

Nanoencapsulación de péptidos: Artículo de revisión Peptide nanoencapsulation: Review article

S. Chong Canto ^a, L. Chávez-Güitrón ^a, M. González González ^a, G. Carrillo Sancén ^a
G. I. Cerón Montes ^a, M. del S. Ruíz Palma ^{a,*}

^a Universidad Tecnológica de Tecámac. Carretera Federal México-Pachuca Km. 37.5 Predio Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México. C.P. 55740. México.

Resumen

Los péptidos bioactivos son secuencias cortas de aminoácidos que provienen de la hidrólisis de proteínas, se mantienen inactivos cuando la proteína está completa y adquieren su actividad al ser liberados. Los péptidos bioactivos tienen relevancia en las funciones metabólicas de los organismos. Se han identificado las funciones de algunos péptidos bioactivos con aplicaciones terapéuticas para humanos entre las cuales destacan sus funciones antimicrobianas, antitrombóticas, antihipertensivas, además de su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares e infecciosas. Una forma de proteger la actividad de los péptidos bioactivos para su administración es la nanoencapsulación, a través de la cual se generan partículas a nanoescala con una barrera protectora. Este artículo es una revisión de los materiales empleados para la nanoencapsulación de proteínas y péptidos bioactivos, también incluye algunas características físicas, como la eficiencia de encapsulación (EE) y la determinación de la morfología del producto terminado mediante el microscopio de transmisión electrónica (MTE).

Palabras clave: Nanoencapsulación, péptidos bioactivos, liposomas.

Abstract

Bioactive peptides are short sequences of amino acids that come from protein hydrolysis, remain inactive when the protein is complete, and acquire their activity when released. Bioactive peptides are relevant in the metabolic functions of organisms. The functions of some bioactive peptides with therapeutic applications for humans have been identified, among which their antimicrobial, antithrombotic, and antihypertensive functions stand out, in addition to their use in the treatment of cardiovascular and infectious diseases. One way to protect the activity of bioactive peptides for administration is the nanoencapsulation technique through which nanoscale particles with a protective barrier are generated. This article is a review of the materials used for the nanoencapsulation of proteins and bioactive peptides, it also includes some physical characteristics such as the encapsulation efficiency (EE) and the determination of the morphology of the finished product by transmission electron microscopy (TEM).

Keywords: nanoencapsulation, bioactive peptides, liposomes.

1. Introducción

La encapsulación se considera una técnica eficaz para transportar compuestos bioactivos dentro de un material protector. La encapsulación proporciona estabilidad a los compuestos bioactivos, así también los protege de reacciones ambientales adversas, actuando como una barrera protectora (Latorres *et al.*, 2021). En la encapsulación, uno o más ingredientes se inmovilizan dentro de una matriz o pared. La

matriz puede estar en una fase sólida o líquida, que puede ser homogénea o heterogénea. El ingrediente dentro de la matriz, suele llamarse núcleo o parte activa del material, y el exterior de la cápsula se denomina cáscara, pared y encapsulante o material portador (Bayraktar *et al.*, 2017).

La nanoencapsulación ha sido ampliamente estudiada en diferentes áreas de investigación, incluyendo la alimentaria, la farmacéutica y la cosmética, y recientemente en la agroquímica y pesca, entre otras (Assadpour, E & Jafari, SM,

*Autor para la correspondencia: mruizp@uttecamac.edu.mx

Correo electrónico: another_sayuri_2341@hotmail.com (Sayuri Chong Canto), lchavezg@uttecamac.edu.mx (Lorena Chávez-Güitrón), monserratzglezg19@gmail.com (Montserrat González González), casaby@hotmail.com (Gabriela Carrillo Sancén), gceronm@uttecamac.edu.mx (Genaro Iván Cerón Montes), mruizp@uttecamac.edu.mx (María del Socorro Ruíz Palma)

2019). La nanoencapsulación puede definirse como la inclusión de bioactivos o el atrapamiento de compuestos naturales en portadores que tienen una dimensión a nanoescala (Bayraktar *et al.*, 2017) con un tamaño inferior a 1 micra (100 nm), aunque en algunas áreas (farmacéutica y cosmética), su tamaño debe ser inferior a 100 nm para ser consideradas como nanocápsulas (Shin *et al.*, 2015; Jafari, 2017). La nanoencapsulación tiene una ventaja sobre la microencapsulación, que es el tamaño de las partículas. Las nanopartículas aumentan en gran medida la relación superficie-volumen, lo que permite que los sitios activos estén más expuestos a la superficie de los sistemas en los que serán liberados. Además, la adsorción de las nanocápsulas en las células es mucho más fácil en comparación con las microcápsulas.

La fabricación de las nanopartículas implica el uso de biomateriales como tensioactivos y/o polímeros que forman la envoltura de encapsulación y, en algunos casos, la formación de las nanopartículas requiere la inclusión de inductores de carga superficial y/o ligandos para lograr los atributos críticos de calidad (CQA, por sus siglas en inglés) definidos *a priori*.

El presente artículo de revisión, proporciona una visión general de los materiales de matriz orgánica utilizados para nanoencapsular proteínas y péptidos bioactivos (PBs). También se muestra cómo se determinan algunas características físicas como la eficiencia de encapsulación (EE) y la morfología del producto nanoencapsulado por microscopía de transmisión electrónica (MTE).

2. Proteínas y péptidos bioactivos (PBs)

Las plantas y los animales son una gran fuente de proteínas que darán lugar a la producción de PBs, que están codificados en sus estructuras. Las proteínas y PBs desempeñan un papel importante en las funciones metabólicas de los organismos vivos y, por consiguiente, en la salud humana. Muchas proteínas y péptidos se han utilizado para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades, como la diabetes. Los péptidos que ya se han utilizado como terapéuticos han sido la insulina, la hormona de crecimiento humana, las hormonas femeninas, los factores de coagulación VII, IX, la antitrombina III y los concentrados de proteína C, la ciclosporina, la tuftsin, el dipéptido de muramil (MDP) y los análogos del péptido tímico. También se ha aceptado la producción a gran escala de algunos péptidos que mejoran las defensas del huésped (Ibrahim *et al.*, 2020). Además, en el tratamiento del cáncer se utilizan interferones, anticuerpos monoclonales y vacunas. Estas proteínas y péptidos se administran principalmente por vía parenteral (Noorbacha *et al.*, 2017).

Las proteínas y las PBs tienen diferentes funciones, según su modo de acción se clasifican en antimicrobianas, antitrombóticas, antihipertensivas, opioides, inmunomoduladoras, fijadoras de minerales y antioxidantes. Las proteínas se pueden clasificar según la forma de obtención como endógenas, si se obtienen a partir de aminoácidos por síntesis dentro de un organismo, o exógenas si se obtienen a través de la dieta o de una fuente externa a un organismo (Sánchez & Vázquez, 2017). Las proteínas son moléculas anfólicas complejas, y cuando se hidrolizan suelen dar lugar a péptidos con propiedades completamente diferentes.

La hidrólisis enzimática de las proteínas afecta a sus propiedades fisicoquímicas, como el peso molecular, la distribución de la carga, el punto isoeléctrico, la ionización de los grupos ácido/base y los índices hidrofílico/hidrofóbico de los péptidos resultantes. Estos cambios en la estructura primaria y secundaria de la proteína son responsables de las propiedades biológicas observadas en los péptidos resultantes.

Muchos PBs comparten un número de residuos peptídicos (2-20 aminoácidos), también sus propiedades biológicas se han atribuido a la presencia de ciertos aminoácidos con propiedades peculiares. Por ejemplo, la mayoría de los péptidos hidrofóbicos y catiónicos cortos son capaces de mostrar propiedades antimicrobianas. Los aminoácidos prolina y valina también desempeñan un papel importante en la mayoría de los péptidos antihipertensivos. Las propiedades hidrofóbicas y los grupos sulfhidrilo confieren propiedades antioxidantes, mientras que la glicina y la histidina promueven propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes en los péptidos, respectivamente (Agyei *et al.*, 2016). En particular, se ha demostrado que ciertos aminoácidos están asociados con la actividad anticancerígena, por ejemplo los aminoácidos hidrofóbicos Leu, Met e Ileu, los aminoácidos aromáticos Trp y Tyr, His y Pro (He *et al.*, 2016). Se han desarrollado varios métodos para enmascarar a las nanopartículas para que no sean reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear. El método preferido es la adsorción de polietilenglicol (PEG) en la superficie de las nanopartículas. La adición de PEG y de copolímeros que contienen PEG a la superficie de las nanopartículas da lugar a un aumento de la vida media de las partículas en la circulación sanguínea en varios órdenes de magnitud. Este método crea una capa protectora hidrofílica alrededor de las nanopartículas que es capaz de repeler la absorción de las proteínas opsoninas mediante la repulsión estérica (Owens & Peppas, 2006). En la actualidad, más de 170 péptidos ya se encuentran en la etapa de pruebas clínicas, mientras que un número mayor al mencionado, está en los estudios preclínicos (Lau & Dunn, 2018).

3. Técnicas de nanoencapsulación

Las técnicas de nanoencapsulación pueden clasificarse en cinco grupos en función del mecanismo/ingrediente principal utilizado para fabricar las nanocápsulas. Incluyen técnicas basadas en lípidos, técnicas inspiradas en la naturaleza, técnicas que usan equipos especializados, técnicas basadas en biopolímeros y otras (Assadpour y Jafari, 2019). Entre las técnicas de nanoencapsulación desarrolladas para proteger a los compuestos activos, los liposomas son los más utilizados, ya que pueden tener diferentes tamaños y transportar diferentes cargas (Mosquera *et al.*, 2015).

La estructura de un liposoma se muestra en la figura 1, son vesículas microscópicas artificiales formadas esencialmente de fosfolípidos que se unen al agua, formando así moléculas anfílicas características, es decir contienen una porción hidrofílica (interacción con el agua/polar) y una hidrofóbica (interacción con lípidos/no polar) por lo que tienen varias aplicaciones en alimentos y en la nutrición (Khorasani *et al.*, 2018).

Los liposomas y las nanopartículas (NPs) poliméricas utilizadas para la nanoencapsulación son materiales de matriz

orgánica, considerados excelentes sistemas de administración de fármacos, sin embargo, tienen algunas desventajas.

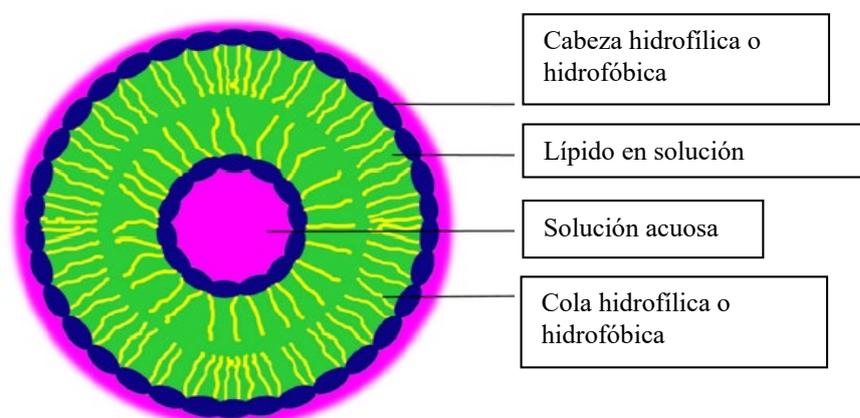


Fig. 1. Estructura de un liposoma. Tomado de Khorasani *et al.*, 2018.

3.1 Liposomas

Los primeros sistemas de fosfolípidos de bicapa llamados liposomas, se describieron en 1965 y pronto se propusieron como sistemas de administración de fármacos (Allen & Cullis, 2013). Los liposomas son vesículas artificiales de forma esférica que pueden crearse a partir de colesterol y fosfolípidos naturales no tóxicos. Los liposomas varían en tamaño, desde vesículas pequeñas a grandes (0,025 μm -2,5 μm). Además, pueden tener membranas de una o dos capas. Teniendo en cuenta su tamaño y el número de capas, los liposomas también pueden clasificarse en dos categorías 1) vesículas multilamelares (MLV) y 2) vesículas unilamelares. Asimismo, las vesículas unilamelares pueden clasificarse en dos categorías 1) vesículas unilamelares grandes (LUV, por sus siglas en inglés) y 2) vesículas unilamelares pequeñas (SUV) (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Los liposomas son grandes sistemas de administración de fármacos debido a su capacidad para atrapar fármacos hidrofílicos y fármacos lipofílicos, además por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y baja inmunogenicidad.

Los liposomas aceptan la unión covalente y no covalente en la superficie, por lo común se usa el polietilenglicol (PEG), que aumenta el tiempo de circulación, o los anticuerpos y péptidos que a su vez, mejoran la focalización y la penetración en el tumor. Sin embargo, algunas de las desventajas de los liposomas son la corta vida media en circulación (menos de 30 minutos) (Klibanov *et al.*, 1990), (Shen *et al.*, 2018), la alta inestabilidad física y química debido a los frecuentes eventos de agregación, la oxidación de las cadenas de acilo insaturadas de los lípidos, la hidrólisis de los enlaces de éster, la baja eficiencia de la encapsulación y la alta fragilidad. Los liposomas se han utilizado para encapsular productos farmacéuticos y proteínas como la hormona estimulante del apetito, proteínas de suero de leche e insulina. Además, mediante el uso de liposomas se ha aumentado la actividad biológica del material encapsulado (Perry & McClements, 2020).

3.2 Nanopartículas poliméricas (NPs)

Las NPs poliméricas se han desarrollado como respuesta a la demanda para encapsular fármacos hidrofóbicos como los taxanos, muy utilizados para el tratamiento del cáncer de mama. Las NPs poliméricas poseen excelentes propiedades como una alta eficiencia de encapsulación, alta biodegradabilidad cuando son elaboradas a partir de polímeros biodegradables, alta estabilidad "*in vivo*", permiten una amplia gama de conjugaciones y un estrecho control de la liberación del fármaco en respuesta a diferentes estímulos como el pH, la temperatura, la luz y los ultrasonidos. Sin embargo, las desventajas de las NPs poliméricas son: el corto tiempo de circulación, la baja estabilidad durante la fabricación, la toxicidad debida a los disolventes residuales utilizados durante la producción y la falta de uniformidad de un lote a otro (Sorolla *et al.*, 2020).

Los polímeros que se utilizan en aplicaciones de bioingeniería y nanoencapsulación, usan por lo general compuestos naturales como el quitosano y los alginatos o polímeros sintéticos como el plurónico, el poli (ácido DL-láctico) (PLA), el polietilenglicol (PEG), el poli (vinilalcohol) (PVA), el ácido poli (láctico co-glicólico) (PLGA) y la poli (propileno imina) (PEI) entre otros (Witika *et al.*, 2020). El quitosano es un polisacárido con una estructura química similar a la de la fibra vegetal celulosa que presenta una actividad antifúngica, antimicrobiana y de crecimiento celular antitumoral. El quitosano se ha utilizado para la liberación de productos farmacéuticos activos, es mucoadhesivo y un inductor de carga positiva (Witika *et al.*, 2020).

4. Métodos

Se realizó una búsqueda sistemática en las bases de datos Science Direct, PubMed y Google Scholar, a partir de un conjunto de palabras clave como: "nanoencapsulados", "nanotransportadores" y "péptidos". Además, se utilizó el booleano AND/OR. Todos los resultados se evaluaron a partir

de sus resúmenes, considerando la información más relevante acerca del tema.

4.1 Eficiencia de encapsulación (EE)

La EE, es decir la masa del liposoma cargado con el péptido, normalmente se determina según el método de Da Rosa Zavareze *et al.* (2014). Brevemente, se ponen 0,5 ml de la solución liposomal y 1 ml de acetona en un tubo de centrifuga. Las muestras se centrifugan a $5000\times g$ durante 30 min a $3^{\circ}C$ para separar las dos fases. El sobrenadante, incluida la proteína libre (es decir, no encapsulada), se extrae y se coloca en una estufa a $60^{\circ}C$ hasta la completa vaporización del disolvente. El material residual desecado se vuelve a suspender en agua destilada (5 ml) y se mide el contenido de proteínas mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Se utiliza un estándar de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) en el rango de 1-1000 $\mu g/ml$. Se extrae una alícuota de 0,5 ml de la muestra inicial y se añade 1 ml de Tritón de 0,06 g/100 g para determinar la proteína total de la muestra. El material se homogeneiza en un vórtex hasta la completa solubilización de la fosfatidilcolina. La eficiencia de encapsulación del péptido se calcula a partir de la ecuación 1 (Hosseini *et al.*, 2017):

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad total del péptido inicial} - \text{péptido no encaps.}}{\text{Cantidad total del péptido inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Otra forma utilizada para determinar la eficiencia de la encapsulación de péptidos es la técnica de la bolsa de diálisis, utilizada para nanofibras cargadas de péptidos (PLN, por sus siglas en inglés). De forma concisa, se toma una muestra de 100 mg de PLN en una bolsa de membrana de diálisis de acetato de celulosa de 12,4 kDa, que contenga 20 ml de agua bidestilada. La bolsa se cierra por ambos extremos y se coloca en 250 ml de agua Milli-Q en un matraz. Después de 30 minutos, se toma una alícuota de 1 ml para medir su contenido en péptidos por el método de Lowry. El contenido de péptidos se determina a partir de la curva estándar de BSA. La eficiencia de la encapsulación se determina mediante la ecuación 2.

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{Pt - Pf}{Pt} \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

donde Pt es la cantidad de péptidos en las nanofibras y Pf es la cantidad de péptidos libres en la superficie de las nanofibras (Rajanna *et al.*, 2021).

4.2 Microscopio de Transmisión electrónica (MTE)

La mayoría de las veces, la morfología de la fracción peptídica dentro de las nanovesículas se determina mediante el MTE con un método de tinción negativa según el protocolo de Maherani. Brevemente, la muestras de nanoliposomas se diluyen 30 veces con agua desionizada para reducir la concentración de las nanovesículas. Se combina el mismo volumen de las muestras diluidas y una solución de molibdato de amonio (2%) como agente de tinción negativa. Las muestras se dejan teñir durante 3 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos sobre una malla de cobre recubierta de carbono. A

continuación se determina la morfología de los nanoliposomas con el MTE a 200 kV (Hosseini *et al.*, 2017).

5. Conclusiones

Las proteínas y péptidos terapéuticos ya se usan comercialmente para el tratamiento de diversas afecciones humanas, sin embargo estos deben protegerse de los factores que puedan ocasionarles un deterioro, es por ello que la nanoencapsulación ofrece una alternativa para evitar este proceso.

Aunque los liposomas presentan algunas desventajas para su uso, ofrecen un mayor número de ventajas para el transporte de proteínas y PBs en forma de nanoencapsulados. Los liposomas, al estar compuestos por lípidos naturales no son tóxicos, no despiertan la respuesta inmune y son completamente biodegradables. Por otra parte, el empleo de NPs como material de nanoencapsulación, no es del todo favorable por la toxicidad que tienen, debida a los disolventes que se emplean para su producción; así mismo hay disparidad en su fabricación.

Finalmente, para comprobar que el proceso de nanoencapsulación fue realizado, se debe tener un método para corroborar que el producto se encuentre dentro o con el material portador, así como determinar la morfología antes y después de realizar la nanoencapsulación. Un estudio adicional que deberá efectuarse a los nuevos nanoencapsulados de péptidos es el de citotoxicidad, para que la administración sea segura en la población.

Conflicto de interés

El autor y los co-autores declaran que no tienen conflictos de interés.

Referencias

- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., Danquah, M.K., (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts Processing*. 1-42. DOI:10.1016/j.fbp.2016.02.003
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S. *et al.* (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 8: 102. DOI:10.1186/1556-276X-8-102
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(1), 36–48. DOI:10.1016/j.addr.2012.09.037
- Assadpour, E & Jafari, S. M. (2019). Nanoencapsulation: Techniques and developments for food applications. In: *Nanomaterials for Food Applications*. 35–61. DOI:10.1016/B978-0-12-814130-4.00003-8
- Bayraktar, O., Erdoğan, I., Köse, M. D., Kalmaz, G. (2017). Nanocarriers for plant-derived natural compounds. In: *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*. 395-412. DOI:10.1016/B978-0-323-46152-8.00017-2.
- Da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., Da Rocha, M., Colussi, R., De Assis, L. M., Suiça de Castro, L. A., Guerra Dias, A. R., Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of 23 encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Science and Technology*. 59: 841-848. DOI:10.1016/j.lwt.2014.05.013

- He, S., Mao, X., Zhang, T., Guo, X., Ge, Y., Ma, C., & Zhang, X. (2016). Separation and nanoencapsulation of antitumor peptides from Chinese three-striped box turtle (*Cuora trifasciata*). *Journal of Microencapsulation*. 33(4): 344–354. DOI:10.1080/02652048.2016.1194904
- Hosseini, S. F., Ramezanzade, L., & Nikkhah, M. (2017). Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105: 1455–1463. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.141
- Ibrahim, Y., Regdon, G., Jr, Hamedelniei, E. I., & Sovány, T. (2020). Review of recently used techniques and materials to improve the efficiency of orally administered proteins/peptides. *DARU: Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28(1): 403–416. DOI:10.1007/s40199-019-00316-w
- Jafari, S. M., (2017). Chapter 1-an introduction to nanoencapsulation techniques for the food bioactive ingredients. In: *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. Academic Press. pp. 1-62.
- Khorasani, S., Danaei, M., Mozafari, M. R. (2018). Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. In: *Trends in Food Science & Technology*. 79:106-115. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.07.009
- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P., Huang, L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *Federation of European Biochemical Societies*. 268 (1): 235-237.
- Lau, J. L. & Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 26(1): 2700-2707. DOI:10.1016/j.bmc.2017.06.052.
- Leader, B., Baca Q. J., Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7:21–39. DOI:10.1038/nrd2399
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Mosquera, M., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. (2016). Incorporation of liposomes containing squid tunic ACE-inhibitory peptides into fish gelatin.
- Witika, B. A., Makoni, P. A., Matafwali, S. K., Chabalenge, B., Mwila, C., Kalungia, A. C., Nkanga, C. I., Bapolisi, A. M., & Walker, R. B. (2020). Biocompatibility of biomaterials for nanoencapsulation: Current approaches. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland). 10(9): 1649. 1-40. DOI:10.3390/nano10091649
- The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96(3): 769-776. DOI:10.1002/jsfa.7145
- Noorbach, I. A., Jaswir, I., Ahmad, H. (2017). Nano-encapsulation of proteins and peptides. *Current Nanomaterials*. 2(2): 76-83. DOI:10.2174/2405461502666170912100212.
- Owens, D. E., 3rd, & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 307(1): 93–102. DOI:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010
- Latorres, J. M., Aquino, S., da Rocha, M., Wasielesky J. W., Martins, V. G., Prentice, C. (2021). Nanoencapsulation of white shrimp peptides in liposomes: Characterization, stability, and influence on bioactive properties. *Journal of Food Processing and Preservation*. 45(7): 1-11. DOI:10.1111/jfpp.15591
- Perry, S. L., McClements, D. J. (2020). Recent advances in encapsulation, protection, and oral delivery of bioactive proteins and peptides using colloidal systems. *Molecules*. 25(5): 1161–1166. DOI:10.3390/molecules25051161
- Rajanna, D., Pushpadass, H. A., Emerald, F. M. E., Padaki, N.V. and Nath, B. S. (2021), Nanoencapsulation of casein-derived peptides within electrospun nanofibres. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*. 102: 1684-1698. DOI:10.1002/jsfa.11509
- Sánchez, A & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*. 1(1): 29–46. DOI:10.1093/fqsafe/fyx006
- Shen, Z., Fisher A., Liu W. K., Li Y. (2018). PEGylated “stealth” nanoparticles and liposomes. In: *Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*. Woodhead Publishing, USA. 1-26. DOI: 10.1016/B978-0-08-101750-0.00001-5
- Shin, G. H., Kim, J. T., Park, H. J., (2015). Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. In: *Trends in Food Science & Technology*. 46 (1): 144-157. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.07.005
- Sorolla, A., Sorolla, M. A., Wang, E., Ceña, V. (2020). Peptides, proteins and nanotechnology: a promising synergy for breast cancer targeting and treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 17(11):1597-1613. DOI: 10.1080/17425247.2020.181473