



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Nanopartículas de kafirina como vehículo de compuestos bioactivos

Lic. Bioquímica Alejandra Espíndola

Tesis de Maestría

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República y PEDECIBA Química

Marzo 2023

Nanopartículas de kafirina como vehículo de compuestos bioactivos

Integrantes del tribunal:

Dr. Eduardo Méndez

Dra. Silvana Alborés

Dra. Nicole Lecot

Nanopartículas de kafirina como vehículo de compuestos bioactivos

Alejandra Espíndola, Mag.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República

Directora: Dra. Lorena Betancor

Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería,
Universidad ORT, Uruguay.

Directora académica: Dra. Helena Pardo

Centro NanoMat, Instituto Polo Tecnológico de Pando,
Facultad de Química, Universidad de la República

2018 – 2023

Resumen

Las kafirinas son la principal proteína de almacenamiento del grano de sorgo, debido a su inferior calidad nutricional y desempeño limitado en el tracto digestivo humano, los esfuerzos de investigación en los últimos años se han dirigido a sus aplicaciones como biomateriales alternativos de valor agregado. Las mismas pertenecen a la familia de las prolaminas con propiedades características únicas como: su solubilidad en alcohol, su insolubilidad en agua, conformación alargada, alta hidrofobicidad, entre otros. Además, estas proteínas tienen la capacidad de autoensamblarse en micelas inducido por la polaridad del solvente, en un proceso denominado precipitación anti-disolvente. Las nanopartículas orgánicas presentan las siguientes ventajas: biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta capacidad de unión a fármacos, absorción adecuada por las células, targeting (orientación), posibilidad de producción simple y de bajo coste, entre otros.

Sin embargo, el uso de kafirinas como carrier o nano-vehículo sigue siendo escaso. En esta tesis de maestría se ha trabajado bajo la hipótesis de preparar y estudiar las propiedades de nanopartículas de kafirina y su uso en la encapsulación de la hormona progesterona. Para ello con un enfoque de biorrefinería se partió de DDGS (granos secos de destilería con solubles) principal subproducto de la producción de bioetanol. Luego de estudiar diversas condiciones de purificación, se evaluaron estrategias alternativas de síntesis y se caracterizaron las nanopartículas obtenidas. Las mismas presentaron (DLS, PDI y PZ de: 224 ± 8 nm; 0.255 ± 0.03 ; -35 ± 2 mV, respectivamente) que fue corroborado por SEM. La evaluación de la estabilidad coloidal mostró a 4°C , efectos de agregación y degradación con el paso del tiempo, donde a pH mayores a 5, las nanoestructuras son estables, ya que presentaron potenciales en el rango de -39 a -61 mV, lo suficientemente alto como para evitar la agregación de éstas.

Los estudios de encapsulación mostraron una eficiencia del 88% y un rendimiento del 72% a $20 \mu\text{g/mL}$ de progesterona inicial, haciendo que ésta sea la mejor condición, dentro del barrido de concentraciones de 12 – $164 \mu\text{g/mL}$ de progesterona. Se ha caracterizado fisicoquímicamente los nanoencapsulados los cuales no mostraron cambios significativos con respecto a las nanopartículas de kafirina. Además, las nanopartículas y los nanoencapsulados resultaron no ser citotóxicas en la línea celular de queratinocito humano (HaCaT) mediante el ensayo de MTT a concentraciones de 10 – $100 \mu\text{g/mL}$ de progesterona.

Finalmente, se logró demostrar la hipótesis de la tesis realizando ensayos en medio de tracto digestivo simulado (ITG) de los nanoencapsulados y de las nanopartículas de kafirina, que fueron incubados durante 2 horas a 37°C y 150 rpm y mostraron la liberación del fármaco encapsulado. Se cuantificó la cantidad de progesterona dentro de los nanoencapsulados y se corroboró su ausencia en las nanopartículas de kafirina. Para la cuantificación de este se utilizaron distintas técnicas: colorimétrica, ELISA y ECLIA. En consecuencia, este trabajo demuestra al mejor de nuestro conocimiento, por primera vez el uso de nanopartículas de kafirina sintetizadas a partir de un residuo industrial como una nanovehículo de progesterona.

Kafirin nanoparticles used as vehicle of bioactive compounds

Alejandra Espíndola, Mag.

Graduate Program in Chemistry, Faculty of Chemistry
University of the Republic

Director: Dra. Lorena Betancor

Biotechnology Laboratory, Faculty of Engineering,
University ORT, Uruguay

Academic director: Dr. Helena Pardo

NanoMat Center, Instituto Polo Tecnológico de Pando,
Faculty of Chemistry, University of the Republic

2018 – 2023

Abstract

Kafirins are the main storage protein of sorghum grain, due to their inferior nutritional quality and limited performance in the human digestive tract, research efforts in recent years have been directed to their applications as alternative value-added biomaterials. They belong to the prolamin family with unique properties such as solubility in alcohol, insolubility in water, elongated conformation, and high hydrophobicity, among others. In addition, these proteins have the ability to self-assemble into micelles induced by the polarity of the solvent, in a process called anti-solvent precipitation. Organic nanoparticles have the following advantages: biocompatibility, biodegradability, high drug binding capacity, adequate cellular uptake, targeting, and the possibility of simple and low-cost production, among others.

Although the main storage protein of sorghum grain is kafirin, due to its nutritional quality and limited performance in the human digestive tract, research efforts in recent years have been directed to its applications as new value-added biomaterials. However, the use of kafirins as carriers or nano-vehicles is still scarce. In this masterwork, we have worked under the hypothesis of preparing and studying the properties of kafirin nanoparticles and their use in the encapsulation of the hormone progesterone. For this purpose, using a biorefinery approach, DDGS (dried distillers dried grains with solubles), the main by-product of bioethanol production, was used as a starting point. After studying different purification conditions, alternative synthesis strategies were evaluated and the nanoparticles obtained were characterized. The same ones presented (DLS, PDI and PZ of 224 ± 8 nm; 0.255 ± 0.03 ; -35 ± 2 mV, respectively) which was corroborated by SEM. The evaluation of colloidal stability showed at 4°C, aggregation and degradation effects with the passage of time, where at pH higher than 5, the nanostructures with both strategies are stable, since they presented potentials in the range of -39 to -61 mV, high enough to avoid their aggregation.

Encapsulation studies showed an efficiency of 88% and a yield of 72% at 20 µg/mL of theoretical progesterone offered, making this the best condition, within the range of concentrations of 12 - 164 µg/mL of progesterone. The nanoencapsulates have been physicochemically characterized and showed no significant changes with respect to the kafirin nanoparticles. Furthermore, the nanoparticles and nanoencapsulates were found not to be cytotoxic in the human keratinocyte cell line (HaCaT) by MTT assay at concentrations of 10 - 100 µg/mL of progesterone.

Finally, we were able to demonstrate the hypothesis of the thesis by performing simulated digestive tract (ITG) medium assays of the nanoencapsulated and kafirin nanoparticles, which were incubated for 2 hours at 37°C and 150 rpm and showed the release of the encapsulated drug. The amount of progesterone within the nanoencapsulates was quantified and its absence in the kafirin nanoparticles was corroborated. Different techniques were used for its quantification: colorimetric, ELISA, and ECLIA.

Consequently, this work demonstrates to the best of our knowledge, for the first time the use of kafirin nanoparticles synthesized from an industry waste as a progesterone nanovehicle.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de Tesis, Dra. Lorena Betancor por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por confiar en mí y haberme guiado a lo largo de este trabajo.

A mi directora Académica, Dra. Helena Pardo por su buena disposición y valiosos aportes durante el desarrollo de esta Tesis.

A MSc. Carlos Sanguinetti por permitirme formar parte del equipo del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay y por poder llevar a cabo mi investigación allí.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, destacando a Dra. Erienne Jackson, Dra. Cecilia Ortiz y Lic. Sebastián Rodríguez, que me ayudaron a llevar adelante mi investigación, aportando sus conocimientos en la temática y su apoyo moral.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme una beca de maestría para poder llevar a cabo mis estudios y por financiar el proyecto “*Valorización de las proteínas del DDGS*”.

A Alcoholes del Uruguay por donarnos los DDGS, material de partida para trabajar,

A Dra. Blanca Gómez-Guerrero y MSc. Analía Martínez, de la Fundación LATITUD, Parque tecnológico del LATU, ya que se trató de un trabajo multidisciplinario.

A la Universidad ORT Uruguay y a PEDECIBA Química por el apoyo financiero recibido para la participación en diversos eventos de divulgación científica.

Finalmente, me queda agradecer a mi familia y mis amigos por su apoyo incondicional a lo largo de todo este proceso.

Abreviaturas

CT: tratamientos combinados

DDGS: granos secos de destilería con solubles

DLS: dispersión dinámica de luz

DSC: calorimetría diferencial de barrido

ECLIA: electro quimioluminiscencia inmunoensayo

EE: eficiencia de encapsulación

ELISA: inmunoensayo ligado a enzimas

FTIR: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

HaCaT: línea celular queratinocitos humanos

ITG: tracto digestivo simulado

K: kafirina

LD: capacidad de carga

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NM: nanomaterial

Nps: nanopartículas

NpsK: nanopartículas de kafirina

NspK-Pr: nanoencapsulados de progesterona

OT: tratamientos originales

PDI: índice de polidispersidad

Pr: progesterona

PZ: potencial Z

R: rendimiento

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

SEM: microscopía electrónica de barrido

SFG: jugo gástrico simulado

UHPLC: análisis en cromatografía líquida de ultra alta presión

Índice

I. Introducción	- 1 -
<i>Nanobiotecnología</i>	- 1 -
<i>Perspectivas futuras de la nanobiotecnología</i>	- 3 -
<i>Aplicaciones farmacéuticas de la nanobiotecnología</i>	- 3 -
<i>Nanomateriales</i>	- 7 -
<i>Nanopartículas</i>	- 9 -
<i>Aplicaciones de las nanopartículas</i>	- 12 -
<i>Destino de las nanopartículas en el cuerpo humano</i>	- 13 -
<i>Nanopartículas proteicas</i>	- 15 -
<i>Tipos y aplicaciones de nanopartículas proteicas</i>	- 15 -
<i>Kafirina</i>	- 20 -
II. Objetivos	- 25 -
<i>Objetivo general</i>	- 25 -
<i>Objetivos específicos</i>	- 25 -
III. Materiales y métodos	- 27 -
<i>Materiales</i>	- 27 -
<i>Análisis de concentración proteica: Método Dumas</i>	- 27 -
<i>Análisis de proteína por electroforesis</i>	- 28 -
<i>Extracción y purificación de kafirinas</i>	- 28 -
<i>Extracción con etanol (OT1)</i>	- 28 -
<i>Variaciones en la extracción con etanol (CT1)</i>	- 29 -
<i>Extracción con ácido acético glacial (OT2)</i>	- 29 -
<i>Variaciones en la extracción con etanol (CT2)</i>	- 29 -

<i>Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de kafirinas</i>	<i>- 29 -</i>
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de kafirinas</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Cuantificación de progesterona</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Colorimétrica</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Análisis en cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC)</i>	<i>- 30 -</i>
<i>Estrategias de síntesis de nanopartículas de kafirina</i>	<i>- 31 -</i>
<i>A: Síntesis de nanopartículas con etanol en volumen final de 2 mL.....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>A': Síntesis de NP con ácido acético glacial en volumen final de 2mL.....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>B: Síntesis de NP en un volumen final de 20 mL, agitación magnética.....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>C: Síntesis de NP en un volumen final de 20 mL, agitación con paletas.....</i>	<i>- 33 -</i>
<i>Encapsulación de progesterona en NspK.....</i>	<i>- 33 -</i>
<i>Evaluación del rendimiento de encapsulación.....</i>	<i>- 34 -</i>
<i>Caracterización fisicoquímica de NspK y NspK-Pr.....</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Estudios de estabilidad</i>	<i>- 35 -</i>
<i>En el tiempo.....</i>	<i>- 35 -</i>
<i>Variando el pH.....</i>	<i>- 36 -</i>
<i>Simulación del tracto digestivo (ITG).....</i>	<i>- 36 -</i>
<i>Citotoxicidad de las nanopartículas y nanoencapsulados</i>	<i>- 37 -</i>
IV. Resultados y discusión	- 39 -
<i>Composición química de sorgo, DDGS y kafirinas.....</i>	<i>- 39 -</i>
<i>Extracción y purificación de kafirinas</i>	<i>- 40 -</i>
<i>Pureza de los concentrados proteicos.....</i>	<i>- 40 -</i>
<i>Perfil electroforético de las fracciones de la extracción</i>	<i>- 42 -</i>

<i>Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de kafirina.....</i>	<i>- 49 -</i>
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de kafirinas</i>	<i>- 51 -</i>
<i>Síntesis de nanopartículas (NpsK).....</i>	<i>- 52 -</i>
<i>Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas proteicas.....</i>	<i>- 52 -</i>
<i>Nanoencapsulados de kafirina cargados con progesterona (NpsK-Pr).....</i>	<i>- 57 -</i>
<i>Preparación de NpsK-Pr y evaluación de encapsulación de progesterona</i>	<i>- 58 -</i>
<i>Caracterización fisicoquímica de NpsK-Pr</i>	<i>- 59 -</i>
<i>Estudios de estabilidad</i>	<i>- 61 -</i>
<i>Simulación del tracto digestivo (ITG).....</i>	<i>- 65 -</i>
<i>Citotoxicidad de nanopartículas y nanoencapsulados</i>	<i>- 67 -</i>
V. Conclusiones	- 70 -
VI. Bibliografía	- 73 -
V II. Perspectivas.....	-88-

Introducción

I. Introducción

Nanobiotecnología

La nanobiotecnología es una rama de la nanotecnología con aplicaciones o usos biológicos y bioquímicos. La misma estudia elementos existentes en la naturaleza para fabricar nuevos dispositivos. Logra maximizar las propiedades fisicoquímicas que surgen de la manipulación de la materia a escala nanométrica. Se trata de la ciencia, de comprensión, diseño, creación y aplicación de nanomateriales en todos los campos de la ciencia, la ingeniería y la tecnología. Transformándose en la revolución científica y tecnológica del presente siglo. De este modo, en los últimos quince años se ha incrementado considerablemente la investigación de nanomateriales, debido a los avances tecnológicos y a las propiedades fisicoquímicas únicas presentes en los mismos, diferenciándose de los materiales de tamaño a escala real.^{1,2}

La nanociencia y la nanotecnología no son nuevas, de hecho, los químicos han fabricado polímeros, incluso se han utilizado para crear los chips de computadora durante los últimos 30 años. En efecto, la naturaleza ha fabricado estructuras diminutas altamente precisas y funcionales durante miles de años como ADN, proteínas, etc. Pero solo a partir de la década de 1980 los humanos han sido capaces de fabricar nanoestructuras sintéticas. Las mismas están hechas de átomos que se definen con precisión en el espacio, tienen un número ilimitado de composiciones, tamaños, formas y funcionalidad.³⁻⁵

La aplicación de la nanobiotecnología a la medicina se denomina nanomedicina. Ésta cubre las aplicaciones de las nanobiotecnologías en el diagnóstico molecular ó también conocido como nanodiagnóstico. La aplicación en la industria farmacéutica para el descubrimiento y la administración de fármacos se denomina nanobiofarmacéutico. Si predominan las industrias de las comunicaciones y la ingeniería, las aplicaciones futuras en la medicina y las ciencias de la vida se están expandiendo rápidamente, hacia el desarrollo de la medicina personalizada. El perfeccionamiento de los diagnósticos moleculares, la combinación de diagnósticos con terapias y la administración de fármacos dirigidos desempeñan un papel importante en esta aplicación (Figura 1).^{3,6}

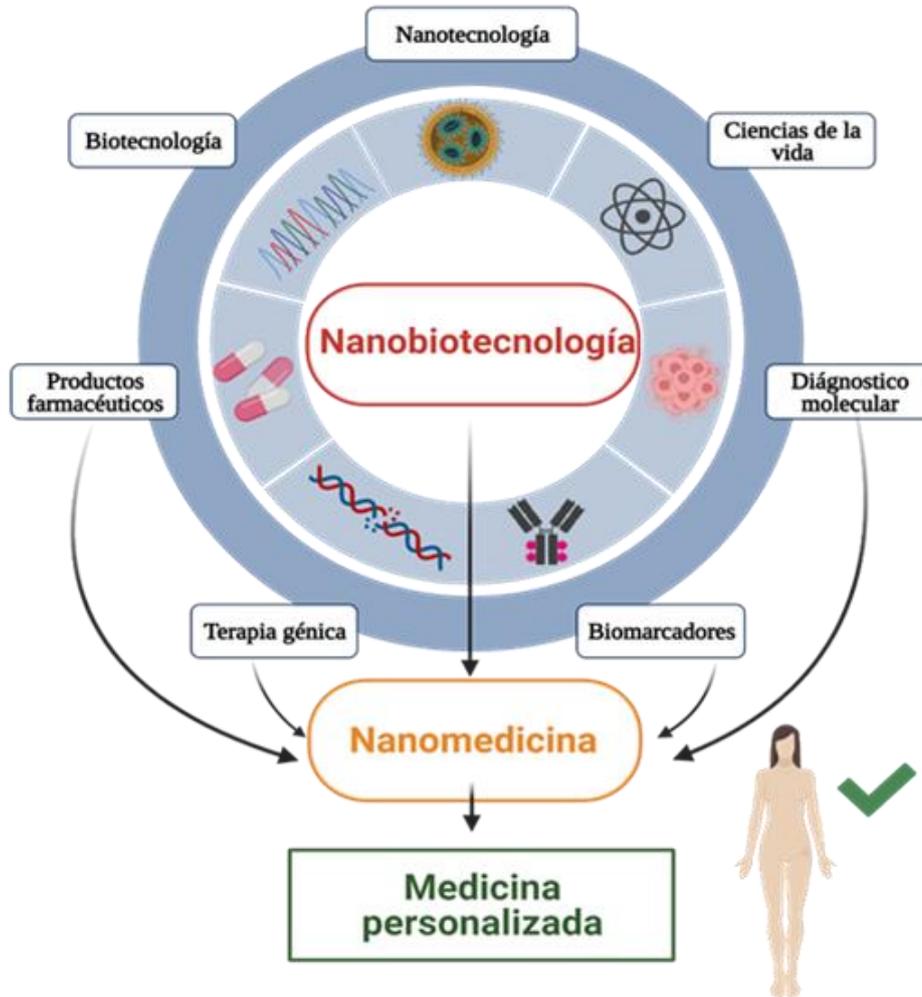


Figura 1. Relación de la nanobiología con otras tecnologías para el desarrollo de la medicina personalizada, creado con BioRender.com.

Los problemas de toxicidad de las nanopartículas son motivo de gran preocupación, ya que la evaluación de riesgos presenta desafíos debido a la falta de datos, complejidad de los nanomateriales, dificultades de medición, etc. La importancia de las nanopartículas se debe a su pequeño tamaño, lo que permite su introducción en partes del cuerpo donde las partículas grandes no son capaces de entrar. Aunque esto puede implicar que las pequeñas puedan cruzar algunas de las barreras como la hematoencefálica y alojarse en el cerebro. Los seres humanos están expuestos a nanopartículas generadas espontáneamente en la atmósfera y muchas de ellas se excretan del cuerpo. La toxicidad es un problema para el uso *in vivo* de nanopartículas, no así para el diagnóstico *in vitro*. Aunque algunas de las nanopartículas no son tóxicas, otras sí lo son; la tendencia actual es utilizar nanopartículas poliméricas degradables no tóxicas, como es el caso del presente estudio.^{3,7}

Perspectivas futuras de la nanobiotecnología

Se espera que en la próxima década comprendamos mejor cómo recubrir o alterar químicamente las nanopartículas para reducir su toxicidad en el cuerpo, lo que permitirá ampliar su uso para el diagnóstico de enfermedades y la administración de fármacos. La finalidad de los nanodispositivos es mejorar la comprensión del mecanismo de la enfermedad y así administrar terapias más efectivas. La nanobiotecnología podría permitir intervenciones terapéuticas a nivel celular para corregir la causa de la enfermedad. Finalmente, la misma proporcionará muchas herramientas para la implementación de la medicina personalizada en la segunda década del siglo XXI.^{7,8}

Por un lado, se prevé un crecimiento global del sector impulsado por los avances tecnológicos, así como un mayor apoyo gubernamental, junto al aumento de la inversión privada y la demanda creciente de dispositivos más pequeños. Sin embargo, los riesgos medioambientales y de seguridad de la nanotecnología, en conjunto a las preocupaciones relacionadas con su comercialización, podrían obstaculizar la expansión del mercado.^{1,9}

Se estima que, Estados Unidos, Brasil y Alemania liderarán la industria nanotecnológica en el año 2024, con una importante presencia de países asiáticos como Japón, China, Corea del Sur, India, Taiwán y Malasia. En particular la industria cosmética le arrebatará el tercer puesto al sector biomédico encabezado por la electrónica y la energía.⁹

En suma, la nanotecnología es capaz de crear nuevos materiales y dispositivos que pueden dedicarse a un amplio rango de aplicaciones en campos tan diversos como la nanomedicina, nanoelectrónica, biomateriales, producción de energía y productos de consumo. Esto supondrá una gran revolución tecnológica y medioambiental.¹⁰

Aplicaciones farmacéuticas de la nanobiotecnología

Entre las nuevas tecnologías, la nanobiotecnología ha provocado un gran interés para su aplicación en la industria farmacéutica. Entre las aplicaciones más importantes de la nanobiotecnología se encuentran las áreas de descubrimiento, desarrollo y administración de fármacos.^{3,11,12}

Particularmente el uso de nanopartículas ha hecho contribuciones significativas al desarrollo de fármacos. La unión multivalente de pequeñas moléculas a nanopartículas puede aumentar la afinidad de unión específica y revelar nuevas propiedades biológicas de dichos nanomateriales. Además, se están desarrollando algunos fármacos a partir de nanomateriales, ejemplos bien conocidos de éstos son dendrímeros, fullerenos y los

nanoanticuerpos. Incluso la conjugación de dendrímeros con fármacos de bajo peso molecular ha sido de creciente interés recientemente para mejorar la farmacocinética, dirección a sitios específicos y facilitar la absorción celular. Por otro lado, los enlaces específicos de fullerenos tienen numerosos puntos de unión lo que permite el enlace específico de grupos químicos.^{10,13,14}

Se prevé un uso cada vez mayor de la nanobiotecnología por parte de las industrias farmacéutica y biotecnológica. La nanotecnología se aplicará en todas las etapas del desarrollo de fármacos hasta aplicaciones de diagnóstico en ensayos clínicos. En un futuro cercano, puede ser posible modelar completamente la estructura y función de una célula individual mediante computadoras conectadas a sistemas de nanobiotecnología.^{3,10}

Uno de las principales dificultades en la administración de fármacos es su solubilidad, que es un factor esencial para su eficacia independientemente de la vía de administración. También es un desafío importante para las compañías farmacéuticas que desarrollan nuevos bioproductos, ya que casi el 50% de los nuevos medicamentos de base química son insolubles o poco solubles en agua.¹⁵

Con respecto al reto anterior, la nanobiotecnología proporciona las siguientes soluciones a los problemas de administración de fármacos:

- ✓ aumenta el área superficial cuando el tamaño de la partícula se reduce.
- ✓ mejora la solubilización del fármaco.
- ✓ uso de vías de administración no invasivas eliminando la necesidad de administrar fármacos por inyección.
- ✓ desarrollo de nuevas formulaciones de nanopartículas con estabilidades y vidas medias mejoradas.
- ✓ desarrollo de formulaciones para mejorar la absorción de compuestos y macromoléculas insolubles.
- ✓ mejora la biodisponibilidad, reduciendo potencialmente la cantidad de dosis requerida y aumentando la seguridad mediante la reducción de los efectos secundarios.
- ✓ fabricación de formulaciones con tamaños de partícula, morfología y propiedades de superficie controlados serían más eficaces y menos costoso.
- ✓ perfiles de liberación sostenida.
- ✓ mejora el cumplimiento de los regímenes farmacológicos del paciente.^{12,16}

El acoplamiento directo de fármacos a ligandos direccionadores restringe la capacidad de acoplamiento a unas pocas moléculas de fármaco, pero el acoplamiento de nanosistemas portadores de fármaco a ligandos permite el intercambio de muchas moléculas del mismo por medio de un ligando dirigido a receptores. Los nanosistemas ofrecen oportunidades para lograr la orientación de fármacos con objetivos específicos de enfermedades. Las nanopartículas de polímeros biodegradables se han utilizado con frecuencia como vehículos de administración de fármacos debido a su biodegradabilidad, buena encapsulación, liberación controlada y baja toxicidad. Se han revisado varios sistemas de nanopartículas, procesos generales de síntesis, encapsulación, liberación controlada y mejora del efecto terapéutico de fármacos nanoencapsulados (Figura 2).^{3,17}

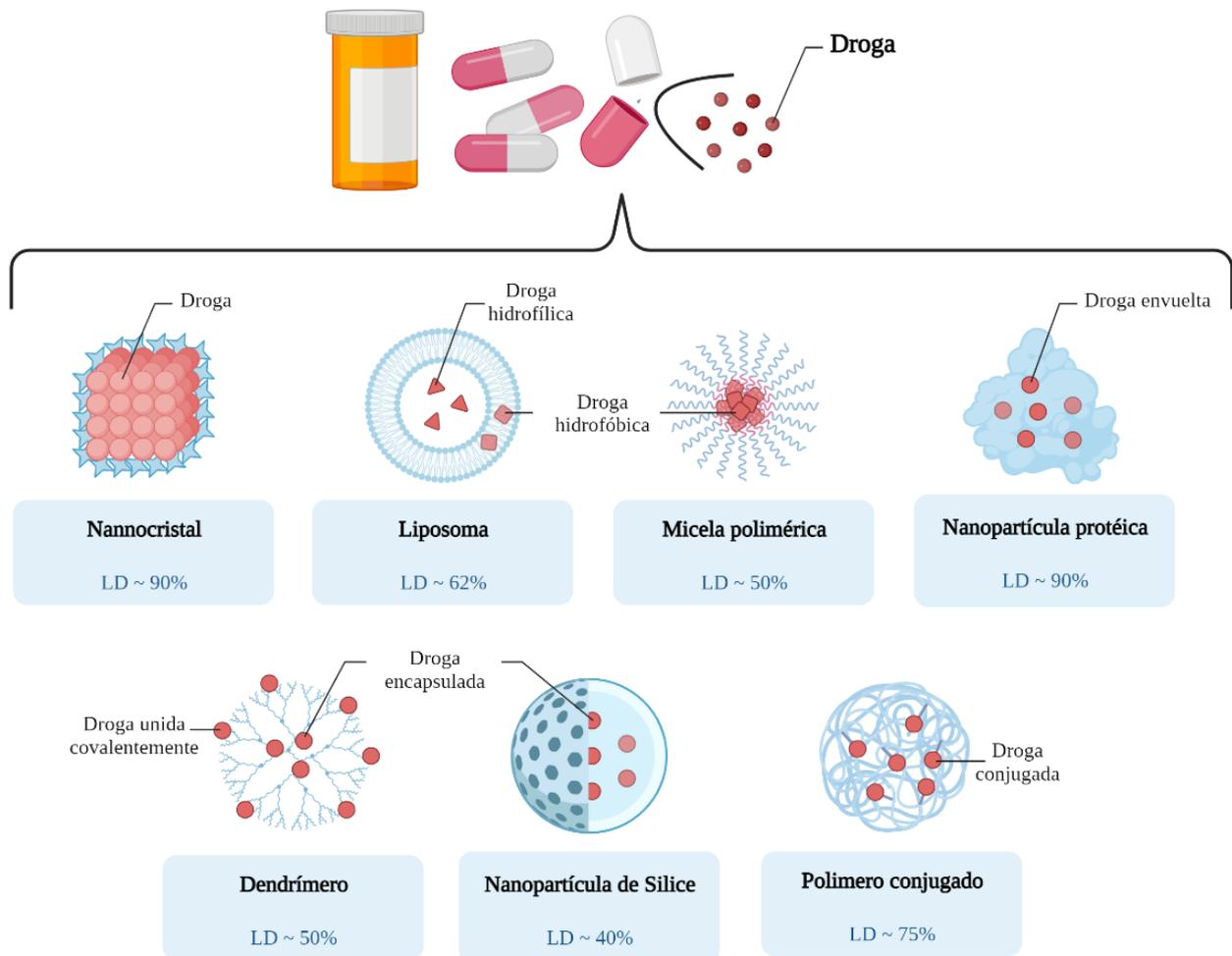


Figura 2. Enfoques de entrega a nanoescala para cargas de moléculas pequeñas. Los nanocristales de fármacos pueden formarse con la ayuda de estabilizadores. Los vehículos

farmacológicos liposomales pueden encapsular fármacos en la bicapa de la micela y/o como cristales de fármaco en el interior. Las micelas poliméricas están compuestas por polímeros anfifílicos que suelen encerrar el fármaco en el núcleo. Los dendrímeros pueden diseñarse para unir covalentemente el fármaco o encapsularlo entre subestructuras. Las nanopartículas de sílice pueden incorporar o adherir fármacos dentro o sobre una matriz porosa. Finalmente, los sistemas de nanoproducción basados en proteínas pueden incorporar fármacos en regiones hidrofóbicas de proteínas y/o entre componentes proteicos. Se muestran las LD= capacidad de carga (del inglés Load Capacity) para cada nanoformulación, basados en biobiografía. El fármaco o droga se esquematiza como una esfera roja. Creado con BioRender.com , adaptado de Manzani et al., 2021.¹⁷

Los nanovehículos con membranas asimétricas pueden permitir la inserción directa de proteínas y por lo tanto su modificación química. Los materiales nanoporosos con gran área de superficie y volumen de poros son especialmente adecuados para los sistemas de administración de fármacos. Además, se pueden utilizar para la encapsulación de células en terapia hormonal.^{3,14}

Nanomateriales

La Organización Internacional de Normalización (ISO) es una organización mundial de organismos nacionales de normalización, define a los nanomateriales como materiales con al menos una dimensión externa que mide 100 nanómetros (nm) o menos o con estructuras internas que miden 100 nm o menos.¹⁹ Dentro de los mismos, se encuentran los nano objetos como un material con una, dos o tres dimensiones externas dentro de la nanoescala (Figura 3).²⁰

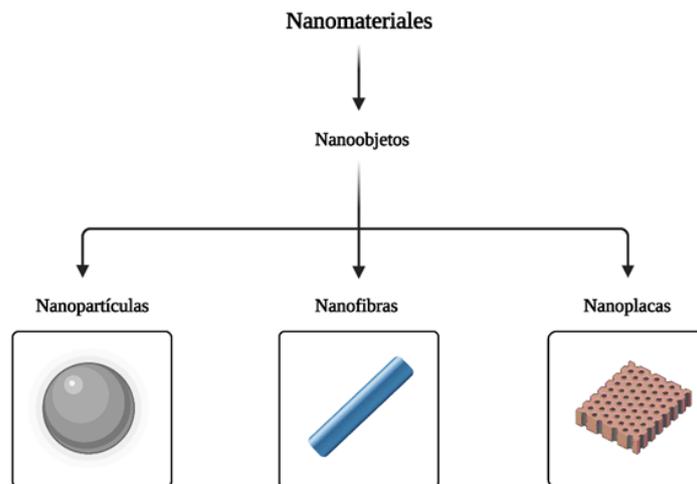


Figura 3. Clasificación en base a la definición ISO de nano objetos, que incluyen las nanopartículas (tres dimensiones), las nanofibras (dos dimensiones) y las nano placas (una dimensión). Creado con BioRender.com, adaptado de Krug et al., 2011.²⁰

Además, de la clasificación de los nanomateriales (NM) según ISO, también se los puede definir según su: procedencia, naturaleza química, origen, y tamaño (Figura 4).

Por su procedencia se clasifican en primer lugar como *naturales*, producidos por árboles, plantas, volcanes, etc. En segundo lugar, como *incidentales* producidos por la combustión de vehículos y/o en procesos industriales etc., *artificiales* (sintética) producidos por diversos procesos de fabricación ya sean top-down o bottom-up.²¹

Por su naturaleza química se pueden diferenciar en orgánicos o inorgánicos, donde los “suaves” son orgánicos y a menudo biodegradables, mientras que los “duros” son inorgánicos frecuentemente insolubles y no biodegradables.

Por su origen se pueden dividir en basados en carbono, es decir, compuestos de carbono que suelen adoptar formas de esferas huecas, elipsoides, como por ejemplo

nanotubos y fullerenos. Como también basados en metales un ejemplo de éstos son DQ. Como la mayoría de los nanomateriales, se pueden combinar.^{22, 25}

Por su tamaño, para ser considerado un nanomaterial, al menos una de sus dimensiones debe pertenecer al rango de escala entre 1 y 100 nanómetros, la distribución del tamaño se basa en la concentración de la media de tamaño.²¹

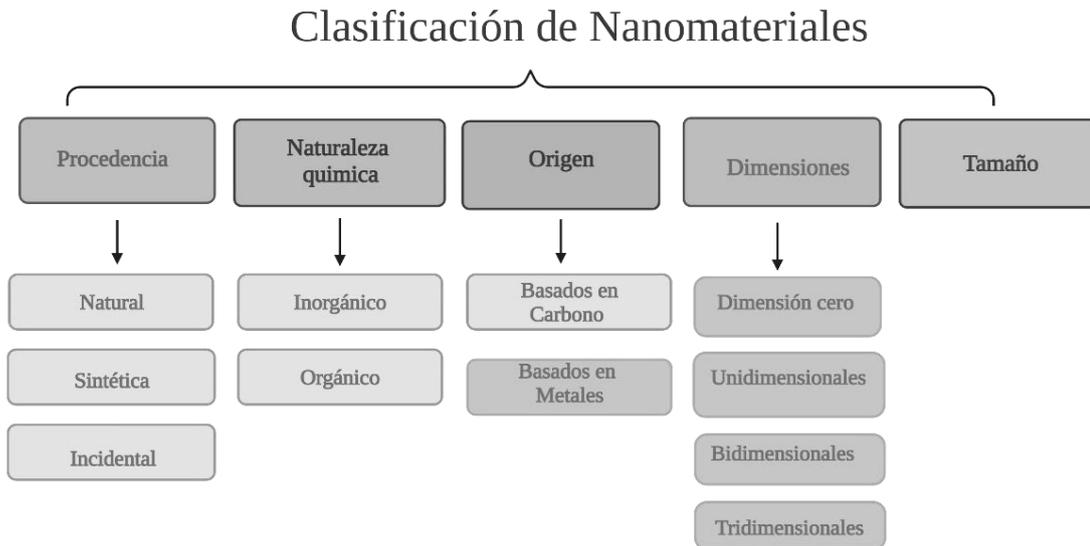


Figura 4. Clasificación de los nanomateriales según: procedencia, naturaleza química, origen, Dimensiones y Tamaño. Creado con BioRender.com.

Por sus **dimensiones**, que se basan en el número de dimensiones del material que están dentro del rango de la nanoescala (<100 nm). Las dimensiones espaciales son muy variables y de una gran influencia en sus propiedades. Atendiendo a su aspecto dimensional, pueden ser clasificadas en cuatro grupos.

- Dimensión cero (0D), donde ninguna dimensión supera los 100 nm, el caso más común son las *nanopartículas de Au y Ag, nanoarcillas, QD*, etc.
- Unidimensionales (1D), se definen como películas delgadas que se han desarrollado y utilizado durante décadas en campos como la química y la ingeniería y la fabricación de elementos electrónicos. El ejemplo más común es el *grafeno*, una red de panal de abeja hecha de átomos de carbono, con muchas aplicaciones prometedoras en áreas relacionadas mayoritariamente a la energía.

- Bidimensionales (2D), a diferencia de las anteriores, dos dimensiones se encuentran fuera de la nanoescala. En particular, sus nuevas propiedades eléctricas y mecánicas son objeto de una intensa investigación científica en los últimos años. Dentro de esta clasificación se encuentran, en primer lugar, los *nanotubos de carbono* que han asumido un papel importante en el contexto de los NM, debido a que son mecánicamente fuertes, flexibles y pueden conducir la electricidad extremadamente bien. En segundo lugar, se encuentran los *nanotubos a base de óxido* se están cuyas aplicaciones son fotocatalíticas y almacenamiento de energía. Por su parte, aquí también se encuentran los *nanocables* que son cables ultrafinos o conjuntos lineales de puntos, formados por autoensamblaje. Estos han demostrado características ópticas, electrónicas y magnéticas notables. Como también se encuentran los *biopolímeros*, como las moléculas de ADN, que ofrecen una amplia gama de oportunidades para la organización de las nanoestructuras.

- Tridimensionales (3D) son materiales que no tienen ninguna dimensión en la nanoescala, por lo que los electrones no están confinados y pueden moverse libremente. Dentro de esta tipología se encuentran materiales nanoestructurados, dispersiones de nanopartículas y las multicapas. Aquí se encuentran los *dendrimeros*, que son moléculas poliméricas esféricas, que se utilizan en aplicaciones convencionales, como revestimientos y tintas, a su vez pueden actuar como moléculas transportadoras y podrían usarse en la administración de fármacos. En este grupo de nanomateriales de tres dimensiones se encuentran las *nanopartículas*.^{21,23,24}

Además de lo anteriormente mencionado, los nanomateriales también pueden presentar una amplia variedad de formas: esférica, cilíndrica, elipsoidal, tubular, helicoidal, campaniforme, arrecifal, dendrítica, en forma de zig-zag o en forma de caja o de jaula.²⁴

A modo de resumen, los NM se pueden crear a partir de minerales o sustancias químicas y sus propiedades fisicoquímicas son diferentes que cuando presentan un tamaño micro o macro. La composición, el tamaño de las partículas, la forma, los revestimientos superficiales y la fuerza de los enlaces de las partículas cambian. El motivo es que al reducirse el tamaño a escala nanométrica, aumenta el área superficial, lo que favorece una

mayor interacción entre átomos y moléculas cercanas, dando lugar a diversas atracciones y repulsiones que provocan efectos superficiales, electrónicos y cuánticos, afectando a los comportamientos ópticos, eléctricos y magnéticos de los materiales.²⁵

Nanopartículas

Las Nanopartículas (Nps) tienen propiedades dependientes del tamaño que son nuevas o mejoradas en comparación con partículas a escala macroscópica, ejemplos son su reactividad química y su comportamiento óptico. Además, las nanopartículas también se pueden organizar en capas sobre las superficies, proveyendo una gran área superficial, y por ende una mejor actividad relevante como por ejemplo catalizadores. A medida que el material se reduce a nanoescala, sus propiedades fisicoquímicas cambian, por ejemplo, dos nanopartículas de oro pueden exhibir un comportamiento diferente (distintas temperaturas de fusión, conductividades eléctricas y colores) simplemente por diferencias en el tamaños de las mismas.^{3,15}

Las Nps pueden (1) aumentar la biodisponibilidad de los medicamentos reduciendo su tasa de degradación (2) realizar una actividad protectora contra la degradación de los fármacos (3) mejorar la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos (4) controlar la liberación de fármacos (5) modificar la farmacocinética (6) aumentar selectivamente la captación celular y (7) dirigirse específicamente a los lugares de la enfermedad.^{26,27}

Las Nps pueden dividirse en dos categorías: A) *inorgánicas* y B) *orgánicas*, basadas en polímeros (Figura 5) siendo estas últimas las más interesantes en el campo biomédico, debido a su alta versatilidad. Si bien, los polímeros sintéticos son más estables y permiten obtener nanopartículas más reproducibles, suelen ser bioincompatibles. Los investigadores han centrado su atención en los polímeros naturales como por ejemplo las proteínas, debido a su renovabilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. Otra ventaja de las proteínas es la posibilidad de utilizar varias metodologías para cargar fármacos, gracias a su estructura primaria definida.^{14,21,28}

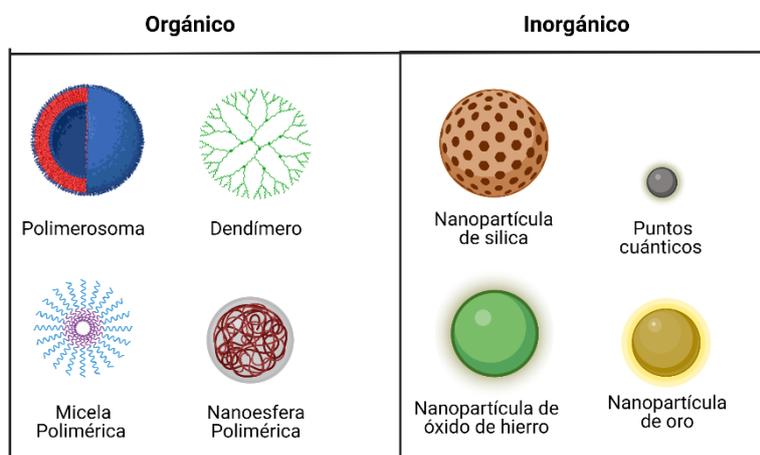


Figura 5. Clases de las nanopartículas A) *Inorgánicas* B) *Orgánicas*. En las primeras se encuentran los puntos cuánticos, nanopartículas de oro, de óxido de hierro, de silica, etc. Mientras que en B) *Orgánicas*, se encuentran, dendrímeros, nanoesfera polimérica, micela polimérica, etc. Creado con BioRender.com, adaptado de Mitchell et al., 2021.²⁸

Cada clase de Nps tiene numerosas y amplias ventajas e inconvenientes, por su lado, las orgánicas tienen como ventajas: control preciso de las características de las partículas; flexibilidad de carga útil para cargas hidrofílicas e hidrofóbicas; fácil modificación de la superficie, etc. Mientras que como desventaja se encuentran la posibilidad de agregación y toxicidad. Por su lado, las ventajas de las inorgánicas son: sus propiedades eléctricas, magnéticas y ópticas; variabilidad de tamaño, estructura y geometría, como desventaja presentan limitaciones de toxicidad y solubilidad.^{27,28}

Aplicaciones de las nanopartículas

Las mismas tienen una gama de aplicaciones, a corto plazo, en nuevos cosméticos, textiles y pinturas, así como métodos de administración dirigida de fármacos a sitios específicos del cuerpo.^{29,30}

En el diagnóstico médico, las Nps se utilizan cada vez más como medios de contraste; también son una herramienta en la terapia del cáncer como agentes de administración de fármacos. Asimismo, las mismas son prometedoras en medicina regenerativa.^{23,24}

Además, las Nps se han desarrollado como una estrategia importante para suministrar drogas convencionales, proteínas recombinantes, vacunas y nucleótidos. Las Nps y otros sistemas de administración de drogas coloidales modifican la cinética, la distribución corporal, la liberación de una droga asociada, el direccionamiento de las drogas en un tejido específico y la reducción de los efectos secundarios. Por lo tanto, las Nps en el sector de la biotecnología farmacéutica mejoran el índice terapéutico y proporcionan soluciones para posibles problemas de administración de nuevas clases de fármacos biotecnológicos, incluidas las proteínas recombinantes y los oligonucleótidos.^{4,10,33}

En suma, una de las aplicaciones más prometedoras de las Nps es en el campo de la medicina. El desarrollo de nuevas terapias y medicamentos basados en la nanotecnología crece rápidamente, debido a las ventajas con respecto a las terapias tradicionales. Esto ha impulsado la diversificación y producción masiva de los nanomateriales de interés biomédico. Es importante considerar que las propiedades únicas de los nanomateriales

influyen en sus interacciones con los factores del entorno y con los seres vivos. Por tanto, es fundamental evaluar la toxicidad potencial que podrían presentar los nanomateriales de interés biomédico en el ambiente y en los sistemas biológicos.^{8,20,27}

Destino e impacto de las nanopartículas en el cuerpo humano

Después de la inhalación, las partículas pequeñas pueden penetrar a través de los diferentes compartimentos tisulares de los pulmones y alcanzar los capilares o células, como los eritrocitos. Estas partículas luego son trasladadas por la circulación a otros órganos como hígado, bazo, riñones, corazón y cerebro, donde pueden depositarse. Por lo tanto, pueden ir a lugares del cuerpo que un mineral promedio no puede. Lo cual es motivo de preocupación en la administración dirigida de terapia contra el cáncer. La decisión final de utilizar una terapia basada en nanopartículas puede depender de una evaluación de riesgo vs beneficio.^{34,35}

Los impactos biológicos de las Nps dependen del tamaño, composición química, estructura superficial, solubilidad, forma, agregación, etc. Estos parámetros pueden modificar su captación celular, unión a proteínas y daño tisular. Los efectos de las Nps dependen de las rutas de exposición que incluyen el tracto gastrointestinal, la piel, los pulmones (Figura 6).^{20,29}

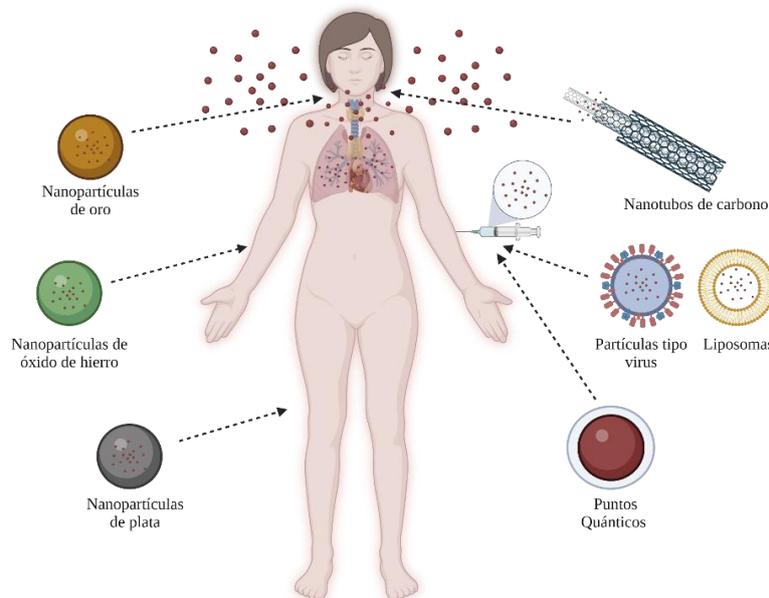


Figura 6. La diversidad de nanofármacos disponibles favorece que puedan tener aplicaciones y vías de administración diversas. Creado con BioRender.com, adaptado de Muñoz et al., 2018.⁸

Debido a la gran diversidad de materiales utilizados y la amplia gama de tamaños de las Nps, los efectos variarán mucho. Es concebible que determinados tamaños de algunos materiales puedan tener efectos tóxicos. En este punto, no se puede hacer una declaración categórica sobre la seguridad de las Nps, la investigación actual está tratando de encontrar formas simples de controlar el grado de toxicidad de una nanopartícula. Este control significa que la partícula será tóxica solo bajo ciertas circunstancias deseables. El uso de nanopartículas degradables y de entrega dirigida, como son *nanopartículas proteicas*, puede superar algunos de los problemas asociados con la toxicidad.^{3,10,36}

Por ende, las *Nps proteicas* puede generar complejos que son más móviles y pueden ingresar a sitios que normalmente son inaccesibles. La desnaturalización o degradación acelerada de proteínas en la superficie de estas puede provocar cambios funcionales y estructurales, incluida la interferencia con enzimas.^{3,10,37}

Nanopartículas proteicas

Son nanopartículas coloidales formadas por polímeros, es decir, macromoléculas compuestas de un gran número de unidades repetitivas. Su organización es sobre una arquitectura molecular de tipo cadena que exhibe una multiplicidad de composiciones, estructuras y propiedades. Las proteínas y los péptidos son uno de los campos de investigación más importantes y fundamentales de la nanomedicina. Ejemplos de los mismos son: insulina, vacunas, anticuerpos y proteínas recombinantes, las cuales se utilizan en el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos para mejorar su función y propiedades.^{16,38}

Las propiedades de las nanopartículas dependen de sus características físicas, químicas y morfológicas. Las nanopartículas coloidales se sintetizan mediante diferentes vías, sin embargo, se considera que existen cuatro principales, cada una de ellas presentan como objetivo la encapsulación de agentes farmacéuticos y su administración dirigida con fines terapéuticos. Según el método de preparación, existen dos tipos de nanopartículas poliméricas: nanoesferas y nanocápsulas. Las primeras son sistemas matriciales esféricos, que tienen el agente activo disperso en una matriz polimérica de manera homogénea. Mientras que las segundas, son sistemas vesiculares que envuelven el agente dentro de una cavidad rodeada por una cubierta polimérica, que controla su liberación dependiendo de su naturaleza. Estas diferencias hacen que ambos tipos de nanovehículos tengan distintas propiedades en cuanto a la forma de liberar la sustancia bioactiva. La selección de la nanopartícula dependerá del método de elaboración, las propiedades químicas, físicas y características del fármaco a encapsular.²⁵

Existen distintos métodos de elaboración de nanopartículas que permiten el encapsulamiento de moléculas hidrófobas e hidrófilas. Los principales métodos de síntesis de nanopartículas son: (1) Método emulsión/evaporación (2) Método de doble o múltiple emulsión (3) Método de difusión de emulsificación (4) Método de Nanoprecipitación.

- (1) Consiste en la emulsión de dos fases, una acuosa con un agente emulsionante y una fase orgánica inmiscible en agua, con un principio activo y un polímero que formará la matriz. Para formar una fase dispersa homogénea se requiere una sonda de ultrasonido, una vez formada la emulsión, comienza la evaporación del solvente orgánico. El polímero precipita encapsulando principios activos

hidrófobos, la polimerización de una emulsión permite crear nanopartículas de tamaño y morfología controlada.

- (2) Este método ha permitido encapsular moléculas hidrófilas gracias a la doble emulsión. Aquí, una molécula hidrófila se une a un surfactante y se disuelven en agua. La emulsión está compuesta por la dispersión de la fase acuosa en una fase orgánica, que presenta un polímero disuelto. Finalmente, la emulsión es sometida a evaporación.
- (3) Utiliza un solvente parcialmente soluble como acetona, en el que se disuelven polímeros o compuestos bioactivos, después, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un estabilizador que evita la agregación de las gotas en la emulsión. Por último, se agrega agua a la emulsión para que se disuelva el solvente y se precipiten las nanopartícula.
- (4) En este método, moléculas bioactivas y el polímero se disuelven en acetona y se añade una solución acuosa que contiene tensioactivos, la acetona es evaporada y las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa³⁸.

Dado que este es el método seleccionado para la síntesis de las nanopartículas de esta línea de investigación, se esquematiza el método de nanoprecipitación (Figura 7).

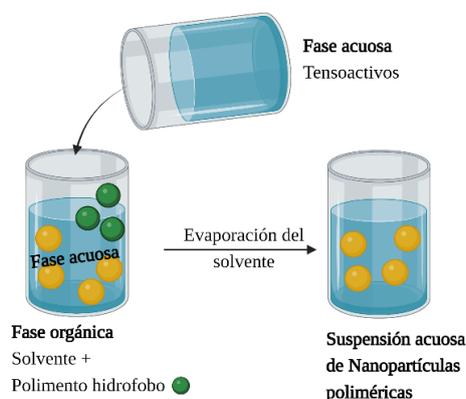


Figura 7. Método de síntesis de nanopartículas poliméricas (nanoprecipitación). Adaptado de Urrejola et al.,2018.³⁸ Creado con BioRender.com.

De esta manera, en la síntesis de nanopartículas hay muchos enfoques que se basan en un equilibrio entre las fuerzas electrostáticas y repulsivas de las cadenas de proteínas. Usualmente para estabilizar las condiciones se utilizan agentes tensioactivos o surfactantes, que disminuyen la tensión superficial. La síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas se ve afectada por: pH, fuerza iónica, disolvente utilizado, temperatura.^{16,39-41}

Caracterización, propiedades y diseño de nanocomplejos

Las características y propiedades de los nanomateriales pueden variar producto de la diversidad en los parámetros y diseños utilizados para su síntesis.

Existen variados materiales empleados como componentes principales de la matriz, pueden tener origen lipídico, proteico, polímeros naturales, semisintético y sintéticos. La estructura química del polímero determinará el comportamiento en términos de encapsulación, degradación y liberación de moléculas.³⁸

Se emplean procesos de síntesis específicos para producir las diversas nanopartículas, recubrimientos, dispersiones o compuestos. Las condiciones definidas de producción y reacción son cruciales para obtener tales características de partículas deseables (Figura 8).^{14,16,42}

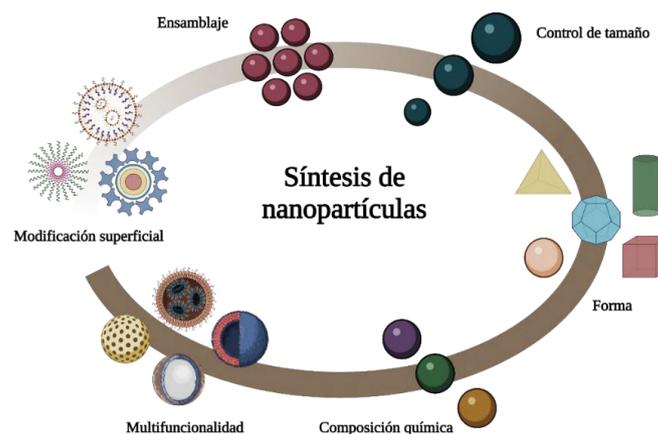


Figura 8. Representación esquemática de diversas propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales que pueden optimizarse desde la síntesis de nanopartículas, como son el ensamblaje, forma, tamaño, composición, funcionalidad y modificaciones superficiales. Creado con BioRender.com, adaptado de Daima et al., 2015.¹¹

Ventajas y desventajas de nanopartículas proteicas

Las propiedades de las nanopartículas de proteínas las han convertido en una de las opciones importantes en la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos. Algunas de las ventajas más importantes son:

✓ Biocompatibilidad

Las proteínas se encuentran entre las principales biomoléculas que componen el cuerpo de todos los organismos vivos y, por lo que, tienen poca toxicidad, en comparación con los polímeros sintéticos. Al absorber agua y crear una repulsión espacial, las proteínas pueden aumentar la estabilidad de las nanopartículas y también reducir el reconocimiento de los nanovehículos por parte del sistema inmunitario.

✓ Biodegradabilidad

Estas moléculas se descomponen en el cuerpo y los aminoácidos que producen son utilizados por los tejidos circundantes para fabricar proteínas o producir energía.

✓ Posibilidad de producción fácil y barata

Las proteínas son abundantes en la naturaleza y son fuentes renovables por plantas, animales, humanos y otros organismos.

✓ Alta capacidad de unión a fármacos.

Las proteínas generalmente tienen muchos tipos de grupos funcionales por lo que tienen la capacidad de unirse y transportar cantidades significativas de fármaco mediante diferentes mecanismos, como interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes.

✓ Direccionamiento

La estructura y secuencia de la proteína, junto a la presencia de numerosos grupos funcionales pueden permitir la unión del fármaco a sitios específicos de la proteína. ^{14,16,41}

A pesar de las diversas ventajas mencionadas con respecto al uso de nanopartículas de proteínas en la administración de fármacos, existen algunas desventajas o limitaciones para el uso de estos polímeros naturales en las industrias farmacéutica y médica, algunas de las más importantes son:

- Las proteínas son polímeros naturales y la mayoría son mezclas heterogéneas de diferentes tamaños con diferentes pesos moleculares. Esta característica reduce la

posibilidad de reproducibilidad y la posibilidad de diferencias en las características del producto en diferentes momentos durante la producción en masa y los usos farmacéuticos industriales. Para superar este problema, los investigadores buscan producir proteínas recombinantes utilizando técnicas de ingeniería genética. Las proteínas producidas por estos métodos son de un solo tamaño y tienen un peso molecular fijo y específico. Al diseñar su estructura, es posible conectar diferentes grupos a su superficie, como factores de orientación y también ajustar la tasa de liberación del fármaco.

- Inmunogenicidad: el cuerpo humano ha mostrado una respuesta inmune a las proteínas extrañas y los diferentes grados de inmunogenicidad se encuentran entre las limitaciones de las nanopartículas de proteínas.

- Conseguir un patrón de liberación adecuado: dado que las proteínas suelen ser moléculas hidrófilas, la mayoría de ellas tienen tasas de liberación lentas y donde las nanopartículas se hinchan cuando entran en el organismo absorbiendo agua y el fármaco se libera al exterior. Por lo tanto, las moléculas enlazadoras químicas, como el formaldehído y el aldehído glutárico, suelen utilizarse para estabilizar su estructura cuando se preparan nanopartículas de proteína.

- La posibilidad de transmitir enfermedades animales como la locura bovina a los humanos cuando se usan fuentes de proteína animal para producir nanopartículas.¹⁶

Kafirina

El uso de nanovehículos de proteína vegetal es un nuevo enfoque en la administración de fármacos, a diferencia de los nanovehículos de proteínas animales, las proteínas vegetales como zeína, gliadina y kafirina tienen una capacidad de liberación de fármacos más prolongada debido a su naturaleza hidrófoba. Además, debido a la alta hidrofobicidad, se pueden producir nanopartículas estables de proteínas vegetales sin la necesidad de tratamientos químicos y físicos ni el uso de moléculas químicas de unión, que usualmente se usan en la fabricación de nanovehículos de proteína animal. Las proteínas vegetales están ampliamente disponibles y son mucho más baratas que las proteínas animales, tampoco corren el riesgo de transmitir enfermedades animales a los humanos. La presencia de diferentes grupos funcionales en estas proteínas hace posible cambiar la superficie de las nanopartículas resultantes para regular las propiedades fisicoquímicas y unirse al sitio de unión.^{16,43,44}

El creciente interés de la investigación en biomateriales basados en proteínas se ha visto estimulado por la demanda de alternativas a los polímeros sintéticos tradicionales que tengan propiedades funcionales ampliadas para dar lugar a un espectro más amplio de aplicaciones. La zeína (prolamina del maíz) ha recibido una creciente atención de la investigación, debido a que es considerada proteína referente. Debido a sus propiedades únicas, como su solubilidad en alcohol acuoso, su naturaleza altamente hidrofóbica y no alergénica, su excelente propiedad de barrera al oxígeno, su reducida susceptibilidad a la degradación proteolítica y su capacidad para soportar el pH gástrico, la zeína se considera superior a otras proteínas, especialmente en las aplicaciones de envasado de alimentos y suministro de fármacos. Actualmente, los proyectos de investigación destinados a explorar la encapsulación de compuestos bioactivos y la administración de fármacos están en pleno desarrollo.^{16,45,46}

Si bien zeína y kafirina pertenecen a la familia de las prolaminas con sus propiedades características de ser soluble en soluciones acuosas de alcohol, alto contenido de prolina y alto rendimiento de amoníaco tras la hidrólisis. Aunque, la principal proteína de almacenamiento del grano de sorgo es la kafirina, debido a su inferior calidad nutricional y desempeño limitado en el tracto digestivo humano, los esfuerzos de investigación se han dirigido a sus aplicaciones como nuevos biomateriales de valor agregado.

Además, en comparación con zeína, kafirina tiene una estructura relativamente más hidrofóbica y menos digerible. En cambio, estas últimas pueden ser una alternativa a la zeína en las aplicaciones de biomateriales. Sin embargo, el esfuerzo por aprovechar su potencial sigue siendo escaso, motivo por el cual es el foco de estudio de esta línea de investigación es con kafirinas.⁴⁷⁻⁴⁹

Se sabe que muchos factores como: composición proteica, pureza, concentración, estructuras secundarias, morfología, concentración, comportamiento de auto ensamblaje; afectan al rendimiento del procesamiento y a las propiedades funcionales de los biomateriales basados en proteínas. Entonces, para desarrollar biomateriales a partir de la kafirina, es necesario comprender en primer lugar sus propiedades (Figura 9).^{40,49}

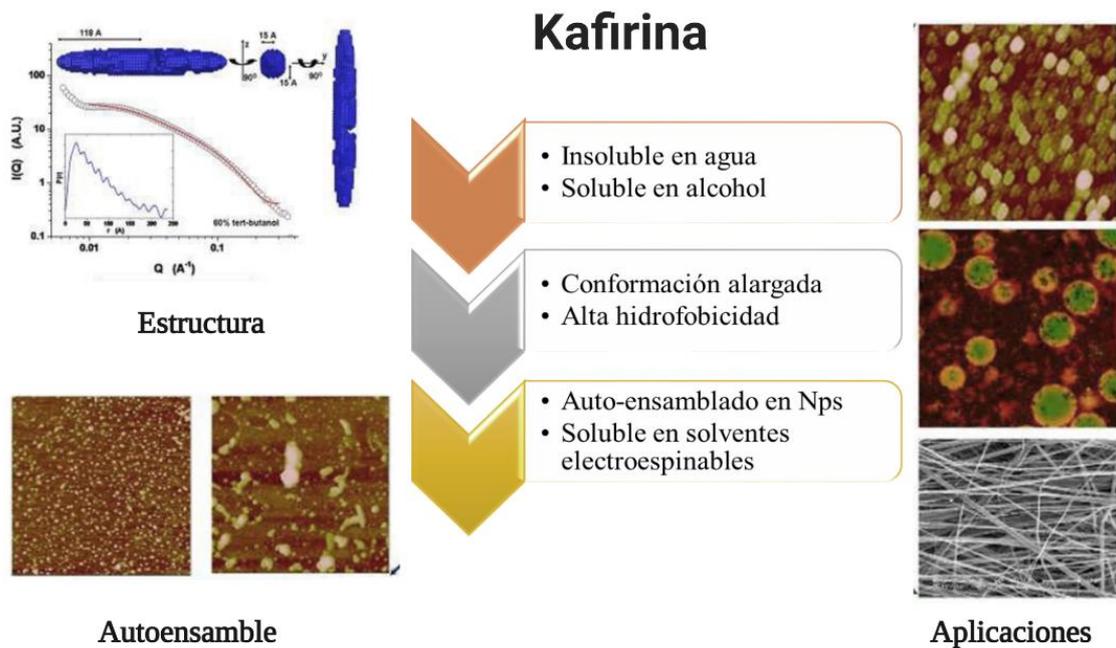


Figura 9. Propiedades fisicoquímicas únicas de la kafirina ponen de relevancia su potencial como recurso atractivo para los productos sin gluten y como bloques de construcción para los sistemas de entrega funcionales. La estructura se corresponde con el perfil de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) de 2 mg/mL de kafirina en tert-butanol al 60%. Creado con BioRender.com, adaptado de Xiao et al., 2016-2017.^{46,50}

Estudios recientes revelaron sus propiedades físicas únicas de: alta hidrofobicidad, buena solubilidad en alcohol acuoso y ácido acético, conformación alargada y la capacidad de autoensamblarse en biomateriales con morfología controlada. Además, dicha proteína ha mostrado un potencial prometedor como ingrediente sin gluten y como un nuevo polímero biodegradable de valor agregado.^{46,51-53}

El contenido de proteínas en el grano de sorgo oscila entre el 7,6% y el 12,5%, se clasifican por su solubilidad: en albúminas solubles en agua, kafirinas reticuladas solubles en alcohol + agente reductor, glutelina soluble en medio alcalino y kafirinas solubles en alcohol.^{49,54}

Estudios anteriores han determinado la secuencia de aminoácidos de la kafirina, pero no se había utilizado las secuencias como medio para predecir la estructura secundaria y la hidrofobicidad de la proteína, lo que tiene el potencial de ofrecer una comprensión profunda de la proteína total de la kafirina (55% α 1, 24% α 2, 18% β , 2% γ) dicha clasificación es en función de su peso molecular, solubilidad y estructura. En base a su estructura secundaria Dianda y col. determinaron su estructura 3D (Figura 10).⁵⁵

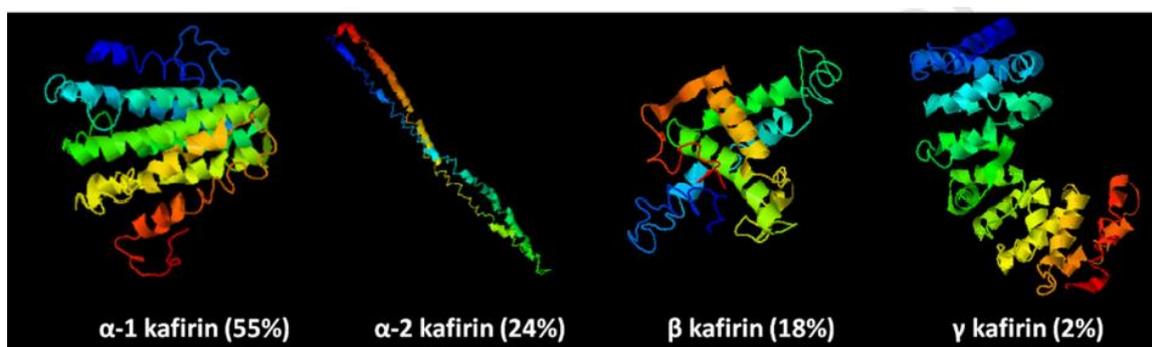


Figura 10. Modelado en 3D de las kafirinas α -1, α -2, β y γ a partir de sus secuencias de aminoácidos, donde se puede observar las distintas conformaciones tridimensionales de las kafirinas. Adaptado de Dianda et al., 2019.⁵⁵

Debido a su peculiar solubilidad y a la propiedad de autoensamblaje inducida por la polaridad del disolvente, la kafirina puede formar partículas submicrométricas (10-1000 nm) o micropartículas ($>1 \mu\text{m}$) mediante nanoprecipitación, (precipitación anti-disolvente). La fabricación tanto de micropartículas como de nanopartículas comienza con la disolución de la proteína kafirina en su disolvente, luego las micropartículas de kafirina se pueden formar en un solo paso, mediante la adición gota a gota sobre un contexto acuoso. El mecanismo subyacente es el enorme aumento de la polaridad del disolvente que conduce a su autoensamblaje en partículas coloidales, principalmente a través de la interacción hidrofóbica y enlaces de hidrógeno. El tamaño de las partículas se puede ajustar mediante la proporción de volumen de la solución madre o stock y el agua. En comparación con las partículas a base de proteínas solubles en agua, las micro/nanopartículas a base de kafirina no necesitan ningún procedimiento de endurecimiento adicional, evitando así el uso de reactivos químicos tóxicos, estas

micro/nanopartículas son especialmente adecuadas para la encapsulación de nutracéuticos insolubles en agua con una mayor eficacia de captación celular.⁵⁹⁻⁶²

Los sistemas de administración de fármacos basados en nanopartículas son capaces de:

1. Proteger los fármacos de la degradación en el tracto gastrointestinal.
2. Ayudar a dirigir la administración de medicamentos a diferentes órganos del cuerpo.
3. Facilitar la administración de medicamentos poco solubles en agua.^{60,61}

Las propiedades fisicoquímicas únicas de la proteína kafirina como su: carácter no alergénico, carácter hidrofóbico, solubilidad en disolventes con bajo punto de ebullición, conformación alargada y capacidad de autoensamblaje inducido por disolventes, han puesto de manifiesto su potencial como recurso alternativo para los productos sin gluten y como vehículo de compuestos bioactivos.⁴⁴

Si se usaron kafirinas como nanovehículo, por ejemplo en partículas coloidales que contienen curcumina,⁴⁶ sin embargo, aún no se ha explorado su uso en la encapsulación de progesterona.

Objetivos

I. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis es preparar y estudiar las propiedades de nanopartículas de kafirina y su uso en la encapsulación de la hormona progesterona.

Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- *Síntesis y caracterización de nanopartículas de kafirina.* Se estudiarán cambios en los parámetros de síntesis y su impacto en las propiedades finales de los nanopencapsulados. Además, se evaluará la estabilidad coloidal de las nanopartículas.
- *Encapsulación de progesterona.* Del objetivo anterior, se seleccionará la estrategia que brinde mejor monodispersidad y estabilidad coloidal en partículas de rango nanométrico y se obtendrán las eficiencias de encapsulación y capacidad de carga para dicha estrategia.
- *Caracterización de encapsulados.* Los nanoencapsulados serán caracterizados según sus propiedades fisicoquímicas, de manera análoga a las nanopartículas de kafirina.
- *Estudios de liberación de la progesterona.* Se estudiará la liberación de la droga en diferentes condiciones de disolución de los encapsulados. Se compararán las cinéticas de liberación en distintas soluciones bufoneadas. Se prestará atención a la estabilidad coloidal de los encapsulados en estos medios.
- *Estudios in vitro con líneas celulares.* Se realizarán ensayos de citotoxicidad en una línea celular epitelial, de cara a una posible aplicación tópica de los encapsulados.

Materiales y métodos

II. Materiales y métodos

A. Materiales

DDGS (granos secos de destilería con solubles) fue donado por Alcoholes del Uruguay (ALUR). Progesterona y BSA se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, EEUU). Tris y ácido acético glacial se obtuvieron de Carlo Erba (Barcelona, España). Acrilamida y Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fueron obtenidas de Applichem (Darmstadt, Alemania). TEMED fue obtenido de Invitrogen y Concentradores de proteína Vivaspin TM 500, 5000 MWCO de GE Healthcare (California, EEUU). SDS fue obtenido de J. T. Baker (Massachusetts, EEUU). APS fue obtenido de Biopack (Buenos Aires, Argentina). Marcador de peso molecular 26619 PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Fisher, Scientific y Columna UHPLC® BEH C18 2.1 X 50 mm de Waters Corporation (Massachusetts, EEUU). Las células HaCaT (MCB-P37) fueron obtenidas del banco de células del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT, Uruguay. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

B. Análisis de concentración proteica: Método Dumas

El método utilizado para medir la concentración proteica de las kafirinas fue por combustión en equipo Dumas, marca LECO, modelo FP-528, realizado en Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). La norma de referencia fue la “AOAC 992.23 International, Washington DC-EE.UU”, que aplica para “Proteína cruda en los cereales, granos y semillas oleaginosas”.⁶² Para ello se pesó 1 gramo de kafirina en la cápsula de aluminio, la cual se cargó en el automuestreador. Se seleccionó el método "CEREAL" con los siguientes parámetros: Factor de proteína: 6,25, Caudal de O₂: 400 ml/min, Factor de O₂: 1,6 ml/mg.⁶³ Se colocó la muestra en el horno de combustión, el cual realizó 3 etapas: purga, combustión y análisis. El tiempo de análisis para una muestra fue de aproximadamente 3 minutos. El resultado final fue expresado en g/100g, que se correspondió a los gramos de proteína/100 gramos de kafirina, parámetro que fue utilizado para estimarla pureza del concentrado proteico.

C. Análisis de proteína por electroforesis

Las muestras obtenidas en cada etapa se analizaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras se dividieron en sólidas y líquidas para su tratamiento, antes de proseguir al sembrado de estas. Todas las muestras fueron preparadas mediante el agregado de buffer de carga con agente reductor (Tris base-HCl pH 6.8, 300 mM, SDS 12 %, Glicerol 30%, Azul de bromofenol 0,6%, β -mercaptoetanol 600 mM) y se incubaron a 95 °C por 10 min.

Las muestras sólidas contaron con un pretratamiento que consistió en el agregado de SDS 10% y la incubación por 10 min a 95 °C. Luego se las centrifugó a 1350 rpm durante 5 min. El sobrenadante de dicha centrifugación se preparó con buffer de carga como previamente descrito y se analizó por SDS-PAGE. El volumen de siembra para todas las muestras fue de 20 μ L. Se corrieron las muestras y el estándar a 120 V durante 1 hora, en buffer de corrida Tris-Glicina 1X (Tris base 30g, Glicina 144g, SDS 10g, con un volumen final de 1L). Por último, se reveló el gel por tinción con azul de coomasie.

D. Extracción y purificación de kafirinas

El método de extracción y purificación de kafirina a partir de DDGS (granos secos de destilería con solubles) se basó en el procedimiento descrito por Li y colaboradores.⁶⁴ A continuación se describen los procesos, tanto para el tratamiento 1 (OT1) con etanol (EtOH), así como para el tratamiento 2 (OT2) con ácido acético glacial. Del mismo modo, las variantes de la extracción con tratamiento 1 (CT1) y tratamiento 2 (CT2).

Extracción con etanol (OT1)

Se colocaron 12 gramos de DDGS pretratado (molido) y se le añadieron 4 volúmenes de (EtOH 70%), hidróxido de sodio (NaOH 0,5%) y metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,4%) solución de partida. La mezcla se incubó a 70 °C durante 1 hora, con agitación magnética a 340 rpm, se dejó enfriar la solución en baño de agua durante 5 minutos y se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm y 23 °C. Luego se llevó a cabo la precipitación de kafirinas, mediante una rápida disminución de la solubilidad, llevando la concentración del sobrenadante de EtOH 70 % a 40 % con agua destilada y se almacenó a -20 °C durante 16 horas. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm y 23°C, durante 20 min, luego se realizaron tres lavados del *pellet* donde se encontraba la proteína de interés. Dichos lavados fueron en 4 mL de agua destilada y centrifugando la solución a 3500 rpm, 23 °C, durante 10 min, descartando los sobrenadantes (SBN). Finalmente, de este modo se logró

extraer y purificar las kafirinas en un concentrado proteico de interés, el mismo se almacenó a -20 °C.

Variaciones en la extracción con etanol (CT1)

Se hicieron 2 variaciones, por un lado, la solución se trabajó sin metabisulfito y la precipitación proteica, se incubó a 4 °C durante 2 horas, en lugar de -20 °C durante 16 horas.

Extracción con ácido acético glacial (OT2)

Se colocaron 12 gramos de DDGS pretratado (molido) y se le añadieron 5 volúmenes de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,5 %) durante 16 horas. Luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, se mezcló el *pellet* con 5 volúmenes de ácido acético glacial durante 1 hora, y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. Consecutivamente, se llevó a cabo la precipitación de kafirinas, mediante un ajuste de pH del sobrenadante a pH 5.0 con NaOH (50 %), se incubó a 4 °C durante 19 horas. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm, durante 30 min, luego se realizaron tres lavados del pellet donde se encontraba la proteína de interés. Dichos lavados fueron en 4 mL de agua destilada y centrifugando la solución a 3500 rpm, durante 10 min, descartando los sobrenadantes. Finalmente, de este modo se lograron extraer y purificar las kafirinas en un concentrado proteico de interés, el cual se almacenó a -20 °C.

Variaciones en la extracción con ácido acético glacial (CT2)

Se hicieron 2 variaciones, por un lado, el *pellet* se trabajó con 2 volúmenes de metabisulfito, en lugar de 5 volúmenes, y por el otro durante la precipitación proteica, se incubó a 4 °C durante 2 horas, en lugar de 19 horas.

E. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de kafirinas

La determinación de la estructura secundaria de las kafirinas se realizó mediante FTIR. Para ello se fabricó una pastilla de KBr, colocando 2 mg de kafirina en 200 mg del haluro, utilizando un mortero de ágata. Luego la mezcla sólida resultante se sometió a una presión de 10 toneladas durante 2 minutos, con una prensa hidráulica de mano Pike Crush IR™ Technologies, generando un disco transparente. Los espectros colectados fueron procesados con ajuste de la línea de base, utilizando el equipo IR Prestige-21 Shimadzu (Japón).

F. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de kafirinas

Las muestras, por duplicado, fueron equilibradas en 25 °C, luego se sometieron a una isoterma durante 1 minuto, y finalmente se les aplicó una rampa de 25 °C a 250 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La atmósfera inerte se mantuvo mediante la purga de nitrógeno a una tasa de flujo de 50 mL/min, utilizando el equipo DSC Q2000, TA Instruments.

G. Cuantificación de progesterona

Colorimétrica

La determinación de progesterona se basó en especificaciones de Maliwal y colaboradores ⁶⁵, que valida el método de espectrometría UV para la cuantificación de dicha droga, la cual presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 253 nm. Se realizó una curva de calibración a partir de un stock de 10 mg/mL de progesterona en etanol 70 %. De esta manera se obtuvo una curva de calibración que va en el rango de 0,2 – 3 µg/mL. Las mediciones se realizaron por triplicado, utilizando como blanco etanol 70 %, en una microplaca UV de 96 pocillos. El resultado de cada medida es un promedio de tres lecturas, utilizando lector de placas TECAN Infinite M 200 Pro.

Análisis en cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC)

Este método fue basado en las especificaciones de Maliwal y col. ⁶⁵ donde se valida el método de HPLC para la cuantificación de dicha droga. Se realizó una curva de calibración a partir de un stock de 10 mg/mL de progesterona en etanol 70 %, y se realizaron las diluciones correspondientes en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 para las concentraciones de: 0,5 – 22 µg/mL de progesterona.

Las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm por 15 minutos. Posteriormente se filtró cada muestra con un filtro de 0,22 µm tratado con polivinilpirrolidona (PVP) al 2% y se procedió a su análisis por UHPLC. La concentración de progesterona presente en las muestras de nanoencapsulados de progesterona fue analizada utilizando un equipo de HPLC/UHPLC Shimadzu Nexera X2 (Kioto, Japón), con un detector de arreglo de diodos. La columna utilizada fue C18, la fase móvil fue metanol: agua (80:20). La detección se llevó a cabo a 25 °C a 254 nm con un flujo de 1 mL/min. Cada inyección fue de un volumen de 20 µl. Se registraron los tiempos de retención de progesterona de 1,0 min. Las muestras fueron analizadas utilizando el software LabSolutions de Shimadzu (Kioto, Japón).

H. Estrategias de síntesis de nanopartículas de kafirina

Las partículas de proteínas se dividen en *solubles e insolubles* en agua. Las típicas *solubles* son: proteína de suero, proteína de clara de huevo, proteína de soja y gelatina. Para las cuales el tratamiento térmico es el método más comúnmente utilizado en la agregación y el ensamblaje. Debido a que el calor desnatura las proteínas solubles y expone los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, lo que lleva a un aumento de las interacciones hidrofóbicas y la formación de enlaces disulfuro para impulsar la agregación de proteínas y formación de partículas. Sin embargo, el comportamiento de agregación inducido por el calentamiento suele formar grandes agrupaciones incluso gelificación. Por lo tanto, la fuerza mecánica mediante agitación trituración u homogeneización se utiliza simultáneamente para reducir el tamaño y la distribución de tamaño de partícula.¹⁶

Por su parte, partículas de proteína *insolubles* en agua o proteínas lipofílicas como son: zeína, gliadina y kafirina son materiales prometedores para formar partículas blandas de alta actividad superficial sin embargo la escasa solubilidad de estas proteínas limita en gran medida sus aplicaciones. Debido a la naturaleza insoluble de estas proteínas no se puede utilizar tratamientos térmicos o de reticulación que normalmente se producen en condiciones acuosas.⁹⁹

Por lo tanto, el método anti disolvente se ha convertido en una técnica popular y se ha demostrado que es muy eficaz para preparar partículas insolubles basadas en proteína. En dicho método, las proteínas insolubles se disuelven en un solvente orgánico que luego se inyecta en la fase acuosa. Impulsado por las interacciones hidrofóbicas, este procedimiento conducirá al autoensamblaje espontáneo de las moléculas de proteínas para formar dispersiones coloidales en agua. Por lo general se requieren fuerzas mecánicas para reducir el tamaño de las partículas. Etanol y ácido acético son los disolventes más utilizados y cumplen los requisitos de seguridad en la industria alimentaria. Las propiedades fisicoquímicas finales de las partículas de proteínas fabricadas dependen de múltiples factores como: la concentración de proteínas, la composición del disolvente, la velocidad de inyección y la velocidad de agitación. Se esquematiza la síntesis de nanopartículas de kafirina (Figura 11).^{41,99-101}

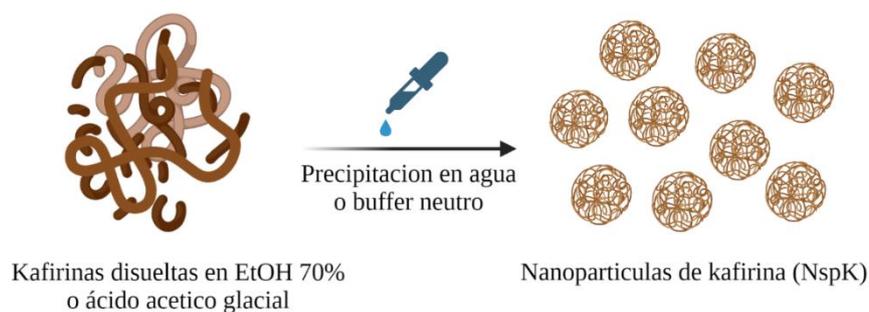


Figura 11. Método de preparación o síntesis de nanopartículas de kafirina mediante el método anti-disolvente. Creado con BioRender.com

Las nanopartículas de kafirina (NspK) fueron sintetizadas utilizando el método de “*precipitación anti-disolvente*” siguiendo las especificaciones de Taylor y col.^{53,66} con algunas modificaciones. La puesta a punto de la síntesis de dichas nanopartículas se llevó a cabo mediante el ensayo de varias estrategias que se enumeran a continuación.

A: Síntesis de nanopartículas con etanol en volumen final de 2 mL

Para la formación de nanopartículas de kafirina (NpsK) se añadieron 10 mg de kafirina en 1 mL de EtOH 70%. Esta suspensión permaneció durante una hora en roller mixer para promover la homogeneidad. Posteriormente gotearon 300 μ L a 60 μ L/min mediante el sistema de bomba de jeringa Legato 110 DRS de KD Scientific. El goteo se realizó sobre 1,7 mL de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 contenido en un vial. La suspensión se encontraba bajo agitación magnética a 340 rpm a 25 °C (temperatura ambiente).

A': Síntesis de NP con ácido acético glacial en volumen final de 2mL

La formación de NpsK se hace de manera análoga a la estrategia A, donde la solubilización de kafirina es en 300 μ L de ácido acético glacial absoluto. No se observaron diferencias visuales significativas en el producto de síntesis.

B: Síntesis de NP en un volumen final de 20 mL, agitación magnética

Se llevó a cabo el escalado de la síntesis de nanopartículas con ambos disolventes, etanol 70% y ácido acético absoluto, para ello se colocaron 0,4 gramos de kafirinas en 6 mL de etanol 70% y 3 mL de ácido acético absoluto. Esta suspensión permaneció durante una hora en roller mixer para promover la homogeneidad. Posteriormente se gotearon 3 mL a 60 μ L/min mediante el sistema de bomba de jeringa Legato 110 DRS de KD Scientific. El goteo se realizó sobre 17 mL de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0, contenido en

un vaso de bohemia. La suspensión se encontraba bajo agitación magnética a 340 rpm a 25 °C.

C: Síntesis de NP en un volumen final de 20 mL, agitación con paletas

Se aplica el mismo procedimiento que la estrategia B, se varió la agitación, en lugar de ser magnética a 340 rpm, se realizó a 100 rpm con un agitador con paletas. Este enfoque metodológico se realizó tanto para kafirinas disueltas en etanol 70 % como ácido acético glacial (Figura 12).

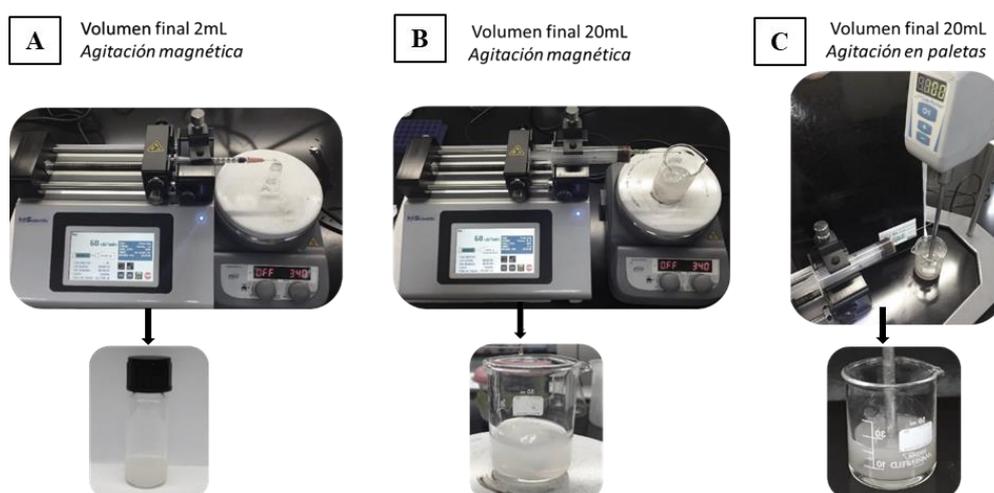
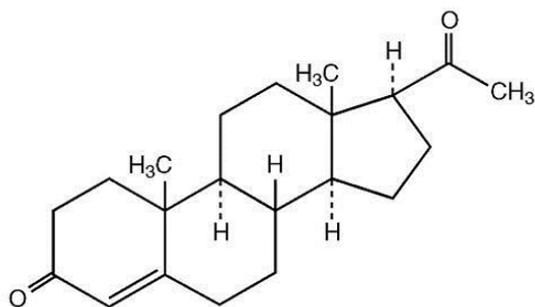


Figura 12. Resumen de las distintas estrategias de síntesis de NspK, las tres se realizaron tanto en ácido acético como en etanol 70%, se observan debajo los distintos productos de síntesis.

I. Encapsulación de progesterona en NspK

La progesterona es un componente fisiológico clave del ciclo menstrual, reproducción y biosíntesis de hormonas como: aldosterona, cortisol, estradiol y testosterona. Éstas son responsables de innumerables funciones como: regulación de la presión arterial, respuesta bajo estrés y baja concentración de glucosa en sangre, desarrollo de características sexuales secundarias femeninas y masculinas. Además, es necesaria para la implantación exitosa del embrión y el mantenimiento del embarazo. Asimismo, dicha droga tiene muchas funciones importantes como: anticoncepción, apoyo a la fase lútea, tratamiento del sangrado uterino disfuncional y endometriosis. Evidenciando el papel importante que tiene la progesterona en la respuesta inmune, prevención y tratamientos contra el cáncer (Figura 13).^{94,111-113}



Estructura de Progesterona

La Progesterona es clave para:

Reproducción
Control de natalidad
Características sexuales secundarias
Equilibrio de sal y agua, regulación de la presión arterial
Adaptación al estrés
Termorregulación
Protección contra tumores
Neurogénesis y neuroprotección.

Figura 13. Estructura química y aplicaciones de progesterona. Adaptado de Nagy et al., 2021.¹¹¹

Los encapsulados de progesterona (NpsK-Pr) fueron sintetizados de manera análoga a la estrategia A de las NpsK. Para ello se añadieron 10 mg de kafirina en 1 mL de progesterona 20 µg/mL en EtOH 70%. Esta suspensión permaneció en roller mixer y se goteó de la misma manera que NpsK.

La *eficiencia de encapsulación (% EE)* fue definida como:

$$\% EE = \frac{[Progesterona]_i - [Progesterona]_s}{[Progesterona]_i} * 100$$

Donde $[Progesterona]_i$ es la concentración inicial de progesterona mezclada con kafirinas previa a la síntesis de las nanopartículas y $[Progesterona]_s$ es la concentración evaluada en el sobrenadante luego de centrifugar las nanopartículas sintetizadas.

Evaluación del rendimiento de encapsulación

Una vez finalizada la síntesis, se concentraron los nanoencapsulados centrifugando la solución a 10000 rpm por 20 min, quedando las NspK-Pr en el *pellet*. Consecutivamente para remover kafirina que no se encapsuló y que pudo haber quedado retenida físicamente en el *pellet* se llevaron a cabo dos lavados de éste en 2 mL de EtOH 20% (v/v), centrifugando a 10000 rpm durante 10 minutos luego de cada lavado. Finalmente, la cuantificación de progesterona liberada que contienen las NpsK-Pr, se volvió a resuspender el *pellet*, en este caso en 2 mL de EtOH 90 % (v/v) con agitación suave con vortex durante 30 min.

El *Rendimiento (% R)* fue definido como:

$$\% R = \frac{[Progesterona]_l * 100}{[Progesterona]_i - [Progesterona]_s + l}$$

Donde $[Progesterona]_l$ es la concentración de progesterona liberada luego de incubar las NspK-Pr con EtOH 80% durante 30 minutos, $[Progesterona]_i$ es la concentración inicial de progesterona mezclada con kafirinas previa a la síntesis de las nanopartículas y $[Progesterona]_s + l$ es la concentración evaluada en el sobrenadante luego de centrifugar las nanopartículas sintetizadas y subsiguientes lavados, se midió en el UV-visible.

J. Caracterización fisicoquímica de NspK y NspK-Pr

Las medidas de los diámetros o radios hidrodinámicos se llevaron a cabo por *Dispersión dinámica de luz (DLS)*, los ensayos se realizaron adicionando 1950 μL de agua destilada filtrada con filtro 0,22 μm , junto a 50 μL de la suspensión de nanopartículas en una celda de cuarzo de 2 mL. Se utilizó el equipo Nanoplus, Particulate Systems, donde se establecen las condiciones en el SOP, como son la constante dieléctrica 78,3, viscosidad 0,88 cP, índice de refracción 1,3328, campo dieléctrico 15,27 V/cm, Intensidad 0,10 mA y ángulo de dispersión 15° en diluyente agua.

El *Potencial Z (PZ)* se midió añadiendo 100 μL de la suspensión de Nps a 10 mL de agua destilada. La muestra se inyectó en una celda capilar, se establecen las condiciones de trabajo como son la movilidad electroforética de 3,2 cm^2/Vs , la conductividad de 0,1277 mS/cm y el diluyente agua.

K. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se llevó a cabo en las instalaciones de ICMA (Instituto de Ciencias y Materiales de Aragón) Universidad de Zaragoza, España. Las muestras se secaron mediante un proceso de liofilización, luego se depositó sobre una cinta adhesiva de carbono, para luego recubrirlas con una película de 14 nm de paladio (ya que las muestras no son conductoras). Se trabajó a bajo voltaje (10 kV), se seleccionó la determinación EDT (Imágenes con electrones secundarios y topografía por medio de un detector ETD (del inglés Everhart-Thornley Detector), en el equipo CSEM-FEG INSPECT F50.

L. Estudios de estabilidad

En el tiempo

El estudio de estabilidad de las nanopartículas (NpsK) y nanoencapsulados (NpsK-Pr) en el tiempo se realizó mediante la medida de variaciones de tamaño y distribución de poblaciones (PDI) como se mencionó anteriormente. Para ello, se almacenaron las muestras a 4 °C en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 y se midieron alícuotas de

ambos productos de síntesis, cada 7 días, durante el período de 30 días. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

Variando el pH

El efecto del pH tanto para NpsK como NpsK-Pr se realizó liofilizando las muestras y posteriormente diluyendo en agua a una concentración de 0,1 mg/mL. Se evaluaron las muestras a pH 3, 5, 7 y 10 con estándares respectivamente midiendo su potencial Z. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

M. Simulación del tracto digestivo (ITG)

La bioaccesibilidad de las nanopartículas y nanoencapsulados se estudió aplicando el modelo gastrointestinal basado en los trabajos de Wei y col.⁶⁷ con algunas modificaciones. Se preparó fluido gástrico simulado: SGF (KCl 5,52 mM, KH₂PO₄ 0,72 mM, NaHCO₃ 20,00 mM, NaCl 37,76 mM, MgCl₂.6 (H₂O) 0,08 mM, NaHCO₃ 0,40 mM, HCl 22,48 mM, CaCl₂.2(H₂O) 0,07 mM, Lecitina 0,17 mM y Pepsina 2000 U/L), basado en los trabajos de Davidov y colaboradores.⁶⁸

Se preparó una suspensión de 6 mL de NspK-Pr y se le añadieron 12mL de fluido gástrico con una proporción (1:2) respectivamente, cuyo volumen final fue de 18 mL. Como control de nanopartículas de kafirina vacías, se mezclaron 6mL de NspK con 12mL de SGF, mismo volumen final. Se realizaron controles de NspK-Pr y NspK de manera análoga, incubados en agua (1:2) en lugar de SGF. Se le sumó un control de SGF, el cual contenía solo fluido gástrico. A las muestras, NspK-Pr, NpsK tanto en SFG como en agua, junto al control de SGF, se ajustó el pH a 1.2 con HCl 1 M. Posteriormente, se incubaron con agitación a 150 rpm a 37°C, durante 2 horas. Se tomaron alícuotas cada 30 minutos durante 2 horas.

Dichas alícuotas se midieron utilizando el Kit ELISA *Progesterone* (bovine) de Eurofins Abraxis (ref PN5081M). Se seleccionó el mismo ya que las matrices nombradas anteriormente son complejas, como la matriz de las nanopartículas. El protocolo cuantitativo de dicho kit fue el siguiente: en primer lugar, se tomaron 25 µL de las muestras: NspK y NsK-Pr en SGF y en agua, junto al control de SGF a tiempo cero, el cual se consideró cuando se ajustó el pH de NsK-Pr en SGF, todas las medidas se sembraron por duplicado en la placa. Luego se añadió 100 µL de conjugado enzimático en cada pocillo, se homogenizó y se incubó por 20 minutos.

Posteriormente se realizaron tres lavados con 300 μL de buffer de lavado 1X. Luego se removió el líquido, se agregó 100 μL de solución sustracto (color) en cada pocillo, se incubó por 10 minutos en la oscuridad. Finalmente se agregó 50 μL de solución stop para medir la absorbancia a 450 y 620 nm. Se repitió el procedimiento para las muestras cada 30 minutos, hasta 120 minutos, tiempo final del ensayo de ELISA.

Se cuantificó la cantidad de Pr dentro de los nanoencapsulados cuando se simulan las condiciones del tracto digestivo, porque es importante estudiar la biocompatibilidad.

N. Citotoxicidad de las nanopartículas y nanoencapsulados

La citotoxicidad de las nanopartículas fue evaluada por el ensayo *MTT* (ref TA535) y se utilizó la línea celular queratinocito humano (HaCaT). Las células se propagaron en un medio de cultivo llamado medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10 % de suero fetal bovino (FBS). Se utilizaron cultivos confluentes (80-90%) para estudiar la viabilidad de NpsK como NpsK-Pr en dicha línea celular. Se colocaron 50.000 células/pocillo en un volumen de 100 μL de medio de cultivo en microplacas de 96 pocillos, y luego se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda, con un 5% de CO₂ en una incubadora de cultivo. Consecutivamente, se prepararon diluciones de NpsK como NpsK-Pr en DMEM de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ en el pocillo.

Se realizaron los respectivos controles: *control de vivas*: con 100 μL /pozo de medio de cultivo, *control de progesterona* y *control de muertas* con 100 μL /pozo de medio. Después de la incubación, se retiró el medio y fueron incluidos a la placa tanto los controles como las distintas diluciones de las Nps. Se volvieron a incubar 24 horas a 37 °C, después de dicha incubación descartar medio. Posteriormente se colocaron 80 μL de medio junto a 20 μL MTT (0,5 mg/mL por pocillo). Para luego llevar a cabo una incubación de 1,5 horas a 37°C, 15 minutos de que culmine la misma, se colocó Tritón X-100 a una concentración de 0.5 mg/mL por pocillo. Se continuó con la incubación de 1,5 horas hasta la formación de cristales púrpuras, visibles bajo el microscopio óptico. Finalmente, el medio de todos los pocillos fue descartado, se añadieron 100 μL /pozo de Dimetilsulfóxido (DMSO) y se midió la densidad óptica (OD) con lector de placas TECAN Infinite 200 PRO a 570 nm. Los datos se normalizaron contra el control de vivas y fueron analizados con el software Megallan.

Resultados y discusión

III. Resultados y discusión

La producción de bioetanol consiste en convertir almidones y azúcares de la materia prima (sorgo) en etanol. El principal subproducto derivado lo constituyen los “granos secos de destilería con solubles” (DDGS) con un 88% de materia seca.

Los DDGS cuenta con alto porcentaje de kafirinas, atendiendo a las tendencias de biorrefinería, en este trabajo se estudió el aislamiento de las kafirinas de este residuo industrial, obtenidos por ALUR, S.A colaboradores en el proyecto *Valorización de las proteínas del DDGS* (FSI_D_2016_1_126313). Esta sección del trabajo se realizó en colaboración con Dra. Blanca Gómez-Guerrero y Msc. Analía Martínez, ambas de la Fundación LATITUD, Parque tecnológico del LATU, Montevideo, Uruguay.

A partir de este desecho industrial, se extrae y purifica el aislado proteico (kafirina). Con el fin de estudiar la química del sorgo, los DDGS y las kafirinas se utilizó el método de DUMAS (Tabla 1).^{56,69-72}

Análisis y química del sorgo y DDGS

Se estudió su composición mediante métodos gravimétricos, este ensayo permitió determinar la cantidad de proteína, humedad y cenizas (Tabla 1).⁷³⁻⁷⁵

Tabla 1. Caracterización del grano de sorgo y DDGS provenientes de ALUR.

Parámetros *	Sorgo	DDGS
Humedad %	13,9	11,1
Cenizas (g/100g) †	1,3	5,3
Proteína (g/100g) †	7,25	32,6

*Obtenido mediante método DUMAS. † Promedio de muestras en base seca vs base húmeda.

La cantidad de proteína que contenía el sorgo fue de 7,25% valor menor si se los compara con: 8,9% de proteína bruta según FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, España), 8,7% según CVB (Holanda), 9,4% INRA (Francia) y 9,36% NRC (EE. UU.).

Por su parte, los DDGS contienen 32,6% de proteína, valor próximo a estudios reportados por su lado Bruni y colaboradores,⁶⁹ que también trabajaron con DDGS provenientes de ALUR, obtuvieron un valor de proteína de 31,4%. A su vez, concuerda con antecedentes

de Lau y col.⁷⁶ que reportaron un 31,8%, así como con Li y colaboradores,⁷⁷ con un 30,8% de proteínas. En contraparte, Wang y col.⁷⁸ obtuvieron 35,5% de proteína, mayor porcentaje reportado.

Si bien la línea de investigación se enfoca en la extracción de proteínas, para luego utilizarlas en la formación de micro o nanopartículas, los DDGS presentan un importante % de materia grasa y de fibras, que podrían ser estudiadas en futuros proyectos.

Extracción y purificación de kafirinas

Los subproductos de destilería se obtienen mediante secado de los residuos del proceso de obtención de etanol como biocombustible, a partir de diversos ingredientes ricos en almidón, en su mayoría son cereales como: maíz, trigo, cebada, sorgo, etc. El proceso consiste en convertir los almidones y azúcares de la materia prima inicial en etanol. Por tanto, en el producto final se reduce drásticamente el contenido en hidratos de carbono no estructurales y se concentra proporcionalmente el porcentaje del resto de nutrientes, en este caso el producto final se correspondería a las kafirinas.^{40,56,73}

Partiendo de muestras de DDGS proporcionadas por ALUR, se realizaron diferentes estrategias de purificación, de manera de optimizar los tiempos de reacción, reactivos, sin comprometer la cantidad y calidad del aislado proteico. Esta sección también se trabajó en colaboración con Fundación LATITUD, Parque tecnológico del LATU, Montevideo, Uruguay. Con el fin de obtener un preparado de alto nivel de pureza de kafirinas para abordar posteriormente la síntesis de nanopartículas, el primer objetivo es estudiar diferentes estrategias de purificación.

Pureza de los concentrados proteicos

Se estudiaron diferentes procesos de purificación, con el fin de determinar si las variaciones en los protocolos de los tratamientos originales (OT) afectan la pureza del concentrado con etanol y ácido acético denominado (OT1 y OT2) respectivamente. Para ello, se diseñaron dos variantes denominados tratamientos combinados (CT1 y CT2) (Tabla 2).

Tabla 2. Pureza obtenida de los distintos tratamientos de purificación de kafirinas.

Muestra	% Pureza Promedio	
Kaf- EtOH (OT1)	89,9 ±	0,1
Kaf- EtOH (CT1)	93,1 ±	0,3
Kaf - AA (OT2)	81,2 ±	1,3
Kaf - AA (CT2)	86,0 ±	1,7

Si se comparan dichos resultados con antecedentes, Lau y colaboradores⁷⁹ determinaron que las harinas integrales crudas contenían 10% de proteína. Luego del proceso de extracción el % de proteína se subió al 68%. Todos los porcentajes anteriores son menores a los del presente trabajo (81,2% y 86,0 %, OT2 y CT2 respectivamente). Las purezas fueron estudiadas por el método de DUMAS (AACC 46-30) con un factor de 5,7.

Por su parte, Ponteri y col.⁸⁰ aplicaron un proceso de extracción de kafirinas muy similar a OT1, con la diferencia que la precipitación proteica la llevaron a cabo ajustando el pH=5 con HCl 1M, mientras que en OT1 fue mediante una rápida disminución de solubilidad, llevando la concentración de EtOH 70% a 40%. Esto podría explicar porque los autores obtuvieron una pureza menor de 51,83% en comparación con OT1. Con respecto al procedimiento de extracción con ácido acético glacial, tanto el reportado como OT2 son muy similares, exceptuando que los mismos realizaron un paso de diálisis antes de ajustar el pH, que se realizó en OT2. En suma, las purezas son menores a las obtenidas en OT1 y OT2, los autores determinan el % de proteína aplicando el método de Kjeldahl (AOAC, 920.87), mientras que en este se utilizó método de DUMAS (AOAC, 992.23).

Análogamente, Wang y colaboradores⁷⁸ realizaron un procedimiento de extracción de kafirinas en ácido acético glacial con una pureza del 98,94%, mayor al de OT2 (81,2%) e incluso CT2 (86,0%). Esto podría atribuirse a que los autores partieron de 75g de DDGS con 10 volúmenes de solvente, a diferencia de OT1 y CT1 donde se partió de 12g DDGS con 4 volúmenes de este. De igual forma, Li y col.⁷⁷ realizaron el procedimiento de extracción de kafirinas a partir de DDGS, tanto con ácido acético como etanol. Reportaron una pureza para el tratamiento con ácido acético de 87,77% mayor que OT2 y CT2. Mientras que para el tratamiento con etanol fue de 93,05% nuevamente mayor que OT1, pero levemente menor que CT1 (93,1%).

Los autores argumentan que cuando se usó ácido se usó una solución de NaOH para ajustar el pH. Durante este paso, se pudo formar una sal de acetato de sodio, lo que puede explicar por qué la extracción con ácido acético tenía una pureza más baja que la extracción con etanol.

En suma, los tratamientos CT1 y CT2 muestran una mejor pureza que los originales con ambos disolventes, siendo el tratamiento que logra la mejor pureza el CT1.

Perfil electroforético de las fracciones de la extracción

Con el fin de hacer un seguimiento del proceso de extracción de kafirina mediante ambas estrategias, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida de OT1 y OT2, donde se sembraron diferentes fracciones del proceso (residuos, sobrenadantes). Los concentrados proteicos se observan como una ancha que se corresponde con $\alpha 1$ y $\alpha 2$ kafirina (~ 21 a 23 kDa) según bibliografía. Por su lado, la banda en ~ 47 kDa se corresponde al polipéptido γ . Sin embargo, existe cierta ambigüedad en la literatura sobre la banda en ~ 50 kDa porque se ha reportado que se separa en polipéptidos más pequeños en condiciones reductoras, lo que sugiere la posibilidad de un dímero. También bandas débiles por encima de los 70 kDa correspondientes a oligómeros (Figura 13).⁸¹⁻⁸³

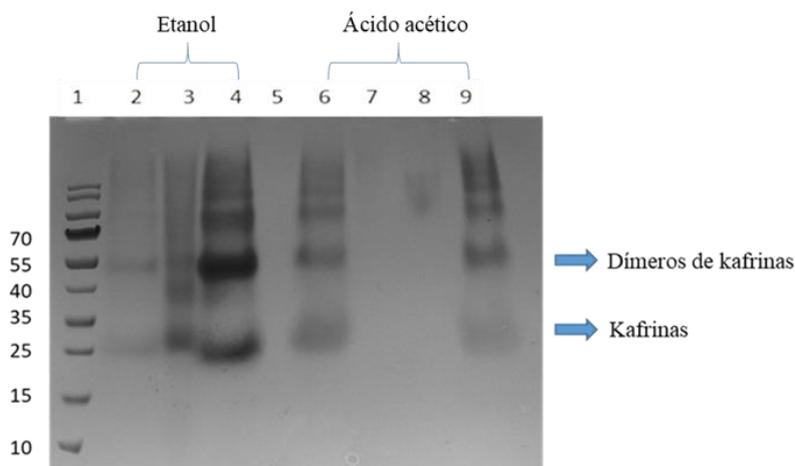


Figura 13. SDS PAGE 12% comparativa entre Tratamiento con Etanol (OT1) y Tratamiento con Ácido acético (OT2). Carril 1: Marcador de peso molecular 26616 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher, Scientific, 2: Residuo 1 T1, 3: Sobrenadante 2 T1, 4: Concentrado proteico T1, 5: Vacío, 6: Residuo 1 T2, 7: Sobrenadante 1 T2, 8: Sobrenadante 1 T2 duplicado, 9: Concentrado proteico T1.

El metabisulfito de sodio puede irritar la piel, los ojos, la garganta, los pulmones.⁸⁴ De esta manera se realizaron los procesos OT1 y OT2 pero sin metabisulfito, donde se ve un cambio en las diferentes fracciones del proceso. A partir de estos resultados se deduce que para la extracción con ácido acético (Figura 14 B) es necesario el metabisulfito. En contraparte no se observa el mismo patrón de degradación proteica a lo largo del proceso con etanol (Figura 14 A).

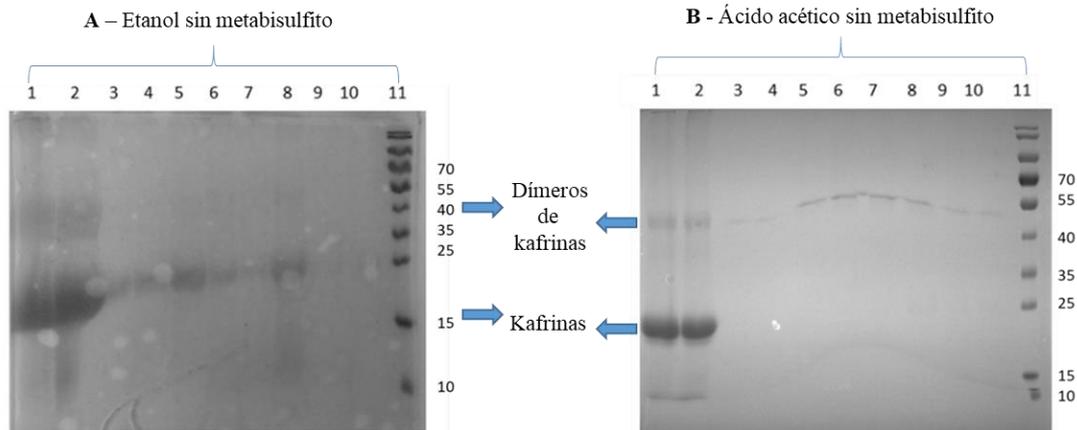


Figura 14. SDS PAGE 12% comparativa sin metabisulfito: A- Tratamiento 1 con Etanol (OT1), B- Tratamiento 2 con Ácido acético (OT2). En ambos geles el orden de siembra es el mismo. Carril 1: concentrado proteico, 2: concentrado proteico duplicado, 3: Lavado 3, 4: Lavado 2, 5: Lavado, 6: Sobrenadante 2, 7: Sobrenadante 2 duplicado, 8: Sobrenadante 1, 9: Residuo 1, 10: Residuo 1 duplicado, 11: Marcador de peso molecular 26616 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher, Scientific.

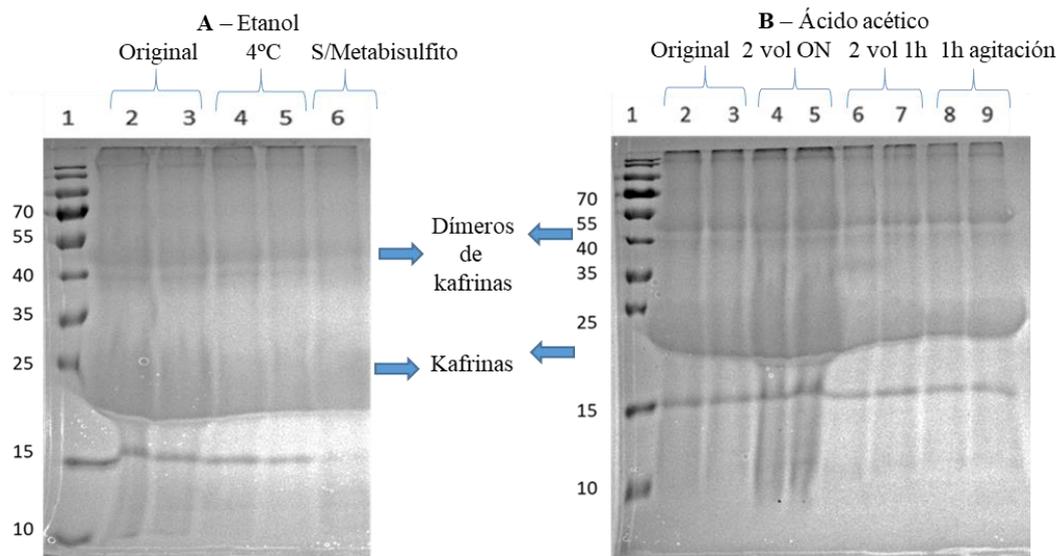


Figura 15. SDS PAGE 15% de variaciones a los tratamientos. A- T1 con etanol, Carril 1: marcador de peso molecular 26616 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher,

Scientific, 2 y 3: procedimiento original, 4 y 5: 4 °C toda la noche, 6: sin metabisulfito. B- T2 con ácido acético, Carril 1: mismo marcador de peso molecular, 2 y 3: procedimiento original, 4 y 5: 2 volúmenes toda la noche, 6 y 7: 2 volúmenes durante 1 hora, 8 y 9: 1 hora de agitación, en lugar de 16 horas como en el proceso original.

Se continuó con la optimización del proceso de extracción proteica para el tratamiento con etanol (Figura 13 A) se redujo la temperatura de incubación de -20 °C (original) a 4 °C toda la noche (ON) lo que implica utilizar otro sistema de enfriamiento más amigable con el ambiente y con la exposición a materiales de laboratorio peligrosas. Para el tratamiento con ácido acético (Figura 13 B) se redujo a 2 volúmenes de metabisulfito y se aminoró el tiempo de agitación a 1 hora. De esta manera los procesos combinados tienen en cuenta el impacto ambiental.

En síntesis, se puede decir que se conserva una integridad proteica de los aislados de todas las variantes para los distintos procesos de purificación. Por ende, el resultado de la extracción no se vio afectado por las variaciones en los procedimientos.

Con la finalidad de evaluar si la molienda de los DDGS afecta el proceso de purificación, ya que se realiza un pretratamiento de DDGS (molienda, desgrasado y lavado) en la extracción de kafirina.^{56,73,78} En el presente trabajo solo se aplicó el paso de molienda de DDGS a 0,5 mm en un ciclo de molino, la extracción de kafirinas se evaluó por DUMAS (Tabla 3) y SDS-PAGE (Figura 14).

Tabla 3. Pureza de kafirinas, comparando DDGS molido contra no molido y aplicando OT2.

Muestra	%Pureza Promedio	
DDGS – Molido	89,9 ±	0,01
DDGS - No Molido	90,8 ±	1,0

Si se comparan las purezas de la extracción de kafirinas cuando se utilizó DDGS no molido y molido (o harina de sorgo), no se observan diferencias significativas entre ambas. En comparación con reportes de Li y colaboradores ambas purezas son menores, para DDGS no molido (88%) y para harina de sorgo (72%). Esto podría deberse a una fuerte asociación entre los componentes proteicos y no proteicos de la harina de sorgo, como los carbohidratos.⁶⁴

Del mismo modo, en la electroforesis no se observa un patrón de bandas diferente en los concentrados proteicos cuando el material de partida es DDGS no molido en comparación

con la harina de sorgo. En este perfil proteico se observan las distintas subunidades de las kafirinas: bandas más nítidas ~21 a 23 kDa ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) banda ~47 kDa (γ) banda tenue ~20 kDa (monómero β) y una banda ~50 kDa que sugiere la dimerización (Figura 16).

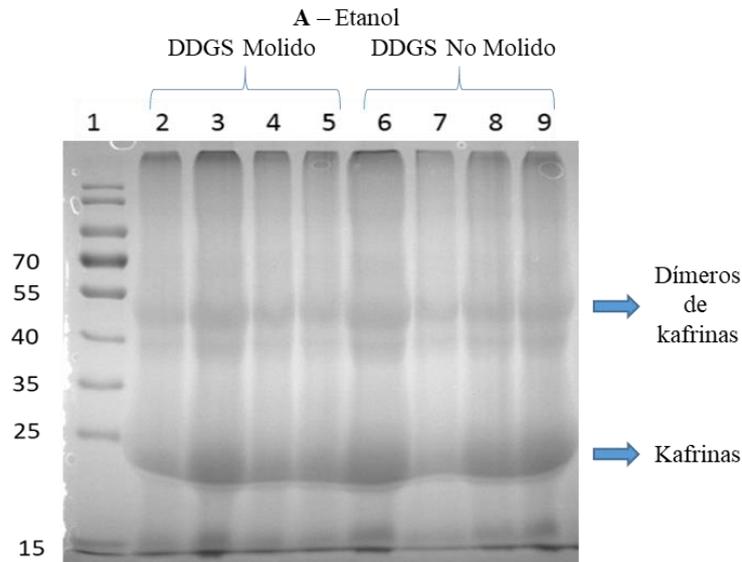


Figura 16. SDS PAGE 12% comparativa entre DDGS molido y no molido con (T1). Carril 1: Marcador de peso molecular 26616 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher, Scientific, 2-5: concentrado proteico a partir de DDGS molido, 6-9: concentrado proteico a partir de DDGS no molido.

Al fin y al cabo, basados en los datos de electroforesis y DUMAS no se observan diferencias significativas entre DDGS molidos y sin moler, por lo que el resto de los ensayos se continuarán *sin moler los DDGS*.

Continuando con la optimización del proceso de extracción se combinaron distintas modificaciones ensayadas (que son los tratamientos combinados). Cabe recordar, para el tratamiento con etanol se combinó sin metabisulfito con incubación durante 2 horas a 4 °C, y para el tratamiento con ácido acético se combinó 2 volúmenes de metabisulfito con 2 horas de precipitación. La pureza de los tratamientos originales como los combinados se muestra en la Tabla 4 y el perfil electroforético en la Figura 17.

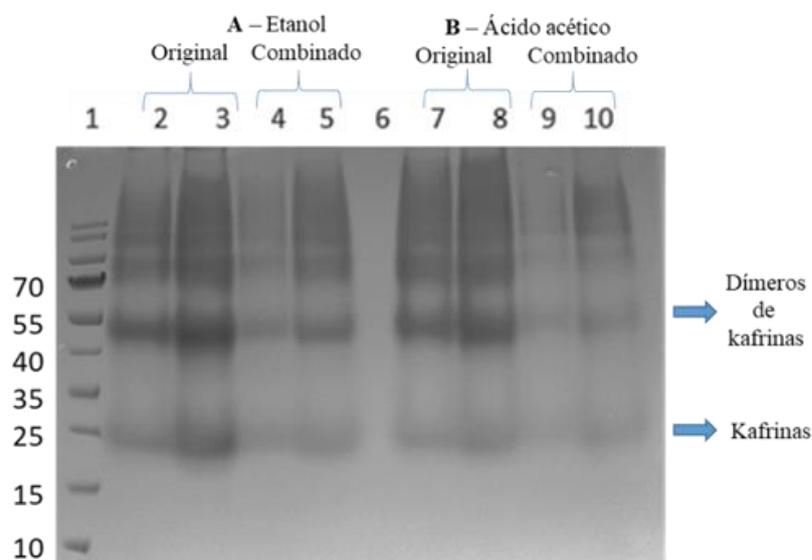


Figura 17. SDS PAGE 12% comparativa de tratamientos originales y combinados. Carril 1: Marcador de peso molecular 26616 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher, Scientific. 2-10: son concentrados proteicos, es decir productos de purificación de kafirinas. 2-3: con proceso original de T1, 4-5: con proceso combinado de T1, 6: vacío, 7-8: con proceso original de T2, 9-10: con proceso combinado de T2.

Tabla 4. Comparativa de los productos de purificación de kafirinas empleando tratamiento combinado y original (CT y OT) respectivamente.

Muestra	%Pureza Promedio	
Kaf- OT1	89,9 ±	0,1
Kaf- CT1	93,1 ±	0,3
Kaf – OT2	81,2 ±	1,3
Kaf – CT2	86,0 ±	1,7

Finalmente, luego de todo este proceso de optimización, se seleccionó la purificación mediante el tratamiento con etanol combinado (CT1) ya que presenta la mejor pureza de los 4 procedimientos, sin presentar diferencias significativas en su perfil electroforético con respecto al original, con tiempos más acotados y con una temperatura de 4 °C en lugar de -20 °C (Figura 18).

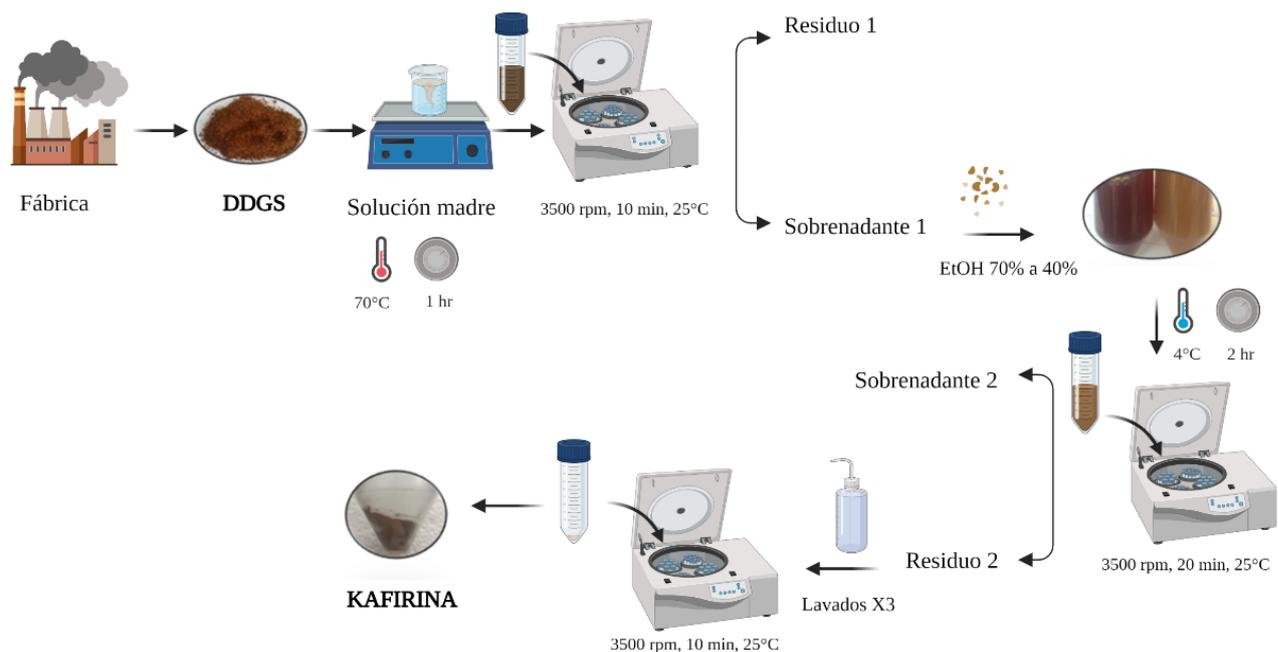


Figura 18. Esquema del proceso de purificación de Kafirinas a partir de DDGS, denominado tratamiento combinado 1 (CT1).

En el proceso de purificación de kafirinas, partiendo de 3 g de DDGS se obtienen $0,73 \pm 0,06$ gramos de kafirina, producto de color más claro que el material de partida, considerado aislado proteico. Tras la aplicación del nuevo protocolo (CT1) se obtuvieron 93,1 gramos de proteínas/100 gramos de kafirinas, resultado muy similar al reportado para la extracción de kafirinas con etanol, 93.05%.⁶⁴

De manera análoga, con el fin de evaluar la integridad de las kafirinas a lo largo del proceso CT1, ya que presenta mayor pureza que el original, se estudió el seguimiento de purificación mediante SDS PAGE como se muestra en la Figura 19.

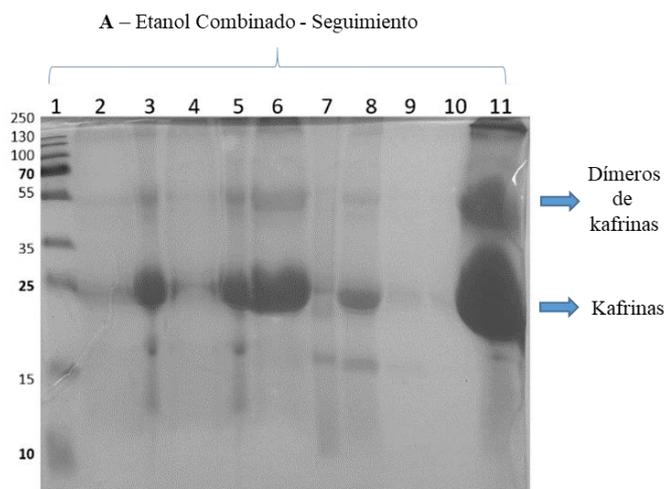


Figura 19. Seguimiento del proceso combinado en etanol (CT1) mediante SDS PAGE 15%. Carril 1: Marcador de peso molecular 26619 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher, Scientific, 2: Muestra inicial (DDGS sin moler con solución EtOH 70% y NaOH 5%) pellet, 3: Muestra inicial sobrenadante, 4: Residuo 1, 5: Sobrenadante 1, 6: Residuo 2, 7: Sobrenadante 2, 8: Lavado 1, 9: Lavado 2, 10: Lavado 3, 11: Concentrado proteico, es decir, las kafirinas.

Una de las metas de este trabajo es obtener la proteína con la mayor pureza posible, de modo que los contaminantes no afecten los ensayos de síntesis de nanopartículas posteriores. Como se observa en la Figura 19 en los carriles 3, 5, 6 y 11 se corresponden con: inicial sobrenadante, sobrenadante 1, residuo 2 y concentrado proteico, respectivamente, donde las kafirinas se encuentran solubles, se visualiza un patrón de bandas. Que consiste en una banda ~25 kDa - α kafirina, una banda tenue ~15 kDa - β kafirina y una banda ~55 kDa que sugiere la formación de dímero. Por el contrario, en los carriles 2, 4, 7 se corresponden con muestras inicial pellet, residuo 1 y sobrenadante 2, respectivamente, se observa la ausencia de dicho patrón de bandas, debido a que las kafirinas no se encuentran solubles en estas fracciones. Además, se puede observar la eficiencia en los lavados, ya que las bandas correspondientes a los contaminantes, tras los lavados (carriles 8, 9 y 10) se ven cada vez más tenues.^{.85-87}

Finalmente, para comprobar la robustez de del protocolo de CT1 se efectuaron 11 rondas de purificación, cada una con 4 cuadruplicados, lo que da una cantidad de concentrados proteicos de 44. Se analizaron 8 muestras correspondientes a la purificación de kafirinas con el protocolo optimizado (Figura 20). En este caso, se visualiza la banda por debajo de 25 kDa (α -kafirina) y la banda de dimerización próximo a 50 kDa.

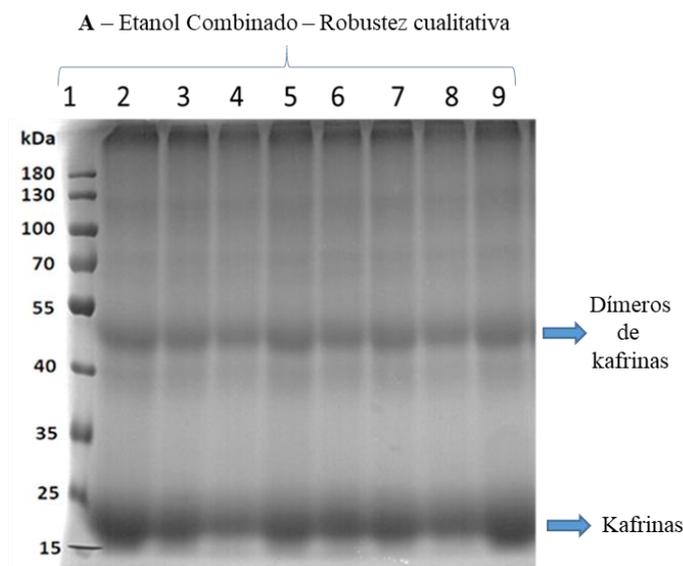


Figura 20. Robustez cualitativa del proceso de purificación CT1 mediante SDS-PAGE 15%. Carril 1: Marcador de peso molecular 26619 PageRuler™ Plus Prestained (10 - 250 kDa), Thermo Fisher, Scientific, 2 al 9: concentrados proteicos de distintas rondas con el proceso combinado en etanol (T1).

En suma, con respecto a la extracción y purificación de kafirinas, se puede decir que no hay diferencias significativas entre los DDGS molidos y sin moler. Tampoco se observaron diferencias entre ambos tratamientos. Se logró optimizar tiempos en ambos protocolos, además de las temperaturas de incubación, hasta lograr el protocolo combinado con etanol, que mostró una pureza superior al 90%.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de kafirina

Teniendo en cuenta la importancia y peculiaridad de la estructura de las kafirinas se determinó su estructura secundaria, mediante FTIR analizando espectros infrarrojos de las mismas. Antecedentes de Yang y colaboradores,⁸⁸ definen las nueve frecuencias que surgen de la unidad polipeptídica: amida A ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$), amida B ($\sim 3100\text{ cm}^{-1}$), amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$), amida II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), amida III ($\sim 1300\text{ cm}^{-1}$), amida IV ($\sim 735\text{ cm}^{-1}$), amida V ($\sim 635\text{ cm}^{-1}$), amida VI ($\sim 600\text{ cm}^{-1}$) y amida VII ($\sim 200\text{ cm}^{-1}$).

De estas, las bandas amida I y amida II son las principales en el espectro IR de proteínas, la región espectral más sensible a las composiciones de estructura secundaria de proteínas es la *amida I* (1700 y 1600 cm^{-1}) que se origina a partir de la vibración de C=O del grupo amida acoplado con la flexión en fase del enlace N-H y el estiramiento del enlace C-N..

La *amida II* es más compleja que la *amida I*, y deriva principalmente de la flexión en el plano N-H y la vibración de estiramiento C-N.⁸⁸

Para determinar la estructura secundaria de las kafirinas, se colectó el espectro original, se aplicó corrección de línea de base y suavizado de la *amida I* (Figura 21).

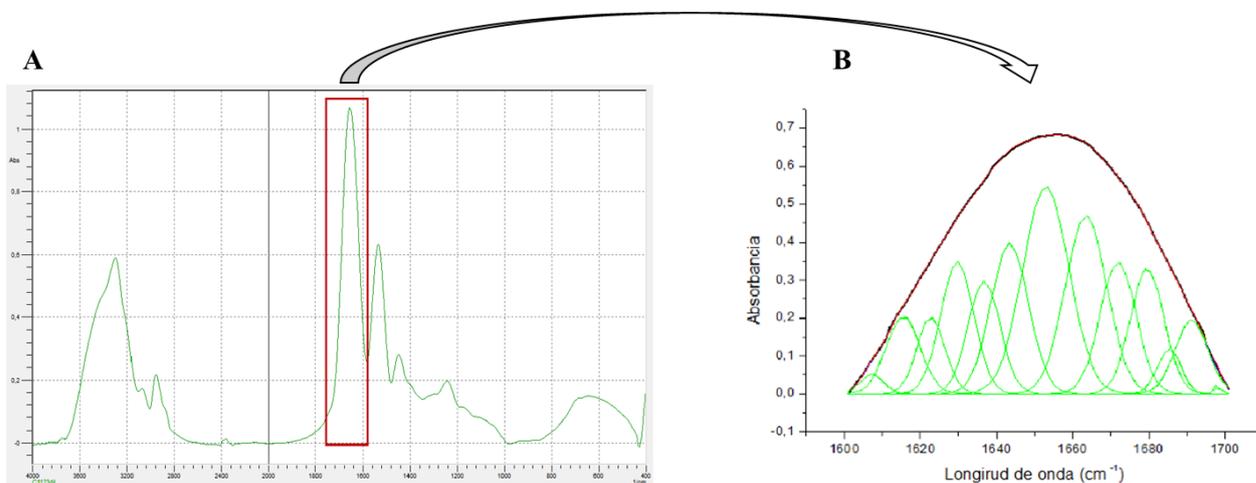


Figura 21. A- Espectro IR de las kafirinas con su línea de base corregida y suavizado aplicado. El cuadrado rojo enmarca la banda de la *amida I*. B- Desconvolución sobre la banda de la *amida I* (1.600 - 1700 cm^{-1}) de las kafirinas, con un coeficiente de correlación ($R^2= 0.999887$).

Consecutivamente se procesaron los datos en el software, en base a antecedentes bibliográficos son 14 picos, los cuales se observan como gaussianas verdes en la Figura 19.⁸⁹ Luego de integrar cada una de las bandas, se hizo la sumatoria de las mismas, cuyo valor fue de $41,90 \text{ Abs} \cdot \text{cm}^{-1}$ (considerado el 100%). De esta manera, se determinó la estructura secundaria de las kafirinas, sumando los porcentajes de las áreas, obteniendo: 37,8% de β -hoja, 35,2% de α -hélice y 20,8% de giro- β .

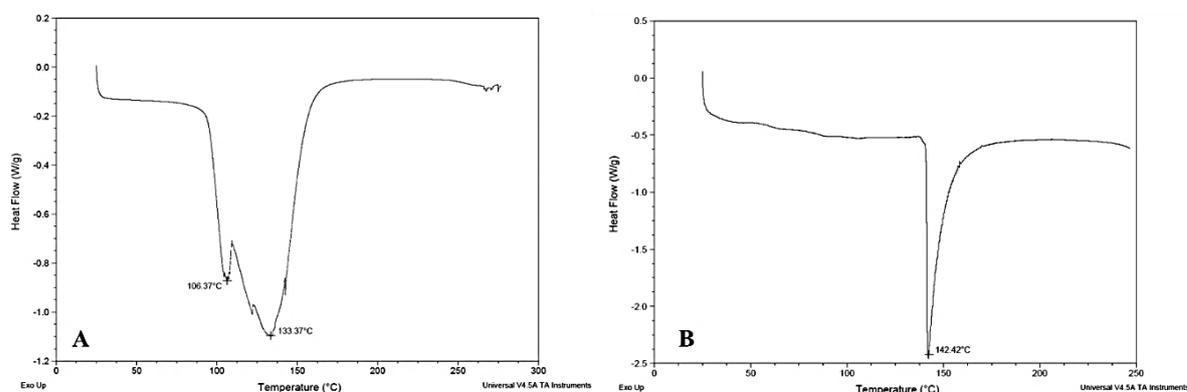
Si se compara con antecedentes bibliográficos de kafirina, estudios de Xiao y colaboradores,⁵⁰ mostraron picos ubicados a 3298 cm^{-1} que se atribuyó con ν (O-H). Los picos típicos de absorción de *amida I* y *amida II* aparecieron a 1652 cm^{-1} y 1541 cm^{-1} , respectivamente. Picos de absorción alrededor de 1460 cm^{-1} , 1258 cm^{-1} y 1061 cm^{-1} fueron contribuidos a la vibración de flexión de CH_2 , ν (C-N) y ν (-C-O-H) respectivamente. Por su lado, Muhammad y col.,⁹⁰ coinciden con las bandas de absorción características de las proteínas, con los picos de O-H alrededor de 3300 cm^{-1} y los picos de estiramiento de CH_3 y CH_2 entre 2925 y 2960 cm^{-1} , y los picos de las *amidas I* y *II* alrededor de 1650 y 1540 cm^{-1} , respectivamente. Así como, Li y colaboradores,⁹¹ también concuerdan con los picos típicos de la *amida I* y *amida II*, que se localizaron en 1647 cm^{-1}

¹ y 1531 cm⁻¹, respectivamente. Los picos aparecidos en 3288 cm⁻¹ también se corresponden a ν (O-H). Mientras que los picos de absorción en torno a 1449 cm⁻¹, 1234 cm⁻¹ y 1061 cm⁻¹, se atribuyeron a la vibración de flexión -CH₂, ν (C-N) y ν (-C-O-H) respectivamente. Por su lado, Bai y col,⁹² refuerzan estos antecedentes, ya que su espectro también mostró bandas de absorción de O-H en 3300 cm⁻¹, además de los picos de absorción de la amida I y la amida II típicos a 1651 y 1537 cm⁻¹, respectivamente. También los picos de absorción a aproximadamente 1454, 1240 y 1024 cm⁻¹ se correspondían a la vibración de flexión -CH₂, la vibración de estiramiento C-N y la vibración de flexión -C-O-H, respectivamente.⁹²

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de kafirinas

Esta técnica permite determinar transiciones de temperatura, como son los puntos de fusión cambios de fase, transiciones vítreas. Para ello, se realizó DSC de las kafirinas no liofilizadas (denominadas *pellet húmedo*) y *kafirinas liofilizadas* (Figura 22).^{50,77}

Figura 22. Termogramas DSC de kafirina: A- *pellet húmedo* (kafirinas no liofilizadas) y B- *kafirinas liofilizadas*.



El mayor beneficio de DSC es la facilidad y rapidez para detectar la transición de los materiales. Antecedentes de Bai y colaboradores,⁹² el termograma de dicha proteína presentó un pico endotérmico a unos 115 °C, que podría deberse a la absorción de energía para la evaporación del agua ligada. Los termogramas se tomaron por triplicado, el *pellet húmedo* presentó dos picos endotérmicos, a 106 ± 1 °C y 136 ± 4 °C. Mientras que las kafirinas liofilizadas presentó un pico endotérmico a 146 ± 6 °C, mayor temperatura con respecto al anterior, podría deberse a la deshidratación de la muestra.

En suma, se logró con FTIR determinar la estructura secundaria de las kafirinas: 49% de hélice α , 27 % de giro β y 24% de hoja β , respectivamente. Además, mediante DSC, se determinó el punto de transición de estas, siendo 146 ± 6 °C, para las kafirinas liofilizadas.

Síntesis y caracterización de nanopartículas (NpsK)

Una vez evaluada la pureza (DUMAS), el perfil electroforético (SDS-PAGE), la estructura secundaria (FTIR) y el punto de transición (DSC) de las kafirinas, se llevaron a cabo distintas condiciones de síntesis variando los disolventes, el volumen final de la NspK y el tipo de agitación para poder analizar si éstas tenían algún impacto en las propiedades fisicoquímicas de dichas nanopartículas.

La presencia de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos quedan expuestos. De hecho, en agua las proteínas forman miela, donde los dominios hidrofóbicos miran hacia el núcleo y los hidrofílicos se orientan a la superficie.⁴¹

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas proteicas.

Las propiedades nanopartículas dependen estrechamente de sus propiedades fisicoquímicas. De hecho, pequeños cambios en las propiedades fisicoquímicas impactan significativamente las distintas características de los nanomateriales, que determinan su uso aplicado. Para poder estudiar las propiedades, hay que tener en cuenta:

- ✓ Tamaño de partícula: debido a su tamaño y movilidad, las nanopartículas tienen una mayor absorción en comparación con las microesferas. También tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que ayuda a la liberación sostenida de agentes terapéuticos o compuestos bioactivos.
- ✓ Dispersión de luz dinámica (DLS): técnica que ayuda a observar el tamaño de partícula en suspensión en base a su movimiento browniano, permite comparar la homogeneidad o heterogeneidad de la muestra, entre otros.
- ✓ Microscopía electrónica de barrido (SEM): brinda información sobre la muestra, incluida la morfología externa (forma) composición química, estructura cristalina y orientación de los materiales que componen la muestra.
- ✓ Carga superficial: permite determinar la carga superficial de nanopartículas en solución (coloides) que poseen carga electrostática positiva o negativa. Además, ayuda a predecir la estabilidad a largo plazo de las nanovehículos

- ✓ Carga de drogas (Drug loading): se puede definir como la cantidad de fármaco unido por masa de polímero, normalmente se expresa en moles de fármaco por mg de polímero. El fármaco puede unirse a nanopartículas ya sea por polimerización o adsorción.
- ✓ Determinación de atrapamiento de drogas: la encapsulación del fármaco se puede determinar por sus diferencias técnicas cuantitativas, una de ellas por absorbancia.
- ✓ Citotoxicidad celular: donde se estudia la viabilidad celular en base a la reducción del MTT. Es de gran importancia estudiar la toxicidad, ya que permite saber su toxicidad en determinada línea celular.^{44,102}

Con el fin de realizar la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de kafirina, se determinó su diámetro hidrodinámico (DLS) y se estudió el efecto de las distintas estrategias de síntesis en la formación de las NspK (Figura 23).

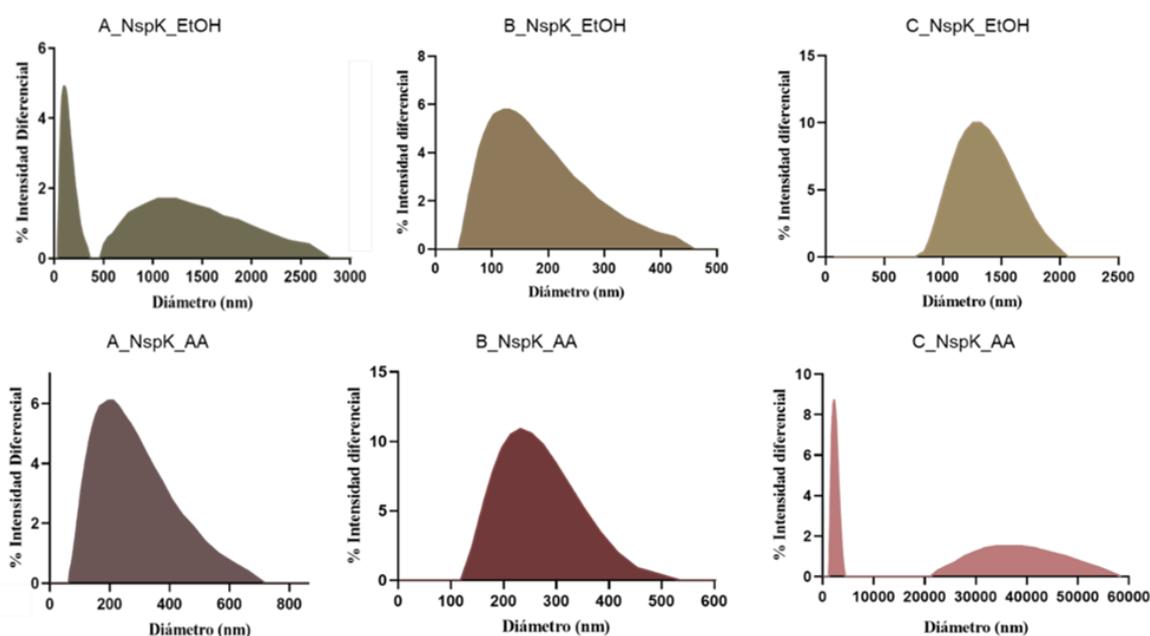


Figura 23. Caracterización de NspK mediante DLS. Distribución de poblaciones para NspK mediante las tres estrategias de síntesis (A, B y C) en etanol y con ácido acético, respectivamente.

Es importante conocer la distribución de poblaciones, ya que el equipo reporta el valor del diámetro hidrodinámico promedio y índice de polidispersidad (PDI) parámetro que brinda el grado de dispersión de un polímero e información sobre el número e intensidad de la/s población/es que tiene la muestra. Cuando el PDI es menor a 0,2 se considera una muestra *monodispersa*, si es mayor, se habla una muestra que presenta *polidispersidad*.

Las NspK sintetizadas con estrategia A tiene un diámetro promedio de 224 ± 21 nm con etanol y 191 ± 19 nm con ácido acético. Si bien ambos promedios son muy similares, con etanol se observan 2 poblaciones y con ácido acético solo una. Si se compara la estrategia A con B, (donde se mantiene el tipo de agitación magnética, pero se lo escala 10 veces) los diámetros se mantienen en el mismo orden, levemente menores que A, 132 ± 2 nm con etanol y 241 ± 6 nm con ácido acético, ambos con una única población. En cambio, si se compara A y B con la estrategia C (donde se varió el tipo de agitación) hay un aumento en el diámetro de las Nspk, incluso de un orden mayor, 1492 ± 256 nm con etanol y 3843 ± 709 nm con ácido acético. Además, con la estrategia C se observó una diferencia en la distribución, con etanol solo una población, mientras que con el otro disolvente se visualizan dos poblaciones.

En suma, se puede decir que *el volumen* de la reacción de síntesis afecta levemente el tamaño y homogeneidad de las nanopartículas de kafirina, utilizando ácido acético, y más aún en etanol. Sin embargo, la variación del *tipo de agitación*, de magnética a paletas, muestra un gran aumento del tamaño de estas, acentuado aún más para las sintetizadas con ácido acético. También se observan diferencias en la polidispersidad de dichas nanopartículas en ambos disolventes. En base a esto, se decidió trabajar únicamente con la estrategia A para ambos disolventes, donde se obtienen nanopartículas de kafirina con un diámetro promedio en el entorno de los 200 nm.

Continuando con la caracterización, con respecto a la estabilidad coloidal de las NspK, depende ante todo de la carga eléctrica y la hidratación de las partículas, permite determinar la carga de las NspK. Vale la pena recordar, que el valor de pH al cual el potencial Z vale 0 se denomina *punto isoeléctrico* y es el punto de menor estabilidad. Desde el punto de vista práctico, coloides con PZ entre +30 y -30 mV se consideran estables, por fuera de estos valores tiende a darse la agregación.^{91,103-105} Reflejado además por sus polidispersidades y valores de potencial Z por encima de -30 mV (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de caracterización de NspK con estrategia A para: etanol y ácido acético.

Muestra	Diámetro (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
A-NpsK en etanol	224 ± 8	0.273 ± 0.7	-35 ± 2
A-NpsK en ácido acético	191 ± 9	0.201 ± 0.3	-60 ± 6

Los resultados se asemejan a otros estudios con nanopartículas de kafirina como carrier, como los antecedentes de Muhammad y colaboradores,¹⁰⁶ los cuales trabajaron con dichas nanopartículas en ausencia y presencia de β -lactoglobulina y caseína para la encapsulación de resveratrol. En su caso tuvieron un diámetro promedio en el orden, levemente menor de unos 189 nm, con un PDI también menor de 0,15 (partículas monodispersas) en comparación con las del presente estudio las cuales son 0.273 y 0.201 para nanopartículas de kafirina con estrategia A en etanol y ácido acético, respectivamente. En cuanto al potencial Z, ellos reportan -20 mV en comparación con 35 mV para A-NpsK en etanol y 60 mV para A-NpsK en ácido acético (Tabla 7).

Por su parte, Xiao y col.⁵⁰ trabajaron sobre nanopartículas de kafirina donde el perfil de distribución del tamaño de las partículas mostró dos picos a 90 nm y 340 nm, lo que indica la coexistencia de dos poblaciones, lo mismo sucede con A-NpsK en etanol.^{50,107,108}

Con respecto a la morfología de las NpsK, se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó una superficie más lisa en las NpsK con ácido acético, en comparación con etanol que presenta mayor rugosidad. El pH bajo del ácido podría estar interfiriendo con la estructura proteica de las kafirinas y esto podría determinar las diferencias observadas entre las dos estrategias.^{78,80} (Figura 24).

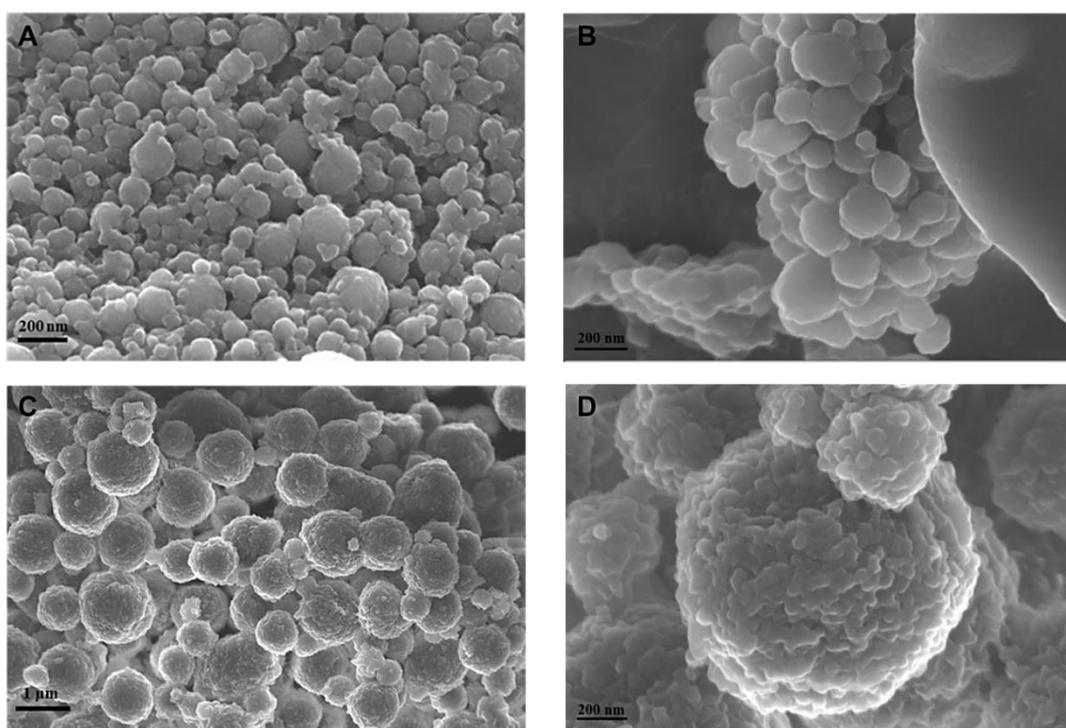


Figura 24. Microscopía electrónica de barrido de NpsK, estrategia A con ácido acético (A y B), estrategia A con etanol (C y D).

Por su parte, el primero muestra imágenes de NspK liofilizadas, las mismas eran esféricas de superficie lisa, pero apretadas en grandes agregados o aglomerados. Por su lado, Xiao ^{46,109} concuerda en este aspecto, ya que sus formulaciones mantuvieron intacta la estructura esférica de las partículas individuales, también apretadas en cúmulos aglomerados.

Es evidente que los diferentes reportes de tamaño, PDI y potencial Z responden a diferencias en las estrategias de síntesis y suspensión de los nanovehículos. Esto hace de suma importancia la caracterización rigurosa de suspensión de nanopartículas obtenida.

En suma, de todas las técnicas probadas, se seleccionó para futuros experimentos la síntesis de NspK con la estrategia A en etanol. Se realizaron 3 lotes, el primero con 10 repeticiones, el segundo y tercero con 4, dando un total de 18 rondas de síntesis, cada una de ella realizada por duplicado (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de caracterización de NspK, con estrategia A, utilizando etanol.

Muestra	Diámetro (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Lote 1	226 ± 13	0.289 ± 0,11	-37 ± 7
Lote 2	231 ± 26	0.245 ± 0,02	-32 ± 5
Lote 3	215 ± 25	0.231 ± 0,04	-34 ± 3
A-NpsK en Etanol	224 ± 8	0.255 ± 0,03	-35 ± 2

Se demuestra la robustez del protocolo de síntesis de NspK con un tamaño promedio de 224 nm, una polidispersidad de 0.255 y un potencial Z de -35 mV. Todos parámetros fisicoquímicos estudiados para las nanopartículas de kafirina son importantes para analizar su potencial como nanovehículo de compuestos bioactivos. Así como, poder evaluar los ensayos de máxima carga y relacionarlos con estudios de liberación de droga/fármaco a partir de los nanoencapsulados.

Nanoencapsulados de kafirina cargados con progesterona (NpsK-Pr)

Luego de seleccionar la estrategia de síntesis con etanol para las nanopartículas de kafirina, se estudió su potencial como nanovehículo de drogas hidrofóbicas evaluando la encapsulación de progesterona en las mismas como droga hidrofóbica modelo.

Para trabajar en la encapsulación de progesterona es necesario contar con estrategias de análisis de esta: espectrofotometría y cromatografía líquida de alta presión. La primer técnica presenta la ventaja de ser rápida y de sencilla manipulación. Sin embargo, su evaluación es en el ultravioleta, pudiendo tener restos proteicos que actúen como interferencias, motivo por el cual se evaluó por UHPLC.

Para la cuantificación de progesterona, se realizaron en primera instancia las curvas de calibración correspondientes para cada método (Figura 25).^{65,114} Por espectrofotometría, se realizó una curva de calibración en el rango de 0,2 – 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de progesterona, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9922. Mientras que la curva por UHPLC se realizó en el rango de 0,5 – 22 $\mu\text{g/mL}$, con un R^2 de 0.9941.

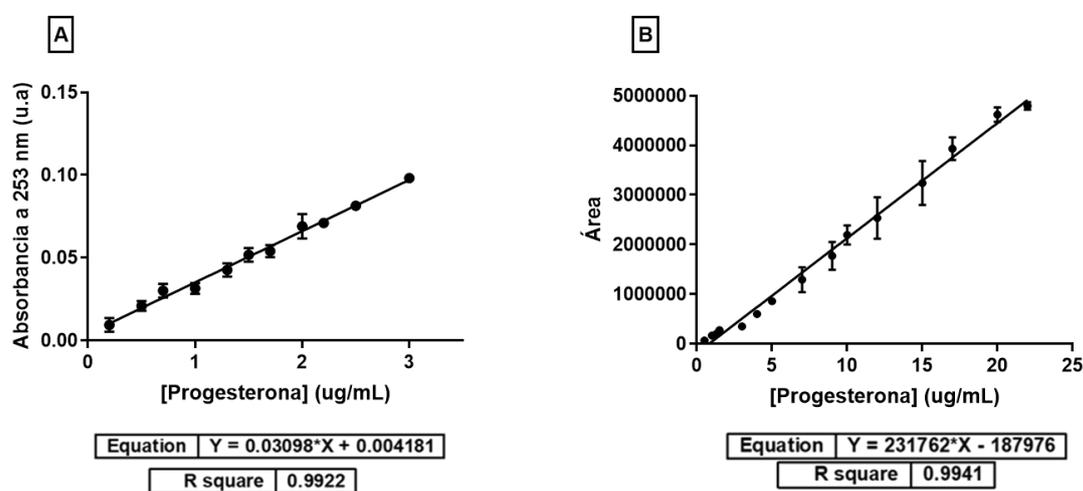


Figura 25. Curvas de calibración según distintos métodos de análisis, A: Por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 253 nm, se realizó por triplicado, (donde u.a son unidades de absorbancia). B: Por cromatografía líquida de ultra alta presión, se realizó por duplicado.

Ambas metodologías son válidas para el análisis de rutina de progesterona por cuestiones de practicidad y rapidez se seleccionó la técnica colorimetría para la cuantificación.

Preparación de NspK-Pr y evaluación de encapsulación de progesterona

Se realizaron experimentos independientes de encapsulación de progesterona en nanopartículas de kafirina (NspK-Pr) variando la cantidad de progesterona ofrecida mientras se mantenía constante la cantidad de kafirina (Figura 26).

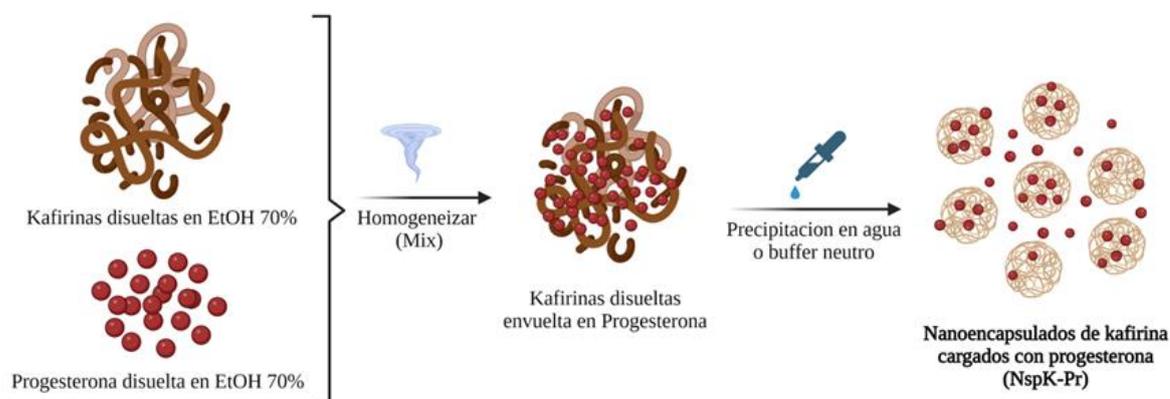


Figura 26. Método de preparación o síntesis de nanoencapsulados de kafirina cargados con progesterona, mediante el método nanoprecipitación. Creado con BioRender.com.

Se estableció un rango de concentraciones de progesterona de 12 a 164 $\mu\text{g/mL}$. Se determinó para cada una de ellas la eficiencia de encapsulación (EE%) el rendimiento (R%) y la capacidad de carga (μg progesterona/ mg Nps) como resume la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros de encapsulación de Nspk-Pr.

[Progesterona]	EE%	R%	$\mu\text{g P/ mg Nps}$
12 $\mu\text{g/mL}$	47 \pm 14	20 \pm 6	1.9 \pm 0.9
16 $\mu\text{g/mL}$	88 \pm 5	72 \pm 6	1.3 \pm 0.1
37 $\mu\text{g/mL}$	92 \pm 6	9 \pm 1	2.1 \pm 0.1
101 $\mu\text{g/mL}$	97 \pm 2	3.0 \pm 0.6	1.9 \pm 0.6
164 $\mu\text{g/mL}$	99 \pm 0.3	2.0 \pm 0.8	1.9 \pm 0.8

Las *eficiencias de encapsulación* fueron muy altas (mayores al 92%) cuando se trabaja con concentraciones de progesterona por encima de 37 $\mu\text{g/mL}$, la eficiencia de encapsulación se refiere a la cantidad de progesterona ofrecida que está dentro del nanoencapsulado. Si se compara con antecedentes, Xiao y colaboradores,⁵⁰ reportan una eficiencia de encapsulación de 55% en nanopartículas de kafirina encapsulando curcumina e incluso su eficiencia aumenta a 86%, cuando se le agrega quitosano a la

formulación. Con respecto a la *capacidad de carga*, los mismos autores la calculan como eficiencia de carga = cucumina encapsulada (mg) dividido el peso de las partículas (mg), su resultados fueron para cc-kaf 5% y para cc-kaf-CMC se eleva a 6,1 %.

Por otro lado, para Khan y col.¹⁰⁶ la *eficiencia* de encapsulación del resveratrol disminuyó gradualmente de 72 % a 67 % a medida que aumentaba su concentración en partículas de kafirina, que fue similar en ausencia y presencia de β -Lg. La eficacia de las partículas de kafirina/caseína fue similar a la de la kafirina y las de kafirina/ β -Lg, en 33 μ g/mL de resveratrol. Sin embargo, la *capacidad de carga* de este en todas las partículas aumentó gradualmente a medida que aumentaba la concentración de resveratrol. Este efecto no se observa en el presente estudio, ya que la carga se mantiene en el mismo orden, la cantidad se encuentra en el entorno de los 2 μ g/mg Nps. En cambio, el *rendimiento* presenta un pico máximo que se encuentra a los 16 μ g/mL de progesterona, con un 72%. El rendimiento es calculado como la progesterona cuantificada luego de romper las nanopartículas y liberar la progesterona al medio.

Caracterización fisicoquímica de NpsK-Pr

Se realizó la caracterización de los nano/microencapsulados, determinando su diámetro, homogeneidad, estabilidad coloidal y se los comparó con los parámetros de las NpsK, que se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Tabla comparativa de parámetros de caracterización fisicoquímica de NspK-Pr y NspK.

Muestra	Diámetro (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
NpsK-Pr	347 \pm 30	0.240 \pm 0.02	-40 \pm 6
NpsK	224 \pm 8	0.255 \pm 0.03	-35 \pm 2

Se puede observar un aumento del tamaño en NpsK-Pr en comparación con NpsK, siendo estas últimas más heterogéneas que los nanoencapsulados, ambas formulaciones estables coloidalmente.

Comparándolo con los estudios de Muhammad y colaboradores,⁹⁰ reportaron un diámetro promedio de partículas de kafirina/ β -Lg fueron similares a las partículas de kafirina sola. En cambio, el tamaño de la partícula de kafirina/caseína fueron menores que las kafirina/ β -Lg, con respecto al potencial Z, su resultado fue un valor absoluto superior a -20 mV.

Las nanopartículas basadas en una proteína hidrofóbica son vulnerables al entorno circundante y su estabilidad se mejora al recubrirlas con una capa adicional de un biopolímero secundario. Por lo que se puede mejorar en la estabilidad de NspK-Pr con algún tipo de estabilizante, como por ejemplo PEG (Poli etilenglicol).¹¹⁵

En el estudio de Muhammad,^{90,116} la disminución del tamaño probablemente se deba a que β -Lg o caseína estén interactuando con la kafirina, reduciendo la hidrofobicidad de la superficie e inhibiendo la agregación de las partículas. Dicha agregación fue un gran desafío a lo largo del presente estudio, lo que reafirma la idea de mejorar la estabilidad de los nanodispositivos.

Mientras que Xiao y col.¹⁰⁹ también caracterizaron sus nanoencapsulados, en este caso ellos compararon nanopartículas de kafirina con curcumina versus nanopartículas de kafirina con curcumina y quitosano. El primer nanoencapsulado mostró un diámetro medio de 200 ± 3 nm, mientras que las segundas fueron de 236 ± 2 nm. Se observaron valores de PDI de 0,186 y 0,235 para cada formulación, lo que sugiere una homogeneidad aceptable, mientras que sus potenciales Z fueron de -23 mV y -26 mV, respectivamente.

Continuando con la caracterización se determinó su tamaño y polidispersidad, como se visualiza en el gráfico de distribución de poblaciones (Figura 27). Con respecto a la morfología de los encapsulados, se analizó del mismo modo que para las NspK, por microscopía electrónica de barrido (Figura 28). La superficie de los encapsulados es muy similar a las nanopartículas de kafirina con la estrategia de etanol.

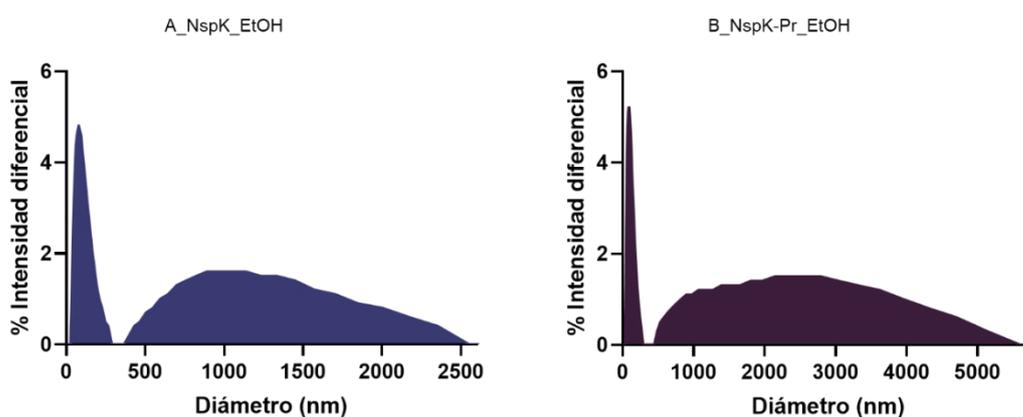


Figura 27. Distribución de población de nanoencapsulados de progesterona con la estrategia A, tanto para la estrategia A como B.

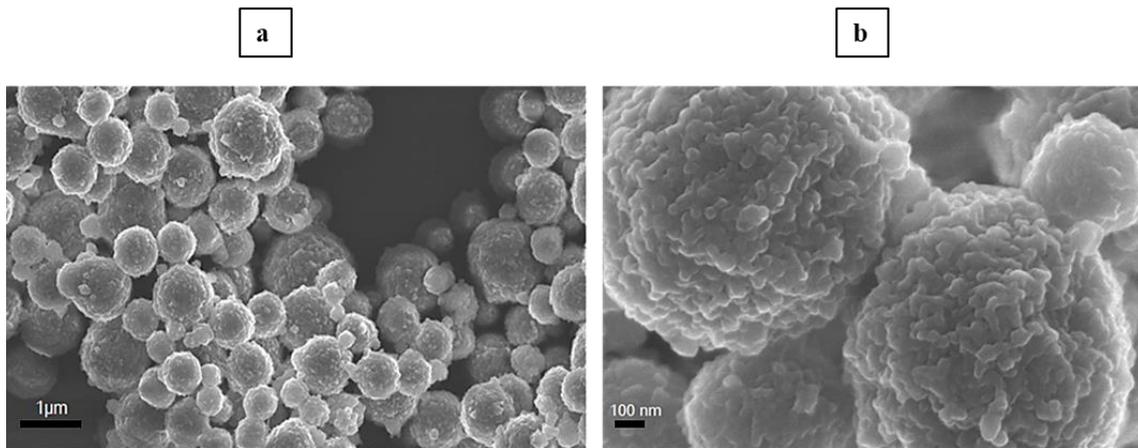


Figura 28. Microscopía Electrónica de Barrido de encapsulados NpsK-Pr con la estrategia de etanol a diferentes aumentos.

Comparándolo con antecedentes de Muhammad y col.^{90,116} las partículas de kafirina también eran esféricas con una superficie lisa pero apretada en grandes agregados, a raíz de una alta atracción hidrofóbica. Ahora bien, partículas de kafirín/ β -Lg y kafirina/caseína también eran esféricas, pero más irregulares, con una película sobre las partículas, cuya formación se debió al exceso de proteínas de la leche. Esto es opuesto a lo que vemos en el presente estudio, donde las NspK son más heterogéneas que los nanoencapsulados.

Mientras que, reportes de Xiao y colaboradores^{74,107,109} estudiaron la morfología los nanovehículos, con otra técnica llamada Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) donde las partículas se observan esféricas. En comparación cc-kaf y cc-kaf/CMC la primera mostró un tamaño de partícula medio de 193 nm y la segunda de 225 nm. Conjuntamente, realizan SEM de polvos liofilizados de ambas formulaciones, las cuales mantuvieron intacta la estructura de partículas individuales esféricas pero apiladas en grandes agregados, como en el presente estudio.

Estudios de estabilidad coloidal

Para estudiar la estabilidad coloidal en el tiempo para los nanovehículos se incubaron las suspensiones a 4 °C, se midió el diámetro y PDI de las mismas, a diferentes tiempos. La distribución de poblaciones de nanopartículas y nanoencapsulados a medida que pasa el tiempo (Figura 29).

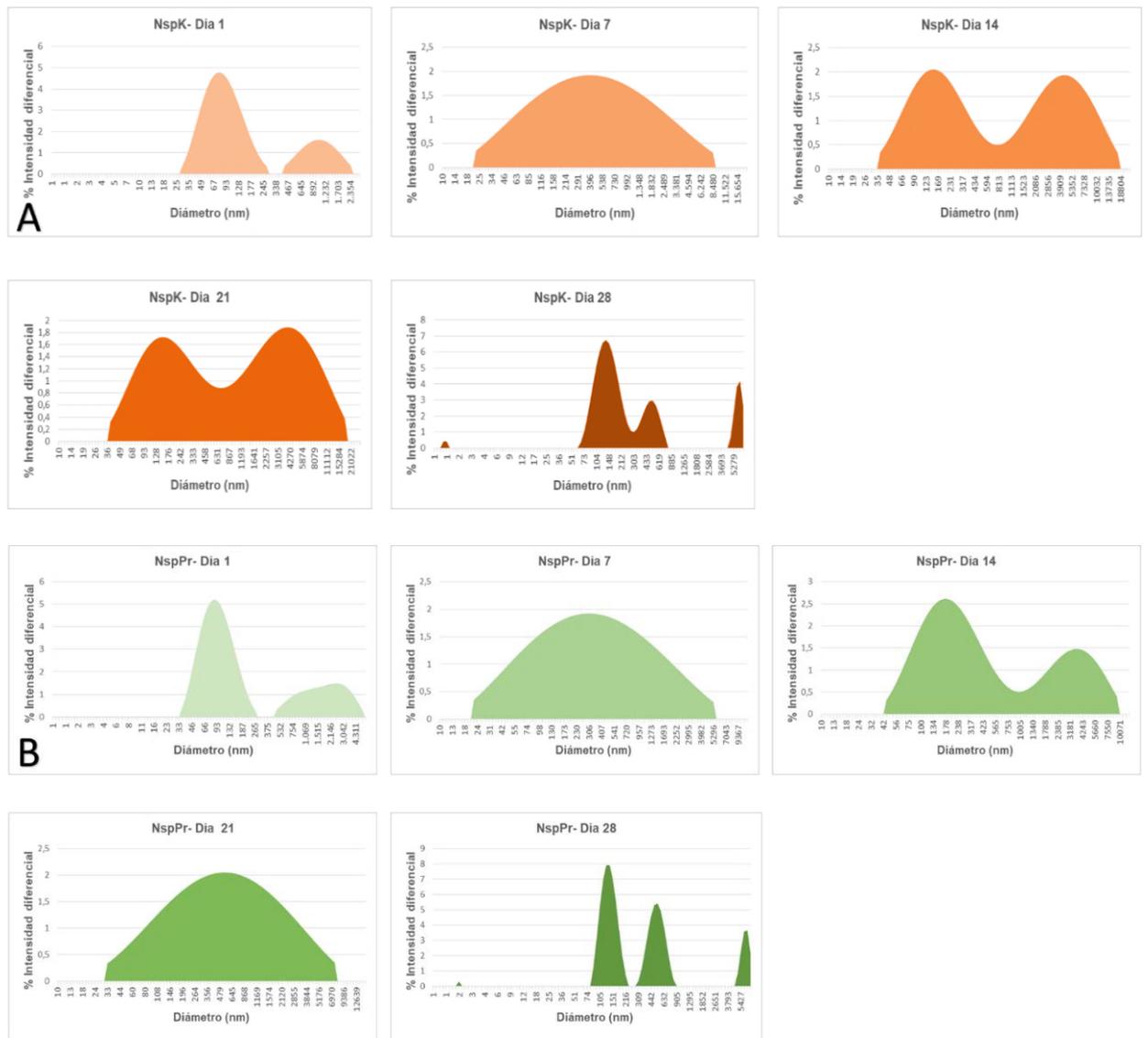


Figura 29. Estudio de potencial Z de NpsK (A) y NpsK-Pr (B) en función del tiempo, donde se muestra la distribución de poblaciones de las nanopartículas (naranja) y de los nanoencapsulados (verde).

Se puede decir entonces, la cantidad y el tamaño de las poblaciones varían con el tiempo. Se observó un aumento creciente del tamaño y de la polidispersidad con el transcurso de los días. En cambio, luego de los 28 días se observan fenómenos de degradación, cambiando el perfil de distribución, donde se ven tres poblaciones de diámetros muy distintos y cada una de ellas menos polidispersa en sí misma. Son estables coloidalmente, las muestras son heterogéneas, donde los cúmulos caen por gravedad.

Si bien la distribución de poblaciones es de suma importancia (Figura 29), saber cuáles son las intensidades de los picos de las gaussianas es importante para saber dentro de las

muestras heterogéneas (tanto de nano/micropartículas y encapsulados) cual es el valor de la intensidad de la muestra de interés (Tabla 9)

Tabla 9. Diámetros e intensidades de NpsK y NspK-Pr.

	NpsK		NpsK-Pr	
	Diámetro (nm)	Intensidad (%)	Diámetro (nm)	Intensidad (%)
Día 1	78,815	4,779	85,287	5,205
Día 7	550,369	1,997	306,054	1,919
Día 14	144,422	20,525	178,351	2,612
	4228,89	1,935	3673,85	1,479
Día 21	150,23	1,724	555,548	2,005
	3943,13	18,870		
Dia 28	1,429	0,406	2,047	0,3604
	135,735	6,755	137,902	7,934
	518,010	2,957	528,58	5,423
	6311,63	4,183	6491,67	3,662

Se compara con antecedentes de Pu y col.¹¹⁷ donde se evaluó la capacidad de almacenamiento de NspK cargadas con resveratrol durante 30 días a temperatura ambiente. Los autores, determinaron que el tamaño de las partículas reticuladas no varió significativamente en 30 días, lo que demuestra una estabilidad fisicoquímica favorable a lo largo de un mes, como en el presente trabajo. Sin embargo, los tamaños aumentaron aproximadamente un 100% al final del almacenamiento para las no reticuladas.

Por su lado, Chang y col.⁹⁹ presentaron alternativas para mejorar la homogeneidad de las partículas y reducir el tamaño de las mismas. Además, los estados naturales de algunas proteínas insolubles en agua ya se encuentran en forma de agregados heterogéneos e irregulares, que pueden ser disociados en pequeñas partículas uniformes mediante fuerza mecánica. El tratamiento con ultrasonido puede reducir el tamaño de las partículas, así como la microfluidización de alta resolución que también promueve la disociación de cúmulos de partículas proteicas.

En otra instancia también se evaluó la estabilidad coloidal estudiando el potencial Z a distintos pH, ya que, el pH de la muestra es uno de los factores más relevantes capaces de afectar el potencial Z de las partículas.

Entonces, factores extrínsecos como el pH y la temperatura afectan el volumen aparente de las micropartículas; mientras que las fuerzas de atracción de Van der Waals y las

fuerzas de repulsión estéricas determinan su estabilidad.^{110,119} Con el fin de estudiar cómo afecta el pH a la estabilidad de las nanopartículas de kafirinas y nanoencapsulados, se ensayaron distintas condiciones variando el pH de 3 a 10, con estándares para las estrategias A y C (Figura 30).

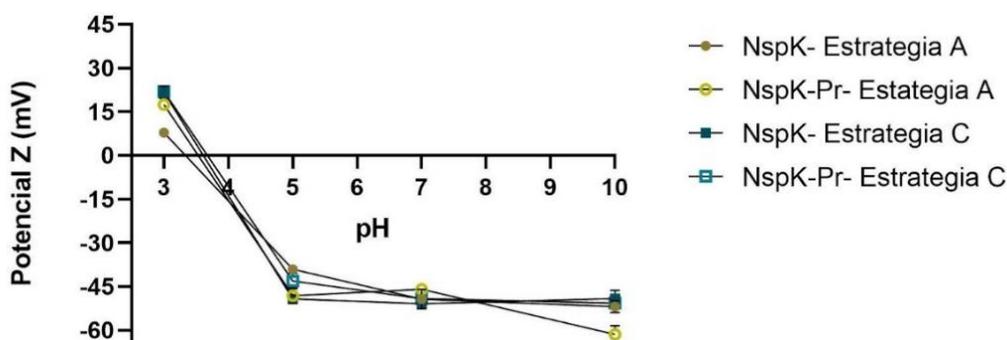


Figura 30. Estudio de estabilidad de NpsK y NpsK-Pr tanto con la estrategia A como C, en función al pH.

Se puede decir entonces que tanto las NspK como los NpsK-Pr son más estables coloidalmente por encima de pH 5 que a pH menores. Si lo comparamos con estudios previos de Li y col.¹¹⁸ el potencial zeta de 1 mg/mL de kafirina en 70 % de etanol en función del pH, osciló entre -10 y +15 mV, con un punto isoeléctrico (PI) en torno al pH 6,1, similar a antecedentes biográficos donde el PI de 5,1.¹²⁰ A un pH inferior a 6,1, el mayor PZ positivo fue de 13,5 mV, que no evita la agregación. Sin embargo, cuando la kafirina se autoensambló en NspK, su potencial fue de -40 mV, impidiendo la agregación.

Se analizó el efecto del pH en las nanopartículas de kafirinas y los nanoencapsulados de progesterona. El mayor PZ positivo fue de $+21,94 \pm 0,41$ mV a pH 3, no suficientemente grande como para evitar la agregación entre las kafirinas. Mientras que a pH mayores a 5, las nanoestructuras con ambas estrategias presentan mayor estabilidad, con PZ de $-39,08 \pm 0,97$ mV a $-61,50 \pm 2,94$ mV, lo suficientemente alto como para evitar la agregación de estas.

En suma, se supervisaron las estabildades de las nanopartículas de kafirina y los nanoencapsulados de progesterona, en el tiempo y en base a su pH.

Estudios de liberación del tracto digestivo simulado (ITG)

La administración oral de fármacos implica que sufrir cambios bruscos de pH y ataque de enzimas digestivas. Para que sean eficaces, las formulaciones deben poder sobrevivir en estos entornos hostiles, sin mostrar agregación física o degradación de las moléculas bioactivas encapsuladas.¹²¹

Como la kafirina es una de las proteínas de cereales menos digeribles, nanopartículas en base de dicha proteína, son menos susceptibles al entorno hostil del tracto digestivo, lo que permitiría la entrega más protegida de los compuestos bioactivos. A pesar de las ventajas únicas de las mismas, la encapsulación inadecuada de fármacos libres y/o la absorción ineficiente, podría ser debido a la falta de un promotor a nivel de absorción intestinal. En los tratamientos en los que es necesario un alto nivel de eficiencia de encapsulación y captación celular *in vitro*, sería útil introducir un segundo polímero, para formar un complejo polimérico con las NspK.^{109,119}

Además del papel protector, las partículas de proteína pueden mejorar la entrega sostenida y controlada de compuestos en el entorno digestivo, mejorando su biodisponibilidad. La liberación está estrechamente relacionada con su perfil de digestión, que generalmente se controla mediante cambios en el tamaño de las partículas, el contenido de compuestos liberados y el contenido de residuos de aminoácidos en condiciones ITG simuladas.^{91,99}

Para llevar a cabo dicho ensayo, se sintetizaron las NspK y NspK-Pr, se incubaron en fluido gástrico simulado (SGF) durante 2 horas. Se cuantificó la cantidad de progesterona dentro de las NspK-Pr. Así como la cantidad de progesterona inicial u ofrecida a las NspK para la formación de los nanoencapsulados de Progesterona (Tabla 10).

Tabla 10. Estudio de liberación de fármaco de NspK-Pr en condiciones ITG.

[Pr] (µg/mL)	Teórico	Colorimétrica	ELISA	ECLIA*
Ofrecida a NspK-Pr	20,0	16,85 ± 0,006	22,0 ± 0,15	21,02
Encapsulada en NspK-Pr	1,0	0,85 ± 0,8	N. D	1,38

N. D= No determinado. † Promedio de muestras ± SD. ECLIA*Trazabilidad DI-CG/EM a progesterona altamente purificada.

ECLIA es un inmunoensayo de electroquímico luminiscencia para la determinación cuantitativa de progesterona, mientras que ELISA también es un inmunoensayo, en este

caso, se basa en el reconocimiento específico de progesterona por anticuerpos inmovilizados, donde la progesterona compite con una cantidad constante de conjugado

De esta manera, se logró determinar la concentración de Pr ofrecida para la formación de nanoencapsulados, con distintas técnicas. Teóricamente la concentración ofrecida fue de 20 µg/mL, mediante colorimetría 17 µg/mL, con *ELISA* 22 µg/mL y con *ECLIA* fue de 21 µg/mL. Se suprimió 'la mínima contribución de las Nsp-K en la formación de nanoencapsulados de progesterona y se corroboró la ausencia de este.

Con respecto a la cuantificación de Pr dentro de los nanoencapsulados, asumiendo una liberación del 100%), teóricamente se esperaba 1,0 µg/mL dentro de NspK-Pr en 18 mL de jugo gástrico simulado. Si bien no se logró determinar su cantidad con *ELISA*, mediante colorimetría fue de (0,85 µg/mL) y con *ECLIA* (1,38 µg/mL).

Los reportes previos son similares en cuanto a una buena bioaccesibilidad y liberación del fármaco, droga, nutracéutico o compuesto bioactivo. Por su lado, Patel y col.¹²¹ determinaron que la cantidad de curcumina en nanopartículas de zeína, durante 3 horas en condiciones ITG simuladas, se mantuvo constante en todo momento con un valor de 80-95%. A partir de observaciones visuales, los autores no vieron agregación de partículas coloidales ni en la fase gástrica ni en la fase intestinal, lo que validó aún más que la dispersión era estable a los cambios de pH (de pH = 2 en la fase gástrica a 6,8 en la fase intestinal) y presencia de enzimas digestivas. En el presente estudio solo se trabajó en la parte gástrica.

Por su parte, Xiao y colaboradores,^{74,109} determinaron perfiles de liberación *in vitro* de la curcumina nativa. Donde solo se detectó el 10 % de la curcumina pura en los primeros 30 minutos del tratamiento con *SGF*, después de eso, la curcumina pura mostró una tasa de liberación lenta con menos del 15% de curcumina detectada al final de 6 h. Esto indicó que, al pasar por el tracto digestivo simulado, solo una pequeña fracción de curcumina pura existe en formato de curcumina solubilizada que luego puede ser efectivamente absorbida por el intestino delgado.

Mientras que, Li y col.¹¹⁸ determinaron los perfiles de liberación *in vitro* de curcumina a partir de nanopartículas de kafirina sólidas y huecas, donde el 40 % de la curcumina se liberó en *SG*, con una la velocidad de disolución permaneció relativamente sin cambios durante las siguientes 5 h de incubación, similar que los reportes de Xiao y colaboradores.

La liberación de compuestos bioactivos en partículas proteicas está directamente relacionada con el proceso de hinchamiento y desintegración de estos nanovehículos, que se producen en el entorno oral, gástrico e intestinal. Por lo tanto, la liberación, degradación o conversión a la forma biodisponible de los compuestos encapsulados debe estudiarse en todo el tracto digestivo. Como propuesta de mejora del presente estudio, una vez simulada la fase gástrica, se podría continuar con la simulación de la fase intestinal, que implica el uso de otras enzimas gástricas.^{68,74,109}

En suma, se logró evaluar la liberación de progesterona en los nanoencapsulados bajo condiciones hostiles de ITG, lo que permite conocer mejor la bioaccesibilidad del fármaco.

Citotoxicidad de nanopartículas y nanoencapsulados

Cuando se trabajan con nanopartículas es muy importante estudiar la toxicidad y forma parte de la caracterización de las nanopartículas. Con el fin de evaluar citotoxicidad celular tanto de NpsK y NpsK-Pr en queratinocitos humanos (HaCaT), se realizó el ensayo de viabilidad celular. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).^{122,123} Cabe destacar que cada muestra se sembró en 6 pocillos, se realizó por duplicado en dos placas paralelas, se muestran los resultados en la Figura 31.

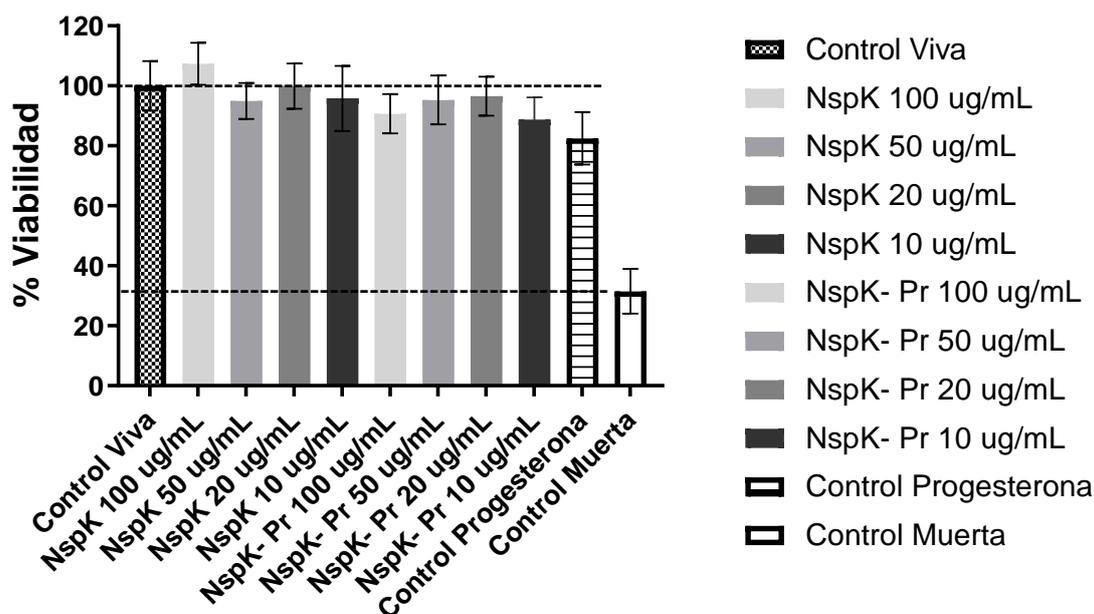


Figura 31. Ensayo MTT de las NpsK y NpsK-Pr. Para ello, las células HaCaT (línea celular de queratinocitos humanos) se incubaron durante 24 h en DMEM +10% SFB con concentraciones

de NpsK y NpsK-Pr (10, 20, 50, 100 ug/mL) de progesterona en cada pocillo, control de progesterona con 0,012 ug/mL por pocillo. Los datos fueron normalizados contra el control viva (células con DMEM suplementado con 10% de FBS), también se muestra el control de células muertas (células en medio de cultivo, con Tritón X-100 a 0,5 mg/ml en el pocillo).

Tanto las nanopartículas como los nanoencapsulados no resultaron ser citotóxicos, al menos para la línea celular HaCaT. Lo que coincide con reportes previos de citotoxicidad, por ejemplo, las nanopartículas de kafirinas-curcumina tienen una viabilidad por encima del 100%, por lo que muestran también su alta biocompatibilidad. Xiao y colaboradores,^{74,77} probaron que la curcumina nativa suspendida en agua no mostró toxicidad, debido a su solubilidad extremadamente baja en agua. En el presente trabajo se realizó un control similar llamado *Control de progesterona* para determinar si el fármaco libre tenía algún efecto citotóxico.

Los resultados mostraron una viabilidad celular cercanas 100 % en todas las concentraciones probadas, resultado análogo a nano/micro encapsulados en el rango de 10 a 100 ug/mL de progesterona.

Finalmente, se puede decir entonces, ambas formulaciones no son citotóxicas para esta línea celular y podrían ser usadas como nanovehículo de compuestos bioactivos.

Conclusiones

IV. Conclusiones

En el marco de esta Tesis se logró preparar y estudiar las propiedades de las nanopartículas de kafirina y su uso en la encapsulación de la hormona progesterona.

En primera instancia, se logró poner a punto el protocolo de purificación de kafirinas, en dicho proceso, partiendo de 3 gramos de DDGS se obtienen 0,73 gramos de kafirina, tras la aplicación del nuevo protocolo (CT1) donde se obtuvo un concentrado de kafirinas con una pureza del 93%. Se logró determinar con FTIR además su estructura secundaria: 49% de hélice α , 27 % de giro β y 24% de hoja β , respectivamente. Mediante DSC, se determinó el punto de transición de estas, siendo 146 °C para las kafirinas liofilizadas.

Este aislado proteico producto del protocolo CT1 fue el material de partida para la síntesis de nanopartículas de kafirina. Conjuntamente, se alcanzó la síntesis de éstas, mediante las distintas estrategias, seleccionando la estrategia A. Cuyos parámetros fisicoquímicos promedios, como: 224 nm, 0.255 y -35 mV, diámetro, índice de polidispersidad y estabilidad coloidal respectivamente. Donde se trabajó en condiciones de pH fisiológicas, disminuyendo la formación de grandes aglomerados, optimizando los tiempos y reactivos, ya que es un proceso que se podría aplicar a escala industrial. Se observaron diferencias en su superficie mediante SEM, cuando se cambió de disolvente, siendo nanopartículas de superficie más lisa con ácido acético y más rugosa con etanol.

De manera análoga, se obtuvieron nanoencapsulados de progesterona, los cuales también fueron caracterizados con DLS y SEM: se observó aumento del tamaño en NpsK-Pr en comparación con NpsK, mientras que la superficie de los NpsK-Pr es muy similar a las NpsK con la estrategia de etanol. También, se determinó la concentración de progesterona de los nanoencapsulados, mediante cálculo de % Eficiencia de encapsulación, % Rendimiento y capacidad de carga, ofreciendo distintas cantidades de progesterona de: 12 – 164 $\mu\text{g/mL}$.

El mayor rendimiento alcanzado fue de 72% que presentó un pico máximo a los 16 $\mu\text{g/mL}$ de progesterona ofrecida y una eficiencia de encapsulación del 88%, haciendo que ésta sea la mejor condición, dentro del barrido de concentraciones del fármaco modelo. Se evaluó, también, la estabilidad coloidal de las NpsK y NpsK-Pr en el tiempo a 4°C, observando efectos de agregación y degradación con el paso del tiempo. Así como la estabilidad coloidal variando el pH, donde a pH mayores a 5, las nanoestructuras con

ambas estrategias son estables, ya que presentaron potenciales en el rango de -39 a -61 mV, lo suficientemente alto como para evitar la agregación de estas.

Posteriormente, se logró determinar la concentración de Pr ofrecida para la formación de nanoencapsulados, en condiciones del tracto digestivo simulado. Teóricamente la concentración ofrecida fue de 20 µg/mL, mediante colorimetría 17 µg/mL, con *ELISA* 22 µg/mL y con *ECLIA* fue de 21 µg/mL. Igualmente, se suprimió la mínima contribución de las NspK en la formación de NspK-Pr y se corroboró que las NspK no tuvieran Pr. Con respecto a la cuantificación de Pr dentro de los nanoencapsulados, asumiendo una liberación del 100%, teóricamente se esperaba 1,0 µg/mL dentro de NspK-Pr en 18 mL de jugo gástrico simulado. Si bien no se logró determinar su cantidad con *ELISA*, mediante colorimetría fue de (0,85 µg/mL) y con *ECLIA* (1,38 µg/mL).

Finalmente, se realizaron estudios de citotoxicidad (MTT) que demuestra que se trata de nanoestructuras inocuas, posicionándolas como potencial nanovehículo de compuestos bioactivos.

Referencias

V. Bibliografía

1. Delgado, José; Bullón, J. y S. J.-L. Nanopartículas: fundamentos y aplicaciones. *Nanotecnología Fundam. y Apl.* 203–222 (2015).
2. Kane, R. S. & Stroock, A. D. Nanobiotechnology: Protein-nanomaterial interactions. *Biotechnology Progress* **23**, 316–319 (2007).
3. Jain, K. K. Nanobiotechnology. in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* **1**, 599–614 (Elsevier Inc., 2011).
4. Bawa, R., Bawa, S. R., Maebius, S. B., Flynn, T. & Wei, C. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **1**, 150–158 (2005).
5. Maine, E., Thomas, V. J., Bliemel, M., Murira, A. & Utterback, J. The emergence of the nanobiotechnology industry. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 2–5 (2014).
6. Dar, A. I. & Acharya, A. Nanomaterials: From Research to Personalized Medicine. *Nanomater. - Based Biomed. Appl. Mol. Imaging, Diagnostics Ther.* 1–10 (2020). doi:10.1007/978-981-15-4280-0_1
7. Jain, K. The Role of Nanobiotechnology. (2009).
8. Muñoz, R. V. & Saquero, A. H. Toxicidad de los nanomateriales de interés biomédico en los sistemas biológicos. *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencias y Nanotecnología* **11**, 65–75 (2018).
9. Aplicaciones de la Nanotecnología, ejemplos y ventajas - Iberdrola. Available at: <https://www.iberdrola.com/innovacion/aplicaciones-nanotecnologia>. (Accessed: 4th August 2022)
10. Gómez Garzón, M. Usos terapéuticos de nanomateriales y

- nanopartículas. *Rev. Repert. Med. y Cirugía* **28**, (2019).
11. Daima, H. K. & Bansal, V. Influence of Physicochemical Properties of Nanomaterials on Their Antibacterial Applications. in *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases* 151–166 (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-801317-5.00010-4
 12. Vauthier, C., Couvreur, P. & Fattal, E. Nanomaterials: Applications in drug delivery. *Nanomater. A Danger or a Promise? A Chem. Biol. Perspect.* **9781447142**, 131–151 (2013).
 13. Pelaz, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* **11**, 2313–2381 (2017).
 14. de la Fuente, J. M. & Grazu, V. *Nanobiotechnology Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles.* (2012).
 15. Maestro, J. Ma. A. & CArbajo, J. I. Ma. Aplicaciones Industriales de la Nanotecnología. *Univ. Oviedo* 92 (2012).
 16. Kianfar, E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology* **19**, (2021).
 17. Manzari, M. T. *et al.* Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nature Reviews Materials* **6**, 351–370 (2021).
 18. Siri, M. Estudio de Nanopartículas Proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales. *Estudio de Nanopartículas Proteicas y su posible aplicación como vectores de drogas antitumorales* 1–241 (2017).
 19. Martínez, L. J. Nanopartículas poliméricas funcionales como material para purificar proteínas. (2021).

20. Krug, H. F. & Wick, P. Nanotoxicology: An interdisciplinary challenge. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 1260–1278 (2011).
21. Khan, S. & Hossain, M. K. Classification and properties of nanoparticles. *Nanoparticle-Based Polym. Compos.* 15–54 (2022). doi:10.1016/B978-0-12-824272-8.00009-9
22. Nanomateriales | Todo lo que necesitas saber. Available at: <https://www.phi4tech.com/es/nanomateriales>. (Accessed: 11th August 2022)
23. *Orizaba-Chávez B y cols. Farmacocinética de la progesterona.* (2013).
24. Clasificación nano materiales. Available at: <https://nuevatecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nano-materiales/>. (Accessed: 11th August 2022)
25. NANOMATERIALES: LOS MATERIALES DEL FUTURO . Available at: <https://www.infinitiaresearch.com/noticias/nanomateriales-aplicaciones-empresa/>. (Accessed: 26th February 2023)
26. Sáez, V. *et al.* Liberación controlada de fármacos. Micropartículas. in *Revista Iberoamericana de Polímeros* 87–101 (2004).
27. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **12**, 908–931 (2019).
28. Mitchell, M. J. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **20**, 101–124 (2021).
29. Carolina Mendoza Muniz Asistente Técnico Belén Correa Revisión, D. & Gabriela Medina, Q. *UNITAR-Proyecto Piloto de Nanoseguridad Nanotecnología y Nanoseguridad en Uruguay Nanoevaluación y Propuesta de Plan de Nanoseguridad.* (2013).

30. Kayser, O., Lemke, A. & Hernández-Trejo, N. *The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. Current Pharmaceutical Biotechnology* **6**, (2005).
31. Chen, G., Roy, I., Yang, C. & Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **116**, 2826–2885 (2016).
32. Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K. & González-Méndez, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ. Quim.* **27**, 286–291 (2016).
33. Alshora, D. H., Ibrahim, M. A. & Alanazi, F. K. *Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility. Surface Chemistry of Nanobiomaterials: Applications of Nanobiomaterials* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-323-42861-3.00006-6
34. Vazquez Muñoz, R. & Huerta Saquero, A. Toxicidad de los nanomateriales de interés biomédico en los sistemas biológicos. *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología* **11**, 65 (2018).
35. Grunwald, A. The case of nanobiotechnology. *EMBO Rep.* **5 Spec No**, S32–S36 (2004).
36. Yang, L. Nanotechnology-controlled drug delivery for treating bone diseases. in *Nanotechnology-Enhanced Orthopedic Materials* 141–161 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/b978-0-85709-844-3.00007-0
37. Jiménez-Barrios, N. & Chirino, Y. I. ¿Los nanomateriales pueden causar neurotoxicidad? *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología* **11**, 17 (2018).

38. Urrejola, M. C. *et al.* Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly) Polymeric Nanoparticle Systems: Structure, Elaboration Methods, Characteristics, Properties, Biofunctionalization and Self-assembly Layer by Layer Technologies. *Int. J. Morphol* **36**, 1463–1471 (2018).
39. Tarhini, M., Greige-Gerges, H. & Elaissari, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *Int. J. Pharm.* **522**, 172–197 (2017).
40. Martínez-López, A. L. *et al.* Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int. J. Pharm.* **581**, (2020).
41. Giannelli, M. *et al.* Bioactive Keratin and Fibroin Nanoparticles: An Overview of Their Preparation Strategies. *Nanomater.* 2022, Vol. 12, Page 1406 **12**, 1406 (2022).
42. Shamsuzzaman *et al.* Green synthesis and biological evaluation of steroidal 2H-pyrans as anticancer and antioxidant agents. *J. King Saud Univ. - Sci.* **27**, 1–6 (2015).
43. Weissmueller, N. T., Lu, H. D., Hurley, A. & Prud'Homme, R. K. Nanocarriers from GRAS Zein Proteins to Encapsulate Hydrophobic Actives. *Biomacromolecules* **17**, 3828–3837 (2016).
44. Verma, D., Gulati, N., Kaul, S., Mukherjee, S. & Nagaich, U. Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *J. Pharm.* **2018**, 1–18 (2018).
45. Xiao, J. *et al.* Structure, morphology, and assembly behavior of kafirin. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 216–224 (2015).
46. Xiao, J., Chen, Y. & Huang, Q. Physicochemical properties of kafirin

- protein and its applications as building blocks of functional delivery systems. *Food and Function* **8**, 1402–1413 (2017).
47. Bai, X. *et al.* Development and characterization of soybean oil microcapsules employing kafirin and sodium caseinate as wall materials. *Lwt* **111**, 235–241 (2019).
 48. Duodu, K. G., Taylor, J. R. N., Belton, P. S. & Hamaker, B. R. Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science* **38**, 117–131 (2003).
 49. Chiquito-almanza, E. Kafirinas, proteínas clave para conferir digestibilidad y calidad proteica al grano de sorgo* kafirins, key proteins to improve digestibility and proteic quality of sorghum grain. **2**, 235–248 (2011).
 50. Xiao, J. Kafirin Protein and Its Applications in Nanoencapsulation, Pickering Emulsion and Electrospun Fiber. (2016).
 51. Xiao, J. *et al.* Structure, morphology, and assembly behavior of kafirin. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 216–224 (2015).
 52. Taylor, J., Anyango, J. O. & Taylor, J. R. N. Developments in the Science of Zein, Kafirin, and Gluten Protein Bioplastic Materials. *Cereal Chem.* **90**, 344–357 (2013).
 53. Shull, J. M., Watterson, J. J. & Kirleis', A. W. *Proposed Nomenclature for the Alcohol-Soluble Proteins (Kafirins) of Sorghum bicolor (L. Moench) Based on Molecular Weight, Solubility, and Structure?* *J. Agric. Food Chem* **39**, (1991).
 54. McCuiston, K. C., Selle, P. H., Liu, S. Y. & Goodband, R. D. *Sorghum as a feed grain for animal production. Sorghum and Millets: Chemistry, Technology, and Nutritional Attributes* (AACCI, 2018).

doi:10.1016/B978-0-12-811527-5.00012-5

55. Dianda, N., Rouf, T. B., Bonilla, J. C., Hedrick, V. & Kokini, J. Effect of solvent polarity on the secondary structure, surface and mechanical properties of biodegradable kafirin films. *J. Cereal Sci.* **90**, 102856 (2019).
56. Taylor, J. & Taylor, J. R. N. Making Kafirin, the Sorghum Prolamin, into a Viable Alternative Protein Source. *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2018). doi:10.1002/aocs.12016
57. Taylor, J., Taylor, J. R. N., Belton, P. S. & Minnaar, A. Formation of kafirin microparticles by phase separation from an organic acid and their characterisation. *J. Cereal Sci.* **50**, 99–105 (2009).
58. Weissmueller, N. T., Lu, H. D., Hurley, A. & Prud'Homme, R. K. Nanocarriers from GRAS Zein Proteins to Encapsulate Hydrophobic Actives. *Biomacromolecules* **17**, 3828–3837 (2016).
59. Anyango, J. O., Duneas, N., Taylor, J. R. N. & Taylor, J. Physicochemical Modification of Kafirin Microparticles and Their Ability To Bind Bone Morphogenetic Protein - 2 (BMP-2), for Application as a Biomaterial. **2**, 1–29 (2012).
60. Reinier Oropesa-Nuñez & Jáuregui-Haza Ulises-Javier. Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. Available at: https://www.researchgate.net/publication/236649980_Las_nanoparticulas_como_portadores_de_farmacos_caracteristicas_y_perspectivas_Nanoparticles_as_drug_carriers_characteristics_and_perspectives. (Accessed: 15th August 2022)
61. J.M. Irache. *Nanomedicine: nanoparticles with medical applications*. (2008).

62. Müller, J. ¿Dumas o Kjeldahl para el análisis de referencia ? *Anal. Beyond Meas. FOSS* 1–5 (2017).
63. *APPLICATION NOTE N/Protein Determination in Cereals according to the Dumas combustion method Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds Tested with VELP Scientifica NDA 701 Dumas Nitrogen Analyzer (Code F30800070) N/PROTEIN DETERMINATION IN CEREALS DUMAS COMBUSTION METHOD.* (2017).
64. Li, N. *et al.* Adhesive Performance of Sorghum Protein Extracted from Sorghum DDGS and Flour. *J. Polym. Environ.* **19**, 755–765 (2011).
65. Maliwal, D., Jain, P., Jain, A. & Patidar, V. Determination of progesterone in capsules by high-performance liquid chromatography and UV- spectrophotometry. *J. Young Pharm.* **1**, 371 (2009).
66. Taylor, J. & Taylor, J. R. N. Making Kafirin, the Sorghum Prolamin, into a Viable Alternative Protein Source. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **95**, 969–990 (2018).
67. Wei, Y. *et al.* Fabrication and characterization of resveratrol loaded zein-propylene glycol alginate-rhamnolipid composite nanoparticles: Physicochemical stability, formation mechanism and in vitro digestion. *Food Hydrocoll.* **95**, 336–348 (2019).
68. Davidov-Pardo, G., Pérez-Ciordia, S., Marín-Arroyo, M. R. & McClements, D. J. Improving Resveratrol Bioaccessibility Using Biopolymer Nanoparticles and Complexes: Impact of Protein-Carbohydrate Maillard Conjugation. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3915–3923 (2015).
69. Bruni, M., Trujillo, A. I., Facchín, L., Saragó, L. & Chilibroste, P. *Evaluación nutricional para rumiantes de la burlanda de sorgo*

húmeda obtenida de la producción de etanol de ALUR Paysandú.

70. Chiquito-Almanza, E., Cobielles-Castrejón, G., Montes-García, N., Pecina-Quintero, V. & Luis Anaya-López, J. *Kafirinas, proteínas clave para conferir digestibilidad y calidad proteica al grano de sorgo. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **2**, (2011).
71. Giorda, B. *Physical and chemical characteristics of sorghum grain. Relationship with ruminal degradation in cattle. Arch. Zootec* **60**, (2011).
72. Taylor, J. *et al.* Biocompatibility and biodegradation of protein microparticle and film scaffolds made from kafirin (sorghum prolamin protein) subcutaneously implanted in rodent models. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **103**, 2582–2590 (2015).
73. De Blas, C., Mateos, G. G. & Rebollar, P. G. DDGS de Maíz (Granos de destilería, DDG, y solubles, DDS). *Sitio Argentino Prod. Anim.* 1–5 (2007).
74. Xiao, J., Li, C. & Huang, Q. Kafirin Nanoparticle-Stabilized Pickering Emulsions as Oral Delivery Vehicles: Physicochemical Stability and in Vitro Digestion Profile. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 10263–10270 (2015).
75. Chatzifragkou, A. *et al.* Biorefinery strategies for upgrading Distillers' Dried Grains with Solubles (DDGS). *Process Biochemistry* **50**, 2194–2207 (2015).
76. Lau, E. T. L. *et al.* Formulation and characterization of drug-loaded microparticles using distillers dried grain kafirin. *Cereal Chem.* **92**, 246–252 (2015).
77. Li, N. *et al.* Adhesive Performance of Sorghum Protein Extracted from

- Sorghum DDGS and Flour. *J. Polym. Environ.* **19**, 755–765 (2011).
78. Wang, Y., Tilley, M., Bean, S., Susan Sun, X. & Wang, D. Comparison of methods for extracting kafirin proteins from sorghum distillers dried grains with solubles. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8366–8372 (2009).
79. Lau, E. T. L. *et al.* Preparation and In Vitro Release of Drug-Loaded Microparticles for Oral Delivery Using Wholegrain Sorghum Kafirin Protein. *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, (2015).
80. Pontieri, P. *et al.* Comparison of extraction methods for isolating kafirin protein from food grade sorghum flour. *Aust. J. Crop Sci.* **13**, 1297–1304 (2019).
81. Yuan, Y., Ma, M., Wang, D. & Xu, Y. A review of factors affecting the stability of zein-based nanoparticles loaded with bioactive compounds: from construction to application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2022). doi:10.1080/10408398.2022.2047881
82. Belton, P. S., Delgadillo, I., Halford, N. G. & Shewry, P. R. Kafirin structure and functionality. **44**, 272–286 (2006).
83. Yu, W., He, Z. & Huang, F. Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Isolated From Newly Weaned Infant Rhesus Monkeys and Ferrets. **8**, 8–10 (2015).
84. Departamento de salud y servicio para personas mayores de New Jersey. Hoja informativa de sustancias peligrosas-Metabisulfito De Sodio. 1–6 (2005).
85. Dianda, N., Rouf, T. B., Bonilla, J. C., Hedrick, V. & Kokini, J. Effect of solvent polarity on the secondary structure, surface and mechanical properties of biodegradable kafirin films. *J. Cereal Sci.* **90**, (2019).
86. Xiao, J., Nian, S. & Huang, Q. Assembly of kafirin/carboxymethyl

- chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. *Food Hydrocoll.* **51**, 166–175 (2015).
87. Mokrane, H. *et al.* Characterization of kafirins in algerian sorghum cultivars. *Cereal Chem.* **86**, 487–491 (2009).
 88. Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A. & Yu, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* **10**, 382–396 (2015).
 89. Shah, U. *et al.* Physicochemical characterisation of kafirins extracted from sorghum grain and dried distillers grain with solubles related to their biomaterial functionality. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
 90. Khan, M. A. *et al.* Encapsulation and protection of resveratrol in kafirin and milk protein nanoparticles. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1–11 (2019). doi:10.1111/ijfs.14212
 91. Li, X. *et al.* Development of hollow kafirin-based nanoparticles fabricated through layer-by-layer assembly as delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocoll.* **96**, 93–101 (2019).
 92. Bai, X. *et al.* Development and characterization of soybean oil microcapsules employing kafirin and sodium caseinate as wall materials. *LWT* **111**, 235–241 (2019).
 93. Xiao, J., Chen, Y. & Huang, Q. Physicochemical properties of kafirin protein and its applications as building blocks of functional delivery systems. *Food Funct.* **8**, 1402–1413 (2017).
 94. Orizaba, B., Alba, G. & Ocharán, M. Farmacocinética de la progesterona. *Rev. del Hosp. Juárez México* **80**, 59–66 (2013).
 95. Du, G. *et al.* A label-free colorimetric progesterone aptasensor based on the aggregation of gold nanoparticles. *Microchim. Acta* **183**, 2251–

- 2258 (2016).
96. Leimann, F. V. *et al.* Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. *Ciência Rural* **45**, 2082–2088 (2015).
 97. Pu, C., Tang, W., Liu, M., Zhu, Y. & Sun, Q. Resveratrol-loaded hollow kafirin nanoparticles via gallic acid crosslinking: An evaluation compared with their solid and non-crosslinked counterparts. *Food Res. Int.* **135**, 109308 (2020).
 98. Xie, B. *et al.* Progesterone PLGA/mPEG-PLGA Hybrid Nanoparticle Sustained-Release System by Intramuscular Injection. *Pharm. Res.* **35**, (2018).
 99. Chang, C. *et al.* Protein particle-based vehicles for encapsulation and delivery of nutrients: Fabrication, digestion, and release properties. *Food Hydrocoll.* **123**, 106963 (2022).
 100. Martínez-López, A. L. *et al.* Protein-based nanoparticles for drug delivery purposes. *Int. J. Pharm.* **581**, 119289 (2020).
 101. Bean, S. R. *et al.* Starch and Protein Chemistry and Functional Properties. *Sorghum Millets Chem. Technol. Nutr. Attrib.* 131–170 (2019). doi:10.1016/B978-0-12-811527-5.00006-X
 102. Mohanty, C., Arya, G., Verma, R. S. & Sahoo, S. K. Nanobiotechnology: Application of nanotechnology in therapeutics and diagnosis. *Int. J. Green Nanotechnol. Biomed.* **1**, (2009).
 103. Lic, P. & Botasini, S. Nanopartículas Y Desarrollo De Un Sensor Colorimétrico.
 104. Kumar, A. & Dixit, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. *Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic Acids* 43–58

(2017). doi:10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1

105. Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K. & McNeil, S. E. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *https://doi.org/10.2217/17435889.2.6.789* **2**, 789–803 (2007).
106. Khan, M. A. *et al.* Encapsulation and protection of resveratrol in kafirin and milk protein nanoparticles. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54**, 2998–3007 (2019).
107. Xiao, J., Wang, X., Perez Gonzalez, A. J. & Huang, Q. Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and rheological behavior. *Food Hydrocoll.* **54**, 30–39 (2016).
108. Xiao, J., Li, C. & Huang, Q. Kafirin Nanoparticle-Stabilized Pickering Emulsions as Oral Delivery Vehicles: Physicochemical Stability and in Vitro Digestion Profile. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 10263–10270 (2015).
109. Xiao, J., Nian, S. & Huang, Q. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. *Food Hydrocoll.* **51**, 166–175 (2015).
110. Taylor, J., Anyango, J. O. & Taylor, J. R. N. Developments in the Science of Zein, Kafirin, and Gluten Protein Bioplastic Materials. *Cereal Chem.* **90**, 344–357 (2013).
111. Nagy, B. *et al.* Key to life: Physiological role and clinical implications of progesterone. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, (2021).
112. Dinny Graham, J. & Clarke, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* **18**, 502–519 (1997).
113. Taraborrelli, S. Physiology, production and action of progesterone.

Acta Obstet. Gynecol. Scand. **94**, 8–16 (2015).

114. Fogolari, O. *et al.* Method validation for progesterone determination in poly(methyl methacrylate) nanoparticles synthesized via miniemulsion polymerization. *Int. J. Polym. Sci.* **2017**, (2017).
115. Davidov-Pardo, G., Pérez-Ciordia, S., Marín-Arroyo, M. R. & McClements, D. J. Improving Resveratrol Bioaccessibility Using Biopolymer Nanoparticles and Complexes: Impact of Protein-Carbohydrate Maillard Conjugation. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3915–3923 (2015).
116. Ovais, M. *et al.* Multifunctional theranostic applications of biocompatible green-synthesized colloidal nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 4393–4408 (2018).
117. Pu, C., Tang, W., Liu, M., Zhu, Y. & Sun, Q. Resveratrol-loaded hollow kafirin nanoparticles via gallic acid crosslinking: An evaluation compared with their solid and non-crosslinked counterparts. *Food Res. Int.* **135**, (2020).
118. Li, X. *et al.* Development of hollow kafirin-based nanoparticles fabricated through layer-by-layer assembly as delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocoll.* **96**, 93–101 (2019).
119. Taylor, J. Preparation , characterisation and functionality of kafirin microparticles by PhD Food Science Department of Food Science University of Pretoria. (2008).
120. Anyango, J. O., Taylor, J. R. N. & Taylor, J. *Role of γ -kafirin in the formation and organization of kafirin.* (2013).
121. Patel, A., Hu, Y., Tiwari, J. K. & Velikov, K. P. Synthesis and characterisation of zein-curcumin colloidal particles. *Soft Matter* **6**,

6192–6199 (2010).

122. Iqbal, H. M. N. & Keshavarz, T. *The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites. Biomedical Composites* (Elsevier Ltd., 2017). doi:10.1016/b978-0-08-100752-5.00014-7
123. Mao, Y. & McClements, D. J. Influence of electrostatic heteroaggregation of lipid droplets on their stability and digestibility under simulated gastrointestinal conditions. *Food Funct.* **3**, 1025–1034 (2012).

VII. Perspectivas

- Probar condiciones de síntesis adicionales que mejoren la homodispersidad y disminuyan el tamaño de las nanopartículas de kafirina.
- Realizar una caracterización más exhaustiva de las propiedades fisico-químicas.
- Hacer estudios de liberación de progesterona en el tiempo en diferentes condiciones en base a su posible formulación.
- Evaluar otras moléculas hidrofóbicas de interés farmacéutico.