



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Nanoarcillas empleadas como sistemas de encapsulación y liberación controlada: Caracterización y efecto de su incorporación en las propiedades de geles de gelatina

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: ANA MARIA TONE

TUTOR/A ACADEMICO: ÉDGAR PÉREZ ESTEVE,
GEMMA MORAGA BALLESTEROS

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, JULIO 2018

NANOARCILLAS EMPLEADAS COMO SISTEMAS DE ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA: CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE SU INCORPORACIÓN EN LAS PROPIEDADES DE GELES DE GELATINA

Ana Maria Tone¹, Édgar Pérez Esteve¹, Gemma Moraga Ballesteros¹

RESUMEN

El diseño de nuevos alimentos funcionales con declaraciones nutricionales y/o de salud requiere a menudo la encapsulación, protección y posterior liberación controlada de moléculas bioactivas. Entre los sistemas de encapsulación más novedosos, las nanoarcillas laminares están recibiendo gran atención debido a su capacidad para encapsular gran cantidad de un compuesto activo y liberarlo controladamente al medio. El objetivo de este estudio es caracterizar tres tipos de nanoarcilla (montmorillonita, hectorita y saponita) y evaluar el impacto de la incorporación de dichas partículas, tanto desnudas como funcionalizadas con aminos, en geles de gelatina. Por una parte, se caracterizaron las arcillas de acuerdo a su morfología, distribución de tamaño de partícula y potencial zeta, observándose que la funcionalización con aminos modificó la carga superficial de las partículas. Por otra parte, las propiedades reológicas de los geles fueron evaluadas mediante ensayos oscilatorios con barrido de temperatura. Los resultados han demostrado que la adición de las partículas tanto desnudas como funcionalizadas a un 1% de concentración no modifican la temperatura de gelificación del gel al cual se añade, ni tampoco las propiedades viscoelásticas del gel resultante cuando las partículas están funcionalizadas con aminos. De esta manera, su incorporación como sistemas de liberación controlada no modificarían significativamente estas propiedades del alimento al cual se añadieran.

Palabras clave: nanoarcillas, funcionalización, reología, gelatina.

RESUMEN

El disseny de nous aliments funcionals amb declaracions nutricionals i/o de salut requereix sovint l'encapsulació, protecció i posterior alliberament controlat de molècules bioactives. Entre els sistemes d'encapsulació més nous, les nanoargiles laminars estan rebent gran atenció a causa de la seua capacitat d'encapsular gran quantitat d'un compost actiu i alliberar-lo controladament al medi. L'objectiu d'aquest estudi és caracteritzar tres tipus de nanoargiles laminars (montmotillonita, hectorita i saponita) i avaluar

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València.

l'impacte de la incorporació de dites partícules, tant nues com funcionalitzades amb amines, en gels de gelatina. Per una banda es caracteritzaren les argiles d'acord amb la seua morfologia, distribució de tamany de partícula i potencial zeta, i es va observar que la funcionalització amb amines va modificar la càrrega superficial de les partícules. Per altra banda, les propietats reològiques dels gels es van avaluar amb assajos oscil·latoris amb rampa de temperatura. Els resultats han demostrat que l'addició de partícules tant nues com funcionalitzades a una concentració de 1% no modifiquen la temperatura de gelificació del gel al que s'afegixen, ni tampoc les propietats viscoelàstiques del gel resultant quan les partícules estan funcionalitzades amb amines. D'aquesta manera, la seua incorporació com sistema de alliberament controlat no modificaria significativament aquestes propietats del aliment al qual es podrien afegir.

Paraules claus: nanoargiles, funcionalització, reologia, gelatina.

ABSTRACT

The design of new functional foods with nutritional and/or health claims often requires the encapsulation, protection and subsequent controlled release of bioactive molecules. Among the most novel encapsulation systems, laminar nanoclays are receiving great attention due to their ability to encapsulate a large quantity of an active compound and release it in a controlled way to the medium. The objective of this study is to characterize three types of nanoclays (montmorillonite, hectorite and saponite) and to evaluate the impact of their incorporation, both nude and functionalized with amines, in gelatin gels. On the one hand, nanoclays were characterized according to their morphology, particle size distribution and zeta potential, observing that functionalization with amines modified the surface charge of the particles. On the other hand, the rheological properties of the gels were evaluated by oscillatory tests with temperature sweep. The results have shown that the addition of both naked and functionalized particles at a 1% concentration does not modify the gelation temperature of the gel to which it is added, nor the viscoelastic properties of the resulting gel when the particles are functionalized with amines. In this way, their incorporation as controlled release systems would not significantly modify these properties of the food in which they could be added.

Keywords: nanoclay, functionalization, rheology, gelatin.

1. INTRODUCCIÓN

El diseño de nuevos alimentos funcionales con declaraciones nutricionales y/o de salud requiere a menudo la encapsulación, protección y posterior liberación controlada de moléculas bioactivas. La encapsulación se puede definir como el proceso por el cual los compuestos activos son rodeados con otra sustancia que actúa de revestimiento (Dickinson, 1992; McClements, 2005). Hasta hace unos años, esta técnica utilizaba mayoritariamente en el ámbito farmacéutico. Sin embargo, actualmente su aplicación en otros sectores como el alimentario está cobrando gran importancia. Las principales ventajas de tener un compuesto activo encapsulado, ya sean compuestos antioxidantes, antimicrobianos o microorganismos, son la facilidad de manejo, la protección durante su almacenamiento y transporte y su mejor control en la liberación hacia los alimentos (Bae y Lee, 2008). Para lograr dicho objetivo, se han descrito diferentes sistemas de encapsulación nanoestructurados tanto orgánicos como inorgánicos.

Sistemas de encapsulación orgánicos.

En el ámbito alimentario los materiales tradicionalmente empleados para la formación de microcápsulas son carbohidratos, proteínas y lípidos. Los carbohidratos utilizados para dichos fines son almidón, celulosa, gomas, goma de guar, pectina, alginato, quitosano, dextrinas, ciclodextrinas (Fathi *et al.*, 2012). Por su parte, la incorporación de proteínas como matrices en los sistemas de encapsulación es ampliamente utilizada gracias a la capacidad de las proteínas de formar hidrogeles. Las proteínas contienen numerosos grupos funcionales que pueden modificarse con facilidad en procesos químicos, físicos y biológicos. Las proteínas más empleadas para la formación de matrices son: caseína, proteína hidrolizada de suero lácteo, proteína de soja, proteína de cacahuete y miosina obtenida a partir de carne o pescado (Wang *et al.*, 2012). Por último, también se utilizan emulsiones grasa en agua (O/W) para sistemas de encapsulación en las que el compuesto a encapsular es soluble en el aceite de la emulsión (Muller y Keck, 2004). Alguno de los lípidos empleados en la formación de microcápsulas es la lecitina siendo éste un compuesto lípido polar, extraído principalmente de la soja o de huevo, que se utiliza para encapsular mediante liposomas. Los liposomas han sido ampliamente utilizados por su capacidad de encapsular compuestos hidrofílicos en su núcleo y, compuestos hidrofóbicos en su bicapa lipídica (Aravind *et al.*, 2012).

Los principales problemas al emplear sistemas orgánicos de encapsulación son la baja estabilidad durante el procesado y el almacenado, baja capacidad para controlar la tasa de liberación o conseguir la liberación controlada en una zona específica. Asimismo, las microcápsulas orgánicas presentan problemas de protección del compuesto activo tras su paso por el estómago (Garti y McClements, 2012). En este sentido se han propuesto nuevos sistemas inorgánicos.

Sistemas de encapsulación inorgánicos

Recientes avances en la síntesis inorgánica han posibilitado la creación de nuevos sistemas de encapsulación inorgánica. Uno de los primeros ejemplos fueron las partículas mesoporosas de óxido de silicio. Estas partículas poseen un tamaño de poro y morfología ajustable, así como gran estabilidad química que hacen que estas partículas puedan emplearse para un amplio abanico de aplicaciones nanotecnológicas como por ejemplo la absorción y catálisis (Slowing *et al.*, 2007). Además, poseen una gran superficie porosa que puede modificarse anclando moléculas orgánicas que actúan como puertas moleculares (Pérez-Esteve *et al.*, 2014). Estas puertas moleculares pueden abrirse con estímulos externos como el pH, la temperatura, la luz, reacciones Redox, polaridad..., liberando de forma controlada el compuesto activo (Aznar *et al.*, 2009). Pese a su gran potencial, los materiales mesoporosos todavía tienen grandes limitaciones para su uso industrial, como pueden ser su alto coste económico. En este sentido, se han realizado grandes esfuerzos por encontrar alternativas naturales o sintéticas más económicas. Una de las alternativas propuestas en los últimos años son las nanoarcillas laminares.

Las arcillas laminares pertenecen a la familia estructural conocida como filosilicatos. En su aspecto primario, se componen de la asociación de varias láminas apiladas, las cuales forman agregados irregulares. A gran escala, cada lámina posee alrededor de 100 a 200 nm de longitud y 1 nm de espesor. Las láminas se forman gracias a la asociación de capas tetraédricas y octaédricas. Los grupos tetraédricos $(\text{SiO})_4^{4-}$ se unen compartiendo tres de sus cuatro oxígenos con otros vecinos formando capas, de extensión infinita y fórmula $(\text{Si}_2\text{O}_5)^{2-}$, que constituyen la unidad fundamental de los filosilicatos. En ellas los tetraedros se distribuyen formando hexágonos. El silicio tetraédrico puede estar, en parte, sustituido por Al^{3+} o Fe^{3+} . Estas capas tetraédricas se unen a otras octaédricas de óxido de aluminio, donde el Al^{3+} puede estar sustituido por Mg^{2+} , Fe^{2+} o Fe^{3+} y más raramente por Li, Cr, Mn, Ni, Cu o Zn. El plano de unión entre ambas capas está formado por los oxígenos de los tetraedros, y por grupos hidroxilo de la capa octaédrica, de forma que entre plano y plano queda un hidroxilo en el centro de cada hexágono formado por seis oxígenos apicales. La formación de una capa tetraédrica y una capa octaédrica se denomina estructura bilaminar. También existe la posibilidad de hallarse una formación constituida por una capa octaédrica entre dos tetraédricas. La estructura de planos puede observarse en la Figura 1.

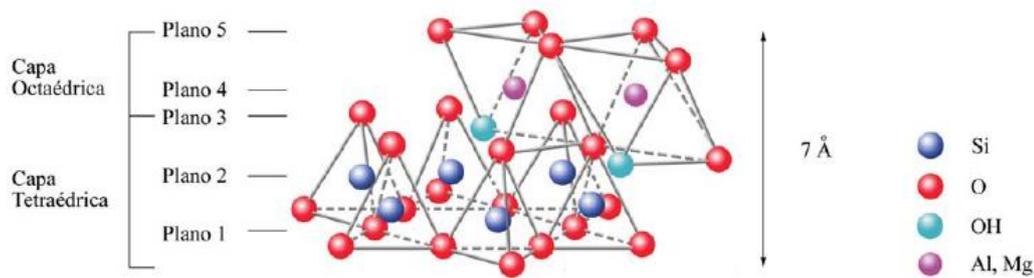


FIGURA 1. Estructura final correspondiente a una lámina T: O. (Urquiza *et al.*, 2009).

Algunos de los tipos más frecuentes de nanoarcillas empleados en sistemas de liberación controlada son la montmorillonita, la hectorita y la saponita.

Montmorillonita

La montmorillonita (**Mon**) es una arcilla mineral, principal constituyente de la bentonita, formada por silicatos apilados cuyo grosor es de 10 Å (Yano *et al.*, 1993). Su fórmula química es $(\text{Na,Ca})_{0.33}(\text{Al,Mg})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ donde $n\text{H}_2\text{O}$ depende de la cantidad de agua ligada. Está formada por dos capas de tetraédricas de sílice y una capa octaédrica, formando láminas. La capa octaédrica contiene Al (III) que intercambia electrones con el oxígeno y se halla rodeada de las dos capas de sílice que interactúan con el oxígeno. Las láminas presentan carga negativa debido al intercambio de Al (III) con Mg (II) y/o Fe (II) (Segad *et al.*, 2010). La posibilidad de intercalarse especies orgánicas dentro de las capas inorgánicas de la Mon, posibilita la preparación de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos con propiedades orgánicas e inorgánicas en un mismo material (Mohanambe y Vasudevan, 2005). La Mon también presenta una gran superficie específica, buena capacidad de absorción, de intercambio catiónico y de transporte y liberación controlada de compuestos (Joshi *et al.*, 2009).

Hectorita

La hectorita (**Hec**) es un silicato magnésico trioctaédrico perteneciente a la familia de las esmectitas. Su fórmula química es $\text{Na}_{0.3}(\text{Mg, Li})_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$. La sustitución de litio por parte del magnesio proporciona a la hectorita una alta capacidad de intercambio de cationes. En consecuencia, es un buen agente adsorbente para moléculas orgánicas polares. Su incorporación a sistemas acuosos posee propiedades tixotrópicas (Kotal y Bhowmick, 2015).

Principalmente se emplea en cosméticos así como en la industria química y de materiales. Junto con la Mon, son ampliamente utilizadas en la

fabricación de nanocompuestos debido a su capacidad de intercambio iónico, área superficial y estabilidad térmica (Kotal y Bhowmick, 2015).

Saponita

La saponita (**Sap**) es un mineral trioctaédrico del grupo de la esmectita que posee capas cargadas negativamente neutralizadas por contraiones cargados positivamente (Na^+ y Mg^{2+}). Su fórmula química es $\text{Ca}_{0.25}(\text{Mg,Fe})_3(\text{Si,Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n(\text{H}_2\text{O})$. Las saponitas y las hectoritas son sistemas potentes de liberación de fármacos debido a la alta capacidad de adsorción, intercambio iónico, capacidad de hinchamiento, baja toxicidad, capacidad de modificación de las propiedades texturales y liberación controlada (Gârea *et al.*, 2017).

Pese a la excelente capacidad de las arcillas para modular la bioaccesibilidad de las moléculas encapsuladas en su interior, la utilización de estos sistemas en la formulación de alimentos todavía es vista como un reto debido a la falta de estudios que relacionen la incorporación de estas partículas con las propiedades físico-químicas del producto en el que se adicionen (Pérez-Esteve *et al.*, 2014). Una forma de integrar los sistemas de liberación en sistemas alimentarios es incorporarlas en matrices de gel de proteína, como por ejemplo los geles de gelatina. La gelatina es una proteína de origen animal producida a partir del colágeno (Boran *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo funcionalizar con aminas (molécula que actúa como puerta molecular con apertura de pH) tres tipos de nanoarcillas de uso común en encapsulación y liberación controlada, caracterizar las nanorarcillas antes y después de la funcionalización, y describir el impacto de la incorporación de los diferentes materiales nanoestructurados (desnudos y funcionalizados) sobre las propiedades fisicoquímicas (comportamiento viscoelástico, temperatura de gelificación,...) de un alimento modelo como es un gel de gelatina al 5% (p/v).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para llevar a cabo el presente trabajo se utilizaron tres tipos de arcillas laminares: montmorillonita natural purificada (Kunipia F), saponita sintética (Sumecton SA) y hectorita sintética (Sumecton SWN) adquiridas de la casa comercial Kunimine Industries Co., (Tokyo, Japón). Los reactivos N-[3-(trimetoxisilil) propil] etilendiamina (**N3**), acetonitrilo, ácido acético y gelatina porcina (tipo A, 300 bloom, peso molecular entre 50-100 kDA, punto isoelectrico entre 7.0 y 9.0) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2 Métodos

2.2.1 FUNCIONALIZACIÓN

Con la finalidad de transformar las arcillas comerciales en sistemas de liberación controlada capaces de liberar al medio una molécula bioactiva en función del pH, la superficie de los tres tipos de arcillas (Mon, Hec, Sap) se funcionalizó con N-(3-trimetoxilpropil)diethylentriamina (N3) siguiendo el procedimiento de [Pérez-Esteve *et al.*, \(2014\)](#) con algunas modificaciones. Para ello, se suspendió 1g de arcilla en 100mL de acetonitrilo, a cuya mezcla se añadieron 4,3 mL de N3. La suspensión se dejó en agitación durante 24h a temperatura ambiente para llevar a cabo la reacción. Al cabo de 24h se lavaron las partículas con acetonitrilo mediante centrifugación (8 min a 10000 rpm). El proceso de lavado se repitió 2 veces, obteniendo al final del mismo las arcillas funcionalizadas con poliaminas (**Mon-N3, Hec-N3, Sap-N3**).

2.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS ARCILLAS

Las arcillas comerciales y las arcillas funcionalizadas fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología, tamaño de partícula y carga superficial.

2.2.2.1 MORFOLOGÍA

La morfología de las arcillas se evaluó empleando microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) mediante un microscopio Zeiss Ultra 55 (Zeiss Oxford Instruments). Para la observación, las distintas arcillas funcionalizadas y sin funcionalizar se montaron sobre el porta empleando cinta de carbono adhesiva de doble capa. A continuación se tomaron las imágenes a 1000 y 10000 aumentos. El voltaje de trabajo fue de 1kV.

2.2.2.2 DISTRIBUCIÓN TAMAÑO DE PARTÍCULA

Para determinar el tamaño de partícula se empleó la técnica de difracción de láser con el equipo Mastersizer 2000, (Malvern Instruments, Reino Unido), mediante una unidad de dispersión en húmedo, empleándose agua como dispersante. Para las partículas, se consideró un índice de refracción de 1,450 y una absorción de 0,01. En todos los casos se obtuvo una tasa de obscuración dentro del rango 0,60- 7%.

2.2.2.3 POTENCIAL ZETA

La determinación del potencial Z tanto de las arcillas funcionalizadas y sin funcionalizar se llevó a cabo en un tampón de acetato (pH 5.5) en una concentración de 1g/mL. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado a una temperatura de 25°C empleando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.). Antes de proceder a la realización de los ensayos, las muestras se sonicaron durante 2 min para evitar la agregación. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el modelo de Smoluchowski.

2.2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE GELATINA

Con el objetivo de estudiar el efecto de la incorporación de sistemas de encapsulación basados en arcillas en alimentos, se utilizaron los geles de gelatina como alimento modelo. Los geles de gelatina se prepararon a una concentración del 5% (p/v) en tampón ácido acético al 0.2M (pH 5,5) siguiendo el método descrito por [Pérez-Esteve *et al.*, \(2014\)](#) aunque con alguna modificación. Para ello, 0,5 g de gelatina se suspendieron en 5 mL de buffer acetato y se dejaron en agitación durante 2h para hidratar la gelatina. Posteriormente se calentó a 80°C durante 45 min. Una vez disuelta la gelatina, se añadieron 5 mL de buffer de acetato que contenían la cantidad necesaria de partículas para alcanzar una concentración global del 1%.

2.2.4 ANÁLISIS DE REOLOGÍA

El objetivo de este análisis reológico oscilatorio fue determinar la temperatura de gelificación de gelatina 5% (p/v) al incorporar Mon, Hec, Sap, Mon-N3, Hec-N3, Sap-N3, así como la determinación de los valores de módulo de almacenamiento o módulo elástico $G'(\omega)$ y el módulo de pérdidas o módulo viscoso $G''(\omega)$ una vez formado el gel (15 °C). Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el reómetro Kinexus Pro (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) con una temperatura inicial de ensayo de 40°C, temperatura final 10°C, frecuencia 1Hz, 1 rad y una rampa de temperatura de 1°C/min siguiendo el protocolo descrito por [Pang *et al.*, \(2014\)](#).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de las arcillas desnudas y funcionalizadas

3.1.1 MORFOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

La comparación de la morfología de los tres tipos de nanoarcillas desnudas, así como también el estudio del impacto de la funcionalización sobre las propiedades morfológicas de cada una de ellas se realizó por varias técnicas. La primera de ellas fue la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

La **Figura 2** muestra una imagen de cada una de las muestras a un nivel de magnificación de 1000x. En ella se puede observar que el tamaño de partícula para las nanoarcillas desnudas es de 50-60 μm en el caso de la Mon (Figura 2.A), 15-20 μm Hec (Figura 2. B) y 20-25 μm Sap (Figura 2. C).

Respecto a la morfología, como se puede observar en las micrografías de la Figura 2, la Mon tiene una morfología en forma de lámina gruesa más o menos doblada con superficie lisa. [Varadwaj et al., \(2013\)](#) pudieron observar que la montmorillonita es un material de varias capas que consiste en muchas matrices paralelas de placas rotas, las cuales confieren esta estructura plana. Tras la funcionalización (Figura 2.D), la Mon-N3 presenta una superficie más rugosa, la cual puede deberse a una delaminación de las capas debidas al contacto con el disolvente donde se realiza la funcionalización.

Por otra parte, la Hec se muestra como una partícula esférica, con una superficie rugosa de tamaños diferentes. En su superficie se puede apreciar pequeñas rugosidades, así como partes geométricas lisas adheridas a la superficie (ver Figura 2.B). Por último, la Sap (Figura 2.C.) posee formas semiesféricas muy irregulares con superficies rugosas. Esta morfología ha sido observada por [Occelli et al., \(2002\)](#), los cuales concluyeron que estas irregularidades eran debidas a la aglomeración de placas onduladas. Ni Hec ni Sap modificaron significativamente su morfología tras la funcionalización.

Del mismo modo, la **Figura 3** muestra micrografías de cada una de las muestras a un nivel de magnificación de 10000x, pudiendo así, apreciar mejor la superficie de las partículas. No se observan cambios significativos en la superficie de las arcillas desnudas y las arcillas funcionalizadas.

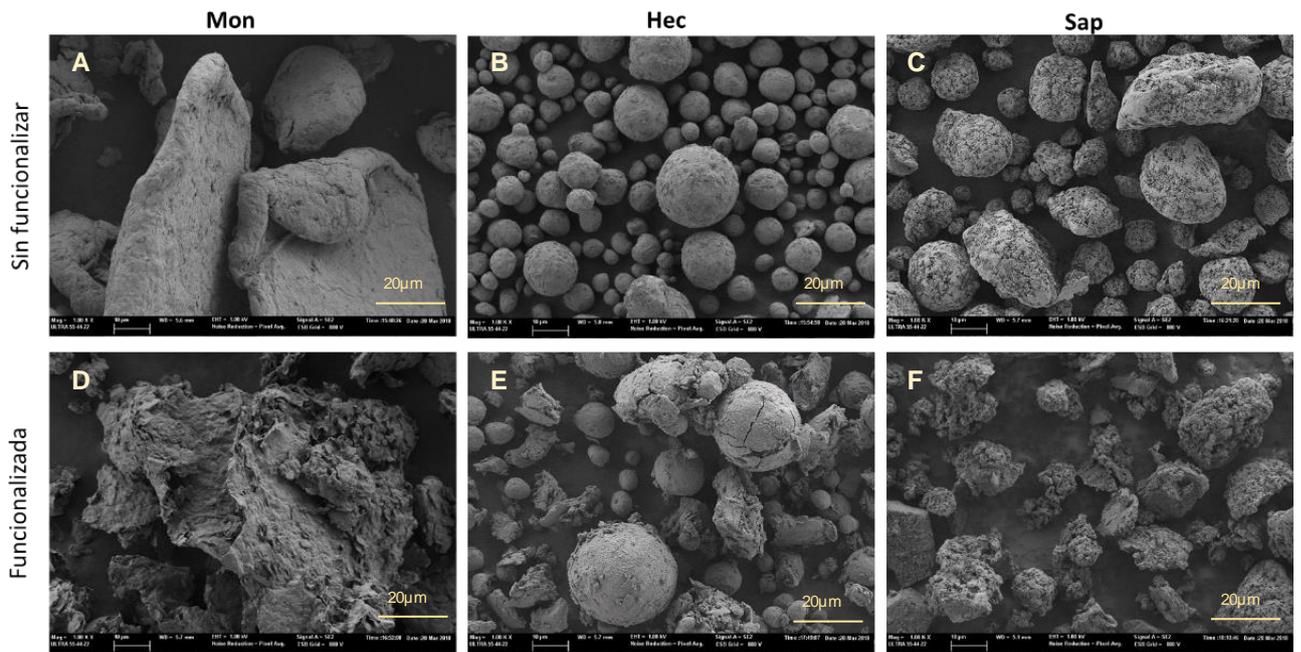


FIGURA 2: Micrografías a 10000 aumentos de nanoarcillas funcionalizadas y sin funcionalizar.

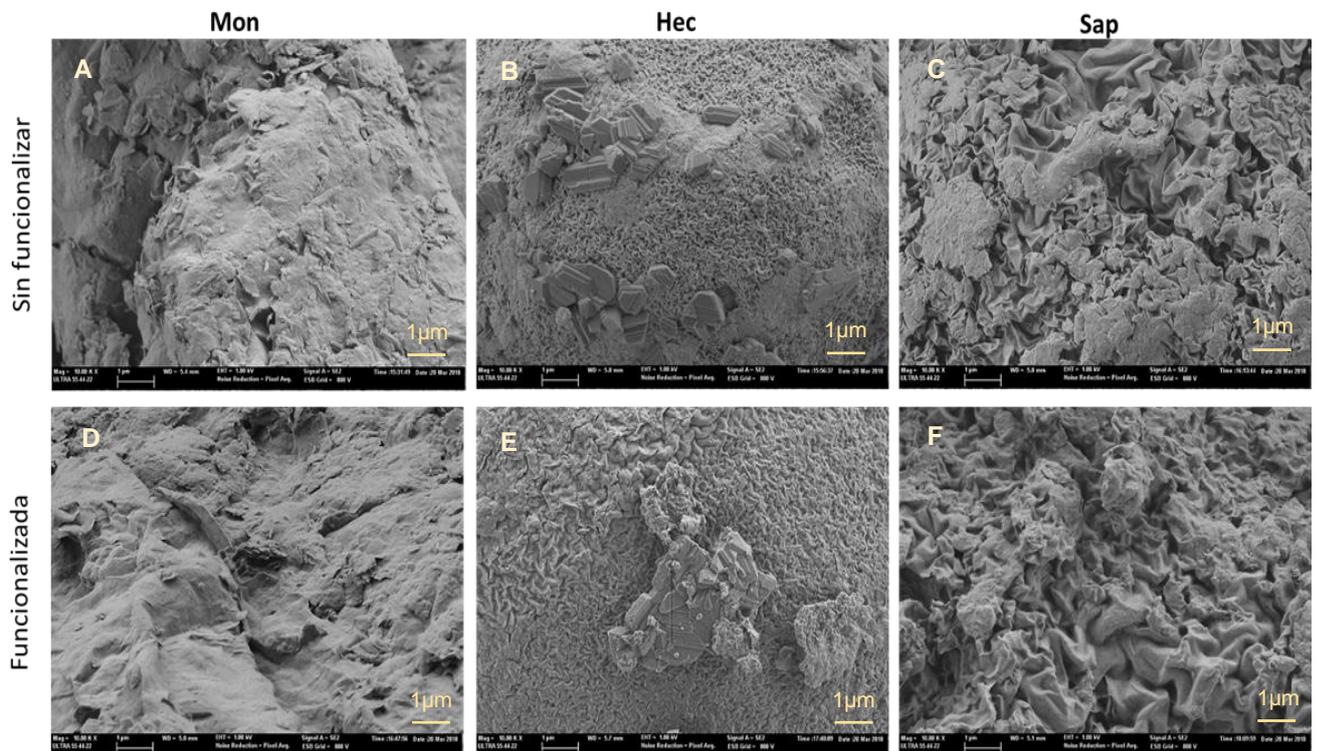


FIGURA 3: Micrografías a 10000 aumentos de nanoarcillas funcionalizadas y sin funcionalizar.

Por otra parte, **se realizaron** análisis de distribución de tamaño de partícula **en medio acuoso tanto de las partículas desnudas como funcionalizadas**. En la **Figura 4** se muestra la distribución del tamaño de partícula para Mon, Mon-N3 figura 4.A, Hec, Hec-N3 figura 4.B, y Sap, Sap-N3 figura 4.C. Los resultados obtenidos muestran que el tamaño de las partículas está en el rango 0,5 - 100 μm . La distribución de tamaño de partícula es monomodal. Al funcionalizar las nanoarcillas se observa un desplazamiento hacia la derecha en la población.

Por su parte, montmorillonita (Figura 4.A.) presenta una distribución prácticamente monomodal y una gran amplitud en cuanto a tamaños de partícula. Los valores de $D_{v0.5}$ y de $D[4,3]$ obtenidos fueron de 3 y 4,81 μm , respectivamente. Este tamaño es muy inferior al observado por microscopía, y puede deberse a que en presencia de agua los agregados que forman la partícula tienden a captar agua, por lo que se hinchan y se rompen, dando lugar a estructuras más pequeñas. Al funcionalizar las nanoarcillas, se observa que la distribución de tamaños se desplaza a la derecha, de manera que en medio acuoso la Mon-N3 tiene un tamaño de $D_{v0.5}$ de 34 μm y $D[43]$ de 40 μm (casi 10 veces mayor que Mon). Estos valores son más próximos a los observados en microscopía. Por tanto, podría concluirse que la Mon-N3 se ha mantenido más estable en presencia de agua (no se ha hinchado), y que la Mon posiblemente se ha hinchado y desfragmentado, dando lugar a una separación de las láminas y a la formación de partículas mucho más pequeñas.

La Hec (Figura 4.B.) presenta valores de $D_{v0.5}$ de 25 μm y $D[43]$ de 27 μm mientras que, Hec-N3 tiene $D_{v0.5}$ de 16 μm y $D[43]$ 19 μm . Estos valores indican que las partículas funcionalizadas son más pequeñas que las no funcionalizadas, pudiendo significar que las partículas desnudas en presencia de agua expanden su estructura sin llegar a romperse, como le ocurre a la Mon, mientras que la expansión está limitada en el caso de las funcionalizadas.

Por último, la Sap posee valores de $D_{v0.5}$ de 30 μm y $D[43]$ de 34 mientras que la Sap-N3 posee valores $D_{v0.5}$ de 16 μm y $D[43]$ 21 μm . La disminución observada en la distribución de tamaño de partícula tras la funcionalización podría explicarse de la misma manera que en el caso de Hec. Además, Hec-N3 y Sap-N3 poseen valores de $D_{v0.5}$ y $D[43]$ similares.

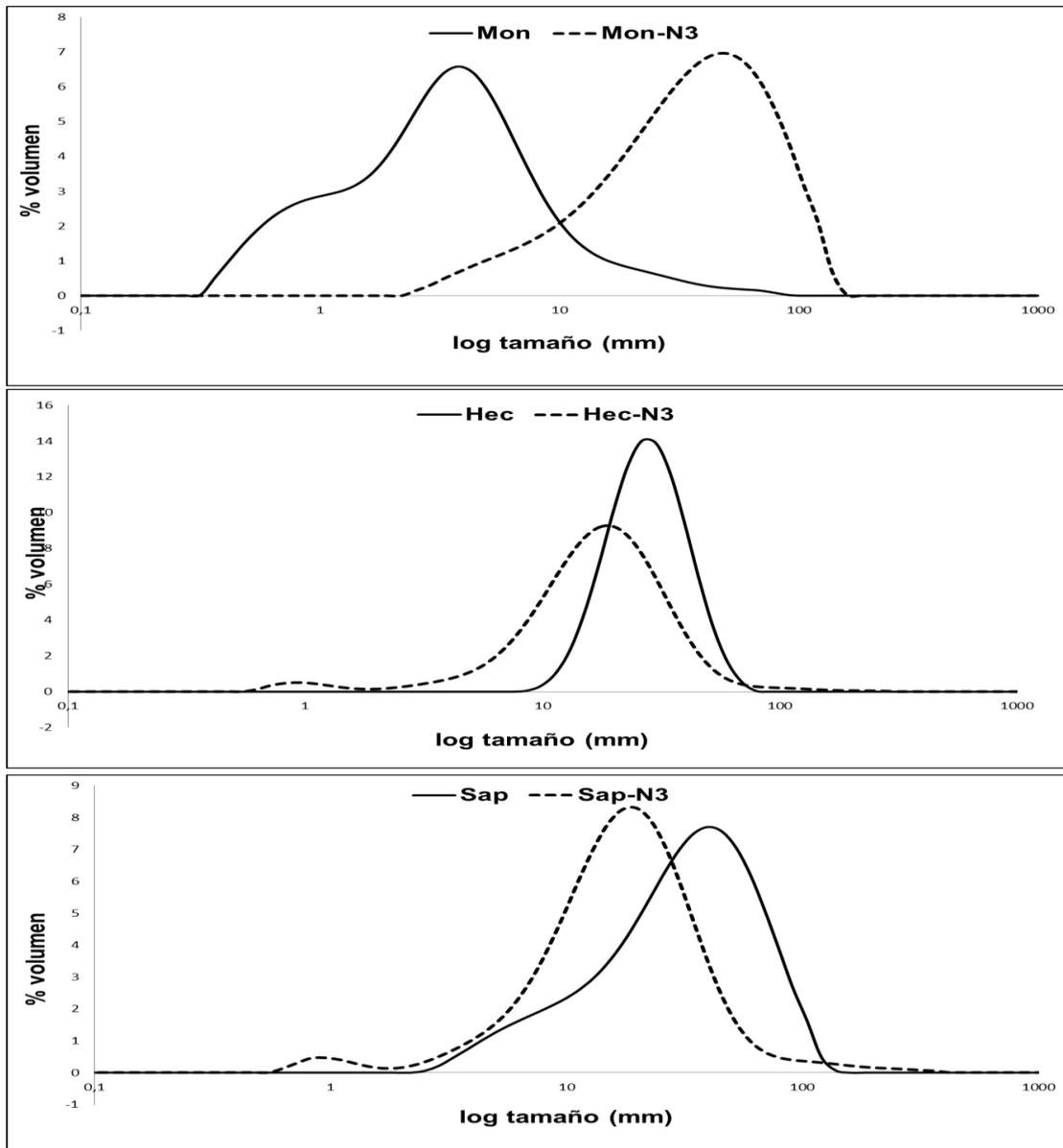


FIGURA 4: distribución tamaño de partícula. A) Mon, Mon-N3, B) Hec, Hec-N3, C) Sap, Sap-N3.

3.1.2 POTENCIAL ZETA

Con el objetivo de confirmar la eficiencia de la funcionalización, se determinó el potencial zeta de cada una de las arcillas antes y después de la funcionalización. Los valores obtenidos de potencial (ζ) tanto para las nanoarcillas funcionalizadas o sin funcionalizar se muestran en la **Figura 5**.

Como se puede apreciar, las nanoarcillas desnudas presentan valores de ζ de -41,36 mV (Mon), -21 mV (Hec) y -26,46 mV (Sap). Estos valores han sido reportados para otros materiales silícicos, como es el caso de las partículas SBA-15 y las micropartículas MCM-41, las cuales poseen valores cercanos a -30 mV (Pérez-Esteve *et al.*, (2014).

Tras la funcionalización, las nanoarcillas presentan valores de ζ positivos: 31,33 mV (Mon), 26,23 mV (Hec) y 27,43 mV (Sap). Este cambio de negativo a positivo, es una prueba de la eficacia de funcionalización con aminas, las cuales a pH neutro poseen muchas cargas positivas.

Generalmente se considera que las partículas que presentan valores de ζ entre el rango de +30 mV y -30 mV tienden a formar agregados, es por ello que las partículas más positivas de +30 mV o más negativas de -30 mV se consideran estables. Así pues, los valores de ζ obtenidos indicarían que las partículas serían coloidalmente estables y que no tendrían tendencia a la aglomeración (Pérez-Esteve *et al.*, 2014).

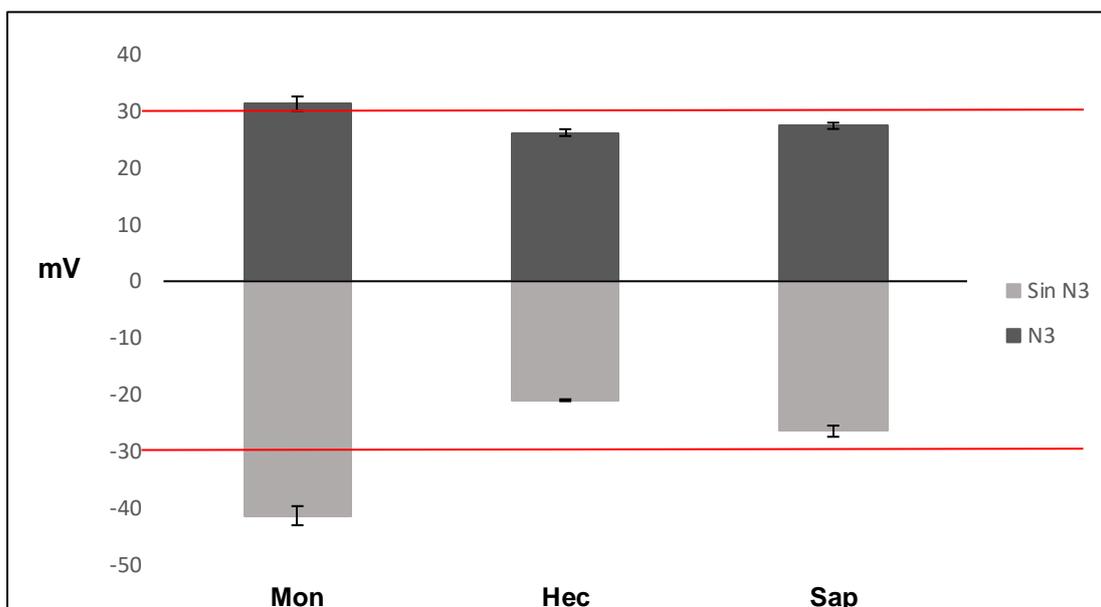


FIGURA 5. Valores de potencial zeta (media \pm SD) de las partículas funcionalizadas con aminas (en gris oscuro) y las partículas desnudas (gris claro), dispersadas en un tampón acetato con pH 5.5.

Además de actuar como puertas moleculares, se ha observado que la funcionalización con aminas previene la degradación de las partículas durante los procesos de digestión (Pérez-Esteve *et al.*, 2016), contribuyendo a mejorar su estabilidad.

3.1 Efecto de la incorporación de las diferentes arcillas sobre las propiedades reológicas de geles de gelatina

La gelatina tiene diversas aplicaciones en distintos sectores de la industria, como por ejemplo, la industria alimentaria, farmacéutica y fotográfica (Xu, M *et al.*, 2016) pero para desempeñar estas aplicaciones la calidad de la gelatina depende de sus propiedades reológicas (Stainsby, 1987). La gelatina tiene naturaleza anfótera (Haddar *et al.*, 2012) y capacidad para formar geles resistentes y termorreversibles (Bell, 1989) en un amplio rango de concentraciones (Fonkwe *et al.*, 2003).

En recientes estudios, se han empleado partículas micro y nano como relleno (fillers) en matrices de biopolímeros para mejorar las propiedades de los mismos (Neffe *et al.*, 2011). La mejora de propiedades depende de las propiedades de la matriz, de la concentración, tamaño y superficie del filler y de la interacción de éste con la matriz. El tamaño de partícula y el área superficial juegan un papel importante para la interacción del filler con la matriz, por ello, normalmente las nanopartículas tienen más efecto en las propiedades del material que las micropartículas (Nakamura *et al.*, 1992, y Zhang *et al.*, 2004). Por otra parte, la funcionalización química de los fillers puede incrementar la interacción del filler con la matriz (Wu *et al.*, 2005). En este contexto, en esta sección se muestra el efecto de la incorporación de las tres nanoarcillas (desnudas y funcionalizadas) en una concentración suficiente para liberar una gran cantidad de compuestos bioactivos (1%) en las propiedades reológicas de geles de gelatina del 5% p/v.

La **Figura 6** muestra los reogramas del gel de gelatina al 5% (p/v) y, a modo de ejemplo, del gel de gelatina al incorporarse Mon-N3 a 1% de concentración que se obtuvieron al aplicar un barrido de temperatura de 1°C/min. En ellos se pueden observar los valores de G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) en función de la temperatura.

Para la gelatina (Figura 6.A.), se observan valores de G' y G'' relativamente bajos desde 40 hasta 22.5°C formando una meseta. En toda esta región, predomina el comportamiento viscoso sobre el elástico ($G' > G''$). Desde los 22.5°C hacia abajo se observa un incremento del valor de G' y G'' , pero sobre todo de G' hasta llegar al *cross-over*, punto donde G' y G'' se igualan y sucede la gelificación. En el caso de la gelatina, la temperatura de gelificación es de 20,7±0°C. Este valor es inferior al reportado por Gudmundsson, (2002) y Cho *et al.*, (2005) quienes reportaron que la temperatura de gelificación para la gelatina está en 22,6°C y 23,8°C respectivamente. Un comportamiento muy similar se observa para la gelatina que contiene Mon-N3. A partir de estas curvas se calcularon los valores de temperatura de gelificación, así como los valores de G' y G'' de las muestras una vez formado el gel (15°C).

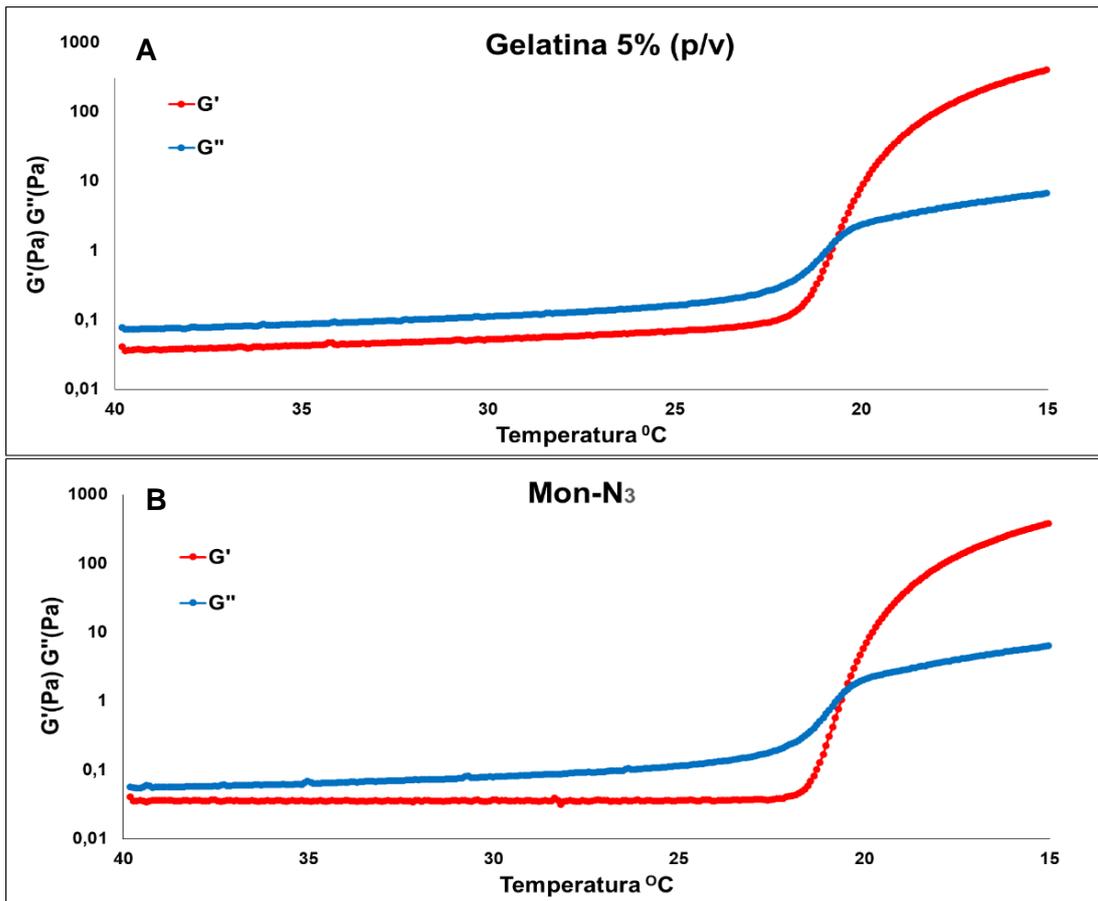


FIGURA 6. Módulo elástico (rojo) y módulo viscoso (azul) de A) gelatina 5% p/v y gelatina 5% p/v con 1% de A) montmorillonita funcionalizada.

En la **Figura 7. A** se muestran las temperaturas de gelificación de la gelatina al 5% (p/v) con 1% de cada partícula respectivamente. Se puede observar que aunque se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes muestras ($p < 0,05$), las temperaturas de gelificación oscilaron entre 20,07 y 21,07. Por tanto, estos cambios en la temperatura de gelificación no tendrían un impacto apreciable en la práctica (almacenamiento o consumo del producto).

Por otra parte, en la **Figura 7.B** y **Figura 7.C**, se representan los valores de G' y G'' de las muestras a una temperatura donde el gel ya está formado (15°C). Como se puede observar, mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de G' de las muestra control y aquellas que incorporaban nanoarcillas funcionalizadas, la adición de nanoarcillas desnudas provocó una disminución de este parámetro. Esta tendencia se acentúa más en el caso de la Mon.

Respecto al valor de G'' , la incorporación de partículas funcionalizadas no modificó significativamente este parámetro. Sin embargo, la incorporación de Mon incrementó el valor de G'' , y por tanto el componente viscoso.

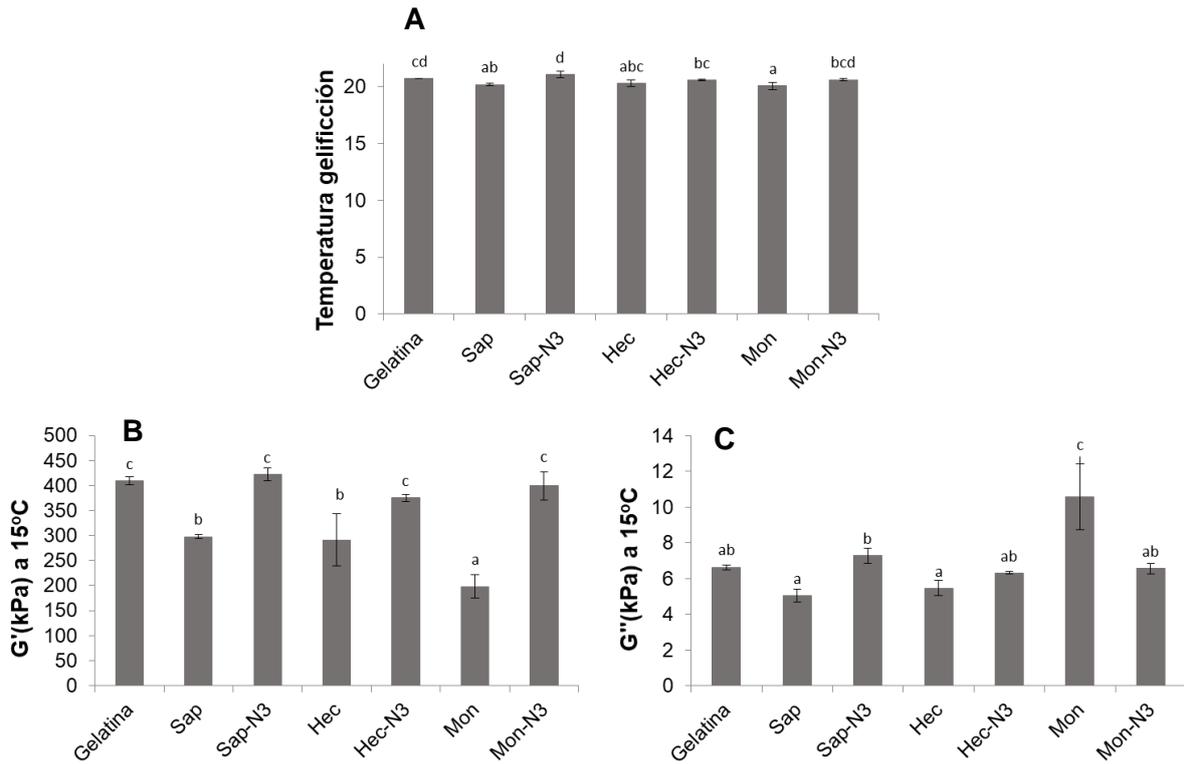


FIGURA 7. Análisis estadístico ANOVA. A) Temperaturas de gelificación de las muestras, B) G' (kPa) a 15°C, C) G'' (kPa) a 15°C.

4. CONCLUSIONES

Durante la realización de este trabajo se han funcionalizado tres tipos de nanoarcillas y posteriormente se han caracterizado las propiedades geométricas (tamaño y morfología), así como la carga superficial, tanto de las partículas desnudas como funcionalizadas con aminas. Por otra parte, se ha estudiado cómo varía la temperatura de gelificación de geles de gelatina tras la adición de las nanoarcillas y cómo éstas afectan el módulo elástico y el módulo viscoso. Los datos obtenidos han permitido entender cómo, tras la funcionalización, las aminas cubren la superficie de las nanoarcillas, cambiando la carga superficial e impidiendo la entrada de agua dentro de su estructura. Por otra parte, se ha visto que la adición de nanoarcillas tiene un impacto mínimo en cuanto a la temperatura de gelificación. Sin embargo, se ha observado que la adición de nanoarcillas desnudas al gel, disminuye los valores de G' , disminuyendo así la fuerza del mismo. La adición de partículas funcionalizadas no afecta significativamente a las propiedades viscoelásticas. Por lo tanto, dichas partículas, sobre todo funcionalizadas, podrían incorporarse en una matriz alimentaria sin cambiar significativamente aspectos tan importantes como la temperatura de gelificación o las propiedades visco-elásticas del gel.

REFERENCIAS

- Aravind, A., Jeyamohan, P., Nair, R., Veeranarayanan, S., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., ... & Kumar, D. S. (2012). AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery. *Biotechnology and bioengineering*, 109(11), 2920-2931.
- Aznar, E., Martínez-Máñez, R., & Sancenón, F. (2009). Controlled release using mesoporous materials containing gate-like scaffoldings. *Expert opinion on drug delivery*, 6(6), 643-655.
- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), 549-560.
- Bell, A. E. (1989). Gel structure and food biopolymers. *Water and food quality*, 251-275.
- Boran, G., Mulvaney, S. J., & Regenstein, J. M. (2010). Rheological properties of gelatin from silver carp skin compared to commercially available gelatins from different sources. *Journal of food science*, 75(8).
- Cho, S. M., Gu, Y. S., & Kim, S. B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 19(2), 221-229.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to food colloids*. Oxford University Press.
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27.
- Fonkwe, L. G., Narsimhan, G., & Cha, A. S. (2003). Characterization of gelation time and texture of gelatin and gelatin-polysaccharide mixed gels. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 871-883.
- Gârea, S. A., Voicu, A. I., & Iovu, H. (2017). Clay-Polymer Nanocomposites for Controlled Drug Release. In *Clay-Polymer Nanocomposites* (pp. 475-509).
- Garti, N., & McClements, D. J. (Eds.). (2012). *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Elsevier
- Gudmundsson, M., & Hafsteinsson, H. (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, 62(1), 37-39.
- Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O. M., Nasri, M., & Bougatef, A. (2012). Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *International journal of biological macromolecules*, 51(4), 477-483.
- Joshi, G. V., Kevadiya, B. D., Patel, H. A., Bajaj, H. C., & Jasra, R. V. (2009). Montmorillonite as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutics*, 374(1-2), 53-57.
- Kotal, M., & Bhowmick, A. K. (2015). Polymer nanocomposites from modified clays: Recent advances and challenges. *Progress in Polymer Science*, 51, 127-187.
- McClements, D. J. (2005). Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions. *Langmuir*, 21(21), 9777-9785.
- Mohanambe, L., & Vasudevan, S. (2005). Anionic clays containing anti-inflammatory drug molecules: Comparison of molecular dynamics simulation and measurements. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(32), 15651-15658.
- Muller, R. H., & Keck, C. M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of biotechnology*, 113(1-3), 151-170.
- Nakamura, Y., Yamaguchi, M., Okubo, M., & Matsumoto, T. (1992). Effects of particle size on mechanical and impact properties of epoxy resin filled with spherical silica. *Journal of applied polymer science*, 45(7), 1281-1289.
- Neffe, A. T., Loebus, A., Zaupa, A., Stoetzel, C., Müller, F. A., & Lendlein, A. (2011). Gelatin functionalization with tyrosine derived moieties to increase the interaction with hydroxyapatite fillers. *Acta biomaterialia*, 7(4), 1693-1701.
- Occelli, M. L., Olivier, J. P., Perdigon-Melon, J. A., & Auroux, A. (2002). Surface area, pore volume distribution, and acidity in mesoporous expanded clay catalysts from hybrid density functional theory (DFT) and adsorption microcalorimetry methods. *Langmuir*, 18(25), 9816-9823.

- Pang, Z., Deeth, H., Sopade, P., Sharma, R., & Bansal, N. (2014). Rheology, texture and microstructure of gelatin gels with and without milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 35, 484-493.
- Pérez-Esteve, E., Oliver, L., García, L., Nieuwland, M., de Jongh, H. H., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2014). Incorporation of mesoporous silica particles in gelatine gels: Effect of particle type and surface modification on physical properties. *Langmuir*, 30(23), 6970-6979.
- Pérez-Esteve, E., Ruiz-Rico, M., de la Torre, C., Llorca, E., Sancenón, F., Marcos, M. D., ... & Barat, J. M. (2016). Stability of different mesoporous silica particles during an in vitro digestion. *Microporous and Mesoporous Materials*, 230, 196-207.
- Segad, M., Jonsson, B., Åkesson, T., & Cabane, B. (2010). Ca/Na montmorillonite: structure, forces and swelling properties. *Langmuir*, 26(8), 5782-5790.
- Slowing, I. I., Trewyn, B. G., Giri, S., & Lin, V. Y. (2007). Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Advanced Functional Materials*, 17(8), 1225-1236.
- Stainsby, G. (1987). Gelatin gels. *Advances in meat research (USA)*.
- Urquiza, E. A. F., & Rulduà, M. L. M. (2009). Estructura general de las arcillas utilizadas en la preparación de nanocompuestos poliméricos. *Ingenierías*, 12(44), 35.
- Varadwaj, G. B. B., Rana, S., & Parida, K. M. (2013). A stable amine functionalized montmorillonite supported Cu, Ni catalyst showing synergistic and co-operative effectiveness towards C-S coupling reactions. *RSC Advances*, 3(20), 7570-7578.
- Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L. T. (2012). Fortification of dietary biopolymers-based packaging material with bioactive plant extracts. *Food research international*, 49(1), 80-91
- Wu, C. L., Zhang, M. Q., Rong, M. Z., & Friedrich, K. (2005). Silica nanoparticles filled polypropylene: effects of particle surface treatment, matrix ductility and particle species on mechanical performance of the composites. *Composites Science and Technology*, 65(3-4), 635-645.
- Xu, M., Wei, L., Xiao, Y., Bi, H., Yang, H., & Du, Y. (2017). Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin. *International journal of biological macromolecules*, 95, 1246-1253.
- Yano, K., Usuki, A., Okada, A., Kurauchi, T., & Kamigaito, O. (1993). Synthesis and properties of polyimide-clay hybrid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(10), 2493-2498.
- Zhang, Q., Tian, M., Wu, Y., Lin, G., & Zhang, L. (2004). Effect of particle size on the properties of Mg (OH) 2-filled rubber composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 94(6), 2341-2346.