

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

NANOPARTÍCULAS DE C-FICOCIANINA: AUTOENSAMBLADO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Moises Galindo-Pérez¹, Marcia Morales-Ibarría¹, Dolores Reyes-Duarte¹, Andrés Hernández-Arana², José Campos-Terán¹, Izlia Arroyo-Maya^{1*}

¹ Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Santa Fe Cuajimalpa, C.P. 05348, México.

² Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa CDMX, 09340, México.

Correo electrónico: iarroyo@cua.uam.mx

Resumen

La tendencia actual para la obtención de productos farmacéuticos y alimenticios requiere el uso de materiales naturales, biodegradables y/o amigables con el ambiente. La C-ficocianina derivada de *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 ha demostrado poseer alta actividad antioxidante, además, presenta diferentes actividades biológicas y puede servir como colorante natural. Sin embargo, se degrada fácilmente debido a los cambios en las condiciones ambientales. Para evitar la degradación de la C-ficocianina y mejorar su vida útil, se requiere su encapsulación directa en nanopartículas biopoliméricas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar nanopartículas de proteína de suero de leche (WPI) y pectina para la encapsulación de C-ficocianina. Asimismo, se evaluó su actividad antioxidante medida por ABTS y DPPH y su estabilidad frente al almacenamiento y a los cambios de pH y temperatura. Los resultados mostraron que las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina tuvieron tamaños de partícula de 463 nm con índice de polidispersidad de 0.2, potencial zeta de -39 mV y una eficiencia de encapsulación del 87%. La actividad antioxidante medida por ABTS y DPPH fue 4.9 y 2.2 veces menor que la del extracto libre, respectivamente, indicando la protección de los grupos antioxidantes de la C-ficocianina. Durante 70 días de almacenamiento no se evidenciaron cambios importantes en la coloración. La estabilidad de las nanopartículas frente al pH fue máxima a un pH de 4.0. A temperaturas de calentamiento menores de 60 °C se pueden mantener las características de la C-ficocianina. Por lo tanto, el método de autoensamblado usando WPI y pectina fue adecuado para integrar, proteger y estabilizar a la C-ficocianina, lo que hace posible su aplicación tecnológica en diferentes áreas de interés tales como salud y alimentos.

Palabras clave: nanotecnología, microalgas, c-ficocianina, ABTS, DPPH, estabilidad

Abstract

The current trend for obtaining pharmaceutical and food products requires the use of natural, biodegradable, and/or environmentally friendly materials. C-phycoerythrin derived from *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 has shown to possess high antioxidant activity. Additionally, it exhibits various biological activities and can serve as a natural dye. However, it degrades easily due to changes in environmental conditions. To prevent the degradation of C-phycoerythrin and enhance its shelf life, its direct encapsulation into biopolymeric nanoparticles is required. Therefore, the objective of this study was to develop and characterize whey protein isolate (WPI) and pectin



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



nanoparticles for the encapsulation of C-phycoerythrin. In addition, their antioxidant activity was measured by ABTS and DPPH assays, and their stability against storage and changes in pH and temperature were evaluated. The results showed that C-phycoerythrin/WPI-pectin nanoparticles had particle sizes of 463 nm with a polydispersity index of 0.2, a zeta potential of -39 mV, and an encapsulation efficiency of 87%. The antioxidant activity evaluated by ABTS and DPPH was 4.9 and 2.2 times lower than that of the free extract, respectively, indicating the protection of the antioxidant groups of C-phycoerythrin. During 70 days of storage, no significant changes in coloration were observed. The stability of the nanoparticles against pH was maximum at a pH of 4.0. C-phycoerythrin characteristics can be maintained at heating temperatures below 60 °C. Therefore, the self-assembly method using WPI and pectin was suitable for integrating, protecting, and stabilizing C-phycoerythrin, making its technological applications in different areas of interest such as health and foods.

Key words: nanotechnology, microalgae, C-phycoerythrin, ABTS, DPPH, stability

Introducción

Las proteínas derivadas de microalgas como las ficocianinas, dentro de las cuales destaca la C-ficocianina, han ganado interés debido a sus propiedades benéficas para la salud. La estructura tridimensional de la C-ficocianina incluye a las subunidades α y β , ambas con estructura de α -hélice y pesos moleculares entre 10-19 kDa y 14- 21 kDa, respectivamente (Ashaolu et al., 2021). Puede presentarse en cuatro formas estructurales diferentes, monomérica trimérica, hexamérica y decamérica dependiendo de las condiciones externas como el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteínas (Chen et al., 2022; Romay et al., 2003). Tiene un componente no proteico llamado ficocianobilina que actúa como un grupo cromóforo y es responsable de su color.

Una de las características distintivas de la C-ficocianina es su color azul brillante con diferentes

tonalidades, lo que la hace apta para ser utilizada como colorante natural en una gran diversidad de alimentos (Kuddus et al., 2015). Dentro de la actividad biológica que poseen este tipo de proteínas, resalta su capacidad para actuar como agentes antiinflamatorios, antidiabéticos, inmunomoduladores, antioxidantes e inducir la apoptosis de células cancerosas (Patel et al., 2022). Recientemente se ha caracterizado la cepa *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 respecto a su producción de biomasa, fijación de CO₂ y producción de C-ficocianina, donde se observó que la C-ficocianina purificada tiene una elevada capacidad antioxidante (Hernández-Martínez et al., 2023).

Sin embargo, la C-ficocianina puede degradarse debido a diversos factores fisicoquímicos, por ejemplo, cambios de temperatura, pH, presencia de oxígeno, etc. (Yuan et al., 2022), lo cual limita sus aplicaciones

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



tecnológicas tanto en el campo de la salud como de alimentos. A temperaturas inferiores de 45 °C la C-ficocianina no presenta cambios importantes; sin embargo, al incrementarse la temperatura, su vida media disminuye exponencialmente (Adjali et al., 2022). También las modificaciones del pH, tanto alcalinos como ácidos, producen la desnaturalización de la proteína (Li et al., 2022b). La exposición de la C-ficocianina a los espectros ultravioleta y visible, también generan cambios conformacionales que son influenciados por la longitud de onda y la intensidad de la luz (Yuan et al., 2022). Los cambios que ocurren en la C-ficocianina por efecto de las modificaciones de las condiciones ambientales, tienen un impacto negativo en sus propiedades funcionales y tecnológicas.

La nanotecnología es una alternativa para la estabilización fisicoquímica de este tipo de proteínas. Los sistemas nanoparticulados incluyen a las partículas sólidas, los liposomas, los sistemas coloidales, las fibras, los dendrímeros, etc., que son capaces de atrapar, integrar o encapsular física o químicamente a las proteínas. La característica principal de estos sistemas es su tamaño (1-1000 nm) y pueden proteger a la C-ficocianina y mejorar su estabilidad física y química. Además son plataformas que pueden generar una liberación controlada de la C-ficocianina, potencializando sus propiedades funcionales (Li et al., 2022a).

Por lo que este trabajo presenta los resultados obtenidos de la preparación y caracterización de nanopartículas de C-ficocianina derivada de

cianobacterias (*Desertifilum tharense* UAM-C/S02). Específicamente, se evaluaron las propiedades físicas (tamaño, índice de polidispersidad, morfología y carga superficial), químicas (actividad antioxidante, porcentaje de inhibición de radicales libres y eficiencia de encapsulación) y su estabilidad (frente al pH y a la temperatura) de las nanopartículas ensambladas a partir de C-ficocianina con otras proteínas (WPI) y carbohidratos (pectina).

Materiales y métodos

Materiales

La proteína aislada de suero de leche (WPI) se adquirió de Davisco Foods International Inc. La pectina cítrica (alrededor de 80% de grado de metoxilación) se adquirió de Sigma-Aldrich®. La C-ficocianina fue extraída de *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 de acuerdo con el protocolo descrito por Hernández-Martínez et al. (2023). Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

Preparación de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Las nanopartículas de WPI-pectina (sin C-ficocianina) fueron fabricadas mediante el método de complejación iónica propuesto por Arroyo-Maya & McClements (2015), con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon soluciones *stock* de WPI y pectina a una concentración de 1 y 0.5% (p/v), respectivamente, en agua Mili-Q® y con agitación magnética a 500 rpm. Ambas dispersiones fueron mezcladas hasta una

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

concentración final de 0.5% de WPI y 0.25% de pectina. La mezcla resultante fue calentada a 90 °C usando un baño de agua (BM-40T, BG-PRONALAB, México) por 5 minutos para provocar la desnaturalización y agregación de las proteínas globulares. Después, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.0 usando HCl 0.1 M, provocando el autoensamblaje de las nanopartículas. La dispersión fue almacenada en refrigeración a 2.5 °C.

Las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina fueron preparadas siguiendo la misma metodología con la diferencia que después del proceso de calentamiento y enfriamiento de la mezcla de WPI-pectina, se agregaron 5 mL de C-ficocianina (0.45 mg/mL) bajo agitación magnética por 10 min. Finalmente, el pH de la dispersión fue ajustado a 4.0 con HCl 0.1 M y las nanopartículas fueron almacenadas en refrigeración.

Caracterización de las nanopartículas

Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD)

El TP y el IPD de los nanosistemas con y sin C-ficocianina fueron determinados mediante la técnica de dispersión dinámica de luz usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, R.U.). Antes de la medición, cada dispersión de nanopartículas fue diluida 10 veces con agua Mili-Q®. El TP e IPD se midieron por triplicado.

Potencial zeta (ζ)

La carga superficial de las nanopartículas de cada sistema fue obtenida por el movimiento electroforético de las partículas en dispersión usando un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, R.U.). Similarmente, antes de la medición las dispersiones fueron diluidas 10 veces. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Eficiencia de encapsulación (%EE)

El %EE fue determinado mediante la cuantificación de la C-ficocianina no encapsulada. Para este propósito, una alícuota C-ficocianina/WPI-pectina fue centrifugada (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany) a 10000 rpm por 20 min. Posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido a las longitudes de onda de 280 (proteína), 620 (C-ficocianina) y 650 nm (aloficocianina) usando un espectrofotómetro (Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fischer, EE. UU.). La concentración de C-ficocianina fue calculado usando el coeficiente de extinción molar descrito por Soni et al., (2006), con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de C - ficocianina (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{(OD_{620} - 0.7 OD_{650})}{7.38} \quad (1)$$

Y el %EE fue calculado como sigue:

$$EE (\%) = \frac{[C\text{-ficocianina}_{Total}] - [C\text{-phycoyanin}_{sobrenadante}]}{[C\text{-ficocianina}_{Total}]} \quad (2)$$



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Las determinaciones del %EE se hicieron por triplicado.

Actividad antioxidante de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Actividad antioxidante medida con 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico (ABTS)

El radical catiónico ABTS^{•+} se generó mezclando una solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (concentración final de 2.45 mM) en agitación magnética durante 12 horas. La solución se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 a una longitud de onda de 734 nm (Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fischer, EE. UU.). Después, se tomaron 950 µL de esta solución, se mezclaron con 50 µL de la muestra (nanopartículas de WPI-pectina, C-ficocianina/WPI-pectina o el extracto de C-ficocianina) y se agregaron 1000 µL de etanol. Posteriormente, se realizó la incubación de la mezcla durante 30 min a 25 °C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 734 nm. Para el sistema blanco se omitió la adición de la muestra, y se adicionaron 50 µL de etanol.

Los resultados fueron expresados en función a la capacidad antioxidante equivalente al Trolox[®] (TEAC, por sus siglas en inglés). Para este fin se determinó la disminución de la absorbancia del radical ABTS en función de la concentración de Trolox[®] (0-300 µM), calculándose el % de inhibición de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[1 - \left(\frac{A_F}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

Donde A_F es la absorbancia medida a las diferentes concentraciones de Trolox[®]; y A_0 es la absorbancia del sistema blanco (0 µM). Finalmente, se construyó una curva patrón del % de inhibición en función de la concentración de Trolox[®] ($y = 0.209x - 0.268$; $R^2 = 0.995$). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante medida por el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Para evaluar la actividad antioxidante medida por el método de DPPH, se preparó una solución de DPPH (100 mM) en etanol y se colocó en la oscuridad durante 2 h. Las determinaciones se realizaron en un tubo forrado con aluminio para evitar su exposición a la luz se adicionaron 790 µL de etanol, 185 µL de la muestra (nanopartículas de WPI-pectina, C-ficocianina/WPI-pectina o el extracto de C-ficocianina) y 600 µL de la solución de DPPH. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 30 min a 25 °C. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm (Evolution 300 UV-visible Spectrophotometer, Thermo Fischer, EE. UU.). Las mediciones se hicieron por triplicado.

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina encapsulada durante el almacenamiento



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en la degradación de la C-ficocianina se comparó la degradación de la C-ficocianina nanoencapsulada en función de una solución acuosa de C-ficocianina a la misma concentración, que fueron almacenadas a 4 °C durante 70 días. Se determinó la concentración del extracto acuoso a los 0, 18 y 70 días. Los resultados fueron expresados como media y desviación estándar de tres repeticiones. Además, se registró el aspecto visual mediante fotografías.

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina frente a los cambios del pH

Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas frente a las modificaciones del pH, se determinó variando el pH (2-9) de un lote de nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina usando HCl (0.1 M) o NaOH (0.1 M). cada dispersión se caracterizó de acuerdo con su TP, IPD y ζ usando un Zetasizer Nano-ZS como se mencionó anteriormente.

Estabilidad térmica de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina

La estabilidad térmica de las nanopartículas con C-ficocianina se determinó de la siguiente manera: se diluyeron 5 mL de dispersión de nanopartículas con agua Mili-Q® acidificada (pH de 4.0). La mezcla se colocó a diferentes temperaturas (20, 40, 60, 80 y 90 °C) en un baño de agua con control de temperatura durante 60 min. Después cada una de las dispersiones

sometidas a tratamiento térmico fueron evaluadas en términos del TP, ζ y su apariencia visual.

Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los datos fueron expresados como el promedio y la desviación estándar. Para evaluar la significancia, se realizó un análisis estadístico ANDEVA y las diferencias entre medias se determinaron con una prueba de Tukey por medio del software estadístico Minitab® (versión 17, Minitab® Inc., Pensilvania, EE. UU.).

Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Tamaño de partícula, índice de polidispersidad potencial zeta y eficiencia de encapsulación

En condiciones de neutralidad y después del calentamiento, se exponen los grupos cargados negativamente del núcleo de la β -lactoglobulina del WPI y los grupos carboxilato del ácido galacturónico de la pectina. Cuando el pH es ajustado (pH=4.0), las proteínas de WPI externalizan las cargas positivas y la pectina sus cargas negativas, lo que produce interacciones electrostáticas (Salminen & Weiss, 2014) capaces de atrapar a la C-ficocianina. La **Tabla 1** muestra las características fisicoquímicas de las nanopartículas fabricadas con WPI y pectina como

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

biopolímeros y la C-ficocianina como material encapsulante.

Los TP de los nanosistemas biopoliméricos variaron entre 350 y 470 nm siendo significativamente ($p < 0.05$) más grandes las nanopartículas de C-ficocianina que las nanopartículas sin carga. Estas diferencias son atribuibles a las interacciones entre la C-ficocianina y los biopolímeros usados. Las proteínas del WPI puede fuertemente interactuar con la estructura α -helicoidal de la C-ficocianina (Zhang et al., 2021) produciendo una alta eficiencia de encapsulación (%EE $\approx 87\%$), al mismo tiempo, los grupos carboxilo de la pectina interactúan con los grupos positivos del WPI y la C-ficocianina, en consecuencia el tamaño de partícula incrementa.

Las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina presentaron un IPD por debajo de 0.3. El análisis ANDEVA no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Las nanopartículas biopoliméricas preparadas tienen un comportamiento monomodal con una distribución de tamaños estrecha y con una clara tendencia al tamaño de partícula promedio.

También la **Tabla 1** muestra la carga superficial medida por el ζ de las nanopartículas de WPI-pectina con y sin C-ficocianina. El ζ para las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina fue mucho mayor que el ζ de las nanopartículas de WPI-pectina. El análisis ANDEVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas, lo que es atribuido a las interacciones entre la C-ficocianina, las proteínas del WPI y la pectina, disminuyendo la cantidad de grupos cargado negativamente en la superficie de las partículas y con ello el aumento en el valor del ζ .

La carga negativa es producto de los grupos carboxílicos del ácido galacturónico de la pectina que son exhibidos durante la fabricación de las nanopartículas y contribuyen a la carga promedio del sistema (Kotchabhakdi & Vardhanabhuti, 2020). Además, la carga promedio de la superficie de las partículas es menor a los -20 mV, esto indica que los nanosistemas preparados tienen una buena estabilidad física, dado que las nanopartículas tienen una menor tendencia a agregarse o a flocular debido a las fuerzas electrostáticas repulsivas encontradas en la superficie de las partículas (Gülseren et al., 2012).

Tabla 1: Características fisicoquímicas de las nanopartículas de WPI-pectina y C-ficocianina/WPI-pectina

Sistema	TP (nm)	IPD	ζ (mV)	EE (%)
Nanopartículas de WPI-pectina	356.82 \pm 8.47 ^a	0.22 \pm 0.01 ^a	-39.62 \pm 1.75 ^a	----
Nanopartículas de C-Ficocianina/WPI-pectina	463.23 \pm 4.02 ^b	0.20 \pm 0.01 ^a	-24.50 \pm 0.90 ^b	87.29 \pm 0.55

^{a,b} Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Actividad antioxidante de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina

La evaluación de la actividad antioxidante de las nanopartículas de C-ficocianina es importante para establecer el efecto del proceso de fabricación sobre la conservación de las propiedades funcionales de los compuestos encapsulados. La **Figura 1** muestra las actividades antioxidantes determinadas con los radicales ABTS (**Figura 1a**) y DPPH (**Figura 1b**).

La **Figura 1a** representa la actividad antioxidante de las nanopartículas de WPI-pectina con y sin C-ficocianina y el extracto de C-ficocianina, medidos por la metodología de ABTS y expresados como equivalente a Trolox®, donde se muestra que el extracto libre (no encapsulado) de la C-ficocianina presenta la mayor actividad antioxidante, alcanzando valores de 319 ± 6.85 TEAC. Las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina y WPI-pectina tuvieron valores de capacidad antioxidante de 65.34 ± 13.36 y 17.72 ± 10.34 , respectivamente. El análisis estadístico ANDEVA presentó diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La **Figura 1b** muestra la actividad antioxidante determinada por DPPH de las nanopartículas comparadas con el extracto no encapsulado. En este caso las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina tuvieron un % de inhibición de 27.99 ± 5.08 y las nanopartículas de WPI-pectina de 12.66 ± 4.01 , mientras que, el extracto de C-ficocianina tuvo el mayor % de inhibición (61.69 ± 2.64). El análisis

estadístico ANDEVA también presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

La actividad antioxidante mostrada para las nanopartículas de WPI-pectina es debido a que el WPI está compuesto principalmente por β -lactoglobulina que ha demostrado una actividad antioxidante dependiente de la concentración, siendo capaz de inhibir al radical catiónico ABTS producto de la presencia de aminoácidos con actividad antioxidante como Tyr, Lys, Arg, Cys, Met e His; y péptidos antioxidantes como YVEEL, MHIRL, y WYSLAMAASDI (Hernández-Ledesma et al., 2008; Zhang et al., 2013), que componen a la proteína.

Por otra parte, las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina tienen una actividad antioxidante mayor a las nanopartículas de WPI-pectina, pero inferior al extracto libre. De acuerdo con investigaciones previas, la proteína C-ficocianina extraída de la cepa *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 presentó una inhibición del radical ABTS del 100% (Hernández-Martínez et al., 2023). Sin embargo, la reducción en la capacidad antioxidante de las nanopartículas conteniendo C-ficocianina es atribuido a que la C-ficocianina quedó atrapada casi por completo en el interior de las nanopartículas (%EE $\approx 87\%$); por lo tanto, los grupos que producen la actividad antioxidante en la C-ficocianina quedan enmascarados por los biopolímeros, atenuando su actividad.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

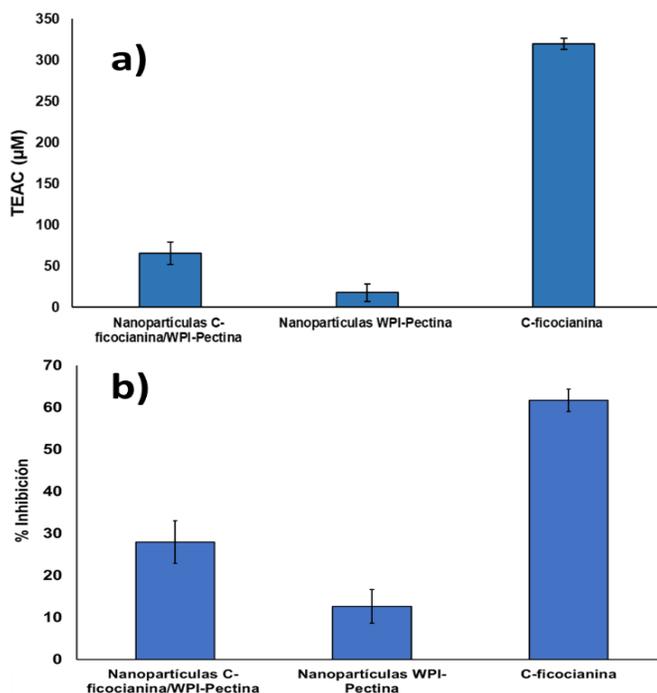


Figura 1: Actividad antioxidante de las nanopartículas y el extracto de C-ficocianina. a) actividad antioxidante medida por ABTS; b) actividad antioxidante medida por DPPH

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina en almacenamiento

Diversas aplicaciones de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina en múltiples áreas requieren que las proteínas tengan buena estabilidad física, es decir, que no sufran fenómenos de inestabilidad coloidal y que la C-ficocianina mantenga sus propiedades físicas, químicas y funcionales por largos periodos de tiempo. Por ejemplo, como aditivo colorante en alimentos se requiere que el color azul de la C-ficocianina permanezca durante toda la vida útil del producto. La **Figura 2** muestra las características visuales de la C-ficocianina en dispersión acuosa

comparada con las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina almacenadas en refrigeración durante 70 días.

En el almacenamiento la dispersión acuosa de C-ficocianina se degradó en un tiempo relativamente corto. En el día 18 se perdió el 90% de la C-ficocianina, y para el día 70, hubo una pérdida del 100% de la proteína, lo que indica que la degradación de la C-ficocianina ocurre a una velocidad elevada, disminuyendo sus aplicaciones tecnológicas y sus propiedades funcionales.

Por otra parte, la C-ficocianina nanoencapsulada con WPI-pectina como biopolímeros, mostró una menor

velocidad de degradación, ya que el color azul permaneció a lo largo de los 70 días de almacenamiento, mejorando con ello, las propiedades funcionales y tecnológicas de la C-ficocianina. Por lo tanto, se demostró que la nanotecnología y en particular la nanoencapsulación es una herramienta

muy útil para proteger a los compuestos bioactivos sensibles a las condiciones ambientales. Además, las nanocápsulas de C-ficocianina/WPI-pectina se pueden fabricar y almacenar durante 70 días para una multitud de aplicaciones incluyendo productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios.

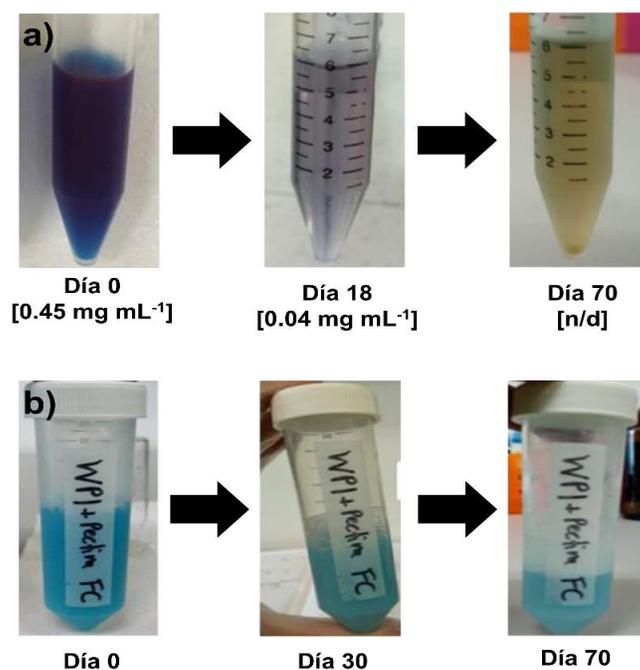


Figura 2: Aspecto visual de: a) dispersión acuosa de la C-ficocianina y b) nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina durante 70 días en almacenamiento refrigerado

Estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina frente a variaciones del pH

Los estudios de estabilidad de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina frente a cambios en la acidez o alcalinidad del medio, son indispensables dadas las diferentes aplicaciones tecnológicas en las áreas farmacéutica y alimentaria. La **Tabla 2** muestra

el comportamiento en el TP, PDI y ζ de las nanopartículas de WPI-pectina cargadas con C-ficocianina sometidas a variaciones en las condiciones del pH. El análisis estadístico ANDEVA mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) del pH sobre las características fisicoquímicas de las nanopartículas.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



El TP disminuyó con el aumento del pH desde 462 a 272 nm a pH de 2.0 y 9.0, respectivamente, encontrando los valores más pequeños a un pH entre 4.0 y 5.0. El IPD decreció desde 0.42 a 0.22 a valores de pH de 2.0 y 4.0, respectivamente. Luego aumenta gradualmente a medida que el pH se incrementa hasta un valor máximo de 9.0, mostrando una alta variabilidad en las mediciones, producto de la alta inestabilidad de las nanopartículas en condiciones alcalinas.

A valores de pH por arriba de 5.5, todos los polímeros se encuentran cargados negativamente, a medida que se incrementa el pH se producen los efectos de descomplejación de la nanoestructura promovidos por la repulsión electrostática entre los biopolímeros y la C-ficocianina; por lo tanto, se genera una alta variabilidad en los tamaños de las partículas y en el IPD. Este efecto también ha sido observado por Arroyo-Maya & McClements (2015), en nanopartículas de antocianinas/WPI-pectina evaluadas a diferentes condiciones de pH, donde se demostró que con el incremento en el valor de pH se provoca la agregación de las nanopartículas debido a la descomplejación entre la WPI y la pectina, por lo tanto, se obtiene una mayor variación en el TP.

El ζ de las nanopartículas de C-ficocianina muestra un comportamiento descendente, encontrándose los valores más cercanos a cero cuando la acidez del medio es muy baja. A medida que se incrementa el valor del pH, decrece la carga superficial de las nanopartículas; por consiguiente, el ζ disminuye. Este

comportamiento es atribuido a los biopolímeros utilizados para fabricar las nanopartículas, por un lado, las proteínas del WPI y la C-ficocianina presentan una alta cantidad de cargas positivas en condiciones ácidas (a un pH inferior a su punto isoeléctrico), mientras que, a valores de pH superiores al punto isoeléctrico, exhiben mayoritariamente cargas negativas. Por otro lado, la cantidad de grupos carboxilo disociados en la pectina es baja a pH ácidos o por debajo del pK_a (≈ 3.5), cuando el pH aumenta, se favorece la disociación de los grupos carboxilo y se provoca la formación de grupos carboxilatos con cargas negativas (Salminen & Weiss, 2014). También, cuando el pH es mayor a 5.0 todos los biopolímeros presentan cargas negativas, generando el fenómeno de descomplejación y contribuyendo a la disminución del ζ .

La apariencia visual de las nanopartículas a diferentes valores de pH se muestra en la **Figura 3**. A un pH de 4.0 el sistema nanoestructurado presenta una apariencia más turbia que a valores de pH por arriba o por debajo donde las dispersiones se muestran traslúcidas con una evidente separación de fases. Esto es debido a que a un pH de 4.0, todos los componentes, tanto proteínas como el polisacárido, interaccionan fuertemente entre sí y logran un sistema con buena estabilidad; mientras que, a valores de pH diferentes de 4.0, la estabilidad de las dispersiones es menor como producto de los cambios de las cargas superficiales de las biomoléculas y los efectos de la descomplejación del WPI y la pectina.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Tabla 2: Cambios en el tamaño, IPD y potencial zeta de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina a diferentes condiciones de pH

Muestra	TP (nm)	IPD	ζ (mV)
pH 2	462.30 \pm 25.73 ^a	0.46 \pm 0.05 ^a	-2.56 \pm 0.55 ^a
pH 3	530.00 \pm 12.31 ^a	0.51 \pm 0.03 ^a	-7.57 \pm 0.30 ^b
pH 4	211.57 \pm 5.28 ^b	0.22 \pm 0.07 ^b	-14.20 \pm 0.75 ^c
pH 5	193.27 \pm 3.00 ^b	0.28 \pm 0.02 ^c	-26.77 \pm 0.64 ^d
pH 6	208.40 \pm 19.07 ^b	0.41 \pm 0.03 ^d	-32.20 \pm 3.10 ^e
pH 7	255.77 \pm 12.63 ^b	0.45 \pm 0.04 ^d	-30.00 \pm 1.90 ^e
pH 9	271.93 \pm 116.51 ^b	0.55 \pm 0.20 ^e	-35.63 \pm 1.99 ^f

^{a,b,c,d,e,f} Las letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas.



Figura 3: Estabilidad física de las nanodispersiones de C-ficocianina/WPI-pectina a diferentes condiciones de pH

Estabilidad térmica de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina

La **Figura 4** muestra el aspecto visual de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-pectina sometidas a diferentes temperaturas (0 a 90 °C) durante 60 min. A bajas temperaturas (0 y 20 °C) los sistemas presentaron un aspecto turbio con una coloración azul intenso por la conservación de las

propiedades de la C-ficocianina. Cuando se aumenta la temperatura, la coloración azul desaparece gradualmente. En el sistema con calentamiento a 40 °C se observó una ligera degradación de la C-ficocianina; mientras que, a 60 °C existe una mayor degradación de la proteína, pero se mantiene un ligero color azul en la dispersión. A la temperatura de calentamiento de 80 °C se degrada la C-ficocianina casi en su totalidad, observándose en la imagen un

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ligero tono azul en el sistema. Finalmente, para la temperatura de calentamiento a 100 °C hay una pérdida total del color azul de la C-ficocianina.

De acuerdo con diferentes estudios, la degradación de la C-ficocianina es prácticamente nula o muy bajas a temperaturas inferiores a los 45 °C. Mientras que, a temperaturas más altas, la velocidad de degradación térmica está directamente relacionada con el aumento de la temperatura (Adjali et al., 2022; Antelo et al., 2008). Resultados similares fueron reportados por

Braga et al. (2016), para nanofibras cargadas con C-ficocianina, donde se encontró un aumento en la vida media y una disminución significativa en la tasa de degradación térmica de la proteína.

Estos resultados demuestran que la integración de la C-ficocianina en las nanoestructuras de WPI-pectina puede ayudar a preservar sus propiedades físicas, químicas, sensoriales y funcionales en productos que requieran algún tratamiento térmico durante su producción, por ejemplo, los alimentos pasteurizados.



Figura 4: Apariencia visual de las nanopartículas de C-ficocianina/WPI-Pectina después del tratamiento térmico durante 60 min a diferentes temperaturas

Conclusiones

La técnica de autoensamblado por medio de complejación electrostática usando WPI y pectina como biopolímeros es útil para la obtención de sistemas nanométricos, monodispersos, estables y es capaz de incorporar moléculas solubles en agua como la C-ficocianina con alta eficiencia. Además, la nanoencapsulación enmascaró los grupos antioxidantes de la C-ficocianina, disminuyendo su

actividad antioxidante, pero protegiendo a la biomolécula.

Con respecto a la estabilidad, las nanocápsulas de C-ficocianina no presentaron diferencias considerables en la coloración durante 70 días de almacenamiento refrigerado, manteniendo con ellos sus propiedades físicas, químicas, sensoriales y funcionales. También se observó la máxima estabilidad a un pH de 4.0 donde existe una excelente integración entre los



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

componentes de las nanopartículas. Finalmente, con la nanoencapsulación se lograron mantener las características de la C-ficocianina frente a diferentes condiciones de calentamiento.

Por lo tanto, la nanoencapsulación usando WPI y pectina como biopolímeros encapsulantes es de gran utilidad para proteger a diferentes compuestos como la C-ficocianina, lo que hace posible su aplicación tecnológica en diversas áreas de interés como la farmacéutica, cosmética y alimenticia.

Agradecimientos

Galindo-Pérez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca posdoctoral otorgada.

Referencias

Adjali A, Clarot I, Chen Z, Marchioni E & Boudier A (2022) Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 12(3): 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005>.

Antelo FS, Costa JAV & Kalil SJ (2008) Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 41(1): 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.03.012>.

Arroyo-Maya IJ & McClements DJ (2015) Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food Research International* 69: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.005>.

Ashaolu TJ, Samborska K, Lee CC, Tomas M, Capanoglu E, Tarhan Ö, Taze B & Jafari SM (2021) Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 193: 2320–2331.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.064>.

Braga ARC, Figueira FS, Silveira JT, Morais MG, Costa JAV & Kalil SJ (2016) Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and preservative agents. *Journal of Food Processing and Preservation*. 40(6): 1264–1269.

<https://doi.org/10.1111/jfpp.12711>.

Chen H, Qi H & Xiong P (2022) Phycobiliproteins—A family of algae-derived biliproteins: Productions, characterization and pharmaceutical potentials. *Marine Drugs*. 20(7): 1–21.

<https://doi.org/10.3390/md20070450>.

Gülseren I, Fang Y & Corredig M (2012) Complexation of high methoxyl pectin with ethanol desolvated whey protein nanoparticles: Physico-chemical properties and encapsulation behaviour. *Food and Function*. 3(8): 859–866. <https://doi.org/10.1039/c2fo10235h>.

Hernández-Ledesma B, Recio I & Amigo L (2008) β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*. 35(2): 257–265.

<https://doi.org/10.1007/s00726-007-0585-1>.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



Hernández-Martínez I, González-Resendiz L, Sánchez-García L, Viguera-Ramírez G, Arroyo-Maya IJ & Morales-Ibarria M (2023) C-phycoerythrin production with high antioxidant activity of a new thermotolerant freshwater *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 strain. *Bioresource Technology*. 369: 128431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128431>.

Li Y, Li X, Liang ZP, Chang XY, Li FT, Wang XQ & Lian XJ (2022a) Progress of microencapsulated phycoerythrin in food and pharma industries: A review. *Molecules*. 27(18): 5854. <https://doi.org/10.3390/molecules27185854>.

Li Y, Zhang Z & Abbaspourrad A (2022b) Improved pH stability, heat stability, and functionality of phycoerythrin after PEGylation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 222: 1758–1767. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.261>.

Kotchabhakdi A & Vardhanabhuti B (2020) Formation of heated whey protein isolate-pectin complexes at pH greater than the isoelectric point with improved emulsification properties. *Journal of Dairy Science*. 103(8): 6820–6829. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17745>.

Kuddus M, Singh P, Thomas G & Ali A (2015) Production of C-phycoerythrin and its potential applications. In: *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. Gupta V,

Tuohy MG, O'Donovan A & Lohani M (eds). John Wiley & Sons, Reino Unido, 283-299.

Patel SN, Sonani RR, Roy D, Singh NK, Subudhi S, Pabbi S & Madamwar D (2022) Exploring the structural aspects and therapeutic perspectives of cyanobacterial phycobiliproteins. *3 Biotech*. 12(9): 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03284-2>.

Romay C, González R, Ledón N, Ramirez D & Rimbau V (2003) C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*. 4(3): 207–216. <https://doi.org/10.2174/1389203033487216>.

Salminen H & Weiss J (2014) Effect of pectin type on association and pH stability of whey protein-pectin complexes. *Food Biophysics*. 9(1): 29–38. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9314-3>.

Soni B, Kalavadia B, Trivedi U, & Madamwar D (2006) Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*. 41(9): 2017–2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>.

Yuan B, Li Z, Shan H, Dashnyam B, Xu X, McClements DJ, Zhang B, Tan M, Wang Z & Cao C (2022) A review of recent strategies to improve the physical stability of phycoerythrin. *Current Research in Food Science*. 5: 2329–2337. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.019>.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Zhang QX, Wu H, Ling YF & Lu RR (2013) Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*. 80(3): 367–373.

<https://doi.org/10.1017/S0022029913000320>.

Zhang S, Zhang Z, Dadmohammadi Y, Li Y, Jaiswal A & Abbaspourrad A (2021) Whey protein improves the stability of C-phycoerythrin in acidified conditions during light storage. *Food Chemistry*. 344: 128642.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128642>.