

NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO ALGÍNICO OBTENIDAS USANDO CLORURO DE ZINC

O. Sereno^a, S. Ortiz^a, F. Dantas^b, J. V. L. Silva^c, M. A. Sabino^{a-c*}

^a Departamento de Química, Grupo B5IDA, Universidad Simón Bolívar, AP 8900. Caracas, Venezuela.

^b Instituto Nacional de Tecnología – INT, Av. Venezuela 82, Saúde, Rio de Janeiro-RJ, CEP: 20081-312, Brasil.

^c Divisão de Tecnologias Tridimensionais–Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer-Campinas, SP-Brasil

*Autor de correspondencia, e-mail: msabino@usb.ve

Recibido: Abril 2013. Aprobado: Julio 2013.

Publicado: Noviembre 2013.

RESUMEN

Los problemas asociados a la alimentación, constituyen un asunto de salud pública global que afecta entre un tercio y la mitad de la población mundial. A pesar de que la nanotecnología ha sido aplicada en mayor medida en la liberación controlada de fármacos, sus aplicaciones en el sector alimenticio representan una excelente opción para reducir la desnutrición por falta de nutrientes ya que permite obtener alimentos que aseguren la ingesta de la cantidad necesaria de nutrientes en la dieta. Las propiedades del alginato y su capacidad de gelación en presencia de iones divalentes sugieren que puede ser usado como un portador de nutrientes esenciales. El objetivo de esta investigación consistió en encapsular un metal esencial como el Zinc utilizando alginato de sodio como material base para la formación de partículas nanoestructuradas con aplicaciones en la fortificación de alimentos. Mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (TEM) se caracterizaron las partículas, y los resultados de estas partículas preparadas usando cloruro de zinc ($ZnCl_2$) presentaron la escala nanométrica alcanzando alrededor de 70-200 nm, y adicionalmente se caracterizó su morfología y capacidad de encapsulamiento.

Palabras Clave: fortificación de alimentos, ácido algínico, gelación, nano-encapsulamiento.

ALGINIC ACID NANOPARTICLES OBTAINED USING ZINC CHLORIDE

ABSTRACT

Nutritional deficiencies are one of the most severe and important health problems nowadays that affects between one third and half of the world population. The applications of Nanoscience and nanotechnology to the food sector are relatively recent compared with their use in other areas like drug delivery, micro- and nano-encapsulation, etc. Enabling technologies had been require about smart delivery of nutrients for food intake to ensure the required quantity of nutrients in the diet, and just it is the aim of this research. The properties of alginate solutions and its capacity to undergo gelation in present of divalent cations (such as Zn^{+2}), suggest that can be used as a coat or carrier for essential nutrients. The main objective of this research is to use sodium alginate to encapsulate an essential metal like Zinc into nanostructured particles with applications in food fortification. Electron microscopy technique scanning (SEM) and transmission (TEM) were used to characterize them, and results shown that alginate based particles prepared with Zinc Chloride ($ZnCl_2$) reach the nanoscale shown around 70-200 nm and their characteristic morphology and encapsulation were analyzed.

Keywords: food fortification, alginic acid, gelation, nano-encapsulation.

INTRODUCCIÓN

Existen elementos indispensables para la adecuada nutrición y funcionamiento de diversas funciones orgánicas que son considerados esenciales para un organismo porque su reducción por debajo de cierto límite resulta en la disminución de una función fisiológica importante o limita alguna función vital en dicho

organismo [1,2]. El mantenimiento de los niveles de estos elementos en el organismo no depende solo de la ingesta de una cantidad suficiente, sino de su adecuada absorción, y es precisamente este punto una de las aplicaciones de mayor estudio y más importantes de la nanotecnología al área alimenticia [3]. Ha sido a través de estos avances que se ha fortificado por ejemplo: sal con yodo, harinas con

hierro y ácido fólico, bebidas con calcio y condimentos con hierro y fósforo [4] y tés con selenio [5] entre otros. Los resultados obtenidos hasta el momento han evidenciado que la nanoencapsulación mejora la absorción del principio activo al tiempo que mejora las cualidades sensoriales y/o funcionales del producto alimenticio fortificado [4].

El zinc (Zn^{+2}) es uno de los elementos esenciales para el organismo humano, está presente en todos los tejidos y fluidos del cuerpo, es parte de alrededor de 300 enzimas y participa en numerosas funciones del cuerpo ligadas al metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, como así también a la síntesis de insulina, ARN, y ADN [1,6]. La deficiencia de zinc afecta el crecimiento celular, la maduración sexual del individuo, la regeneración y reparación de los tejidos, así como también afecta el funcionamiento del sistema inmune [7,8], es por ello que su ingesta y su absorción es fundamental en el ser humano.

El alginato es un polisacárido hidrofílico de origen natural que representa un 40% en masa del extracto seco de ciertos tipos de algas marinas [9] que ha sido utilizado en muchas aplicaciones entre las cuales está la liberación controlada de diversos compuestos/fármacos, debido a que presenta baja toxicidad, otra gran ventaja es que es biocompatible [9], fácilmente digerible y en presencia de cationes divalentes a temperatura ambiente forma geles insolubles en agua y estables al calor [10]. El alginato es resistente a hidrólisis ácida y soluble en soluciones alcalinas [11], lo que es muy importante para que la encapsulación de nutrientes en alginato sea un procedimiento viable: el alginato protege los nutrientes durante su paso por el tracto digestivo superior, y permite su liberación en el intestino, lo que aumenta el nivel de aprovechamiento del compuesto encapsulado [12].

La fortificación de alimentos con nutrientes esenciales permite asegurar la ingesta de dichos nutrientes en la dieta diaria, por lo que hoy día se dedican grandes esfuerzos en investigación y en generación de patentes en este campo

[3,4,13]. Es por ello que la finalidad de esta investigación es aportar los interesantes resultados obtenidos al encapsular Zn^{+2} en nanocápsulas de alginato de sodio mediante un procedimiento de gelación iónica. Se espera que la aplicación final de las nanopartículas preparadas sirva para enriquecer el valor nutritivo de ciertos productos de interés dentro del sector alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Caracterización del Alginato

1.1.1 Purificación del Alginato de Sodio comercial

Con el objetivo de eliminar impurezas que pudieran estar presentes producto del proceso de extracción del alginato de sodio comercial, es necesario llevar a cabo un proceso de purificación que consiste en un lavado y precipitación ácida del alginato de sodio marca Aldrich y que ha sido reportado previamente [14,15].

1.1.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con la finalidad de conocer la estructura molecular del alginato de partida, se obtuvieron espectros de 1H -RMN y para ello se empleó un espectrómetro de resonancia magnética nuclear, marca JEOL de 400 MHz. Se utilizó un tubo de inserto RMN con agua deuterada como solvente, el tiempo de relajación fue 41,9 ms, 128 barridos y a temperatura ambiente.

1.2 Preparación de las Nanopartículas

1.2.1 Preparación de las soluciones de alginato.

Se preparó una solución de alginato al 1,0% m/v usando agua desionizada a la cual se le añadió el surfactante Tween-80 [0,05% m/v], el cual es un surfactante hidrofílico y se usa para la emulsificación de una fase aceitosa u orgánica en agua (O/W).

1.2.2 Preparación de la solución del Ión Divalente.

Se preparó una solución de $ZnCl_2$ 0,025mol/L a partir de una mezcla: agua desionizada/alcohol isopropílico en proporción 80/20. Además, se le incorporó a la solución: o

bien polivinilpirrolidona PVP (Sigma-Aldrich, Mw 10.000 gr/mol) o polivinilalcohol PVA (HIMEDIA, Mw 140.000 gr/mol) como agentes tensoactivos al 2% m/v.

1.2.3 Preparación de nanopartículas.

Se incorporaron, gota a gota, 5 mL de la solución de alginato al 1% sobre 45 mL de la solución de $ZnCl_2$ previamente preparada, manteniendo una agitación continua durante 30 minutos a velocidad de 10.000 r.p.m usando un ultradispersor IKA T10 basic que posee una punta tipo túnel con 4 salidas, lo cual permite agitar muy bien la solución debido a la generación de un efecto vórtice.

1.2.4 Recuperación de las nano/micropartículas

Transcurrido el tiempo de preparación, se detuvo la agitación y se dejó precipitar las partículas. Luego cuidadosamente, la solución final fue centrifugada por 20 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante. El sólido se congeló y luego fue liofilizado utilizando un equipo Labconco Freeze Dryer 12.

1.3 Caracterización de las Nanopartículas

1.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para determinar la morfología y diámetro de las partículas, las muestras fueron recubiertas con oro en un equipo marca Brazer y se analizó su morfología por MEB en un equipo JEOL JSM 6460 a 15 kV. Adicionalmente, se hizo un microanálisis químico elemental por dispersión de electrones (EDX) en un equipo OXFORD-INCA Digitalizado y acoplado al microscopio electrónico.

1.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Para determinar con mayor resolución la morfología de las nanopartículas se usó un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL, modelo JEM 2100, con voltaje acelerador de 200 kV y filamento de hexaboruro de lantano (LaB_6). Las muestras se prepararon por suspensión, vía húmeda, se depositaron en una rejilla de

cobre de 200 mesh y luego fueron recubiertas con carbono.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4 Resonancia Magnética Nuclear

Los alginatos son polímeros lineales de alta masa molecular compuestos por residuos de α -L-gulurónico (G) y β -D-manurónico (M) presentes en secuencia y proporciones variables, unidos por enlaces glucosídicos 1-4, formando bloques MM, GG y MG [15]. En la figura 1 se detallan las diferentes bandas de los protones tipo G y tipo M, y su ubicación dentro de la molécula de alginato.

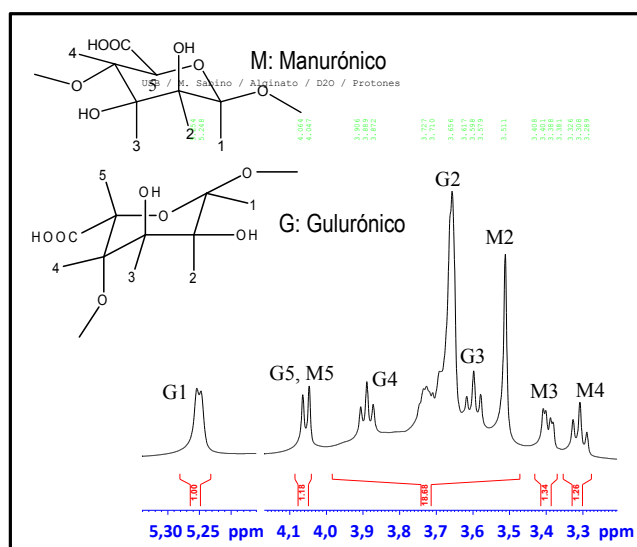


Fig.1. Espectro 1H -RMN del alginato purificado.

La configuración que adopta la macromolécula depende de su composición: es así como los bloques de ácido manurónico (M) originan zonas casi planas, con estructura semejante a una cinta, mientras que las de ácido gulurónico (G) presentan una estructura con entrantes y salientes [15] por lo que se hace posible que en presencia de iones divalentes, el alginato forme una estructura tridimensional al formarse puntos de reticulación iónica, generando una solución espesa con aspecto de gel [16]. Dicho gel se forma por la acción coordinada de varias cadenas de bloques G que se sitúan paralelas, alojándose

en los espacios entre ellas el ión divalente. Este complejo se forma debido a la interacción electrostática entre el catión divalente y las unidades uronato cargadas negativamente debido a la presencia del grupo carboxilato [17,18]. A ese complejo electrostático se le ha denominado comúnmente "caja de huevos" y su estabilidad y resistencia se relaciona con lo bien que el catión encaja en los intersticios moleculares que se forman entre los bloques de gularónico (y de allí el nombre por el que es comúnmente conocido). Por esta razón, puede afirmarse que el contenido de ácido gularónico (G) presente en el polisacárido está directamente relacionado a su capacidad de formación de gel [19-21].

Con los valores de la intensidad de cada integral reportada en el espectro $^1\text{H-RMN}$, se determinó que la relación entre protones M/G en el alginato analizado fue 0,95 M/G, mostrando mayor composición del anómero G, por lo que se afirma que la muestra de alginato utilizada presenta capacidad para la formación del gel [22-24] y por tanto es posible que se favorezca la formación de nanopartículas, como será demostrado a continuación.

1.5 Microscopía Electrónica de Barrido

Fue posible estudiar las diferentes características morfológicas y estructurales de las partículas obtenidas usando los dos tipos de surfactantes PVP (de bajo peso molecular) y PVA (de alto peso molecular). Como se observa en la figura 2, la microscopía electrónica de barrido revela que en su mayoría, las partículas obtenidas se presentan como aglomerados micrométricos, pero las partículas que se aprecian tienen forma esférica y están dentro del rango procurado. A continuación se analiza como el tipo de agente tensoactivo usado puede influir en la morfología de estas nanopartículas.

Las micrografías que componen la figura 2, identificadas como (a) y (b), corresponden a las partículas obtenidas usando PVP, mientras que (c) y (d) fueron obtenidas usando PVA. En general se observaron menor cantidad de

partículas en las formulaciones obtenidas con PVP, por lo que podría argumentarse que de alguna manera el PVA esté estabilizando mejor las gotas y por tanto favoreciendo la formación de las nanopartículas e influyendo en el tamaño y morfología final de las mismas [25,26]. En las mismas figuras se observa que al parecer, el uso del PVA en la formulación también está favoreciendo la aglomeración de las nanopartículas.

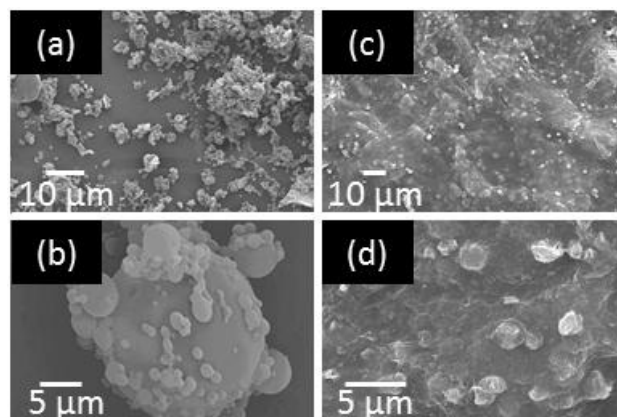


Fig. 2. Micrografías MEB nanopartículas de alginato/ Zn^{+2} obtenidas con (a), (b) PVP y (c), (d) PVA.

En las micrografías 2(c) y 2(d) puede observarse que las partículas parecen encontrarse inmersas en una fina capa rugosa que puede ser PVA remanente sobre la muestra a pesar de los lavados y centrifugados sucesivos y de la liofilización. Puede sugerirse que como el PVA utilizado presenta un peso molecular mucho mayor que la PVP ($1,4 \times 10^5$ g/mol vs $1,0 \times 10^4$ g/mol), es posible que se vea favorecida la formación de agregados o aglomerados de partículas en las formulaciones en las que se utiliza el PVA. También es posible que este mismo parámetro estabilice un poco las gotas durante la preparación de las nanopartículas, lo que podría explicar lo comentado anteriormente sobre la cantidad de partículas observadas en las micrografías correspondientes a la formulación en la que se usó PVA [27].

En relación al tamaño, para ambos casos, se observaron partículas en escala nanométrica, sin embargo, gran cantidad de las mismas se encontraban formando

aglomerados. A pesar de esto, partículas de menor tamaño (diámetro promedio 50 nm) pudieron ser más claramente apreciadas por MET, como podrá apreciarse más adelante en las figuras 4 y 5.

También fue posible evidenciar mediante la técnica de dispersión de electrones EDX la presencia del metal Zinc en las nanopartículas obtenidas, garantizándose así que el ion Zn^{+2} es el núcleo de reticulación de estas partículas (lo cual ha sido ratificado luego con los resultados MET). Estos resultados se resumen en la figura 3, donde cada micrografía MEB se presenta con su análisis EDX respectivo acompañado por la tabla de composición elemental obtenida. El análisis semicuantitativo presenta los elementos Cloro y Sodio en grandes cantidades debido a que el material de partida es el alginato de Sodio; mientras que el ión Zn^{+2} proviene de la sal $ZnCl_2$.

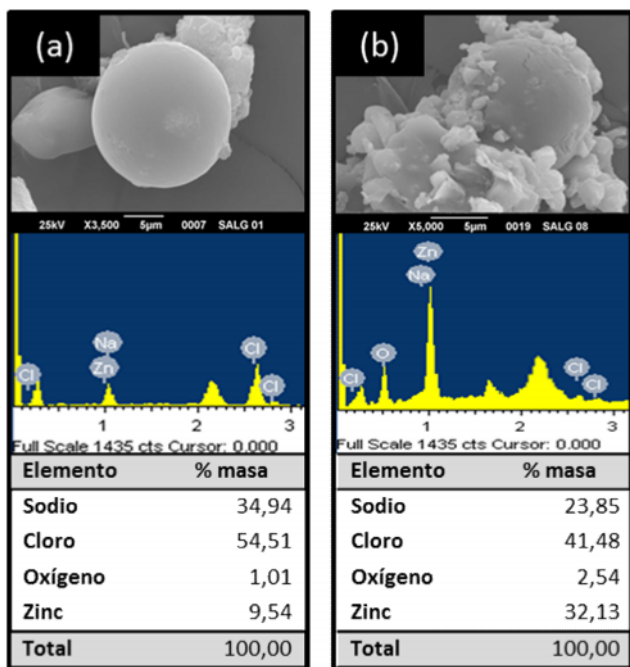


Fig. 3. Micrografías MEB nanopartículas de alginato/Zn obtenidas con (a) PVP y (b) PVA, acompañadas por su respectivo análisis EDX-MEB.

1.6 Microscopía Electrónica de Transmisión

Mediante esta técnica fue posible obtener más detalles de las características morfológicas y estructurales, así como

confirmar las magnitudes de las partículas obtenidas, y la presencia del zinc como agente reticulador de las mismas. Los resultados de estos ensayos son determinantes para esta investigación debido a que el tamaño de las partículas obtenidas es un factor con influencia en el exitoso desempeño del material dentro de la fortificación alimentaria comentada en la introducción [7,26].

En la figura 4, la microscopía electrónica de transmisión revela que las partículas tienen forma esférica, verificando que gran cantidad de las mismas se encuentran entre los límites de la escala micro y nanométrica. Igualmente se observan algunos puntos oscuros correspondientes al Zinc utilizado para llevar a cabo la gelación, y que se encuentran distribuidos en el interior de las partículas (Figura 5a). Estos iones serían entonces los responsables de que las nanopartículas se formen a partir de la formulación y del tipo de agitación empleada.

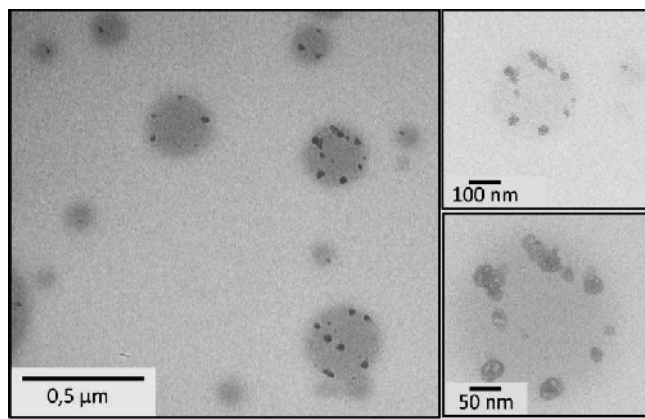


Fig.4. Micrografías MET de nanopartículas de alginato/ Zn^{+2} .

Usando el software DigitalMicrograph, que posee el equipo MET, se pudo verificar que efectivamente los planos cristalográficos de estos puntos oscuros que se observan en estas microfotografías hacia lo que sería el interior de las nanopartículas corresponden a los del zinc. Las ampliaciones de micrografías MET mostradas en la figura 5 son evidencia detallada de que se obtuvieron partículas dentro de la escala nanométrica, cuyos diámetros se encuentran alrededor de los 50 nm,

considerado dentro del mínimo rango dimensional, a pesar de que en general la distribución de tamaño alcanzada estuvo entre 70-200 nm.

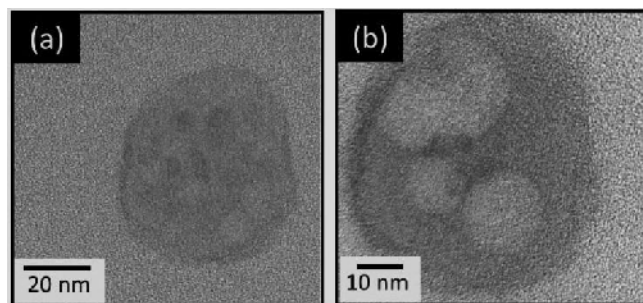


Fig. 5. Evidencia mediante micrografías MET de nanopartículas de alginato/ Zn^{+2} .

Al hacer una magnificación mayor (véase Figura 5b), se observa un punto oscuro en el centro de la nanopartícula (correspondiente al Zn^{+2}), y alrededor de éste, se evidencian algunas zonas claras, de manera que es posible que las partículas sean huecas y estos espacios vacíos pueden resultar favorables para la posterior liberación del ión en la aplicación final de estas nanopartículas en el área alimentaria [28], o para el encapsulamiento/liberación de algún compuesto [29] o para otras aplicaciones.

CONCLUSIONES

El alginato utilizado contiene mayor cantidad de anómero G según el análisis 1H RMN, lo cual lo hace idóneo para su uso como material base para la formación de nanopartículas por reticulación tipo gel usando iones divalentes como el Zn^{+2} . La evaluación de los agentes tensoactivos como PVA y PVP, son un parámetro de gran importancia en el éxito de la metodología empleada, así como el uso de este tipo de ultradispersor, para de esta manera garantizar la escala nanométrica en estas partículas. El PVA en este caso favoreció la formación de nanopartículas a pesar de que su uso también fomentó la aglomeración de las mismas en comparación a cuando se empleó el PVP. Técnicas como MEB y MET resultaron idóneas para el estudio de la morfología y tamaño de las

nanopartículas complementando su caracterización. Asimismo a través de estas técnicas fue posible determinar la composición elemental de las nanopartículas a través de un análisis EDX-MEB, y las evidencias por MET permitió confirmar la morfología y composición de las mismas evidenciándose que el elemento Zinc se encuentra efectivamente en su interior, actuando como ente gelificante, lo cual les confiere potencialidad para su aplicación en el sector alimentario.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer inicialmente a FONACIT por el financiamiento al Proyecto estratégico N° 1859. Y dado el carácter multidisciplinario de esta investigación agradecen también al Laboratorio de Superficies-Lab. E de la Universidad Simón Bolívar (USB) y al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de PDVSA-INTEVEP. Igualmente se quiere agradecer al Instituto Nacional de Tecnología (INT) de Rio-Janeiro, Brasil por su colaboración facilitando el ultradispersor utilizado en esta investigación; y a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado São Paulo, Brasil), proceso N°: 2012/19302-4.

REFERENCIAS

- [1] King J. C., (2011) "Zinc: an essential but elusive nutrient" *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94:679–684.
- [2] Rehman H., Aziz T., Farooq M., Wakeel A., Rengel Z. (2012) "Zinc nutrition in rice production systems: a review," *Plant and Soil*, 361(1–2):203–226.
- [3] Hurrell R. F., (2002) "Forging Effective Strategies to Combat Iron Deficiency Fortification: Overcoming Technical and Practical Barriers" *Journal of Nutrition*, 1(1):806–812.
- [4] Allen L., De Benoist B. (2006) *Guidelines on food fortification with micronutrients*. Geneva, World Health Organization, pp. 527.

- [5] Sekhon B., (2010) "Food nanotechnology an overview" *Nanotechnology, Science and Applications*, 3:1–15.
- [6] Cope E. C., Morris D. R., Levenson C. W. (2012) "Improving treatments and outcomes: an emerging role for zinc in traumatic brain injury" *Nutrition reviews*, 70(7):410–413.
- [7] Shankar A. H., Prasad A. S. (1998) "Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance of infection" *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68:447S–463S.
- [8] Sandstead H. (2012) "Zinc Nutrition from Discovery to Global Health Impact," *Advances in Nutrition*, 3:718–719.
- [9] George M., Abraham T. E. (2006) "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review.," *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 114(1):1–14.
- [10] Poncelet D., Lencki R., Beaulieu C., Halle J.P., Neufeid R.J, Fournier A. (1992) "Production of alginate beads by emulsification / internal gelation . I . Methodology," *Applied microbiology and biotechnology*, 38:39–45.
- [11] Haug A., Larsen B., Smidsrod O. (1963) "The degradation of alginates at different pH Values," *Acta Chemica Scandinava*, 5:1466–1468.
- [12] Boccio J. R., Zubillaga M. B., Caro R, Gotelli C., Gotelli M. J., Weill R. (1997) "A new procedure to fortify fluid milk and dairy products with high-bioavailable ferrous sulfate.," *Nutrition reviews*, 55(6):240–246.
- [13] Sozer N., Kokini J. L. (2009) "Nanotechnology and its applications in the food sector.," *Trends in biotechnology*, 27(2):82–89.
- [14] Rinaudo M. (2008) "Main properties and current applications of some polisaccharides as biomaterials," *Polymer International*, 57:397–430.
- [15] Pawar S. N., Edgar K. J. (2012) "Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications." *Biomaterials*, 33(11):3279–305.
- [16] Green D. W., Mann S., Oreffo R. O. (2006) "Mineralized polysaccharide capsules as biomimetic microenvironments for cell, gene and growth factor delivery in tissue engineering" *Soft Matter*, 2(9):732.
- [17] Andersen T., Melvik J. E., Gåserød O., Alsberg E., Christensen B. E. (2012) "Ionically gelled alginate foams: physical properties controlled by operational and macromolecular parameters" *Biomacromolecules*, 13(11):3703–3710.
- [18] Agulhon P., Markova V., Robitzer M., Quignard F., Mineva T(2012) "Structure of alginate gels: interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations." *Biomacromolecules*, 13(6):1899–1907.
- [19] Martinsen A., Skjåk-Braek G., Smidsrød O. (1989) "Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads." *Biotechnology and bioengineering*, 33(1):79–89.
- [20] Leal D., Matsuhiro B., Rossi M., Caruso F. (2008) "FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds.," *Carbohydrate research*, 343(2):308–316.
- [21] Loh Q. L., Wong Y. Y., Choong C. (2012) "Combinatorial effect of different alginate compositions, polycations, and gelling ions on microcapsule properties" *Colloid and Polymer Science*, 290(7):619–629.
- [22] Drury J. L., Dennis R. G., Mooney D. J. (2004) "The tensile properties of alginate hydrogels." *Biomaterials*, 25(16):3187–3199.
- [23] Draget K. I., Skjåk-Braek G., Smidsrød O. (1997) "Alginate based new materials." *International journal of biological macromolecules*, 21(1–2):47–55.
- [24] Orive G., Tam S. K., Pedraz J. L., Hallé J.-P, (2006) "Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine

- microcapsules for cell therapy.” *Biomaterials*, 27(20):3691–3700.
- [25]Kamel O., Awad G., Geneidi S., Mortada N. D., (2007) “Preparation And Characterization Of Acyclovir Nanoparticles By Double Emulsion Technique,” *Egyptian Journal of Biomedical Sciences*, 23(1):14-17.
- [26]Lee K. Y., Mooney D. J. (2012) “Alginate: properties and biomedical applications.,” *Progress in polymer science*, 37(1):106–126.
- [27]Surassmo S., Min S.-G., Bejrapha P., and Choi M.-J. (2010) “Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion–diffusion method” *Food Research International*, 43(1):8–17.
- [28]Gombotz W. R., Wee S. F. (2012) “Protein release from alginate matrices.,” *Advanced drug delivery reviews*,64:194–205.
- [29]Reis R.L. (2012) “Polysaccharide based scaffolds for and all range of regenerative medicene approaches” *J. Tissue Eng. Regenerative Medice*, 6 (1): 184.