



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

---

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**

**Área Académica de Ingeniería Agroindustrial e Ingeniería en  
Alimentos**

***“Elaboración y caracterización de péptidos  
antimicrobianos encapsulados en soportes  
biopoliméricos, con potencial aplicación  
biotecnológica”***

**TESIS**

Que, para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencia de los Alimentos**

PRESENTA:

**I.A. Joel Islas Cuellar**

DIRECCIÓN DE TESIS

**Dr. Norberto Chavarría Hernández**

**Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández**



**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**

**COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP**

Acta de reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: *"Elaboración y caracterización de péptidos antimicrobianos encapsulados en soportes biopoliméricos, con potencial aplicación biotecnológica"*, que desarrolló el estudiante Joel Islas Cuellar, No. Matrícula 162927.

**Asistentes:**

- Dr. Norberto Chavarría Hernández
- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
- Dra. Ma. del Rocío López Cuellar
- Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

**A. Revisión de Trabajo de Tesis**

**Observaciones:**

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a Joel oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

**B. Acuerdos**

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a 30 de Enero de 2019.

- Dr. Norberto Chavarría Hernández
- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
- Dra. Ma. del Rocío López Cuellar
- Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



ccp. Archivo.



Rancho Universitario.  
 Av. Universidad Km. 1  
 Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32 CP 43600  
 Tulancingo, Hgo.



El presente trabajo de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos, "*Elaboración y caracterización de péptidos antimicrobianos encapsulados en soportes biopoliméricos, con potencial aplicación biotecnológica*", fue realizado por Joel Islas Cuellar y contó con el apoyo del CONACyT a través de una beca para realización de estudios de posgrado (No. Becario 781764) bajo la asesoría de la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, Dra. Ma. del Rocío López Cuellar, Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez y Dr. Norberto Chavarría Hernández, del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria de la UAEH, con el soporte de los siguientes proyectos:

1. *Diseño y Caracterización de Películas Alimentarias a base de Biopolímeros y Antimicrobianos Naturales*. Redes Temáticas de Colaboración PRODEP-SEP 2017. Red: Biotecnologías Basadas en Biomoléculas Funcionales para el Sector Agroalimentario.
2. *Fortalecimiento de la Investigación en Producción y Caracterización de Biomoléculas Funcionales de gran Potencial Biotecnológico*. CONACyT Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2016, Clave 269805.
3. *Fortalecimiento de la infraestructura del Instituto de Ciencias Agropecuarias-UAEH para consolidar la investigación básica y aplicada en procesos de producción y caracterización de productos de origen metabólico y biomateriales Agroalimentarios*. CONACyT Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2015, Clave 254437.
4. *Equipamiento para fortalecer al Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*. CONACyT Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2014, Clave 230138.
5. *Nanopartículas biopoliméricas actuando como sistemas de transporte para péptidos antimicrobianos con potencial aplicación en la industria*. CONACyT Investigación Científica Básica 2014, Clave 239553.

## **Agradecimientos**

A Dios, por regalarme la vida y forjar mi camino, regalándome toda clase de vivencias, por estar conmigo siempre en toda prueba, dándome voluntad y fuerza para continuar en los momentos más difíciles, vulnerables y solitarios, gracias.

A mis padres, Marco Aurelio y Blanca Estela, por darme todo y mucho más...Los amo, sin ustedes, nada sería posible.

A mi hermana, por los ánimos y porras, aunque a veces tenemos diferencias, sabes que estamos para apoyarnos y salir adelante, te quiero mucho.

A Ofe, por ser tan "tú", por compartir conmigo tantos momentos, el acompañamiento en este tiempo, por la confianza, respeto y comprensión.

Al Dr. Norberto, Dra. Adriana y Dra. Chio, por la oportunidad de colaborar en el CABA, por las facilidades para realizar este trabajo de maestría, por el apoyo y asesoría en la parte experimental, por las sugerencias y comentarios constructivos, por su paciencia, tiempo y amistad.

Al Dr. Víctor Martínez, Dr. Armando Zepeda y Dr. José Gervacio, por las facilidades para continuar con este trabajo y apoyo incondicional cuando fue requerido.

A mis compañeros de clase, en especial a Román y Karla, por las divertidas anécdotas y amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Roberto (pach), Gerardo, Ángel, Andrea (afeda), Charly, Goby, Sixto, Lore RH, Lore TG, Karenina, Yareli, Jaqui Avelar, Hilda, Lili, Grace.

## DEDICATORIA

*Quiero dedicar este trabajo a:*

*Pita, por brindarme tanto, por tus enseñanzas, por tus regaños y consejos, por tu pasión y amor.*

*Tía Anita, gracias por el ejemplo de lucha, por los consejos, por tu cariño, por compartir tus experiencias y por tus enseñanzas.*

*Tío Carmelo, aunque ya no nos acompañas, sigues siendo un ejemplo de vida, seguimos aprendiendo de ti, recordándote con gran cariño "mi cuate".*

*Tíos Ángel y Marcelino, por el apoyo incondicional que siempre me brindan y los consejos.*

*Gracias viejitos, los llevo en el corazón.*

## Contenido

Índice de figuras .....	7
Índice de tablas .....	9
Resumen .....	11
Abstract .....	12
1 Introducción .....	13
2 Marco Teórico .....	16
2.1 Bioconservación .....	16
2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	17
2.3 Bacteriocinas .....	18
2.3.1 Clasificación .....	20
2.4 Nisina .....	21
2.4.1 Generalidades .....	21
2.4.2 Síntesis y estructura .....	22
2.4.3 Mecanismo de acción de nisina .....	23
2.4.4 Factores limitantes en el uso de nisina .....	25
2.5 Encapsulación .....	26
2.5.1 Generalidades .....	26
2.5.2 Ventajas de la encapsulación .....	27
2.6 Nanotecnología .....	28
2.7 Liposomas .....	29
2.7.1 Generalidades .....	29
2.7.2 Formación .....	30
2.7.3 Lípidos usados .....	31
2.7.4 Clasificación de liposomas .....	34
2.7.5 Métodos de preparación de liposomas .....	37
2.7.6 Aplicaciones de Liposomas .....	41
2.8 Biopolímeros ocupados en el recubrimiento de liposomas .....	56
2.8.1 Pectina .....	57

2.8.2 Quitosano .....	58
3 Justificación .....	60
4 Objetivos .....	61
4.1 Objetivo general .....	61
4.2 Objetivos específicos .....	61
5 Hipótesis.....	62
6 Materiales y métodos .....	63
6.1 Materiales .....	63
6.1.1 Microorganismos indicadores .....	63
6.1.2 Medios de cultivo .....	63
6.1.3 Biopolímeros, lecitina y agente antimicrobiano .....	64
6.1.4 Buffers de fosfatos y de acetatos.....	64
6.1.5 Soluciones de nisina, pectina, quitosano y piraña .....	64
6.1.6 Fases móviles para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	65
6.1.7 Solventes para purificación de lecitina de soya y preparación de liposomas.....	65
6.2 Métodos .....	66
6.2.1 Purificación de lecitina de soya para la obtención de fosfatidilcolina (PC)	66
6.2.2 Producción de liposomas por método de hidratación de película delgada	68
6.2.3 Caracterización de liposomas.....	70
6.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de nisina contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	72
6.2.5 Evaluación de la estabilidad y actividad antimicrobiana de los liposomas	75
6.2.6 Eficiencia de encapsulación (E.E) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). .....	78
6.2.7 Microscopia de fuerza atómica (MFA) .....	83
6.2.8 Análisis Estadístico .....	84
7 Resultados y Discusiones .....	85
7.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de nisina contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	85

7.2 Purificación de lecitina de soya .....	91
7.3 Determinación del tiempo de sonicación.....	94
7.4 Elaboración de liposomas y su distinto polímero .....	96
7.5 Eficiencia de encapsulado (E.E) .....	98
7.6 Determinación de la morfología de liposomas mediante Microscopía de Fuerza Atómica .....	100
7.7 Evaluación de la estabilidad fisicoquímica de los liposomas .....	103
7.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana (A.A) .....	109
8 Conclusiones.....	115
9 Referencias .....	116



## Índice de figuras

Figura 1. Estructura primaria de nisina, Ala-S-Ala representan a la lantionina, Abu-S-Ala representan a la $\beta$ -metil-lantionina DHA y DHB, las flechas indican los sitios de modificación. Tomado de Rollema et al. (1996).....	23
Figura 2. Mecanismo de acción de nisina. Acción dual, primero existe la inhibición de la síntesis de la pared celular y la formación de poros, ambos mecanismos se ven facilitados por la unión de la molécula de nisina al lípido II, principal transportador de peptidoglucano. Tomado de Perez, Perez, and Elegado (2015). ....	24
Figura 3. A) Liposoma con carga hidrofílica, atrapada entre las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, B) Liposoma con carga lipofílica, atrapada en la cola hidrofóbica del fosfolípido. Tomado del blog <i>No solo genes</i> ( <a href="https://nosologenes.com/hola-liposoma/">https://nosologenes.com/hola-liposoma/</a> ).....	29
Figura 4. Esquema del proceso de autoensamblaje básico de moléculas de fosfolípidos individuales (a), láminas de la membrana bicapa (b), seguida de transformación en liposomas (c). Una sola bicapa tiene típicamente ~ 5 nm de espesor y consiste en moléculas de lípidos individuales ordenadas con sus colas hidrófobas enfrentadas entre sí y sus grupos de cabeza hidrofílicas “mirando” hacia el medio acuoso interno y externo. Tomado de Jesorka and Orwar (2008). ....	31
Figura 5. Estructura de fosfolípido, cabeza hidrofílica formada por un fosfato y glicerol y cola hidrofóbica formado por ácidos grasos. Tomado de OpenStax (2013).....	32
Figura 6. Liposoma unilamelar B) Liposoma multilamelar C) Liposoma multivesicular. Modificado de Kaurinovic and Popovic (2012). ....	34
Figura 7. Diferentes tipos de vesículas: vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas grandes oligolamelares (OLV) y vesículas multilamelares grandes (MLV). La escala es aproximada. Adaptado de Jesorka and Orwar (2008). ....	35
Figura 8. Clasificación de liposomas de acuerdo con su tipo de componente. A liposoma convencional. B liposomas con polímero. C liposoma ligado a una diana. D liposoma teranóstico. Adaptado de Sercombe et al. (2015). ....	36
Figura 9. Liposomas para administración de i-doxil, en farmacia. ....	42
Figura 10. Liposomas en la industria cosmética, para tratamientos tópicos. ....	43
Figura 11. La botella de la izquierda contiene liposomas encapsulando curcumina, y la botella del lado derecho contiene la misma cantidad de curcumina pero libre, se muestra la diferencia en la solubilidad en ambos casos. Tomado de Mirafzali et al. (2014). ....	46
Figura 12. Liposomas Stealth en el control de microorganismos patógenos. ....	60
<b>Figura 13.</b> Procedimiento general en la purificación de lecitina de soya y obtención de fosfatidilcolina. ....	67
<b>Figura 14.</b> Formación de película lipídica en paredes de matraz.....	68
<b>Figura 15.</b> Procedimiento general para elaboración de liposomas con nisina. ....	69
Figura 16. Baño de ultrasonido BRANSONIC CPX5800H, ocupado para la reducción en tamaño de liposomas.....	70

Figura 17. Zetasizer Nano-ZS modelo Zen 3600, ocupado para mediciones de potencial Z, PDI y tamaño de liposomas. ....	71
Figura 18. Celdas capilar plegada desechable, para medición de potencial Z de liposomas. ....	71
Figura 19. Lector de ELISA AWARENESS, Stat Fax-2100 utilizado para la medición de absorbancia en la determinación de la CMI. ....	75
Figura 20. Estrés térmico a liposomas para liberar nisina encapsulada, previo a su evaluación de actividad antimicrobiana.....	76
Figura 21. Procedimiento para la realización de la prueba de difusión en agar por gota. Tomado de Trejo-González (2016). ....	77
Figura 22. Curva de calibración de nisina a 220 nm.....	79
Figura 23. Separación de liposomas con nisina de nisina no encapsulada. A) antes de ultrafiltración: mezcla de liposomas y nisina libre se colocan en el ultrafiltro, B) después de ultrafiltración: liposomas con nisina quedan en retenido y nisina no encapsulada queda en el filtrado. ....	81
Figura 24. Del lado izquierdo se observa el equipo de cromatografía usado en este estudio (Agilent Technologies, 1260) y del lado derecho se observa el detalle de la columna con termostato, utilizada para análisis de muestras de nisina en este estudio.....	82
Figura 25. Microscopio de fuerza atómica Park XE7.....	83
Figura 26. Placa de ELISA: control-, control+, y tratamientos con <i>L. monocytogenes</i> , a 35°C, 24 h de incubación.....	86
Figura 27. Determinación de CMI mediante absorbancia para <i>L. monocytogenes</i> a 35°C. Densidad óptica ( $\lambda= 545 - 630$ nm). ....	87
Figura 28. Placa ELISA, control-, control+, y tratamientos contra <i>S. aureus</i> , a 35°C, 24 h de incubación.....	88
Figura 29. Determinación de CMI mediante absorbancia para <i>S. aureus</i> a 35°C. Densidad óptica ( $\lambda= 545 - 630$ nm) ....	89
Figura 30. Muestra de lecitina purificada para elaboración de liposomas con PC-2.....	91
Figura 31. Comparación de FTIR entre muestras de lecitina cruda, lecitina purificada y estándar de fosfatidilcolina (Sigma-Aldrich, Lote CV8971H, E.U.A) pureza de 99%. ....	92
Figura 33. Cambios en tamaño de liposomas con el tiempo. ....	105
<b>Figura 35.</b> Cambios en Pz con el tiempo.....	108
Figura 36. Actividad antimicrobiana de liposomas contra <i>L. monocytogenes</i> (Lm) y <i>S. aureus</i> (Sa).....	111

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL. Adaptado de Cotter PD (2005).....	20
Tabla 2. Trabajos sobre la encapsulación de nisina en liposomas, en los últimos diez años (Fuente CONRICYT).....	49
Tabla 3. Distribución de placa de Elisa para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los microorganismos indicadores.....	73
Tabla 4. Volúmenes de nisina considerados para la curva de calibración.....	80
Tabla 5. Condiciones de operación en HPLC para cuantificación de nisina en liposomas y curva estándar de nisina. Fase móvil A: 99.9% ACN y 0.1 TFA. Fase móvil B, 99.9% Agua y 0.1 TFA.....	81
Tabla 6. Evaluación de diferentes tiempos de sonicación para optimizar tiempos de tratamiento para fabricar liposomas.....	94
Tabla 7. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los liposomas elaborados en el presente trabajo.....	97
<b>Tabla 8.</b> Eficiencia de encapsulado de liposomas y propiedades fisicoquímicas.....	99
Tabla 9. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los liposomas respecto al tiempo.....	103
Tabla 10. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra <i>L. monocytogenes</i> (Lm) y <i>S. aureus</i> (Sa) en función del tiempo, zona de inhibición y actividad antimicrobiana, de los distintos liposomas.....	109
Tabla 11. Galería fotográfica de actividad antimicrobiana en función del tiempo contra microorganismos indicadores.....	112

## Resumen

Los péptidos antimicrobianos han sido ampliamente reconocidos como conservadores en los alimentos; sin embargo, la baja estabilidad, la degradación proteolítica y las interacciones con las sustancias circundantes podrían afectar su actividad antimicrobiana (AA). La encapsulación de bacteriocinas dentro de liposomas es una alternativa para superar los inconvenientes anteriores. El objetivo del presente trabajo fue la elaboración de liposomas convencionales (LC), liposomas recubiertos con pectina (LP) y liposomas recubiertos de quitosano (LQ) para la encapsulación de nisina. Los liposomas se caracterizaron por su tamaño, índice de polidispersidad (PDI), potencial Z y AA contra *Listeria monocytogenes* (Lm) y *Staphylococcus aureus* (Sa). La nisina se encapsuló en liposomas de lecitina de soya parcialmente purificada mediante el método de hidratación de película delgada con ayuda de ultrasonido. La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó mediante HPLC. El tamaño y el potencial Z (Pz) de los liposomas se determinó con un equipo Zetasizer nano-ZS ZEN 3600, la morfología con un microscopio de fuerza atómica (MFA) Park XE7 y la AA por la inhibición del crecimiento microbiano en cultivos sólidos de Lm y Sa. Se obtuvieron los siguientes resultados promedio en tamaño, PDI y Pz de 201 nm, 0.21, -39 mV; 205 nm, 0.23, -37 mV; 209 nm, 0.23, +22 mV, para LC, LP y LQ, respectivamente. Los valores de EE estuvieron en el rango de 86% a 95%. El MFA mostró liposomas esféricas (100-150 nm) con recubrimientos densos de biopolímeros en el caso de muestras de LQ y LP sugiriendo liposomas recubiertos. La AA mostrada disminuyó para todos los casos, de igual manera es claro que los liposomas protegieron a la nisina respecto al tiempo, la AA residual fue mejor para el caso de LC en comparación con los demás tratamientos.

## Abstract

Antimicrobial peptides have been widely recognized as preservatives in foods; however, low stability, proteolytic degradation and interactions with surrounding substances could affect their antimicrobial activity (AA). The encapsulation of bacteriocins within liposomes is an alternative to overcome the above drawbacks. The objective of the present work was the elaboration of conventional liposomes (LC), liposomes coated with pectin (LP) and liposomes coated with chitosan (LQ) for the encapsulation of nisin. The liposomes were characterized by their size, polydispersity index (PDI), potential Z (Pz) and AA against *Listeria monocytogenes* (Lm) and *Staphylococcus aureus* (Sa). Nisin was encapsulated in partially purified soybean lecithin liposomes by the thin film hydration method with the assistance of ultrasound. The encapsulation efficiency (EE) was determined by HPLC. The size, PDI and Pz of the liposomes were determined with a Zetasizer nano-ZS ZEN 3600 equipment, the morphology with an atomic force microscope (MFA) Park XE7 and the AA by the inhibition of microbial growth in solid cultures of Lm and Sa. The following average results were obtained in size, PDI and Pz of 201 nm, 0.21, -39 mV; 205 nm, 0.23, -37 mV; 209 nm, 0.23, + 22 mV, for LC, LP and LQ, respectively. The EE % values were in the range of 86% to 95%. The MFA showed spheroidal liposomes (100-150 nm) with dense coatings of biopolymers in the case of LQ and LP samples suggesting coated liposomes. The AA shown decreased for all cases, in the same way it is clear that the liposomes protected nisin with respect to time, the residual AA was better for the case of LC compared with the other treatments.

## 1 Introducción

Durante los últimos años se han observado tendencias en los consumidores en la búsqueda de productos saludables, que sean mínimamente procesados y que contengan conservadores naturales, ya que el uso inadecuado de preservantes convencionales, el mal manejo de los alimentos y prácticas deficientes de procesamiento pueden propiciar la proliferación de microorganismos patógenos y/o deterioradores de los alimentos, pudiendo generar problemas de salud, como enfermedades transmitidas por los alimentos, así como implicaciones económicas importantes para la industria; además de la creciente preocupación de los consumidores por enfermedades crónicas relacionadas a los conservadores sintéticos; entre las alternativas para resolver estas problemáticas, se tiene a la bioconservación, que es la extensión de la vida útil de alimentos empleando como conservantes la microbiota natural o sus metabolitos (Stiles, 1996).

Debido a esto, la bioconservación ha atraído la atención de la industria de alimentos, así como de la comunidad científica como un potencial sustituto de los preservantes utilizados en la actualidad, ya que hace uso de diferentes tecnologías alternativas, como sustancias naturales con propiedades antibacterianas como aceites esenciales de diferentes partes de plantas, frutos y especias como canela, jamaica, clavo de olor, lavanda, limón, naranja, mandarina, orégano, etc. Otro ejemplo claro de bioconservación es la utilización de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son capaces de producir sustancias inhibitoras de microorganismos, además de que sirven como una barrera más para la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos; estas sustancias conocidas como bacteriocinas, metabolitos primarios de las BAL, se definen como productos de la síntesis ribosómica, conformado por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos además son secretados extracelularmente y presentan actividad bactericida sobre cepas patógenas (Cotter PD, 2005).

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

El uso de bacteriocinas en la industria de los alimentos está comprobado que reduce la adición de conservadores químicos e inclusive puede ser una alternativa en la sustitución de éstos, lo cual es de suma importancia para atender las necesidades del consumidor, ya que están en busca de aquellos productos que contengan menos aditivos sintéticos; además, son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos relacionados filogenéticamente con las BAL, tales como *Listeria monocytogenes*, bacteria causante de la listeriosis, *Clostridium botulinum*, causante del botulismo y de la misma forma se han establecido diferentes estrategias, como la adición de agentes quelantes y sales orgánicas, para también tener un efecto antimicrobiano contra bacterias Gram negativas, como *Salmonella* sp., bacteria causante de salmonelosis; *Escherichia coli*, particularmente la cepa *Escherichia coli* O157:H7, causante de diarrea hemorrágica.

La nisina, la única bacteriocina aprobada como conservador en más de 40 países, codificada como E 234 en la Unión Europea, es sintetizada de forma natural por la bacteria *Lactococcus lactis*, sus propiedades conservantes se conocen desde la década del año 1940 y es considerada por la FAO/WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization) como un aditivo GRAS (Generally Recognized as Safe), sin embargo uno de los retos en el uso de nisina es su baja actividad antimicrobiana en sistemas alimentarios complejos como cárnicos y productos lácteos, ya que interactúa con grasas y proteínas, limitando su actividad, al igual puede ser inactivada por enzimas presentes en los alimentos como las proteasas, disminuyendo su efecto antimicrobiano (Balciunas et al., 2013; Khan & Oh, 2016).

Una solución para mejorar y conservar su efecto antimicrobiano, es el uso de la encapsulación, la cual ofrece ventajas como proteger el material activo de la degradación producida por el medio ambiente (calor, aire, luz, humedad), le brinda protección de reacciones enzimáticas; además el compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado, puede ser empleado para separar componentes con el fin de que éstos no reaccionen. Entre la amplia

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

variedad de tipos de encapsulación así como de materiales, se tienen a los liposomas, que son vesículas compuestas principalmente por fosfolípidos en bicapa, contienen una fase acuosa interna y están suspendidas en otra fase acuosa externa, su formación es espontánea, los fosfolípidos se mezclan con agua; su parte polar interacciona con el agua, y su parte apolar interacciona con sus homólogas (ácidos grasos) para formar bicapas, entre las principales ventajas de los liposomas tenemos que en su estructura podemos incorporar moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfifílico, tienden a la estabilización del principio activo, no son tóxicos, son completamente bio-compatibles, y se han utilizado ampliamente para la encapsulación y transporte de antibióticos, antimicrobianos, terapia génica, cosméticos, etc.; y dependiendo del tipo de liposoma podemos incorporar mayor concentración de compuesto activo en comparación a otros métodos de encapsulamiento (Jesorka & Orwar, 2008).

En el presente trabajo, se elaboraron liposomas convencionales y liposomas recubiertos (liposomas *Stealth*) a partir de lecitina de soya parcialmente purificada encapsulando péptidos (nisina comercial), los biopolímeros utilizados fueron pectina cítrica y quitosano, se utilizó la asistencia de un baño de ultrasonido para la formación de liposomas, su elaboración fue por medio del método de hidratación de la película delgada, se determinó la eficiencia de encapsulado mediante análisis de HPLC, se determinó el tamaño, potencial Z e índice de polidispersión (PDI) mediante un equipo Zetasizer Nano; la morfología de las partículas se determinó mediante microscopía de fuerza atómica, y se evaluó la estabilidad fisicoquímica y actividad antimicrobiana de los liposomas en un alimento modelo durante 8 días.



## 2 Marco Teórico

### 2.1 Bioconservación

Las enfermedades transmitidas por los alimentos se encuentran entre las preocupaciones más serias y costosas de salud pública a nivel mundial, y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. A pesar de las tecnologías modernas, las buenas prácticas de fabricación, el control de calidad, los conceptos de higiene y seguridad, el número reportado de intoxicaciones y enfermedades transmitidas por alimentos aumentó en la última década. Se estima que anualmente en el mundo, 1.8 millones de muertes son debidas a enfermedades diarreicas, donde la contaminación de los alimentos representan una de las principales causas (COFEPRIS, 2018). Las infecciones más comunes transmitidas por los alimentos son causadas por bacterias, como, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* y virus. Se informa que hay más de 960 millones de casos reportados causados por enfermedades transmitida por alimentos (ETA) y de estos casos hubo cerca de 420 mil casos de muertes (OMS/WHO, 2015). La globalización del mercado de alimentos, la introducción de nuevos alimentos, nuevos procesos de fabricación y la creciente demanda los productos mínimamente procesados, recién cortados y listos para el consumo pueden requerir una cadena alimentaria más larga y más compleja, lo que aumenta el riesgo de contaminación microbiológica.

Por lo tanto, continuamente se buscan nuevas tecnologías de conservación de alimentos que cumplan con estas demandas. Entre las tecnologías alternativas de conservación de alimentos, se ha prestado especial atención a la bioconservación y mejorar la calidad higiénica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos alimenticios perecederos.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

La bioconservación se define como la extensión de la vida útil de los alimentos empleando conservantes como la microbiota natural, o sus metabolitos (Stiles, 1996) también es una rama de la biotecnología, y tiene diferentes aplicaciones y/o métodos en la conservación, procesado y seguridad de los alimentos. Estas técnicas tienen como objetivo ser más eficientes y naturales que las empleadas usando conservadores sintéticos. Para ello se investigan, se desarrollan y se procesan sustancias de origen natural, donde emplean microorganismos que ayuden en el procesamiento y conservación de alimentos. A tales agentes se les denomina biopreservantes o bioconservantes. En la bioconservación de alimentos se incluyen desde técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la producción de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Estas tecnologías alternativas implican el uso de aditivos con propiedades antibacterianas como los aceites esenciales de diferentes partes de plantas, frutos y especias; así como el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) y sus metabolitos como las bacteriocinas, de especial interés en la bioconservación y en este proyecto de investigación.

## **2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)**

Las BAL fueron descubiertas en 1857 por el científico Louis Pasteur, mientras realizaba estudios tras la consulta de los vinicultores, de por qué se les descomponía y acidificaba el vino. En semanas descubrió que la sustancia que lo alteraba era el ácido láctico, producto de la fermentación láctica desencadenada por ciertos microorganismos.

Las BAL además de contribuir en la preservación de los alimentos, se han ocupado desde tiempos ancestrales para la fermentación de distintos alimentos ya que mejoran atributos organolépticos como lo son sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva, además este tipo de microorganismos al ser consumidos por el hombre en cantidades adecuadas mejoran la salud (Quinto et al., 2014; Ramírez, 2011).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Las BAL son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, su longitud es variable de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$ , son no esporulados, no móviles, pueden ser cocos o bacilos, Gram positivos, catalasa negativos, son anaerobias pero pueden ser aerobio tolerantes y se pueden clasificar en homofermentativas y heterofermentativas dependiendo su tipo de fermentación, en el primer caso se generan 2 moléculas de lactato y en el segundo se generan lactato, etanol y dióxido de carbono (Parada, 2007).

Los géneros más importantes de BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, y *Bifidobacterium* (Klein, 1998). Las BAL son conocidas generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y tienen un papel importante en la conservación de alimentos y alimentos fermentados, algunas de estas bacterias producen sustancias antagónicas llamadas bacteriocinas, las cuales en pequeñas concentraciones son muy activas contra microorganismos patógenos, así como otras sustancias antimicrobianas como el etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrogeno y peptidoglucano hidrolasas (Parada, 2007; Quinto et al., 2014; Stiles, 1996).

### 2.3 Bacteriocinas

Los péptidos antimicrobianos codificados genéticamente producidos por bacterias se denominan bacteriocinas, la primer bacteriocina descubierta fue hace más de 90 años, fue nombrada colicina, para reflejar el organismo productor original: *E. coli*; posteriormente en 1928 la búsqueda en el mejoramiento en los procesos de fermentación, fomentó a que se realizaran estudios con la bacteria *Lactococcus lactis*, con la cual descubrieron que producía una sustancia que inhibía a microorganismos, pero fue hasta 1933 que lograron dilucidar esta bacteriocina, siendo hasta 1943 nombrada como nisina, siendo la única bacteriocina hasta 2016 con la etiqueta GRAS y con aplicación comercial desde 1969, actualmente la

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

colicina descubierta en 1925 se unió a la categoría GRAS en 2016 (Balciunas et al., 2013; Cotter PD, 2005; FDA, 2016; Parada, 2007; Quinto et al., 2014).

Las bacteriocinas que probablemente tendrán el potencial más inmediato en aplicaciones alimentarias serán aquellas producidas por BAL de calidad alimentaria, ya que es más probable que cumplan con la aprobación reglamentaria debido a su origen, las bacteriocinas se pueden definir como péptidos pequeños, estables al calor, producidos por bacterias, que son activos contra otras bacterias y para los cuales el productor tiene un mecanismo de inmunidad específico (Cotter PD, 2005).

Las bacteriocinas que se producen por BAL pueden ser de espectro amplio o estrecho, pero en general, la actividad se dirige contra especies Gram-positivas de contenido G+C bajo, aunque existen ciertas cepas productoras de bacteriocinas con actividad antimicrobiana contra especies Gram-negativas (Parada, 2007; Swetwivathana & Visessanguan, 2015), de igual manera se ha demostrado actividad contra bacterias Gram-negativas, pero generalmente solo en situaciones donde la integridad de la membrana externa se ha visto comprometida o en combinación con otros tratamientos (Galvez, Abriouel, Lopez, & Ben Omar, 2007; Parada, 2007; Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008; Trejo-González, Rodríguez-Hernández, del Rocío López-Cuellar, Martínez-Juárez, & Chavarría-Hernández, 2018).

Las bacteriocinas producidas por LAB ofrecen varias características deseables, propiedades que las hacen adecuadas para la conservación de alimentos (Galvez et al., 2007).

- Son generalmente reconocidas como sustancias seguras.
- No son activas, ni tóxicas en células eucariotas.
- Se vuelven inactivas por proteasas del tracto digestivo.
- Tienen poca influencia en la microbiota intestinal.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Son generalmente tolerantes a cambios de pH y al calor.
- Tienen un espectro antimicrobiano relativamente amplio, contra muchos patógenos transmitidos por alimentos y bacterias de descomposición, muestran un modo de acción bactericida, generalmente actuando sobre la membrana citoplásmica bacteriana.
- Sus determinantes genéticos son generalmente codificado por plásmidos, lo que facilita la manipulación genética.

El uso de las bacteriocinas no se limita a la bioconservación de alimentos, también tiene uso complementario en medicina veterinaria en el tratamiento de algunas infecciones cutáneas, en el control de infecciones sistémicas causados por patógenos entericos, cuidado oral, acción espermicida, cuidado íntimo femenino, de igual manera se utiliza como agente terapéutico contra tipos cáncer (Balciunas et al., 2013; López-Cuellar, Rodríguez-Hernández, & Chavarría-Hernández, 2016).

### 2.3.1 Clasificación

Debido al amplio estudio de bacteriocinas se sugieren varias clasificaciones; para fines prácticos nos basaremos en la propuesta por (Cotter PD, 2005).

**Tabla 1.** Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL. Adaptado de Cotter PD (2005).

Clasificación	Comentarios / Sugerencias	Ejemplos
<b>Clase 1</b>		
<b>Bacteriocinas que contienen lantionina</b>	Incluye 1 y 2 lantibióticos; hasta 11 subclases han sido propuestas.	1 péptido: nisina, mersacidina, lacticina 481.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

		2 péptidos: lacticina 3147, citolisina.
<b>Clase 2</b>		
<b>Bacteriocinas que no contienen lantionina</b>	Grupo heterogéneo de pequeños péptidos. Subclase A, tipo Pediocina Subclase B, de 2 péptidos Subclase C, cíclicas Subclase D, péptidos lineales	Clase A: pediocina PA1, leucocina A Clase B: lactacina F; clase C: enterocina AS48, reuterina 6; clase D: lactococcin A, divergicina A
<b>Bacteriolicinas*</b>		
<b>Proteínas líticas distintas de bacteriocinas</b>	Proteínas grandes y termolábiles, muchas veces hidrolasas de mureína	Lisostafina, enterolicina A

\*se sugiere que estas no son generalmente consideradas como bacteriocinas

## 2.4 Nisina

### 2.4.1 Generalidades

La nisina es una bacteriocina de la clase 1, contiene el aminoácido lantionina, es producido por algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y se compone de 34 residuos de aminoácidos, tiene un peso molecular 3.5 kD, existiendo 4 variantes: nisina A, nisina Z, nisina F y nisina Q; la nisina A difiere de la nisina Z en el aminoácido 27, en nisina A es histidina y en nisina Z es asparagina; la nisina F difiere de la nisina A en 2 posiciones de aminoácidos, en nisina A esta la histidina en la posición 27 y en nisina F esta asparagina y en la posición 30, en nisina A esta

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

isoleucina y en nisina F valina; la nisina Q, difiere en 4 posiciones de aminoácidos, en el aminoácido 27 en nisina A esta histidina y en nisina Q esta asparagina, en la posición 30 en nisina A es isoleucina y en nisina Q es valina, en la posición 15 en nisina A es alanina y en nisina Q es valina, en la posición 21 en nisina A es metionina y en nisina Q es leucina (Benech, Kheadr, Lacroix, & Fliss, 2002; Khan & Oh, 2016; O'Connor et al., 2015; Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008).

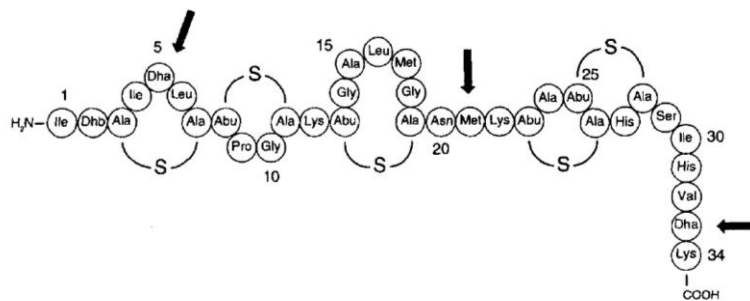
La nisina es comúnmente utilizada en productos lácteos, vegetales, comida enlatada, pescados, cárnicos, bebidas alcohólicas, etc., su acción antimicrobiana está ampliamente probada contra bacterias Gram-positivas y en combinación con otros tratamientos de conservación, como lo son los pulsos eléctricos, ácidos orgánicos, tratamiento térmico, atmósferas modificadas, altas presiones hidrostáticas etc., tiene efecto contra bacterias Gram-negativas ya que se genera una acción sinérgica, ha sido comercializada como conservante desde los años 60, es aprobada por la Organización de Agricultura y Alimentación (FAO) por sus siglas en inglés y la Organización mundial de la Salud la (OMS) como aditivo GRAS, es resistente a tratamientos térmicos y cambios en pH (Cotter PD, 2005; Chen H., 2003; Galvez et al., 2007; Khan & Oh, 2016). El comité de la FAO/WHO recomienda una ingesta diaria de 60 mg por cada 70 kg de masa corporal, y en México la legislación marca una dosis de 12.5 mg/kg en el producto final o 500 UI/g de producto (NOM-212-SSA1-2002, 2003), 40 UI son equivalentes a 1 µg de nisina pura (Chen H., 2003).

#### **2.4.2 Síntesis y estructura**

La nisina pertenece al grupo de lantibióticos, su síntesis es de manera ribosomal como un pre péptido y contiene una serie de aminoácidos poco comunes, que se forman en un proceso de modificación postraducciona. En este proceso, una serina deshidratada enzimáticamente por la enzima NisB (dehidroalanina, Dha) se condensa con el grupo sulfidrilo de una cisteína vecina lo que da como resultado la

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

formación de residuos de lantionina y una treonina deshidratada enzimáticamente por la enzima NisC (dehidrobutirina, Dhb) se une de igual manera con el grupo sulfidrilo de una cisteína vecina lo que da como resultado la formación de residuos  $\beta$ -metil-lantionina. Muchos lantibióticos también contienen serinas deshidratadas y treoninas deshidratadas. Los puentes de tio-éter de las lantioninas forman enlaces cruzados intramoleculares que dan como resultado cinco elementos de estructura cíclica en la molécula, que son muy importantes en las propiedades de inserción de la membrana de la bacteriocina. Se cree que estas estructuras de anillo retienen la rigidez del péptido, dan resistencia térmica, alto grado de hidrofobicidad. La nisina A (Figura 1) no tiene ningún grupo funcional negativo y tiene una carga positiva de +4 por las 3 grupos lisina y 1 grupo de histidina, su tamaño es de  $20 \times 50 \text{ \AA}$  y su punto isoeléctrico está cercano a 10.5, de igual manera posee propiedades anfipáticas, por su residuo terminal N hidrofóbico y C terminal hidrofílico (Chacko, 2008; Khan & Oh, 2016; Rollema, Metzger, Both, Kuipers, & Siezen, 1996).



**Figura 1.** Estructura primaria de nisina, Ala-S-Ala representan a la lantionina, Abu-S-Ala representan a la  $\beta$ -metil-lantionina DHA y DHB, las flechas indican los sitios de modificación. Tomado de Rollema et al. (1996).

### 2.4.3 Mecanismo de acción de nisina

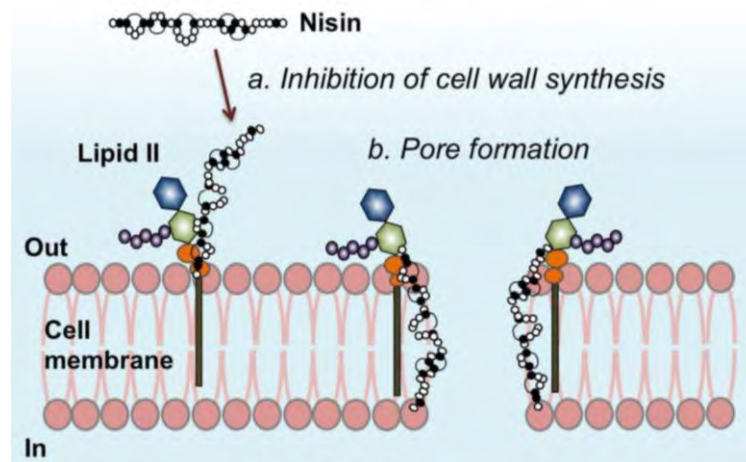
La nisina inhibe los microorganismos diana mediante la formación de poros en la membrana plasmática (Figura 2).



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

La acción de la nisina es dual:

- Primero ocurre la unión de la nisina a la membrana de la célula diana, mediante atracciones electrostáticas, el residuo N-terminal interactúa con el lípido II, que es el principal transportador de peptidoglucano. Seguido de la inserción en la fase lipídica, el residuo C-terminal de la nisina se inserta dentro de la membrana, formando complejos entre nisina y lípido II.
- Posteriormente conduce a la formación de poros, lo que conduce a la muerte celular, debido a la salida rápida de sustancias citoplásmicas esenciales, como aminoácidos, iones de potasio y nucleótidos, del citoplasma del microorganismo diana.



**Figura 2.** Mecanismo de acción de nisina. Acción dual, primero existe la inhibición de la síntesis de la pared celular y la formación de poros, ambos mecanismos se ven facilitados por la unión de la molécula de nisina al lípido II, principal transportador de peptidoglucano. Tomado de Perez, Perez, and Elegado (2015).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

El contenido de lípidos aniónicos en bacterias Gram-positivas es mucho más alto que en bacterias Gram negativas y puede ser responsable de la mayor actividad de la nisina contra bacterias Gram-positivas.

#### **2.4.4 Factores limitantes en el uso de nisina**

Existen factores limitantes en el uso de nisina en matrices alimentarias complejas, y su efecto antimicrobiano se puede ver disminuido o anulado por diferentes factores como:

- Condiciones de procesamiento en los alimentos
- Temperaturas de almacenaje
- Cambios en el pH del alimento
- Inactivación por enzimas en el alimento
- Interacción con aditivos del alimento (metabisulfito, dióxido de titanio)
- Absorción de la nisina por componentes del alimento como grasa y/o proteína
- Baja solubilidad y mala distribución en el alimento
- Baja estabilidad de la nisina durante el almacenaje

La microencapsulación y la nanotecnología en la industria alimentaria puede ser una alternativa para la protección y liberación controlada de bacteriocinas en los alimentos, y de esta manera conservar sus cualidades antimicrobianas intactas, en la actualidad se han desarrollado tecnologías para la entrega de bacteriocinas (Khan & Oh, 2016).

## 2.5 Encapsulación

### 2.5.1 Generalidades

La encapsulación es una tecnología que permite atrapar componentes sensibles en una matriz homogénea o heterogénea para su protección. En este proceso se forman películas delgadas o membranas semipermeables, utilizando diversos materiales como los biopolímeros. El desarrollo exitoso de estos sistemas de encapsulación se basa en el conocimiento sobre la estabilidad del componente que se desea proteger (péptidos, microorganismos, aceites esenciales, enzimas, antioxidantes, etc.), las propiedades de los materiales para la encapsulación, el método para la formación de la cápsula y el alimento al cual se desea incorporar (Gouin, 2004).

La encapsulación ofrece numerosos beneficios a los consumidores, debido a que añade un valor agregado al alimento, una mayor estabilidad entre los diferentes componentes, así como la protección del componente activo contra la humedad, variaciones de temperatura, el daño mecánico, la permeabilidad y la reactividad (al pH y/o a la presencia de sales) que pueden deteriorarlo; por otra parte, también la encapsulación ayuda a que los componentes activos resistan las condiciones de procesamiento y empaquetado (Gouin, 2004; Guevara Bretón & Jiménez Munguía, 2008).

En algunos casos el alimento no sufre alteración en sus atributos sensoriales (sabor, aroma y apariencia) y nutricionales por la presencia de los encapsulados. Otro de los beneficios de la encapsulación es que los componentes se liberan de forma controlada por difusión, disolución, disociación, y/o fracturación, lo cual es de importancia cuando los agentes activos deben ser liberados en un tiempo apropiado y/o bajo ciertas condiciones (Guevara Bretón & Jiménez Munguía, 2008).

### 2.5.2 Ventajas de la encapsulación

Las principales ventajas de la micro encapsulación son: (S. S. Bansode, 2010).

- Proteger el material activo de la degradación producida por el medio ambiente (calor, aire, luz, humedad), etc.
- El compuesto encapsulado se libera gradualmente
- Puede ser empleado para separar componentes, con el fin de que éstos no reaccionen.

Actualmente se utiliza una gran variedad de materiales para formar cápsulas, la selección se basa en sus características y propiedades, así como la biocompatibilidad que se pueda tener entre cada uno de ellos, para realizar dicha interacción y formar más de una capa. Es necesario tener 2 tipos de materiales uno que provenga de biopolímeros cargados negativamente como la goma gelana, pectinas o alginatos y el otro grupo de biopolímeros con carga positiva, como el quitosano y la gelatina.

Las técnicas de encapsulación pueden ser divididas en 3 grupos: químicos; como la inclusión molecular, polimerización interfacial; físicos como secado por aspersion, revestimiento por pulverización en lecho fluidizado, extrusión, co cristalización; fisicoquímicos como la coacervación, separación de fase orgánica, atrapamiento en sistemas de escala nano, la selección del método de encapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del coste (Shahidi & Han, 1993). Actualmente el impacto y las aplicaciones de la nanotecnología en las ciencias alimentarias han atraído una gran atención de la comunidad científica por la variedad de sistemas como son nanoliposomas, nanoemulsiones, nanopartículas y nanofibras (Khan & Oh, 2016).

## 2.6 Nanotecnología

Actualmente el impacto y las aplicaciones de la nanotecnología en las ciencias alimentarias han atraído una gran atención de la comunidad científica. El uso de la nanotecnología ya ha introducido métodos e instrumentos modernos para controlar y proteger los compuestos activos, estabilizar sus estructuras, y mejorar su liberación, de esta manera sus propiedades se mantendrán intactas por mayor tiempo y no sufrirán cambios en el alimento, rara vez se utilizan en su forma pura ciertos ingredientes y/o aditivos como lo son antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes, colorantes y conservadores de alimentos, generalmente se aplican como recubrimientos o se incorporan a alguna forma de sistema de entrega, para este propósito, se han formulado varios sistemas mencionados previamente (Brandelli, 2012; Khan & Oh, 2016).

La manipulación de materiales a nano escala ofrece la oportunidad de aplicarse a toda la cadena alimentaria, como lo puede ser en la producción, procesamiento, envasado, transporte y almacenamiento. En la industria alimentaria, las aplicaciones de la nanotecnología están representadas en los sistemas de suministro de nanopartículas, el envasado y la seguridad y protección de los alimentos. En el futuro próximo, la nanotecnología desempeñará un papel fundamental en dos áreas principales del procesamiento de alimentos, el envasado de alimentos y los ingredientes/aditivos alimentarios (Khan & Oh, 2016).

La liberación controlada y la protección de bacteriocinas pueden ser mejoradas mediante el uso de sistemas de nanoliposomas, con el uso de nanotecnología se pueden sintetizar liposomas cargados o recubiertos con nisina para que su liberación sea controlada y además su compuesto activo sea protegido de los componentes del alimento y su liberación sea de manera gradual (Patrícia da Silva Malheiros, Daroit, & Brandelli, 2010). Además una forma de mejorar su liberación y

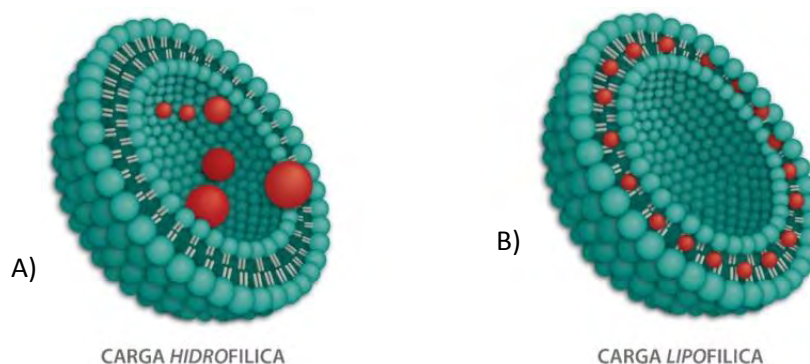
## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

estabilidad fisicoquímica es la incorporación de biopolímeros que recubran estas partículas (liposomas *Stealth*) (Lopes, Pinilla, & Brandelli, 2017).

## 2.7 Liposomas

### 2.7.1 Generalidades

Desde la primera observación de vesículas de fosfolípidos (liposomas), las tecnologías derivadas de los liposomas se han convertido en una de las piedras angulares de la bio-nanotecnología (Jesorka & Orwar, 2008). Los liposomas son pequeñas vesículas formadas a partir de lípidos anfifílicos, suspendidos en un entorno acuoso que encierra un núcleo acuoso. Estas vesículas pueden incorporar muchos componentes funcionales dentro de su interior haciéndolos muy versátiles, ya que pueden ser moléculas de carácter hidrofílico, hidrofóbico y anfifílico. El material puede quedar atrapado en la bicapa lipídica o en la fase acuosa (Figura 3), dependiendo de su lipofilia/hidrofiliidad inherente (Ulrich, 2002).



**Figura 3.** A) Liposoma con carga hidrofílica, atrapada entre las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos, B) Liposoma con carga lipofílica, atrapada en la cola hidrofóbica del fosfolípido. Tomado del blog *No solo genes* (<https://nosologenes.com/hola-liposoma/>)

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

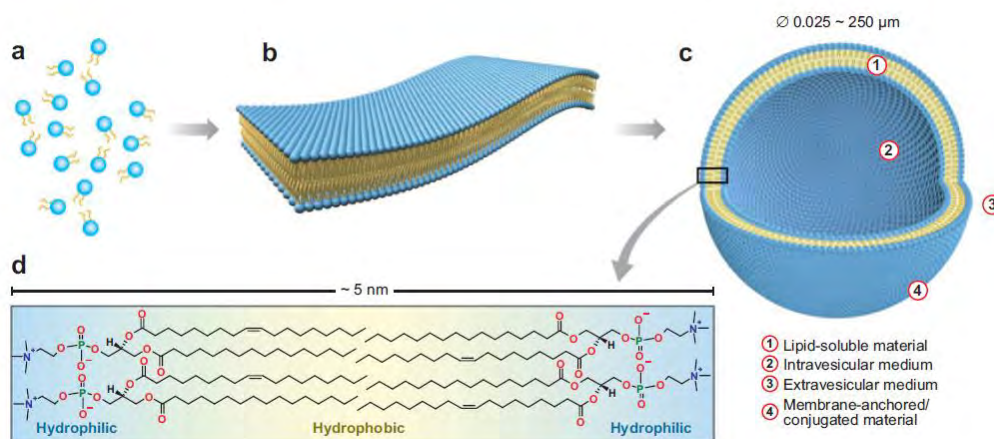
Las ventajas que ofrecen los liposomas sobre otros métodos de encapsulación son su bajo costo de fabricación, su ausencia de toxicidad, su amplia gama de morfología, su biocompatibilidad, flexibilidad para atrapar y proteger muchos tipos de biomoléculas, así como su liberación diferencial; además algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen. Estas propiedades han sido aprovechadas por diferentes ramas de la investigación; en farmacia por ejemplo, se ocupan para la entrega de terapia génica, ya que se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie del liposoma, lo que les convierte en sistemas más accesibles a tejidos como los tumores; en cosméticos para liberación controlada de compuestos activos implícitos en tratamientos dérmicos; en el mejoramiento de la seguridad alimentaria para encapsular péptidos bioactivos así como aditivos alimentarios, para cada una de estas aplicaciones existen numerosas formulaciones de lípidos específicos, los cuales hacen amplia la gama de liposomas potenciales (Akbarzadeh et al., 2013; Balazs & Godbey, 2011; Patrícia da Silva Malheiros et al., 2010; Ulrich, 2002).

### **2.7.2 Formación**

Los liposomas generalmente se forman por el autoensamblaje de moléculas de lípidos dispersos (Figura 4), cada uno de las cuales contiene un grupo de cabeza hidrofílica y colas hidrofóbicas, estos lípidos adquieren asociaciones que producen estados entrópicamente favorables, de baja energía libre, en algunos casos formando bicapas de lípidos o vesículas, dichas bicapas se caracterizan por colas hidrófobas enfrentadas entre sí y grupos de cabeza hidrofílica que miran hacia afuera para asociarse con el medio acuoso; en este punto, la formación de bicapa lipídica sigue siendo energéticamente desfavorable, porque las partes hidrófobas de las moléculas todavía están en contacto con el agua, un problema que se supera

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

mediante la curvatura de la membrana bicapa que se forma sobre sí misma para formar una vesícula con bordes cerrados.



**Figura 4.** Esquema del proceso de autoensamblaje básico de moléculas de fosfolípidos individuales (a), láminas de la membrana bicapa (b), seguida de transformación en liposomas (c). Una sola bicapa tiene típicamente  $\sim 5$  nm de espesor y consiste en moléculas de lípidos individuales ordenadas con sus colas hidrófobas enfrentadas entre sí y sus grupos de cabeza hidrofílicas “mirando” hacia el medio acuoso interno y externo. Tomado de Jesorka and Orwar (2008).

Este autoensamblaje impulsado por la energía libre es estable y ha sido explotado como un poderoso mecanismo para diseñar liposomas (Jesorka & Orwar, 2008; Karmali & Chaudhuri, 2007; Ulrich, 2002).

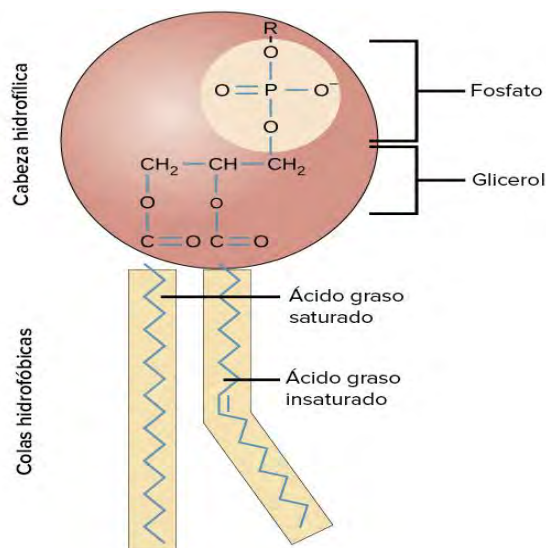
### 2.7.3 Lípidos usados

Generalmente los lípidos ocupados en la preparación de liposomas son los fosfolípidos (Figura 5), los cuales son moléculas anfífilicas, cuya parte hidrófoba está constituida por las cadenas hidrocarbonadas y el componente hidrófilo es la cabeza del fosfolípido que posee carga eléctrica, todas las membranas plasmáticas activas de las células poseen una bicapa de fosfolípidos, con la cabeza polar hacia el exterior de la superficie interactuando con el agua y sus colas dirigidas hacia el



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

interior, juntándose unas con otras. Por tanto, esta bicapa es una estructura cooperativa que se mantiene unida por interacciones no covalentes que la refuerzan (Mirafzali, Thompson, & Tallua, 2014)



**Figura 5.** Estructura de fosfolípido, cabeza hidrofílica formada por un fosfato y glicerol y cola hidrofóbica formado por ácidos grasos. Tomado de OpenStax (2013).

Los fosfolípidos, al igual que todas las moléculas de carácter anfifílico pueden clasificarse según su polaridad como aniónicos (polaridad negativa), catiónicos (polaridad positiva), y neutros (polaridad sin carga).

Es la cabeza polar del fosfolípido la que proporciona el valor de la carga al agregado formado. La longitud y grado de insaturación (enlaces dobles existentes en las cadenas) presente en la cadena hidrocarbonada es un factor importante. Estos dos parámetros van a marcar la flexibilidad de la membrana. Se da mayor rigidez en fosfolípidos de cadena larga y esta rigidez aumenta con el número de insaturaciones (T. M. Taylor, Davidson, Bruce, & Weiss, 2005).

Los lípidos comúnmente utilizados para la fabricación de liposomas son la Fosfatidilcolina (PC) un fosfolípido neutro, el ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol,

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

fosfatidilcerina que son lípidos de carácter aniónico y la estearilamina y otros lípidos sintéticos que se emplean cuando se necesitan liposomas catiónicos (Jesorka & Orwar, 2008; Karmali & Chaudhuri, 2007).

Cada uno de estos lípidos puede poseer una combinación diferente de cadenas de ácidos grasos en la región hidrofóbica de la molécula que proporciona diferentes grados de saturación. Cada fosfolípido es único y tiene un perfil complejo de transición de fase. La temperatura de transición de gel a fase líquida, se define como la temperatura requerida para inducir un cambio en el estado físico lipídico de la fase de gel ordenado en la que las cadenas de hidrocarburo están completamente extendidas y estrechamente empaquetadas, a la fase líquida desordenada donde las cadenas de hidrocarburos están orientadas aleatoriamente y son fluidas. Hay varios factores que influyen en la temperatura de transición de fase, como la longitud de la cadena de acilo, la carga del grupo de cabeza del fosfolípido, las especies de grupos de cabeza y el grado de insaturación. Por lo general, cuanto mayor es la longitud de la cadena de hidrocarburos, mayores serán las temperaturas de transición de fase (Balazs & Godbey, 2011; Jesorka & Orwar, 2008; Sercombe et al., 2015; Shahidi & Han, 1993).

### 2.7.4 Clasificación de liposomas

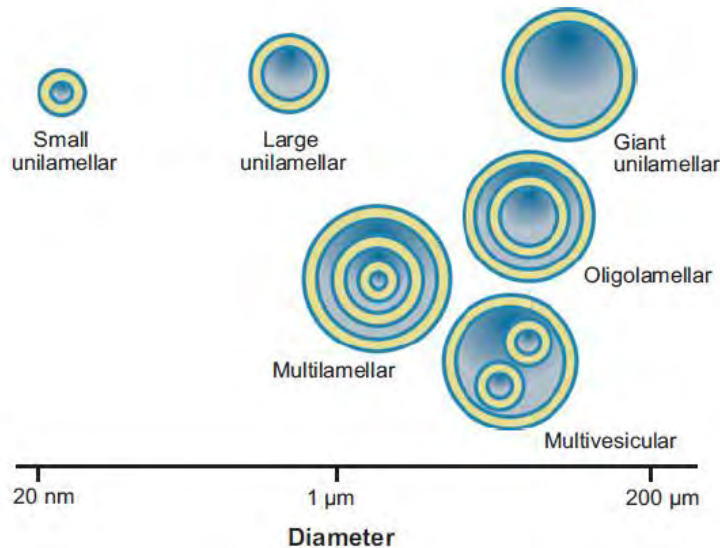
Los liposomas son, desde una perspectiva morfológica, más frecuentemente clasificados por su número de bicapas (lamelas) en unilamelares, oligolamelares y multilamelares (Figura 6).



**Figura 6.** Liposoma unilamelar B) Liposoma multilamelar C) Liposoma multivesicular. Modificado de Kaurinovic and Popovic (2012).

De igual manera se pueden clasificar por su tamaño (Figura 7) en pequeños de 20 nm a 100 nm, grandes 100 a 900 nm y gigantes de 1000 nm a 3500 nm. Existen los liposomas multivesiculares que son liposomas pequeños dentro de otro grande (Immordino, Dosio, & Cattell, 2006; Jesorka & Orwar, 2008).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



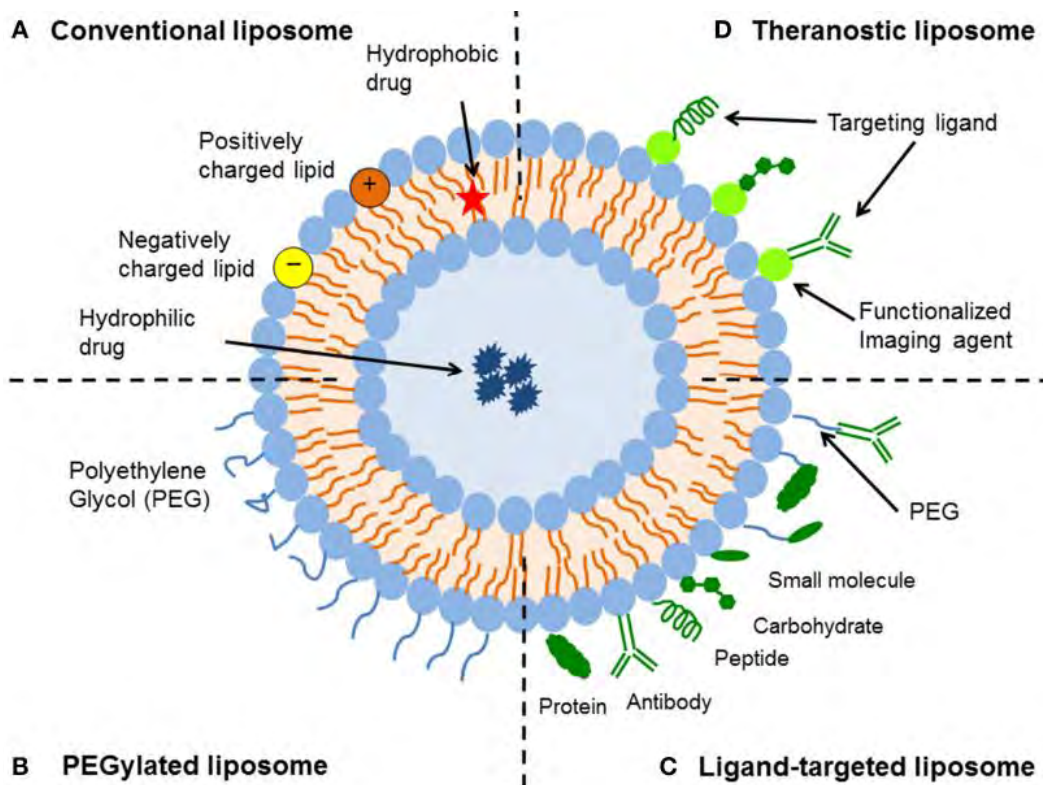
**Figura 7.** Diferentes tipos de vesículas: vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas grandes oligolamelares (OLV) y vesículas multilamelares grandes (MLV). La escala es aproximada. Adaptado de Jesorka and Orwar (2008).

Del mismo modo, los liposomas se pueden clasificar por su tipo de componente en:

- Liposomas convencionales: su bicapa puede estar compuesta de lípidos catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos (Jesorka & Orwar, 2008).
- Liposomas Stealth: su bicapa puede ser de lípidos convencionales y/o sintéticos, además lleva unida a su estructura un biopolímero, esto para mejorar su estabilidad, puede ser un polímero con carga + o -, la repulsión entre partículas aumenta, de igual manera la liberación del compuesto activo se ve mejorada así como su eficiencia de encapsulado (Immordino et al., 2006; Lopes et al., 2017; Sercombe et al., 2015).
- Liposomas ligandos-target: se puede usar para la dirección específica mediante la unión de ligandos (por ejemplo, proteínas, anticuerpos, péptidos

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

y carbohidratos) a su superficie, lo cual mejora la entrega y la liberación del compuesto activo, se ha ocupado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, terapia génica, vacunas etc. (Jesorka & Orwar, 2008; Sercombe et al., 2015).



**Figura 8.** Clasificación de liposomas de acuerdo con su tipo de componente. A liposoma convencional. B liposomas con polímero. C liposoma ligado a una diana. D liposoma teranóstico. Adaptado de Sercombe et al. (2015).

- Liposomas teranósticos : son llamados así porque mezclan la terapia génica y el diagnóstico en un solo vehículo, son liposomas multifuncionales y complejos, estas formulaciones liposomales combinan una o más de las

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

siguientes estrategias, marcadores activos con uno o más ligandos dirigidos, una respuesta a desencadenantes para controlar la liberación del compuesto, entrega de un fármaco terapéutico, biomarcadores, portadores de agentes de contraste para aumentar la diferencia de señal entre áreas de interés y antecedentes, y específicamente localizar los restos de contraste en los tejidos u órganos diana (Bozzuto & Molinari, 2015; Sercombe et al., 2015).

### 2.7.5 Métodos de preparación de liposomas

Todos los métodos de preparación de liposomas involucran 4 pasos básicos.

1. Evaporación del solvente orgánico de soluciones de lípidos.
2. Dispersar el lípido en medio acuoso.
3. Purificar el liposoma resultante.
4. Analizar el producto final.

La carga del compuesto activo puede ser de manera pasiva, durante la formación del liposomas, o activa después de la formación del liposoma.

Existen 3 métodos diferentes en cuanto a carga pasiva

1. Método de dispersión mecánica
  - Sonicación: quizá es el método más utilizado para la reducción de tamaño de liposomas, existen 2 tipos de sonicación:
    - Con sonda: una sonda/punta está en contacto con la dispersión de liposomas, la energía de entrada en la dispersión de lípidos es muy alta formando partículas pequeñas en cortos tiempos, en este método la punta suele calentarse y se debe ocupar un baño de

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

hielo para controlar la temperatura, además la punta puede desprender partículas de titanio y contaminar la solución.

- Sonicación de baño. La dispersión de liposomas se puede proteger en un ambiente estéril y ser colocado en el baño sonicador, además es más fácil regular la temperatura de la solución.
  
- Célula de presión francesa: implica la extrusión a través de un pequeño orificio, los liposomas resultantes son grandes en comparación con los sonicados, y sus volúmenes de trabajo son hasta de 50 mL.
  
- Congelación y descongelación de liposomas: los SUV se congelan rápidamente y se descongelan lentamente, se crean vesículas unilamelares por el resultado de la fusión de los SUV.
  
- Hidratación de películas lipídicas con agitación manual y/o agitación mecánica y liofilización: Se trata de un protocolo que incluye varios ciclos de evaporación del disolvente y sonicación. Se inicia con el proceso de evaporación del solvente en el que se encuentran los lípidos y una vez se tiene la bicapa de lípidos, se añade ciclohexano con un pequeño volumen de etanol (1-2% del volumen total) para aumentar la miscibilidad. Se liofiliza la muestra durante al menos 5 h. Así, la película de lípidos es otra vez formada y es el momento de pasar al proceso de hidratación de la bicapa lipídica, por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos, se agita energicamente mediante un sonicador. Este proceso permite obtener vesículas multilamelares, pero el tamaño y la lamelaridad es difícil de controlar.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Micro-emulsión. Dispersiones aceite en agua, agua en aceite son formadas mezclando agua, surfactantes, lecitina de soya y un cosolvente, estas emulsiones suelen ser estables y ser transparentes a la vista.
- Extrusión por membrana: los liposomas se hacen pasar por una membrana de policarbonato con un tamaño de poro definido (50, 100, 200 y 1000 nm) la mayoría de liposomas obtenidos serán unilamelares.

## 2. Método de dispersión solvente

- Inyección de éter (vaporización del disolvente): Una solución de lípidos disueltos en una mezcla de éter dietílico o éter-metanol se inyecta gradualmente en una solución acuosa del material a encapsular a 55 ° C a 65 ° C o bajo presión reducida. La consiguiente eliminación de éter al vacío conduce a la formación de liposomas. Se obtienen partículas con tamaños de 70 a 200 nm; su desventaja es la exposición de los compuestos a encapsularse en solventes orgánicos a altas temperaturas.
- Inyección de etanol: Una solución lipídica en etanol se inyecta rápidamente en un gran exceso de búfer. Los MLV se forman a la vez. Las desventajas del método son que la población es heterogénea (30 a 110 nm), los liposomas están muy diluidos, la eliminación de todo el etanol es difícil porque se forma una mezcla azeotrópica y su desventaja es que la moléculas activas se inactiven en presencia de etanol.
- Método de evaporación de fase inversa: se basa en la creación de micelas invertidas. La lenta eliminación del disolvente orgánico conduce a la conversión de estas micelas invertidas en estado viscoso y forma un gel. En un punto crítico de este proceso, el gel colapsa y



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

algunas de las micelas invertidas se alteran. El exceso de fosfolípidos en el entorno dona a la formación de una bicapa completa alrededor de las micelas residuales, que resulta en la creación de liposomas.

3. Método de eliminación de detergente (eliminación de material no encapsulado)

- Diálisis: Este es el caso cuando las vesículas se preparan mezclando detergente y fosfolípidos, lo que inicialmente da lugar a la formación de micelas mixtas, de forma que una vez que se dializa el detergente se obtienen liposomas unilamelares.
- Cromatografía de permeación en gel: En este método, el detergente se elimina por cromatografía. Los liposomas no penetran en los poros de las columnas empaquetadas, penetran a través de los espacios entre las columnas.

(Akbarzadeh et al., 2013; Jesorka & Orwar, 2008; Khan & Oh, 2016; Putri, Dwiastuti, Marchaban, & Nugroho, 2017; Ulrich, 2002).

El método más frecuentemente utilizado para la encapsulación de bacteriocinas en liposomas es la hidratación de película delgada, y la fosfatidilcolina es el fosfolípido más comúnmente usado (Patrícia da Silva Malheiros et al., 2010).

## 2.7.6 Aplicaciones de Liposomas

### 2.7.6.1 Liposomas en la entrega de fármacos

Una de las primeras aplicaciones de liposomas fue para entrega de fármacos, son muy útiles en esta área ya que pueden atrapar y transportar diferentes tipos de sustancias como antibacteriales, antivirales y medicamentos contra el cáncer, así como hormonas, enzimas, nucleótidos, esteroides y broncodilatadores. El objetivo de la administración de fármacos mediante liposomas, es lograr una alta localización de compuestos activos en los sitios blancos donde están tumores o inflamaciones (Immordino et al., 2006; Jesorka & Orwar, 2008). La localización es la liberación controlada cuando un cambio en la estructura del liposoma o en su reactividad promueve la liberación de material encapsulado. La localización ayuda a garantizar la liberación del compuesto activo a través de un mecanismo específico en el sitio objetivo. Hay dos mecanismos principales de liberación controlada. Una se basa en el desarrollo de una reacción de afinidad entre el objetivo y el liposoma. El segundo es una liberación desencadenada e implica la incorporación de una molécula ambientalmente sensible (pH, cambio de temperatura o irradiación de luz) en el liposoma que causará cambios estructurales en la membrana vesicular (Jesorka & Orwar, 2008; Sercombe et al., 2015).

Además, los liposomas mejoran la solubilidad de fármacos, dan protección a fármacos sensible como moléculas de ADN, ARN, nucleótidos y ribozimas, mejora de la absorción intracelular de medicamentos anticancerígenos (Figura 9), antivirales y antimicrobianos; alteran la farmacocinética y biodistribución de fármacos de vida corta (Akbarzadeh et al., 2013; Immordino et al., 2006; Sercombe et al., 2015). Existen fármacos liposomados como Doxil, EVACT™, DaunoXome, VincaXome, y Mikasom.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 9.** Liposomas para administración de i-doxil, en farmacia.

### 2.7.6.2 Liposomas en la terapia génica

El objetivo de la terapia génica es entregar ADN, ARN, o secuencias antisentido a las células con el fin de aliviar los síntomas o prevenir enfermedades (Karmali & Chaudhuri, 2007). Algunas aplicaciones principales son la sustitución de genes, la adición de genes para la producción de toxinas naturales, la sensibilización de células a otros tratamientos, de igual manera algunas enfermedades como fibrosis quística, la hemofilia, la anemia de células falciformes, sistema de inmunodeficiencias, enfermedades transmisibles virales (VIH, hepatitis), enfermedades neurológicas (enfermedad de Parkinson), y el Alzheimer pueden ser tratadas con la terapia génica usando liposomas (Balazs & Godbey, 2011; Bozzuto & Molinari, 2015; Karmali & Chaudhuri, 2007).

### 2.7.6.3 Liposomas en cosméticos

En 1963, el uso de vesículas lipídicas como sistemas de administración de fármacos tópicos comenzó a atraer la atención. La estructura bicapa liposómica contiene fosfolípidos o esfingolípidos que se asemejan a las membranas naturales que hacen que este sistema sea de interés para la industria cosmética. Los liposomas, dependiendo de la composición, pueden alterar la fluidez de la membrana celular y

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

fusionarse con las células para administrar medicamentos e ingredientes activos al sitio objetivo (Betz, Aeppli, Menshutina, & Leuenberger, 2005). Algunos expertos creen que los liposomas no penetran como vesículas intactas ni penetran en la piel, sino que se deforman en fragmentos (Jesorka & Orwar, 2008). Las vesículas dentro de cremas, ungüentos y otras soluciones administrarán fármacos de una manera dependiente de la concentración a través de la epidermis y la dermis (Betz et al., 2005). Los cosméticos con liposomas (Figura 10) van desde pastas (cremas, geles y ungüentos) hasta formulaciones que contienen diversos extractos, humectantes, antibióticos y proteínas recombinantes para la cicatrización de heridas o quemaduras solares. Debido a su alto y duradero contenido de humedad, la mayoría de los productos son cremas antienvjecimiento, protectores solares, perfumes, acondicionadores para el cabello y para después del afeitado (Betz et al., 2005; Jesorka & Orwar, 2008).



**Figura 10.** Liposomas en la industria cosmética, para tratamientos tópicos.

#### 2.7.6.4 Liposomas en la industria de alimentos

Una razón para suministrar algunos ingredientes alimentarios a través de liposomas es la misma que para la encapsulación en general, una mejor estabilidad del ingrediente, es deseable proteger un ingrediente de los iones metálicos, pH, radicales libres, enzimas o agua en un alimento, que de lo contrario podría dar como resultado la degradación del ingrediente alimentario, esto se puede lograr creando un ambiente estabilizador en un liposoma que promueva la durabilidad del ingrediente (Desai & Jin Park, 2005; Reineccius, 1995).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Aunque las aplicaciones de liposomas para el sector alimentario son bastante recientes, ha habido avances significativos en esta área. Las principales aplicaciones, hasta el momento, son dirigidos a alterar la textura de los componentes de los alimentos, la encapsulación de componentes de los alimentos o aditivos (vitaminas, minerales, saborizantes), controlar la liberación de sabores, y el aumento de la biodisponibilidad de los componentes nutricionales (T. M. Taylor et al., 2005).

La mayoría de las técnicas de encapsulación empleadas actualmente en la industria alimentaria se basan en biopolímeros, como los carbohidratos, gomas, proteínas, fibras sintéticas, dextrinas y alginatos, sin embargo, los liposomas han comenzado recientemente a ganar importancia debido a sus ventajas únicas (Reineccius, 1995), mencionadas anteriormente. Con base en los resultados de estudios liposomales en investigación y aplicaciones farmacéuticas y médicas, los científicos de alimentos han comenzado a utilizar liposomas para los componentes funcionales de administración controlada, como péptidos, enzimas, vitaminas y sabores en diversas aplicaciones alimentarias (T. M. Taylor et al., 2005).

Una de las principales aplicaciones de los liposomas en los alimentos y nutracéuticos es su propiedad para proteger moléculas solubles en agua y otras solubles en lípidos al mismo tiempo. Esto es importante cuando se deben administrar diferentes moléculas juntas para tener un efecto sinérgico. Como ejemplo, el ácido ascórbico y el tocoferol, ambos son poderosos antioxidantes, ejercen una función sinérgica, el ácido ascórbico es una molécula soluble en agua y el tocoferol es una molécula soluble en grasa. El ácido ascórbico se puede encapsular dentro del núcleo acuoso de los liposomas y el tocoferol se incorpora a las bicapas lipídicas de los liposomas (Mirafzali et al., 2014).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

A la fecha los liposomas no han sido utilizados como ingredientes en bebidas, debido a problemas de estabilidad, la mayoría de bebidas comercializadas tienen pH por debajo de 3, lo cual provocaría la hidrólisis de las vesículas, aunado a los procesos de esterilización y desestabilizarían la membrana lipídica, otro inconveniente en el uso de liposomas para bebidas es que las partículas deberían ser menores a 50 nm, esto para que la solución sea transparente, de otra manera será turbia y reducir vesículas a 50 nm o menos es costoso por la cantidad de energía necesaria para reducir el tamaño de partícula; sin embargo hay esfuerzos en la fortificación de jugos de manzana con liposomas atrapando sulfato férrico (Mirafzali et al., 2014).

Otros ejemplos de liposomas en alimentos, son su incorporación a productos lácteos, Rao, Chawan, and Veeramachaneni (1994) atraparon  $\beta$ -galactosidasa en liposomas, demostraron que la enzima se mantuvo activa por 20 días en muestras de leche, en favor de resolver el problema de la intolerancia a la lactosa, ya que la enzima libre puede generar cambios en el sabor de la leche.

Una técnica para envasar liposomas para uso comercial es formulando liposomas liofilizados y colocando el contenido en cápsulas de liberación en polvo. Cuando las tapas se colocan en botellas de agua, sus contenidos se liberan y se dispersan en agua y los liposomas se forman instantáneamente. Al envasar liposomas de esta manera, la vida útil del producto aumenta instantáneamente. Además, dado que la formulación liposómica permanece como un polvo seco hasta que el consumidor lo ocupa, la degradación de los lípidos y la desestabilización son efectos negativos superados. Los liposomas liofilizados se pueden mantener a temperatura ambiente, la Figura 11 muestra la formulación de Curcusomas empaquetados en un tapón y su diferencia en la solubilidad con la curcumina libre; la curcumina es conocida por sus funciones de antioxidante, antitumorales, antiartritis, neuroprotectoras y antiinflamatorias (Mirafzali et al., 2014).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 11.** La botella de la izquierda contiene liposomas encapsulando curcumina, y la botella del lado derecho contiene la misma cantidad de curcumina pero libre, se muestra la diferencia en la solubilidad en ambos casos. Tomado de Mirafzali et al. (2014).

Extractos de ajo igual han probado ser potenciales antimicrobianos, demostrando actividad contra cepas de *Listeria monocytogenes* de manera libre, y al encapsularlos en liposomas se mantienen una actividad residual del 40 % superior en comparación con extractos sin liposomas en muestras de leche (C. M. Pinilla, Norena, & Brandelli, 2017).

#### **2.7.6.5 Mejoramiento de actividad y entrega de bacteriocinas mediante liposomas**

En los últimos años ha habido una tendencia general hacia una reducción de aditivos antimicrobianos sintéticos y la sustitución de éstos con alternativas de origen natural (Patrícia da Silva Malheiros et al., 2010), dando área de oportunidad a las bacteriocinas, sin embargo, como ya se señaló anteriormente estos metabolitos bacterianos pierden actividad al entrar en contacto con matrices

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

alimentarias, la aplicación de liposomas puede ayudar a superar estas desventajas, además mejorar su liberación y estabilidad.

Un ejemplo de compuestos antimicrobianos de origen natural en alimentos es el reportado por Laridi et al. (2003) que incorporaron nisina Z libre y nisina Z liposomada a un proceso de fermentación láctea en la elaboración de queso, informaron que la nisina Z liposomada pudo resistir el ciclo de temperatura sin pérdidas de actividad en comparación con el uso de nisina Z libre. En otro estudio se reporta la inclusión de nisina y lisozimas a liposomas, demostrando la eficacia en la reducción de 2 ciclos logarítmicos de concentración de microorganismos (UFC/mL) en comparación con la nisina libre (Were, Bruce, Davidson, & Weiss, 2004). También se reporta el atrapamiento de nisina con extracto de ajo en pro de demostrar un efecto sinérgico en contra de patógenos Gram positivos y negativos, demostrando que ya sea en conjunto o por separado los compuestos en liposomas muestran tener mejor actividad residual en leche que los compuestos sin protección (C. M. B. Pinilla & Brandelli, 2016).

Otra bacteriocina, pediocina AcH fue atrapada en liposomas y demostró tener un efecto antilisterial del 30 % mejor en comparación con Pediocina libre en muestras de carne, protegiendo a la bacteriocina del tratamiento térmico, así como del contacto con grasa y proteínas de la matriz (Degnan & Luchansky, 1992).

De igual manera hay estudios en donde se ocupan biopolímeros en el recubrimiento de liposomas con nisina, para mejorar la estabilidad y que su liberación sea controlada; Lopes et al. (2017) elaboraron liposomas convencionales y liposomas Stealth con ácido poligalacturónico, demostrando mejorías significativas en la inhibición de cepas de *Listeria monocytogenes*, en comparación con liposomas convencionales y sobre nisina libre, siendo la última la que mostró menor inhibición en la prueba, de igual manera demostraron que la eficiencia de encapsulado, así



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

como repulsión entre las partículas de la suspensión era mejorada significativamente con la incorporación del biopolímero, sobre el liposoma desnudo.

La eficiencia de encapsulado (E.E) así como la estabilidad de la suspensión son parámetros importantes en la fabricación de liposomas, ya que a mayor concentración de nisina encapsulada, tendremos una mayor actividad residual, por otro lado si la suspensión tiene valores de potencial Z (Indicador de estabilidad en suspensiones) no apropiados, será inestable, con tendencia a la floculación por la colisión constante de los liposomas.

En la Tabla 2 se muestran algunos estudios representativos de atrapamiento de nisina en liposomas, haciendo relevancia en sus resultados de E.E, potencial Z, PDI y tamaño, morfología y efecto antimicrobiano. Los trabajos se obtuvieron mediante búsqueda en la base de datos del Consorcio Nacional de Recursos de Información Científica y Tecnológica, CONRICYT (<https://www.conricyt.mx/>) con las palabras clave: *liposome*, *lecithin*, *bacteriocin* y *food application*, en la última década.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

**Tabla 2.** Trabajos sobre la encapsulación de nisina en liposomas, en los últimos diez años (Fuente CONRICYT)

Método de elaboración de liposomas /componente	Concentración /Agente antimicrobiano	Microorganismo indicador	Datos Relevantes	Referencia
Hidratación de la película delgada  Lecitina de soya purificada,  Quitosano  Sulfato de condroitina	10 mg/mL  Nisaplin (Danisco)	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 <i>Listeria</i> sp. str1 <i>L. innocua</i> 6a <i>L. monocytogenes</i> 4b <i>Listeria</i> sp. str2	<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) 146 L.C, 210 L.Q, 135 L.S.C</li> <li>PZ (mV) -22.46 L.C, -18 L.Q, -27 L.S.C; el autor argumenta valores de estabilidad para sus liposomas recubiertos, aunque en literatura se reportan valores de <math>\pm 30</math> para suspensiones estables</li> <li>PDI 0.149 L.C, 0.105 L.Q, 0.168 L.S.C</li> <li>E.E (cromatografía de exclusión en gel ) 90 % L.C, 67 % L.Q, 88 % L.S.C</li> <li>Todos los liposomas mostraron una actividad inicial de 3200 UA/mL, pero a T de 25°C a los 14 días, solo L.Q mantuvieron actividad de 200 UA/mL, a T de 4°C a los 14 días de evaluación la actividad se mantuvo en L.C y L.S.C con 200 UA/mL y L.Q con 400 UA/mL.</li> <li>Sus tipos de liposomas mostraron morfología esférica y cúbica por MTE</li> </ul>	(da-Silva, Boelter, da Silveira, & Brandelli, 2014)
Hidratación de la película delgada,  Lecitina de soya parcialmente purificada y colesterol	10 mg / mL  Nisaplin (Danisco)  Sustancias similares a bacteriocina (BLS) BLS 34		<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) L.C 137.7, L.C.C 218 para liposomas con nisina; para liposomas con BLS 34 L.C 163, L.C.C 158</li> <li>PZ (mV) L.C -55, L.C.C -64.2 para liposomas con nisina; para liposomas con BLS L.C -27.42, L.C.C -53</li> <li>PDI L.C 0.346, L.C.C 0.312 para liposomas con nisina; para liposomas con BLS L.C 0.218, L.C.C 0.242</li> <li>E.E (método de difusión en agar)</li> </ul>	(Malheiros Pda, Sant'Anna, Barbosa Mde, Brandelli, & Franco, 2012)

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

			<p>L.C 94.12 %, L.C.C 88.9% para liposomas con nisina; para liposomas con BLS 34 L.C 100 %, L.C.C 100 %</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Evaluó sus liposomas en quesos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> a 2.6 log CFU / g. En los primeros 5 días bajo refrigeración, los recuentos de <i>L. monocytogenes</i> en los quesos que contienen nisina libre, L.C y L.C.C ambos con nisina estaban por debajo del límite de detección (10 UFC / g). En el día 8, los recuentos estaban entre 3 y 4 log UFC / g, lo que indica que las células que resistieron la acción de la nisina comenzaron a multiplicarse después del día cinco. En el día 21 el recuento del patógeno para L.C y nisina libre fue de 7 log UFC / g y para L.C.C fue de 7.5 log UFC/ g. El control fue de 8 UFC/g. lo que dió una reducción log para L.C y nisina libre.</li> <li>Para BLS 34 en el día 5 en comparación con su control hay 5.5 log de UFC/ g 1 log UFC /g menos que su control para el mismo día, para el día 21</li> </ul>	
<p>Hidratación de la película delgada</p> <p>Fosfatidilcolina &gt; 94% de pureza</p> <p>Pectina de manzana</p> <p>Ácido poligalacturónico</p>	Nisina (2.5%)	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) para liposomas con 1% de polímero L.C 105; L.P 108; L.P.G.A 160</li> <li>PZ (mV) -17 L.C, L.P -25; L.P.G.A -17</li> <li>PDI(-)p 0.271 L.C; 0.274 L.P; 0.139 L.P.G.A</li> <li>E.E (%) 86.9 L.C;87.9 L.P; 84 L.P.G.A</li> <li>Sus liposomas mostraron una actividad inicial de 800 UA/mL para liposomas recubiertos y de 400 UA/mL para liposomas convencionales; al finalizar la prueba por 14 días, los L.C y L.P.G.A mantuvieron una actividad de 200 UA/mL mientras los L.P ya no tuvieron actividad</li> <li>Sus estructuras muestran una morfología esférica y existe un recubrimiento en la MTE sugiriendo la incorporación del polímero.</li> </ul>	(Lopes et al., 2017)
<p>Hidratación de la película delgada</p> <p>Fosfatidilcolina &gt; 94% de pureza</p>	Extracto de ajo	<p><i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644</p> <p><i>Listeria</i> sp. str1</p> <p><i>L. innocua</i> 6a</p> <p><i>L. monocytogenes</i> 4b</p> <p><i>Listeria</i> sp. str2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) 174</li> <li>PZ (mV) -16.2</li> <li>PDI(-) 0.26</li> <li>E.E (%) HPLC 47.5</li> <li>Sus liposomas obtuvieron en promedio la reducción de 2 unidades log en cepas de <i>Listeria</i> comparándolas con un control positivo de 8 log</li> </ul>	(C. M. Pinilla et al., 2017)

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

			<p>UFC/mL, y fue mejor el compuesto antimicrobiano libre en la inhibición del m.o que el encapsulado en liposomas, el autor argumenta que los liposomas pueden detener la difusión del compuesto al exterior atrapándolo en la zona lipofílica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sus estructuras son principalmente esféricas y algunas amorfas</li> </ul>	
<p>Hidratación de la película delgada y método de fase reversa</p> <p>Lecitina de soya parcialmente purificada</p>	<p>Nisina pura 0.5 mg /mL</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T.P (nm) 190 método FR, 18 método HPD con sonda de ultrasonido y 148 método HPD con baño de ultrasonido</li> <li>• PZ (mV) Entre - 55.8 y - 54.5 mV HPD con baño ultrasónico</li> <li>• PDI(-) 0.39</li> <li>• E.E (%) (Difusión en agar ) 94.12</li> <li>• Los liposomas mostraron una actividad residual de 50 % a los 6 días y de 25% a los 24 días respecto del día 1 contra el microorganismo indicador, el autor utilizo el método de difusión en agar contra 10<sup>7</sup> UFC/mL</li> <li>• Sus estructuras mostraron una morfología redonda y amorfa</li> </ul>	<p>(da-Silva-Malheiros, Serafini-Micheletto, Pesce-da-Silveira, &amp; Brandelli, 2010)</p>
<p>Hidratación de la película delgada</p> <p>Lecitina de soya parcialmente purificada</p>	<p>Bacteriocina BLS P34</p>	<p><i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T.P (nm) 160</li> <li>• E.E% (difusión en agar) 100</li> <li>• Las nano vesículas mostraron una actividad residual del 50 % después de 4 días de almacenaje contra leche entera y desgrasada, después de este periodo no hubo diferencias significativas con un periodo de almacenaje de 21 días.</li> <li>• Las vesículas mostraron mejor actividad antimicrobiana a T de 7°C en leche desgrasada, ya que hubo reducción de 4 unidades logarítmicas al día 5, en comparación con leche entera que fue de 2 unidades log, el control que fue de 8 unidades log al día 5.</li> </ul>	<p>(Patrícia da Silva Malheiros, Sant'Anna, Utpott, &amp; Brandelli, 2012)</p>
<p>Hidratación de la película delgada</p> <p>Fosfatidilcolina pura</p>	<p>Nisina Nisaplin 2.5 % 1 mg / mL de nisina pura</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Datos de liposomas con concentración de 1 mg/mL</li> <li>• T.P (nm) LLS 516.1 y LFCP 168</li> <li>• PDI(-) LLS 0.139 y LFCP 0.247</li> <li>• PZ (mV) LLS -27.74 y LFCP -4.82</li> <li>• E.E (%) (Difusión en agar )</li> </ul>	<p>(Boelter &amp; Brandelli, 2016)</p>

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

(Phospholipon®90G) y Lecitina de soya parcialmente purificada			<p>94 al 100</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Los liposomas (Phospholipon) mostraron una actividad de 9600 UA/mL al tiempo 0, a los 4 meses mostraron una actividad de 400 UA/mL. a los 5 meses una actividad de 200 UA/mL y de 100 UA/mL a los 6 meses a 4°C, evaluados contra 10<sup>7</sup> de microorganismo indicador</li> </ul>	
Hidratación de la película delgada  Lecitina de soya parcialmente purificada	Nisina nisaplin 2.5%	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) 140</li> <li>E.E (%) 100</li> <li>Las vesículas mostraron una disminución de 2 unidades logarítmicas con respecto al control al día 28, mostrando un efecto bacteriostático, la nisina libre tuvo un efecto bactericida ya que en el día 7 no se detectaron bacterias, el autor argumenta que la nisina al ser un péptido anfifílico, queda disuelto en la parte hidrofílica y al querer movilizarse, se queda atrapada en la membrana, dejándola no disponible.</li> </ul>	(Malheiros, 2012)
Lecitina de soya Lecitina marina Proliposome (fosfolípidos) técnica de disruptor celular constante	Nisina Z (3.8 / 10 <sup>4</sup> I.U.)	<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 82110	<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) 150 a 275 dependiendo del número de ciclos en disruptor y presiones utilizadas</li> <li>PZ (mV) -22.46 L.C, -18 L.Q, -27 L.S.C; el autor argumenta valores de estabilidad para sus liposomas recubiertos, aunque en literatura se reportan valores de ± 30 para suspensiones estables</li> <li>PDI 0.149 L.C, 0.105 L.Q, 0.168 L.S.C</li> <li>E.E (cromatografía de exclusión en gel) 90 % L.C, 67 % L.Q, 88 % L.S.C</li> <li>Los liposomas muestran mejor actividad antibacteriana en una mezcla de nisina libre y encapsulada, que nisina libre o completamente encapsulada, argumentando que la nisina libre controla el crecimiento inicial de la bacteria, posterior los liposomas liberan la nisina encapsulada inhibiendo el crecimiento bacteriano.</li> <li>La morfología de sus liposomas es predominantemente esférica y según el autor son vesículas multilamelares, obtenidas mediante MTE</li> </ul>	(Imran et al., 2015)
Lecitina de soya parcialmente purificada	Pediocina ALTA TM 2345	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<ul style="list-style-type: none"> <li>T.P (nm) Valores de 190 a 210</li> <li>PZ (mV) -44 a -42</li> <li>PDI</li> </ul>	(de Mello et al., 2013)

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

<p>Hidratación de la película delgada</p>			<p>0.201</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• E.E (Difusión en agar ) 80</li> <li>• Los liposomas con pediocina a las 48 h mostraron una cuenta viable de 6 log y la Pediocina libre de 7 log, al final del estudio no hubo diferencias significativas entre la Pediocina libre y la encapsulada, el autor argumenta que la pediocina fue liberada gradualmente desde los liposomas. Por otra parte menciona que después de 13 días de almacén tanto la Pediocina libre y encapsulada mantienen un 50% de su actividad inicial. Reporta una actividad antimicrobiana de 800UA/mL</li> <li>• El autor menciona que logro morfologías esféricas y homogéneas, aglomeradas. Mediante MTE</li> </ul>	
<p>Lecitina de soya Fosfatidilcolina Emulsión por sonicación</p>	<p>Pediocina de <i>Pediococcus pentosaceus</i> 34</p>	<p><i>Listeria innocua</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T.P (nm) De 161 a 284 dependido de la concentración de lípido, amplitud y tiempo de sonicación</li> <li>• Los liposomas de lecitina y Pediocina libre a las 12 h mostraron una reducción de 2 unidades log de listeria en comparación del control, los liposomas de Fosfatidilcolina mostraron una reducción de 3 unidades log al mismo tiempo; a las 24 h los liposomas con lecitina y la pediocina libre mostraron 8 unidades log, los liposomas de Fosfatidilcolina mostraron 7 unidades log, el control mostro 10unidades log, a las 72 h los liposomas con lecitina, Fosfatidilcolina y Pediocina libre mostraron 9 unidades log y el control exhibió 10.5 unidades log, el autor menciona que los liposomas elaborados con Fosfatidilcolina inhiben desde el inicio del experimento hasta un tiempo de 36 h, posteriormente su efecto es similar a los liposomas de lecitina y Pediocina libre</li> </ul>	<p>(Narsaiah, 2013)</p>
<p>Lecitina de soya parcialmente purificada Hidratación de la película delgada</p>	<p>Nisina Nisaplin 2.5%</p>	<p><i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T.P (nm) 140</li> <li>• PZ (mV) -55</li> <li>• E.E (%) 94</li> <li>• Los liposomas y la nisina libre mostraron una actividad inicial de 1600 UA/mL, pero la nisina libre fue eficiente mostrando efecto bactericida en comparación con los liposomas que ejercieron un efecto bactericida al principio y bacteriostático hasta las primeras 20 h, la cuenta inician de <i>Listeria</i> con nisina libre fue indetectable y se mantuvo así todo el</li> </ul>	<p>(P. da Silva Malheiros, Daroit, da Silveira, &amp; Brandelli, 2010)</p>

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

			<p>experimento, por otra parte los liposomas mostraron límites indetectables de listeria, pero pasadas 24 h, hubo un crecimiento de 5 unidades Log y en 48 h el crecimiento fue igual que el control, el autor argumenta que existe interacción electrostática entre la nisina y la membrana lipídica, impidiendo que toda la nisina migre y logre un efecto bactericida.</p>	
<p>Fosfatidilcolina Método de agitación y ultrasonido</p>	<p>Nisina Z 90% de pureza</p>	<p><i>L. monocytogenes</i> <i>E. faecalis</i> <i>S. aureus</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T.P (nm) 54 a 108 nm</li> <li>• EE (%) Densidad óptica LC 56 L.Q 86</li> <li>• Los liposomas mostraron ser eficientes en el control de <i>S. aureus</i> a una concentración de 5 ug/ml, comparado con nisina libre 10ug/mL, los liposomas con quitosano demostraron ser más eficientes que los LC a la misma concentración ya que muestran densidades ópticas de 0.8 y 0.5 respectivamente comparadas con el control positivo de 1.6, el autor argumenta que posiblemente existe un efecto sinérgico, además de las propiedades antimicrobianas ya conocidas del biopolímero, de igual manera se lo atribuye a la mayor % de nisina atrapada en el núcleo del LQ.</li> <li>• En el control de <i>L. monocytogenes</i> con LC no mostró una actividad inicial, fue hasta el día 3 que disminuyó el crecimiento bacteriano, demostrando la formación de poros en la membrana lipídica, aunque su actividad no es muy eficiente debida a la baja carga de los liposomas; con LQ mostraron actividad al igual que la nisina libre aunque con la mitad de concentración de nisina 25 ug/mL y 50 ug/mL respectivamente.</li> <li>• En el control de <i>E. faecalis</i> LC mostraron un control bajo de este patógeno, aunque los LQ mostraron mejor actividad que la nisina libre y LC, los LQ mostraron control del patógeno después del día 4, los LQ fueron 2 veces más efectivos que la nisina libre a la misma concentración</li> <li>• Mediante TEM el autor menciona una morfología redonda y lisa, en LC y LQ; además menciona un revestimiento en LQ, y se lo atribuye al quitosano.</li> </ul>	<p>(Niaz et al., 2018)</p>
<p>Lecitina de soya 20% -4% colesterol Hidratación de la película delgada</p>	<p>Nisina</p>	<p><i>L. monocytogenes</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T.P (nm) 134 L.C, 149 L.S</li> <li>• PZ (mV) -37 L.C, -44 L.S</li> <li>• PDI (-) 0.245 L.C y 0.293 L.S</li> </ul>	<p>(Cui, Wu, Li, &amp; Lin, 2016)</p>

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• E.E (ensayo de ácido bicinconírico) 53.6 % L.C, 75.7 L.S</li> <li>• Los autores realizaron el mismo experimento a 4 y 25 °C; a T de 25 °C reportaron unidades log de 7.33, 4.85, 5.59 y 4.78 para el control, nisina libre LC y LS respectivamente, al día 4 reportaron 7.58, 6.83, 6.76 y 5.34 para el control, nisina libre LC y LS respectivamente haciendo mención que LS demostraron ser más eficaces en el control del patógeno, al menos 2 unidades log respecto al control y 1 unidad log en comparación con LC, al día 7 no había diferencias entre el control y la nisina libre con 8 unidades log, mientras tanto LC tuvo 7 unidades log y LS fue de 5.48 unidades log.</li> <li>• A 4°C en el día 6 la nisina libre se mostraba igual que el control positivo con 5 unidades log, mientras tanto LC tenía 4.52 y LS 3.96 unidades log, mencionando que la nisina encapsulada mantuvo mejor control del patógeno, al día 10 los LS seguían con menor cuenta log 4.36 mientras LC fue de 5.41, la nisina libre ya no mostró actividad y fue similar al control, los datos se mantuvieron hasta el día 14 con 6.88, 6.48, 5.83 y 4.48 para el control, nisina libre, LC y LS respectivamente.</li> </ul>	
--	--	--	--	--

Abreviaciones:

T.P tamaño de partícula; nm nanómetros; mV milivolts; L.C liposomas convencionales; L.Q liposomas cubiertos con quitosano; L.S.C liposomas cubiertos con sulfato de condroitina; PZ potencial Z; PDI índice de polidispersión; E.E eficiencia de encapsulamiento; TEM microscopia de transmisión electrónica; UA unidades arbitrarias; mL mililitros; L.P.G.A liposomas con recubrimiento de ácido poligalacturónico; L.P liposomas con recubrimiento de pectina; HPD hidratación de la película delgada; FR fase reversa; liposomas de lecitina LLS; Liposomas de fosfatidilcolina pura LFPC; liposoma con silica, LS.



## 2.8 Biopolímeros ocupados en el recubrimiento de liposomas

Entre los diferentes polímeros investigados en el área de farmacia, en el intento de mejorar propiedades de estabilización estérica, se han reportado trabajos con recubrimiento de polietilenglicol (PEG), esto por su facilidad de incorporarse de distintas maneras a los liposomas, su biocompatibilidad, solubilidad en medios acuosos y orgánicos, no toxicidad, y muy baja inmunogenicidad así como buena cinética de excreción (Immordino et al., 2006). De igual manera existen estudios donde reportan el uso de polímeros sintéticos, como polivinilpirrolidona (PVP), poliácridamida (PAA) y polivinilalcohol (PVA) (Frenzel & Steffen-Heins, 2015; Immordino et al., 2006).

Pocos estudios en el uso de biopolímeros se han realizado para liposomas cubiertos destinados a la industria alimentaria, entre estos polímeros tenemos las proteínas de soya, ácido poligalacturónico, alginato, quitosano, pectinas (da-Silva et al., 2014; Frenzel, Krolak, Wagner, & Steffen-Heins, 2015; Lopes et al., 2017). Estos esfuerzos se suman a la idea de liposomas Stealth, para la entrega de compuestos de interés, además el recubrimiento brindará estabilidad estérica, mejorará su liberación y brindará protección al compuesto de interés (Gomaa, Martinent, Hammami, Fliss, & Subirade, 2017; Woodle & Lasic, 1992).

Para que un polímero pueda ser utilizado como recubrimiento debe cumplir con ciertos parámetros, como tener buenas propiedades de solubilidad, ser hidrofílicos, tener cadenas flexibles, no ser tóxicos, ser biodegradables y biocompatibles (da-Silva et al., 2014; Frenzel & Steffen-Heins, 2015; Lopes et al., 2017).

Para fines prácticos, en este trabajo hablaremos solo de los biopolímeros de interés, pectina y quitosano.

### 2.8.1 Pectina

Su nombre proviene de la palabra griega 'pektos', que significa firme y duro, la pectina se considera como un ingrediente alimentario seguro: de acuerdo con la regulación de la Unión Europea (EC 1333/2008). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés) lo reconoce como GRAS. Está compuesta principalmente por cadenas de  $\alpha$ -(1-4)-D-ácido galacturónico, el cual es parcialmente sustituido por residuos de ramnosa, en las cadenas laterales están presentes azúcares neutros, los cuales se enlazan a la estructura principal (De Cindio, Gabriele, & Lupi, 2016).

La pectina para uso en alimentos se define como un polímero que contiene unidades de ácido galacturónico (al menos 65%). Los grupos ácidos pueden estar libres, combinados como un éster metílico, o como sales de sodio, potasio, calcio o amonio, y en algunas pectinas también pueden estar presentes grupos amida.

Dentro de la estructura se conocen 2 regiones (International Pectin Producers' Association, IPPA; (<https://ippa.info/index.htm>))

- Región lineal o de ácido homogalacturonano: En esta zona se encuentran moléculas de ácido galacturónico, las cuales se enlazan por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -D-(1,4).
- Región ramificada o región velluda: son bloques que contienen muchas moléculas neutras de azúcar (ramnosa, galactosa, arabinosa y cantidades menores de otros azúcares) consiste de tres subunidades: Ramnogalacturonano I, Arabinogalactano y Xilogalacturonano.

### 2.8.1.1 Tipos de pectina

La pectina se puede clasificar dependiendo de su grado de metilación:

Si poseen la mayoría de los grupos carboxilo esterificados, normalmente entre el 50% al 80%, se le considera de alto metoxilo, la mayoría de grupos ácidos no están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes, estas pectinas no forman geles de esta manera, por el contrario necesitan presencia del 55 al 65 % de azúcar para formar un gel.

Las pectinas que poseen la mayoría de los grupos carboxilo libres, menos del 50%, son consideradas de bajo metoxilo, sus grupos están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes como el calcio. En este caso la formación del gel ocurre por la formación de enlaces entre los iones calcio con moléculas de pectina, formando una red tridimensional con los grupos carboxilo de ésta.

La gran ventaja de usar pectina en el desarrollo de nanopartículas, se basa en sus atractivas propiedades tales como biodegradabilidad, actividad biológica controlable y cadenas flexibles que permiten la modulación del polisacárido a una forma específica (da Silva et al., 2014).

Al ser un polisacárido de carácter aniónico podría impartirle características de repulsión entre los liposomas, además de contribuir al estudio de este polímero como recubrimiento para liposomas.

### 2.8.2 Quitosano

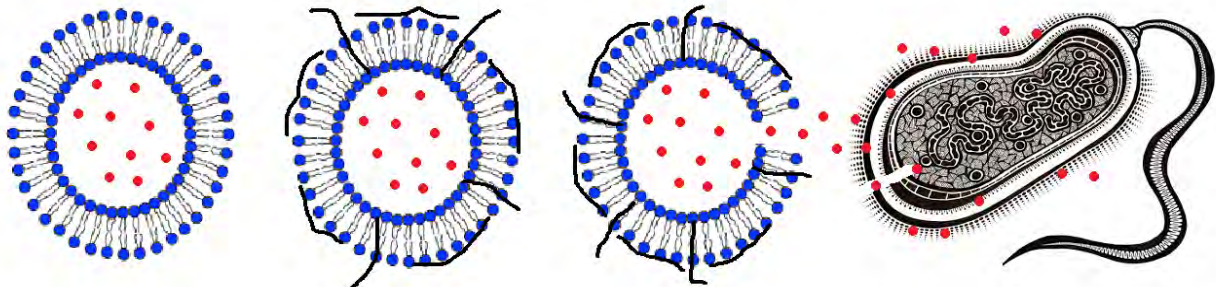
La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, si bien este proceso nunca llega al 100%, es por ello que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucosa (Aranaz et al., 2009).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

El quitosano exhibe propiedades interesantes para la fabricación de películas y recubrimientos (por lo tanto puede utilizarse también como base para encapsular diversos compuestos); además, presenta actividad antimicrobiana inherente contra diversos patógenos. Por las razones anteriores es que el quitosano sigue siendo estudiado con diversas posibilidades de aplicación: Aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos), agricultura, biosensores, clarificación de jugos, emulsificación, entre otras (Fernández-Saiz, 2012).

### 3 Justificación

Debido a que el crecimiento y proliferación de microorganismos son la principal causa de deterioro en los alimentos, la creciente preocupación del consumidor por la relación entre enfermedades y aditivos sintéticos, la creciente demanda de productos seguros, saludables y naturales; por lo tanto, el presente trabajo se suma al uso de la bioconservación en la sustitución de aditivos sintéticos por bacteriocinas, particularmente nisina, para el control de bacterias indeseables; sin embargo, en respuesta a la disminución de actividad antimicrobiana de nisina al contacto con matrices alimentarias, se propone su encapsulación en liposomas, para protegerla de ambientes adversos; además, estos liposomas pueden ser del tipo *Stealth* para mejorar su eficiencia de encapsulado, estabilidad y liberación de nisina, específicamente mediante la incorporación de biopolímeros como pectina y quitosano.



**Figura 12.** Liposomas Stealth en el control de microorganismos patógenos.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Encapsular nisina en liposomas de lecitina de soya parcialmente purificada, recubiertos con biopolímeros, pectina y quitosano, y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas, antimicrobianas y morfología.

### 4.2 Objetivos específicos

- Encapsular nisina en liposomas de fosfatidilcolina, recubiertos con pectina o quitosano, y caracterizarlos en lo siguiente:
  - Determinación de Tamaño de partícula, Índice de Polidispersión y Potencial Z
  - Morfología, mediante Microscopia de Fuerza Atómica (MFA).
  - Estabilidad y actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en un alimento modelo.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

## 5 Hipótesis

La encapsulación de nisina en liposomas recubiertos con pectina o quitosano, permitirá la liberación controlada y sostenida del antimicrobiano, además el recubrimiento biopolimérico proporcionará mayor estabilidad a la bacteriocina y aumentará la eficiencia de encapsulación, protegiendo la nisina de los componentes presentes en matrices alimentarias, permitiendo la potencial aplicación de estos productos en la bioconservación de alimentos susceptibles de contaminación por bacterias patógenas y/o deterioradoras.

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Microorganismos indicadores

En este estudio se usó como microorganismos indicadores a *L. monocytogenes* (CFQ-B103) y *S. aureus* (ATCC-25923) donados por la Dra. Gloria Díaz Ruiz del cepario de la Facultad de Química, UNAM. Las bacterias se conservaron a -80 °C en viales de 1.5 mL, los cuales contenían 0.3 mL de glicerol y 1.3 mL de caldo de fermentación del microorganismo indicador crecido en caldo BHI.

#### 6.1.2 Medios de cultivo

Para la preparación de viales de conservación, activación de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, para la prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la prueba de actividad antimicrobiana (difusión en agar por gota), y la prueba del pozo profundo se utilizó Infusión Cerebro Corazón (BHI) (BD Bioxon, Lote 6321510, México), de igual manera se utilizó extracto de carne (DIBICO, Lote 6934105, México) para la prueba de actividad antimicrobiana para simular una matriz compleja, el agar ocupado en la prueba de actividad antimicrobiana y prueba de pozo profundo para preparar BHI suave (1.5% p/v caldo BHI; 0.8 % p/v bacto-agar (BDTM DIFCO, Lote, 0189501, Francia)).



### **6.1.3 Biopolímeros, lecitina y agente antimicrobiano**

Pectina cítrica (GENU Pectin, Grado de Esterificación =34.5%, CP- KELKO, Lote GR61412, E.U.A), quitosano de cáscara de camarón grado práctico (Sigma-Aldrich, Lote 061M0046V, Islandia), lecitina de soya (Reasol, Lote 17125, México), L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de soya (Sigma-Aldrich, Lote CV8971H, E.U.A) como estándar, y nisina (Nisaplin DANISCO, Lote 4262745585, México).

### **6.1.4 Buffers de fosfatos y de acetatos**

Para la preparación de buffers de fosfatos 0.01 mol/L y 0.001 mol/L ambos pH 7 se utilizó fosfato de potasio dibásico (J.T. Baker, Lote X06C14, México,) y fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker, Lote B36C10, México) ambos en cristales. Para la preparación de buffer de acetato salino 0.02 mol/L pH 7 conteniendo 0.1 mol/L de cloruro de sodio (J.T.Baker, Lote V41C63, México) se utilizó ácido acético glacial (J.T.Baker, Lote V14L31, México), acetato de sodio (Meyer, PO513214, México) en cristales.

### **6.1.5 Soluciones de nisina, pectina, quitosano y piraña**

En cada experimento se preparó un lote de nisina 20,000 UI/mL disuelto en buffer de fosfatos 0.01 mol/L pH 7, la mezcla se sometió a diálisis en membranas de celulosa de 1 kD (Spectra/Por® 7) por 18 h a temperatura de refrigeración con agitación a nivel 4 (Cimarec, Thermo scientific, E.U.A), posteriormente se colocaban en tubos de 2 mL (Eppendorf ®) los cuales se conservaron en refrigeración hasta su uso; se hacían las diluciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas usando el mismo buffer, para cada experimento.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

La solución de pectina 1% p/v se realizó con agua grado HPLC (J.T. Baker, Lote V18C12, México), con agitación nivel 3 a 35° C (Cimarec, Thermo scientific, E.U.A) por 30 min, para la preparación de la solución de quitosano ésta se disolvió en buffer de acetatos salino 0.02 mol/L pH 4.5 con agitación por 3 h a temperatura ambiente. Las soluciones fueron filtradas (MILLEX® GV, 0.45 µm) para retirar impurezas.

Para la preparación de la solución piraña se utilizó peróxido de hidrógeno (Meyer, Lote L5215563, México) y ácido sulfúrico (J.T. Baker, Lote B12F43, México)

#### **6.1.6 Fases móviles para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Para la preparación de fases para pruebas en HPLC se utilizó acetonitrilo (ACN) (J.T. Baker, Lote X29C60, E.U.A), Agua HPLC (J.T. Baker, Lote V18C12, México) y ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich, Lote SHBD4322V, E.U.A).

#### **6.1.7 Solventes para purificación de lecitina de soya y preparación de liposomas**

Para la purificación de lecitina de soya se utilizó acetato de etilo (J.T. Baker, Lote V49C75, México), Acetona (J.T. Baker. Lote V43C71, E.U.A.) y para preparación de liposomas se utilizó cloroformo (Meyer, Lote U1117582, México)

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Purificación de lecitina de soya para la obtención de fosfatidilcolina (PC)

Muestras de 10 g de lecitina de soya se mezclaron con 50 mL de acetato de etilo y se dejó en una placa de calentamiento (Cimarec, Thermo scientific, E.U.A) con agitación nivel 8, por 18 h y en refrigeración (8 °C), transcurrido el tiempo se decantó el acetato de etilo y se agregó otro volumen por 10 min con mismo nivel de agitación, transcurrido el tiempo lentamente se agregaron 3 mL de agua destilada, resultando la formación de 2 fases, la fase superior fue separada de la inferior y se descartó, la fase inferior que tenía un aspecto de gel se disolvió en 20 mL de acetona, formando aglomerados, los cuales se rompieron con una barra de vidrio, posteriormente la acetona fue separada por decantación y se agregó otra alícuota de acetona (20 mL), repitiendo el mismo proceso, hasta la obtención de un polvo fino, el cual fue filtrado y etiquetado como PC-1; para lograr una muestra más pura, se sometió de nuevo a los lavados de acetona repitiendo el proceso, la muestra con doble lavado de acetona se etiquetó como PC-2 de igual manera la muestra que se sometió a tres lavados de acetona se etiquetó como PC-3, todas la muestras se almacenaron en un desecador y se mantuvieron protegidas de la luz y a un vacío de 60 kPa. Se obtuvo un rendimiento de 6.4 g, 6.1 g y 5.8 g de muestra por cada 10 g de lecitina, respectivamente. Posterior se realizaron comparaciones de los espectros FT-IR entre un estándar de fosfatidilcolina y de las muestras purificadas. En la Figura 13 se muestra el procedimiento general para la purificación de lecitina.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



10 g de lecitina



Lavado con acetato de etilo



Lavado con acetona



Filtrado



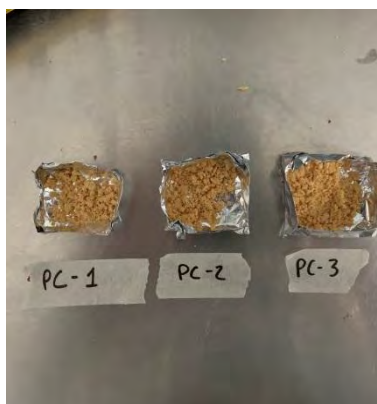
Obtención de polvo



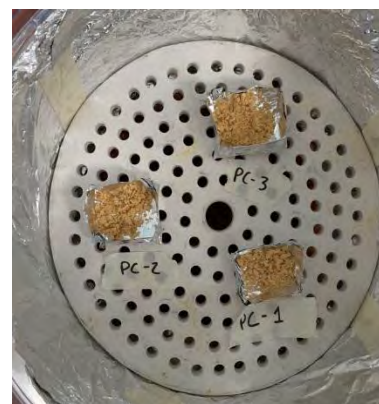
Secado



Recuperación



Identificación



Almacenamiento en desecador al vacío

**Figura 13.** Procedimiento general en la purificación de lecitina de soya y obtención de fosfatidilcolina.

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

**6.2.2 Producción de liposomas por método de hidratación de película delgada**

Para la producción de liposomas se siguió la metodología descrita por da-Silva-Malheiros et al. (2010) con algunas modificaciones; se pesaron 80 mg de PC-2 y se disolvieron con 10 mL de cloroformo, la mezcla se rotaevaporó (BUCHI, R-215, Alemania) a 90 rpm, siguiendo las indicaciones del equipo para la evaporación de cloroformo, evitando la formación de burbujas, liberando la presión manualmente cada que se requería, hasta la formación de una película en las paredes del matraz (Figura 14); el matraz se colocó en un horno (Instrument Inc, LAB-LINE, 3618, E.U.A.) a 30 °C, con vacío de 60 kPa por 18 h para eliminar trazas del solvente.



80 mg PC-2



Disolución con cloroformo



Evaporación solvente



Formación de película lipídica

**Figura 14.** Formación de película lipídica en paredes de matraz.



## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Transcurrido el tiempo la película se rehidrató con 10 mL de buffer de fosfatos (10 mM) a pH 7 con nisina 10,000 UI/mL, esto para liposomas convencionales; para los liposomas *Stealth* se utilizaron 5 mL de solución de nisina 20,000 UI/mL disuelta en buffer de fosfatos 10 mM pH 7, los liposomas se sometieron a 5 ciclos de agitación y calentamiento, 1 min en Vortex y 2 min con agitación nivel 4 con agitador magnético (8.36 mm × 22.44 mm), a 60°C en baño maría por 2 min; esto para favorecer la temperatura de transición de lípidos, terminados los ciclos de agitación y calentamiento, es cuando se agregaron 5 mL de biopolímero a distintas concentraciones 1.0 mg/mL (Pectina o Quitosano) para liposomas *Stealth*; luego la muestra se sometió a sonicación por 30 min en un baño ultrasónico (BRANSONIC, CPX5800H, E.U.A) (Figura 16), cuidando que la muestra se mantuviera a 25 °C con un recirculador (Julabo, F 33, Alemania), terminado el tiempo de sonicación los liposomas se filtraron (MILLEX® GV, 0.22 µm) en condiciones asépticas. En la Figura 15 se observa el procedimiento en la elaboración de liposomas.



**Figura 15.** Procedimiento general para elaboración de liposomas con nisina.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Para la elaboración del blanco se siguió la misma metodología pero solo con buffer de fosfatos 10 mM. La concentración final de nisina de los liposomas convencionales y *Stealth* fue de 10,000 UI/mL.

### 6.2.3 Caracterización de liposomas

Se evaluaron distintos tiempos de ultrasonificación 10, 20, 30, 40 y 50 min en un baño ultrasónico (BRANSONIC, CPX5800H, E.U.A) sobre liposomas vacíos y liposomas con nisina, para obtener un tamaño de partícula deseado.



**Figura 16.** Baño de ultrasonido BRANSONIC CPX5800H, ocupado para la reducción en tamaño de liposomas.

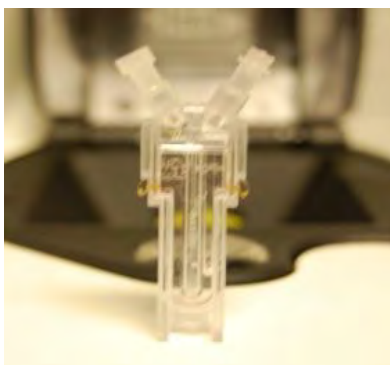
El diámetro medio y la distribución del tamaño de partícula (PDI) de los liposomas fueron determinados con base en la dispersión dinámica de luz (DLS), para el potencial Z se fundamentó en electroforesis de laser Doppler. Las mediciones se hicieron automáticamente mediante un Zetasizer Nano-ZS (Figura 17) (Zen 3600, Malvern Instruments, Reino Unido).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 17.** Zetasizer Nano-ZS modelo Zen 3600, ocupado para mediciones de potencial Z, PDI y tamaño de liposomas.

Las muestras (2 mL) fueron colocadas en cubetas cilíndricas verticales para determinar tamaño de partícula y PDI, para potencial Z se utilizaron celdas capilares plegadas (1.5 mL) (Figura 18), todas las mediciones a 25 °C; la intensidad de dispersión de luz se midió a un ángulo de dispersión de 173° relativo a la fuente, antes de cada medición las muestras fueron diluidas (1:100) en buffer de fosfatos 1mM.



**Figura 18.** Celdas capilar plegada desechable, para medición de potencial Z de liposomas.



#### **6.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de nisina contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.**

Se activaron cultivos de *L. monocytogenes* y *S. aureus* al 1% en caldo BHI, se incubó a 35 °C (RIOSSA, EC-33, E.U.A) por 24 h, posteriormente, de este cultivo se inóculo al 1% otro volumen de caldo BHI, y se incubó a 35°C por 6 h, para obtener un cultivo de  $8.5 \times 10^8$  UFC/mL, luego se realizaron diluciones con caldo BHI hasta tener  $10^5$  UFC/mL.

- Preparación de la solución de nisina

Se hicieron diluciones de nisina previamente dializada, en buffer de fosfatos 10 mM de 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240 UI/mL para *L. monocytogenes* y de 280, 290, 300, 310, 320, 330 y 340 UI/mL para *S. aureus*.

- Técnica empleada

De cada microorganismo se preparó una suspensión y se realizaron diluciones con caldo BHI hasta tener  $10^5$  UFC/mL. Se utilizaron placas ELISA (CORNING® Costar®) estériles de fondo redondo y 96 pozos, 8 filas de la A a la H y 12 columnas numeradas. Se siguió la metodología de (Rivera-Hernández, 2017; Trejo-González, 2016; Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008) con algunas modificaciones.

Para la determinación de la CMI de *L. monocytogenes* del pozo A1 al A3 se colocaron 220 µL de caldo BHI estéril como control de esterilidad de caldo BHI (control negativo). Del pozo B1 a B3 se colocaron 170 µL de BHI estéril más 50 µL de suspensión bacteriana ajustada (control positivo de crecimiento bacteriano). En los pozos C1 a C3 se colocaron 120 µL de caldo BHI y 50 µL de solución de nisina 150 UI/mL, de forma similar se adicionó en los pozos D1 al D3, E1 al E3, F1 al F3, G1 al G3, H1 al H3 y A5 al A7 a concentraciones de 160, 170, 180, 200, 220 y 240 UI/mL respectivamente, finalmente se añadieron en todos los pozos 50 µL de

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

suspensión bacteriana con excepción a los controles positivo y negativo. Para mezclar el contenido de los pozos se pipeteó (sube-baja) cada pozo con una punta diferente y estéril. Las placas fueron incubadas a 35°C por 24 h, cada pozo tuvo un volumen de líquido de 220 µL.

Para la determinación de la CMI para *S. aureus* se realizó el mismo procedimiento que para *L. monocytogenes*, con la diferencia en las soluciones de nisina, en los pozos C1 a C3 se colocaron 120 µL de caldo BHI y 50 µL de solución de nisina a 280 UI/mL, de forma similar se adicionó en los pozos D1 al D3, E1 al E3, F1 al F3, G1 al G3, H1 al H3 y A5 al A7 a concentraciones de 290, 300, 310, 320, 330 y 340 UI/mL respectivamente.

**Tabla 3.** Distribución de placa de Elisa para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los microorganismos indicadores.

Concentración de nisina (UI/mL) <i>L. monocytogenes</i> / <i>S. aureus</i>	Pozo	1	2	3	4	5	6	7	Concentración de nisina (UI/mL) <i>L. monocytogenes</i> / <i>S. aureus</i>
Sin nisina	A	C+ 220 µL BHI	C+ 220 µL BHI	C+ 220 µL BHI	E S P A C	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	240 / 340
Sin nisina	B	C- 170 µL BHI + 50 µL m.o	C- 170 µL BHI + 50 µL m.o	C- 170 µL BHI + 50 µL m.o					

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

150 / 280	C	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	I O				
160 / 290	D	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o					
170 / 300	E	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o					
180 / 310	F	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o					
200 / 320	G	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o	120 µL BHI + 50 µL nisina + 50 µL m.o					
220 / 330	H	120 µL BHI + 50 µL nisina	120 µL BHI + 50 µL nisina	120 µL BHI + 50 µL nisina					

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

		+ 50 μL m.o	+ 50 μL m.o	+ 50 μL m.o					
--	--	----------------	----------------	----------------	--	--	--	--	--

- Lectura de absorbancia para determinación de la CMI

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó por lecturas de absorbancia de las placas ELISA, a 545 – 630 nm en el lector de ELISA (AWARENESS, Stat Fax-2100) a las 0, 20 y 24 h de incubación. Entre cada medición, mediante agitación suave con puntas estériles, se homogenizó cada pozo debido al sedimento formado por el crecimiento de los microorganismos.



**Figura 19.** Lector de ELISA AWARENESS, Stat Fax-2100 utilizado para la medición de absorbancia en la determinación de la CMI.

### 6.2.5 Evaluación de la estabilidad y actividad antimicrobiana de los liposomas

La estabilidad de liposomas y su actividad antimicrobiana se evaluó mediante el uso de la técnica del pozo profundo según Zou, Lee, Seo, and Ahn (2012), con ciertas modificaciones. Se utilizaron liposomas con 10,000 UI/mL y nisina libre a la misma

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

concentración, como blanco se usaron liposomas vacíos, así como agar BHI con extracto de carne al 1% como alimento modelo; se realizaron pruebas a temperatura de refrigeración, usando tubos Eppendorf de 2 mL con 500  $\mu$ L de agar colocándoles 500  $\mu$ L de suspensión de liposomas o solución de nisina. La actividad antimicrobiana y la estabilidad se midió por 8 días.

La actividad antimicrobiana se determinó a los días 0, 2, 4, 6 y 8 por medio del método de difusión por gota en agar según la metodología de Trejo-González (2016) con ciertas modificaciones; primero se midieron 400  $\mu$ L de suspensión de cada tipo de liposoma así como de nisina y se colocaron en tubos Eppendorf, para luego someterlos a un estrés térmico de 50 °C por 30 min para liberar la nisina encapsulada (Figura 20).

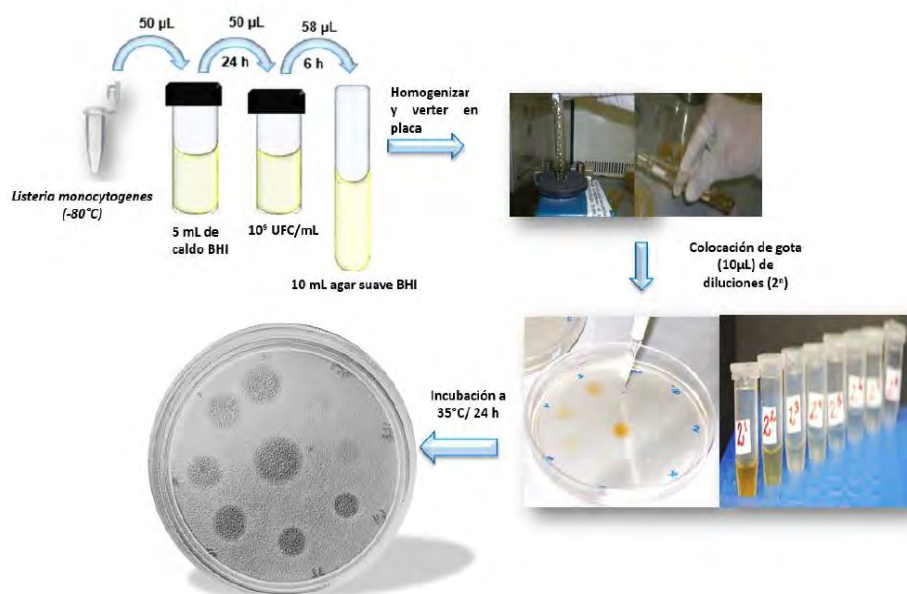


**Figura 20.** Estrés térmico a liposomas para liberar nisina encapsulada, previo a su evaluación de actividad antimicrobiana.

Posterior se realizaron diluciones base 2 (Figura 21), hasta 2<sup>8</sup> usando tubos de 2 mL (Eppendorf) estériles previamente llenados con 400  $\mu$ L de buffer de fosfatos; luego se depositaron gotas de 10  $\mu$ L de cada dilución sobre agar BHI suave previamente inoculado con  $8.5 \times 10^5$  UFC/mL del microorganismo indicador. Las cajas se dejaron en reposo en una campana de flujo laminar durante 20 min y luego se incubaron a 35°C por 24 h.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

La actividad antimicrobiana se reportó en unidades arbitrarias (UA) por mL. Se consideró una actividad unitaria (i.e., 1 UA) en la máxima dilución a la cual se obtiene un halo claro de inhibición del microorganismo indicador probado (Nuñez, Tomillo, Gaya, & Medina, 1996).



**Figura 21.** Procedimiento para la realización de la prueba de difusión en agar por gota. Tomado de Trejo-González (2016).

Para determinar la estabilidad fisicoquímica de los liposomas en el tiempo, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de suspensiones liposomales, evaluándose tamaño de partícula, PDI y potencial Z, de acuerdo con los métodos de la sección 6.2.3.

### **6.2.6 Eficiencia de encapsulación (E.E) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

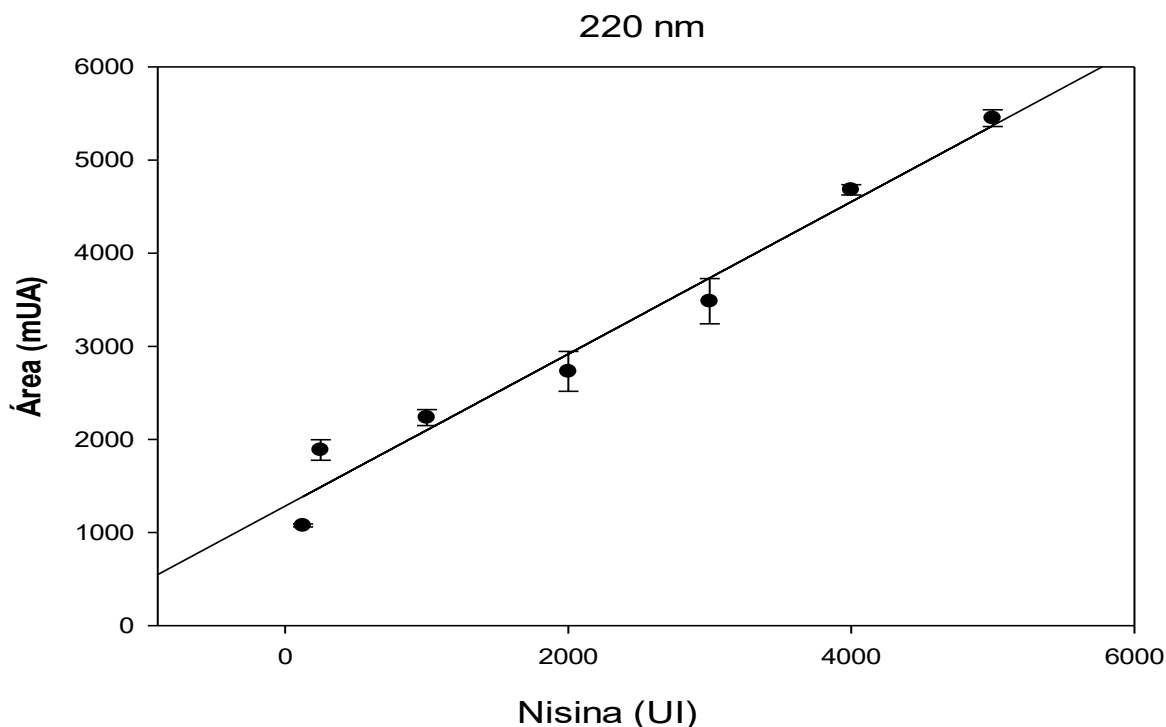
- Preparación de muestra de nisina para curva estándar

Se siguió la metodología propuesta por (Rivera-Hernández, 2017; Wilson-Stanford et al., 2009) con algunas modificaciones. Se pesaron 500 mg de formulación de nisina, se disolvieron y aforaron a 10 mL en buffer de fosfatos 10 mM; luego se dializaron volúmenes de 10 mL en membranas de celulosa (Spectra/Por® 7, MWCO: 1 kD, Lote 3286468, E.U.A) en frascos KIMAX con 2 litros de agua filtrada (Barnsted MicroPure ST, Germany) con recambios de agua cada 9 h, por 18 h en refrigeración; posteriormente la muestra se sonicó durante 20 min (BRANSONIC, CPX5800H, E.U.A), cuidando que no se sobrecalentara con ayuda de un baño recirculador (JULABO, F33, Alemania) y se centrifugó (Thermo scientific, Sorvall ST16R, E.U.A) a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se filtró (PALL, Acrodisc®, 0.45µm), se colocó en tubos de 2 mL (Eppendorf®) y se colocaron en congelación hasta su posterior uso.

- Inyección para curva estándar

La solución madre tratada se colocó en viales para HPLC y se inyectaron diferentes volúmenes con masas de 125 a 5,000 UI de nisina (Tabla 4), por triplicado, en HPLC (Agilent Technologies, 1260 Infinity), columna (Phenomenex ultremex 5 C-18, 250×10 mm) a 40°C. Entre cada muestra inyectada se realizó 2 lavados de la columna con 1 mL de ACN. Para la inyección y lavado de la columna se siguió el protocolo descrito en la Tabla 5. En la Figura 22 se observa la curva obtenida para de nisina cuantificada a una absorbancia de 220 nm.

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 22.** Curva de calibración de nisina a 220 nm.

Se prepararon dos fases móviles: fase A, 99.9% ACN y 0.1 TFA y fase B, 99.9% Agua y 0.1% TFA, ambas fases se filtraron (Agilent Technologies, filtro de membrana de nylon, 0.45  $\mu\text{m}$ ) y se sonicaron (BRANSONIC, CPX5800H, E.U.A) por 30 min, la temperatura de la columna en HPLC fue 40°C. Se usó el detector de arreglo de diodos (DAD) y las lecturas se realizaron a 220 nm. En trabajos anteriores (Rivera-Hernández, 2017) ya se había determinado un tiempo de elución de nisina en 40 min para la misma muestra de nisina comercial, por lo cual ya no fue necesario determinar tiempos de elución y colección de fracciones.



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

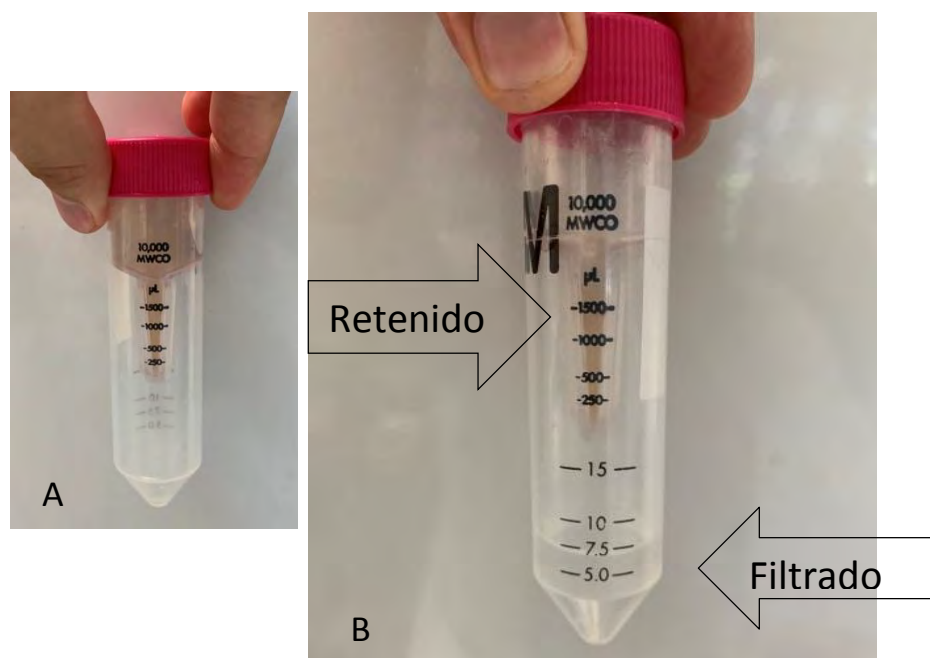
**Tabla 4.** Volúmenes de nisina considerados para la curva de calibración.

<b>Volumen de inyección (μL)</b>	<b>Masa de Nisina (UI)</b>
2.5	125
5	250
20	1000
40	2000
60	3000
80	4000
100	5000

- Inyección de liposomas

Los liposomas fueron separados de la nisina no encapsulada mediante ultrafiltración (Ultracel YM-10 Membrane, 10 kDa, Millipore), centrifugando a 15,000 rpm y 4°C (Thermo Scientific, Sorvall ST16R, E.U.A), obteniéndose un filtrado y un retenido (Figura 23). La cantidad de nisina encapsulada se determinó en el retenido como se describe a continuación. Se colocaron 1.5 mL de retenido, conteniendo liposomas, en un vial para HPLC y se inyectaron 700 μL en HPLC (Agilent Technologies, 1260 Infinity), la muestra se hizo pasar por la columna (Phenomenex ultremex 5 C-18, 250×10 mm), siguiendo el mismo protocolo descrito para la curva estándar (Tabla 5).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 23.** Separación de liposomas con nisina de nisina no encapsulada. A) antes de ultrafiltración: mezcla de liposomas y nisina libre se colocan en el ultrafiltro, B) después de ultrafiltración: liposomas con nisina quedan en retenido y nisina no encapsulada queda en el filtrado.

**Tabla 5.** Condiciones de operación en HPLC para cuantificación de nisina en liposomas y curva estándar de nisina. Fase móvil A: 99.9% ACN y 0.1 TFA. Fase móvil B, 99.9% Agua y 0.1 TFA

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	Flujo (mL/min)
0	100	0	1
23	0	100	1
30	100	0	1
40	100	0	1

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 24.** Del lado izquierdo se observa el equipo de cromatografía usado en este estudio (Agilent Technologies, 1260) y del lado derecho se observa el detalle de la columna con termostato, utilizada para análisis de muestras de nisina en este estudio.

La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{N_s - N_r}{N_s} \times 100$$

$N_s$ = nisina en solución

$N_r$ = nisina en retenido (i.e., nisina encapsulada en liposomas)

EE= Eficiencia de encapsulado

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

**6.2.7 Microscopia de fuerza atómica (MFA)**

- Preparación de la muestra

Se fabricaron liposomas vacíos, liposomas con nisina y liposomas con nisina recubiertos con pectina o con quitosano; de cada muestra se realizaron diluciones 1:1,000, se colocaron 40  $\mu\text{L}$  en un portaobjetos el cual se dejó secar por 3 h en una campana de flujo laminar (Labconco®, Modelo 3746701, E.U.A). Antes de usarse, los portaobjetos fueron tratados con solución piraña (2 partes de ácido sulfúrico por 1 parte de peróxido de hidrogeno), dejándose sumergidos al menos 1 h, esto para remover cualquier residuo orgánico presente en el portaobjetos, posteriormente los portaobjetos se enjuagaron repetidas veces con agua destilada y etanol, dejándose secar en campana de flujo laminar. La microscopia se realizó en un microscopio de fuerza atómica (Park XE7, E.U.A) (Figura 25) en modo *non-contact*.



**Figura 25.** Microscopio de fuerza atómica Park XE7.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

### **6.2.8 Análisis Estadístico**

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ) usando el software estadístico IBM SPSS Statistics 20.

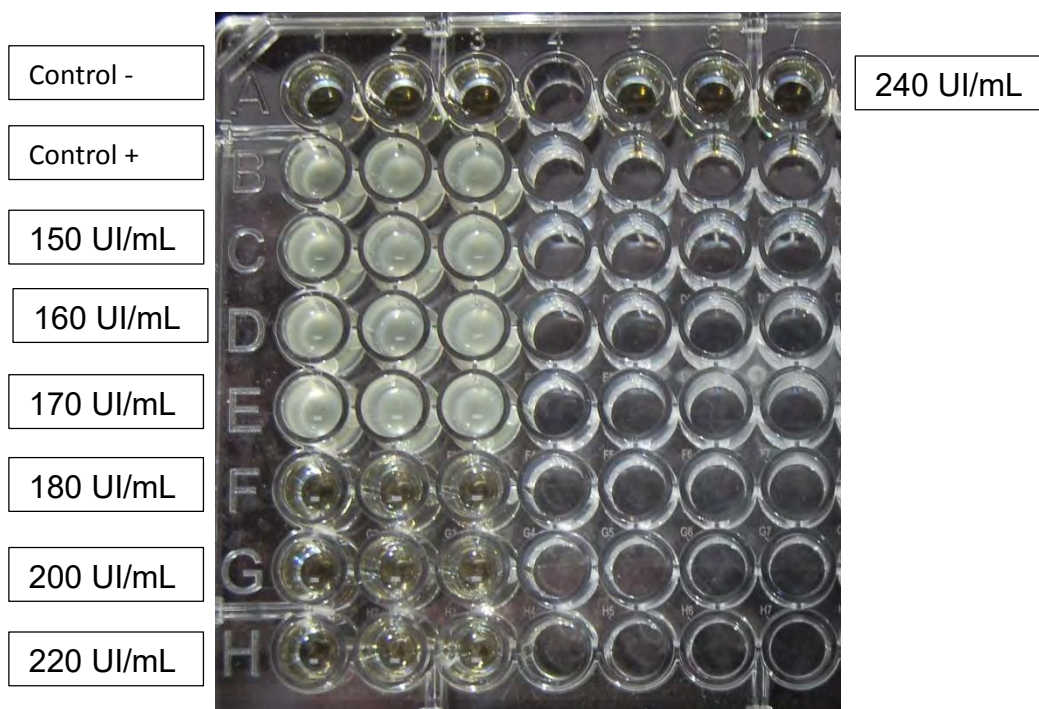
## 7 Resultados y Discusiones

### 7.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de nisina contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*

La CMI es definida como la concentración más baja del agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible de un microorganismo bajo incubación en condiciones definidas y es ocupada como una herramienta para determinar la actividad *in-vitro* de nuevos antimicrobianos (Andrews, 2001). Se determinó la CMI de nisina (Nisaplin, Danisco) contra  $10^5$  UFC/mL de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, esto para tener un referente de la concentración de nisina a encapsular en liposomas. Se determinó que la CMI para *L. monocytogenes* fue de 180 UI/mL y de 320 UI/mL para *S. aureus*.

En la figura 26 se muestran los pozos de la placa de ELISA de *L. monocytogenes* con las diferentes concentraciones de nisina evaluadas a las 24 h de incubación; de manera visual, los tratamientos de 150 hasta 170 UI/mL exhiben turbidez debida a crecimiento bacteriano, sugiriendo que se requiere de mayor concentración de nisina para inhibir las células de este microorganismo; en contraste, en los tratamientos de 180 a 240 UI/mL hay ausencia de crecimiento bacteriano, sugiriendo que 180 UI/mL son suficientes para ejercer un efecto inhibitorio contra  $10^5$  UFC/mL de *L. monocytogenes*.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

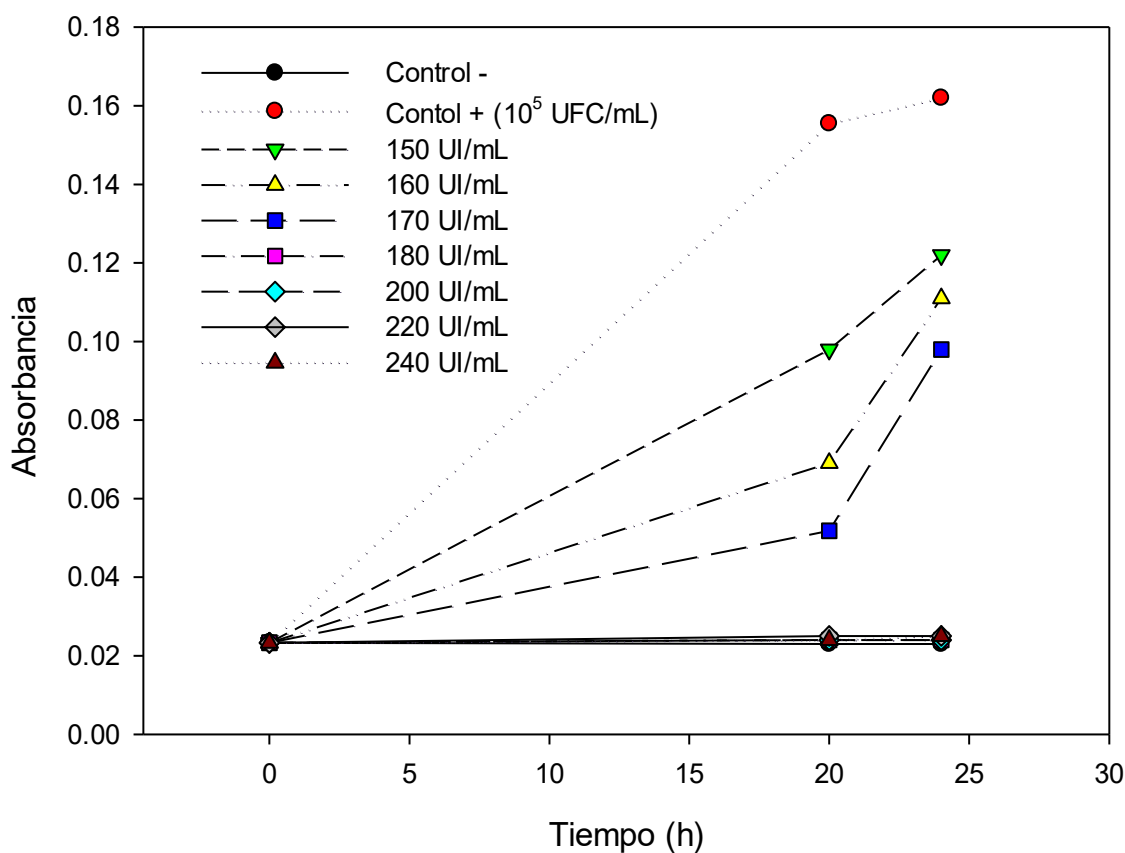


**Figura 26.** Placa de ELISA: control-, control+, y tratamientos con *L. monocytogenes*, a 35°C, 24 h de incubación.

Existen diferentes alternativas para determinar la actividad antimicrobiana de bacteriocinas como son la bioluminometría de ATP, radiometría, medición de conductancia y turbidimetría automatizada (i.e., medición de la densidad óptica en micro placas de ELISA (Turcotte, Lacroix, Kheadr, Grignon, & Fliss, 2004). En este estudio, también se midió el crecimiento de *L. monocytogenes* con base en el incremento de absorbancia. En la figura 27 se puede observar que al tiempo de incubación 0 h no existe diferencia en los tratamientos, al aumentar el tiempo a 20 h de incubación, para los tratamientos menores a 180 UI/mL existe un incremento en las absorbancias indicando crecimiento bacteriano, aunque no son iguales que el control positivo (sin nisina), existe un crecimiento bacteriano indicando una acción bacteriostática y/o bactericida no efectiva, mostrando un incremento en la absorbancia que se acentúa entre las 20 y 24 h. En contraste, los tratamientos superiores a 170 UI/mL exhiben un comportamiento similar al control negativo, sin

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

incremento en las absorbancias, sugiriendo que no hay crecimiento bacteriano, corroborando una CMI de 180 UI/mL de acuerdo con lo que se obtuvo visualmente para *L. monocytogenes*.



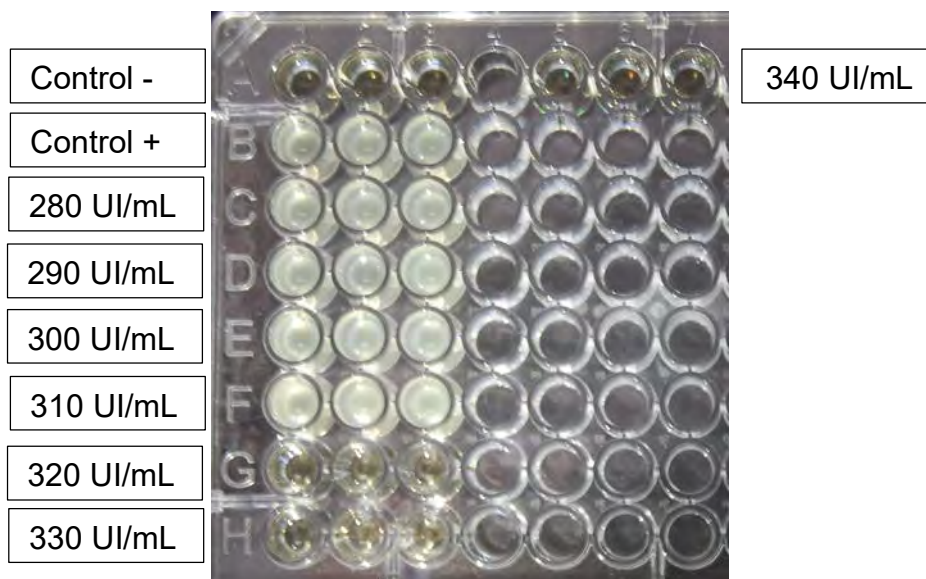
**Figura 27.** Determinación de CMI mediante absorbancia para *L. monocytogenes* a 35°C. Densidad óptica ( $\lambda = 545 - 630$  nm).

Por otra parte, en la figura 28 se muestran los pozos de la placa ELISA de *S. aureus* con las diferentes concentraciones de nisina evaluadas a las 24 h de incubación; de manera visual los tratamientos de 290 hasta 310 UI/mL presentan crecimiento bacteriano, sugiriendo que se requiere de mayor concentración de nisina para ejercer un efecto inhibitorio; para los tratamientos desde 320 hasta 340 UI/mL hay



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

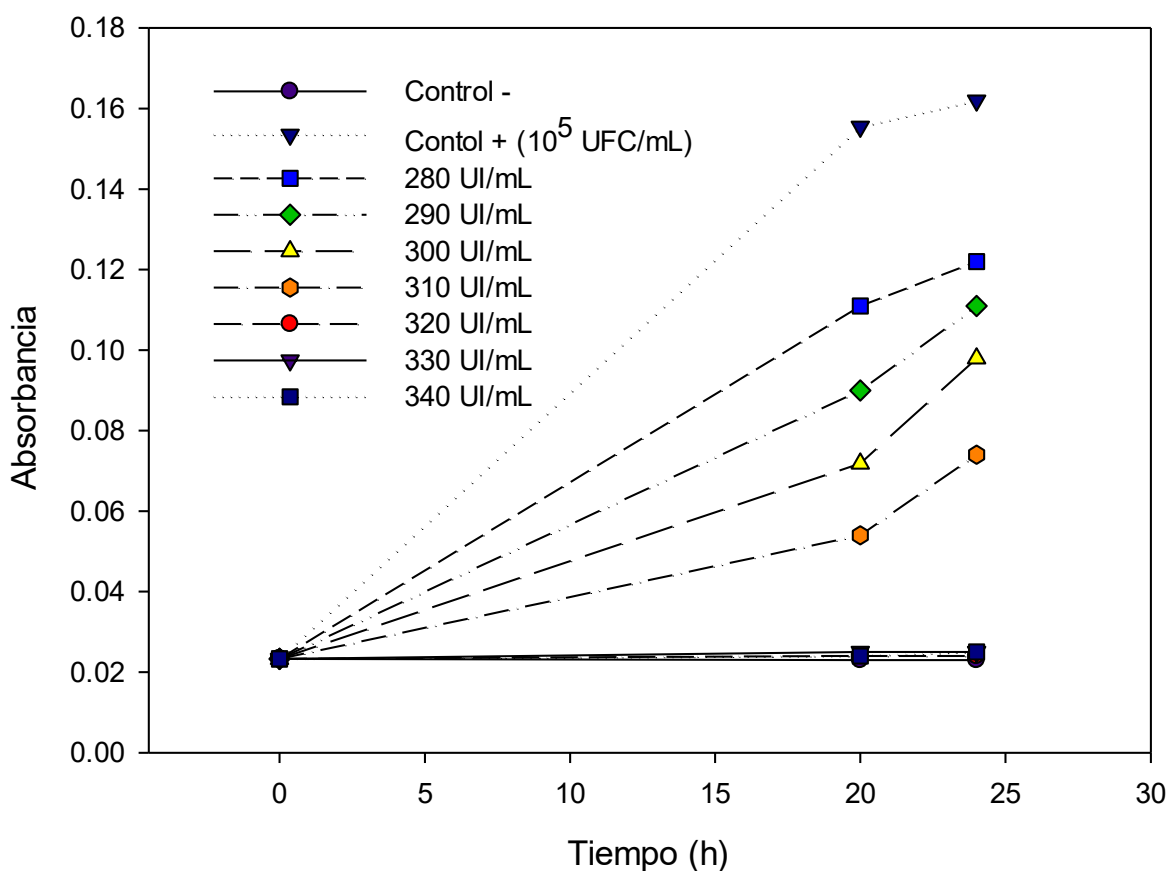
ausencia de crecimiento bacteriano, demostrando que 320 UI/mL son suficientes para ejercer un efecto inhibitorio contra  $10^5$  UFC/mL de *S. aureus*.



**Figura 28.** Placa ELISA, control-, control+, y tratamientos contra *S. aureus*, a 35°C, 24 h de incubación.

De igual manera se midió la absorbancia como una medición indirecta del crecimiento de *S. aureus*. En la figura 29, se muestra que en el tiempo de incubación 0 h no existe diferencia entre los tratamientos, a las 20 h de incubación, para los tratamientos menores a 320 UI/mL existe un incremento en las absorbancias indicando crecimiento bacteriano; aunque no son iguales que el control positivo, existe un crecimiento bacteriano indicando una acción bacteriostática y/o bactericida no efectiva. En contraste, los tratamientos superiores a 310 UI/mL muestran inhibición del crecimiento (sin incremento en las absorbancias), corroborando una CMI de 320 UI/mL, coincidente con lo que se obtuvo visualmente para *S. aureus*.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 29.** Determinación de CMI mediante absorbancia para *S. aureus* a 35°C. Densidad óptica ( $\lambda = 545 - 630$  nm)

Hay diferentes datos reportados de CMI en la literatura para estos microorganismos indicadores, Rivera-Hernández (2017) reportó una CMI de 171.5 UI/mL, similar a la encontrada en este estudio, probablemente porque los factores experimentales como concentración de microorganismos (m.o.), temperatura de incubación así como medios de cultivo fueron similares a los de este trabajo. Zou et al. (2012) reportaron una CMI para *L. monocytogenes* de 320 UI/mL y de 640 UI/mL para *S. aureus*, pero cada pozo en las placas de ELISA fue inoculado con  $10^6$  UFC/mL, una mayor concentración bacteriana que la ocupada en el presente trabajo, además

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

incubaron a 37°C por 18 h; cabe destacar que estos autores usaron triptona de soya, así como volúmenes de solución de nisina e inóculo de 100 µL, factores experimentales diferentes a los de este trabajo.

De igual manera Dosler and Gerceker (2012) reportaron una CMI de 1,280 UI/mL para cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA), las condiciones experimentales reportadas por estos autores son distintas, ya que el trabajo usa una concentración de m.o. de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, así como una incubación de 37°C por 20 h, sin embargo las cepas MRSA son resistentes a diferentes antimicrobianos, y en combinación con ampicilina (0.25 µg/mL) solo requirió de 320 UI/mL nisina para ejercer un efecto bacteriostático.

Los distintos valores reportados de la CMI para *L. monocytogenes* y *S. aureus* en literatura y la determinada en este estudio, se deben a distintos factores experimentales, como son diferentes medios de cultivo, tamaño de inóculo, temperatura y tiempo de incubación así como uno determinante que es la cepa empleada, ya que algunas cepas pueden poseer resistencia a diferentes antimicrobianos, requiriendo mayor concentración de agente antimicrobiano y/o combinación con otros para que su efecto sea bactericida en el mejor de los casos, ya que algunas cepas pueden poseer mecanismos de defensa como la producción de ciertas enzimas, capaces de inactivar bacteriocinas y de igual manera a los antibióticos en general (Pastor-Sánchez, 2006). Una estrategia es la combinación de antimicrobianos como las bacteriocinas y el uso de antibióticos en menor cantidad ya que las bacteriocinas logran un daño sub-letal, de esta manera existe un efecto sinérgico para bacterias resistentes a los antibióticos (Dosler & Gerceker, 2012), lo ideal sería estandarizar las pruebas acorde a lo que indica The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), y lograr una mejor comparación de nuestros datos con los de otros investigadores .

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

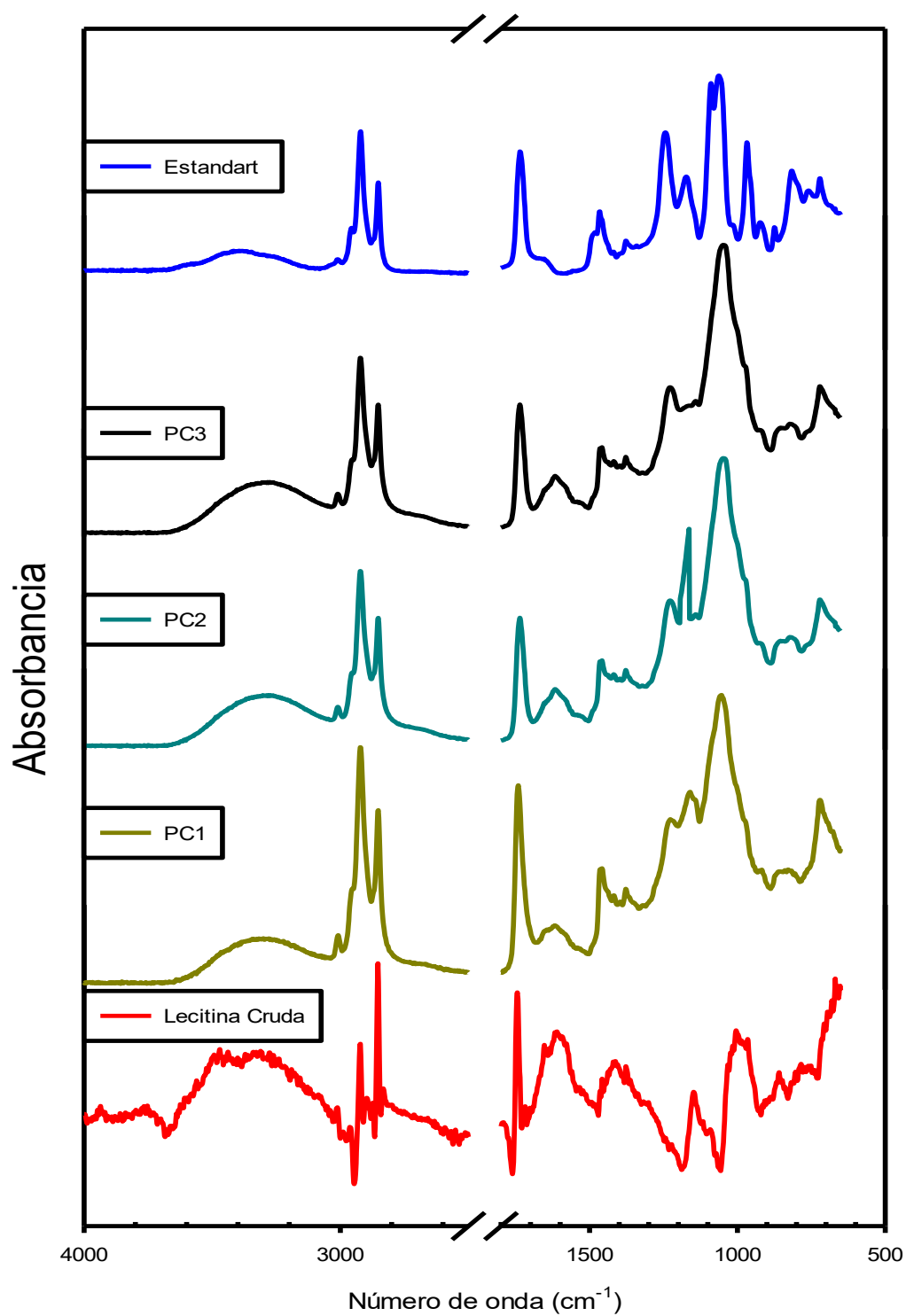
## 7.2 Purificación de lecitina de soya

Muestras de lecitina de soya se acondicionaron para obtener PC parcialmente purificada, la lecitina se sometió a lavados con solventes orgánicos para poder eliminar impurezas y grasas no deseadas, terminado el proceso se obtuvo un polvo color amarillo huevo (Figura 30), el cual se sometió a pruebas de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) para comparar los espectros con los del estándar de L- $\alpha$  Fosfatidilcolina 99.9% de pureza (Sigma-Aldrich, U.S.A), esperando que la muestra purificada exhibiera los grupos funcionales típicos de PC.



**Figura 30.** Muestra de lecitina purificada para elaboración de liposomas con PC-2.

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 31.** Comparación de FTIR entre muestras de lecitina cruda, lecitina purificada y estándar de fosfatidilcolina (Sigma-Aldrich, Lote CV8971H, E.U.A) pureza de 99%.

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

En la Figura 31 se observan los distintos espectros FT-IR, de lecitina sin tratamiento, y de distintos procesos de purificación (PC-1, PC-2 y PC-3), así como del estándar. En la región de  $2,900\text{ cm}^{-1}$  a  $3,050\text{ cm}^{-1}$  se observan dos picos bien definidos presentes en todas las muestras los cuales se pueden asociar a las vibraciones de grupos  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2$  y  $\text{C-H}$  en las cadenas de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos; según Mantsch (1991) hay 3 tipos de modos de vibración en las cadenas de acilo, las vibraciones de carbono-hidrógeno ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y  $=\text{C}-\text{H}$ ) con una región espectral de  $2,800\text{ cm}^{-1}$  a  $3,100\text{ cm}^{-1}$ , características de la región de hidrocarburo hidrofóbico, el estiramiento antisimétrico de  $\text{CH}_2$  a  $2,929\text{ cm}^{-1}$  y el modo de estiramiento simétrico de  $\text{CH}_2$  a  $2,850\text{ cm}^{-1}$  son generalmente las bandas más fuertes en los espectros de lípidos.

De igual manera en la región de  $1,700\text{ cm}^{-1}$  a  $1,800\text{ cm}^{-1}$  se observa un pico amplio y bien definido en todas las muestras con excepción de la lecitina cruda, el cual aparece pero con interferencias, según Ville (1995) estas absorciones están relacionadas con el enlace  $\text{C}=\text{O}$  presentes en los ácidos carboxílicos de los ácidos grasos; en las regiones de  $1,220\text{ cm}^{-1}$  a  $1,250\text{ cm}^{-1}$  y  $1,090\text{ cm}^{-1}$  se observan picos definidos, según Ville (1995) ocurren las absorciones características de grupos funcionales presentes en fosfolípidos los cuales se relacionan con los grupos fosfato, y de acuerdo con Arrondo, Goñi, and Macarulla (1984) en estas absorciones ocurren los estiramiento asimétrico y simétricos de los grupos  $\text{PO}_2$ , grupo relacionado con el grupo fosfato del glicerol y típico en muestras de fosfolípidos, el cual solo se identificó en la muestra PC-2 y el estándar, esto podría ser debido a que en la muestra PC-1 el pico está traslapado y/o con interferencias, ya que no está bien definido, o incluso la muestra está sucia y no se alcanza a definir; más aún, en la muestra PC-3 este pico se ve disminuido, posiblemente debido a que fue removido o desnaturalizado por el lavado con solventes orgánicos; de igual manera en la región de  $820\text{ cm}^{-1}$  se observa una absorción y un pico definido, que podría ser el estiramiento asimétrico de grupo P del O, según Ville (1995) de la región de

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

700 a 900 se pueden asociar absorciones con el contenido de fosfolípidos, el cual se presenta como un pico más definido en la muestra PC-2 en comparación con la PC-1, teniendo esta evidencia y además de que se identificaron las absorciones características de los grupos funcionales de los fosfolípidos en la muestra PC-2, se decidió continuar con la elaboración de los liposomas usando solo la PC-2.

### 7.3 Determinación del tiempo de sonicación

Se evaluaron distintos tiempos de sonicación para la obtención de liposomas de tamaño entre 100 a 250 nm, con índices de polidispersión (PDI) menores a 0.25, que son rangos reportados en la literatura para distintos tipos de liposomas, en la Tabla 6 se observan los resultados obtenidos en este trabajo.

**Tabla 6.** Evaluación de diferentes tiempos de sonicación para optimizar tiempos de tratamiento para fabricar liposomas.

Sonicación (min)	Liposomas vacíos		Liposomas con nisina	
	Tamaño de partícula (d.nm)	Índice de polidispersión (-)	Tamaño de partícula (d.nm)	Índice de polidispersión (-)
10	225±9.6 <sup>a</sup>	0.32±0.06 <sup>a</sup>	333.47±5.6 <sup>a</sup>	0.41±0.02 <sup>a</sup>
20	155±8.7 <sup>b</sup>	0.21±0.06 <sup>a</sup>	178.56±2.1 <sup>b</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>
30	145±6.3 <sup>b</sup>	0.11±0.03 <sup>b</sup>	167.88±5.3 <sup>c</sup>	0.17±0.09 <sup>c</sup>
40	133±1.8 <sup>c</sup>	0.10±0.04 <sup>b</sup>	163.2±3.4 <sup>c</sup>	0.12±0.08 <sup>c</sup>
50	105±5.6 <sup>d</sup>	0.10±0.02 <sup>b</sup>	159.57±5.3 <sup>c</sup>	0.11±0.09 <sup>c</sup>

Nota: Lote 0 de liposomas

Como se puede observar, para los liposomas vacíos, con 10 min de sonicación es suficiente para obtener liposomas con tamaño promedio de 225 nm y PDI de 0.32, y para liposomas con nisina, se obtiene un tamaño promedio de 333 nm con un PDI de 0.41, con 20 min de sonicación para liposomas vacíos ya se obtienen parámetros

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

en tamaño y PDI similares a los reportados en literatura, pero en el caso de liposomas con nisina se obtuvo un tamaño de partícula de 178 nm, pero con un PDI de 0.29, fue hasta 30 min que se obtuvieron parámetros deseados, con un tamaño de 167 nm y PDI de 0.17. da-Silva et al. (2014) reportan un tamaño de partícula promedio para liposomas vacíos de 124.4 nm, y de 145.5 nm con un PDI de 0.149 para liposomas con nisina; aunque el tamaño obtenido en este trabajo es mayor, nuestros valores aún se encuentran dentro de los valores que se reportan, el método de preparación de liposomas fue el mismo excepto que sonicaron mediante sonda con un tiempo de 5 min, mientras que en este estudio usamos un baño ultrasónico por un tiempo de 30 min; esta puede ser una causa de que con una sonda se obtengan tamaños de partícula más pequeños, ya que los liposomas están en contacto directo con la sonda, y es posiblemente la razón de una reducción en el tamaño considerable en función del tiempo, mientras que en el baño ultrasónico, la muestra se encuentra en un recipiente sumergido en agua a la mitad del tanque, además las ondas de ultrasonido son generadas desde la pared del aparato, viajan en el agua y atraviesan el material del recipiente que contiene el liposoma generando probablemente una menor intensidad en el tratamiento con ultrasonido; caso contrario en la sonda, la cual son generadas por la misma que está sumergida en la muestra pudiendo resultar en un proceso más eficiente. Por otra parte da-Silva-Malheiros et al. (2010) evaluaron 2 tratamientos de ultrasonido, uno con sonda y otro con baño de ultrasonido, encontrando un tamaño de partícula promedio de 181.4 y 148 nm respectivamente, los tiempos evaluados son 5 min para la sonda y 40 min para el baño ultrasónico, aunque estos autores reportan un tamaño menor en el caso del baño ultrasónico, este proceso consume más energía debido a mayor tiempo del tratamiento. Putri et al. (2017) mencionan que el tiempo de ultrasonido juega un rol importante en la reducción de tamaño de partícula, y que a mayor tiempo de sonicación, habrá un menor tamaño de partícula, lo cual se observa en todos los tiempos evaluados en este estudio. da-Silva-Malheiros et al. (2010) reportan un PDI menor en el tratamiento con sonda de 0.27 contra 0.392 en el baño, siendo una muestra más homogénea con la sonda, en ambos casos el tamaño de



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

partícula es óptimo aunque se difiere en el PDI, por lo cual podría inferirse que ambos tratamientos de ultrasonido son eficientes ya que generan partículas de tamaño deseado, aunque la sonda genera muestras menos dispersas que un baño de ultrasonido, aunque esto es dependiente del tiempo. El PDI es básicamente una representación de la distribución de poblaciones de tamaño dentro de una muestra dada. El valor numérico de PDI varía de 0.0 (para una muestra perfectamente uniforme con respecto al tamaño de partícula) a 1.0 (para una muestra altamente poli dispersa con múltiples poblaciones de tamaño de partícula). En la práctica, los valores de 0.2 y menos se consideran comúnmente aceptables para nanopartículas a base de polímeros y lípidos (Chen, Liu, & Fahr, 2011; Putri et al., 2017) por tal motivo se decidió que un tratamiento de 30 min de sonicación es el adecuado para elaborar nuestros liposomas, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de 40 y 50 min, además, someter la muestra a mayores tiempos de sonicación, podría desnaturalizar nuestro péptido, causando una disminución en su actividad antimicrobiana. Una vez determinado el tiempo de sonificado se elaboraron los liposomas recubiertos.

#### **7.4 Elaboración de liposomas y su distinto polímero.**

Se elaboraron 4 tipos de liposomas y se determinaron sus características fisicoquímicas: tamaño, Índice de Polidispersión y Potencial Z; en la Tabla 7 se observan los resultados obtenidos. Como se puede observar, existe un incremento en el tamaño de los liposomas con nisina en comparación con el liposoma vacío, esto puede deberse a la incorporación del péptido en el interior, así como lo mencionan da-Silva et al. (2014); por otra parte todos los liposomas muestran un tamaño menor a 205 nm en promedio y según Jesorka and Orwar (2008) los liposomas se pueden clasificar en pequeños con un tamaño de 20 nm a 200 nm, en grandes de 200 nm a 1000 nm, según la clasificación de este autor nuestros liposomas entrarían en el tamaño pequeño, además los valores de PDI entran en la

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

categoría de una muestra mono dispersa según (Chen et al., 2011; da-Silva et al., 2014; Putri et al., 2017) ya que demuestran una distribución de partícula homogénea, con PDI menor a 0.21 en el caso de los liposomas con polímero y de 0.19 para liposomas con nisina.

**Tabla 7.** Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los liposomas elaborados en el presente trabajo.

	<b>Liposoma vacío</b>	<b>Liposomas con nisina</b>	<b>Liposomas con nisina y pectina (1%)</b>	<b>Liposomas con nisina y quitosano (1%)</b>
<b>Tamaño (d.nm)</b>	156.3 ± 5.3 <sup>a</sup>	193 ± 8.6 <sup>c</sup>	205 ± 8.7 <sup>c</sup>	179 ± 5.3 <sup>b</sup>
<b>PDI (-)</b>	0.11 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.07 <sup>a</sup>
<b>Potencial Z (mV)</b>	-38 ± 10.56 <sup>a</sup>	- 52.02 ± 5.31 <sup>a</sup>	- 48.02 ± 7.35 <sup>a</sup>	+24 ± 2.99 <sup>c</sup>

Nota: Lote 1 de liposomas.

Las características de los liposomas vacíos (i.e., tamaño, 156 nm; PDI, 0.11 y PZ, -38 mV) fueron similares a lo reportado por Lopes et al. (2017) en cuanto a tamaño y PDI se refiere ya que ambos entran en la categoría de liposomas pequeños y monodispersos, sin embargo el potencial Z que reporta el autor es de -20 mV, el cual argumenta el autor puede verse disminuido por la utilización de mezclas de lípidos, ya que ocupó un lípido neutro y un lípido aniónico, mostrando inestabilidad en suspensión, contrario al valor PZ obtenido en este trabajo; por otra parte existen reportes con PZ mayores a -30 mV para liposomas vacíos (da-Silva-Malheiros et al., 2010; C. M. B. Pinilla & Brandelli, 2016).

En el caso de liposomas con nisina encontramos un PZ de -52 mV, dando muestra de estabilidad en la suspensión y similitud con lo reportado por C. M. B. Pinilla and Brandelli (2016) para liposomas con nisina; en el caso de liposomas con

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

recubrimiento, para el caso de pectina obtuvimos un valor de -48 mV, en este caso aparentemente no hubo mejorías en cuanto a estabilidad (sin polímero, Pz=-52 mV) aunque estadísticamente no existieron diferencias en estos tratamientos. Más aún, los liposomas están asociados con valores de repulsión electrostática deseables, Lopes et al. (2017) reporta para liposomas con pectina un valor de -25 mV, que es menor al hallado en este estudio, sin embargo el proceso seguido por estos autores fue muy distintos del seguido en este trabajo.

En el caso de liposomas con quitosano se encontró un Pz de +24 mV, el cambio de polaridad en estos liposomas podría deberse a la carga del quitosano ya que es un polímero catiónico, recordemos que el Pz es un indicador de las cargas accesibles en la superficie liposomal; en contraste, da-Silva et al. (2014) reportan un pZ de -17 mV para liposomas con quitosano, cabe destacar que las diferencias en los resultados podrían deberse a los lípidos utilizados, ya que los autores mencionados usaron un lípido aniónico, y la cantidad de quitosano que ocuparon fue del 0.5 %, es decir la mitad de lo empleado en este proyecto, de igual manera el medio en el que están dispersos los liposomas puede afectar las cargas, esto dependiendo del buffer utilizado, la calidad del agua del buffer y principalmente su pH.

### **7.5 Eficiencia de encapsulado (E.E)**

La eficiencia de encapsulación es una expresión de la cantidad de compuesto activo incorporado en el liposoma y se define normalmente como el porcentaje de compuesto activo atrapado, en relación con la cantidad total del mismo introducida en el proceso, la determinación de este parámetro generalmente requiere la separación del compuesto libre de la formulación liposómica.

El análisis de nisina en las fracciones de nisina libre y encapsuladas permite el cálculo de la eficiencia de encapsulación. Se determinó el % de E.E de liposomas convencionales y de liposomas con recubrimiento biopolimérico. En la tabla 8 se

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

presentan los valores de E.E en los distintos liposomas así como su tamaño, PDI y Pz.

**Tabla 8.** Eficiencia de encapsulado de liposomas y propiedades fisicoquímicas.

	<b>Liposoma vacío</b>	<b>Liposomas nisina</b>	<b>Liposomas nisina/pectina</b>	<b>Liposomas nisina/quitosano</b>
<b>E.E (%)</b>	n/a	86±3.1 <sup>a</sup>	95±2.5 <sup>b</sup>	92±1.4 <sup>b</sup>
<b>Tamaño (d.nm)</b>	164.1 ± 1.7 <sup>a</sup>	185.4 ± 2.2 <sup>b</sup>	207±3.5 <sup>c</sup>	196.6 ± 9.1 <sup>bc</sup>
<b>PDI (-)</b>	0.22± 0.06 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Potencial Z (mV)</b>	-40.9 ± 0.05 <sup>a</sup>	- 35.2 ± 2.76 <sup>b</sup>	-39.8 ± 3.76 <sup>b</sup>	+21.1 ± 0.33 <sup>c</sup>

Nota: Lote 2 de liposomas

Como se puede observar hay diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de nisina incorporada entre los liposomas convencionales y liposomas *Stealth*, donde los valores de E.E% son mayores cuando se recubren los liposomas con pectina o quitosano, lo cual podría implicar que parte de la nisina quedaría atrapada en espacios entre el liposoma y el biopolímero, de igual manera la nisina podría unirse al biopolímero aumentando la masa atrapada.

La E.E% del liposoma convencional obtenida en el presente trabajo, por sí misma tuvo un valor alto debido a las interacciones eléctricas entre nisina y PC (da-Silva-Malheiros et al., 2010; da-Silva et al., 2014), siendo notablemente mayor que lo reportado en trabajos similares: (Lopes et al., 2017) reportaron valores de E.E% de 86, 87 y 84% para liposomas encapsulando nisina, convencionales, y *Stealth* con ácido poligalacturónico y pectina, respectivamente. Los valores de E.E% son diversos y seguramente deben estudiarse con mayor detenimiento los distintos

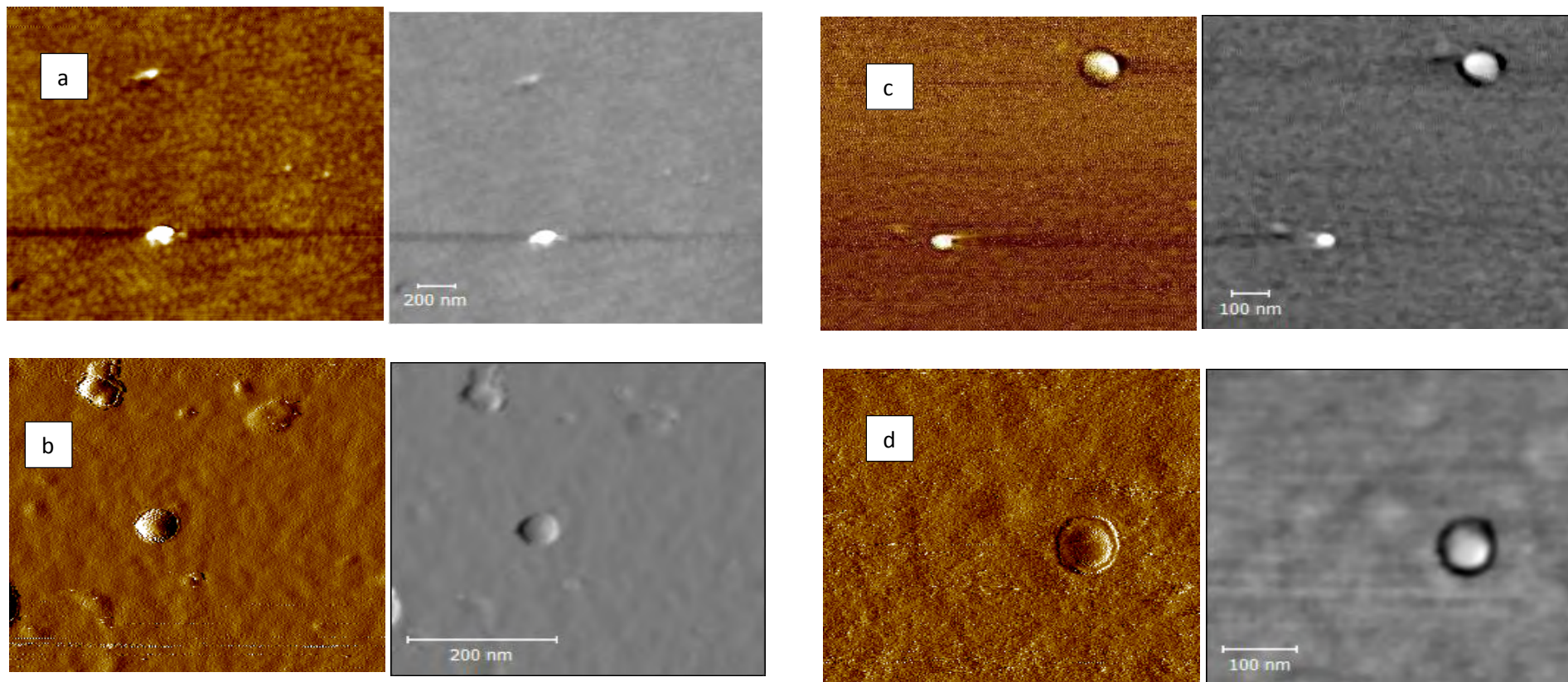
ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

factores implicados, incluyendo el método de cuantificación del metabolito encapsulado, de manera que en la literatura se reportan valores desde 54% hasta 96% (da-Silva-Malheiros et al., 2010; C. M. B. Pinilla & Brandelli, 2016; T. Matthew Taylor, Gaysinsky, Davidson, Bruce, & Weiss, 2007; Were et al., 2004). En otro estudio utilizando quitosano como recubrimiento de liposomas con nisina se reportó una E.E de 70% (da-Silva et al., 2014), los autores argumentan que después de agregar el biopolímero, este pudiese competir con la nisina por los mismos sitios en el liposoma, ya que ambos tienen una carga positiva, su técnica de detección fue por cromatografía en gel, cabe destacar que estos autores utilizaron una sonda sonicadora y extrusor para fabricar sus liposomas, pudiendo perder nisina en el paso de generar partículas pequeñas, como lo argumenta Zou et al. (2012), quienes en su estudio reportaron una E.E del 71% mencionando que la disminución de nisina registrada, puede originarse tanto en la sonicación como en la extrusión utilizadas para fabricar sus liposomas.

### **7.6 Determinación de la morfología de liposomas mediante Microscopía de Fuerza Atómica**

Los liposomas fueron analizados por microscopia de fuerza atómica (MFA) y sus características morfológicas se pueden observar en la Figura 32.

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 32.** Micrografías de fuerza atómica de liposomas: a) liposomas vacíos; b) liposomas con nisina; c) liposomas con pectina; d) liposomas con quitosano.

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Como se puede apreciar los en las micrografías todos los liposomas exhibieron una morfología esferoidal. En trabajos relacionados (da-Silva et al., 2014; Patrícia da Silva Malheiros, Sant'Anna, Micheletto, da Silveira, & Brandelli, 2011; C. M. Pinilla et al., 2017) realizaron microscopia de transmisión electrónica encontrando morfologías esféricas, cúbicas y amorfas. Entre los factores que afectan el resultado se encuentra el proceso de preparación de muestra, el cual en nuestro caso implica un secado que pudiese afectar tanto la morfología como el tamaño de liposomas, lo ideal sería acceder a una microscopia no invasiva para tener certidumbre en morfología y tamaño (i.e., microscopía confocal).

Por otro lado, aunque el tamaño de partícula en la microscopia es menor a los 100 nm, tamaño inferior reportado por el Zetasizer, recordemos que el aparato utiliza la técnica DLS, la cual reporta un diámetro hidrodinámico representativo de una muestra poblacional (Allen, 1981); como se mencionó con anterioridad, la muestra fue secada, lo cual posiblemente causó deshidratación en las membranas del liposoma disminuyendo su tamaño, la recomendación es la misma que para la morfología, que las muestras estén en suspensión. De acuerdo con nuestra búsqueda, hasta el momento no hay reportes de MFA utilizada para el estudio morfológico de liposomas encapsulando péptidos.

De igual manera en los liposomas de pectina y quitosano se logra observar una sombra en la periferia del liposoma, sugiriendo la unión entre el biopolímero y el liposoma, lo cual podría asociarse con el recubrimiento biopolimérico. En trabajos análogos, (da-Silva et al., 2014; Lopes et al., 2017) proponen que recubrimientos biopoliméricos de sus liposomas, pueden apreciarse a través de microscopia de transmisión electrónica (TEM).



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

### 7.7 Evaluación de la estabilidad fisicoquímica de los liposomas

Se realizó el seguimiento de la estabilidad fisicoquímica de los liposomas en contacto con un alimento modelo, obteniendo los siguientes resultados en función del tiempo (Tabla 9).

**Tabla 9.** Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los liposomas respecto al tiempo.

Tiempo (Día)	Liposoma	Tamaño (D.nm)	PDI (-)	Pz (mV)
0	Blanco	163.6±0.46 <sup>a</sup>	0.196±0.002 <sup>a</sup>	46.53±2.63 <sup>a</sup>
	Liposoma Nisina	185.03±0.5 <sup>b</sup>	0.201±0.001 <sup>b</sup>	46.73±3.01 <sup>a</sup>
	Liposoma Pectina	185.1±0.26 <sup>b</sup>	0.197±0.002 <sup>c</sup>	47.40±2.18 <sup>a</sup>
	Liposoma Quitosano	191.45±0.9 <sup>c</sup>	0.197± 0.03 <sup>c</sup>	+25.76±0.25 <sup>b</sup>
2	Blanco	191.97±0.289 <sup>a</sup>	0.201±0.002 <sup>a</sup>	46.53±2.63 <sup>a</sup>
	Liposoma Nisina	207.37±1.102 <sup>b</sup>	0.215±0.004 <sup>b</sup>	42.5±5.04 <sup>a</sup>
	Liposoma Pectina	191.2±1.179 <sup>a</sup>	0.199±0.001 <sup>a</sup>	46.73±3.01 <sup>a</sup>
	Liposoma Quitosano	202.87±0.306 <sup>c</sup>	0.199±0.001 <sup>a</sup>	+21±1.70 <sup>a</sup>
4	Blanco	197.63±0.874 <sup>a</sup>	0.207±0.001 <sup>a</sup>	45.933±3.25 <sup>a</sup>
	Liposoma Nisina	212.767±1.65 <sup>b</sup>	0.242±0.003 <sup>b</sup>	42.20±2.66 <sup>a</sup>
	Liposoma Pectina	216.767±1.86 <sup>c</sup>	0.208±0.001 <sup>a</sup>	42±6.239 <sup>a</sup>
	Liposoma Quitosano	204.46±0.153 <sup>d</sup>	0.199±0.001 <sup>c</sup>	+23.167±0.40 <sup>b</sup>



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

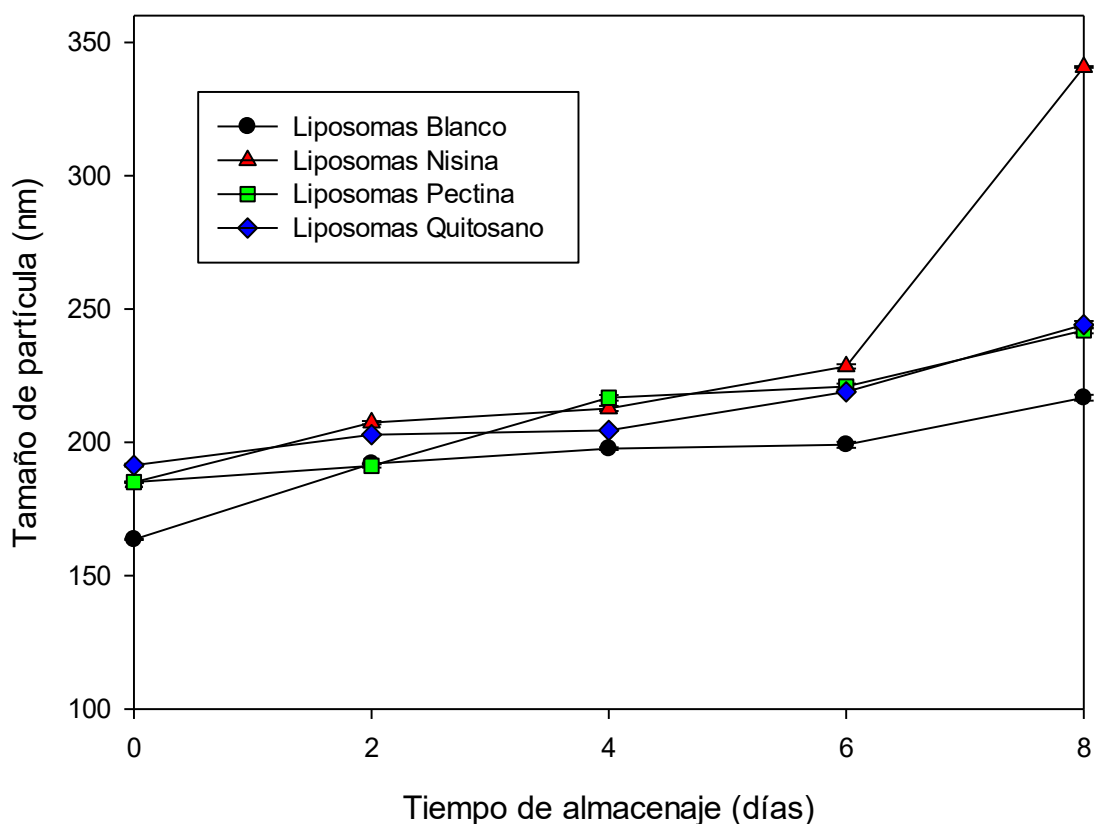
<b>6</b>	Blanco	199.1±1.97 <sup>a</sup>	0.205±0.005 <sup>a</sup>	45.867±8.33 <sup>a</sup>
	Liposoma Nisina	228.53±1.40 <sup>b</sup>	0.260±0.014 <sup>b</sup>	32.5±3.005 <sup>b</sup>
	Liposoma Pectina	221±1.87 <sup>c</sup>	0.202±0.004 <sup>a</sup>	35.83±1.305 <sup>b</sup>
	Liposoma Quitosano	219±0.265 <sup>c</sup>	0.208±0.007 <sup>a</sup>	+20.7±1.044 <sup>c</sup>
<b>8</b>	Blanco	216.767±1.91 <sup>a</sup>	0.23±0.005 <sup>a</sup>	42.30±0.404 <sup>a</sup>
	Liposoma Nisina	340.767±0.569 <sup>b</sup>	0.361±0.036 <sup>b</sup>	36.133±4.02 <sup>b</sup>
	Liposoma Pectina	242.033±1.87 <sup>c</sup>	0.249±0.012 <sup>c</sup>	35.033±0.643 <sup>b</sup>
	Liposoma Quitosano	244.161±2.41 <sup>c</sup>	0.22±0.004 <sup>a</sup>	+19.6±0.436 <sup>c</sup>

Nota: Lote 3 de liposomas

Como se puede observar en la tabla 9, al día 0 existen diferencias en el tamaño entre los liposomas con nisina respecto al blanco, lo cual puede sugerir un incremento en el tamaño de estos por la incorporación de nisina, como lo menciona (I. M. da Silva et al., 2014). En el día 2 se incrementó el tamaño de los liposomas siendo el máximo de 207 nm para liposomas de nisina; sin embargo, según Jesorka and Orwar (2008) los liposomas siguen entrando en la categoría de pequeños. Al día 8 los liposomas son grandes: 242 nm para liposomas recubiertos y 340 nm los liposomas con nisina, posiblemente debido a la formación de agregados, como resultado de la interacción de liposomas con ingredientes del alimento modelo; específicamente, la posible salida de nisina del interior del liposoma puede generar inestabilidad en la partícula (P. da Silva Malheiros et al., 2010; T. Matthew Taylor et al., 2007). En la figura 33 se puede corroborar de manera gráfica el incremento gradual en el tamaño de los liposomas, siendo el liposoma de nisina el de mayor tamaño, Patrícia da Silva Malheiros et al. (2011) reportan valores menores a 200

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

nm en un seguimiento de tamaño por 24 días, cabe destacar que sus liposomas no están en contacto con una matriz alimentaria, caso opuesto a este trabajo, lo cual podría explicar el incremento en los liposomas con nisina; posiblemente los liposomas con recubrimiento no sufrieron este crecimiento drástico en su tamaño debido a que el biopolímero fue el primero en entrar en contacto con los ingredientes de la matriz, moderando su incremento en el tamaño. Sin embargo, habrá que proponer investigaciones básicas en esta dirección para dilucidar estas posibles interacciones.

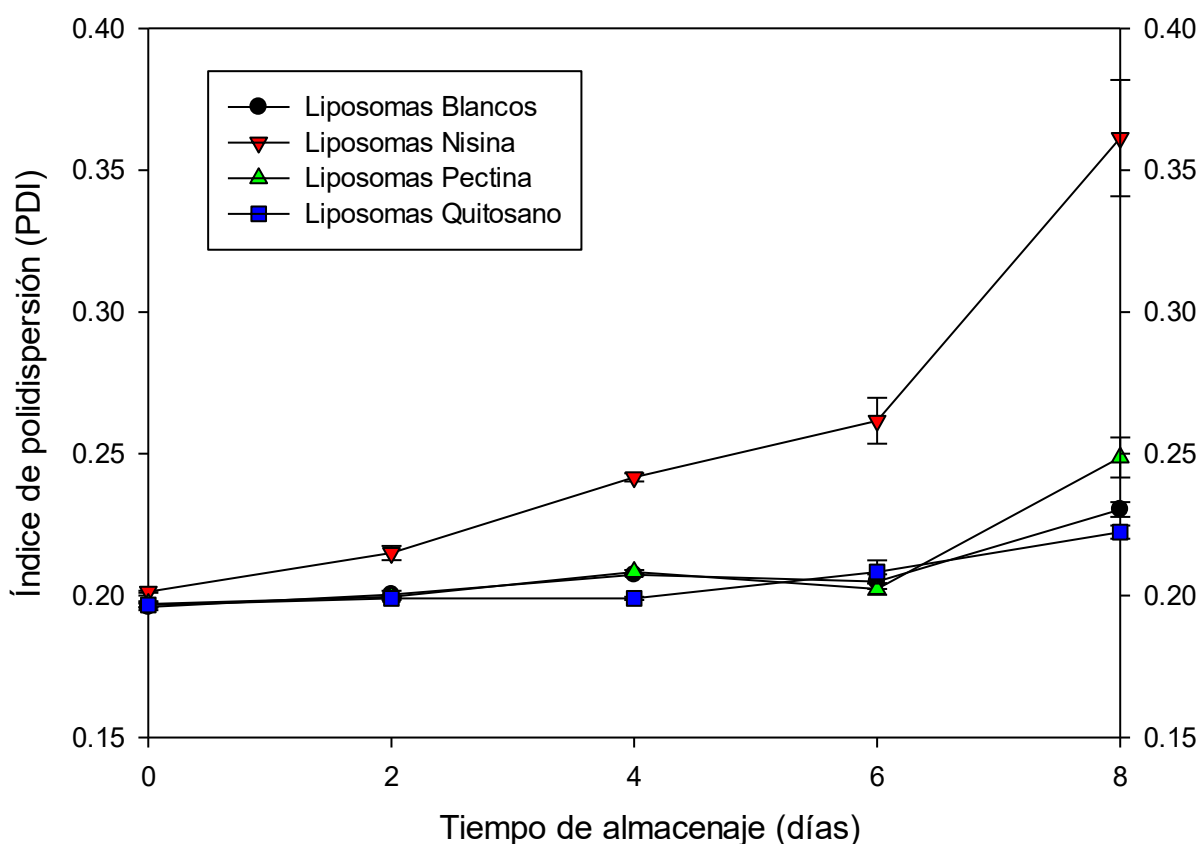


**Figura 32.** Cambios en tamaño de liposomas con el tiempo.

En cuanto a valores de PDI al tiempo 0 todos los liposomas muestran una distribución monomodal y homogénea ya que se encuentran por debajo de valores

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

de 0.21; según Badran (2014) indica que valores menores a 0.3 en PDI sugieren una muestra homogénea y monodispersa. En el presente trabajo los valores de PDI se mantienen menores de 0.3 hasta el día 8, a excepción del liposoma de nisina el cual aumentó su PDI a 0.36, posiblemente por la formación de agregados, generando una muestra más dispersa, pero menores de 0.4 que algunos autores presentan como asociados a muestras de liposomas homogéneos (da-Silva-Malheiros et al., 2010).



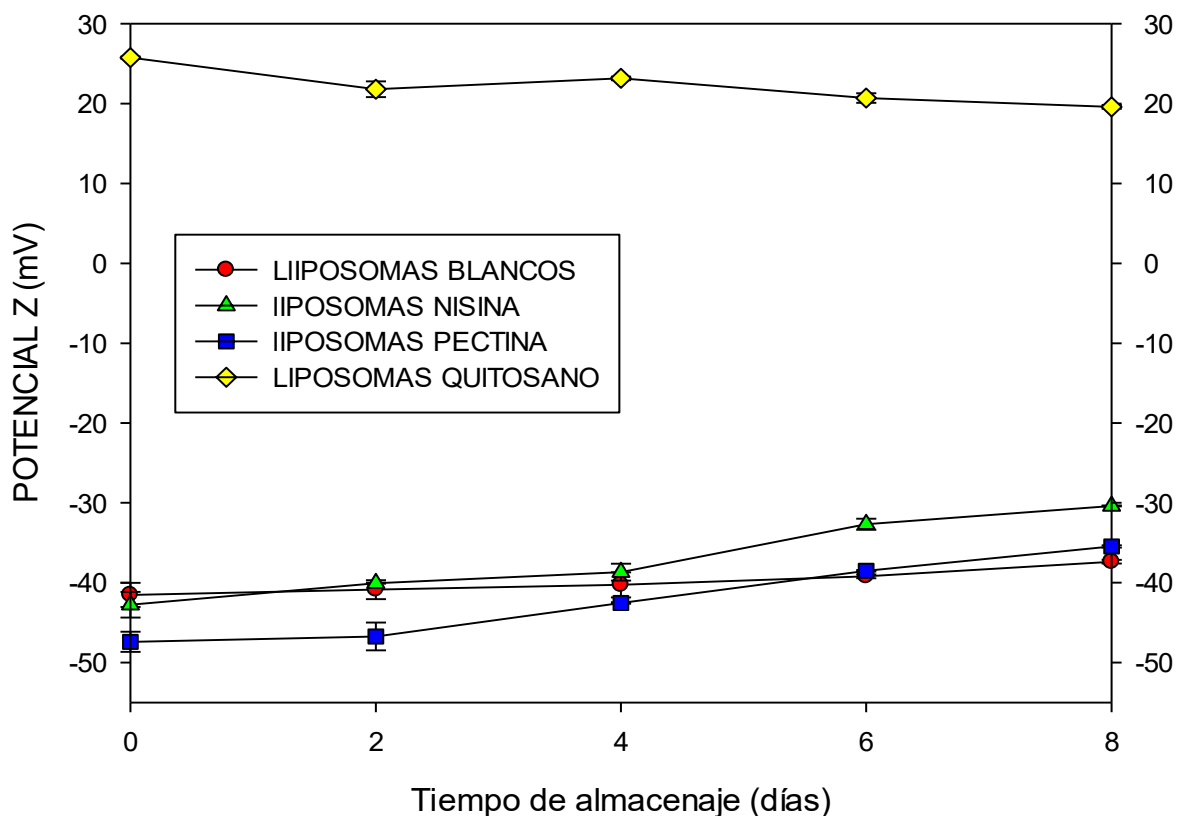
**Figura 34.** Cambios en PDI con el tiempo.

En la figura 34 se puede corroborar de manera visual que hasta el día 6 todos los liposomas mantuvieron valores de PDI menores a 0.3, indicando muestras homogéneas, en el día 8 solo los liposomas de nisina son los que se incrementan

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

0.06 unidades, valor no alejado de lo reportado anteriormente (de Mello et al., 2013), que obtiene valores menores a 0.25 hasta por 13 días para liposomas con Pediocina, cabe destacar que estos autores solo realizan el seguimiento de la estabilidad sin que los liposomas estén en contacto con un alimento modelo, contrario a este experimento, en el cual los liposomas estaban en contacto con una matriz compleja similar a un alimento pudiendo llevarse a cabo reacciones fisicoquímicas que afectan la estabilidad de liposomas. Respecto a los valores de Pz obtenidos, se obtuvieron suspensiones estables en todos los liposomas en el día 0 con valores absolutos mayores a 25 mV, asociado a repulsión entre las partículas, y así se mantuvieron hasta el día 8 con valores mayores a 30 mV, a excepción de los liposomas con quitosano los cuales siempre mostraron valores menores a 25 mV (Figura 35), aunque visualmente se veía un medio homogéneo sin floculación de partículas. El fabricante del equipo menciona que son recomendables valores de Pz superiores a  $\pm 30$  mV, para suspensiones estables ya que hay mayor repulsión entre las partículas (Malvern, 2013).

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 335.** Cambios en Pz con el tiempo.

Existen varios trabajos reportados en la literatura con potenciales Z iniciales con valores absolutos de 17-75 mV, (Lopes et al., 2017) reportaron valores Pz de 24 mV argumentando buena estabilidad por 24 días para liposomas almacenados en suspensión; (T. Matthew Taylor et al., 2007) reportaron valores de 8 a 52 mV, con distintas formulaciones de lípidos, agregando fosfatidilglicerol para generar partículas más estables; de igual manera (I. M. da Silva et al., 2014) reportaron valores de Pz de 17 a 27 mV indicando repulsión entre partículas, lo cual se asocia con estabilidad de las formulaciones de liposomas; de acuerdo con estos autores, nuestros liposomas son estables respecto al tiempo. Es escasa literatura en donde se reportan liposomas en interacción con matrices alimentarias y realicen un seguimiento en el tiempo de sus propiedades fisicoquímicas; algunos como los ya reportados solo evalúan el valor inicial de Pz.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

### 7.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana (A.A)

Las actividades antimicrobianas de los nanoliposomas contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* fueron evaluadas con muestras almacenadas en contacto con un alimento modelo y a temperatura de refrigeración. La Figura 36 y tablas 10 y 11 presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 10.** Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (Lm) y *S. aureus* (Sa) en función del tiempo, zona de inhibición y actividad antimicrobiana, de los distintos liposomas

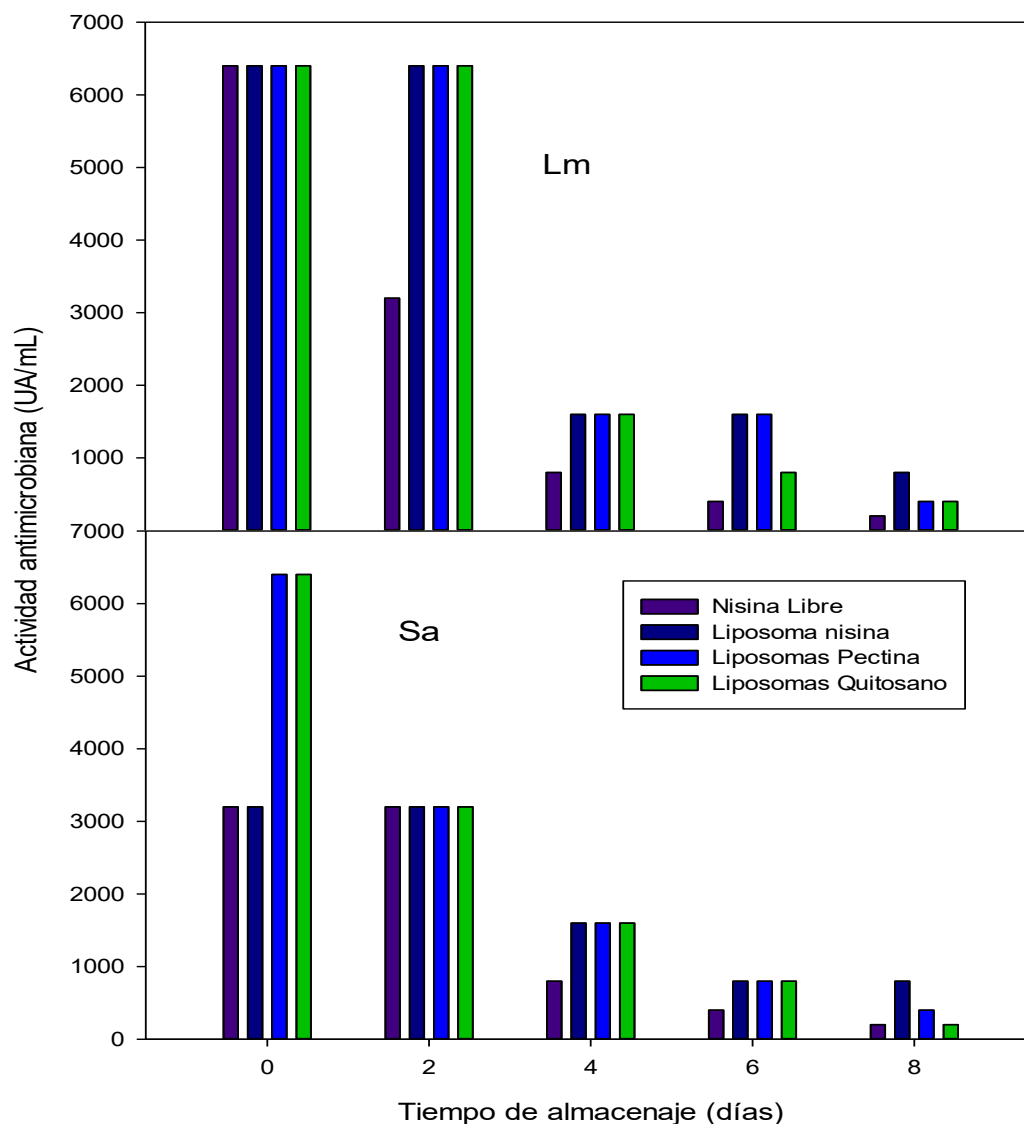
Tiempo (Día)	Muestra	Diámetro de inhibición en la mayor dilución (mm)		Mayor dilución con efecto antimicrobiano		Actividad antimicrobiana de la suspensión de liposomas (UA/mL)	
		Lm	Sa	Lm	Sa	Lm	Sa
0	Liposoma Vacío	0	0	N/A	N/A	0	0
	Nisina Libre	7.25±0.16	7.41±0.11	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	6400	3200
	Liposoma Nisina	7.15±0.12	7.41±0.18	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	6400	3200
	Liposoma Pectina	7.26±0.11	7.92±0.45	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>	6400	6400
	Liposoma Quitosano	7.02±0.16	7.13±0.19	2 <sup>6</sup>	2 <sup>6</sup>	6400	6400
2	Liposoma Vacío	0	0	N/A	N/A	0	0
	Nisina Libre	8.02±0.16	7.89±0.45	2 <sup>5</sup>	2 <sup>5</sup>	3200	3200
	Liposoma Nisina	8.46±0.12	7.65±0.58	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	6400	3200
	Liposoma Pectina	8.63±0.24	8.02±0.25	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	6400	3200
	Liposoma Quitosano	8.98±0.56	7.98±0.39	2 <sup>6</sup>	2 <sup>5</sup>	6400	3200
4	Liposoma Vacío	0	0	N/A	N/A	0	0

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

	Nisina Libre	8.29±0.16	7.16±0.86	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	800	800
	Liposoma Nisina	7.91±0.02	6.54±0.7	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	1600	1600
	Liposoma Pectina	7.68±0.28	6.75±0.52	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	1600	1600
	Liposoma Quitosano	7.21±0.01	6.62±0.29	2 <sup>4</sup>	2 <sup>4</sup>	1600	1600
<b>6</b>	Liposoma Vacío	0	0	N/A	N/A	0	0
	Nisina Libre	8.07±1.64	6.22±0.1	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	400	400
	Liposoma Nisina	7.33±0.76	7.58±0.45	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	1600	800
	Liposoma Pectina	6.54±0.10	6.70±0.08	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	1600	800
	Liposoma Quitosano	7.50±0.47	7.17±0.65	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	800	800
<b>8</b>	Liposoma Vacío	0	0	N/A	N/A	0	0
	Nisina Libre	7.21±0.53	6.13±0.06	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	200	200
	Liposoma Nisina	7.38±0.89	5.74±0.54	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	800	800
	Liposoma Pectina	6.90±0.26	6.88±0.07	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	400	400
	Liposoma Quitosano	7.45±1.26	7.03±0.37	2 <sup>2</sup>	2 <sup>1</sup>	400	200

Inicialmente la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, tanto de nisina libre como encapsulada en liposomas, fue relevante generando halos de inhibición claros hasta las diluciones 2<sup>5</sup> y 2<sup>6</sup>; el liposoma vacío control no tuvo ninguna actividad antimicrobiana durante todo el experimento.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



**Figura 346.** Actividad antimicrobiana de liposomas contra *L. monocytogenes* (Lm) y *S. aureus* (Sa).

En general, la actividad disminuyó con el tiempo; sin embargo es claro que los liposomas protegieron la nisina encapsulada. Más aún, se encontró que los liposomas de nisina incluso protegieron mejor la actividad antimicrobiana de la nisina que los liposomas con recubrimiento biopolimérico (Figura 36 y Tabla 10, día 8).



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA











Los resultados sugieren que el uso de la nisina libre es poco eficiente y que ésta puede perder su estabilidad por interacciones con matrices alimentarias, como sugiere en la literatura (Takhistov, George, & Chikindas, 2009), de tal manera que la nisina encapsulada está ligada a la membrana por interacciones electrostáticas entre la parte catiónica de la nisina y la membrana aniónica del liposoma, protegiéndola de los componentes del alimento; así mismo, es importante efectuar un tratamiento térmico para que la nisina sea liberada de los liposomas y pueda actuar contra los microorganismos, de lo contrario, posiblemente esta nisina no esté disponible y no tenga ningún efecto antimicrobiano (en los experimentos iniciales de esta investigación esto fue justamente lo que se observó).









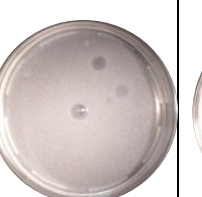

Por otra parte, la disminución paulatina de la actividad de la nisina en los liposomas *Stealth* sugiere la presencia de posibles interacciones de la nisina con la pectina y el quitosano, de manera que su efecto antimicrobiano final es menor que en los liposomas sin recubrimiento biopolimérico. Más aun, podría esperarse una sinergia de la actividad antimicrobiana del complejo nisina-polisacárido ya que muchos polisacáridos exhiben estos efectos, incluyendo pectina y quitosano (José M. Lagaron, María J. Ocio, & Amparo López-Rubio, 2012). Sin embargo esto plantea nuevas preguntas por dilucidar a través del diseño adecuado de experimentos para investigaciones futuras.

**Tabla 11.** Galería fotográfica de actividad antimicrobiana en función del tiempo contra microorganismos indicadores.

	Tiempo (Días)
--	---------------

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Bacteria/ Muestra	0	2	4	6	8
Lm /Liposoma Vacío					
Sa /Liposoma Vacío					

Bacteria/ Muestra	Tiempo (Días)				
	0	2	4	6	8
Lm/nisina libre					
Sa/nisina libre					

Bacteria/ Muestra	Tiempo (Días)				
	0	2	4	6	8

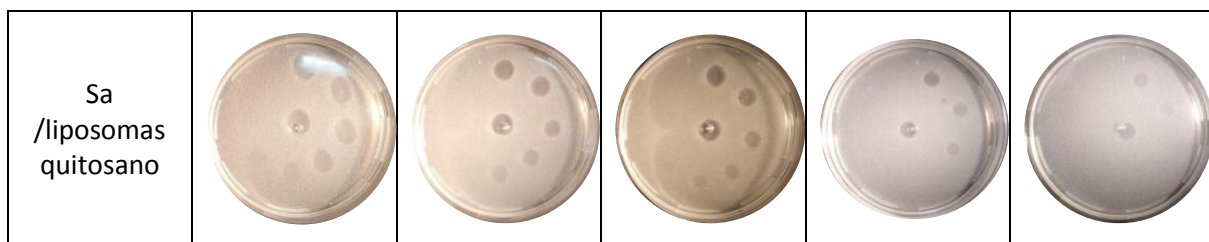
ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Lm /Liposomas nisina					
Sa /liposomas nisina					

Bacteria/ Muestra	Tiempo (Días)				
	0	2	4	6	8
La /Liposomas pectina					
Sa /liposomas pectina					

Bacteria/ Muestra	Tiempo (Días)				
	0	2	4	6	8
La /Liposomas quitosano					

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



## 8 Conclusiones

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- La concentración mínima inhibitoria (**CMI**) de nisina contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* determinada en medio líquido BHI fue de **180 UI/mL y 320 UI/mL**, respectivamente.
- Se estandarizó un protocolo para obtener liposomas elaborados a base de lecitina purificada, recubriéndolos con pectina o quitosano (liposomas *Stealth*)
- El tamaño promedio de los **liposomas vacíos** fue de **183 nm** con un **PDI de 0.16**, para **liposomas con nisina** de **201 nm** y **PDI de 0.21**, con recubrimiento polimérico de **205 nm** en el caso de **pectina** y **209 nm** con quitosano, con **PDI de 0.23 para ambos**. Por tanto, se fabricaron nano liposomas.
- La **eficiencia de encapsulamiento fue 87%, 95% y 92%** para liposomas con nisina, liposomas nisina/pectina y liposomas nisina/quitosano, respectivamente. Esta eficiencia fue sobresaliente.
- El potencia Z promedio para liposomas vacíos, con nisina, con nisina/pectina y con nisina/quitosano son de **-35 mV, -39 mV, -37mV y 22mV** respectivamente, sugiriendo buena estabilidad de los liposomas en suspensión acuosa.
- Los liposomas recubiertos mostraron un **revestimiento denso**, sugiriendo la incorporación de los **biopolímeros**, así como una morfología esférica mediante una microscopia de fuerza atómica.
- Los liposomas protegieron a la nisina de matrices complejas en un alimento modelo, manteniendo cierta actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, pero mayor que lo observado usando nisina libre. Esto abre la posibilidad del uso de estos sistemas en la bioconservación de alimentos.

## 9 Referencias

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., . . . Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8(1), 102.
- Allen, T. (1981). *Particle size measurement* (3rd ed.): Springer-Science+Business Media, B.V.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., . . . Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, 3(2), 203-230.
- Arrondo, J. L. R., Goñi, F. M., & Macarulla, J. M. (1984). Infrared Spectroscopy Of Phosphatidylcholines In Aqueous Suspension A Study Of The Phosphate Group Vibrations *Biochimica et Biophysica Acta*, 794, 165-168. doi: 10.1016/0005-2760(84)90310-2
- Badran, M. (2014). FORMULATION AND IN VITRO EVALUATION OF FLUFENAMIC ACID LOADED DEFORMABLE LIPOSOMES FOR IMPROVED SKIN DELIVERY. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 9(1).
- Balazs, D. A., & Godbey, W. (2011). Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv*, 2011, 326497. doi: 10.1155/2011/326497
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. d. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. d. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2002). Antibacterial Activities of Nisin Z Encapsulated in Liposomes or Produced In Situ by Mixed Culture during Cheddar Cheese Ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5607-5619. doi: 10.1128/aem.68.11.5607-5619.2002
- Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., & Leuenberger, H. (2005). In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int J Pharm*, 296(1-2), 44-54. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.02.032
- Boelter, J. F., & Brandelli, A. (2016). Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 145, 740-747. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.080
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 10, 975-999. doi: 10.2147/IJN.S68861
- Brandelli, A. (2012). Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol. 12, No. 8, 731-741.
- COFEPRIS. (2018). Protección contra Riesgos Sanitarios. In C. F. p. l. P. c. R. Sanitarios (Ed.). Mexico
- Cotter PD, H. C., Ross RP. (2005). BACTERIOCINS: DEVELOPING INNATE IMMUNITY FOR FOOD. *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*, 3, 1-12. doi: 10.1038/nrmicro1240
- Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. *J Dairy Sci*, 99(11), 8598-8606. doi: 10.3168/jds.2016-11658
- Chacko, J. (2008). *CONTROLLED RELEASE OF NISIN FROM A BIOPOLYMER BASED FILM FOR FOOD PACKAGING APPLICATIONS*. (Master of Science), The Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Chen H., H. D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 2, 19. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Chen, M., Liu, X., & Fahr, A. (2011). Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *Int J Pharm*, 408(1-2), 223-234. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.006
- da-Silva-Malheiros, P., Serafini-Micheletto, Y.-M., Pesce-da-Silveira, N., & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198-1203. doi: 10.1016/j.foodres.2010.02.015
- da-Silva, I.-M., Boelter, J. F., da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2014). Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(7). doi: 10.1007/s11051-014-2479-y
- da Silva, E. P., Sitta, D. L., Fragal, V. H., Cellet, T. S., Mauricio, M. R., Garcia, F. P., . . . Kunita, M. H. (2014). Covalent TiO(2)/pectin microspheres with Fe(3)O(4) nanoparticles for magnetic field-modulated drug delivery. *Int J Biol Macromol*, 67, 43-52. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.035
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21(6), 284-292. doi: 10.1016/j.tifs.2010.03.003
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2010). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiol*, 27(1), 175-178. doi: 10.1016/j.fm.2009.09.013
- da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552. doi: 10.1007/s11051-011-0278-2
- da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Utpott, M., & Brandelli, A. (2012). Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*, 23(1), 42-47. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.06.008
- De Cindio, B., Gabriele, D., & Lupi, F. R. (2016). Pectin: Properties Determination and Uses. In Elsevier (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 294-300).
- de Mello, M. B., da Silva Malheiros, P., Brandelli, A., Pesce da Silveira, N., Jantzen, M. M., & de Souza da Motta, A. (2013). Characterization and Antilisterial Effect of Phosphatidylcholine Nanovesicles Containing the Antimicrobial Peptide Pediocin. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 5(1), 43-50. doi: 10.1007/s12602-013-9125-3
- Degnan, A. J., & Luchansky, J. B. (1992). Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome-encapsulated pediocin AcH. *Journal of Food Protection*, 55(7), 552-554.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394. doi: 10.1081/drt-200063478
- Dosler, S., & Gerceker, A. A. (2012). In vitro activities of antimicrobial cationic peptides; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive bacteria. *J Chemother*, 24(3), 137-143. doi: 10.1179/1973947812Y.0000000007
- FDA. (2016). GRAS Notice No. 676. <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/default.htm>: Food and Drug Administration.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Fernández-Saiz, P. (2012). Chitosan and Chitosan Blends as Antimicrobials. In José M. Lagarón, María J. Ocio, & A. López-Rubio (Eds.), *Antimicrobial Polymers* (pp. 71-99.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Frenzel, M., Krolak, E., Wagner, A. E., & Steffen-Heins, A. (2015). Physicochemical properties of WPI coated liposomes serving as stable transporters in a real food matrix. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 527-534. doi: 10.1016/j.lwt.2015.03.055
- Frenzel, M., & Steffen-Heins, A. (2015). Whey protein coating increases bilayer rigidity and stability of liposomes in food-like matrices. *Food Chem*, *173*, 1090-1099. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.076
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, *120*(1-2), 51-70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001
- Gomaa, A. I., Martinent, C., Hammami, R., Fliss, I., & Subirade, M. (2017). Dual Coating of Liposomes as Encapsulating Matrix of Antimicrobial Peptides: Development and Characterization. *Front Chem*, *5*, 103. doi: 10.3389/fchem.2017.00103
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(7-8), 330-347. doi: 10.1016/j.tifs.2003.10.005
- Guevara Bretón, N., & Jiménez Munguía, T. (2008). Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, *2*, 36-49.
- Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International journal of nanomedicine*, *1*(3), 297.
- Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., Paris, C., Guedon, E., Linder, M., & Desobry, S. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1), 341-349. doi: 10.1016/j.lwt.2014.12.046
- Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, *1*, 801-832. doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747
- José M. Lagaron, María J. Ocio, & Amparo López-Rubio. (2012). *Antimicrobial polymers*: John Wiley & Sons, Inc.
- Karmali, P. P., & Chaudhuri, A. (2007). Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Med Res Rev*, *27*(5), 696-722. doi: 10.1002/med.20090
- Kaurinovic, B., & Popovic, M. (2012). Liposomes as a Tool to Study Lipid Peroxidation. doi: 10.5772/46020
- Khan, I., & Oh, D.-H. (2016). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *34*, 376-384. doi: 10.1016/j.ifset.2015.12.013
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, *41*, 103-125. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00049-X
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. O., Vuillemand, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325-336. doi: 10.1016/s0958-6946(02)00194-2
- Lopes, N. A., Pinilla, C. M. B., & Brandelli, A. (2017). Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior. *Food Hydrocolloids*, *70*, 1-7. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.03.016



ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- López-Cuellar, M. d. R., Rodríguez-Hernández, A.-I., & Chavarría-Hernández, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-12. doi: 10.1080/13102818.2016.1232605
- Malheiros Pda, S., Sant'Anna, V., Barbosa Mde, S., Brandelli, A., & Franco, B. D. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int J Food Microbiol*, 156(3), 272-277. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2012.04.004
- Malheiros, P. D. S., Daroit, D. J., Brandelli, A. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. . *Brazilian journal of microbiology*, 43 (4), 1414-1418.
- Malvern. (2013). *Zetasizer Nano. User Manual. MAN0485 Issue 1.1*. UK: Malvern Instruments Ltd.
- Mantsch, H. H., McElhaney, R.N. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 213-226. doi: 10.1016/0009-3084(91)90077-0
- Mirafzali, Z., Thompson, C. S., & Tallua, K. (2014). Application of Liposomes in the Food Industry. 139-150. doi: 10.1016/b978-0-12-404568-2.00013-3
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Wilson, R. A., Mandge, H. M., Manikantan, M. R., Malik, R. K., and Vij, S. (2013). Pediocin-loaded nanoliposomes and hybrid alginate–nanoliposome delivery systems for slow release of pediocin. . *Bionanoscience*, 3(1), 37-42. doi: 10.1007/s12668-012-0069-y
- Niaz, T., Shabbir, S., Noor, T., Rahman, A., Bokhari, H., & Imran, M. (2018). Potential of polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin Z against foodborne pathogens. *Lwt*, 96, 98-110. doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.029
- PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA. PRODUCTOS Y SERVICIOS. QUESOS: NO MADURADOS O FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS, ASI COMO LOS PRODUCTOS ELABORADOS CON INGREDIENTES, PROCEDIMIENTOS O ASPECTO SEMEJANTE. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. METODO DE PRUEBA. (2003).
- Nuñez, M., Tomillo, J., Gaya, P., & Medina, M. (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft*, 51(1), 7-10.
- O'Connor, P. M., O'Shea, E. F., Guinane, C. M., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2015). Nisin H Is a New Nisin Variant Produced by the Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. *Appl Environ Microbiol*, 81(12), 3953-3960. doi: 10.1128/AEM.00212-15
- OMS/WHO. (2015). ESTIMACIONES DE LA OMS SOBRE LA CARGA MUNDIAL DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA.
- OpenStax. (2013). *Biology*
- Parada, J. L., Ricoy Caron, C., Medeiros, Bianchi, A., Socol, C.R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*, 50.
- Pastor-Sánchez, R. (2006). Ecological niche altering: bacteria resistance to antibiotics. *Garceta Sanitaria*, 20, 75-81. doi: 10.1157/13086041
- Perez, R., Perez, M. T., & Elegado, F. (2015). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*, 8(2), 61-67. doi: 10.18191/2015-08-2-027

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Pinilla, C. M., Norena, C. P., & Brandelli, A. (2017). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. *Food Chem*, *220*, 470-476. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.027
- Pinilla, C. M. B., & Brandelli, A. (2016). Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *36*, 287-293. doi: 10.1016/j.ifset.2016.07.017
- Putri, D. C. A., Dwiastuti, R., Marchaban, M., & Nugroho, A. K. (2017). Optimization of Mixing Temperature and Sonication Duration in Liposome Preparation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*, *14*(2), 79-85. doi: 10.24071/jpsc.142728
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, *05*(18), 1765-1775. doi: 10.4236/fns.2014.518190
- Ramírez, R., J.C., Rosas, Ulloa, P., Velázquez, González M., Ulloa, A.J., Arce, Romero, F. (2011, Abril-Junio). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuentes* *7*, 16.
- Rao, D., Chawan, C., & Veeramachaneni, R. (1994). Liposomal encapsulation of  $\beta$ -galactosidase: comparison of two methods of encapsulation and in vitro lactose digestibility. *Journal of food biochemistry*, *18*(4), 239-251.
- Reineccius, G. A. (1995). Liposomes for Controlled Release in the Food Industry. *590*, 113-131. doi: 10.1021/bk-1995-0590.ch011
- Rivera-Hernández, L. (2017). *Caracterización de la transferencia de masa de nisina desde una película de pectina/gelana hacia un sistema modelo*. (Maestría), UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, Tulancingo de Bravo, Hgo., México.
- Rollema, H. S., Metzger, J. W., Both, P., Kuipers, O. P., & Siezen, R. J. (1996). Structure and Biological Activity of Chemically Modified Nisin A Species. *European Journal of Biochemistry*, *241*(3), 716-722. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.00716.x
- S. S. Bansode, S. K. B., D. D. Gaikwad, S. L. Jadhav, R. M. Thorat. (2010). MICROENCAPSULATION : A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *1*(2), 6.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol*, *6*, 286. doi: 10.3389/fphar.2015.00286
- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *33*(6), 501-547. doi: 10.1080/10408399309527645
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, *18*(4), 329-343. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.009
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *70*, 331-345.
- Swetwathana, A., & Visessanguan, W. (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Sci*, *109*, 101-105. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.05.030
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *45*(7-8), 587-605. doi: 10.1080/10408390591001135
- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of Antimicrobial-bearing Liposomes by  $\zeta$ -Potential, Vesicle Size, and Encapsulation Efficiency. *Food Biophysics*, *2*(1), 1-9. doi: 10.1007/s11483-007-9023-x

## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

- Trejo-González, L. (2016). *Diseño y caracterización de películas de gelana-pectina adicionadas con bacteriocinas y EDTA, con actividad antimicrobiana contra Listeria monocytogenes, Escherichia coli y Staphylococcus aureus en medios a base de barbacoa estilo Tulancingo (Maestria)*, universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México
- Trejo-González, L., Rodríguez-Hernández, A.-I., del Rocío López-Cuellar, M., Martínez-Juárez, V.-M., & Chavarría-Hernández, N. (2018). Antimicrobial pectin-gellan films: effects on three foodborne pathogens in a meat medium, and selected physical-mechanical properties. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 469-476. doi: 10.1080/19476337.2017.1422278
- Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., & Fliss, I. I. (2004). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *Int J Food Microbiol*, 90(3), 283-293. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00315-5
- Ulrich, S. A. (2002). Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Reports*, 22, 1-22.
- Ville, H., Maes, G., De Schrijver, R., Rombouts, G., Spincemaille, G., Geers, R. (1995). Determination of Phospholipid Content of Intramuscular Fat by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Meat Science*, 41(3), 283-291. doi: 10.1016/0309-1740(95)00007-8
- Were, L. M., Bruce, B., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2004). Encapsulation of Nisin and Lysozyme in Liposomes Enhances Efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 67(5), 922-927. doi: 10.4315/0362-028x-67.5.922
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 3(2), 163-175. doi: 10.1038/nprot.2007.521
- Wilson-Stanford, S., Kalli, A., Hakansson, K., Kastrantas, J., Orugunty, R. S., & Smith, L. (2009). Oxidation of lanthionines renders the lantibiotic nisin inactive. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1381-1387. doi: 10.1128/AEM.01864-08
- Woodle, M. C., & Lasic, D. D. (1992). Sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1113(2), 171-199.
- Zou, Y., Lee, H. Y., Seo, Y. C., & Ahn, J. (2012). Enhanced antimicrobial activity of nisin-loaded liposomal nanoparticles against foodborne pathogens. *J Food Sci*, 77(3), M165-170. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02580.x

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



Ciudad de México, México, 22 de Febrero de 2019

Estimad@s Colegas:

**JOEL ISLAS-CUELLAR, ADRIANA INÉS RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, MA. DEL ROCÍO LÓPEZ-CUELLAR, VICTOR MANUEL MARTÍNEZ-JUÁREZ, JOSÉ JUAN GERVACIO-ARCINIEGA, NORBERTO CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ**

Agradecemos sinceramente el interés por participar en el XL Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ) y por este conducto se le informa que su trabajo:

**1031 ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANO-LIPOSOMAS CONTENIENDO NISINA, RECUBIERTOS CON PECTINA CÍTRICA O QUITOSANO**

ha sido aceptado para su presentación en la sesión de INGENIERÍA DE ALIMENTOS en la modalidad ORAL.

A partir del 18 de marzo de 2019 consulte el programa completo en nuestra página web [www.amidiq.com](http://www.amidiq.com) para conocer el día y hora precisa de su presentación. Recuerde que tiene hasta el viernes 22 de marzo de 2019 para sustituir el resumen de dos páginas por su trabajo en extenso en la plataforma OpenConf.

A nombre de la AMIDIQ le agradecemos su participación y esperamos tener la oportunidad de saludarlo personalmente en Bahías de Huatulco, Oaxaca.

Atentamente

COMITÉ TÉCNICO AMIDIQ 2019

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANO-LIPOSOMAS CONTENIENDO NISINA, RECUBIERTOS CON PECTINA CÍTRICA O QUITOSANO

Joel Islas-Cuellar<sup>a</sup>, Adriana Inés Rodríguez-Hernández<sup>a</sup>, Ma. del Rocío López-Cuellar<sup>a</sup>, Víctor Manuel Martínez-Juárez<sup>a</sup>,

José Juan Gervacio-Arciniega<sup>b</sup>, Norberto Chavarría-Hernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600, México.

[joelislascuellar@gmail.com](mailto:joelislascuellar@gmail.com); [norchavarría@gmail.com](mailto:norchavarría@gmail.com)

<sup>b</sup>CONACyT-Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, C.P. 72570, México.

### Resumen

Se encapsuló nisina (Nis) mediante nano-liposomas de fosfatidilcolina, recubiertos con pectina cítrica (LR-Nis-PC) y quitosano (LR-Nis-Q), los cuales exhibieron tamaños promedio, índice de polidispersidad (IPD) y potencial Z de  $205 \pm 8.7$  nm,  $0.21 \pm 0.08$  (-),  $-48.02 \pm 7.35$  mV, y  $179 \pm 5.3$  nm,  $0.21 \pm 0.07$  (-),  $+24 \pm 2.99$  mV, respectivamente. El porcentaje de encapsulación de Nis fue mayor del 92%. Los liposomas recubiertos con biopolímeros fueron estables durante 8 días en condiciones de refrigeración; los controles sin recubrir, lo fueron durante 6 días (a los 8 días, éstos últimos exhibieron tamaños de 350 nm con IPD de 0.36 (-)). La Nis nano-encapsulada mediante liposomas conservó gran actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* durante todo el experimento, mientras que la Nis sin encapsular perdió rápidamente su actividad antimicrobiana.

### Introducción

El uso de péptidos antimicrobianos, específicamente bacteriocinas, ha demostrado ser eficaz en la industria alimentaria y farmacéutica [1], y en años recientes se plantean aplicaciones más diversas con el advenimiento de la nanotecnología (National Nanotechnology Initiative; <https://www.nano.gov>), particularmente a través del uso de nano-cápsulas conteniendo bacteriocinas para distintos propósitos [2]. Las bacteriocinas son producidas principalmente por bacterias ácido lácticas (BAL), de entre las cuales la nisina (Nis) es la más estudiada y usada [1]. Por otra parte, dentro las tecnologías de encapsulación para proteger a la Nis y promover su liberación controlada, encontramos la encapsulación en liposomas, y dentro de éstos, se encuentran los liposomas recubiertos con polímeros para asegurar una mayor protección en distintos ambientes [3].

El objetivo del presente trabajo fue encapsular Nis mediante liposomas (L-Nis) y liposomas recubiertos (LR-Nis), éstos últimos con pectina cítrica (PC) o quitosano (Q), determinándose el % de encapsulación de Nis (%E). Los liposomas fueron caracterizados en su tamaño, índice de polidispersidad (IPD), potencial Z (pZ), estabilidad y actividad antimicrobiana (AM) contra *Listeria monocytogenes* (Lm) y *Staphylococcus aureus* (Sa).

### Metodología

Se purificó fosfatidilcolina a partir de lecitina de soya, usando acetato de etilo. Se determinó la concentración mínima inhibitoria de Nis contra Lm y Sa en placas ELISA usando espectrómetro lector (545-630 nm). Luego se fabricaron los L-Nis encapsulando Nis mediante el método de hidratación de película delgada [4] usando solución de Nis 20,000 UI/mL en regulador de fosfatos 10 mM, pH 7. Para fabricar los LR-Nis, L-Nis fueron agitados y calentados a 60°C para mezclarse con solución de PC o Q, 1 mg/mL, seguido de sonicación por 30 min en baño ultrasónico, manteniéndose a 25°C. La eficiencia de encapsulación de Nis (%E) fue determinada con ayuda de HPLC 1260 Infinity. Los liposomas obtenidos fueron caracterizados en su tamaño, IPD y pZ, mediante equipo Zetasizer Nano-ZS, y fotografiados por microscopía de fuerza atómica (AFM) usando un equipo Park XE7 en modo *non-contact*. La estabilidad



## ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

de liposomas fue evaluada en presencia de agar BHI+extracto de carne 1%, simulando un alimento, durante 8 días en refrigeración, tomando muestras cada 2 días, determinando tamaño, IPD y pZ; la AM fue evaluada por el método de dilución crítica en placas de BHI suave inoculadas con Lm o Sa. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron sujetos de ANOVA y comparación de medias Tukey ( $p < 0.05$ )

### Resultados

Se encontró una MIC de 180 UI/mL para Lm y de 320 UI/mL para Sa. Otros autores han reportado datos de MIC contra estos microbios, los cuales pueden diferir por las distintas condiciones experimentales usadas; sin embargo, la concentración de Nis para inhibir Sa usualmente es mayor que la correspondiente para inhibir Lm. Zou et al. [5] reportaron MICs de 320 y 640 UI/mL para Lm y Sa, respectivamente. Con base en estos resultados, se determinó la concentración de Nis para el encapsulamiento mediante liposomas. La Tabla 1 presenta las características de los liposomas fabricados.

Tabla 1. Algunas características de los liposomas fabricados para encapsular Nis

	L control	L-Nis	LR-Nis-PC	LR-Nis-Q
Tamaño (nm)	156.3±5.3 <sup>a</sup>	193±8.6 <sup>b</sup>	205±8.7 <sup>c</sup>	179±5.3 <sup>b</sup>
IPD (-)	0.11±0.04 <sup>a</sup>	0.19±0.07 <sup>a</sup>	0.21±0.08 <sup>a</sup>	0.21±0.07 <sup>a</sup>
pZ (mV)	-38±10.56 <sup>a</sup>	-52.02±5.31 <sup>a</sup>	-48.02±7.35 <sup>a</sup>	+24±2.99 <sup>b</sup>
%E	-	86±3.1 <sup>a</sup>	95±2.5 <sup>b</sup>	92±1.4 <sup>b</sup>

Letras distintas en superíndices indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

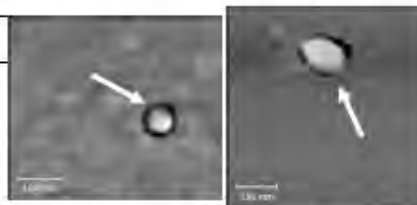


Figura 1. Micrografías AFM: a) L-Nis; b) LR-Nis-Q

Los liposomas fabricados se ubicaron en la categoría de nanoliposomas, con una distribución monomodal y estabilidad conveniente, dados los valores de IPD y pZ asociados. También se determinó que los liposomas menos estables fueron los L-Nis, exhibiendo tamaños de 350 nm con IPD de 0.36 (-) a los 8 días, mientras que al mismo tiempo de observación, los liposomas recubiertos con PC y Q exhibieron tamaños promedio de 240 nm con IPD de 0.24 (-). Por otra parte, los liposomas-Nis exhibieron una AM notable contra Lm y Sa durante el tiempo que duró el experimento.

### Conclusiones

Se logró encapsular nisina mediante nanoliposomas a base de fosfatidilcolina, recubiertos con pectina cítrica o quitosano. Los liposomas recubiertos fueron estables durante al menos una semana, conservando la actividad antimicrobiana de la nisina encapsulada.

### Referencias

- Deegan, L.H., et al., *Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension*. International Dairy Journal, 2006. 16(9): p. 1058-1071.
- López-Cuellar, M.d.R., A.-I. Rodríguez-Hernández, and N. Chavarria-Hernández, *LAB bacteriocin applications in the last decade*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2016. 30(6): p. 1039-1050.
- Lopes, N.A., C.M.B. Pinilla, and A. Brandelli, *Pectin and polygalacturonic acid-coated liposomes as novel delivery system for nisin: Preparation, characterization and release behavior*. Food Hydrocolloids, 2017. 70: p. 1-7.
- da Silva Malheiros, P., et al., *Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin*. Food Research International, 2010. 43(4): p. 1198-1203.
- Zou, Y., et al., *Enhanced antimicrobial activity of nisin-loaded liposomal nanoparticles against foodborne pathogens*. J Food Sci, 2012. 77(3): p. M165-70.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA



August 24<sup>th</sup>, 2018

ID 289

Dear colleague

We are pleased to inform that the work:

**Preparation and characterization of pectin-chitosan covered nano-liposomes entrapping nisin**

Authored by:

Islas-Cuellar, J., López-Cuellar, M.R., Rodríguez-Hernández, A.I., Martínez-Juárez, V.M., Gervacio-Arciniega, J.J., Chavarría-Hernández, N.

has been ACCEPTED for POSTER presentation during the Latin Food 2018 congress. In short, we will let you know the date and time of your presentation.

On behalf of the organizing committee, we thank you for your participation and we are looking forward to greet you from November the 14<sup>th</sup> to 16<sup>th</sup> at Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.

Sincerely  
Organizing Committee,  
Latin Food 2018

N.B. Each delegate to Latin Food 2018, who paid her/his registration fee, may present up to two works either as a poster or oral presentation.

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS ENCAPSULADOS EN SOPORTES BIOPOLIMÉRICOS, CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Food Biotechnology

**Preparation and characterization of pectin-chitosan covered nano-liposomes entrapping nisin**

Islas-Cuellar, J.<sup>1,2</sup>, López-Cuellar, M.R.<sup>1,2</sup>, Rodríguez-Hernández, A.I.<sup>1,2</sup>, Martínez-Juárez, V.M.<sup>2</sup>, Gervacio-Arciniega, J.J.<sup>3</sup>, Chavarría-Hernández, N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, <sup>2</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad Km.1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600, México.

<sup>3</sup>CONACyT-Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, C.P. 72570, México.  
E-mail: joelislascuellar@gmail.com

**Introduction.** Antimicrobial peptides are conservatives in food applications; however, low stability, proteolytic degradation and interactions with surrounding substances could affect its antimicrobial activity (AM). The encapsulation of bacteriocins within liposomes is an alternative to overcome the former drawbacks. The aim of the present work was the elaboration of conventional liposomes (NL) and stealth liposomes (SNL) for nisin encapsulation. Both NL and SNL were characterized in their size, polydispersity index (PDI), Z potential and AM against *Listeria monocytogenes* (Lm) and *Staphylococcus aureus* (Sa). **Methodology.** Nisin was encapsulated in purified soy lecithin liposomes (NL) by the thin film hydration method with ultrasound assistance. The encapsulation efficiency (EE) was determined based on HPLC. To prepare SNL liposomes, samples of NL were covered with citric pectin (CP) or chitosan (Ch). The size and Z potential of liposomes were determined with a Zetasizer nano-ZS ZEN 3600 equipment, the morphology with a Park XE7 atomic force microscope (AFM) in the non-contact mode, and the AM by the microbial growth inhibition in solid cultures of Lm and Sa. **Results.** The average size, PDI and Z potential were 156.3±5.3 nm, 0.11±0.04, -38±10.56 mV; 193±8.6 nm, 0.19±0.07, 52.02±5.31 mV; 205±8.7 nm, 0.2±0.07, 48.02±7.35 mV; and 179±5.3 nm, 0.21±0.07, +24±2.99 mV, for empty, NL, CP-SNL and Ch-SNL liposomes, respectively. The EE values were in the range 86±3.1% to 95±2.5%. The AFM showed spheroidal liposomes (100-150 nm) with dense biopolymer coatings in the case of SNL samples. Currently, work is being done concerning the stability and AM of liposomes. **Conclusion.** The obtained liposomes were in the nanoscale with low PDI values and high EE. Also, the Z potential values suggested acceptable stability.

**Key words:** Liposomes, biopolymers, stealth liposomes, nisin, Z potential