

TEMA 7

Determinación de nanomateriales en alimentos

Nanotecnología en Alimentos

OpenCourseWare

UPV/EHU OCW-2016

Idoia Ruiz de Larramendi

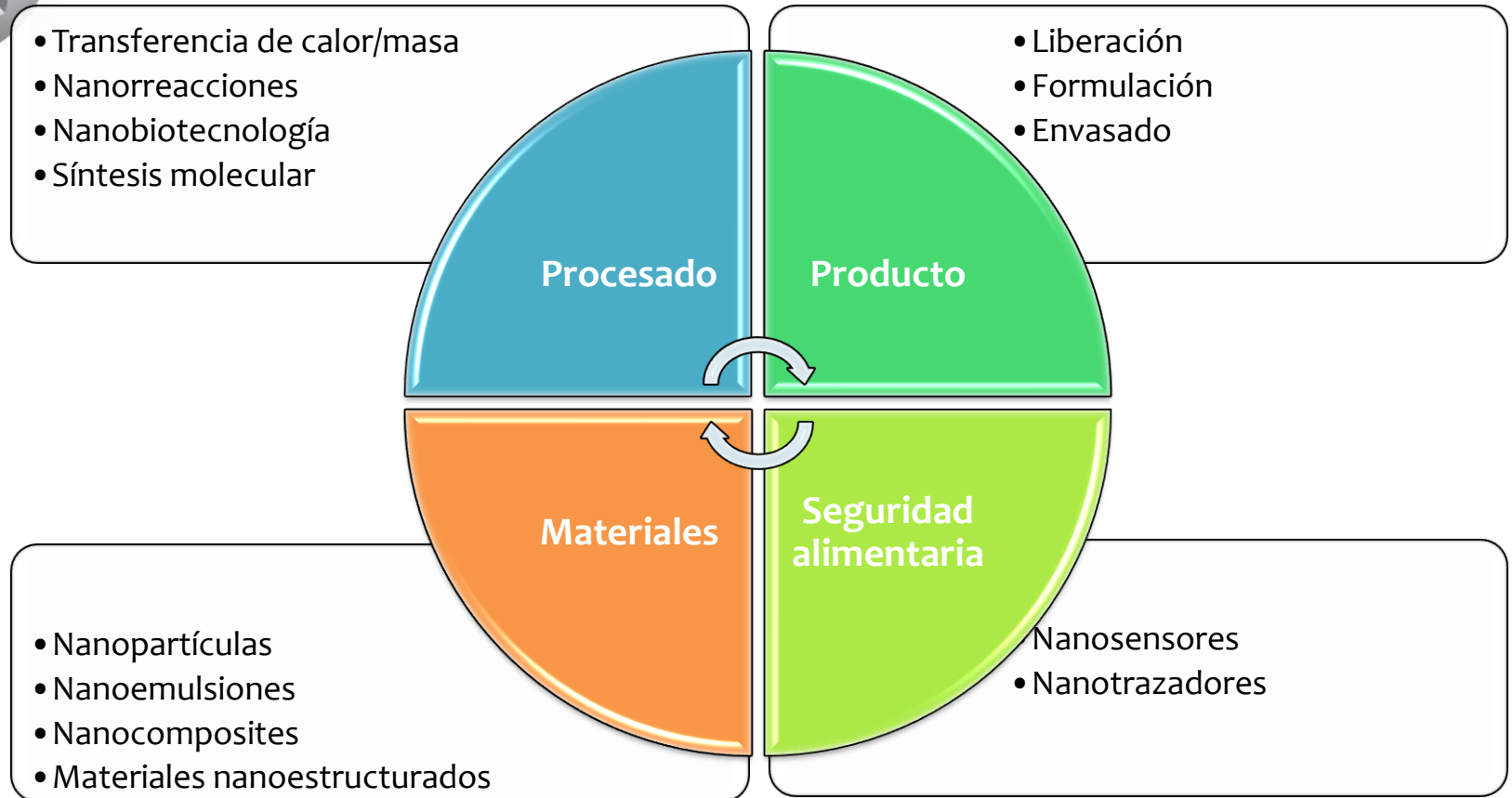


CONTENIDOS

- ❖ **Introducción**
- ❖ **Ensayos analíticos para la caracterización y determinación de NMs**
 - Métodos de separación de NMs
 - Análisis cuantitativo
 - Otras técnicas de análisis
- ❖ **Aplicación al análisis de alimentos**
- ❖ **Tendencias futuras**



INTRODUCCIÓN



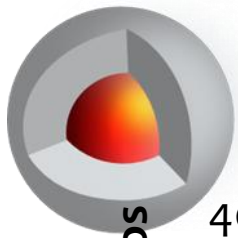
- Principales aplicaciones de los nanomateriales en la industria de los alimentos y en alimentos y bebidas:
 - Desarrollo de materiales con nuevas funcionalidades, procesado en micro y nanoescala, desarrollo de nuevos productos, diseño de métodos e instrumentaciones para el control de la seguridad en los alimentos y bioseguridad



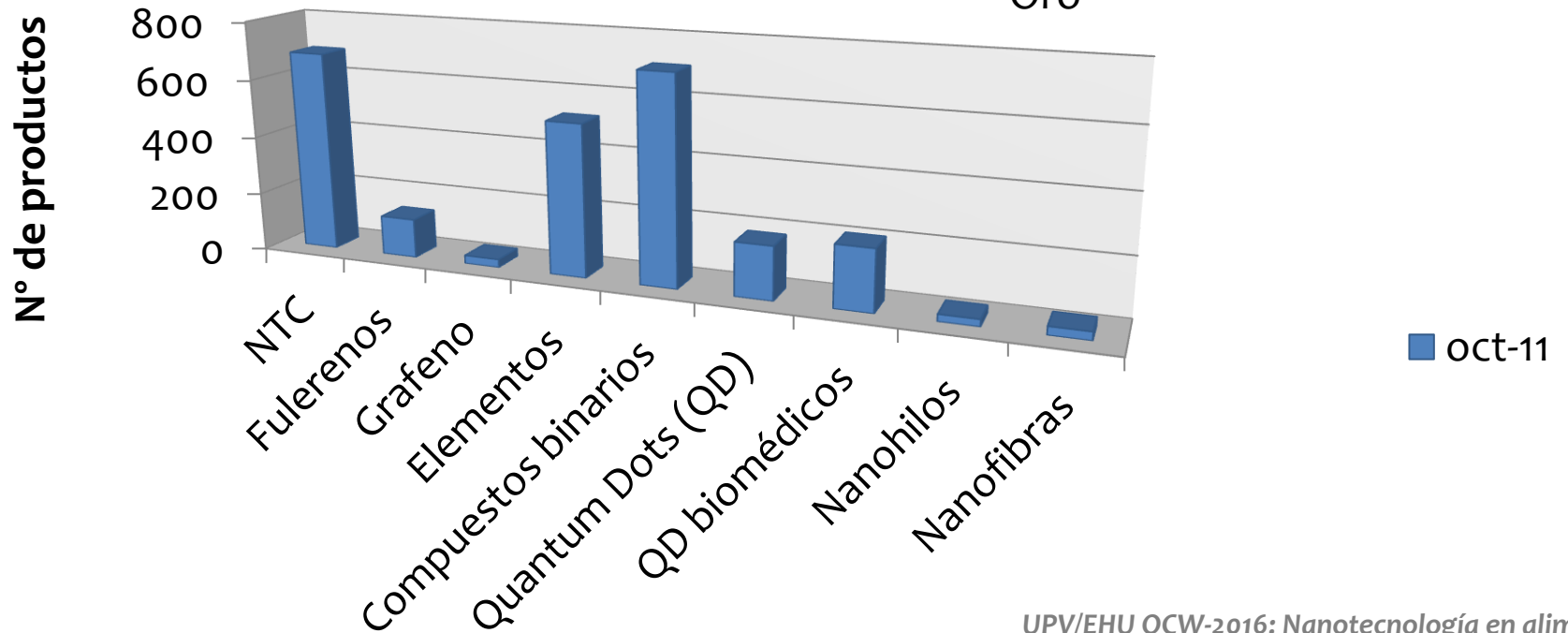
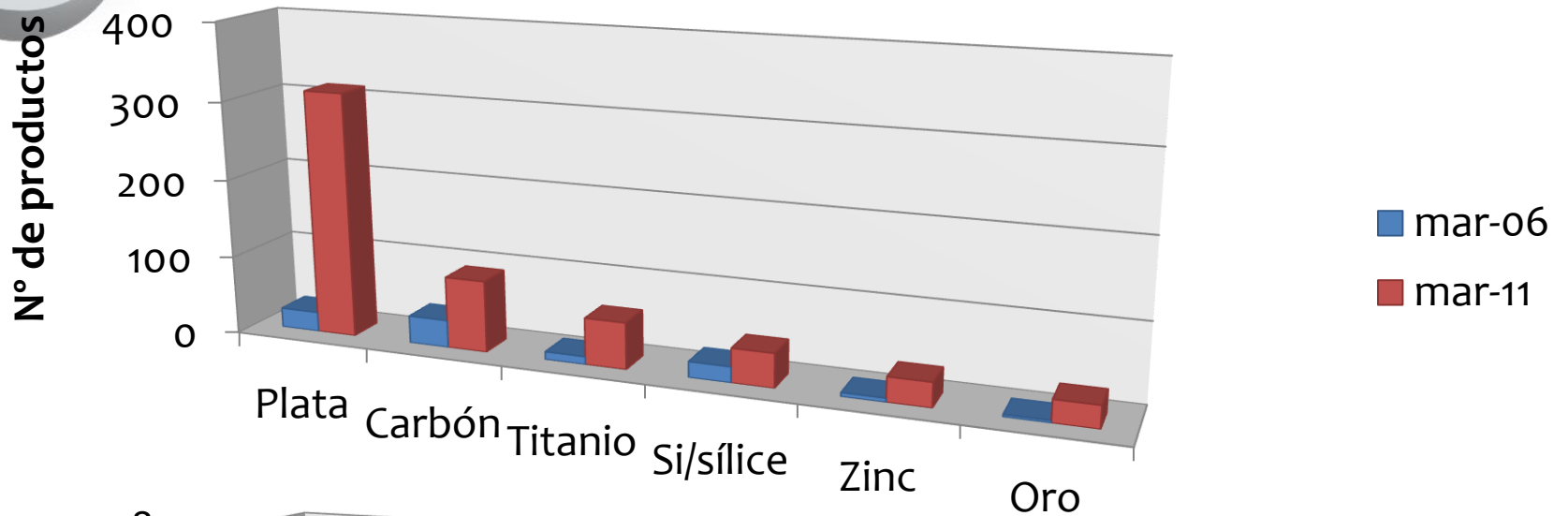
INTRODUCCIÓN

- La nanotecnología puede aportar una coordinación compleja de ingeniería y desafíos científicos en el área de los alimentos y la industria de bioprocesado en la fabricación de alimentos de alta calidad, seguros, obtenidos con recursos eficientes y sostenibles.
- Entre los usos emergentes de nanotecnología en la industria de alimentos encontramos:
 - Empleo de biosensores para la identificación de bacterias y la monitorización de la calidad de los alimentos
 - Sistemas embalaje de alimentos inteligentes y activos
 - Nanoencapsulación de compuestos de alimentos bioactivos (micelas, liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas biopoliméricas y cubosomas).

TABLA 07.01



INTRODUCCIÓN





INTRODUCCIÓN

- Aunque los posibles efectos beneficiosos de la nanotecnología generalmente están bien descritos, existe una gran limitación en cuanto a los estudios que evalúan sus potenciales efectos toxicológicos
 - Se están llevando a cabo numerosos estudios toxicológicos *in vitro*:
 - Ciertos NMs son capaces de cruzar membranas biológicas y acceder a células, tejidos y órganos.
 - También pueden entrar en la circulación sanguínea vía inhalación o ingestión, e incluso penetrar la piel.
 - Los estudios demuestran que ciertos NMs pueden causar la mutación del ADN e inducir un daño estructural en mitocondrias, llegando a causar la muerte celular.
 - El tamaño es un factor clave en la determinación de la toxicidad pero también existen otros aspectos a tener en cuenta.



INTRODUCCIÓN

- Es difícil de generalizar sobre los peligros para la salud asociados con la exposición a NMs → cada nuevo NM debe ser evaluado, teniendo en cuenta todas sus propiedades.
 - Como una consecuencia, las agencias y gobiernos internacionales prestan una especial atención al estudio del destino, el transporte, y los efectos sobre la salud de los NMs en los alimentos y el medio ambiente.
 - Diversos estudios ya presentan los últimos avances en la investigación sobre la evaluación de los riesgos asociados a los NMs en el entorno acuático, incluyendo métodos analíticos y evaluaciones de ecotoxicidad.
 - Excepcionalmente, los últimos estudios relacionados con contaminantes en alimentos y en el medio ambiente, incluyen los NMs como uno de los sistemas más investigados en la actualidad.
 - El requisito previo para la evaluación de la toxicología, la toxicocinética, la migración y la exposición es el desarrollo de instrumentos analíticos para la detección y la caracterización de NPs en matrices complejas.



INTRODUCCIÓN

- Debido principalmente a la seguridad del consumidor, es necesario controlar el contenido de NMs en los alimentos.
 - métodos cuantitativos de análisis fiables para medir los niveles de NMs en una amplia gama de matrices.

ALIMENTO

NMs naturales (NMNs)

NMs artificiales (NMAs)

NMs por contaminación (NMCs)

- Muchas sustancias contenidas en alimentos o ingredientes tienen nanoestructuras naturales (tamaño = μm o nm):
 - 1) proteínas de alimentos, que son las partículas globulares con tamaño = 10 - 100 nm) \rightarrow auténticas NPs;
 - 2) polisacáridos lineales con nanoestructuras unidimensionales con grosor < 1 nm;
 - 3) polisacáridos de almidón que presentan nanoestructuras cristalinas en 3D de espesores de alrededor de 10 de nm.



INTRODUCCIÓN

- Es importante caracterizar los efectos y las interacciones de los NMAs en la matriz de los alimentos.
 - Las proteínas e hidratos de carbono tienen elevadas superficies específicas y una alta carga electroquímica superficial que probablemente los hace interactuar con otras partículas cargadas, como muchas de las NPs artificiales (NPAs).
 - Estos componentes también contienen dominios hidrófobos que probablemente actúan recíprocamente con las NPAs hidrófobas [p.ej., fullerenos y/o nanotubos de carbono (CNTs)].



INTRODUCCIÓN

- El alimento también contiene coloides naturales e iones disueltos.
 - Los coloides dispersados son partículas en la gama de NPAs (1-200 nm) → no precipitan por la gravitación debido a su pequeño tamaño, una cierta carga superficial, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y fuerzas estéricas. Cualquier cambio (p.ej., el pH o concentraciones de ion) puede desestabilizar la suspensión.
 - La Liberación NPAs en tales sistemas complejos está obligada a conducir a una serie de interacciones, y no es fácil saber si una cierta NPA será adsorbida en una superficie o si será estabilizada por polímeros naturales de modo que permanezca móvil.
- Considerando la enorme diversidad de NPAs que se emplean en el sector de los alimentos (p.ej., la composición química, el tamaño, la distribución de tamaño, la actividad/modificación superficial), y su interacción potencial con componentes de la matriz de los alimentos (p.ej., proteínas), la determinación de NMs en el alimento es una tarea desafiante que requiere soluciones adaptadas a cada sistema.



ENSAYOS ANALÍTICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE NANOMATERIALES

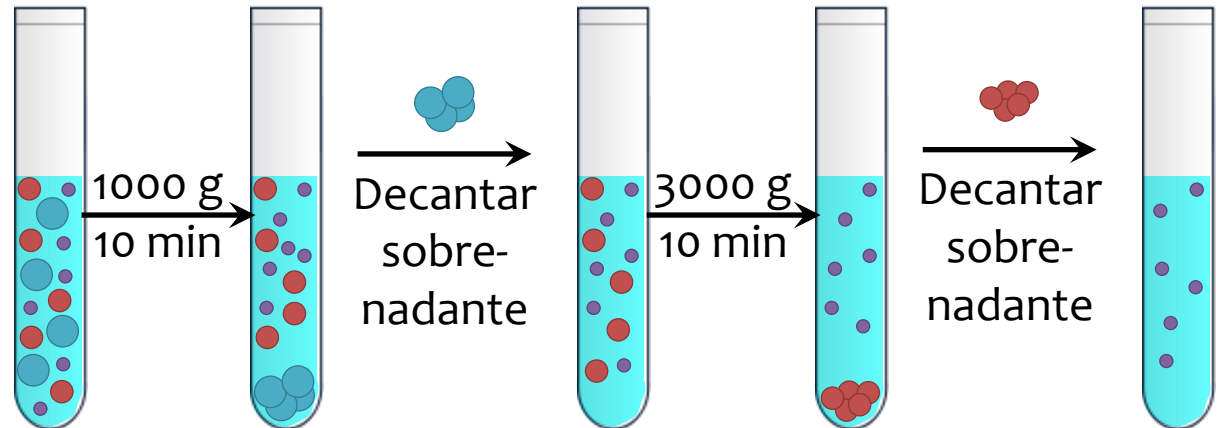
- Recientemente, el problema de la seguridad de los NMs, inicialmente estaba limitado a aspectos químicos (aumento en la reactividad química), se ha extendido a su posible toxicidad teniendo en cuenta también sus propiedades físicas.
- El análisis de los NMs → caracterización o detección de NPs/NMs + determinación de la composición química.
- Los parámetros fisico-químicos pueden cambiar en función del entorno → caracterización de los NMs debe realizarse en cinco momentos:
 1. Tras ser manufacturado
 2. Como es entregado para su uso en productos alimenticios
 3. Como se encuentra en la matriz del alimento
 4. Como se emplea en el estudio de toxicidad
 5. Como se halla en fluidos y tejidos biológicos
- Información fisico-química: medidas de la forma física y morfología, tamaño, concentración en masa y en nº de partículas, área superficial específica, superficie química y carga superficial, potencial redox, solubilidad, pH, viscosidad, densidad, reactividad química/actividad catalítica y actividad fotocatalítica, además de como es lógico, conocer su composición química.
- Siempre que sea posible → ajustarse a regulaciones existentes



MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE NANOMATERIALES

- El principal problema → los métodos analíticos se han aplicado para caracterizar NMs únicos y sólo ciertas técnicas se pueden aplicar al análisis de sistemas más complejos.
 - Los alimentos constituyen sistemas muy complejos donde los NMs se encuentran en muy baja concentración.
 - Además contienen gran número de estructuras naturales (algunas de ellas nanométricas)
- Por todo esto, es necesario separar los NMs de la matriz del alimento mediante métodos bioquímicos, físicos o químicos.

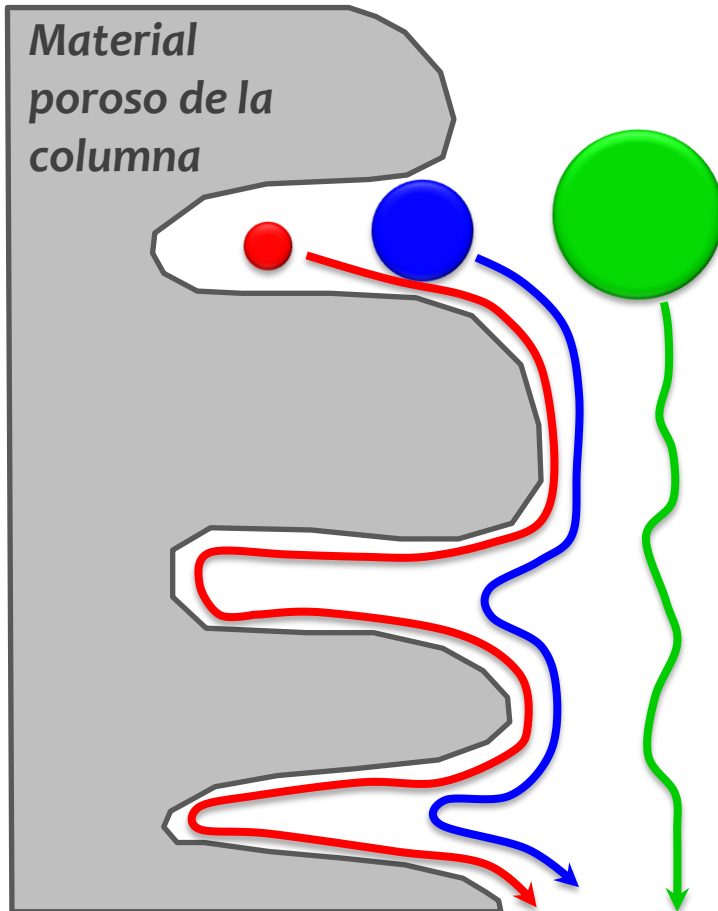
- **CENTRIFUGACIÓN**





MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE NANOMATERIALES

- CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY - SEC)



- Es un método cromatográfico en el cual las moléculas en disolución se separan en función de su tamaño y , en algunos casos, por su peso molecular.
- Aplicable a partículas menores de 100 nm.
- Es necesaria una columna de material poroso y se pueden producir adsorciones no específicas dando lugar a interacciones no deseadas → añadir aditivos para bloquear los sitios activos.
- SEC + otras técnicas: voltametría, ICP-MS, DLS... → QDs y SWCNT



MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE NANOMATERIALES

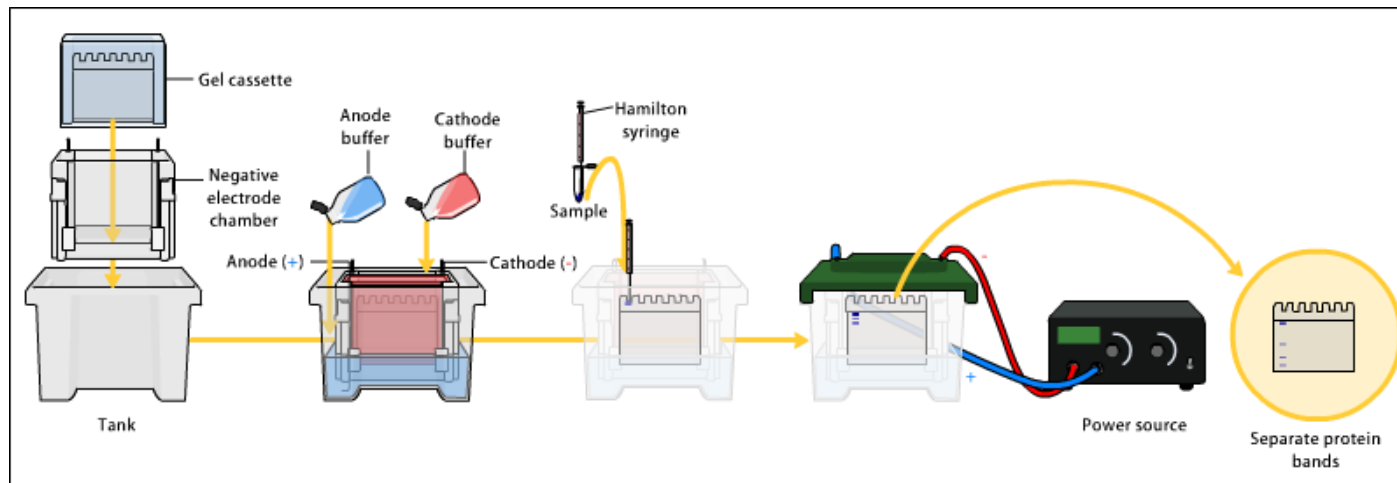
- CROMATOGRAFÍA HIDRODINÁMICA (HYDRODYNAMIC CHROMATOGRAPHY - HDC)
 - Es otro método de separación basado en el tamaño.
 - En este caso el material de la columna no es poroso y la separación se obtiene en función de la velocidad de flujo y el gradiente de velocidad.
 - HDC + ICP-MS → empleado para separar NPs en entornos reales.
- CROMATOGRAFÍA DE CONTRACORRIENTE (COUNTER CURRENT CHROMATOGRAPHY - CCC)
 - Es una técnica de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria también es un líquido.
 - La separación del soluto se basa en la repartición entre dos fases líquidas inmiscibles: la fase móvil y la fase estacionaria.



MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE NANOMATERIALES

- **ELECTROFORESIS y ELECTROFORESIS CAPILAR (EC)**

- Se refiere a la manipulación de partículas con carga neta $q \neq 0$ con la aplicación de un campo eléctrico DC.
- La separación por electroforesis se basa en el tamaño de partícula, forma y modificación química de la superficie de las NPs.
- La carga de las NPs sin modificación superficial se debe principalmente a la adsorción de iones, mientras que si están funcionalizadas influirá la cantidad de grupos químicos y la ionización de los mismos.
- Un tipo de electroforesis es la de en gel que se basa en la diferente migración de los analitos en un gel bajo un campo eléctrico aplicado.



Electroforesis

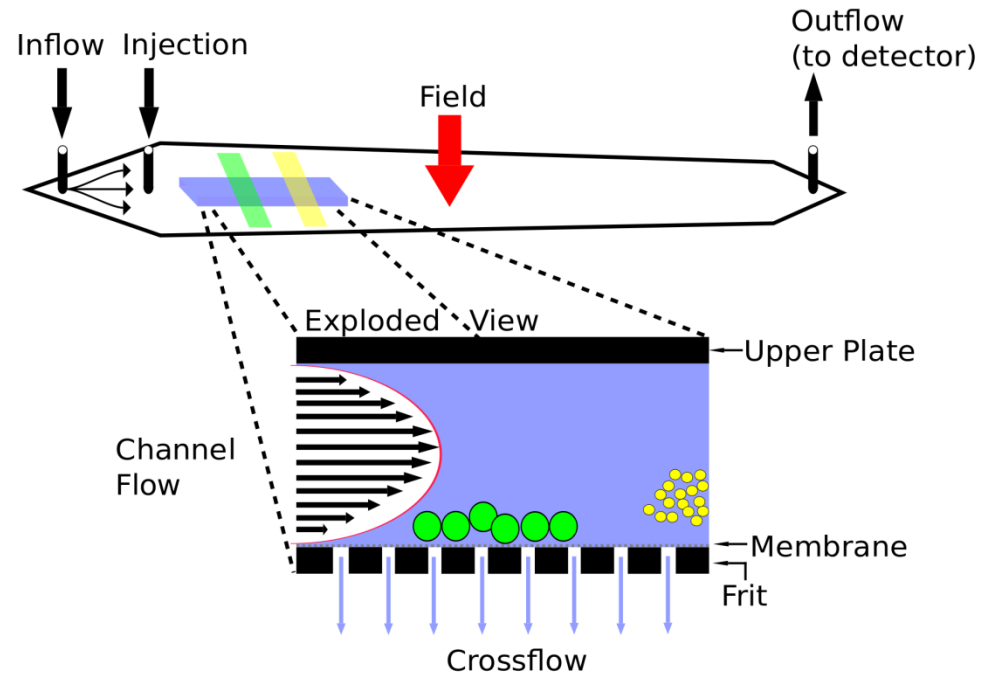
Imagen de Bensaccount
(Wikimedia Commons con
licencia CC BY 3.0)



MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE NANOMATERIALES

FRACCIONAMIENTO CAMPO-FLUJO (FIELD-FLOW FRACTIONATION - FFF)

- Es una técnica de separación en la cual se aplica un campo perpendicular al flujo de la mezcla.
- Este campo ocasiona que se separe la mezcla debido a las diferencias de movilidades de los diferentes componentes de la misma.
- El campo aplicado puede ser gravitacional, centrífugo, magnético, eléctrico, térmico o flujo de fluidos perpendiculares al flujo de la mezcla.



FFF

Imagen de Ich - Ich habe dieses Bild mit dem Programm Inkscape selbst erstellt. Die Grafik ist angelehnt an eine Zeichnung der Firma (Wikimedia Commons con licencia CC BY-SA 3.0)



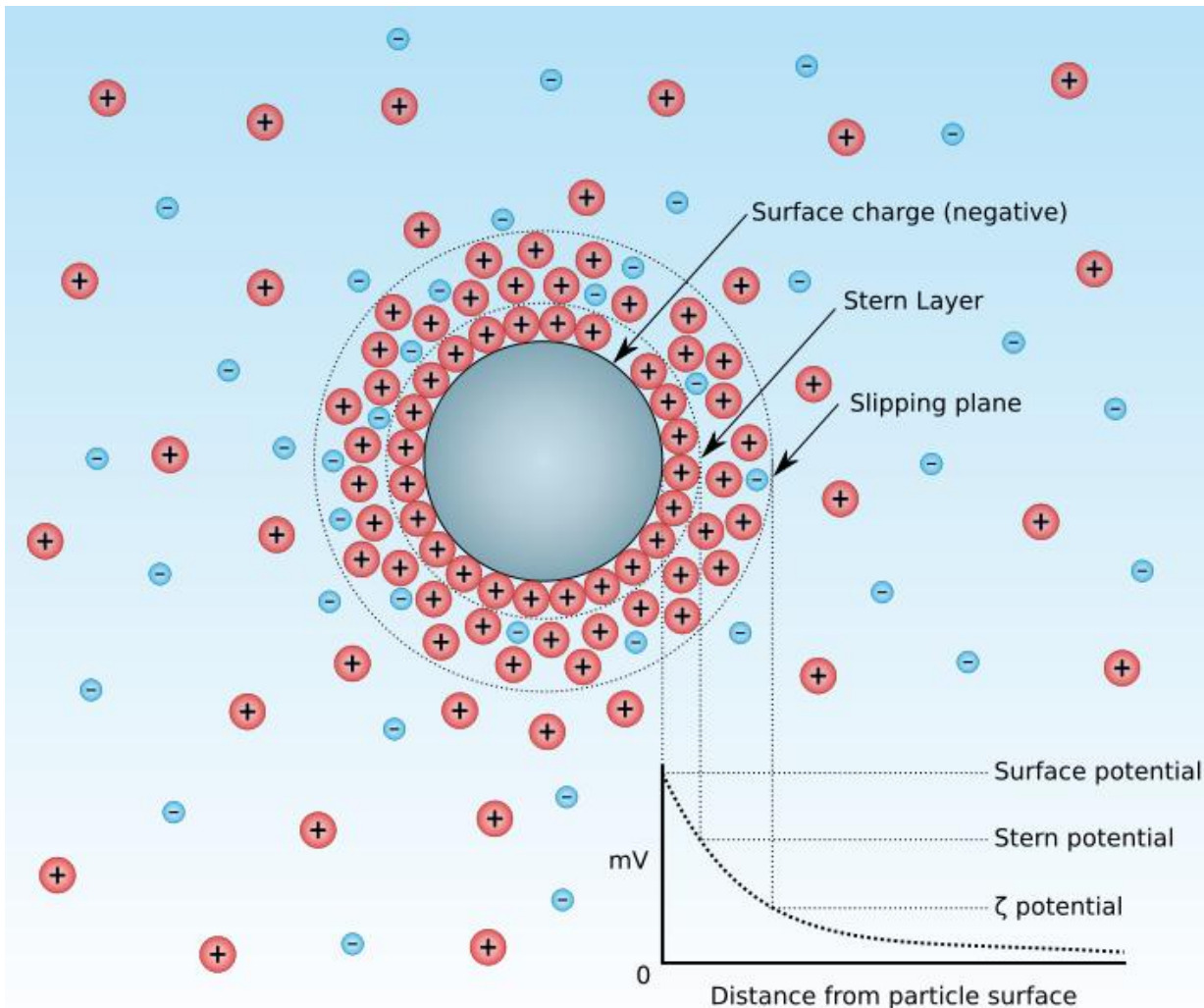
ANÁLISIS CUANTITATIVO

- La toma de muestras y su tratamiento constituye un paso crucial en el análisis cuantitativo, ya que el estado de dispersión de las NPs puede ser alterado o las NPs pueden sufrir diversas alteraciones químicas.
- La presencia de NPs naturales y materia orgánica en las muestras dificulta el análisis.
- Parámetros a tener en cuenta:
 1. Análisis del área superficial mediante, por ejemplo, un *Epiphaniometer*.
 2. Efectos superficiales en los que se determinen propiedades como la dispersabilidad, conductividad, comportamiento catalítico y propiedades ópticas ya que éstas pueden variar con el tamaño de partícula.
 3. Distribución de tamaños de partícula por DLS (*Dynamic Light Scattering* - Dispersión de luz dinámica).
 4. Potencial Zeta función de la carga superficial de la NP.



ANÁLISIS CUANTITATIVO

4. Potencial Zeta función de la carga superficial de la NP.



Potencial Z

Imagen de Larryisgood
modificada por Mjones1984
(Wikimedia Commons con licencia
CC BY-SA 3.0)



ANÁLISIS CUANTITATIVO

- Instrumentación requerida para el análisis de NMs:
 - Espectroscopia de masas de iones secundarios (SIMS) → análisis de superficies de 1-3 nm. Proporciona la composición elemental.
 - AFM para determinar el tamaño y morfología.
 - Técnicas de microscopía (SEM y TEM), microanálisis por dispersión de energías de rayos-X (EDX) y espectroscopia electrónica de pérdidas de energía (EELS) se emplean para determinar el tamaño de las NPs, su morfología y composición química.
- El análisis puede estar dificultado por la interacción de los NMs con solutos o incluso con constituyentes de las células.
 - Elevada reactividad con grupos funcionales orgánicos de alimentos (carboxilo, hidroxilo, amino, sulfidrilo)
 - Interacción con proteínas

TABLA 07.02



APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Alimentos y bebidas

Problema	NMs	Matriz	Técnicas
Investigación de la presencia de contaminantes micro- y nanométricos	NMs inorgánicos	Pan y galletas	ESEM/EDS
Biodisponibilidad de óxidos metálicos nano en peces	TiO ₂ , CeO ₂ y ZnO	Trucha arcoiris	TEM ESEM/EDS ICP-MS ICP-OES CARS
Bioacumulación de NPs de Au en peces	NPs Au	<i>Mytilus edulis</i>	ICP-OES
Toxicidad <i>in vivo</i>	Fulerenos C ₇₀ -C ₉₈	Pez cebra	LC-MS/MS
Acumulación de NMs en plantas	MWCNT, TiO ₂ , CeO ₂	Trigo	TPEM- acoplado autofluo.
Biotransformación de NPs de ZnO y CeO ₂	NPs de ZnO y CeO ₂	Semillas de soja	ICP-OES XAS
Caracterización cuantitativa de NPs de Au	NPs Au	Soluciones acuosas, hígados de ratas	MALDS DLS ICP-MS



APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Embalajes

Problema	NMs	Matriz	Técnicas
Detección de NPs de arcilla	Biopolímeros	95% etanol como estimulador	XRD TEM ICP-MS
Estabilidad de NPs durante el tratamiento térmico	NPs de quitosan para ácido ascórbico-I	Solución acuosa	Potencial Z Ultracentr.
Detección y cuantificación	Ag	Embalajes de alimentos nanoplásticos	Digestión por microondas ICP-AES ICP-MS



TENDENCIAS FUTURAS

- El análisis de NMs en alimentos aún debe ser desarrollado
- Existen métodos que han probado su eficacia para detectar y caracterizar NMs
 - Problema → cuantificar NMs
- Gran progreso en las técnicas en poco tiempo
- Gran variedad de NMs
 - Muchas formas diferentes de analizarlos
 - No existe la mejor técnica para todos los sistemas
 - Combinación de técnicas
 - No existe una rutina en el análisis
 - 7º Programa Marco