

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“NANOPARTICULAS
BIOCOMPATIBLES DOPADAS CON
ANTIOXIDANTES: EFECTO SOBRE EL
PARDEAMIENTO DE ZUMOS DE
FRUTA”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR
LORENA ROJO PÉREZ**

JULIO, 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT.....	1
2. LISTA DE FIGURAS.....	2
3. LISTA DE TABLAS.....	5
4. ABREVIATURAS.....	6
5. INTRODUCCIÓN.....	7
5.1 Importancia de la nanotecnología en la industria alimentaria.....	7
5.2 Situación actual de la nanotecnología en la industria alimentaria.....	8
5.3 Objetivos.....	8
6. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES.....	10
6.1 Pardeamiento en zumos de fruta.....	10
6.2 Métodos empleados para el seguimiento del pardeamiento.....	13
6.2.1 Pardeamiento enzimático.....	13
6.2.2 Pardeamiento no enzimático.....	13
6.3 Antioxidantes alimentarios.....	18
6.3.1 Importancia de los antioxidantes	18
6.3.2 Quercetina.....	18
6.4 Nanopartículas como medios de encapsulación en alimentos.....	20
6.4.1 Encapsulación en alimentos.....	20
6.4.1.1 Quitosano.....	22
6.4.1.2 Proteínas de soja (SPI).....	23
6.4.2 Síntesis de nanopartículas a partir de reactivos de origen natural.....	25
6.4.2.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano.....	25
6.4.2.2 Síntesis de proteínas de soja (SPI).....	26
6.4.3 Métodos de caracterización de nanopartículas.....	28
6.4.3.1 TEM.....	28
6.4.3.2 FTIR.....	29
6.4.3.2 DSL.....	30
7. METODOLOGÍA.....	33
7.1 Reactivos, otros productos y disoluciones.....	33
7.2 Instrumentación analítica.....	33
7.3 Utillaje de laboratorio.....	34

7.4 Seguimiento del pardeamiento de los zumos.....	34
7.5 Síntesis de nanopartículas.....	36
7.5.1 Síntesis de nanopartículas de soja.....	36
7.5.2 Síntesis de nanopartículas de soja con quercetina.....	37
7.5.3 Síntesis de nanopartículas de quitosano.....	37
7.5.4 Síntesis de nanopartículas de quitosano con quercetina.....	38
7.6 Caracterización de las nanopartículas.....	39
7.6.1 Estudio morfológico.....	39
7.6.2 Estudio FTIR.....	39
7.6.3 Estudio espectrofotométrico ultravioleta-visible y de fluorescencia.....	39
7.6.4 Análisis de la eficiencia de encapsulación.....	39
8. RESULTADOS Y DISUSIÓN.....	41
8.1 Desarrollo de metodología para seguimiento de los zumos.....	41
8.1.1 Caracterización espectroscópica directa.....	41
8.1.2 Evolución de la capacidad antioxidante.....	46
8.1.2.1 Puesta a punto de la metodología empleada para la determinación de la capacidad antioxidante de los zumos.....	46
8.1.2.2 Evaluación del contenido de polifenoles en los distintos estadios del pardeamiento.....	47
8.2 Seguimiento de los procesos de pardeamiento en zumos.....	48
8.3 Síntesis y caracterización de las nanopartículas.....	51
8.3.1 Estudio de la eficiencia de encapsulación para las nanopartículas.....	56
8.4 Pardeamiento de los zumos con nanopartículas.....	58
9. CONCLUSIONES.....	61
10. BIBLIGRAFÍA.....	62
ANEXO I.....	68

1. RESUMEN

La investigación en el diseño y en la producción de nanopartículas como sistemas de liberación controlada en la industria alimentaria está ganando gran protagonismo en la actualidad. Se pueden emplear polímeros de grado alimenticio, como proteínas, para diseñar diversos sistemas capaces de encapsular, proteger y liberar de manera controlada compuestos con actividad funcional, como vitaminas o polifenoles, que de otra manera sería complicado incorporarlos a matrices alimentarias debido a su inestabilidad o incompatibilidad. En este trabajo se ha investigado la encapsulación de quercetina en nanopartículas de quitosano y de proteínas aisladas de soja con objetivo de ser incorporadas a zumos de fruta para minimizar el pardeamiento de dichos alimentos, debido a sus propiedades antioxidantes. Para ello, se ha realizado un seguimiento del pardeamiento de zumos de frutas, se han sintetizado y caracterizado las nanopartículas y por último se ha estudiado el efecto del antioxidante encapsulado en las nanopartículas en el pardeamiento de los zumos.

1. ABSTRACT

Research in the design and production of nanoparticles as controlled release systems in the food industry is gaining great prominence at present. Food-grade polymers, such as proteins, can be used to design various systems capable of encapsulating, protecting and releasing in a controlled manner compounds with functional activity, such as vitamins or polyphenols, that would otherwise be impossible to incorporate into food matrices due to their instability or incompatibility. In this work we have investigated the encapsulation of quercetin in nanoparticles of chitosan and isolated soy proteins in order to be incorporated into fruit juices to minimize the browning of these foods, due to their antioxidant properties. For this, the fruit juice has been monitored, the nanoparticles have been synthesized and characterized and finally the effect of the antioxidant encapsulated in the nanoparticles in the browning of the juices was investigated.

2. LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Esquema del pardeamiento enzimático</i>	10
<i>Figura 2: Esquema de las reacciones químicas que tienen lugar en las reacciones de Maillard</i>	12
<i>Figura 3: Esquema de los diferentes métodos químicos empleados en el seguimiento de las reacciones de Maillard</i>	14
<i>Figura 4: Neutralización de un radical libre por un antioxidante</i>	18
<i>Figura 5: Estructura molecular de la quercetina</i>	19
<i>Figura 6: Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación: a) reservorio, b) matriz inclusiva, c) mixto y d) aglomerados</i>	22
<i>Figura 7: Estructura molecular del quitosano</i>	23
<i>Figura 8: Nanomatriz pregelificada de alginato por reticulación ionotrópica con cloruro cálcico recubierta con quitosano</i>	26
<i>Figura 9: Estructura tridimensional de la proteína β-conglucina</i>	27
<i>Figura 10: Posible estructura de las nanopartículas de SPI</i>	27
<i>Figura 11: Esquema de un microscopio electrónico de transmisión</i>	29
<i>Figura 12: Esquema de un sistema FTIR-ATR</i>	30
<i>Figura 13: Componentes básicos del Zetasizer Nano</i>	32
<i>Figura 14 a) Soja texturizada y harina de soja triturada, b) Diálisis de las proteínas de soja y c) Proteínas aisladas de soja (SPI)</i>	36
<i>Figura 15: Nanopartículas de proteína aislada de soja sin encapsular (derecha) y nanopartículas de proteína aislada de soja encapsuladas con quercetina (izquierda)</i> ...37	
<i>Figura 16: Nanopartícula de quitosano encapsuladas con el antioxidante quercetina</i> ...38	
<i>Figura 17: Representación gráfica de los espectros de los zumos filtrados y centrifugados al 5% en disolución acuosa</i>	41
<i>Figura 18: Representación gráfica del espectro de fluorescencia del zumo de manzana al 0,5 % en disolución acuosa</i>	42

<i>Figura 19: Representación gráfica del espectro de fluorescencia del zumo de piña al 0,5% en disolución acuosa.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 20: Representación gráfica del espectro de fluorescencia del zumo de melocotón al 0,5% en disolución acuosa.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 21: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana durante 10 días.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 22: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña durante 10 días.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 23: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón durante 10 días.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 24: Recta del calibrado del ácido gálico del método Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 25: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana durante 9 días.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 26: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña durante 9 días.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 27: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón durante 9 días.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 28: Representación gráfica de las curvas de respuesta de absorción de los zumos.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 29: Espectros de absorbancia de quercetina.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 30: Espectro de fluorescencia del antioxidante quercetina.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 31: Imágenes de las NPQ.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 32: Imágenes de las NPQ-QUER.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 33: Imágenes de las NPS.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 34: Imágenes de las NPS-QUER.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 35: Espectro de IR de las nanopartículas de quitosano y del antioxidante.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 36: Espectro de IR de las nanopartículas de proteína de soja y del antioxidante.....</i>	<i>55</i>

<i>Figura 37: Recta de calibrado de la quercetina utilizada para calcular la eficiencia de encapsulación en las nanopartículas de proteína de soja.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 38: (a) Tubos durante el pardeamiento de los zumos. (b) Diferencia de color en el zumo de manzana entre el pardeamiento con NPQ-QUER y NPS-QUER y sin nanopartículas.....</i>	<i>58</i>

Anexo I

<i>Figura 1: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana durante 5 días.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 2: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana con NPQ-QUER durante 5 días.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 3: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana con NPS-QUER durante 5 días.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 4: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña durante 5 días....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 5: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña con NPQ-QUER durante 5 días.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 6: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña con NPS-QUER durante 5 días.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 7: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón durante 5 días.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 8: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón con NPQ-QUER durante 5 días.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 9: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón con NPS-QUER durante 5 días.....</i>	<i>72</i>

3. LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1: Características físico-químicas de la quercetina.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2: Composición de los aminoácidos en las SPI.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 3: Longitudes de onda de las bandas de fluorescencia de los zumos.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 4: Temperaturas del laboratorio durante el pardeamiento de 10 días de los zumos.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 5: Valores de pH durante el pardeamiento de 10 días de los zumos.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 6: Valores de la determinación de polifenoles durante el pardeamiento de 10 días.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 7: Temperaturas del laboratorio durante el pardeamiento de 9 días de los zumos.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 8: Valores de pH durante el pardeamiento de 9 días de los zumos.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 9: Valores de la determinación de polifenoles durante el pardeamiento de 9 días.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 10: Valores del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 11: Valores de encapsulación del antioxidante en las nanopartículas.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 12: Datos de la temperatura del laboratorio durante el pardeamiento con nanopartículas.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 13: Valores del pH de los zumos durante el pardeamiento con nanopartículas...59</i>	
<i>Tabla 14: Valores de la determinación de los compuestos fenólicos durante el pardeamiento con nanopartículas.....</i>	<i>60</i>

4. ABREVIATURAS

DSL: Dispersión dinámica de luz.

Ensayos P: Ensayos para conocer la evolución del pardeamiento de los zumos en condiciones normales.

Ensayos NPQ: Ensayos para conocer la evolución del pardeamiento de los zumos incorporando nanopartículas de quitosano.

Ensayos NPS: Ensayos para conocer la evolución del pardeamiento de los zumos incorporando nanopartículas de proteínas aisladas de soja.

FTIR: Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier.

NPQ: Nanopartículas de quitosano.

NPQ-QUER: Nanopartículas de quitosano en presencia de quercetina.

NPS: Nanopartículas de proteínas aisladas de soja.

NPS-QUER: Nanopartículas de proteínas aisladas de soja en presencia de quercetina.

QUER: Quercetina.

SPI: Proteínas aisladas de soja.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

5. INTRODUCCIÓN

5.1 Importancia de la nanotecnología en la industria alimentaria.

Actualmente no hay una única definición de nanotecnología; sin embargo, una de las más utilizadas es la que define la nanotecnología como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas que tengan al menos una dimensión de tamaño entre 1 y 100 nanómetros; lo que conlleva unas propiedades mecánicas, ópticas, químicas, magnéticas o electrónicas que difieren significativamente de las propiedades que poseen los mismos materiales a una mayor escala [1].

La nanotecnología engloba cinco tipos diferentes de nanomateriales según su estructura: nanocompuestos, nanopartículas, nanotubos, nanocapas, materiales nanoporosos, superficies nanomoduladas y nanoestructuras biológicas [2].

El uso de la nanotecnología está presente en un amplio abanico de industrias como la automoción, farmacéutica, cosmética, textil o alimentaria. La aparición de la nanotecnología en la industria alimentaria es más reciente que en la industria farmacéutica o en el ámbito médico, sin embargo, se ha encontrado una gran variedad de aplicaciones en el sector agroalimentario tales como: la liberación controlada de nutrientes, la bioseparación de proteínas, el rápido muestreo de contaminantes químicos o biológicos, el envasado inteligente o la nanoencapsulación de nutraceuticos. En la actualidad la nanotecnología ya está implantada en tres etapas claves de la fabricación de alimentos: la producción primaria, procesado y envasado. Sus principales aplicaciones se indican a continuación [3]:

- Mejora de la calidad de los alimentos: utilizando nanoemulsiones y nanorecubrimientos como medio de encapsulación de compuestos funcionales que aumenten la disponibilidad de los nutrientes o eviten olores y sabores desagradables.
- Nanoalimentos funcionales: nuevos alimentos con propiedades nutritivas funcionales.
- Nanosensores: dispositivos biodegradables para controlar la temperatura y la humedad de los alimentos. También pueden identificar la existencia de plagas y patógenos dependiendo de las condiciones en que se almacene los alimentos.

Algunos nanosensores pueden identificar si un alimento es fresco o no y lo indican con un cambio de color.

- Actividad antimicrobiana: un ejemplo son las nanopartículas de plata utilizadas como agentes antimicrobianos en envases.
- Envases inteligentes: aumentan el tiempo de conservación manteniendo la frescura y evitando la pérdida de nutrientes, detectan la contaminación y son biodegradables.
- Etiquetas inteligentes: indican la calidad del almacenamiento y la existencia de roturas o deterioros del envase.

5.2 Situación actual de la nanotecnología en la industria alimentaria.

En los últimos años la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha publicado una evaluación sobre los riesgos potenciales de la nanotecnología para la alimentación y los piensos, donde se observa que aún existen muchas incertidumbres sobre su seguridad. La EFSA ha publicado una guía para la evaluación de los riesgos derivados de la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología en los alimentos y piensos. El documento se centra en evaluar la seguridad del uso de la nanotecnología en la cadena alimentaria, además de recoger los avances más novedosos en el ámbito de la investigación. La guía no solo hace referencia al uso de la nanociencia en los alimentos y piensos, sino que incluye también a los nuevos alimentos, aditivos alimentarios, envases, pesticidas o suplementos alimentarios [4]. Aunque existe un vacío legal, la guía hace referencia a los riesgos asociados a los productos destinados al consumo humano o animal, a los productos agroquímicos y a los envases. Los riesgos de los nanomateriales vienen determinados por su composición química y sus propiedades físico-químicas (tamaño, forma, solubilidad, carga superficial, reactividad superficial) que influenciarán su absorción, metabolismo, distribución, etc.

5.3 Objetivos.

Debido a la gran importancia que ha adquirido la investigación en el diseño y en la producción de nanopartículas como sistemas de liberación controlada en la industria alimentaria y al hecho de que el uso de alimentos que incorporen antioxidantes está en auge, ya que las especies oxidantes o radicales libres son causantes de muchos tipos de

enfermedades, en este trabajo se ha propuesto la síntesis de dos tipos de nanopartículas: nanopartículas del polímero quitosano y nanopartículas de proteínas aisladas de soja como sistemas de encapsulación y liberación controlada de antioxidantes en zumos de fruta.

La adición de nanopartículas con el antioxidante encapsulado tiene dos objetivos: un primer objetivo es retrasar el pardeamiento que tiene lugar en los zumos de fruta mejorando las propiedades sensoriales y aumentando de esta manera la vida útil de los zumos y un segundo objetivo es que a través del consumo de alimentos se están ingiriendo antioxidantes que ayudan a prevenir muchos tipos de enfermedades.

La síntesis de las nanopartículas se pretende abordar empleando como materiales de partida el quitosano/alginato y proteínas aisladas de soja, mientras que como antioxidante modelo se emplearía la quercetina. Las nanopartículas de quitosano/alginato son un vehículo apropiado para la liberación de quercetina debido a su perfil de seguridad y a la mejora de la actividad protectora del antioxidante encapsulado, mientras que la soja es un ingrediente que se caracteriza por su biocompatibilidad y sus altos valores nutricionales por lo que es ampliamente utilizada en la industria alimentaria.

A continuación, se enumeran los objetivos específicos de este trabajo:

- Síntesis y caracterización de nanopartículas constituidas por el sistema quitosano/alginato/cloruro cálcico.
- Síntesis y caracterización de nanopartículas obtenidas a partir de proteínas aisladas de soja (SPI) empleando medios acuosos, disolventes polares y agentes reticulantes.
- Encapsulación de quercetina en los dos tipos de nanopartículas descritos anteriormente y evaluación de la eficiencia de encapsulación.
- Evaluación del pardeamiento de los zumos de frutas.
- Efecto de la liberación del antioxidante quercetina encapsulado en el pardeamiento de los zumos de frutas.

6. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

6.1 Pardeamiento en zumos de fruta.

Las propiedades sensoriales son uno de los parámetros de calidad fundamentales en los alimentos. Para los zumos de fruta el color es el primer atributo sensorial que percibe el consumidor, por lo que inicialmente es el mejor factor que define la calidad de los zumos. Por lo tanto, es de vital importancia el conocimiento de los componentes y procesos que influyen en el color de un alimento, y en los zumos de fruta el proceso fundamental por el que se modifica su color es el pardeamiento [5]. Este fenómeno es el punto de partida de un importante campo de investigación debido a sus implicaciones en la salud y nutrición y, al gran impacto económico que supone en la industria alimentaria. El pardeamiento puede ser de dos tipos: pardeamiento enzimático y pardeamiento no enzimático.

El pardeamiento enzimático se origina en una serie de reacciones químicas que afectan al sabor, al color y al valor nutricional de los alimentos. En estas reacciones químicas participan varios tipos de enzimas, como la polifenol oxidasa o la catecol oxidasa y se necesita la presencia de oxígeno. El pardeamiento enzimático se inicia con la oxidación de los fenoles catalizada por la enzima polifenol oxidasa para dar lugar a la formación de quinonas, en presencia de oxígeno. Las quinonas se caracterizan por su carácter electrófilo que le proporciona una elevada susceptibilidad para recibir un ataque nucleófilo. La polimerización de las quinonas da lugar a la formación de pigmentos de color marrón que son los causantes del característico color pardo que adquieren los alimentos al pardearse. El grado de pardeamiento enzimático depende principalmente de la cantidad de polifenol oxidasa presente en los alimentos, debido a esto la mayoría de los métodos que se investigan para inhibir dicho fenómeno se basan en dificultar o impedir la acción del enzima. En la *figura 1* se muestra un esquema del pardeamiento enzimático [6].



Figura 1: Esquema del pardeamiento enzimático.

Por otro lado, el pardeamiento no enzimático se produce debido a un conjunto de reacciones químicas complejas que dan lugar a la aparición de melanoidinas y de otros pigmentos pardos o negros que oscurecen el color de los alimentos además de producir modificaciones, favorables o no, en su sabor y olor. El pardeamiento no enzimático puede organizarse en tres procesos químicos basados en: reacciones de caramelización, reacciones debidas a la oxidación del ácido ascórbico y las reacciones de Maillard, siendo las dos últimas las que también pueden generar fenómenos de pardeamiento en zumos.

Las reacciones de Maillard tienen lugar entre los azúcares reductores y amino ácidos para formar glicosaminas (compuestos de Amadori) las cuales, dependiendo de las condiciones pueden reagruparse para dar mezclas de compuestos complejos que incluyen largas cadenas poliméricas, pigmentos y melanoidinas, principales responsables del pardeamiento no enzimático [7]. En la *figura 2* se puede observar un esquema que resume todas las complejas reacciones químicas que engloban las denominadas reacciones de Maillard. Este tipo de pardeamiento se ve favorecido por las altas temperaturas como las que se utilizan en la etapa de evaporación en la concentración de los zumos, cabe destacar que el grado de pardeamiento en esta etapa depende del contenido en sólidos solubles que tenga el zumo. Además de la temperatura, el pardeamiento no enzimático también depende de las condiciones en que se almacenen los zumos antes y después de la etapa de evaporación. Existen pocos métodos que consigan evitar que este proceso tenga lugar y entre ellos se encuentra la disminución del pH (un medio básico favorece las reacciones de Maillard porque el grupo amino se encuentra desprotonado aumentando así su reactividad), la adición de antioxidantes, el control de la temperatura y humedad y la eliminación de los sustratos que producen el pardeamiento [8].

El ácido ascórbico o vitamina C es una vitamina hidrosoluble que se encuentra en las verduras, frutas o hortalizas y cuya deficiencia produce la enfermedad conocida como escorbuto que puede causar desde debilidad en las encías hasta hemorragias diseminadas en todo el organismo. El ácido ascórbico es particularmente sensible a las reacciones de oxidación, destruyéndose con gran facilidad durante el procesado de alimentos en presencia de oxígeno. La oxidación es dependiente del pH, ya que la forma ionizada es más sensible que la forma no ionizada ($pK= 4,04$). Inicialmente en la oxidación el ácido ascórbico pasa de ascorbato a dehidroascorbato, en una reacción que es reversible, por lo que en principio el dehidroascorbato mantiene el valor de la vitamina C. Después el

dehidroascorbato se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2,3 dicetogulónico que puede degradarse en otros compuestos. Ni el ácido 2,3 dicetogulónico ni sus productos de degradación tienen actividad como vitamina C. La oxidación del ácido ascórbico se produce también como reacción lateral en las oxidaciones catalizadas por peroxidasas o polifenol oxidasas (pardeamiento enzimático) [9].

Para los zumos de frutas, los componentes que mayor importancia tienen en el pardeamiento son los ácidos orgánicos, los polifenoles, los azúcares reductores y los aminoácidos [10]. Como consecuencia del pardeamiento, se produce una serie de efectos desfavorables en los zumos: la disminución de la disponibilidad nutricional de los aminoácidos, la pérdida de vitamina C, la posible producción de un color y un aroma desagradable, todo lo cual conlleva a una pérdida del valor nutricional del alimento.

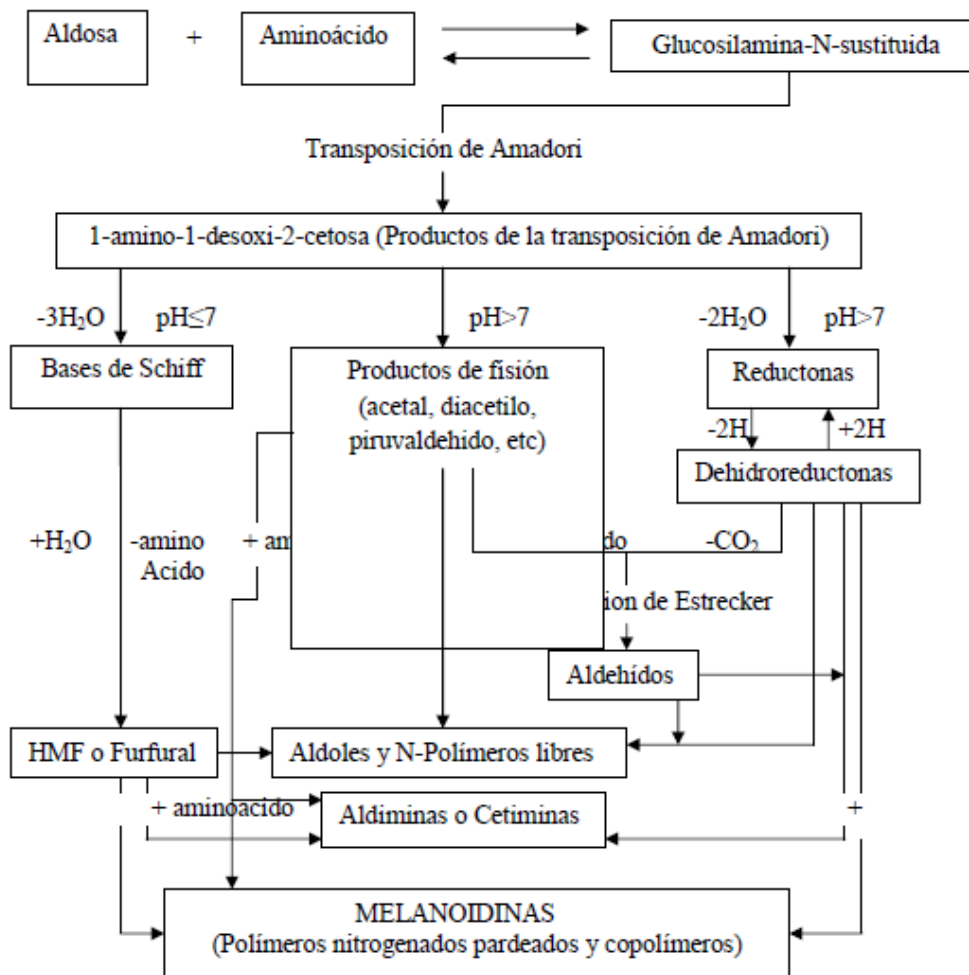


Figura 2: Esquema de las reacciones químicas que tienen lugar en las reacciones de Maillard.

6.2 Métodos empleados para el seguimiento del pardeamiento.

6.2.1 Pardeamiento enzimático.

Los métodos químicos que se utilizan en el control de la reacción del pardeamiento enzimático se basan principalmente en medir la concentración de los sustratos de la reacción, es decir, los polifenoles.

1. Determinación de fenoles.

En la actualidad, la cuantificación de los fenoles totales se lleva a cabo mediante dos métodos: el método Folin-Ciocalteu (el más empleado) y el método de Price y Butler. Ambos métodos se fundamentan en reacciones de oxidación-reducción. En el método Folin-Ciocalteu el ion fenolato es oxidado, en medio alcalino, mientras que el reactivo fosfotúngstico-molíbdeno es reducido, formando un complejo de color azul que se puede determinar espectrofotométricamente. En el método de Price y Butler el ion fenolato también es oxidado mientras que el ion férrico se reduce a ion ferroso que se detecta mediante la formación de un complejo azul con el reactivo ferricianuro de potasio. El complejo formado se conoce como azul de Prusia [11].

Otro método es la medición directa de la absorbancia debido a que los anillos bencénicos que componen los polifenoles presentan un máximo de absorbancia a 280 nm. La absorbancia a dicha longitud de onda puede considerarse como un índice válido del conjunto de los polifenoles totales [12].

6.2.2 Pardeamiento no enzimático.

Por otro lado, los métodos químicos que se utilizan en el control de reacciones de pardeamiento no enzimático se basan en medir la concentración de alguno de los productos intermedios o finales de las reacciones causantes de este tipo de proceso [13]. En la *figura 3* se muestra un esquema de los diferentes indicadores de pardeamiento de alimentos según la etapa de las reacciones de Maillard.

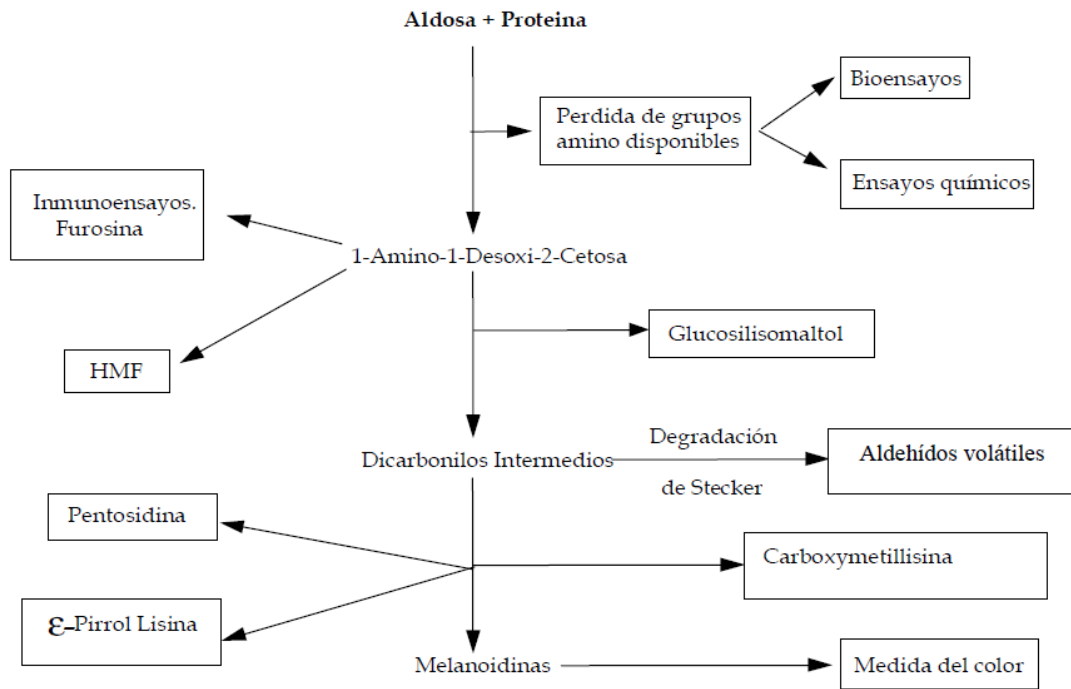


Figura 3: Esquema de los diferentes métodos químicos empleados en el seguimiento de las reacciones de Maillard.

1. Determinación de azúcares.

Los azúcares son sustrato de las reacciones de Maillard y la medida de su disminución es proporcional a la disminución del poder reductor. Sin embargo, en los alimentos sometidos a calentamientos drásticos se producen unas sustancias reductoras que son las responsables de 2/3 del poder reductor total, por lo tanto, la medida de la disminución del poder reductor basada en la disminución de los azúcares no es válida. Las técnicas que se usan para la determinación de azúcares son diferentes tipos de cromatografía como cromatografía gaseosa con columna capilar, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta resolución con detección mediante amperometría de pulsos o cromatografía líquida de alta resolución con detección mediante índice de refracción [14].

2. Determinación de aminoácidos.

Hay dos tipos de determinación de aminoácidos:

Determinación de aminoácidos totales.

Los aminoácidos se determinan con ácido clorhídrico concentrado (6N) a 110-130°C, después de la hidrólisis proteica y durante un período de 10 a 24 horas. Esta determinación solo es útil para alimentos no transformados debido a que en la etapa de hidrólisis se libera tanto la lisina disponible como la que se encuentra bloqueada para las reacciones de Maillard [15].

Determinación ``in vitro`` de aminoácidos disponibles

La lisina es el principal aminoácido y los métodos químicos se basan en estudiar la lisina disponible o reactiva. El método clásico que se usa para la determinación de lisina disponible en los alimentos es la colorimetría y para ello se utiliza el reactivo 2,4 dinitrofluorobenceno (FDNB) para hacer reaccionar el grupo amino y lo que se mide (435 nm) es el derivado formado (dinitrofenil lisina, DNP-lisina) tras hidrolizar la muestra con ácido clorhídrico [16].

3. Determinación de furosina.

La furosina ha sido uno de los primeros productos identificados de las reacciones de Maillard. Se han empleado distintos métodos que utilizan diferentes técnicas cromatográficas hasta que se puso a punto dos métodos que separan furosina utilizando fase reversa con par iónico y elución isocrática. Ambos métodos son sensibles, reproducibles y rápidos y se han utilizado para evaluar la modificación de lisina en numerosos alimentos [17].

4. Fluorescencia.

La fluorescencia es específica de las reacciones de Maillard y se favorece a altas temperaturas y medio alcalino. La aparición de compuestos fluorescentes se produce antes de la formación de pigmentos marrones [18].

5. Determinación de furfural.

El furfural es un compuesto furánico que se produce en las reacciones de degradación del ácido ascórbico, caramelización y reacciones de Maillard y se forma durante tratamientos térmicos, deshidratación o almacenamiento a temperaturas inadecuadas de alimentos. La

determinación de este compuesto se realiza por HPLC. El furfural no se detecta en los zumos frescos, pero este compuesto se incrementa con el calentamiento o almacenamiento a temperaturas elevadas por lo que es un buen indicador de la calidad de los zumos [19].

6. Absorción en el ultravioleta.

Las reacciones de Maillard y la caramelización producen moléculas que absorben entre 250 y 300 nm. Los aminoácidos y los azúcares producen una gran variedad de compuestos que absorben en el ultravioleta [20].

7. Acidez.

Las reacciones de Maillard producen acidificación que se debe a la pérdida de capacidad reguladora del grupo amino sobre el ácido carboxílico y de la producción de ácidos como láctico, fórmico, pirúvico y levulínico [21].

8. Determinación de lactulosa.

El tratamiento térmico en alimentos conduce a la isomerización de sus carbohidratos. En los alimentos que contengan leche los tratamientos de calor, como la esterilización, pueden derivar en la formación de lactulosa. Este indicador se suele utilizar para diferenciar entre lechas pasteurizadas, esterilizadas y con tratamiento UHT directo o indirecto [22].

9. Determinación de compuestos de Amadori.

En productos lácteos se evalúa el daño térmico mediante la medición de uno de compuestos de Amadori, la lactulosilisina y no a través de la furosina. Cabe destacar, que el compuesto de Amadori fructosil- γ -aminobutírico es indicador del pardeamiento en los zumos de naranja deshidratados [23].

10. Determinación de aldehído de Strecker.

La degradación de aminoácidos produce aldehídos específicos y se pueden medir para determinar la intensidad de la reacción [24].

11. Determinación de pirralina (ϵ -pirrol-lisina).

La formación de pirralina se produce en etapas avanzadas de las reacciones de Maillard. La intensidad de este compuesto aumenta ante tratamientos térmicos de larga duración

por lo que se ha propuesto como indicador en alimentos que son tratados a alta temperatura y en alimentos de larga conservación [25].

12. Determinación de carboximetilisina.

La carboximetilisina (CML) es un indicador de etapas avanzadas en las reacciones de Maillard. Se forma a partir de los compuestos de Amadori en los tratamientos térmicos más severos y se cuantifica en los alimentos con la técnica ELISA o con las técnicas cromatográficas: GC/MS, HPLC/FD o LC-MS/MS [26].

13. Color.

Los compuestos coloreados se clasifican en compuestos de bajo peso molecular de 2 a 4 anillos fusionados y dobles enlaces conjugados y en melanoidinas que tienen una masa molecular de varios daltons y presentan diferentes cromóforos. La cuantificación del color es un indicador de la severidad del tratamiento térmico de los alimentos. Para los compuestos de bajo peso molecular se utiliza la cromatografía en capa fina, cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta resolución mientras que para los compuestos de alto peso molecular se utiliza la cromatografía de intercambio iónico y la de exclusión molecular [27].

14. Determinación de 5-Hidroxiacetilfurfural (HMF).

Este indicador se utiliza para prevenir las reacciones de caramelización y se usa en alimentos como la miel o los zumos de frutas. Se puede realizar la medición de HMF a través de colorimetría, pero la técnica más exacta es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Actualmente se ha empezado a utilizar la electroforesis capilar en la determinación de estos compuestos [28].

15. Hidrólisis enzimática ``in vitro``.

La hidrólisis enzimática ``in vitro`` se usa para evaluar la disponibilidad de aminoácidos en proteínas dañadas por calor. Este método se basa en el hecho de que los aminoácidos bloqueados no son hidrolizables por las proteasas, por lo que se utilizan estas enzimas para medir los aminoácidos y péptidos y así indicar el grado de biodisponibilidad de las proteínas en alimentos sometidos a altas temperaturas [29].

6.3 Antioxidantes alimentarios.

6.3.1 Importancia de los antioxidantes.

La oxidación de los alimentos produce olores y sabores indeseables que disminuyen su vida útil y empeoran el valor nutricional de los alimentos [30]. La oxidación consiste en una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Esta reacción suele producir átomos con un electrón desapareado que se denominan radicales libres. Los radicales libres son muy reactivos porque tienden a alcanzar su estabilidad química captando electrones de otros átomos. Los radicales libres dan lugar a reacciones en cadena debido a que cuando un radical libre consigue captar un electrón de una molécula estable, dicha molécula se transforma en un radical libre porque pierde un electrón y así sucesivamente. La reacción que tiene lugar cuando un radical consigue un electrón es una reacción de reducción mientras que la reacción que ocurre cuando una molécula estable pierde un electrón es una reacción de oxidación. Se le denomina antioxidante a cualquier compuesto que en una concentración más baja que la de la sustancia oxidable es capaz de retrasar o inhibir la oxidación reaccionando con el radical libre (*Figura 4*). El antioxidante se oxida perdiendo un electrón y se transforma en un radical libre débil con escasos o nulos efectos tóxicos [31].

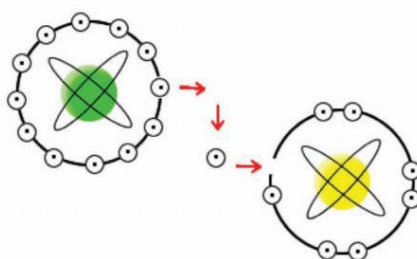


Figura 4: Neutralización de un radical libre por un antioxidante.

6.3.2 Quercetina.

La quercetina pertenece a una familia de compuestos fenólicos denominados flavonoides, siendo la quercetina el principal flavonoide presente en la dieta humana. La palabra flavonoide hace referencia a un grupo de pigmentos aromáticos heterocíclicos que contienen oxígeno y que se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, siendo los principales responsables de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Los flavonoides se dividen en subclases: flavonoles, flavonas, flavononas, flavonoles, antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonas, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y

auronas. A pesar de que los flavonoides no son considerados nutrientes, se ingieren diariamente en la dieta debido a que están presentes en alimentos como el vino tinto, té negro, café, cacao, frutas, vegetales, nueces, semillas o especias. La quercetina representa el 95% de la ingesta total de los flavonoides siendo el brócoli, la cebolla, el té y la manzana su fuente mayoritaria.

La estructura de un flavonoide está formada por dos anillos fenólicos ligados mediante un anillo pirano. La quercetina pertenece a la familia de las flavonas y su estructura molecular se muestra en la *figura 5* [32].

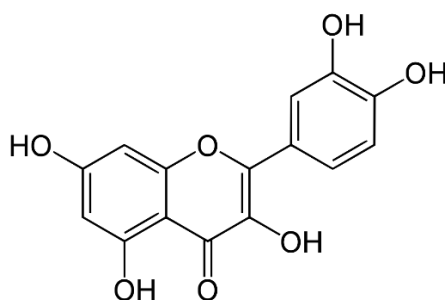


Figura 5: Estructura molecular de la quercetina.

Las principales características físico-químicas del antioxidante quercetina que pueden tener repercusión en la síntesis de las nanopartículas se presentan en la *Tabla 1* [33].

Tabla 1: Características físico-químicas de la quercetina:

	Quercetina
Fórmula química	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Punto de fusión	316,5 °C
Masa molecular (g/mol)	302,2
pka	8,25
Solubilidad acuosa	60 µg/mL (16°C)

En la actualidad, se han realizado numerosos estudios de los flavonoides para investigar sus múltiples efectos beneficiosos vinculados a su carácter antioxidante. Existen estudios que evidencian que las dietas ricas en flavonoides, como la quercetina, proporcionan propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas,

antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. Estas propiedades hacen que los flavonoides tengan efectos positivos en la prevención y en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, enfermedades cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas [32].

La actividad antioxidante de los flavonoides es resultado de la combinación de sus propiedades quelantes de catalizadores metálicos, de su capacidad de transferir electrones a los radicales libres y de la inhibición de las oxidasas, evitando de esta manera la formación de especies afines al oxígeno. Se conoce también su actividad inhibidora de enzimas involucrados de manera indirecta en los procesos oxidativos y su actividad estimuladora de enzimas con propiedades antioxidantes. Con respecto a la quercetina, es el flavonoide que mejor reúne los requisitos para ejercer una función antioxidante efectiva. Su actividad antioxidante es cinco veces mayor que la de la vitamina C y E y además posee una hidrosolubilidad parecida a la vitamina E [34].

La efectividad de un antioxidante en los alimentos depende de su reactividad y de sus propiedades físicas. La quercetina es estable en solución acuosa a pH 3, pero comienza a degradarse a medida que el pH aumenta por encima de 5, siendo inestable en los medios alcalinos. Los compuestos fenólicos pueden interactuar con las partes hidrofóbicas de las nanopartículas a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Suficiente carga superficial los mantiene encapsulados de manera estable en sistemas acuosos, mejorando su mala solubilidad en agua [35].

6.4 Nanopartículas como medios de encapsulación en alimentos.

6.4.1 Encapsulación en alimentos.

La encapsulación es una de las técnicas más usadas en el desarrollo de alimentos funcionales y nutraceúticos. La encapsulación se define como la tecnología mediante la cual se logra introducir compuestos activos dentro de una matriz creando un microambiente en la nanopartícula capaz de controlar las interacciones entre el interior y el exterior [36]. El incremento en la demanda de alimentos saludables ha provocado la investigación y desarrollo de nuevos alimentos. La gran problemática de este reto es asegurar que los ingredientes y los aditivos añadidos a estos alimentos permanezcan efectivos durante la elaboración y el almacenamiento de los productos [37]. Además, los alimentos pueden utilizarse como un medio de transporte eficaz para el suministro de

compuestos bioactivos y micronutrientes en niveles saludables. Dentro de los ingredientes funcionales de mayor importancia en la actualidad se encuentran los antioxidantes y por esta razón y porque el desequilibrio que se produce entre las especies oxidantes y la acción de los sistemas de defensa antioxidante en los seres vivos es una de las causas principales en la generación de enfermedades, el desarrollo de alimentos funcionales que incorporen antioxidantes es uno de los desafíos más ambiciosos en la industria alimentaria. Las ventajas de utilizar los polifenoles encapsulados en lugar de utilizar los compuestos libres son: se puede producir una mejora en la biodisponibilidad de los antioxidantes, disminuir su inestabilidad y su sabor desagradable, así como aumentar la vida útil de los alimentos [38].

Según los reactivos y el proceso de síntesis empleado se pueden obtener diferentes tipos de nanopartículas como medios de encapsulación. La *figura 6* muestra un esquema de los sistemas de encapsulación más comunes [39]. Los sistemas núcleo-capa externa (*Figura 6 a*) consisten en un interior que tiene el componente activo y un material recubriendo (encapsulante, barrera, cubierta o pared) que puede estar formado por una o por varias capas concéntricas. La velocidad de liberación del componente activo depende del grosor, el área y la permeabilidad del encapsulante. Los sistemas matriz inclusiva (*Figura 6 b*) consisten en una mezcla homogénea del componente activo y el material encapsulante. Parte de este compuesto activo se encuentra desprotegido en la superficie de la cápsula. La liberación en estos sistemas depende del material de la matriz, de la forma de la cápsula y de la cantidad de componente bioactivo. Los sistemas mixtos consisten en un sistema matriz inclusiva con un material encapsulante que los envuelve aumentando la protección del agente activo o retardando su liberación (*Figura 6 c*). Por último, los aglomerados ofrecen una amplia área superficial para contener compuestos activos, facilitar el manipuleo y mejorar su aptitud frente al almacenamiento (*Figura 6 d*) [40].

La variedad de compuestos empleados como material de encapsulación es grande, pero el poder emplearlos en alimentos limita significativamente su número en particular si se opta por materiales de origen natural.

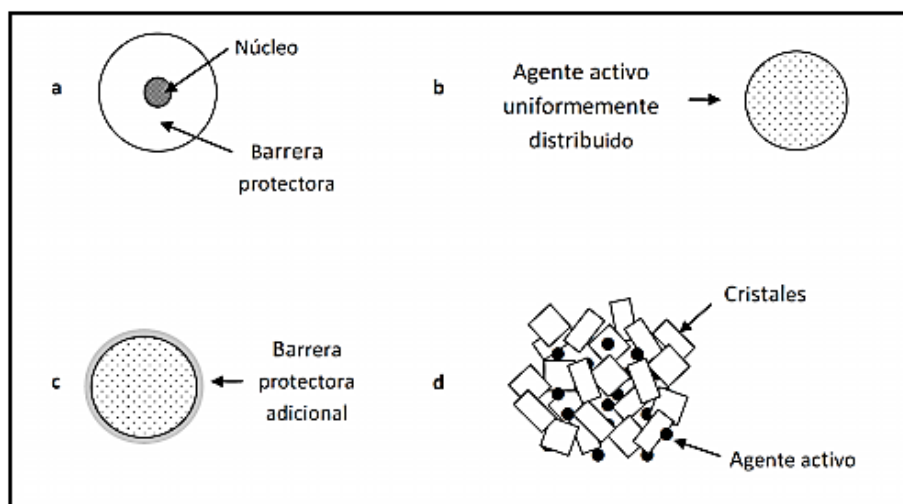


Figura 6: Representación esquemática de los diferentes sistemas de encapsulación: a) reservorio, b) matriz inclusiva, c) mixto y d) aglomerados.

6.4.1.1 Quitosano.

El quitosano es un polisacárido lineal que se encuentra de manera natural en la pared celular de algunos hongos, además comercialmente se obtiene a partir de la N-desacetilación termoalcalina de la quitina. La quitina es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa y se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos como componente principal y también en los insectos. La figura 7 muestra la estructura molecular del quitosano constituida por la unión de unidades de β -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuidas aleatoriamente. El quitosano tiene una gran cantidad de grupos amino primarios libres adquiriéndole una carga positiva y debido a la fácil disponibilidad de estos grupos aminos reacciona con muchas superficies con carga negativa y también sufre quelación con iones metálicos [41]. El quitosano es insoluble en agua pero se solubiliza en soluciones ácidas con un pH inferior a 6,0. Esto se debe a que el quitosano es una base fuerte que contiene grupos aminos primarios con un valor de pKa de 6,3. A pH bajos estas aminas se protonan y se cargan positivamente haciendo que el quitosano se solubilice en agua, mientras que a un pH superior a 6 las aminas se desprotonan y el quitosano pierde su carga transformándose en un polímero insoluble [42]. El tamaño de las partículas, la densidad, la viscosidad, el grado de desacetilización y el peso molecular son características importantes del quitosano que influyen en las aplicaciones del polisacárido.

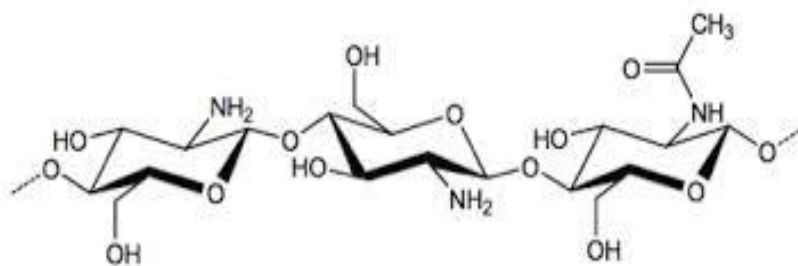


Figura 7: Estructura molecular del quitosano.

El quitosano posee propiedades como biodegradabilidad, baja toxicidad y buena biocompatibilidad que hacen que su uso sea apropiado en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. También tiene la capacidad de formar películas por lo que se ha propuesto como un biopolímero para la fabricación de lentes de contacto. Otro uso del quitosano es como portador de fármacos para después liberarlos de forma controlada. En el ámbito de la industria alimentaria el quitosano se usa como aditivo (espesante, gelificante y emulsificante) y como un recubrimiento comestible y protector de alimentos. También se utiliza durante los procesos de fabricación de alimentos, por ejemplo, en la recuperación de proteínas de los desechos de ovoproductos para reutilizarlas en la alimentación animal o como clarificador en la fabricación de bebidas (agua, vino, zumos). Otros usos que tiene la quitina y el quitosano son en la agricultura para controlar las plagas y enfermedades vegetales y en el tratamiento de aguas residuales como coagulante y floculante, además de utilizarlo para la captura de metales pesados y pesticidas [43].

6.4.1.2 Proteínas aisladas de soja (SPI).

La proteína de soja es una proteína vegetal que contiene una calidad proteica igual a la de la carne, la de la leche o la de los huevos y se obtiene a partir de la harina de soja texturizada. Su ingesta proporciona una buena fuente de fósforo, potasio, vitamina B y E, zinc y hierro. Además, tiene otros beneficios nutricionales como la reducción del colesterol, aumento de la densidad ósea, prevención de algunos tipos de cáncer como el de mama, próstata o tiroides y el alivio de los síntomas de la menopausia. Sin embargo, su fuerte sabor limita sus aplicaciones en el uso de la industria alimentaria. Una excelente alternativa es el uso de las proteínas aisladas de soja (SPI) que poseen más del 90% de proteínas en peso seco (en la síntesis de las SPI se pierden los componentes no proteicos presentes en la harina de soja, principalmente carbohidratos y grasas) y su sabor es suave.

Si se compara la composición de las SPI con las proteínas del huevo, de la leche, de la carne o del trigo contiene mayor proporción de aminoácidos anabólicos como la arginina o la glutamina. La soja es la única leguminosa que tiene todos los aminoácidos esenciales en la proporción correcta, debido a esto la proteína de soja es una proteína completa y de alta calidad. En la *tabla 2* se muestra la composición de los 18 aminoácidos que se encuentran en las SPI. Estructuralmente las SPI son una mezcla de proteínas globulares y en agua presenta las proteínas agregadas en forma de esferas [44]. Las propiedades funcionales de las SPI son determinadas por su estructura química y sus interacciones con otros compuestos. Estas propiedades están limitadas por su baja solubilidad, especialmente si el pH es cercano al punto isoeléctrico de la proteína 4,5 [45]. Se han realizado numerosos estudios sobre las SPI debido a su excelente biodegradabilidad, biocompatibilidad y sus propiedades como su gran capacidad de formar películas o geles. Estas propiedades suponen una alternativa nutricional, funcional y económica en sustitución a otro tipo de proteínas más convencionales que se utilizan en alimentos como bebidas, diferentes productos de carne o de pescado o en el proceso de la panificación de panes [44].

Tabla 2: Composición de los aminoácidos en las SPI.

Aminoácidos	Composición (g/16g de nitrógeno)	Aminoácidos	Composición (g/16g de nitrógeno)
<i>Metionina</i>	1,26	<i>Valina</i>	4,80
<i>Triptofano</i>	1,28	<i>Fenilalanina</i>	4,94
<i>Cisteína</i>	1,33	<i>Serina</i>	5,12
<i>Histidina</i>	2,53	<i>Prolina</i>	5,49
<i>Tirosina</i>	3,14	<i>Lisina</i>	6,38
<i>Treonina</i>	3,86	<i>Arginina</i>	7,23
<i>Glicina</i>	4,18	<i>Leucina</i>	7,78
<i>Alanina</i>	4,26	<i>Ácido Aspártico</i>	11,70
<i>Isoleucina</i>	4,54	<i>Ácido Glutámico</i>	18,70

6.4.2 Síntesis de nanopartículas a partir de reactivos de origen natural.

6.4.2.1 Síntesis de nanopartículas de quitosano.

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido a sus propiedades químicas, físicas y funcionales. Cabe destacar la capacidad de algunos de estos biopolímeros, como el quitosano, de formar hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas que los hacen atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de salud. Las nanopartículas de quitosano se forman como resultado de una suma de procesos de auto asociación o entrecruzamiento que dan lugar al ordenamiento de los polímeros en estructuras nanoscópicas, ya sea por interacciones inter o intramolecular de tipo covalente o no covalente. En la actualidad se ha desarrollado una nueva generación de nanopartículas que incorporan además del quitosano otros polisacáridos que mejoran sus propiedades, uno de los más utilizados es el alginato [46]. El alginato se obtiene principalmente a partir de algas marinas marrones y ha tenido un gran interés en el campo biomédico a lo largo de los últimos años. Químicamente es un polisacárido aniónico que consiste en copolímeros lineales de residuos de α -Lguluronaten y β -D-manuronato. Los alginatos son hemocompatibles, no se ha encontrado que se acumulen en ninguno de los órganos principales y muestran evidencia de degradación *in vivo*. Cabe destacar, la capacidad de los alginatos de gelificar en presencia de cationes bivalentes específicos (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) como consecuencia de la interacción cooperativa de 6 a 10 residuos de α -Lguluronaten, en virtud de la cual dos grupos carboxilato forman un complejo de coordinación con el catión [47]. En este estudio se sintetizan nanopartículas de quitosano y alginato (*figura 8*) en un proceso que consiste en dos etapas: en la primera etapa el alginato se pregelifica en presencia de cloruro cálcico bajo sonificación para obtener un nanogel y en la segunda etapa el quitosano recubre a dicho nanogel.

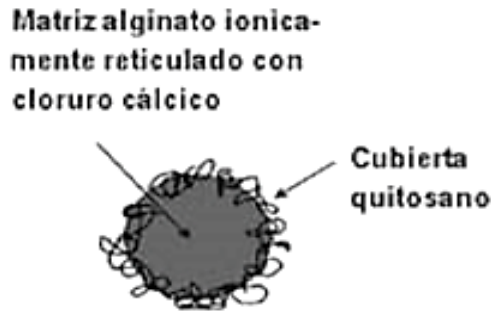


Figura 8: Nanomatriz pregelificada de alginato por reticulación ionotrópica con cloruro cálcico recubierta con quitosano.

6.4.2.2 Síntesis de nanopartículas de proteínas de soja (SPI).

Las nanopartículas de proteína suponen una alternativa adecuada para múltiples aplicaciones industriales ya que son biodegradables y su proceso de producción casi siempre es escalable. Las proteínas poseen propiedades interesantes para la formación de nanopartículas como su naturaleza anfipática que le permite interactuar tanto con el compuesto que se quiere encapsular como con el disolvente. Una de las proteínas utilizadas para la formación de nanopartículas es la proteína de soja enriquecida conocida también como proteína aislada de soja (SPI). La SPI posee altos valores nutricionales que la harían un excelente ingrediente alimentario. La SPI supone un buen método para incorporar fármacos o compuestos con interesantes aplicaciones en alimentos debido a la composición equilibrada de sus aminoácidos (no polares, polares y cargados). Los compuestos principales de SPI son la glicina y la proteína β -conglucina. La β -conglucina está presente en forma de polímero de 180 kDa y se compone de tres subunidades: α' (57-72 kDa), α (57-68 kDa) y β (45-52 kDa) estabilizadas por enlaces no covalentes (*Figura 9*).

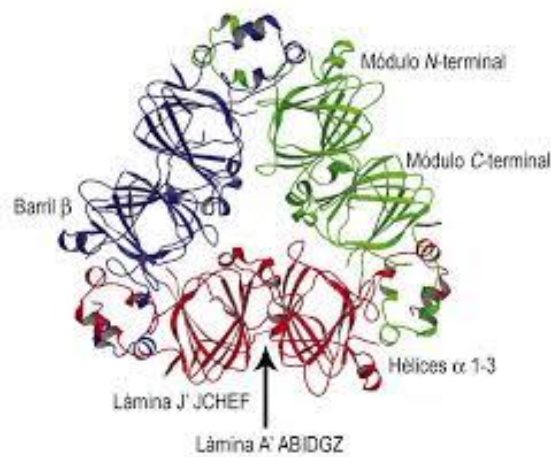


Figura 9: Estructura tridimensional de la proteína β -conglucina.

La glicina está presente en forma de hexámero con una masa molecular de 320-380 kDa y está constituida por subunidades formadas de un polipéptido ácido y uno básico unidos por un puente disulfuro. En presencia de agua estos componentes están principalmente en forma de moléculas globulares cuya cubierta tiene un carácter hidrofílico mientras que su núcleo es hidrofóbico. La adición de un agente de entrecruzamiento permite que las moléculas de SPI se agreguen para formar estructuras diferentes: microesferas, hidrogeles o mezclas de polímeros. En la *figura 10* se muestra una posible estructura de las nanopartículas de SPI [48].

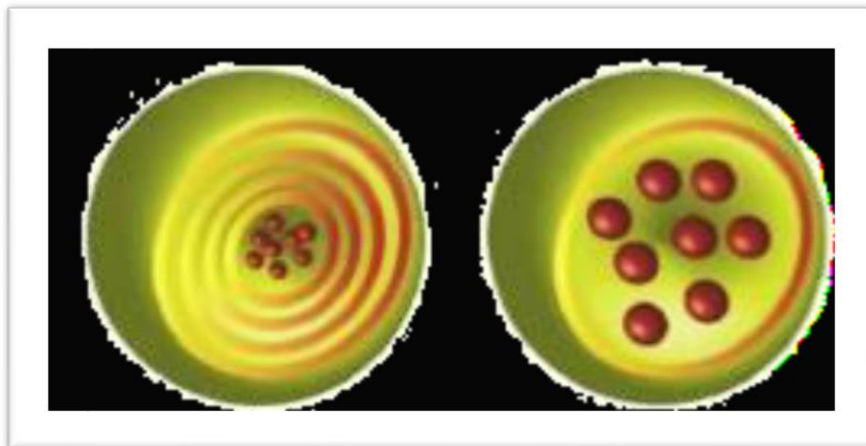


Figura 10: Posible estructura de las nanopartículas de SPI.

6.4.3 Métodos de caracterización de nanopartículas.

Las técnicas que más se utilizan para la caracterización de las nanopartículas son la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y la dispersión dinámica de luz (DLS). A continuación, se describe brevemente cada una de ellas:

6.4.3.1 TEM (Microscopía electrónica de transmisión).

La TEM es una técnica que se utiliza para obtener imágenes de muestras tanto cristalinas como amorfas, estas imágenes ofrecen información sobre su morfología. El equipo para TEM es un instrumento que utiliza los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerados colisiona con una muestra. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes iónicas para formar una imagen que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La imagen que se obtiene tiene distintas intensidades de grises según el grado de dispersión de los electrones incidentes. En la *figura 11* se representa un esquema de un microscopio de transmisión electrónica [49].

Las partes fundamentales de un microscopio electrónico de transmisión son:

- Cañón de electrones: emite los electrones que chocan o atraviesan la muestra, creando una imagen aumentada.
- Lentes magnéticas: crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones.
- Sistema de vacío: es una parte fundamental del equipo ya que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire.
- Placa fotográfica o pantalla fluorescente: permite registrar la imagen aumentada.
- Sistema de registro: suele ser un ordenador y permite visualizar la imagen que produce los electrones.

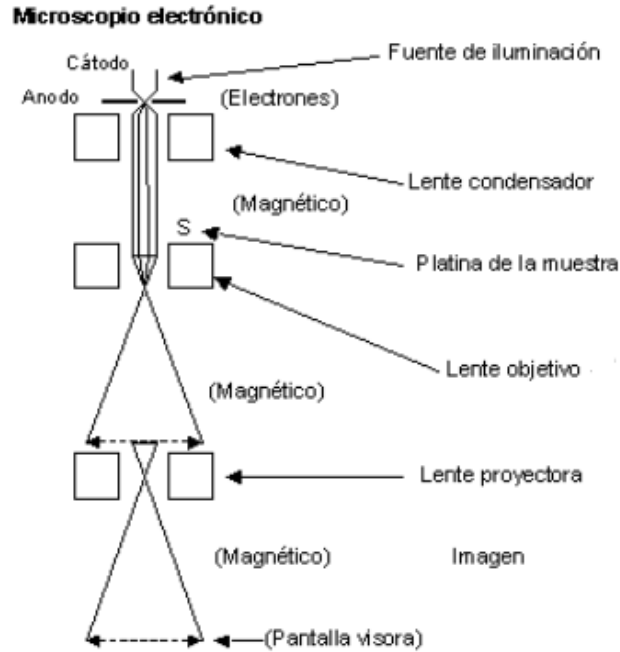


Figura 11: Esquema de un microscopio electrónico de transmisión.

6.4.3.2 FTIR (Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier).

Esta técnica es una herramienta muy utilizada en la determinación de estructuras moleculares y en la identificación de grupos funcionales debido a la capacidad de medición de las vibraciones características de los grupos de átomos. FTIR se fundamenta en el principio de la espectroscopia molecular que afirma que las moléculas absorben energía de la luz en longitudes de onda específicas (frecuencias de resonancia o vibración). Existen dos tipos básicos de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son movimientos a lo largo de los ejes que sirven de enlace entre dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión se deben a movimientos en los ángulos que forman los enlaces. Dentro de la categoría vibraciones de flexión hay muchos tipos de movimientos diferentes alrededor de un ángulo y cada uno de ellos se caracteriza por una frecuencia diferente, debido a esto se puede afirmar que casi todas las moléculas presentan un espectro IR característico.

En este caso se ha utilizado la técnica FTIR unida a un dispositivo ATR (Attenuated Total Reflection) capaz de medir 16 espectros por segundo. El dispositivo ATR es un accesorio de la técnica FTIR diseñado para los análisis espectroscópicos de muestras en el infrarrojo

medio y lejano. Este dispositivo contiene un cristal ATR de diamante, ideal para analizar materiales sólidos duros sin riesgos de roturas. Debido a la gran resistencia química asociada al diamante el ATR se puede utilizar con una amplia variedad de muestras y además consigue un buen contacto con la muestra por lo que se necesita una cantidad mínima. La muestra se deposita en un cristal especial que es iluminado por el haz de luz infrarroja procedente del interferómetro de Michelson y a través de la transformada de Fourier que analiza y transforma la intensidad de la luz transmitida a través del cristal hacia la muestra, se obtiene el espectro IR. En la *figura 12* se puede observar un esquema básico de un sistema FTIR-ATR [50].

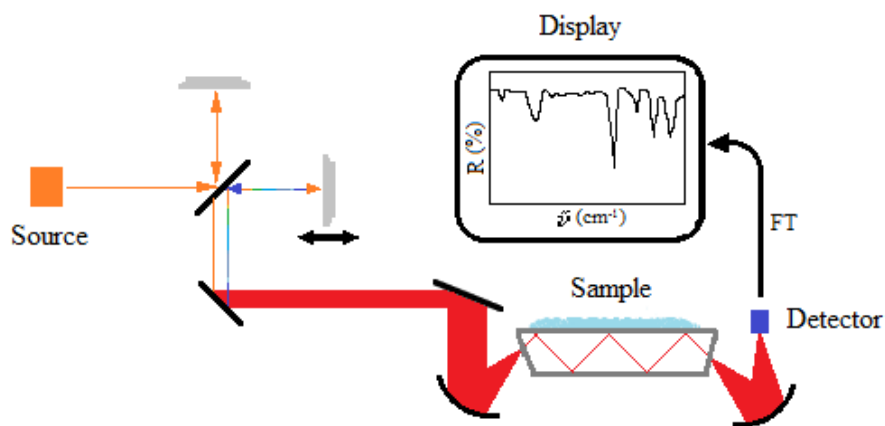


Figura 12: Esquema de un sistema FTIR-ATR.

6.4.3.3 DLS (Dispersión dinámica de luz).

La técnica de dispersión dinámica de luz mide el movimiento browniano de las nanopartículas y lo relaciona con su tamaño nanométrico. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se encuentran en un medio líquido o gaseoso, como consecuencia de los choques entre las moléculas y el fluido. La velocidad de dicho movimiento depende de la temperatura, de la viscosidad del medio y del tamaño de las partículas. Las partículas en disolución se desplazan y al hacer incidir un haz de luz sobre estas partículas es dispersado y su intensidad varía con el tiempo. En DLS se mide las fluctuaciones de intensidad a lo largo del tiempo, para determinar el coeficiente de difusión translacional (D_t), y posteriormente el diámetro hidrodinámico (D_H) utilizando la ecuación de Stokes-Einstein [51]:

$$D_H = kT / 3\pi\eta D_t$$

en la que k = constante Boltzmann, T = temperatura, η = viscosidad.

Las medidas de DSL también se utilizan para determinar el potencial zeta que es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas que aporta información sobre las causas de la dispersión, agregación o floculación del material en estudio. Dicha medición se basa en el principio de que el comportamiento de los coloides está determinado por las cargas eléctricas superficiales (mayoritariamente negativas). Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si la carga es suficientemente grande los coloides se mantienen discretos, dispersos y en suspensión. Si las cargas son pequeñas entonces los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión. El potencial zeta se midió usando una técnica de dispersión de luz llamada Electroforesis Doppler con Láser. Esta técnica mide el movimiento de las partículas cargadas bajo un campo eléctrico que utiliza el efecto Doppler. En el caso del equipo Zetasizer Nano un rayo procedente del láser debe pasar a través de una partícula en dispersión (haz difractado) mientras que otro rayo (haz de referencia), que se crea dividiendo el haz del láser, se conduce por fuera de la célula de capilar donde está introducida la muestra. En la célula de medida se aplica un campo eléctrico alterno y las partículas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. El haz de rayo láser incide sobre las partículas en movimiento provocando un cambio de frecuencia (efecto Doppler). Con este sistema se determina la movilidad de las partículas haciendo una comparación de fase entre la señal detectada (luz dispersada por la partícula) y la señal de referencia; lo importante es que los dos haces se deben comparar en un punto después de que el haz difractado haya pasado a través de la muestra (*Figura 13*).

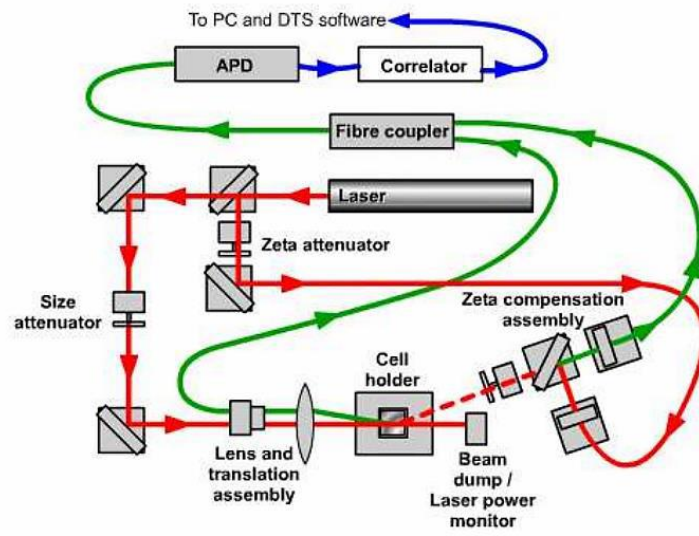


Figura 13: Componentes básicos del Zetasier Nano.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivos, otros productos y disoluciones.

- Agua destilada
- Etanol absoluto, VWR Chemicals
- Quercetina, Cayman Chemical Company
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Merck
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich
- Carbonato de sodio, Merck
- Soja texturizada, Hacendado
- Ácido clorhídrico 37%, Merck
- Hidróxido de sodio 98%, Alfa Aesar
- Ácido acético 100%, VWR Chemicals
- Quitosano, Sigma-Aldrich
- Alginato de sodio, Acros Organic
- Cloruro de calcio anhidrido granular 93%, Sigma-Aldrich
- Disolución patrón de carbonato de sodio (0,71 M)
- Disolución patrón de ácido gálico ($2,93 \times 10^{-3}$ M)
- Disolución quercetina, ($1,65 \times 10^{-4}$ M)
- Zumo bio de manzana, Delizum
- Zumo bio de piña, Delizum
- Zumo bio de melocotón, Valmasera

7.2 Instrumentación analítica.

- Balanza Analítica Mettler AE 163
- pHmetro micropH 2002, CRISON

- Espectrofotómetro visible-Ultravioleta Agilent Technologies CARY 60
- Microscopio de transmisión electrónica Jeo1JEM 2100F
- Espectrofotómetro FTIR Varían 670 IR
- DLS Zetasier, Malvern
- Fluorímetro Varian Cary Eclipse

7.3 Utillaje de laboratorio.

- Placa calefactora Heidolph MR-HeiTec
- Baño de ultrasonidos Selecta Iltrasons MEDI-II
- Centrifuga GYROZEN 15Bdr
- Rotavapor Laborota 4000, Heidolph
- Celda de cuarzo para medidas espectrofotométricas y fluorimétricas
- Vortex Vx100 LabnetMixer

7.4 Seguimiento del pardeamiento de los zumos.

Para estudiar el pardeamiento de los zumos bio de manzana, piña y melocotón se hicieron dos tipos de experimentos: el primer experimento se realizó para conocer la evolución del pardeamiento de los zumos en condiciones normales (Ensayos P) y el segundo se llevó a cabo para evaluar el pardeamiento incorporando las nanopartículas de quitosano (Ensayos NPQ) y de proteína aislada de soja (Ensayos NPS) encapsuladas con la quercetina (QUER), para así poder estudiar el efecto y la liberación del antioxidante en las reacciones de pardeamiento de los tres zumos.

Ensayos P: se transfieren 20 ml de zumo, previamente centrifugado y filtrado y se disponen en tubos con tapa en un número equivalente al de medias que se van a realizar. Los tubos cerrados se dejan en el laboratorio a temperatura ambiente en un lugar donde no reciben luz solar directa hasta que se proceda a su medida.

Ensayos NPQ y NPS: se transfieren 5 ml del zumo, previamente centrifugado y filtrado y se disponen en tubos con tapa en un número equivalente al de medidas a realizar. A cada uno de ellos se adicionan la cantidad de nanopartículas para tener una concentración final del 5 % v/v en el caso de las nanopartículas de proteína de soja y del 5 % p/v para

las de quitosano. Simultáneamente se prepara una serie de tubos de control sin nanopartículas. Todos los tubos cerrados se dejan en laboratorio a temperatura ambiente si recibir luz solar directa hasta su medida.

En todos los ensayos se midió diariamente la temperatura ambiente con un termómetro situado al lado de los tubos. Además de la temperatura, se registró todos los días el pH de los zumos para así poder estudiar el efecto que tienen las reacciones de pardeamiento sobre la acidez de los zumos.

También se hizo un seguimiento espectrofotométrico durante todos los días del estudio para evaluar los posibles cambios de intensidad y de desplazamiento en las bandas de absorbancia de los zumos en la región ultravioleta-visible. Para ello, se tomó una alícuota de 500 μL de los tubos de los zumos y se diluyó en un matraz de 10 mL. Además, antes de iniciar los experimentos del pardeamiento se realizó una caracterización espectrofotométrica y luminiscente de los zumos de frutas. En este último caso se tomaron dos muestras de 500 y 250 μL de zumo, previamente filtrado y centrifugado, y se diluyeron, cada una de ellas, en un matraz de 10 mL.

Por último, se cuantificaron los polifenoles presentes en los zumos, evaluando el carácter antioxidante de las muestras a lo largo de los experimentos de pardeamiento. La determinación de los polifenoles se llevó a cabo siguiendo el método Folin-Ciocalteu descrito en la bibliografía [52], a excepción de algunas modificaciones en las concentraciones. La determinación de polifenoles con el método Folin-Ciocalteu utiliza el ácido gálico como material de referencia. Se realizó una recta de calibrado de dicho ácido con las siguientes concentraciones: 0, $8,62 \times 10^{-6}$, $2,55 \times 10^{-5}$, $5,17 \times 10^{-5}$ y $8,62 \times 10^{-5}$ M, a partir de una disolución madre de ácido gálico ($2,93 \times 10^{-3}$ M). Todas estas disoluciones eran 0,04 M en carbonato de sodio y 1,2% v/v del reactivo de Folin-Ciocalteu. La preparación de las muestras fue realizada de la misma manera, a excepción de que en lugar de añadir la disolución de ácido gálico, las muestras eran 6% v/v de zumo. Los patrones y las muestras se dejaron reaccionar al abrigo de la luz durante 1 hora antes de realizar la determinación espectrofotométrica.

7.5 Síntesis de nanopartículas.

7.5.1 Síntesis de nanopartículas de soja.

La síntesis de las nanopartículas de soja se realizó en dos etapas:

En la primera etapa se aíslan las proteínas de soja (SPI) a partir de una harina de soja y en la segunda etapa se sintetizan las nanopartículas con las proteínas aisladas. La síntesis de las SPI se prepara conforme al método de precipitación isoelectrica [53]. Para ello, se pesaron 50 g de soja texturizada y se trituraron utilizando un mortero para obtener la harina de soja (*Figura 14a*). A continuación, se suspendió la harina de soja en agua desionizada en proporción 1:15 (15 mL de agua por cada gramo de proteína), se ajustó el pH de la disolución hasta 8 con NaOH 1M para aumentar la solubilidad de las proteínas y se dejó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 10.000 g (RCF). El sobrenadante se acidificó con HCl 1M hasta obtener un pH de 4,5 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones descritas anteriormente. El precipitado obtenido se suspendió en agua desionizada y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 1M. Por último, la suspensión se dializó durante 24 horas (*Figura 14b*). Tras dializarse la muestra se llevó a liofilizar para obtener finalmente las proteínas aisladas de soja (*Figura 14c*).



Figura 14 a) Soja texturizada y harina de soja triturada, b) Diálisis de las proteínas de soja y c) Proteínas aisladas de soja (SPI).

En la segunda etapa, una vez sintetizadas las SPI, se procede a la síntesis de nanopartículas. A excepción de algunas modificaciones, el método que se siguió para la preparación de las nanopartículas se encuentra descrito en la bibliografía [54]. Para la síntesis de nanopartículas se pesaron 20 mg de SPI, se disolvieron en 4,5 mL de agua desionizada y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 0,5 mL de etanol, gota a gota, hasta alcanzar una concentración final de etanol

del 10% v/v y se agitó la disolución durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió 1,05 μL de glutaraldehído por cada mg de SPI como agente de entrecruzamiento. Después de 16 horas de reacción, la disolución se diluyó 3 veces con agua y etanol, manteniendo el mismo % de etanol que el descrito anteriormente. Finalmente, el etanol se eliminó en el rotavapor a 30°C y se reemplazó el volumen eliminado de etanol por agua desionizada. La muestra obtenida se centrifugó a 10.000g durante 15 minutos. El sobrenadante que se obtuvo al centrifugar contiene las nanopartículas de soja (*Figura 15*).



Figura 15: Nanopartículas de proteína aislada de soja sin encapsular (derecha) y nanopartículas de proteína aislada de soja encapsuladas con quercetina (izquierda).

7.5.2 Síntesis de nanopartículas de soja con quercetina.

El método que se utiliza para la síntesis de nanopartículas de soja con quercetina encapsulada es el mismo que para las nanopartículas de soja descrito en el apartado anterior. La única diferencia en la preparación es que en lugar de añadir 0,5 mL de etanol se añadieron 0,5 mL de una disolución de quercetina en etanol (205 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La disolución de quercetina se añadió, gota a gota, a la disolución de SPI hasta alcanzar un 10% en volumen. Todas las demás etapas de la síntesis de nanopartículas de soja con quercetina se realizaron de la misma manera que se describe en el apartado anterior.

7.5.3 Síntesis de nanopartículas de quitosano.

Las nanopartículas de quitosano se prepararon de acuerdo con el método de la gelificación electrostática de alginato de sodio y quitosano que se encuentra descrito en la bibliografía [54], a excepción de algunas modificaciones en las concentraciones. Para la síntesis de nanopartículas se prepararon tres disoluciones: una disolución de quitosano (0,05 mg/mL), otra de alginato de sodio (0,5 mg/mL) y una última de cloruro de calcio (0,55 mg/mL). Cabe destacar que la disolución de quitosano se debe acidificar con unas gotas

de ácido acético para que se pueda disolver. Se transfirieron a un balón de 25 mL 3,0 mL de la disolución de alginato de sodio y se llevaron al baño de ultrasonidos donde se le añadió, gota a gota, 2,5 mL de la disolución de cloruro cálcico, 2,5 mL de la disolución de quitosano y por último 2,5 mL de agua destilada manteniendo el baño a 25°C para favorecer la gelificación. A continuación, el balón se llevó a una placa agitadora y se dejó la mezcla agitando a 700 rpm durante 4 horas, a temperatura ambiente. Después de las 4 horas, la disolución se llevó a centrifugar a 5000 g durante 10 minutos. Se obtuvo un precipitado con forma gelatinosa donde se encuentran las nanopartículas.

7.5.4 Síntesis de nanopartículas de quitosano con quercetina.

El método que se utilizó para la síntesis de quercetina encapsulada en nanopartículas de quitosano es el mismo que para las nanopartículas de quitosano vacías. La única diferencia en la preparación es que en lugar de añadir 2 mL de agua destilada se añadieron 2 mL de una disolución de quercetina (50µg/mL). Para las disoluciones de quitosano, alginato de sodio y cloruro de calcio se mantuvieron las mismas concentraciones y se añadieron los mismos volúmenes a la disolución final. Sin embargo, se varió el orden en que se adicionaron los reactivos que en este caso fue: disolución de alginato de sodio, disolución de quercetina, después la de cloruro de calcio y por último la de quitosano, añadiendo todas las disoluciones gota a gota. Finalmente, el producto de reacción (*Figura 16*), se trató de la misma forma que se describe en el apartado anterior.



Figura 16: Nanopartícula de quitosano encapsuladas con el antioxidante quercetina.

7.6 Caracterización de las nanopartículas.

7.6.1 Estudio morfológico.

Las nanopartículas se caracterizaron morfológicamente por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello, se tomaron unos pocos μL de las disoluciones que contenían las nanopartículas y se colocaron sobre una rejilla de cobre recubierta por una película de carbono amorfo. También, se determinó el diámetro promedio y el potencial zeta de las nanopartículas por dispersión dinámica de luz (DSL). Para ello, se tomaron unos pocos μL de la disolución de las nanopartículas y se colocaron en las cubetas específicas del equipo para cada medida.

7.6.2 Estudio FTIR.

Se empleó la espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) para caracterizar las distintas muestras. Para ello, se cogió una porción de la muestra sólida (quercetina), que se depositó cubriendo el cristal del ATR y se realizó la medición; sin embargo, para realizar la medición de las muestras que contenían las nanopartículas en suspensión primero se depositó una gota de la misma sobre el cristal del ATR y se secó mediante la aplicación de una corriente de aire, obteniéndose el espectro de absorción en el intervalo de frecuencias de $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

7.6.3 Estudio espectrofotométrico ultravioleta-visible y de fluorescencia.

La espectrofotometría se utilizó para caracterizar al antioxidante quercetina y así poder conocer su espectro y sus bandas de absorción en ultravioleta-visible y fluorescencia. La quercetina no se disuelve en agua por lo que se preparó una disolución con un 90% de etanol y un 10% de agua. Para ello, se pesó 2 mg de quercetina y se llevaron a un matraz de 10 mL. Esta disolución es la que se ha utilizado para medir en ultravioleta-visible, sin embargo, para medir en fluorescencia esta disolución está demasiado concentrada y este porcentaje de etanol produce interferencias en el espectro del antioxidante. Debido a esto, se volvió a diluir la disolución de quercetina tomando 100 μL de la disolución anterior y llevándolos con etanol a un matraz de 10 mL (porcentaje final de etanol 20%).

7.6.4 Análisis de la eficiencia de encapsulación.

Para determinar la eficiencia de encapsulación de la quercetina en las nanopartículas se realizó una recta patrón de la quercetina con las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 30,

40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de una disolución de quercetina de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 20% v/v de etanol. La presencia de etanol en las disoluciones se debe a la falta de solubilidad de la quercetina en agua, es por ello que todas las disoluciones contienen un 20% de etanol. Para conocer la eficiencia de encapsulación se mide una alícuota del sobrenadante obtenido en la síntesis de nanopartículas, tras centrifugar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Desarrollo de metodología para seguimiento de los zumos.

Para realizar el seguimiento del proceso de pardeamiento de los zumos se abordó la problemática desde dos puntos de vista. En primer lugar, dado que el fenómeno de pardeamiento es una característica que desde el punto de vista organoléptica el consumidor lo aprecia por el cambio de color del producto, se decidió hacer el seguimiento estudiando la variación de los espectros de absorción UV-VIS.

En segundo lugar, como el pardeamiento global, tanto enzimático como no enzimático, está asociado a la presencia de polifenoles y/o antioxidantes tal como ha quedado reflejado en la introducción, se procedió al estudio de la evolución de la capacidad antioxidante del zumo que está directamente relacionada con su contenido.

8.1.1 Caracterización espectroscópica directa.

Para realizar el seguimiento del pardeamiento de los zumos primero se ha realizado una caracterización espectrofotométrica y luminiscente de los zumos de piña, melocotón y manzana. En las *figuras 17* se muestran los espectros de absorbancia en la región ultravioleta-visible de los zumos previamente filtrados y centrifugados.

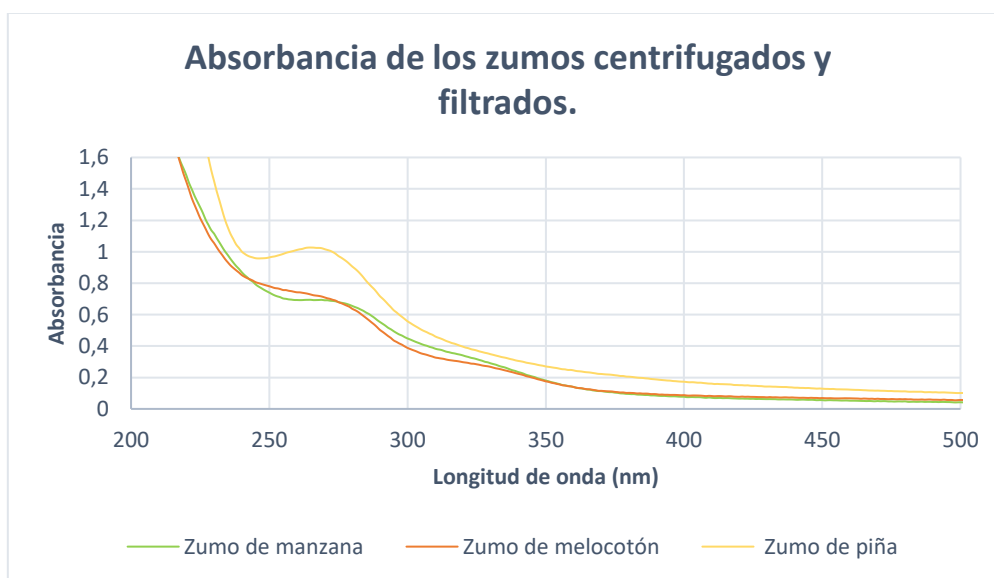


Figura 17: Representación gráfica de los espectros de los zumos filtrados y centrifugados al 5% en disolución acuosa.

En el gráfico se puede observar que los zumos absorben entre 265-280 nm en el ultravioleta-visible. Los fenoles absorben a una longitud de onda de 270 nm por lo que la absorbancia se puede deber a la presencia de dichos compuestos en los zumos.

En las *figuras 18, 19 y 20* se muestran los espectros de fluorescencia de los tres zumos.

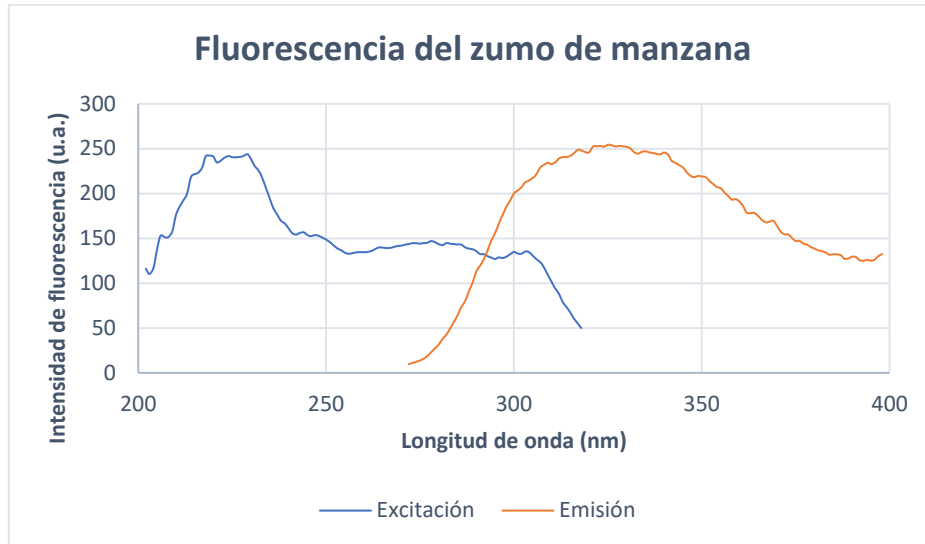


Figura 18: Representación gráfica del espectro de fluorescencia del zumo de manzana al 0,5 % en disolución acuosa.

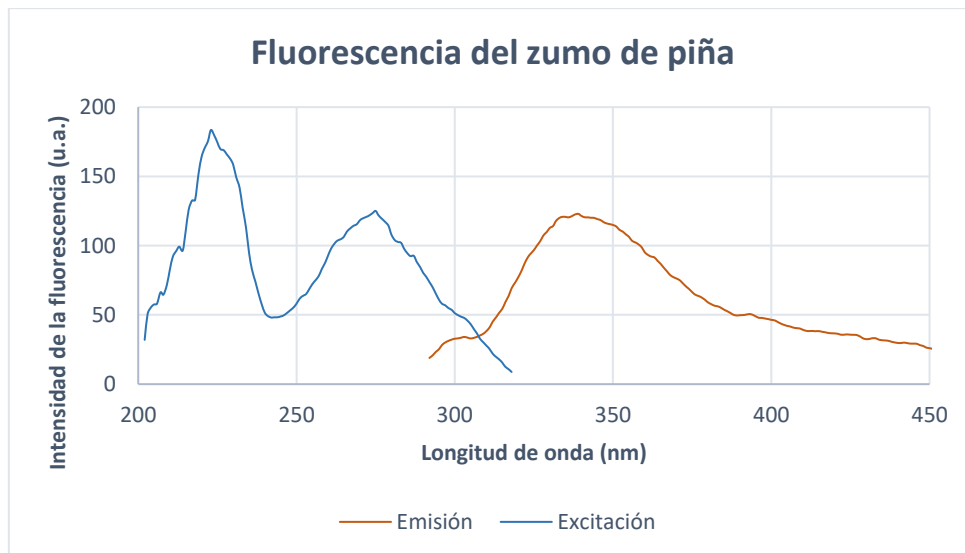


Figura 19: Representación gráfica del espectro de fluorescencia del zumo de piña al 0,5% en disolución acuosa.

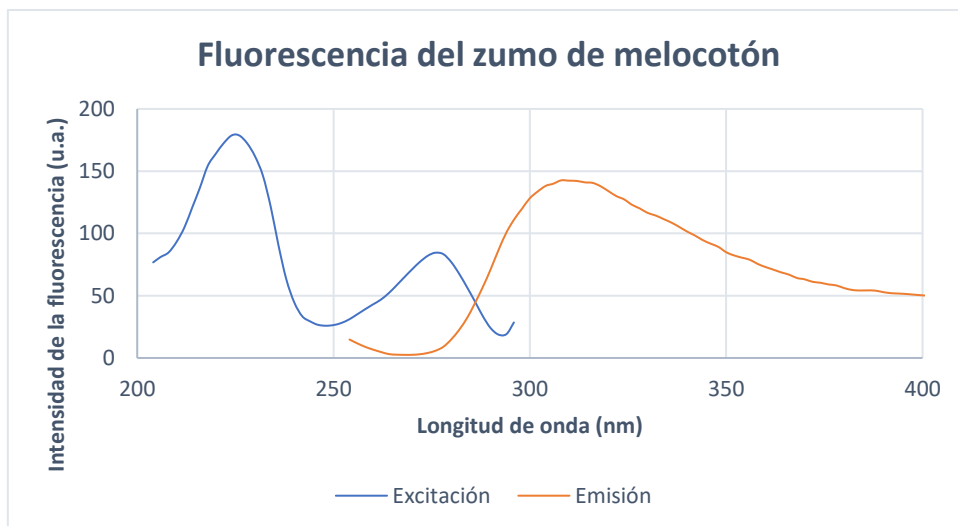


Figura 20: Representación gráfica del espectro de fluorescencia del zumo de melocotón al 0,5% en disolución acuosa.

Al observar los espectros de fluorescencia se aprecia la presencia de dos bandas de excitación para todos los zumos, bien definidas para los zumos de piña y melocotón mientras que para el zumo de manzana la banda situada más al rojo está poco definida. La longitud de onda correspondiente a los máximos de excitación de las bandas situadas en la zona del UV cercano coinciden en todos los zumos. Con respecto a la región de emisión en los tres zumos se observa una banda sobre los 300 nm, pero con un ligero desplazamiento del máximo hacia el rojo según sea zumo de manzana, melocotón o piña. En la *tabla 3* se resumen las longitudes de onda de las bandas de fluorescencia.

Tabla 3: Longitudes de onda de las bandas de fluorescencia de los zumos.

	Longitud de onda de las bandas de excitación (nm)	Longitud de onda de la banda de emisión (nm)
Zumo de manzana	$\lambda= 225$ y $\lambda=278$	$\lambda=310$
Zumo de piña	$\lambda= 225$ y $\lambda=275$	$\lambda=337$
Zumo de melocotón	$\lambda= 225$	$\lambda=325$

Dado que el fenómeno de pardeamiento es una característica que se puede apreciar a simple vista por el cambio de color del producto, se decidió hacer el seguimiento estudiando la variación de los espectros de absorción UV-VIS.

Se realizó un estudio preliminar del pardeamiento de los zumos analizando los espectros obtenidos durante un período de 10 días. Las medidas se realizaron cada dos días, teniendo en cuenta el día inicial en el cual se empezó el experimento. Las *figuras 21, 22* y *23* muestran los gráficos con los espectros del pardeamiento de los zumos de manzana, piña y melocotón respectivamente.

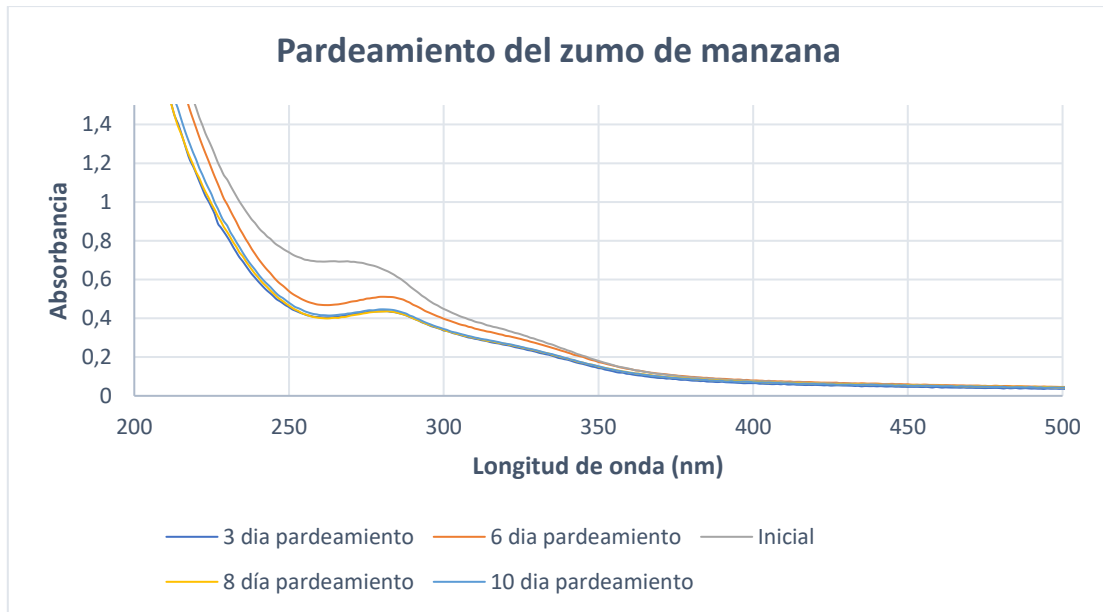


Figura 21: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana durante 10 días.

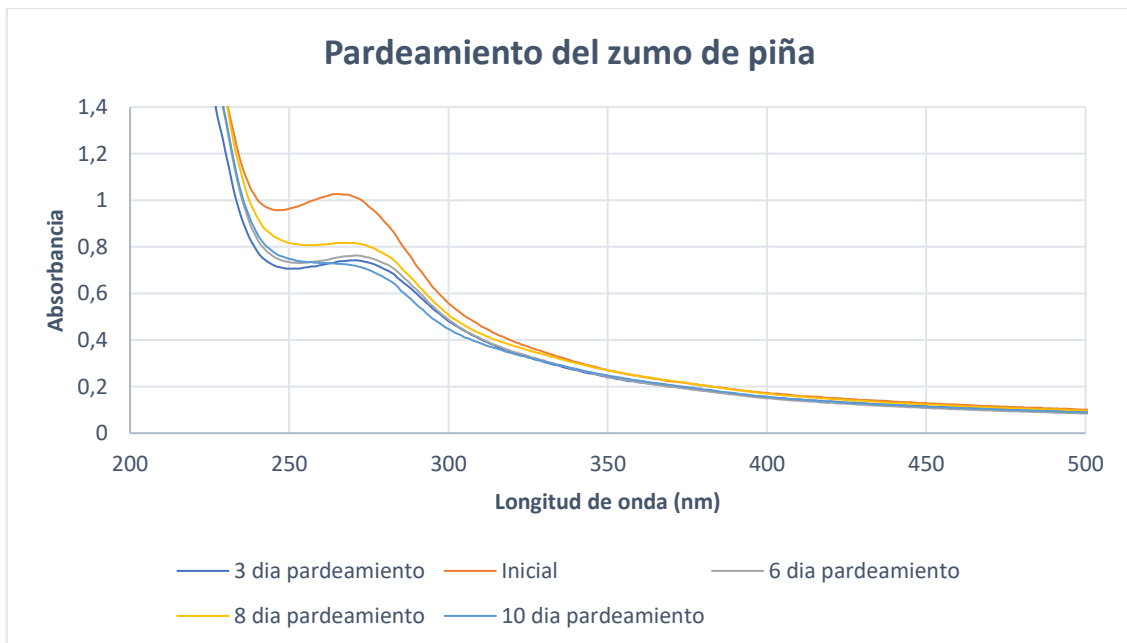


Figura 22: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña durante 10 días.

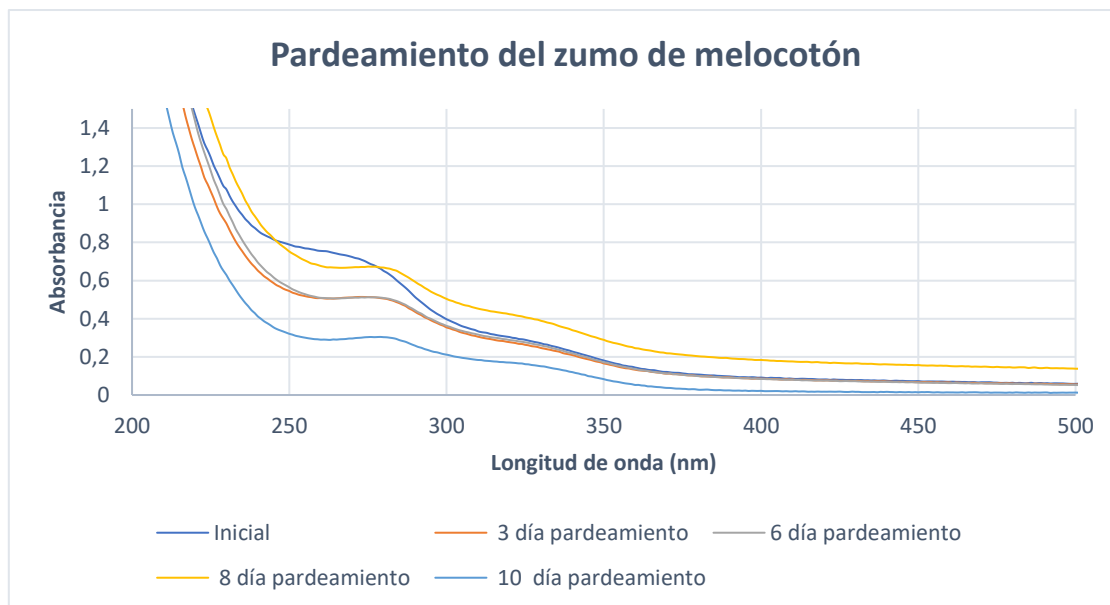


Figura 23: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón durante 10 días.

Como se puede observar en los gráficos las bandas de absorción cambian según avanza el ensayo, efecto que se produce fundamentalmente en los 3 primeros días de pardeamiento a partir de los cuales se mantienen prácticamente constante hasta el último día. Este fenómeno se observa para los tres zumos, siendo más notable en el zumo de melocotón. En líneas generales el valor de la absorbancia disminuye y se observa un desplazamiento del máximo de la banda hacia el rojo. La variabilidad de la medida en los últimos días puede deberse a la formación temporal de compuestos intermedios en las reacciones de pardeamiento.

En la *tabla 4* se muestran los datos de la temperatura del laboratorio durante el seguimiento del pardeamiento, lo que indica que el ensayo se realizó a una temperatura constante de $(22,2 \pm 0,8)$ °C y en la *tabla 5* se muestran los datos de pH de los distintos zumos.

Tabla 4: Temperaturas del laboratorio durante el pardeamiento de 10 días de los zumos.

	Inicial	3 día	6 día	8 día	10 día	Media \pm Desviación estándar
Temperatura (°C)	22	23	23	21	22	$22,2 \pm 0,8$

Tabla 5: Valores de pH durante el pardeamiento de 10 días de los zumos.

pH	Inicial	3 día	6 día	8 día	10 día	Media ± Desviación estándar
Zumo de manzana	4,02	4,01	3,99	3,96	3,98	3,99 ± 0,02
Zumo de piña	3,99	3,98	3,96	3,95	3,99	3,97 ± 0,02
Zumo de melocotón	3,85	3,83	3,89	3,73	3,70	3,80 ± 0,08

Como se puede observar en la *tabla 5* en líneas generales el pH se mantiene prácticamente constante para los zumos de manzana y piña mientras que para el zumo de melocotón parece apreciarse un ligero aumento de la acidez del producto a medida que incrementan los días de pardeamiento. Estas variaciones de pH se pueden deber a los compuestos intermediarios que se forman en las reacciones de pardeamiento.

8.1.2 Evolución de la capacidad antioxidante.

Como se ha descrito en la metodología se ha utilizado el método Folin-Ciocalteu para la determinación de la capacidad antioxidante total de los zumos. Dicho método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la cantidad de polifenoles presentes.

8.1.2.1 Puesta a punto de la metodología empleada para la determinación de la capacidad antioxidante de los zumos.

La evaluación de los polifenoles presentes en las muestras se cuantifica a partir de la capacidad antioxidante obtenida mediante el empleo del método Folin-Ciocalteu. Durante el ensayo pueden cuantificarse polifenoles, monofenoles y otros tipos de compuestos que presenten estructuras fenólicas y por lo tanto se evalúa el contenido fenólico total. Debido a que los diferentes compuestos reaccionan en diferentes grados, y que para la calibración es necesario el empleo de una disolución estándar, se utiliza el ácido gálico como material de referencia. El contenido en antioxidantes se expresa como un valor único

correspondiente a los miligramos de ácido gálico por litro de disolución (ppm), que posee una capacidad antioxidante equivalente al de la muestra y es un valor necesariamente arbitrario pero útil con fines comparativos.

Las características analíticas inferidas a partir de la recta de calibrado se presentan en la *figura 24*.

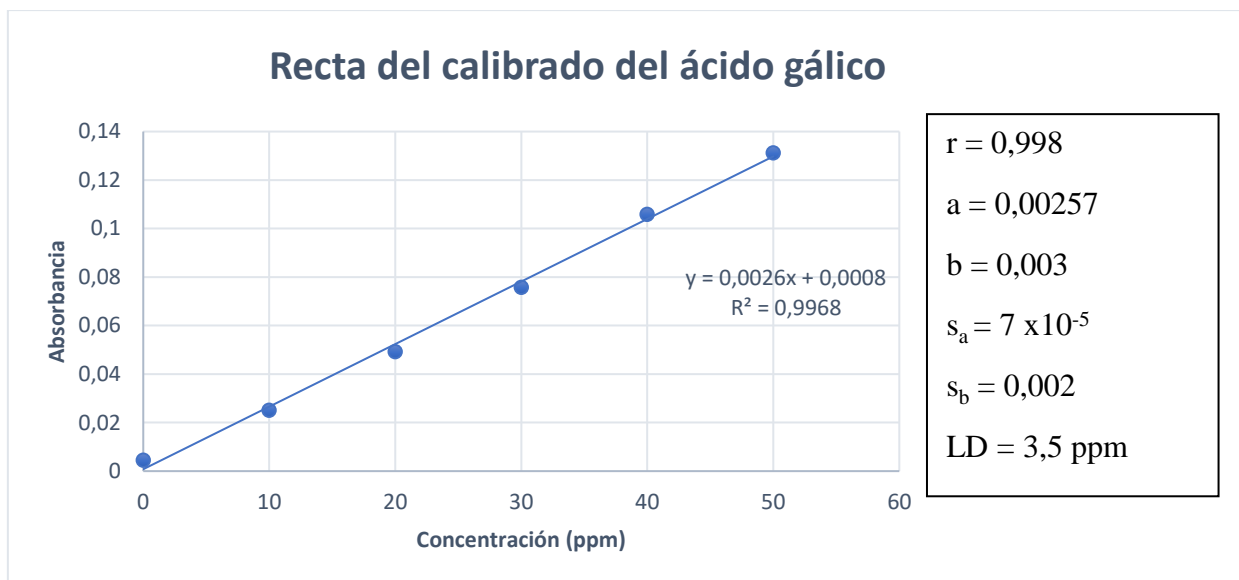


Figura 24: Recta del calibrado del ácido gálico del método Folin-Ciocalteu.

Por tanto, la robustez y sensibilidad demostrada por la metodología la hace adecuada para evaluar el contenido de polifenoles en los distintos estadios del pardeamiento.

8.1.2.2 Evaluación del contenido de polifenoles en los distintos estadios del pardeamiento.

En la *tabla 6* se muestran los datos obtenidos en los distintos estados del proceso de pardeamiento correspondiente al contenido en antioxidantes de los zumos expresados como ppm de ácido gálico.

Tabla 6: Valores de la determinación de polifenoles durante el pardeamiento de 10 días.

	Inicial (ppm)	3 día (ppm)	6 día (ppm)	8 día (ppm)	10 día (ppm)
Zumo de manzana	35	36	40	21	25
Zumo de piña	35	30	32	28	28
Zumo de melocotón	33	26	36	26	21

Observando los resultados se puede ver que a medida que el pardeamiento avanza la cantidad de polifenoles en zumos disminuye, hecho que concuerda con lo esperado porque los zumos al pardearse se oxidan.

8.2 Seguimiento de los procesos de pardeamiento en zumos.

De los estudios preliminares llevados a cabo para un periodo de 10 días, se obtiene que los principales cambios en los zumos se producen en los primeros días y por tanto se decide realizar diariamente el seguimiento del pardeamiento de los zumos. En las *figuras* 25, 26 y 27 se muestran los espectros de un segundo ensayo de pardeamiento para el zumo de manzana, piña y melocotón respectivamente.

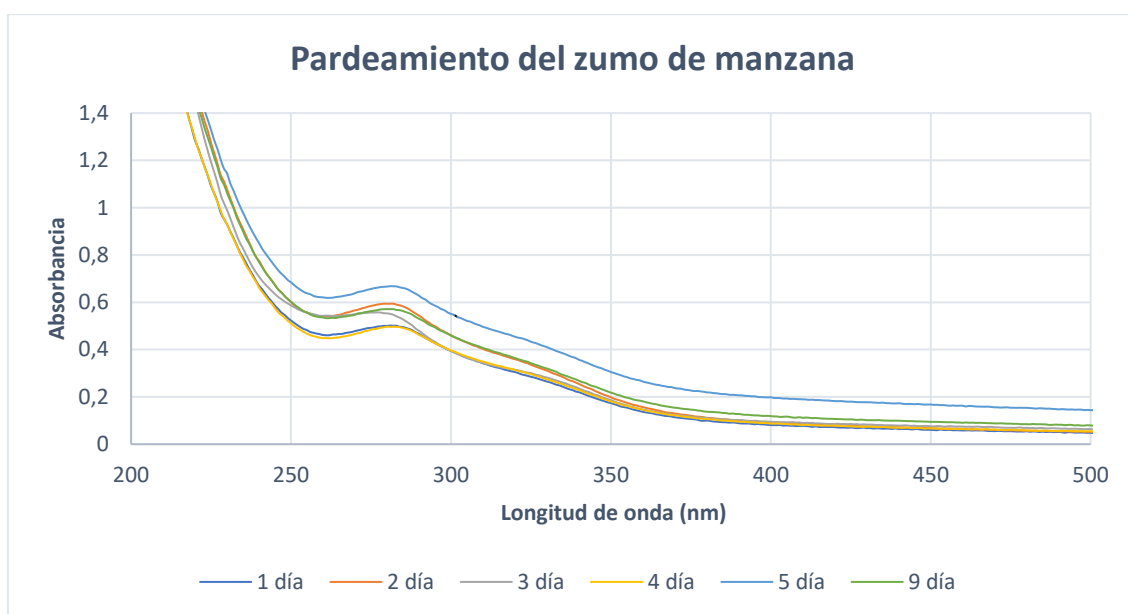


Figura 25: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana durante 9 días.

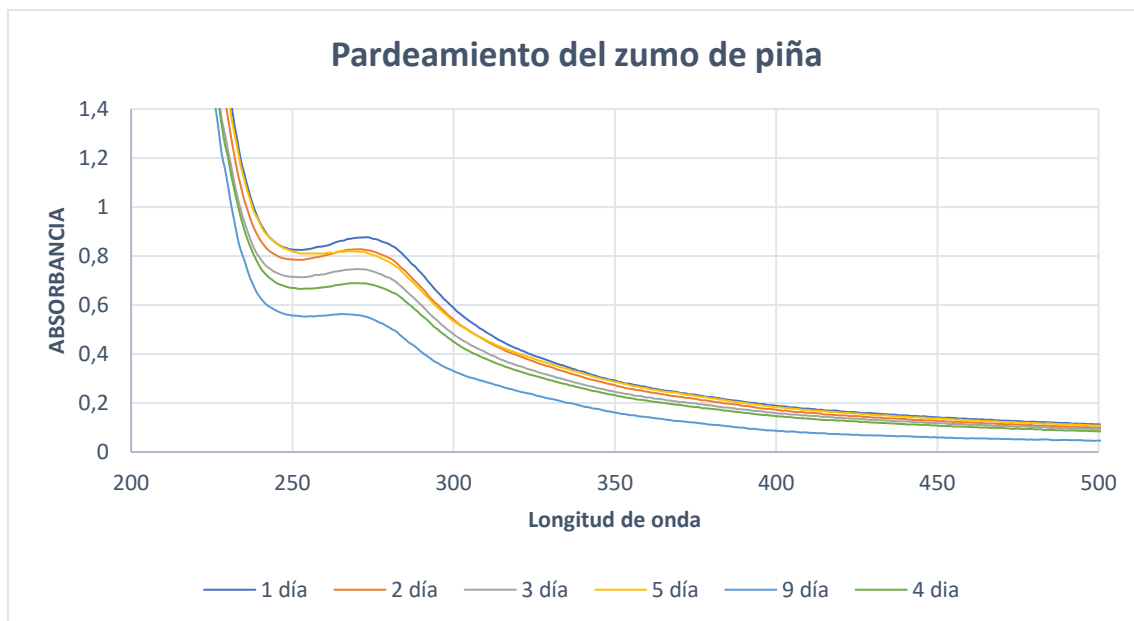


Figura 26: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña durante 9 días.

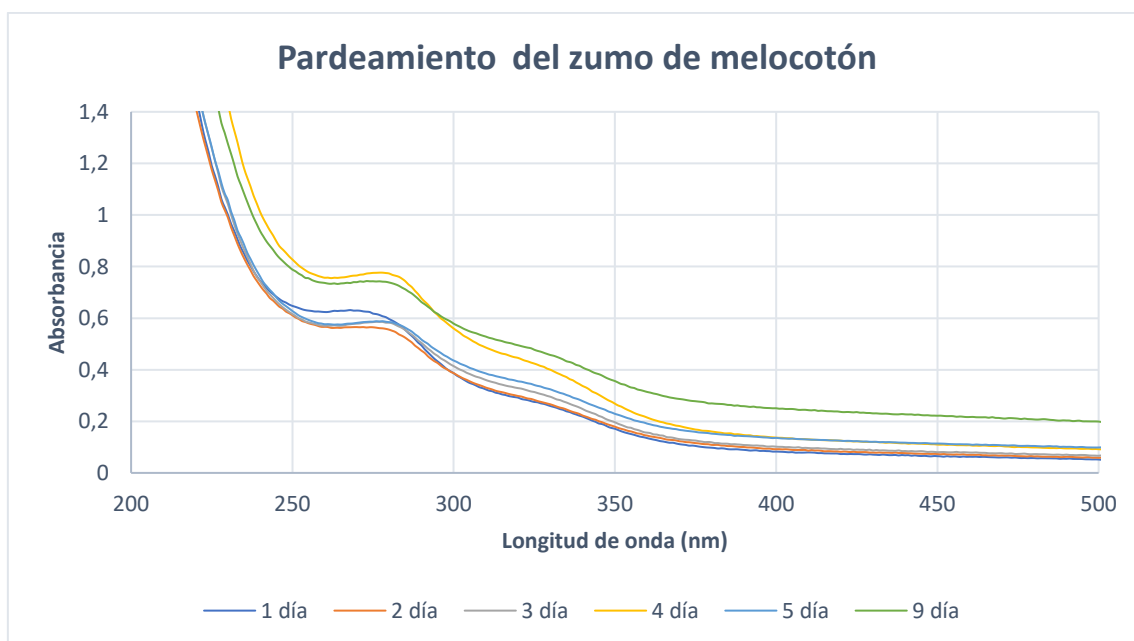


Figura 27: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón durante 9 días.

En este segundo pardeamiento se observa un comportamiento similar al del primer ensayo, pero con menor variabilidad. Cabe destacar que se observa menos desplazamiento en las bandas que en el primer pardeamiento. Es posible que este comportamiento pueda deberse a que la temperatura media a la cual se ha llevado a cabo este ensayo sea ligeramente menor ($21,0 \pm 0,6 \text{ }^\circ\text{C}$).

En la *tabla 7* se muestran los datos de la temperatura del laboratorio durante el seguimiento del pardeamiento.

Tabla 7: Temperaturas del laboratorio durante el pardeamiento de 9 días de los zumos.

	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	9 día	Media ± Desviación estándar
Temperatura (°C)	21	21	20	22	21	21	21,0 ± 0,7

En la *tabla 8* se resumen los datos del pH medido en los zumos, observándose nuevamente que en líneas generales el pH tiene un comportamiento que se correlaciona con el primer ensayo.

Tabla 8: Valores de pH durante el pardeamiento de 9 días de los zumos.

pH	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	9 día	Media ± Desviación estándar
Zumo de manzana	4,00	3,99	3,98	3,95	3,98	3,94	3,97 ± 0,02
Zumo de piña	3,98	3,98	3,99	3,98	3,94	3,99	3,98 ± 0,02
Zumo de melocotón	3,83	3,83	3,82	3,82	3,85	3,75	3,82 ± 0,03

En la *tabla 9* se muestran los valores de la capacidad antioxidante de los zumos expresada como ppm de ácido gálico. Como se puede observar la cantidad de polifenoles en zumos disminuye a medida que aumenta el pardeamiento (entre un 32 y un 49%). En el zumo de manzana la determinación de polifenoles aumenta ligeramente (menos del 10%) en el segundo y quinto día y en el zumo de melocotón aumenta en el tercer y quinto día. Estas fluctuaciones podrían indicar la formación de compuestos de degradación intermedios durante el pardeamiento.

Tabla 9: Valores de la determinación de polifenoles durante el pardeamiento de 9 días.

	Día 1 (ppm)	Día 2 (ppm)	Día 3 (ppm)	Día 4 (ppm)	Día 5 (ppm)	Día 9 (ppm)
Zumo de manzana	28	31	25	24	25	19
Zumo de piña	29	28	25	24	24	15
Zumo de melocotón	26	21	25	19	23	15

Por último, se evaluó la posibilidad de realizar los ensayos de pardeamiento empleando un envejecimiento acelerado. Para ello, se estudió el efecto de la irradiación continua durante 45 horas con radiación UV, que también genera un aumento local de la temperatura en la celda.

Las curvas de respuestas que se muestran en la *figura 28* para cada zumo indican un comportamiento sustancialmente distinto de los zumos con respecto al obtenido en los ensayos anteriores. Este comportamiento probablemente sea debido a un fenómeno de degradación de los compuestos por radiación ultravioleta que no se aprecia cuando se realiza con ciclos normales de luminosidad (día y noche con radiación solar no directa). Es por ello que se continuó trabajando con los ensayos de pardeamiento anteriormente descritos.

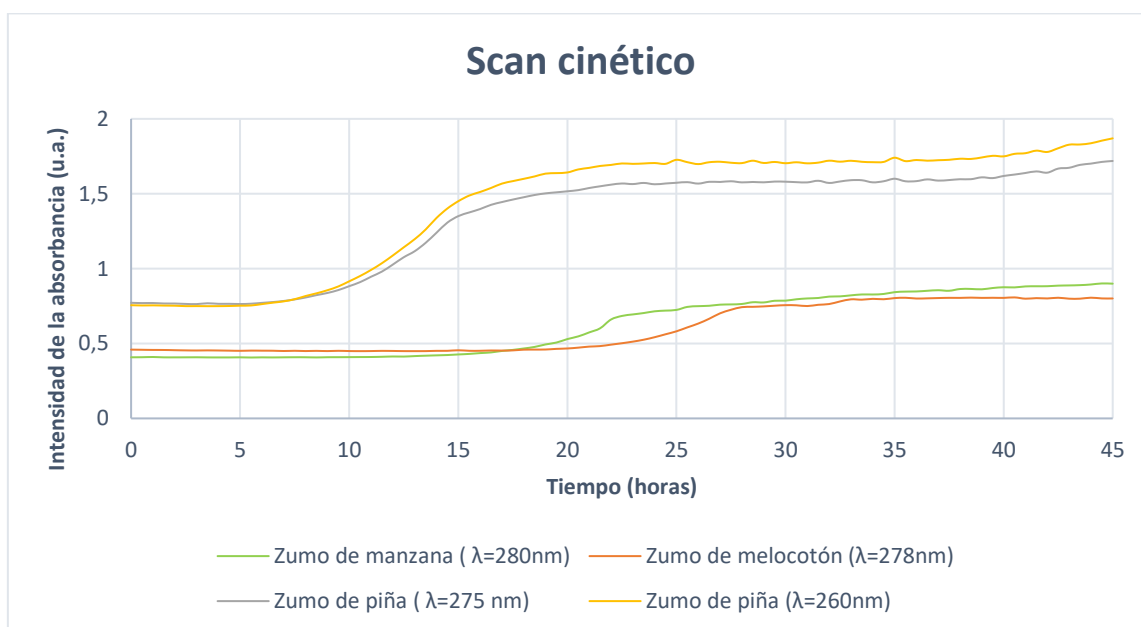


Figura 28: Representación gráfica de las curvas de respuesta de absorción de los zumos.

8.3 Síntesis y caracterización de las nanopartículas.

Dado que se han desarrollado metodologías válidas para el seguimiento del pardeamiento de los zumos se decidió abordar el efecto que tendría sobre el pardeamiento la adición de nanopartículas conteniendo un antioxidante encapsulado, empleando como compuesto modelo la quercetina (QUER).

Antes de proceder a la síntesis de las nanopartículas se ha realizado una caracterización espectrofotométrica y luminiscente del antioxidante que se va a encapsular en las

nanopartículas. En las *figuras 29 y 30* se muestran el espectro de absorbancia en la región ultravioleta-visible y el espectro de fluorescencia de la quercetina.

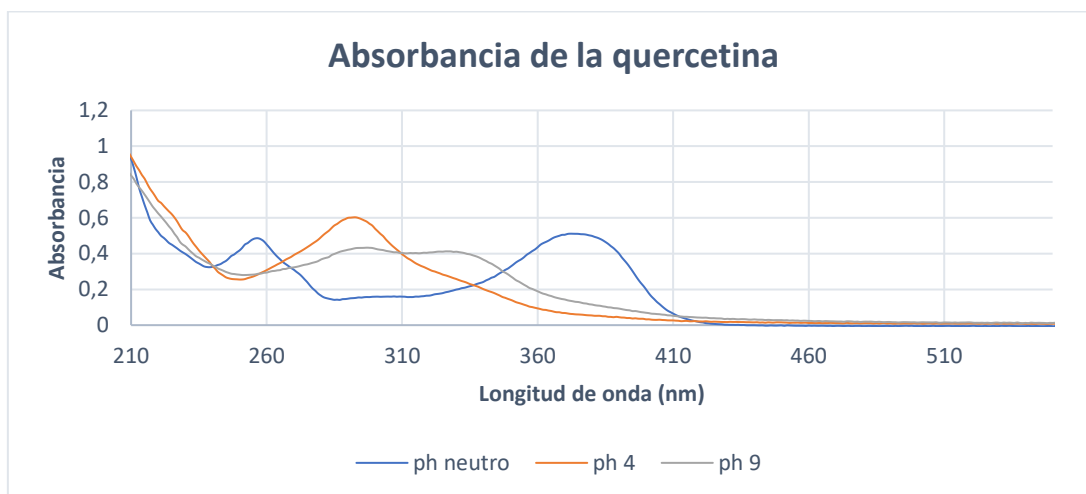


Figura 29: Espectros de absorbancia de quercetina.

El espectro de absorbancia de la quercetina en la región ultravioleta-visible cambia según el pH y en la *figura 29* se muestra el espectro a un pH neutro, ácido y básico. Esta dependencia de los espectros con el pH es el esperable si se tiene en cuenta que la estructura de la QUER, polifenol perteneciente a la familia de los flavonoides, tiene 5 grupos hidroxilo. A pH ácido la quercetina muestra una banda a 290 nm, a un pH básico el antioxidante muestra dos bandas a 297 y 326 nm, mientras que a pH neutro la quercetina presenta dos bandas de absorción a 256 y 372 nm. Cabe destacar que los zumos tienen un pH inferior a 4.

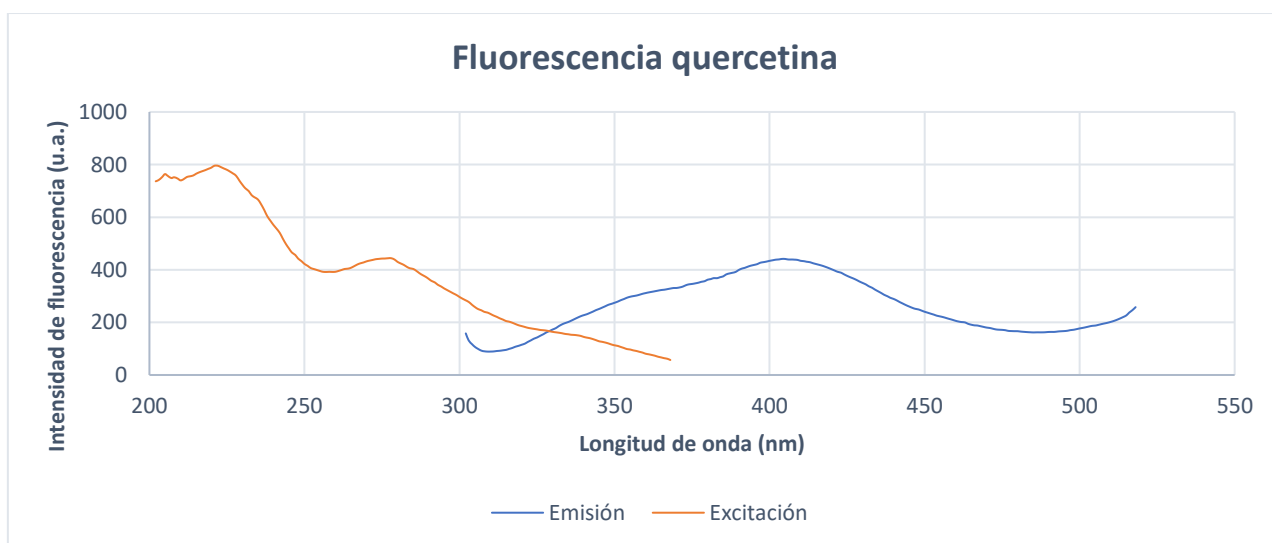


Figura 30: Espectro de fluorescencia del antioxidante quercetina.

Al observar el espectro de fluorescencia de la quercetina observamos que, a pH 4 correspondiente al pH de los zumos, su λ emisión máxima está situada a 406nm y su λ excitación a 277 nm.

Se procedió entonces a la síntesis de las nanopartículas de quitosano (NPQ) y de proteína de soja (NPS) siguiendo protocolos estándar descritos en la bibliografía [53, 54] en ausencia y presencia de QUER (NPQ-QUER y NPS-QUER respectivamente). Para el caso de las nanopartículas obtenidas a partir de SPI se hacía referencia en la bibliografía que la mejor relación entre estabilidad y tamaño se obtiene partiendo de una concentración de SPI que varía entre 4 y 12 mg/mL y un porcentaje de etanol de 10 y 80%. Con el fin de evitar excesos de reactivos en la preparación en nuestro caso se optó por el empleo de 4,4 mg/mL deSPI y 10 % de etanol.

La caracterización morfológica de las NPQ y NPS con y sin QUER, forma y tamaño, se realizó empleando TEM (Microscopio electrónico de transmisión) y las imágenes obtenidas se muestran en las *figuras 31, 32, 33 y 34*.

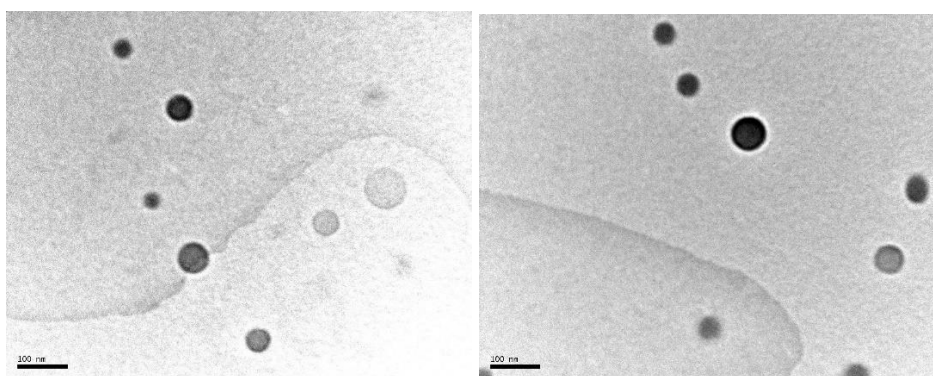


Figura 31: Imágenes de las NPQ.

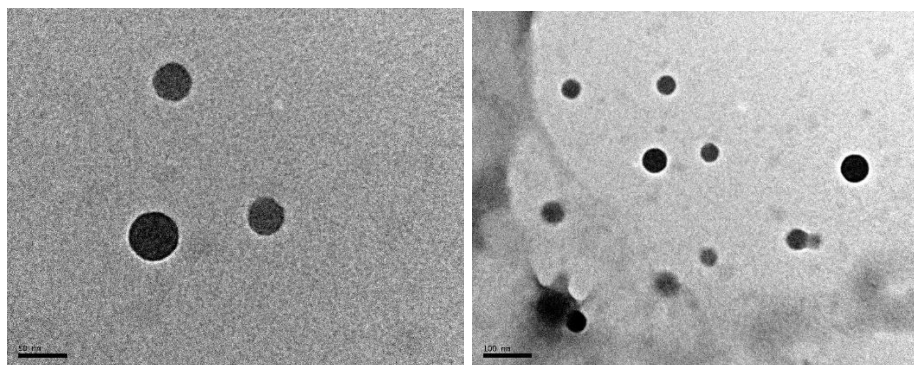


Figura 32: Imágenes de las NPQ-QUER.

Al observar las imágenes obtenidas del TEM se puede ver que las nanopartículas de quitosano tienen una forma esférica prácticamente perfecta con un diámetro aproximado de 40 nm.

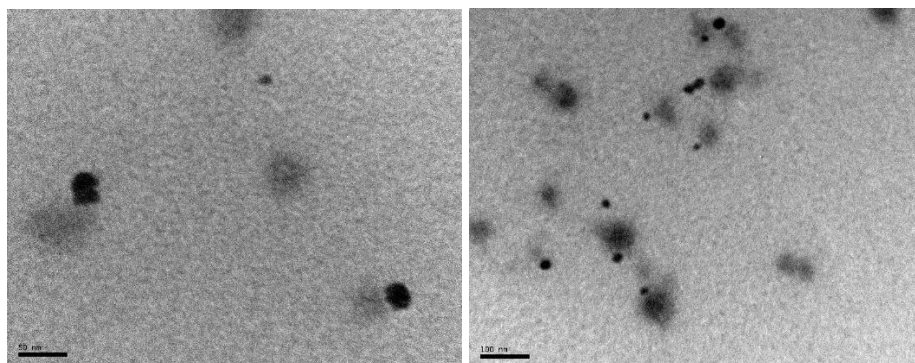


Figura 33: Imágenes de las NPS.

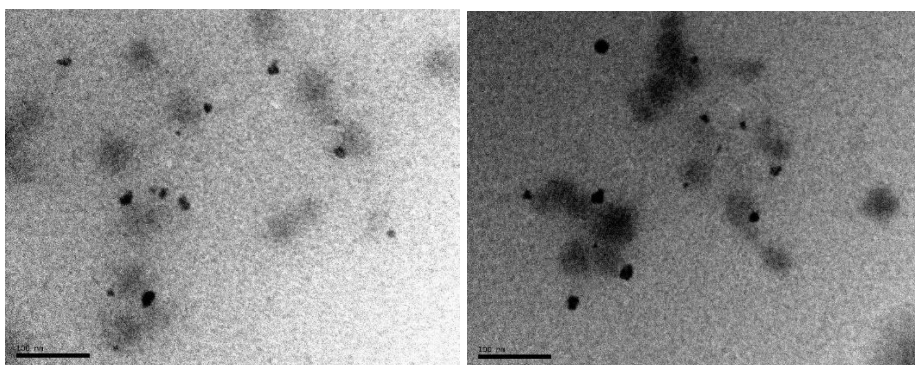


Figura 34: Imágenes de las NPS-QUER.

Al observar las imágenes podemos ver que las nanopartículas de proteína de soja son más pequeñas que las nanopartículas de quitosano y que su forma es esférica pero más irregular que las nanopartículas de quitosano.

Las nanopartículas también se caracterizaron con la técnica FTIR (Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier) y los espectros obtenidos se muestran en las *figuras 35 y 36*. Si se observan los espectros de IR de las NP con y sin QUER, en la región 1000-1600 nm, se puede apreciar que en el espectro de las nanopartículas conteniendo QUER se observan bandas que no aparecen en las nanopartículas vacías. Estas bandas se corresponden con algunas de las presentes en el espectro del antioxidante puro. Este hecho indicaría la presencia del antioxidante en las nanopartículas sintetizadas.

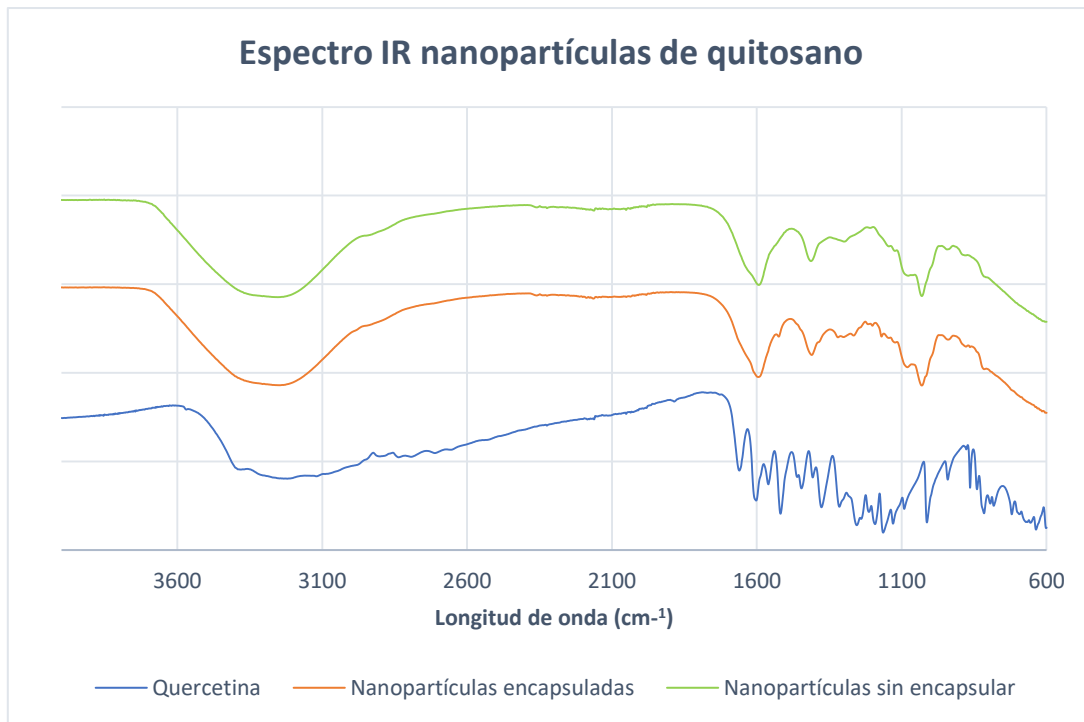


Figura 35: Espectro de IR de las nanopartículas de quitosano y del antioxidante.

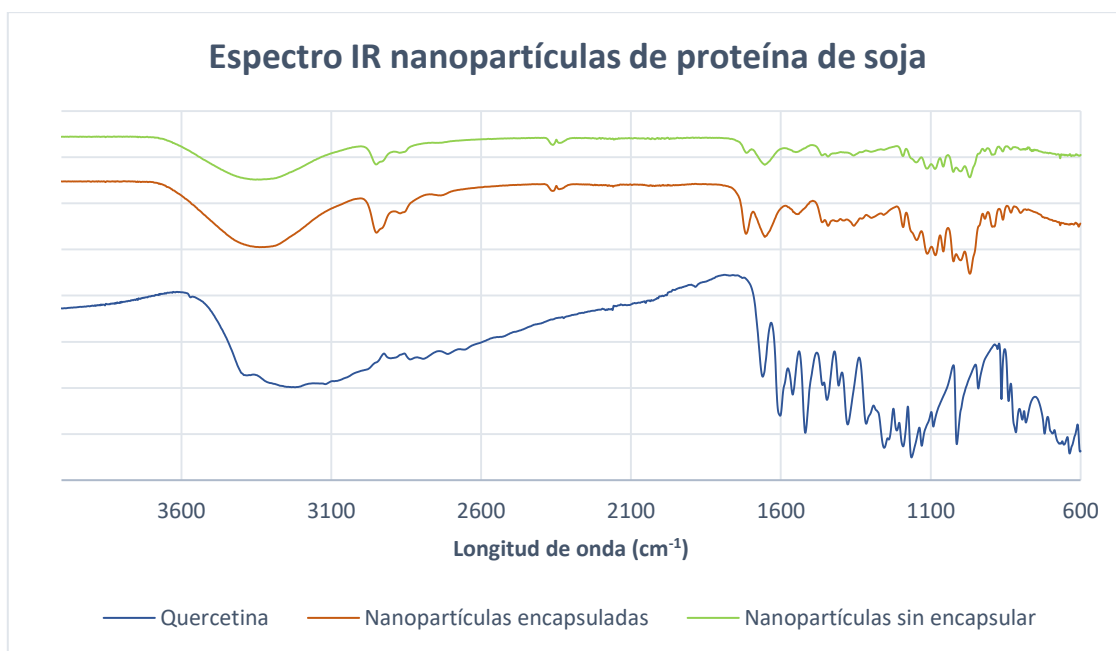


Figura 36: Espectro de IR de las nanopartículas de proteína de soja y del antioxidante.

Por último, se han caracterizado las nanopartículas con la técnica DSL (Dispersión de luz dinámica) para calcular su potencial zeta y su tamaño. En la *tabla 10* se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 10: Valores del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas.

	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)
NPQ	102 ± 9	10 ± 5
NPQ-QUER	616 ± 67	-12 ± 4
NPS	175 ± 98	-18 ± 6
NPS	182 ± 98	-18 ± 4

Como se puede observar en la tabla, el tamaño de las nanopartículas de quitosano aumenta al contener antioxidante, mientras que en las nanopartículas de proteína de soja el tamaño es prácticamente igual en ambas. Por otra parte, estos valores no se correlacionan con los observados por TEM y son bastante mayores, hecho esperable dado que en este caso se refieren a diámetros hidratados.

El potencial zeta nos indica la estabilidad de las nanopartículas y cuanto más negativo es el valor más estables son las nanopartículas. Las nanopartículas de proteína de soja muestran la misma estabilidad sin encapsular y encapsuladas, mientras que la presencia de QUER en las nanopartículas de quitosano no sólo parece mejorar ligeramente la estabilidad de las nanopartículas, sino que también se observa un cambio en la naturaleza de la carga superficial.

8.3.1 Estudio de la eficiencia de encapsulación para las nanopartículas.

Sintetizadas las nanopartículas con y sin quercetina se abordó el estudio de la evaluación de la eficiencia de encapsulación de la quercetina en las nanopartículas tal y como se describe en la metodología en el apartado 7.6.4. Para ello se midió el contenido presente de QUER en la disolución de la mezcla de síntesis relacionándose con la concentración inicial empleada.

Cabe destacar que las nanopartículas de soja se encuentran en dicho sobrenadante, esto significa que la concentración obtenida al medir el sobrenadante equivale a la concentración de quercetina encapsulada en las nanopartículas. Mientras que las nanopartículas de quitosano se encuentran en el precipitado obtenido tras centrifugar en la síntesis, por lo que la concentración de quercetina encapsulada será la resta de la concentración de quercetina añadida en la síntesis menos la concentración de la quercetina obtenida en la medición del sobrenadante. Estos hechos se corresponden con

los datos aportados previamente, donde se demuestra que las NPS son más estables con una carga superficial mayor, lo que hace que permanezcan más fácilmente en suspensión y se encuentren en el sobrenadante luego de ser centrifugadas. En el caso de las NPQ, el diámetro hidratado es mucho mayor y la carga menor lo que permite separarlas como un precipitado.

En la *tabla 11* se muestran los resultados obtenidos y en la *figura 37* se muestra la recta de calibrado del antioxidante utilizada para calcular la eficiencia de encapsulación en las nanopartículas de proteína de soja.

Tabla 11: Valores de encapsulación del antioxidante en las nanopartículas.

	Eficiencia de encapsulación
NPQ-QUER	51%
NPS-QUER	21%

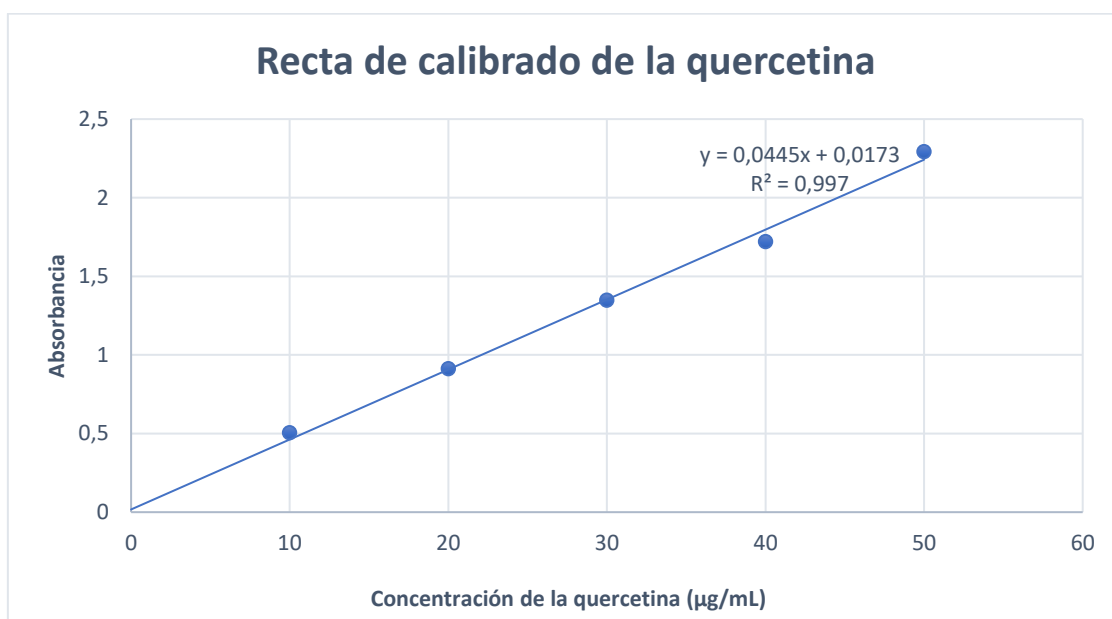


Figura 37: Recta de calibrado de la queretina utilizada para calcular la eficiencia de encapsulación en las nanopartículas de proteína de soja.

Se puede observar que para las NPQ-QUER la eficiencia es mucho mayor, pero es probable por las discusiones previas que parte del antioxidante se encuentre en la superficie de la NP. En el caso de las NPS-QUER la baja eficiencia se corresponde con el escaso cambio de volumen. No obstante, la falta de cambio en el potencial zeta en presencia y en ausencia de QUER podría indicar una inclusión del antioxidante más

efectiva. En este sentido se deberían realizar más estudios para determinar cómo se encuentra la QUER en las nanopartículas y mejorar la eficiencia de encapsulación.

8.4 Pardeamiento de los zumos con nanopartículas.

Una vez sintetizadas y caracterizadas las NPQ-QUER y NPS-QUER se procedió a su incorporación en los zumos, persiguiendo como objetivo fundamental el estudiar si su presencia afectaba el proceso de pardeamiento. Si se analizan los espectros con y sin nanopartículas (*Figuras 1-9 del ANEXO I*) obtenidos durante el proceso de pardeamiento de los zumos de manzana, piña y melocotón se puede concluir que:

- En el pardeamiento con NPQ-QUER no se observan cambios significativos ni en la intensidad de la absorbancia ni en el desplazamiento de las bandas de absorción para los tres zumos de fruta.
- En el pardeamiento con NPS-QUER si se observan variaciones en la intensidad de la absorbancia dependiendo del día del pardeamiento sobre todo en los zumos de piña y melocotón, pero no se observan desplazamientos en las bandas de absorción como se apreciaba en los estudios preliminares.

En la figura 38 (a) se observa una imagen de la gradilla con los zumos durante el pardeamiento y en la figura 39 (b) se observa la diferencia de color en los diferentes pardeamientos.

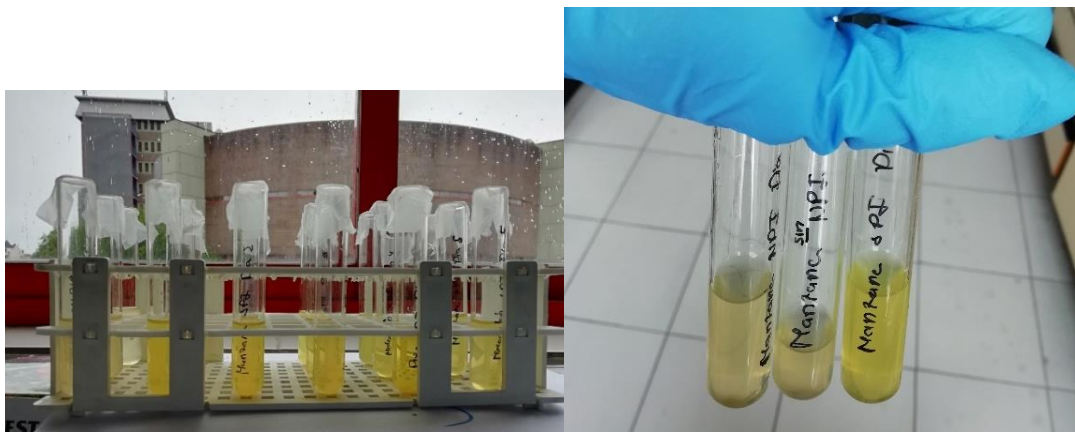


Figura 38: (a) Tubos durante el pardeamiento de los zumos. (b) Diferencia de color en el zumo de manzana entre el pardeamiento con NPQ-QUER y NPS-QUER y sin nanopartículas.

En la *tabla 12* se muestran los datos de la temperatura del laboratorio durante el seguimiento del pardeamiento. Puede observarse que la variabilidad en la temperatura ha

sido mucho mayor ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$), generando así una posible causa de incertidumbre y falta de fiabilidad en los resultados, en este sentido estos estudios deberían ser repetidos en un ambiente tal que permitiera un mejor control de la temperatura.

Tabla 12: Datos de la temperatura del laboratorio durante el pardeamiento con nanopartículas.

	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	Media \pm Desviación estándar
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	25	25	19	19	20	$21,0 \pm 0,7$

En la *tabla 13* se muestran los datos de pH de los zumos cuyos valores se mantiene prácticamente constantes, no ejerciendo ningún efecto sobre la presencia o ausencia de nanopartículas.

Tabla 13: Valores del pH de los zumos durante el pardeamiento con nanopartículas.

pH	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	Media \pm Desviación estándar
Zumo de manzana	4,02	3,99	4,00	4,01	4,02	$4,01 \pm 0,01$
Zumo de manzana con NPQ-QUER	4,04	4,03	4,00	4,00	4,00	$4,01 \pm 0,02$
Zumo de manzana con NPS-QUER	4,04	4,00	4,00	3,99	4,00	$4,01 \pm 0,02$
Zumo de piña	3,99	3,96	3,97	3,97	3,99	$3,98 \pm 0,01$
Zumo de piña con NPQ-QUER	3,99	3,97	3,97	3,97	3,99	$3,98 \pm 0,01$
Zumo de piña con NPS-QUER	4,01	3,97	3,96	3,96	3,97	$3,98 \pm 0,02$
Zumo de melocotón	3,89	3,86	3,85	3,84	3,81	$3,85 \pm 0,03$
Zumo de melocotón con NPQ-QUER	3,89	3,84	3,85	3,85	3,84	$3,85 \pm 0,02$
Zumo de melocotón con NPS-QUER	3,87	3,84	3,84	3,87	3,84	$3,85 \pm 0,02$

Los resultados obtenidos relativos al contenido de compuestos fenólicos y que se representan en la *tabla 14* muestran una gran variabilidad y una falta de correlación con

aquellos obtenidos en los ensayos precedentes. Esto, como en el caso de los espectros pueda deberse a las variaciones de la temperatura durante el ensayo, no pudiendo inferirse ninguna conclusión válida respecto al efecto que puede tener la adición de NPs. No obstante, es de destacar que su presencia puede tener un valor nutritivo dado que aumenta la carga en antioxidantes del zumo. Es por tanto necesario la repetición de estos ensayos en condiciones más estrictas para poder inferir conclusiones válidas.

Tabla 14: Valores de la determinación de los compuestos fenólicos durante el pardeamiento con nanopartículas.

	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 3</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 5</i>
Zumo de manzana	24	20	29	35	28
Zumo de manzana NPQ-QUER	24	25	30	31	27
Zumo de manzana NPS-QUER	25	25	27	30	27
Zumo de piña	29	21	27	41	25
Zumo de piña con NPQ-QUER	29	24	23	38	25
Zumo de piña con NPS-QUER	35	32	30	37	30
Zumo de melocotón	22	20	21	27	22
Zumo de melocotón con NPQ-QUER	24	22	20	24	26
Zumo de melocotón con NPS-QUER	29	25	25	28	25

9. CONCLUSIONES

1. Se puede afirmar la validez del método elegido para evaluar el pardeamiento de los zumos de frutas debido a su robustez y sensibilidad.
2. Se sintetizaron y caracterizaron con éxito nanopartículas constituidas por el sistema quitosano/alginato/cloruro cálcico.
3. Se sintetizaron y caracterizaron con éxito nanopartículas a partir de proteínas aisladas de soja (SPI).
4. El análisis de las muestras por FTIR muestran que el antioxidante está presente en las nanopartículas. Además, el análisis DSL parece indicar que la quercetina se podría encontrar en la superficie de las nanopartículas de quitosano interaccionado con dicho polímero y en las nanopartículas de proteínas aisladas de soja parece indicar una posible inclusión del antioxidante.
5. No se puede confirmar la liberación de la quercetina con los estudios realizados por lo que es necesario realizar nuevos estudios.
6. La adición de las nanopartículas con el antioxidante encapsulado en los zumos no demuestra un efecto de inhibición del pardeamiento. Este hecho se puede deber a la variabilidad en las condiciones del estudio por lo que es necesario la realización de nuevos estudios con unas condiciones más estrictas.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] Poole Jr, C. P., & Owens, F. J. (2003). *Introduction to nanotechnology*. John Wiley & Sons.
- [2] Stone, V., Nowack, B., Baun, A., van den Brink, N., von der Kammer, F., Dusinska, M., ... & Fernandes, T. F. (2010). Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Science of the total environment*, 408(7), 1745-1754.
- [3] Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R., & Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food: from field to plate. *Food Research International*, 69, 381-400.
- [4] EFSA Scientific Committee. (2011). Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*, 9(5), 2140.
- [5] Ibarz-Martínez, R., Pagán, J., Garza, S., & Ibarz, A. (2010). Pardeamiento de zumos clarificados de limón tratados a altas temperaturas. *Scientia Agropecuaria*, 1(1), 7-20.
- [6] Artés, F., Castañer, M., & Gil, M. I. (1998). Revisión: El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas Review: Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food science and technology international*, 4(6), 377-389.
- [7] Hodge, J.E. 1953. Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15): 928-943.
- [8] Ibarz, A., & Naves, J. (1995). Efecto de la temperatura y contenido en sólidos solubles sobre la cinética de pardeamiento no enzimático de zumos clarificados de manzana/Effect of temperature and soluble solids content on nonenzymatic browning kinetics for clarified apple juices. *Food Science and Technology International*, 1(1), 29-34.
- [9] Serra, H. M., & Cafaro, T. A. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(4), 525-532.
- [10] Babsky, N.E.; Toribio, J.L.; Lozano, J.E. 1986. Influence of storage on the composition of clarified apple juice concentrate. *Journal of Food Science* 51(3): 564-567.

- [11] Ricco, R. A., Agudelo, I., & Wagner, M. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 52(2), 161-174.
- [12] Isaza-Martínez, J. H., Veloza-Castiblanco, L. Á., Guevara, C. A., Ávila-Torres, Y. P., & Díaz, O. (2005). Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia Melastomataceae. *Actualidades Biológicas*, 27(1), 75-79.
- [13] Contreras Calderón, J. D. C. (2008). Utilidad de indicadores de pardeamiento químico para el control de ingredientes y fórmulas infantiles.
- [14] Adrian, J., & Frangne, R. (1973). reaction de Maillard. 8. role des pre-melanoidines sur la digestibilité azotée in vivo et la protéolyse in vitro. In *Annales de la nutrition et de l'alimentation*.
- [15] Finot, P. A., & Mauron, J. (1969). Le blocage de la lysine par la réaction de MAILLARD. I. Synthèse de N-(désoxy-1-D-fructosyl-1)-et N-(désoxy-1-D-lactulosyl-1)-L-lysines. *Helvetica Chimica Acta*, 52(6), 1488-1495.
- [16] Carpenter, K. J. (1960). The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochemical Journal*, 77(3), 604.
- [17] Erbersdobler, H. F., & Somoza, V. (2007). Forty years of furosine—Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Molecular nutrition & food research*, 51(4), 423-430.
- [18] Morales, F. J., & Van Boekel, M. A. J. S. (1997). A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescence accumulation. *International Dairy Journal*, 7(11), 675-683.
- [19] Sun, J. B., Severson, R. F., & Kays, S. J. (1993). Quantitative technique for measuring volatile components of baked sweetpotatoes. *HortScience*, 28(11), 1110-1113.
- [20] Friedman, L., & Kline, O. L. (1950). The amino acidsugar reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 184, 599-606.
- [21] Fagerson, I. S. (1969). Thermal degradation of carbohydrates; a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 747-750.
- [22] Adachi, S., & Patton, S. (1961). Presence and significance of lactulose in milk products: a review. *Journal of Dairy Science*, 44(8), 1375-1393.

- [23] Del Castillo, M. D., Corzo, N., Polo, M. C., Pueyo, E., & Olano, A. (1998). Changes in the amino acid composition of dehydrated orange juice during accelerated nonenzymatic browning. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(1), 277-280.
- [24] Ramshaw, E. H., & Dunstone, E. A. (1969). The flavour of milk protein. *Journal of dairy research*, 36(2), 203-213.
- [25] Chiang, G. H. (1988). High-performance liquid chromatographic determination of epsilon-pyrrole lysine in processed food. *Journal of agricultural and food chemistry*, 36(3), 506-509.
- [26] Dittrich, R., Hoffmann, I., Stahl, P., Müller, A., Beckmann, M. W., & Pischetsrieder, M. (2006). Concentrations of N ϵ -carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(18), 6924-6928.
- [27] Ames, J. M., Apriyantono, A., & Arnoldi, A. (1993). Low molecular weight coloured compounds formed in xylose—lysine model systems. *Food chemistry*, 46(2), 121-127.
- [28] Ferrer, E., Alegría, A., Farré, R., Abellán, P., & Romero, F. (1999). Revision: Indicadores del deterioro de la calidad proteica y del valor nutritivo de la leche/Review: Indicators of damage of protein quality and nutritional value of milk. *Food Science and Technology International*, 5(6), 447-461.
- [29] Bujard, E., & Finot, P. A. (1978). Mesure de la disponibilité et du blocage de la lysine dans les laits industriels. In *Annales de la nutrition et de l'alimentation*.
- [30] Kiokias, S., & Varzakas, T. (2014). Activity of flavonoids and β -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. *Food chemistry*, 150, 280-286.
- [31] Amaya Rodríguez, L. M., & Portillo Membreño, C. E. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible* (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- [32] Behling, E. V., SENDÃO, M. C., FRANCESCATO, H. D. C., ANTUNES, L. M. G., & BIANCHI, M. D. L. P. (2008). Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15(3), 285-292.

- [33] Orrego Lagarón, N. (2016). Estudios de absorción y disposición de naringenina y quercetina. Estudios preclínicos.
- [34] Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), 73-5.
- [35] Patel, A. R., Heussen, P. C., Hazekamp, J., Drost, E., & Velikov, K. P. (2012). Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry*, 133(2), 423-429.
- [36] Borgogna, M., Bellich, B., Zorzín, L., Lapasin, R., y Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416- 423.
- [37] Onwulata, C. I. (2011). Encapsulation of New Active Ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 183-202.
- [38] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M., y Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- [39] Deladino, L., Navarro, A., y Martino, M. N. (2007b). Encapsulation of active compounds: Ionic gelation and cocrystallization as case studies. In C. E. Lupano (Ed.), *Functional Properties of Food Components*, (pp. 125-157).
- [40] López Córdoba, A. F. (2012). *Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- [41] Naskar, S., Sharma, S., & Koutsu, K. (2018). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.
- [42] González, C., Valbuena, A., Celis, B., Perentena, L., & Colina, M. (2015). Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrógeno. *Revista Iberoamericana de Polímeros y Materiales*, 16 (1), 43-68.

- [43] Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*, 274(1-2), 1-33.
- [44] Fayad, S. J. (2013). Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja.
- [45] Sobral, P., & Wagner, J. (2009). Relación entre la composición y la actividad antitriptica de sueros de soja y tofu y comportamiento térmico de sus proteínas aisladas. *Información tecnológica*, 20(5), 65-73.
- [46] Goycoolea, F. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
- [47] Douglas, K. L., & Tabrizian, M. (2005). Effect of experimental parameters on the formation of alginate–chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 16(1), 43-56.
- [48] Teng, Z., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Nanoparticles synthesized from soy protein: preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(10), 2712-2720.
- [49] Williams, D. B., & Carter, C. B. (1996). The transmission electron microscope. In *Transmission electron microscopy* (pp. 3-17). Springer, Boston, MA.
- [50] Hind, A. R., Bhargava, S. K., & McKinnon, A. (2001). At the solid/liquid interface: FTIR/ATR—the tool of choice. *Advances in colloid and interface science*, 93(1-3), 91-114.
- [51] Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation
- [52] García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- [53] Teng, Z., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Nanoparticles synthesized from soy protein: preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (10), 2712-2720.

[54] Aluani, D., Tzankova, V., Kondeva-Burdina, M., Yordanov, Y., Nikolova, E., Odzhakov, F., ... & Yoncheva, K. (2017). Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. *International journal of biological macromolecules*, 103, 771-782.

ANEXO I

Espectros de absorción UV-VIS durante el proceso de pardeamiento de los zumos en presencia y ausencia de nanopartículas.

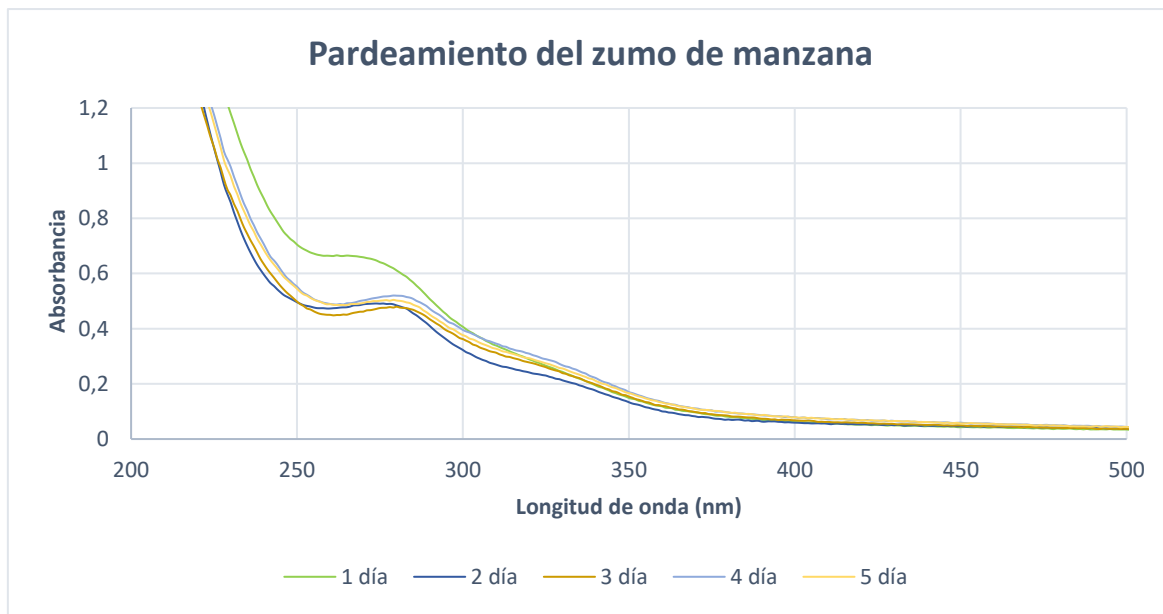


Figura 1: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana durante 5 días.

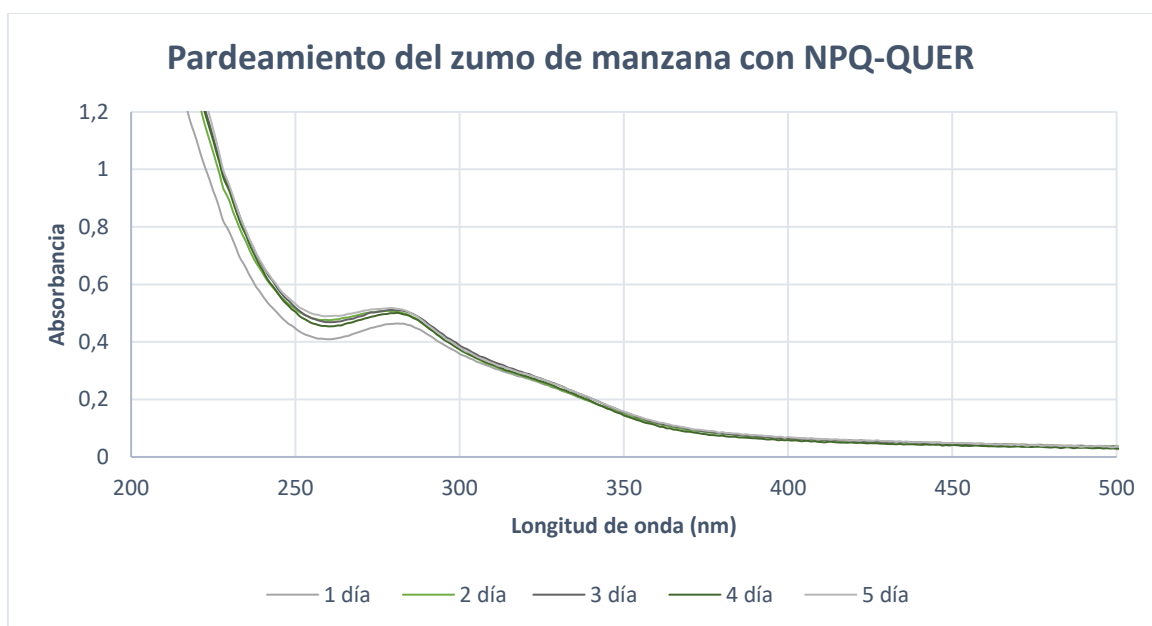


Figura 2: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana con NPQ-QUER durante 5 días.

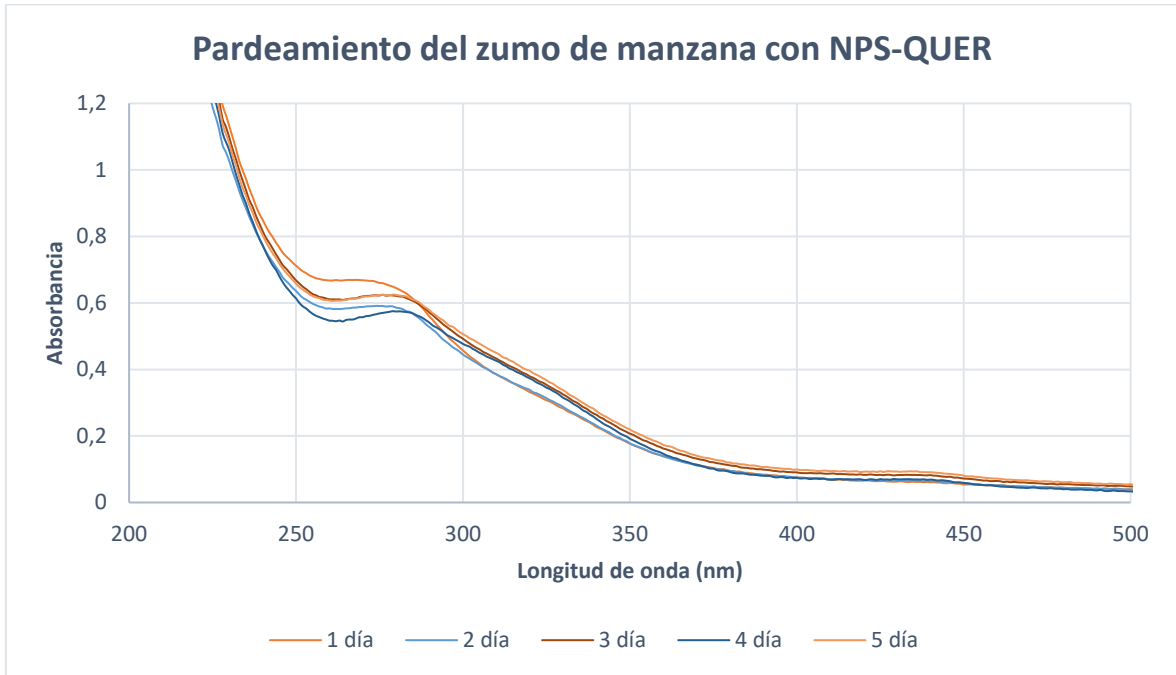


Figura 3: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de manzana con NPS-QUER durante 5 días.

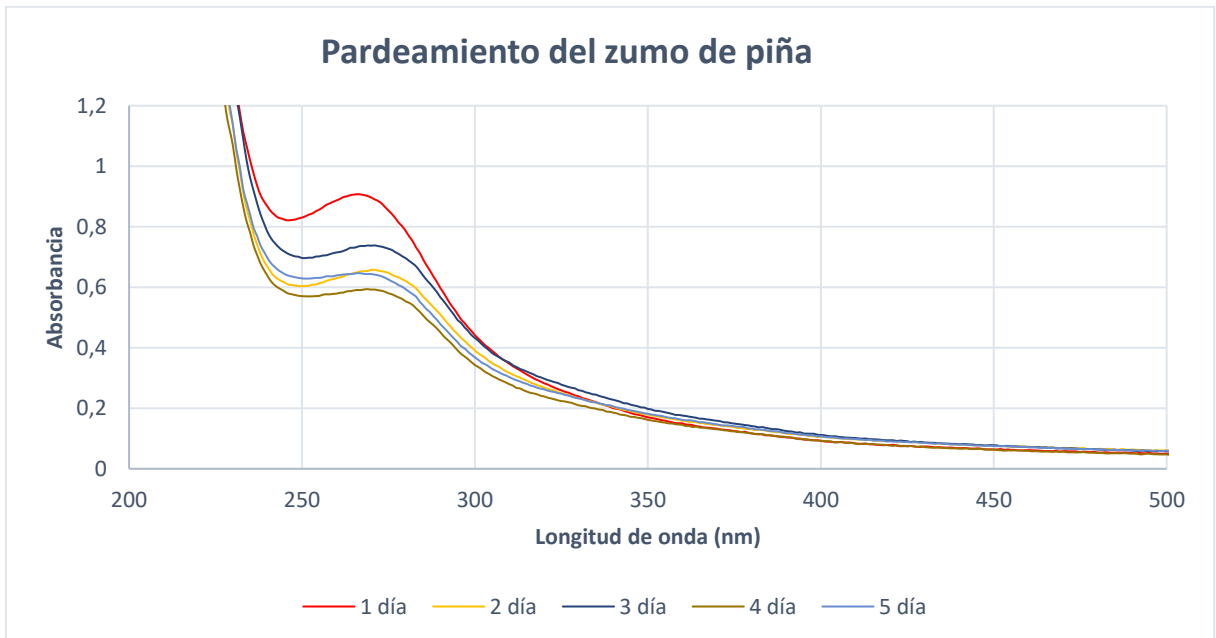


Figura 4: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña durante 5 días.

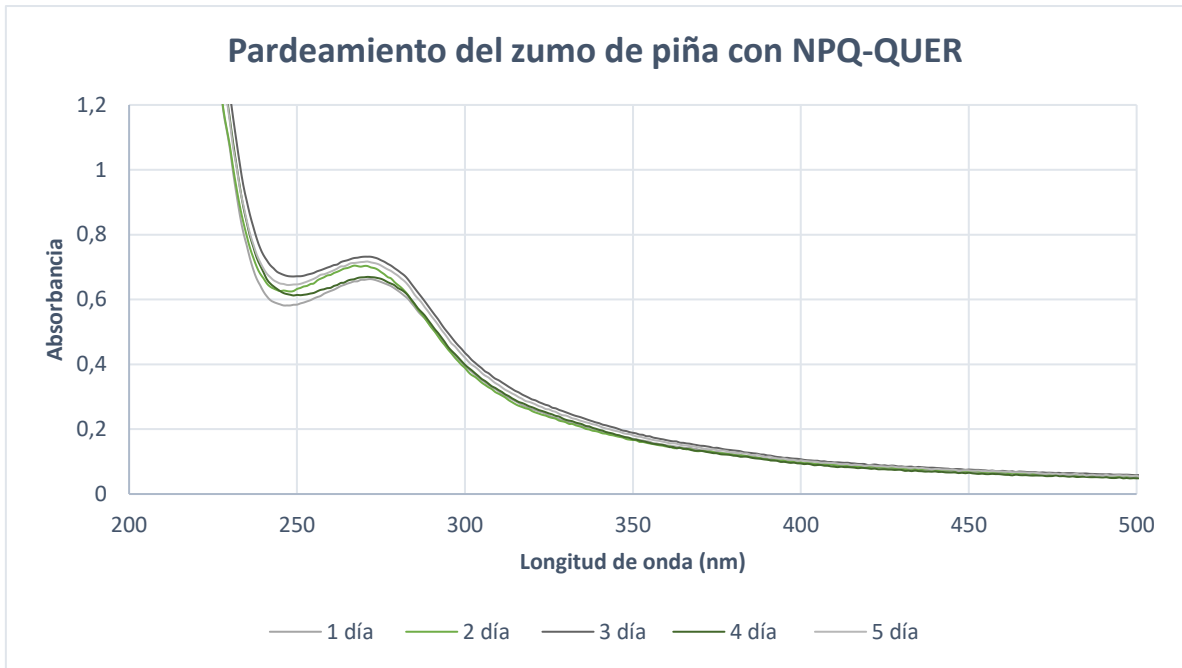


Figura 5: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña con NPQ-QUER durante 5 días.

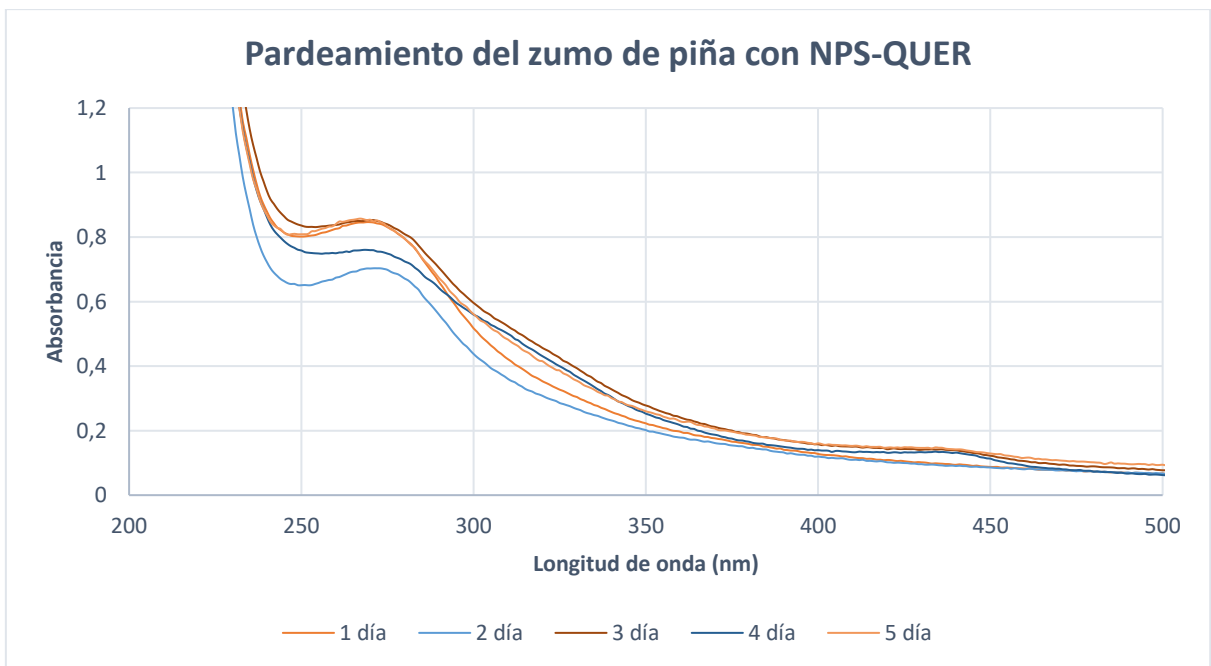


Figura 6: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de piña con NPS-QUER durante 5 días.

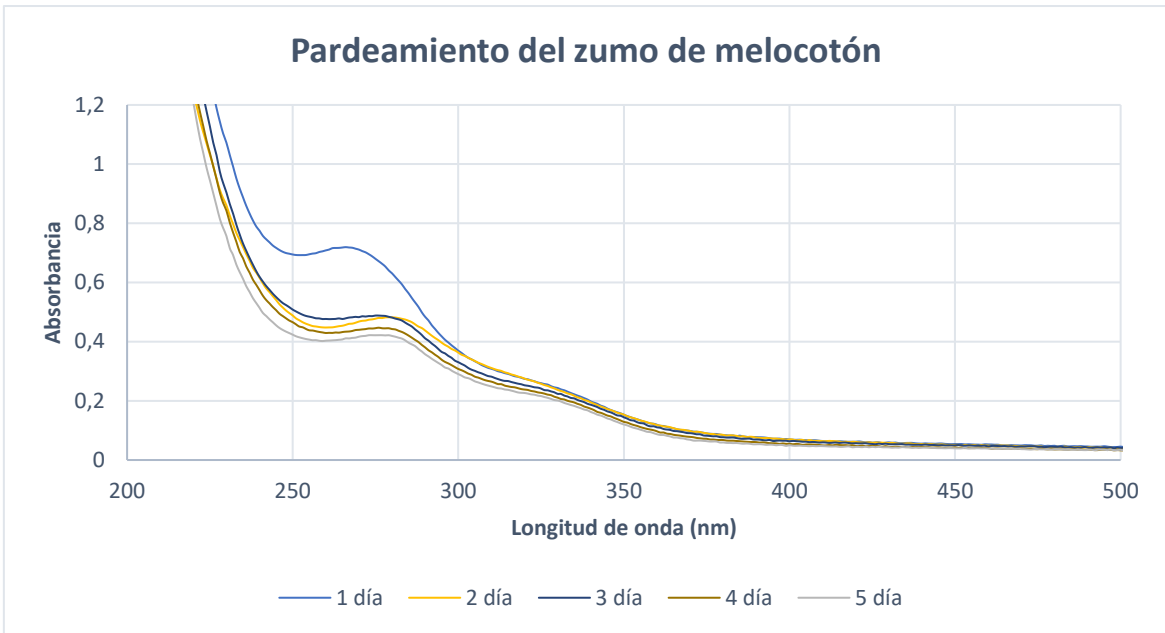


Figura 7: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón durante 5 días.

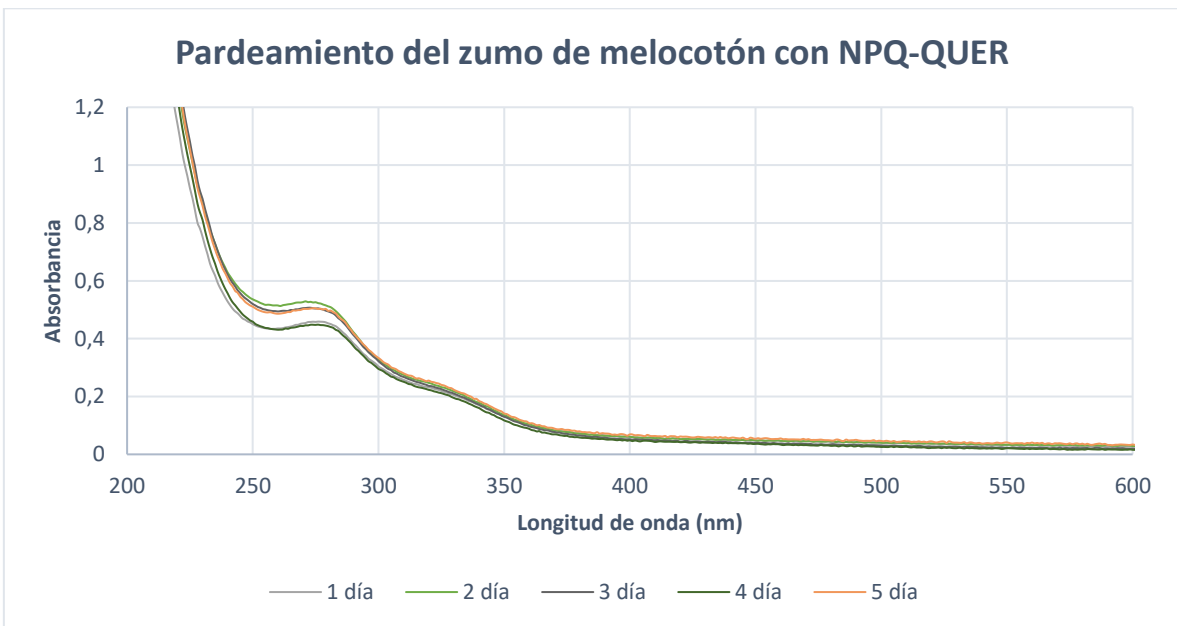


Figura 8: Representación gráfica del pardeamiento del zumo de melocotón con NPQ-QUER durante 5 días.