± 5,2 b	0,565 ± 0,036
	PCHn-TOM	21,6 ± 5,7 b	0,534 ± 0,026
	PCHn-ORE	18,4 ± 2,7 b	0,506 ± 0,007
7	PCHn (control)	22,3 ± 3,6 a	0,464 ± 0,010
	PCHn-CAN	33,0 ± 4,8 a,b	0,447 ± 0,022
	PCHn-COM	60,8 ± 11,1 c	0,804 ± 0,037
	PCHn-LIM	59,2 ± 8,7 c	0,718 ± 0,108
	PCHn-TOM	36,5 ± 2,6 b	0,485 ± 0,006
	PCHn-ORE	26,3 ± 1,9 a,b	0,475 ± 0,018

**Tabla 4:** Efecto del pH del medio acuoso sobre la formación de nanocápsulas PCHn-AE analizada en términos del tamaño promedio de partícula (Z-av) y Pdl.

Los AE evaluados fueron: orégano (ORE), tomillo (TOM), limón (LIM), canela (CAN) y comino (COM). Primeramente, todos los sistemas evaluados presentaron tamaño nanométrico. Se observó que todos las nanocápsulas PCHn-AE presentaron valores Z-av significativamente mayores a PCHn a los pH 11,4 y 9. Por otro lado, los sistemas evaluados a pH 7 exhibieron el mismo comportamiento, con excepción de PCHn-CAN y PCHn-ORE, los cuales no mostraron Z-av significativamente diferente a PCHn. El incremento del Z-av de los sistemas frente a PCHn, para las mismas condiciones de pH, estaría indicando la nanocomplejación de moléculas de AE en la matriz de PCHn (Sponton y col., 2015). A pH 11,4, los sistemas PCHn-CAN y PCHn-COM presentaron los menores Z-av (17,4 y 22,9 nm, respectivamente). Además, PCHn-LIM y PCHn-TOM exhibieron los mayores valores de Z-av (29,5 y 35,3 nm, respectivamente). A pH 9, no se observó diferencia significativa en el Z-av de los sistemas, excepto por PCHn-COM, el que presentó el mayor valor de Z-av (31,6 nm). Como se mencionó anteriormente, los sistemas con menor dH evaluados a pH 7 fueron PCHn-CAN y PCHn-ORE. En este caso, PCHn-COM y PCHn-LIM fueron los sistemas con mayor Z-av (60,8 y 59,2 nm, respectivamente). A partir de estos resultados, se puede concluir que la variación del Z-av es claramente dependiente del AE que está formando la nanocápsula.

Las diferentes conformaciones estructurales de PCHn evidenciadas hasta aquí llevan a suponer una variación en la capacidad de encapsular compuestos hidrofóbicos con el aumento o disminución del pH de la dispersión acuosa. Por lo tanto, fue necesaria la aplicación de un método que permita evaluar la %EE de un ligando en una proteína a una determinada condición del medio, tal como se realizó para las nanocápsulas PCHn-CAN, PCHn-COM, PCHn-LIM, PCHn-TOM y PCHn-ORE, todas ellas formadas a pH 11,4, 9 y 7.

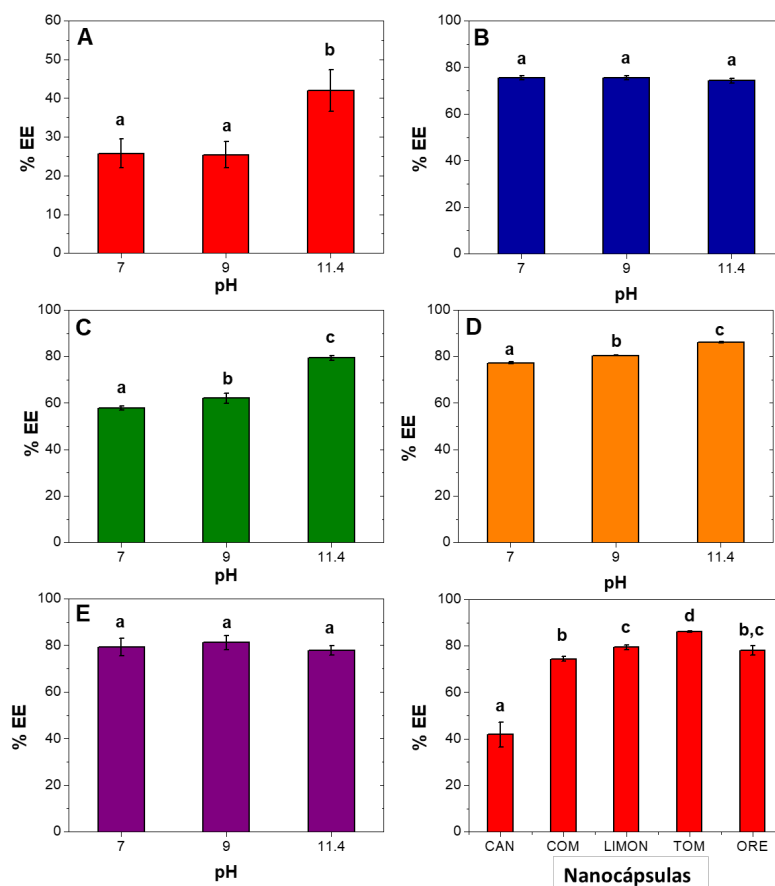
En la **Fig.9** se observan los %EE para cada pH de medio acuoso correspondientes a las nanocápsulas PCHn-CAN, PCHn-COM, PCHn-LIM, PCHn-TOM y PCHn-ORE. El %EE de las nanocápsulas PCHn-LIM y PCHn-TOM aumentó significativamente con el aumento de pH (**Fig. 9C y 9D**). Por lo tanto, la mayor nanoencapsulación de LIM y TOM en PCHn se lograría cuando el pH del medio acuoso es 11,4. La encapsulación de CAN por parte de PCHn no presentó diferencias significativas cuando fue evaluada a pH 9 y 7, pero aumentó significativamente cuando la nanoencapsulación se llevó a cabo a pH 11,4 alcanzando un valor de eficiencia de encapsulación de 44%, aproximadamente (**Fig. 9A**). Por último, los sistemas PCHn-



COM y PCHn-ORE no evidenciaron diferencias significativas en su %EE al ser evaluados a pH 11,4, 9 y 7 (**Fig. 9B y 9E**). A partir de la discusión del **Fig.9**, es posible concluir que la eficiencia de encapsulación de PCHn podría variar o no en función del pH del medio, y la tendencia de su comportamiento dependerá del AE que se esté nanoencapsulando.

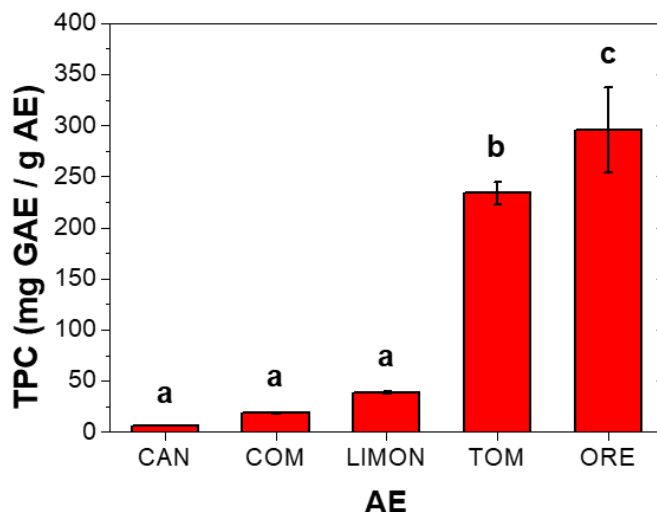
Debido a que la capacidad de nanoencapsular AE por parte de PCHn tiende a ser mayor cuando las nanocápsulas se forman a pH 11,4, se compararon los valores de %EE de todos los sistemas en esta condición del medio acuoso. En el **Fig. 9F** se observa el %EE de las nanocápsulas PCHn-CAN, PCHn-COM, PCHn-LIM, PCHn-TOM y PCHn-ORE, formados a pH 11,4. Bajo esta condición, la capacidad de encapsulación de PCHn presentó variaciones significativas entre los AE evaluados. Aquí se expone nuevamente que la eficiencia de encapsulación dependería del AE involucrado en la formación de la nanocápsula. Esto podría deberse a que los compuestos presentes en los AE mencionados difieren en su naturaleza química y, por lo tanto, presentan grupos funcionales diversos que interactúan de forma específica con la nanopartícula de proteína. La mayor eficiencia de encapsulación fue exhibida por el complejo PCHn-TOM, el cual alcanzó un valor de 86%, aproximadamente. Los complejos PCHn-COM, PCHn-LIM y PCHn-ORE presentaron valores entre 74 y 79%, aproximadamente. Por otro lado, el %EE más bajo correspondió al complejo PCHn-CAN, el cual alcanzó un valor de 44%, aproximadamente.

Estas determinaciones permitieron identificar la condición de formación de nanocápsulas PCHn-AE bajo las cuales presentan características fisicoquímicas deseadas y mayor capacidad de unión de compuestos presentes en AE.



**Fig.9:** Efecto del pH del medio acuoso sobre la eficiencia de encapsulación (% EE) obtenida para las nanocápsulas PCHn-CAN (A), PCHn-COM (B), PCHn-LIM (C), PCHn-TOM (D), PCHn-ORE (E). Comparación de valores % EE para las diferentes nanocápsulas PCHn-AE obtenidas a pH 11,4 (F).

En la **Fig.10** se representan los valores de contenido fenólico total (TPC), expresados como mg GAE/g AE, obtenidos para cada uno de los AE utilizados para formar nanocápsulas PCHn-AE. Se puede observar que el contenido de compuestos fenólicos resultó dependiente de la naturaleza del AE y varió considerablemente para TOM y ORE respecto de CAN, COM y LIM. La menor concentración equivalente de GAE fue presentada por CAN (6 mg GAE/g AE, aproximadamente), mientras que el mayor valor fue presentado por ORE (295 mg GAE/g AE, aproximadamente). Estos resultados son consistentes con bibliografía, y permiten una primera aproximación a la comprensión de la composición de los AE, su posible bioactividad y la clase de compuestos químicos involucrados en dicha bioactividad.



**Fig. 10:** Contenido de compuestos fenólicos totales (TPC) para los AE puros empleados en la obtención de nanocápsulas PCHn-AE.

En la **Tabla 5** se presentan los resultados obtenidos de PCHn (control sin AE) y nanocápsulas PCHn-AE formadas a pH 11,4 para el ensayo de actividad antioxidante *in vitro* de ABTS.

Nanocápsulas	ABTS
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
PCHn (control)	354 ± 67 c
PCHn-CAN	949 ± 16 f
PCHn-COM	541 ± 12 e
PCHn-LIM	443 ± 16 d
PCHn-TOM	85 ± 3 b
PCHn-ORE	61 ± 3 a

**Tabla 5:** Actividad antioxidante *in vitro* (expresada como IC<sub>50</sub>) registrada por el método ABTS de las nanocápsulas PCHn-AE.

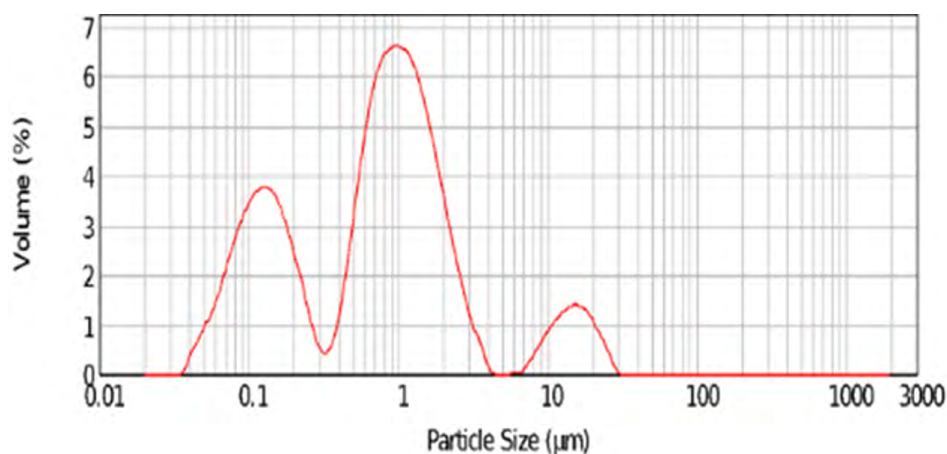
Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos por el ensayo ABTS se encontraron entre 61 y 949 µg/mL, aproximadamente. La actividad antioxidante presentada por las nanocápsulas PCHn-AE dependió del AE encapsulado. Los sistemas PCHn-TOM y PCHn-ORE evidenciaron mayor la capacidad antioxidante, y las nanocápsulas PCHn-CAN, PCHn-COM y PCHn-LIM mostraron, incluso, menor capacidad antioxidante que

PCHn. Estas últimas observaciones sugieren que los grupos funcionales responsables de la actividad antioxidante de los AE de CAN, COM y LIM posiblemente estén bloqueados en la conformación final adoptada por dichas nanocápsulas. Sin embargo, para las nanocápsulas formadas con los AE de TOM y ORE, la actividad antioxidante podría ser correlacionada con el alto contenido de compuestos fenólicos totales y/o a una acción sinérgica promovida por la nanoencapsulación con PCHn.

### Obtención y caracterización de microcápsulas PCHn-AE de orégano

Las emulsiones convencionales constituyen una buena herramienta para la encapsulación de CB lipofílicos (tales como los AE) que pueden ser incorporados en la fase oleosa dispersa. De esta manera, los CB sensibles al deterioro medioambiental pueden ser eficientemente vehiculizados, retenidos e incorporados en diversas matrices alimenticias. Sin embargo, a los fines del presente proyecto se intentó obtener emulsiones de tipo *Pickering* para generar microcápsulas capaces de vehiculizar, retener y proteger AEO, que como se observó en la sección previa posee excelentes propiedades antioxidantes debido de su alto contenido en compuestos fenólicos totales. Para ello, las nanopartículas PCHn fueron evaluadas por su actividad emulsionante a fin de poder ser aplicarlas en el proceso de microencapsulación planteado. Para producir la microencapsulación del AEO empleando PCHn como emulsionante se prepararon 250 g de emulsión, formulada a una fracción de AO del 25 %p/p (suplementado con 1% de AEO) y una fase acuosa continúa compuesta por 2 %p/p de PCHn. La formación y estabilidad de emulsiones fueron monitoreadas en los procesos primario y secundario mediante análisis de tamaño de gota y estabilidad coloidal por evolución de retrodispersión de luz a lo largo de un tubo que contiene la emulsión (Arzeni y col., 2015).

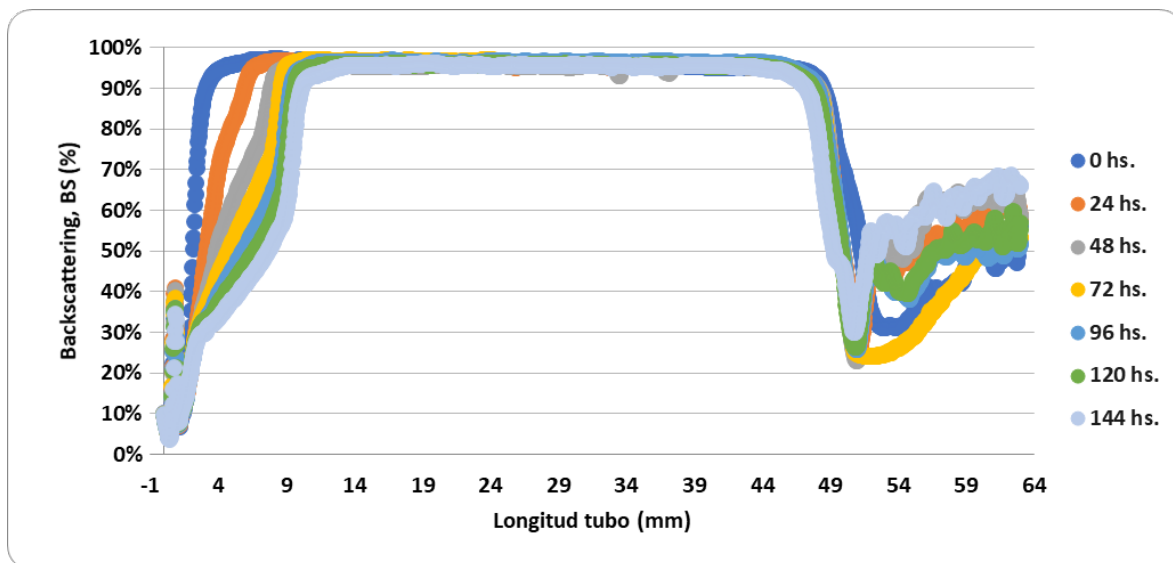
La **Fig. 11** presenta la distribución de tamaño de gota generado por el proceso de homogenización primario empleando un equipo Ultraturrax. Se observó que la emulsión primaria consistió en tres poblaciones distintas de gotas cuyos tamaños promedios estuvieron comprendidos en 0,1 mm, 1 mm y 10 mm. La población de 1 mm presentó el mayor porcentaje en volumen indicando su prevalencia en el volumen total de emulsión primaria. La naturaleza polidispersa de esta emulsión es la esperada para un proceso de homogenización usando homogeneizadores de hélice a alta velocidad como el Ultraturrax.



**Fig. 11:** Distribución de tamaño de gota basada en volumen (%) de la emulsión primaria PCHn-AEO.

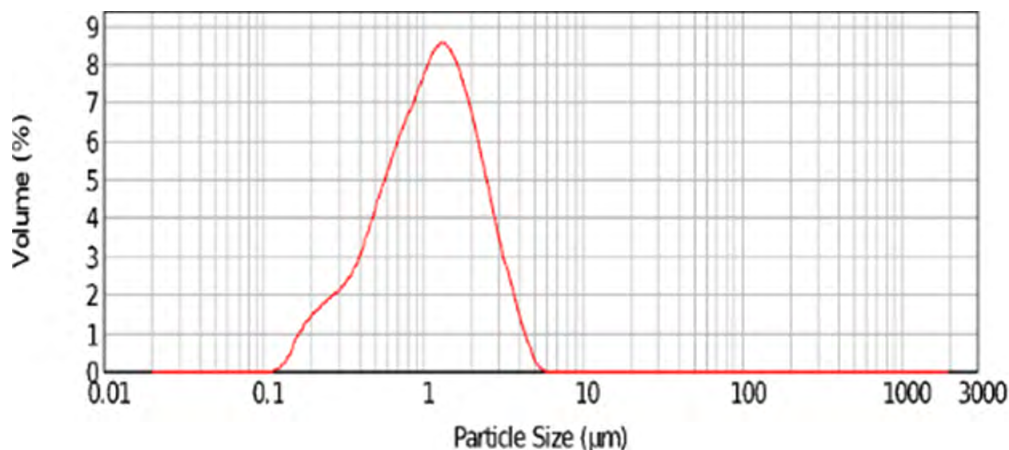
La estabilidad coloidal de la emulsión primaria fue monitoreada durante un periodo de 144 h (6 días). En la **Fig.12** se presenta el perfil de retrodispersión de luz a lo largo del tubo que contiene dicha emulsión en función del tiempo (h). Se observó que el aumento del tiempo produjo una disminución del porcentaje de luz retro dispersada en el fondo del tubo lo cual es indicativo de una menor concentración

de gotas de emulsión debido a una migración hacia la parte superior del tubo gobernada por un proceso de cremado. Sin embargo, durante el periodo ensayado no se observó una capa de crema formada por acumulación de gotas en la parte superior del tubo.



**Fig. 12:** Evolución del perfil de retrodispersión de luz a lo largo del tubo de emulsión primaria PCHn-AEO.

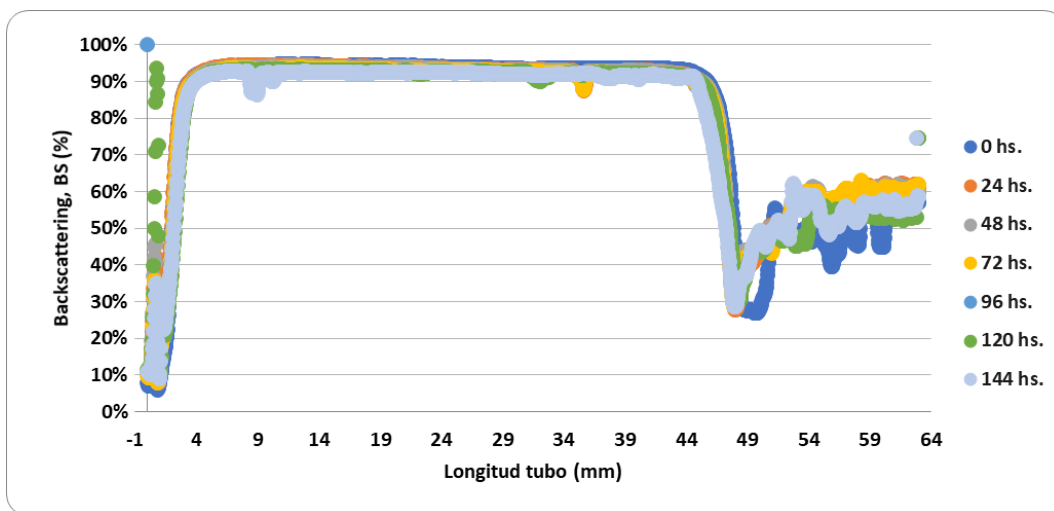
Por otro lado, el proceso de homogenización secundario empleando un equipo homogeneizador a válvula a presión produjo una emulsión secundaria cuya distribución de tamaño de gota se presenta en la **Fig. 13**. Con respecto a la emulsión primaria, puede observarse que el proceso de emulsificación secundario arrojó un comportamiento prácticamente monomodal y una consecuente reducción de la polidispersidad del sistema. Para esta emulsión, el tamaño promedio de gota estuvo comprendido en 1  $\mu\text{m}$ , siendo esto compatible con las condiciones de homogeneización empleadas.



**Fig. 13:** Distribución de tamaño de gota basada en volumen (%) de la emulsión secundaria PCHn-AEO.

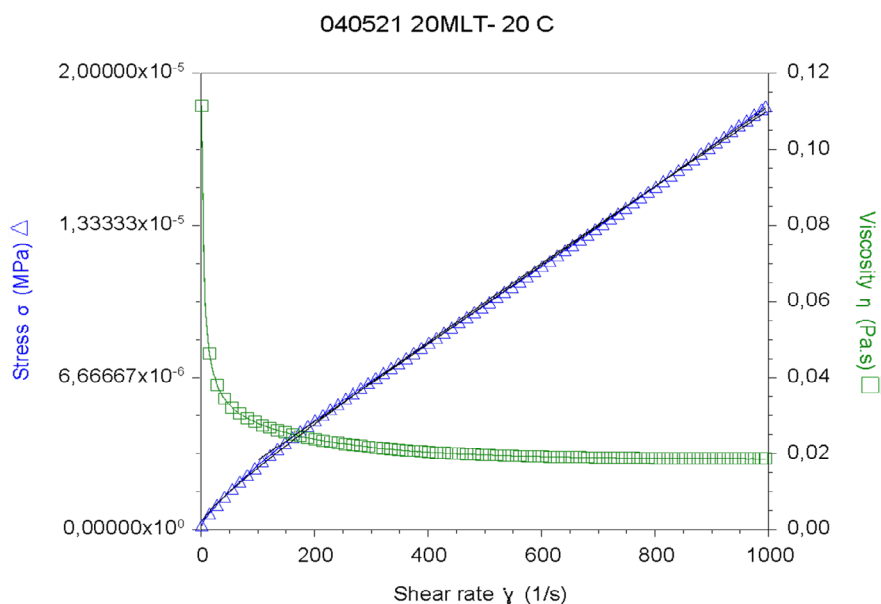
La emulsión secundaria fue evaluada en términos de su estabilidad coloidal a través de la evolución de la retrodispersión de luz a lo largo del tubo de emulsión. Dicho perfil de retrodispersión se visualiza en la **Fig. 14**. Se observó que durante el periodo ensayado correspondiente a 144 h (6 días) no hubo variación en el perfil de retrodispersión de luz a lo largo del tubo indicando un gran aumento de la estabilidad coloidal de la emulsión secundaria. Este resultado es compatible con el aumento de la

monodispersidad del sistema y se relaciona con las condiciones de emulsificación empleadas. En virtud de los resultados obtenidos, puede concluirse que las emulsiones *Pickering* empleando como agentes emulsionantes las nanopartículas PCHn constituyen un excelente material tensioactivo capaz de promover la estabilidad de emulsiones que vehiculizan AEO por un considerable periodo de tiempo (6 días). Este comportamiento puede ser asociado con su gran hidrofobicidad superficial y con la capacidad de generar películas adsorbidas sobre la interfase aceite/agua de gran resistencia mecánica, posiblemente atribuida a un fuerte carácter elástico originado por importantes interacciones entre segmentos hidrofóbicos adsorbidos.



**Fig. 14:** Evolución del perfil de retrodispersión de luz a lo largo del tubo de emulsión secundaria PCHn-AEO.

La emulsión secundaria generada suplementada con un 20%p/p de maltodextrina (MDX) fue sometida a evaluación de su comportamiento reológico ya que este es un requisito importante para poder ser generada en polvo en forma de microcápsulas por medio de un proceso de secado spray. El reograma obtenido se presenta la **Fig. 15**.



**Fig. 15:** Dependencia del stress de corte (s) y viscosidad (h) de la velocidad de corte (g) de la emulsión secundaria PCHn-AEO.

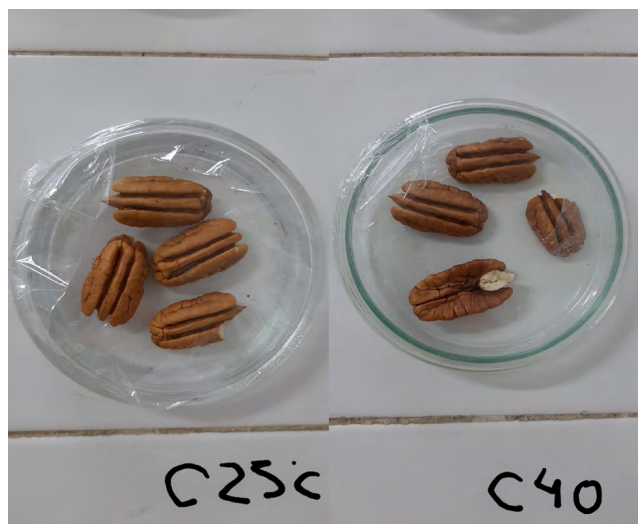
Se observó que la dependencia del stress de corte ( $s$ ) y de la viscosidad ( $h$ ) con el gradiente de velocidad ( $g$ ) correspondió a un comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ), el cual es típico para este tipo de material.

Por último, las emulsiones secundarias suplementadas con un 20 %p/p de MDX como material de pared fueron sometidas a un proceso de secado usando spray a una  $T_{inlet} = 160^{\circ}\text{C}$  y a una velocidad de bombeo =  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . Una vez obtenido y recolectado el polvo de microcápsulas se determinó  $a_w$  en equipo Aqualab. Los resultados fueron  $a_w = 0,17$  para el polvo a la salida del ciclón y  $0,309$  para el polvo recuperado (que se acumuló en la cámara de secado, pero no se separó en ciclón). Posteriormente, un pool generado con los mismos se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  bajo una atmósfera controlada con un  $a_w$  de  $0,34$  empleando una solución sobresaturada de  $\text{MgCl}_2$ .

Por otro lado, las microcápsulas PCHn-AEO fueron reconstituidas en agua estéril a una concentración de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  y se evaluaron en términos de su actividad antifúngica contra *Aspergillus spp.* Bajo las condiciones de ensayo, se observó que las microcápsulas PCHn-AEO produjeron una inhibición del crecimiento radial del micelio de un  $48,55 \pm 3,21 \%$ .

### Evaluación del impacto de la aplicación de nano y microestructuras por espolvoreo sobre la oxidación lipídica de nuez pecán

Como se mencionó anteriormente, para verificar el éxito de la aplicación de las nano y microcápsulas se evaluó el desempeño de las mismas en sus formas en polvo como agentes antioxidantes para la conservación de aceite extraído de nuez pecán. La técnica de conservación fue por espolvoreo de  $0,25 \text{ g}$  de polvo de nano y microcápsulas sobre  $10 \text{ g}$  de una muestra de nuez pecán de la variedad Harris Super (cosecha 2021). Las nueces espolvoreadas se colocaron en placas de Petri de vidrio estériles (diámetro  $9 \text{ cm}$ ) y se sellaron con un film plástico. Se tomaron placas controles, las cuales se mantuvieron a  $25^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$  sin aplicación de sistemas encapsulados (**Fig. 16**) y placas tratadas con los mismos que fueron colocadas en estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  a fin de acelerar condiciones de deterioro (**Fig. 17**). Ambos conjuntos de placas se mantuvieron en tales condiciones durante un periodo de 30 días.



**Fig. 16:** Apariencia de las muestras de nueces pecán sometidas a tratamiento control (sin espolvoreo) almacenadas a  $25$  y  $40^{\circ}\text{C}$ .





**Fig. 17:** Apariencia de las muestras de nueces pecán sometidas a espolvoreo con nanocápsulas PCHn-AE y microcápsulas PCHn-AEO almacenadas a 40°C por 30 días.

Posteriormente, se extrajo el aceite a partir de las nueces controles y tratadas y su estabilidad oxidativa en condiciones aceleradas fue evaluada por el método de Rancimat. Los resultados se presentan en la **Tabla 6**.

Sistemas encapsulados espolvoreados sobre nuez pecán	OSI (h)
Control S/T 25 °C, 30 días	13,25 ± 0,68 b
Control S/T 40 °C, 30 días	10,38 ± 0,11 a
Nanocápsula PCHn-ORE 40 °C, 30 días	17,44 ± 0,08 d
Nanocápsula PCHn-TOM 40 °C, 30 días	14,75 ± 0,17 c
Nanocápsula PCHn-LIM 40 °C, 30 días	14,73 ± 0,00 c
Microcápsula PCHn-AEO 40 °C, 30 días	13,08 ± 0,42 b

**Tabla 6:** Valores del índice de estabilidad oxidativa (OSI, h) para el aceite crudo extraído de muestras de nueces pecán controles (sin espolvoreo) y sometidas a espolvoreo con nanocápsulas PCHn-AE y microcápsulas PCHn-AEO.

A partir de dicha Tabla, puede deducirse que el almacenamiento de las nueces no tratadas en condiciones aceleradas de deterioro, es decir a 40°C provocó una reducción significativa del índice de estabilidad oxidativa (OSI, h) poniendo en evidencia el deterioro de la calidad de su aceite. Además, se observó que el efecto de la aplicación de los polvos por espolvoreo sobre la calidad de las nueces dependió del tipo de sistema encapsulado y del tipo de AE ensayado. Tras un periodo de almacenamiento a 40°C durante 30 días, la aplicación de las microcápsulas PCHn-AEO produjo un valor OSI similar al grupo control mantenido a 25°C, lo que manifestó cierto grado de protección del aceite. Sin embargo, los sistemas más efectivos para el control de calidad lipídica fueron aquellos constituidos por nanocápsulas PCHn-AE. Los polvos de nanocápsulas PCHn-TOM y PCHn-LIM manifestaron un grado de protección similar pero significativamente superior a los controles. La máxima protección del aceite de nuez pecán fue conseguida por espolvoreo con las nanocápsulas PCHn-ORE, lo cual convierte a las mismas en los sistemas más promisorios para la conservación de la calidad lipídica de este tipo de alimento. Este grado de protección pudo ser correlacionado con el elevado poder antioxidante que manifestó este sistema en ensayos *in vitro* y el cual pudo ser explicado por el alto contenido de compuestos fenólicos que posee el AE de orégano. Un análisis por GC-FID-MS reveló que el principal CB presente en el AEO bajo estudio fue carvacrol (**Tabla 7**).

Tiempo de retención (min)	Identificación (MS)	% Área (FID)
6,86	$\alpha$ -pineno $\alpha$ -mirceno (más probable)	1,0
7,96	o-cimeno	9,1
8,81	$\gamma$ -terpineno	7,1
9,92	$\alpha$ -linalool	1,9
15,89	Carvacrol	78,6
18,46	Cariofileno	1,8
22,46	Óxido de cariofileno	0,5

**Tabla 7:** Resultados del análisis de GC-FID-MS para el AE de orégano.

Por lo tanto, las acciones antioxidantes (y antifúngicas) de este compuesto fenólico son potenciadas cuando el mismo, ya sea en forma pura o contenido en un AE, es convenientemente vehiculizado. En virtud de los resultados obtenidos, es evidente que la forma más conveniente de vehiculizar AEO es por medio de nanoestructuras, las cuales manifiestan ventajas significativas frente a sus contrapartes microcápsulas. Las principales ventajas radican en la potenciación de sus propiedades conservantes y en su proceso de obtención, el cual es significativamente más económico.

## Conclusiones

En el presente proyecto de investigación se demostró la capacidad de nanopartículas de clara huevo obtenidas por tratamiento térmico controlado (PCHn) para actuar como matrices encapsulantes de aceites esenciales (AE) y compuestos bioactivos (CB) derivados de los mismos. A partir de dicha matriz pudo obtenerse y caracterizarse favorablemente nanocápsulas PCHn-CB y PCHn-AE empleando un conjunto de técnicas analíticas complementarias. Respecto a las nanocápsulas PCHn-CB, se concluye que su formación y características fisicoquímicas y antifúngicas dependen en gran medida de la naturaleza química del CB. Entre estos sistemas se destacan las nanocápsulas que vehiculizan carvacrol (CAR) y timol (TIM) como potentes agentes antifúngicos potencialmente capaces de controlar el deterioro mi-

crobiológico de diversas matrices alimenticias. La acción antifúngica evidenciada pudo ser explicada en términos de las ventajas que ofrece la nanoencapsulación de estos CB lipofílicos y volátiles, fundamentalmente debido a un incremento de su solubilidad en medios acuosos. Por otra parte, este proyecto avanzó hacia la nanoencapsulación de AE, los cuales representan las materias primas comercialmente disponibles y más económicas que estos CB. Las nanocápsulas PCHn-AE exhibieron una actividad antioxidante dependiente de la composición de compuestos fenólicos totales de dichos AE. En este sentido, los sistemas antioxidantes más promisorios fueron aquellos constituidos por las nanocápsulas PCHn-ORE, cuya actividad es correlacionada con el alto contenido de compuestos fenólicos totales que posee este AE.

Por otro lado, las PCHn son capaces de actuar como agentes emulsionantes de tipo Pickering los cuales pueden ser empleados para la formulación de emulsiones convencionales capaces de vehicular AE. A partir de las mismas, es posible obtener microcápsulas PCHn-AE mediante un proceso de secado spray convenientemente diseñado para preservar las propiedades de dicho AE. En este proyecto se encapsuló AE de orégano (AEO), seleccionado sobre la base de su alto contenido de compuestos fenólicos, mayormente carvacrol, el cual explica su alto poder antioxidante y considerable actividad antifúngica.

Las nanocápsulas y microcápsulas generadas en el presente proyecto fueron evaluadas como agentes antioxidantes a fin de preservar la calidad lipídica de nuez pecán. Para ello, las nueces fueron recubiertas con tales sistemas por espolvoreo, un método de aplicación poco abordado en la bibliografía. Se concluye que dicho método promovió la estabilidad oxidativa del aceite de nuez pecán dependiendo del tipo de sistema encapsulado. El sistema más eficiente para controlar el deterioro oxidativo del aceite de nuez pecán, en condiciones de almacenamiento aceleradas (40°C, 30 días), fue la nanocápsula PCHn-ORE, lo cual demostró su gran potencialidad como agente antioxidante por las razones anteriormente descritas.

Por último, se considera que los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación impactan positivamente en el área de conservación de alimentos, especialmente, aquellos que poseen un elevado contenido lipídico y, en cierta medida, el conocimiento generado podría ser extrapolado para la conservación de otros tipos de matrices y materias primas alimenticias, como las oleaginosas (semillas de lino). Desafortunadamente, por razones de aislamiento preventivo por la pandemia COVID-19 algunas actividades de investigación no pudieron llevarse a cabo, lo cual obligó al grupo de trabajo a ajustar el número de experiencias, métodos y técnicas que podrían haber complementado los resultados obtenidos. Como perspectiva futura, deberá tenerse en cuenta el desarrollo de una evaluación sensorial de las nueces recubiertas con nano y microcápsulas a fin de vislumbrar la aceptabilidad de consumidores habituales de este fruto. No obstante, se considera que el aporte científico básico y aplicado del presente proyecto favorece al sector agroindustrial implicado mediante la valorización de sus productos y su empleo en aplicaciones de creciente interés a nivel nacional e internacional.

### **Indicadores de producción**

Como indicadores de producción deberían considerarse los siguientes puntos:

1. Calidad de los resultados obtenidos.
2. Avance en el conocimiento sobre estrategias innovadoras para la preservación de alimentos de alto contenido lipídico.
3. Experiencia del grupo de trabajo en la temática planteada en el presente proyecto, lo que posiciona al mismo en un área científico-tecnológica de actual relevancia en la industria alimentaria.
4. Formación de recursos humanos. La concreción del presente proyecto dio lugar al desarrollo de una beca de iniciación en investigación del alumno Alexis Ceroleni (FCAL-UNER). Algunas

de las actividades planteadas y sus resultados derivados constituyen parte de la labor de investigación de la Dra. Maria Julieta Bof en el marco de su plan de trabajo como Investigadora Asistente de CONICET (Tema: *Diseño de recubrimientos para la conservación de nuez pecán: vehiculización de compuestos activos en nano y microestructuras*). Además, el avance del conocimiento en la temática planteada dio lugar a la obtención de una beca doctoral CONICET de la Ing. Erika Mariana Ramos (inicio abril 2021), desarrollando actividades de investigación en el tema “*Nanoencapsulación de propóleo para su aplicación en conservación de alimentos orgánicos de alto contenido lipídico*”, en el Laboratorio de Investigación en Postcosecha de Frutas (LIPOFRU) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación dependiente de la Universidad Nacional de Entre Ríos (FCAL-UNER), bajo la dirección del Dr. Adrian A. Perez y codirección de la Dra. Maria Julieta Bof.

5. Producciones científicas: Algunos resultados derivados del presente proyecto fueron presentados en dos contribuciones en forma de poster en un Congreso Internacional (CICYTAC 2018). Por motivos de confinamiento y aislamiento social debido a la pandemia COVID-19, la divulgación de los resultados obtenidos pre-pandemia (prevista para 2020) fue impedida. Es por ello que el grupo de trabajo se compromete a realizar contribuciones científicas en eventos nacionales e internacionales, como así publicar los resultados obtenidos en revistas científicas en un futuro inmediato.

## Bibliografía

- Abbasi, S., Benvidi, A., Gharaghani, S., Rezaeinasab, M. (2018). Chemometric studies of thymol binding with bovine serum albumin: A developing strategy for the successful investigation of pharmacological activity. *Bioelectrochemistry*, 124, 172-184.
- Albani, J. R. (2004). *Structure and dynamic of macromolecules: Absorption and fluorescence studies*. Paris, Francia: Elsevier.
- Arzeni, C., Perez, O. E., LeBlanc, J. G., Pilosof, A. M. R. (2015). Egg albumin folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 379-386.
- Bansod, S., Rai, M. (2008). Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences* 3, 2, 81-88.
- Ben Arfa, A.; Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149-154.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
- Ccappecan 2013. <http://www.cappecan.com.ar/index.php?s=novedades>
- Chen, F., Kong, N., Wang, L., Luo, Z., Yin, J., Chen, Y. (2021). Nanocomplexation between thymol and soy protein isolate and its improvements on stability and antibacterial properties of thymol. *Food Chemistry*, 334, 127594.
- Cogan, U., Kopelman, S., & Shinitzky, M. (1976). Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *European Journal of Biochemistry*, 65,1, 71-78.
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J., Pezennec, S. (2007). Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *Journal of Colloid Interface Science*, 315 2, 627-36.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., Mérillon, J.M. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural Food Chemical*, 57, 1768-1774.
- Fioramonti, S.A., Ru biolo, A.C., Santiago, L.G. (2017). Characterization of freeze-dried flaxseed oil microcapsules obtained by multilayer emulsions. *Powder Technology*, 319, 238-244.

- Himed, L., Merniz, S., Monteagudo-Olivan, R., Barkat, M., & Coronas, J. (2019). Antioxidant activity of the essential oil of Citrus limon before and after its encapsulation in amorphous SiO<sub>2</sub>. *Scientific African*, 1-20.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*, 95, 50-56.
- INTA. 2015. Nuez Pecán, un mercado con potencial de U\$S 30 M. <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=26417>
- Ji, M., Sun, X., Guo, X., Zhu, W., Wu, J., Chen, L., Wang, J., Chen, M., Cheng, C., Zhang, Q. (2019). Green synthesis, characterization and in vitro release of cinnamaldehyde/sodium alginate/chitosan nanoparticles, *Food Hydrocolloids*, 90, 515-522.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (3rd ed.), Chapter 8. Singapore, USA: Springer.
- Labuckas, Diana O., Damián M. Maestri, Milton Perelló, Marcela L. Martínez, and Alicia L. Lamarque. 2008. "Phenolics from Walnut (*Juglans Regia* L.) Kernels: Antioxidant Activity and Interactions with Proteins." *Food Chemistry* 107 (2): 607-12.
- Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., & Croguennec, T. (2013). Complexes between linoleate and native or aggregated b-lactoglobulin: Interaction parameters and in vitro cytotoxic effect. *Food Chemistry*, 141, 2305-2313.
- Liu, Q., Cui, H., Muhoza, B., Duhoranimana, E., Xia, S., Hayat, K., Hussain, S., Tahir, M.U., Zhang, X. (2020). Fabrication of low environment-sensitive nanoparticles for cinnamaldehyde encapsulation by heat-induced gelation method. *Food Hydrocolloids*, 105, 105789.
- Lu, Y., Wang, Y.L., Gao, S.H., Wang, G.K., Yan, C.L., Chen, D.J. (2009). Interaction of quercetin with ovalbumin: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Journal of Luminescence*, 129, 1048-1054.
- Pan, K., Chen, H., Davidson, P.M., Zhong, Q. (2014). Thymol Nanoencapsulated by Sodium Caseinate: Physical and Antilisterial Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1649-1657.
- Parris, N., Cooke, P. H., Hicks, K. B. (2005). Encapsulation of Essential Oils in Zein Nanospherical Particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4788-4792.
- Pereira de Abreu, D.A., P. Paseiro Losada, J. Maroto, and J.M. Cruz. 2011. "Natural Antioxidant Active Packaging Film and Its Effect on Lipid Damage in Frozen Blue Shark (*Prionace Glauca*)." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12 (1): 50-55.
- Rao, S., Xu, G., Lu, X., Zhang, R., Gao, L., Wang, Q., Yang, Z., Jiao, X. (2020). Characterization of ovalbumin-carvacrol inclusion complexes as delivery systems with antibacterial application. *Food Hydrocolloids*, 105, 105753.
- Ross, P.D. & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20, 3096-3102.
- Santiago, L., Sponton, O., Perez, A., Ramel, J., (2016). Proceso de obtención de nanotransportadores de sustancias lipofílicas. AR20160103823.
- Shahidi, Fereidoon, and Ying Zhong. 2010. "Novel Antioxidants in Food Quality Preservation and Health Promotion." *European Journal of Lipid Science and Technology* 112 (9): 930-40.
- Sponton, O. E., Perez, A. A., Carrara, C. R., & Santiago, L. G. (2015). Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs. *Food Hydrocolloids*, 48, 165-173.
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Ramel, J.V., Santiago, L.G. (2017). Protein nanovehicles produced from egg white. Part 1: Effect of pH and heat treatment time on particle size and binding capacity *Food Hydrocolloids*, 73, 67-73.
- Sponton, O.E., Perez, A.A., Stechina, M.F., Santiago, L.G. (2020). Production of protein nanovehicles by heat treatment of industrial egg white in a batch reactor. *Journal of Food Engineering*, 268, 109740.

- Sun, Q., Li, J., Sun, Y., Chen, Q., Zhang, L., Le, T. (2020). The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. *Food Chemistry*, 317, 126-405.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68, 4, 1561-1568.
- USDA-NASS, Noncitrus Fruits and Nuts 2010 Preliminary Summary, January 21, 20.
- Visentini, F.F., Sponton, O.E., Perez, A.A., Santiago, L.G. (2017a). Formation and colloidal stability of ovalbumin-retinol nanocomplexes. *Food Hydrocolloids*, 67, 130-138.
- Wang, W., Nema, S., & Teagarden, D. (2010). Protein aggregation pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics*, 390, 89-99.
- Wang, L., Jin, J., Liu, X., Wang, Y., Liu, Y., Zhao, Y., & Xing, F. (2018). Effect of cinnamaldehyde on morphological alterations of *Aspergillus ochraceus* and expression of key genes involved in ochratoxin A biosynthesis. *Toxins*, 10,9, 340.
- Wu, X., Wu, H., Liu, M., Liu, Z., Xu, H., Lai, F. (2011). Analysis of binding interaction between (-)-epigallocatechin (EGC) and  $\beta$ -lactoglobulin by multi-spectroscopic method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82, 164- 168.
- Wu, Y., Luo, Y., Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *Food Science and Technology*, 48, 283-290.
- Xie, L., Wehling, R.L., Ciftci, O., Zhang, Y. (2017). Formation of complexes between tannic acid with bovine serum albumin, egg ovalbumin and bovine beta-lactoglobulin. *Food Research International*, 102, 195-202.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.-P., Pei, R.-S., Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 174-179.
- Zimet, P., Livney, Y.D. (2009). Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 23, 1120-1126.



**PID 8101**

**Denominación del Proyecto**

Conservación de alimentos orgánicos de alto contenido lipídico mediante tecnologías de biomateriales nano y microestructurados

**Director**

Adrian Alejandro Perez

**Codirectora**

Delia Elisa Locaso

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ciencias de la Alimentación

**Cátedra/s, área o disciplina científica**

Propiedades físicas de alimentos, Microbiología de alimentos, Conservación de alimentos.

**Instituciones intervinientes públicas o privadas. Convenios o acuerdos**

Propiedades físicas de alimentos, Microbiología de alimentos, Conservación de alimentos. Instituto de Tecnología de Alimentos FIQ-UNL

**Contacto**

[julieta.bof@uner.edu.ar](mailto:julieta.bof@uner.edu.ar)

**Integrantes del proyecto**

Docentes: Bof, Maria J.; Bordagaray, Valeria C.; Bordenave, Lauro R.; Gonzalez Alejandro, Maria E.; Bordenave, Lauro R.; Gonzalez Alejandro, Maria E.; Stechina, Nicolas; Suárez, Gustavo D., Lare, Maria V. Colaboradores Externos: Binetti, Ana G.; Deseta, Maria L.; Santiago, Liliana G.; Sponton, Osvaldo E.

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

9/12/2017 y 08/06/2021

Resolución de aprobación del Informe Final C.S 122/22 (27-05-2022)