



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS

“Nanoencapsulación de la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26 por
microfluidización”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

PRESENTA:

M. C. JOSÉ ALEXIS GARCÍA TOLEDO.

ASESORES:

DRA. PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA.

DRA. BEATRIZ TORRESTIANA SÁNCHEZ.

DRA. CECILIA E. MARTÍNEZ SÁNCHEZ.

H. VERACRUZ, VERACRUZ.

FEBRERO DE 2018.

DEDICATORIA

A Dios por regalarme su bendición en cada etapa de mi vida.

A mi Madre Alma Rosa, a mi Padre José Abel y a mi hermana Vilda Astrid, que siempre han estado a mi lado con su inagotable apoyo y amor.

A mi amada esposa Sue Nadyelly, mi gran amor, por no dejarme caer, por tener las palabras adecuadas, las acciones correctas y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mi hija Leah Samantha, que llegó a mi vida para darle un giro radical y convertirse en el amor de mi vida, gracias mi bolita de oro, espero no fallarte y ser el mejor ejemplo para ti.

A todos los amigos que coseché en la UNIDA durante este trayecto. Con todos ustedes la vida de laboratorio fue más amena. Gracias amigos

RECONOCIMIENTOS

A la Dra. Patricia G. Mendoza García, por todo el apoyo, tiempo, paciencia y recursos para el desarrollo de este proyecto. Por confiar en mí y darme la oportunidad de ser su alumno.

A la Dra. Beatríz Torrestiana Sánchez y a la Dra. Cecilia E. Martínez Sánchez, por las valiosas revisiones, apoyo y orientación.

Al Dr. José Manuel Andrade Tejero, al Dr. Hugo Sergio García Galindo y a la Dra. Cynthia Cano Sarmiento, por su invaluable colaboración en la revisión, sugerencias y opiniones.

Al Dr. Arturo García Bórquez, por el apoyo durante la estancia en la Escuela Superior de Física y Matemáticas del IPN, al Dr. Raúl Borga Urbi y al Dr. Nicolás Cayetano Castro por su valioso apoyo durante la Cryo-TEM en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología del IPN.

A la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos y al Tecnológico Nacional de México/Veracruz, por el apoyo económico y material recibido durante el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento durante el programa de Doctorado en Ciencias en Alimentos.

RESUMEN

García Toledo, José Alexis. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, Instituto Tecnológico Nacional de México/Veracruz. Febrero de 2018. “**Nanoencapsulación de la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26 por microfluidización**”. Asesores: Dra. Patricia G. Mendoza García, Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dra. Cecilia E. Martínez Sánchez.

La pediocina, es un bioconservador con alta especificidad contra *Listeria monocytogenes*. Al ser adicionada en forma libre en un alimento se ve afectada su actividad antimicrobiana por inactivación por enzimas proteolíticas o interacción con los componentes del alimento. Por lo que es necesario protegerla por métodos de nanoencapsulación y evaluar su liberación. Los liposomas resultan convenientes para proteger compuestos como la pediocina. La pediocina se obtuvo a partir de *P. acidilactici* ITV26, se purificó por el método de adsorción-desorción. Se elaboraron los liposomas empleando un rotor-stator y posteriormente un microfluidizador, usando 1, 3 y 5% (p/v) de un refinado de fosfatidilcolina de soya (PC) a presión de 500 y 1000 bar y 2 ciclos, se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación, se caracterizaron los liposomas mediante dispersión de luz dinámica, luz retrodispersa, calorimetría diferencial de barrido y microscopía electrónica de transmisión criogénica, se realizaron cinéticas de liberación a diferentes valores de pH, se hicieron cinéticas de crecimiento de *Listeria innocua* AST-062 con la bacteriocina en forma libre y encapsulada en liposomas. Los resultados mostraron una disminución en el tamaño de partícula del pre-tratamiento con el rotor-stator de 5750 nm a 144 nm, utilizando el equipo microfluidizador se obtuvieron liposomas unilamelares de doble capa y se alcanzaron eficiencias de encapsulación de hasta 88%, los liposomas elaborados con 3% y 5% (p/v) de PC, 500 bar y 1 ciclo de microfluidización fueron los más estables de acuerdo a los resultados de potencial zeta y luz retrodispersa, la bacteriocina fue estable y tuvo una liberación lenta a pH 6.8, se logró disminuir hasta 2 unidades logarítmicas el crecimiento de *L. innocua* AST-062.

ABSTRACT

García Toledo, José Alexis. Ph.D. Food Science. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, Instituto Tecnológico de Nacional de México/Veracruz. February 2018. **“Nanoencapsulación de la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26 por microfluidización”**. Advisors: Ph.D. Patricia G. Mendoza García, Ph.D. Beatriz Torrestiana Sánchez, Ph.D. Cecilia E. Martínez Sánchez.

Pediocin is a bioconservative with high specificity against *Listeria monocytogenes*. When it is added in a free form in a food, its antimicrobial activity is affected by inactivation by proteolytic enzymes or interaction with the food components. It is necessary to protect it by nanoencapsulation methods and evaluate its release. Liposomes are convenient for protecting compounds such as pediocin. Pediocin was obtained from *P. acidilactici* ITV26, purified by the adsorption-desorption method. The liposomes were elaborated using a rotor-stator and later a microfluidizer, using 1, 3 and 5% (w/v) of a soy phosphatidylcholine refining (PC) at a pressure of 500 and 1000 bar and 2 cycles, the percentage of encapsulation efficiency were calculated, the liposomes were characterized by dynamic light scattering, backscattered light, differential scanning calorimetry and cryogenic transmission electron microscopy, release kinetics were performed at different pH values, growth kinetics of *Listeria innocua* AST-062 were made with the bacteriocin in free form and encapsulated into liposomes. The results showed a decrease in the particle size of the pre-treatment with the rotor-stator from 5750 nm to 144 nm, using the microfluidizer equipment double layered unilamellar liposomes were obtained and encapsulation efficiencies of up to 88% were achieved, the liposomes elaborated with 3% and 5% (w/v) of PC, 500 bar and 1 cycle of microfluidization were the most stable according to the results of zeta potential and backscattered light, the bacteriocin was stable and had a slow release at pH 6.8, the growth of *L. innocua* AST-062 was reduced by 2 logarithmic units.

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| CONTENIDO | vi |
| LISTA DE TABLAS | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. Estado del arte..... | 4 |
| 1.1. Bacterias ácido-lácticas..... | 4 |
| 1.2. Bacteriocinas..... | 4 |
| 1.2.1. Clasificación de las bacteriocinas..... | 5 |
| 1.2.2. Modo de acción de las bacteriocinas..... | 8 |
| 1.2.3. Estabilidad al pH y altas temperaturas | 8 |
| 1.3. Pediocina PA-1..... | 10 |
| 1.3.1. Espectro de inhibición | 11 |
| 1.4. <i>Pediococcus acidilactici</i> | 12 |
| 1.5. <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV26 | 13 |
| 1.5.1. Espectro de inhibición de la bacteriocina producida por <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV26..... | 13 |
| 1.5.2. Propiedades fisicoquímicas..... | 15 |
| 1.5.3. Solubilidad de la pediocina..... | 16 |
| 1.6. Métodos de cuantificación de la actividad antimicrobiana..... | 16 |
| 1.6.1. Microensayos en microplacas | 16 |
| 1.6.2. Inmunoensayos enzimáticos | 16 |
| 1.6.3. Difusión en agar | 17 |
| 1.7. Purificación de bacteriocinas..... | 18 |
| 1.8. Alcances y limitaciones de la pediocina | 19 |
| 1.2.4. Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en alimentos..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 1.9. Funciones de la encapsulación | 21 |
| 1.10. Encapsulación de compuestos con actividad funcional..... | 22 |
| 1.11. Microencapsulación..... | 22 |
| 1.12. Nanoencapsulación..... | 23 |
| 1.13. Métodos de nanoencapsulación..... | 23 |
| 1.14. Liposomas..... | 24 |
| 1.14.1. Fosfolípidos..... | 24 |
| 1.14.2. Clasificación de los liposomas según su estructura física..... | 27 |
| 1.14.3. Proceso de formación..... | 27 |
| 1.14.4. Aplicaciones nutricionales de los liposomas..... | 28 |
| 1.18. Investigaciones sobre encapsulación de bacteriocinas en liposomas..... | 30 |
| 1.14.5. Los liposomas como sistemas de liberación controlada..... | 33 |
| 1.15. Métodos para producción de liposomas..... | 34 |
| 1.15.1. Hidratación de película fina..... | 34 |
| 1.15.2. Ultrasonificación..... | 35 |
| 1.15.3. Evaporación en fase reversa..... | 35 |
| 1.15.4. Extrucción por membrana..... | 35 |
| 1.15.5. Microfluidización..... | 36 |
| 1.16. Separación de la fracción no encapsulada..... | 37 |
| 1.17. Caracterización de los sistemas encapsulados..... | 38 |
| 1.17.1. Tamaño de partícula..... | 38 |
| 1.17.2. Determinación del potencial zeta..... | 39 |
| 1.17.3. Turbiscan (Luz retrodispersa)..... | 40 |
| 1.17.4. Análisis térmico..... | 41 |
| 1.17.5. Técnicas microscópicas..... | 41 |
| 1.19. Investigaciones realizadas en el Instituto Tecnológico de Veracruz..... | 42 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 45 |
| HIPOTESIS..... | 46 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 47 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 47 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 48 |
| 2.1. Bacterias y condiciones de crecimiento..... | 48 |

| | |
|--|----|
| 2.1.1. Reactivación de la cepa productora de bacteriocina | 48 |
| 2.2. Obtención de la bacteriocina en extracto libre de células..... | 48 |
| 3.2. Obtención de la bacteriocina en forma de extracto libre de células..... | 49 |
| 2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar | 49 |
| 2.4. Purificación de la bacteriocina | 50 |
| 2.5. Ultrafiltración y liofilización de la bacteriocina | 51 |
| 2.6. Electroforesis SDS-PAGE. | 51 |
| 2.7. Determinación del contenido de proteína | 52 |
| 2.8. Diseño experimental..... | 52 |
| 2.9. Encapsulación de la bacteriocina | 53 |
| 2.9.1. Preparación de los liposomas..... | 53 |
| 2.10.2. Separación de la fracción no encapsulada: Cromatografía de filtración en gel..... | 53 |
| 2.10. Caracterización de los liposomas..... | 54 |
| 2.10.1. Análisis del tamaño de las microcápsulas | 54 |
| 2.10.2. Determinación del potencial zeta..... | 55 |
| 2.10.3. Cinéticas de estabilidad (Turbiscan)..... | 55 |
| 2.10.4. Microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-TEM)..... | 55 |
| 2.10.5. Microscopía confocal de barrido láser | 56 |
| 2.10.6. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC)..... | 56 |
| 2.11. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE)..... | 57 |
| 2.12. Estudios de liberación de la pediocina <i>In vitro</i> | 57 |
| 2.13. Inhibición del crecimiento | 58 |
| 2.14. Análisis estadístico | 58 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 61 |
| 3.1. Cinética de crecimiento de <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV26 | 61 |
| 3.3. Purificación de la bacteriocina..... | 62 |
| 3.4. Determinación de la presencia y tamaño del péptido empleando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) | 65 |
| 3.5. Resultados de actividad antimicrobiana | 66 |
| 3.6. Caracterización fisicoquímica de la bacteriocina encapsulada en liposomas | 68 |

| | |
|---|-----|
| 3.6.1. Dispersión de luz dinámica..... | 68 |
| 3.6.1. Potencial zeta | 73 |
| 3.6.2. Luz retrodispersa..... | 75 |
| 3.6.3. Calorimetría diferencial de barrido..... | 79 |
| 3.6.4. Microscopía electrónica de transmisión criogénica | 81 |
| 3.7. Eficiencia de encapsulación | 85 |
| 3.8. Cinéticas de liberación | 86 |
| 3.9. Inhibición del crecimiento de <i>Listeria innocua</i> AST-062 por la bacteriocina encapsulada en liposomas | 90 |
| CONCLUSIONES | 93 |
| RECOMENDACIONES..... | 94 |
| REFERENCIAS | 95 |
| APÉNDICE A..... | 106 |
| APÉNDICE B..... | 107 |
| APÉNDICE C | 107 |
| APÉNDICE D | 108 |
| APÉNDICE E..... | 110 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| TABLA 1.1. Clasificación de las bacteriocinas..... | 6 |
| TABLA 1.2. Cepas bacteriocinogénicas del Género <i>Pediococcus</i> | 7 |
| TABLA 1.3. Producción de pediocinas PA-1/AcH y PD-1 por diferentes especies de | 7 |
| TABLA 1.4. Espectro de inhibición de la pediocina producida por <i>P. acidilactici</i> ITV26..... | 14 |
| TABLA 1.5. Algunas propiedades fisicoquímicas de la pediocina PA-1..... | 15 |
| TABLA 1.6. Grupos salientes más comunes en la naturaleza, con los nombres de los fosfolípido correspondientes. | 25 |
| TABLA 1.7. Composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina de soja (SPC) y de huevo (EPC). | 26 |
| TABLA 1.8. Caracterización de sistemas encapsulados..... | 38 |
| TABLA 1.9. Relación de estabilidad y potencial zeta de una suspensión..... | 40 |
| TABLA 2.10. Valores reales y codificados en el diseño factorial completo 3x2x2 sobre la nanoencapsulación de la bacteriocina de <i>P. acidilactici</i> ITV26..... | 52 |
| TABLA 3.11. Tabla de purificación..... | 67 |
| TABLA 3.12. Valores de TSI global | 79 |
| TABLA 3.13. Tamaños de partícula..... | 83 |
| TABLA 3.14. Eficiencia de encapsulación..... | 85 |
| TABLA 3.15. Velocidades de liberación..... | 87 |
| TABLA 3.16. Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>Listeria innocua</i> AST-062 | 91 |
| TABLA A.16. Medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe). | 106 |
| TABLA A.17. Medio de cultivo LB (Lauria-Bertoni). | 106 |
| TABLA A.18. Formulaciones SDS-PAGE | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.1. Modo de acción de Bacteriocinas Clase II familia de las pediocinas (Ej. Sakacina), Clase I (Ej. Nisina), Bacteriolisinas (Ej. Lisostafina) (Cotter <i>et al.</i> , 2005). | 9 |
| FIGURA 1.2. Modelo tridimensional predicho de la estructura terciaria de 19 aminoácidos N-terminales de la pediocina PA-1. | 12 |
| FIGURA 1.3. Diagrama del mecanismo de microfluidización. | 37 |
| FIGURA 3.4. Cinética de crecimiento, pH y actividad antimicrobiana de <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV26..... | 61 |
| FIGURA 3.5. SDS-Page de la bacteriocina de <i>P. acidilactici</i> ITV26 empleando diferentes concentraciones de NaCl para la purificación: (1) 500 mM, (2) 400 mM, (3) 300 mM, (4) 200 mM, (5) 100 mM y (6) Marcador molecular. | 62 |
| FIGURA 3.6. Prueba de actividad antimicrobiana de los extractos a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 mM y el extracto libre de células (ELC)..... | 63 |
| FIGURA 3.7. Electroforesis SDS-PAGE de la bacteriocina purificada de <i>Pediococcus acidilactici</i> ITV 26..... | 64 |
| FIGURA 3.8. Prueba de actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones. (1) Paquete celular, (2) Retenido de 10 kDa, (3) Retenido de 3 kDa y (4) Permeado de 3KDa..... | 65 |
| FIGURA 3.9. Curva estándar de peso molecular. | 66 |
| FIGURA 3.10. Tamaño de partícula de los liposomas encapsulando a la pediocina con 1, 3 y 5% (p/v) de PC, usando (A) 500 y (B) 1000 bar de presión de microfluidización. | 69 |
| FIGURA 3.11. Distribución de tamaño de partícula de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5 % (p/v) de PC, a 500 bar de presión con 0, 1 y 2 ciclos de microfluidización. | 71 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 3.12. Distribución de tamaño de partícula de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5 % (p/v) de PC, a 1000 bar de presión con 0, 1 y 2 ciclos de microfluidización. | 72 |
| FIGURA 3.13. Valores de potencial zeta de los liposomas encapsulando a la pediocina con 0, 1 y 2 ciclos, usando 1, 3 y 5% (p/v) de PC, a (A) 500 y (B) 1000 bar de presión de microfluidización..... | 74 |
| FIGURA 3.14. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 1% (p/v) de PC, a 500 bar de presión de microfluidización. | 76 |
| FIGURA 3.15. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 1% (p/v) de PC, a 1000 bar de presión de microfluidización..... | 76 |
| FIGURA 3.16. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 3% (p/v) de PC, a 500 bar de presión de microfluidización. | 77 |
| FIGURA 3.17. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 3% (p/v) de PC, a 1000 bar de presión de microfluidización..... | 77 |
| FIGURA 3.18. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 5% (p/v) de PC, a 500 bar de presión de microfluidización. | 78 |
| FIGURA 3.19. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 5% (p/v) de PC, a 1000 bar de presión de microfluidización..... | 78 |
| FIGURA 3.20. Termograma DSC; Presión de microfluidización: 500 bar, Concentración de PC: 3%, con 1 ciclo de microfluidización. | 80 |
| FIGURA 3.21. Micrografías de Cryo-TEM de los liposomas encapsulando a la pediocina | 82 |
| FIGURA 3.22. Microscopía confocal de barrido láser de la pediocina encapsulada en liposomas con 3% (p/v) de PC usando homogenización mediante rotor-stator (Ciclo 0). | 84 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 3.23. Cinéticas de liberación de la pediocina encapsulada en liposomas | 88 |
| FIGURA 3.24. Cinéticas de liberación de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5% (p/v) de PC a 1000 bar de presión de microfluidización. | 89 |
| FIGURA 3.25. Cinética de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> AST-062..... | 91 |
| FIGURA E.26. Curva patrón de albúmina de suero bovino para la determinación de proteína..... | 111 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos gram-positivos, que intervienen en la obtención y producción de numerosos alimentos fermentados y en el desarrollo de sus características sensoriales. Dichas bacterias poseen también mecanismos de antagonismo microbiano, lo que contribuye a que los alimentos fermentados posean una adecuada calidad higiénica. Los mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL incluyen la competencia por los nutrientes del sustrato y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, entre los que se encuentran las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos que se producen a nivel ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, que se excretan al medio extracelular y que, en algunos casos, poseen un amplio espectro de acción y actividad antimicrobiana frente a bacterias alterantes y patógenas de los alimentos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* (Cotter *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012; Benmechernene *et al.*, 2013).

Debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos, las bacteriocinas producidas por las BAL podrían utilizarse como "bioconservadores" en los alimentos, sustituyendo a los conservadores químicos por sus posibles efectos tóxicos en la salud de los consumidores. Las bacteriocinas podrían utilizarse en los alimentos: a) empleando la cepa productora BAL bacteriocinogénica; b) como ingrediente, empleando un sustrato fermentado por una cepa bacteriocinogénica; y c) como aditivo, adicionando la bacteriocina. El interés se ha centrado en las bacteriocinas de clase IIa por su termoestabilidad y su acción contra *Listeria monocytogenes* (Kemperman *et al.*, 2003), principalmente la pediocina. En la actualidad la pediocina se comercializa y está incluida en varias patentes europeas y norteamericanas (de Mello *et al.*, 2013), como un fermentado que contiene una fracción de pediocina PA-1, denominado Alta™ (Kerry Bio-Science), se utiliza como conservante alimentario en productos cárnicos listos para

su consumo, ensaladas y salsas. No obstante, el interés de la industria alimentaria por satisfacer la demanda de los consumidores, que solicitan productos más naturales y menos procesados, sugiere que muchas otras BAL bacteriocinogénicas, podrían emplearse en un futuro próximo como aditivos antimicrobianos naturales o como cultivos iniciadores, protectores o probióticos de los alimentos (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Benmechernene *et al.*, 2013).

En nuestro grupo de investigación, se ha obtenido una bacteriocina reconocida como pediocina, producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26 con una fuerte actividad antilisterial. Sin embargo, la efectividad de esta bacteriocina se ve afectada por factores que provocan una reducción en la actividad del antimicrobiano en el alimento como tratamientos térmicos o cambios de pH, también pierde actividad en presencia de enzimas proteolíticas como quimiotripsina, tripsina/tripsina K, termolisina, y debido a la interacción con los componentes del mismo alimento tales como proteínas, lípidos, ácidos o sales. Además, en la matriz de un alimento la actividad de una bacteriocina disminuye por cambios en la solubilidad y carga molecular y una difusión limitada en matrices sólidas (Degnan *et al.*, 1993; Nes *et al.*, 1996; Benech *et al.*, 2002; Benech *et al.*, 2003; Devlieghere *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2012). Por lo tanto, existe la necesidad de proteger estos péptidos mediante sistemas de encapsulación y posteriormente evaluar su liberación. La encapsulación mejora la actividad antimicrobiana y la estabilidad de los péptidos activos en los sistemas alimentarios. En esta dirección, se han fabricado sistemas de administración nano y micro que utilizan surfactantes como lípidos, carbohidratos, polímeros, proteínas para estabilizar y mejorar la actividad biológica de los compuestos bioactivos (Aditya *et al.*, 2017). En este sentido los liposomas representan un sistema con aplicaciones para el almacenamiento y la liberación controlada de compuestos activos, debido a su naturaleza anfifílica pueden transportar péptidos tales como bacteriocinas atrapándolas en el centro acuoso o entre las bicapas de fosfolípidos (Benech *et al.*, 2002; Benech *et al.*, 2003; Laridi *et al.*, 2003). Los liposomas son vesículas hechas de una o más láminas de fosfolípidos, su estructura podría describirse como una serie concéntrica de moléculas que tienen una cabeza polar, una cola no polar y donde cada molécula

tiene dos cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas (Laridi *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2008; de Vos *et al.*, 2010). Existen diversos métodos para la fabricación de liposomas como la extrucción por membrana, evaporación en fase reversa, ultrasonificación, tradicionalmente se utiliza el método de hidratación de película fina, en consecuencia, métodos como este requieren la utilización de solventes orgánicos como cloroformo o metanol para disolver a los fosfolípidos, por lo cual no es conveniente para su aplicación en alimentos. En este aspecto la microfluidización permite encapsular agentes activos en matrices liposomales, sin exponerse a la sonicación y solventes orgánicos, y formar liposomas estables sin agregación (Imran *et al.*, 2012). Factores como la concentración de fosfolípidos, el efecto del pH y la temperatura pueden afectar la liberación de bacteriocinas, por esta razón, en este estudio se desarrolló un proceso de encapsulación para la pediocina en una matriz liposomal preparada a partir de un refinado de fosfatidilcolina de soya (PC) empleando la técnica de microfluidización y se caracterizó fisicoquímicamente los liposomas encapsulando a la pediocina, utilizando técnicas como dispersión de luz dinámica y luz retrodispersa para determinar el tamaño de los liposomas y su estabilidad respectivamente, así como calorimetría de barrido diferencial para la caracterización térmica, además de microscopía electrónica de transmisión criogénica y microscopía confocal de barrido láser para la analizar la morfología de los sistemas encapsulados. Resulta imprescindible estudiar el efecto del pH sobre los liposomas cargados con pediocina por lo cual se estudió el efecto de este mediante cinéticas de liberación a diferentes valores de pH 4, 5, 6 y 6.8, así mismo se evaluó la actividad antimicrobiana de la bacteriocina en forma libre y encapsulada en liposomas mediante cinéticas de crecimiento empleando como cepa sensible a *Listeria innocua* AST-062.

1. Estado del arte

1.1. Bacterias ácido-lácticas

Las BAL son de gran importancia en la industria alimentaria, su utilidad se basa principalmente en las características sensoriales que les imparten a los productos como sabor, olor, textura y consistencia. Estas cualidades se generan en el proceso de fermentación. Los compuestos que se producen durante la fermentación son ácido láctico, ácido acético, diacetilo, acetaldehído, etanol, ácido propiónico, peróxido de hidrógeno, compuestos azufrados, ácidos grasos y bacteriocinas (Klaenhammer, 1993; E. Yang *et al.*, 2013), que son el compuesto de interés en esta investigación.

1.2. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos pequeños, sintetizados ribosomalmente, termoestables, con capacidad antimicrobiana a concentraciones nanomolares (Cotter *et al.*, 2005). A diferencia de los antibióticos, las bacteriocinas pueden romperse fácilmente por medio de proteasas y son rápidamente inactivadas en el estómago y en el intestino delgado (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996).

La mayoría de las BAL sintetizan sólo una bacteriocina, aunque algunas pueden sintetizar hasta tres. Hay gran variabilidad de cepa a cepa, con acción bactericida contra bacterias que pueden ser de la misma especie (espectro reducido), o de otros géneros (amplio espectro), así como contra algunos microorganismos patógenos y alterantes presentes o transmitidos por alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*. Durante las últimas décadas se ha realizado gran cantidad de estudios sobre estos compuestos antimicrobianos. Las bacteriocinas que han representado mayor interés son las de Clase IIa (familia de las pediocinas), de las cuales se han reportado más de 50 termoestables (Chen *et al.*, 1997). De las bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas, la nisina y la pediocina son las más

estudiadas, debido a que muestran un amplio espectro de actividad, además son bactericidas a bajas concentraciones y muestran estabilidad térmica y resistencia al pH en los alimentos (Goulhen *et al.*, 1999).

1.2.1. Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos y proteínas. Cotter *et al.* (2005), sugirieron un nuevo esquema de clasificación (Tabla 1.1). Se han tomado varios enfoques para clasificar las bacteriocinas. Uno, que se utiliza para clasificar las bacteriocinas de bacterias del ácido láctico (BAL), divide estos péptidos en péptidos de clase I, que experimentan modificaciones postraduccionales, y péptidos de clase II, que en gran parte no están modificados (o experimentan modificaciones modestas, por ejemplo, la formación de puentes de disulfuro, la circularización o la adición de N-formilmetionina) (Cotter *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2012).

Cotter *et al.* (2012), argumentan que la designación de bacteriocina debe retenerse para antimicrobianos peptídicos y, por lo tanto, las proteínas antimicrobianas sintetizadas ribosómicamente no están cubiertas en esta clasificación. Así pues, las bacteriocinas de clase I (modificadas) pueden ser subagrupadas como lantibióticos, linaridinas, proteusinas, péptidos lineales que contienen azol o azolina, cianobactinas (incluyendo cianobactinas similares a patelamida y preniladas, similares a anacilamida), tiopéptidos, péptidos de lazo, sactibióticos, bottromicinas, glicocinas y microcinas modificadas que no pertenecen a otros subgrupos (por ejemplo, microcina C7-C51). Las bacteriocinas sin modificar o circulares (clase II) se pueden dividir en cinco grupos que corresponden a las cuatro subclases de bacteriocinas de BAL no modificadas y una de las subclases de microcinas no modificadas. Estas subclases son péptidos que contienen una secuencia consenso altamente conservada YGNGV (en el que N representa cualquier aminoácido, los péptidos de clase IIa); bacteriocinas de dos péptidos (péptidos de clase IIb); bacteriocinas circulares (péptidos de clase IIc); bacteriocinas de un solo péptido no modificadas, lineales, no semejantes a pediocina, que no pertenecen a otras subclases (péptidos de clase II d); y las bacteriocinas de tipo microcin E492 (péptidos de clase II e, anteriormente conocidos como microcinas de clase II b).

TABLA 1.1. Clasificación de las bacteriocinas.

| Grupo | Característica distintiva | Ejemplos |
|--|---|-----------------------------------|
| Clase I (modificadas) | | |
| Bacteriocinas tipo MccC7-C51 | Se une covalentemente a un ácido aspártico carboxi-terminal. | Microcina C7-C51. |
| Péptidos de lazo | Tienen una estructura de lazo. | Microcina J25. |
| Péptidos lineales que contienen azol o azolina | Posee heterociclos, pero no otras modificaciones. | Microcina B17. |
| Lantabióticos | Posee puentes de lantionina. | Nisina, planosporicina. |
| Linaridinas | Tienen una estructura lineal y contienen aminoácidos deshidratados. | Cypemicina. |
| Proteusinas | Contienen múltiples hidroxilaciones, epimerizaciones y metilaciones. | Politeonamida A. |
| Escatibioticas | Contiene enlaces de azufre- α -carbono. | Subtilosina A, thuricina CD. |
| Cianobactinas tipo patellamida | Posee heterociclos y experimenta macrociclización. | Patellamida A. |
| Cianobactinas tipo anacinclamida | Péptidos cíclicos que consisten en aminoácidos proteinogénicos con grupos prenil unidos. | Anacinclamida A10. |
| Tiopéptidos | Contiene un anillo central de piridina, dihidropiridina o piperidina, así como heterociclos. | Tiostreptona, nocatiacina I. |
| Bottromicinas | Contiene amidina macrocíclica, un tiazol carboxi-terminal descarboxilado y aminoácidos metilados con carbono. | Bottromicina A2. |
| Glicocinas | Contiene glucopéptidos ligados a Serina. | Sublancina 168. |
| Clase II (no modificadas o cíclicas) | | |
| Péptidos IIa (bacteriocinas tipo pediocina PA-1) | Posee una secuencia consenso YGNGV conservado (en el que N representa cualquier aminoácido). | Pediacina PA-1, enterocina CRL35. |
| Péptidos IIb | Se requieren dos péptidos no modificados. | ABP118, lactacina F. |
| Péptidos IIc | Péptidos cíclicos. | Enterocina AS-48. |
| Péptidos IId | Bacteriocinas de un solo péptido, no modificada, lineal, no del tipo pediocina. | Microcinas V y S, lactococcina A. |
| Péptidos IIe | Contiene una región carboxi-terminal rica en serina con una modificación no ribosómica de tipo sideróforo. | Microcina E492, Microcina M. |

Fuente: Cotter *et al.*, 2012.

Una cepa puede producir diferentes bacteriocinas (Tabla 1.2) o se puede dar el caso de que una misma bacteriocina, sea producida por varias cepas (Tabla 1.3).

TABLA 1.2. Cepas bacteriocinogénicas del Género *Pediococcus*.

| Especie | Pediocina |
|--|---------------------|
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | Pediocina PA1 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> PO2B5627 | Pediocina PO2 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | Pediocina PAC 1.0 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | Pediocina pAcH |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | Pediocinas E, F y H |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61 y L7230 | Pediocinas |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> MC 03 | Pediocina |

Fuente: Bhunia *et al.*, 1988; Daeschel, 1989; Hoover *et al.*, 1989; Foegeding *et al.*, 1992; Klaenhammer, 1993; Pucci *et al.*, 1988; Ray *et al.*, 1999.

TABLA 1.3. Producción de pediocinas PA-1/AcH y PD-1 por diferentes especies de *Pediococcus*.

| Cepa | Bacteriocina |
|----------------------------------|----------------------|
| <i>Pediococcus. acidilactici</i> | Pediocina PA-1/AcH |
| <i>Pediococcus damnosus</i> | Pediocina PA-1, PD-1 |
| <i>Pediococcus parvulus</i> | Pediocina PA-1 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | Pediocina PA-1 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | Pediocina PA-1 |

Fuente: Bhunia *et al.*, 1988; Ennahar *et al.*, 1996; Bennik *et al.*, 1997; Green *et al.*, 1997; Mora *et al.*, 1997.

1.2.2. Modo de acción de las bacteriocinas

En la literatura se han reportan varios modelos propuestos del modo de acción de las bacteriocinas de las bacterias gram positivas. Se sabe que penetran en la membrana de las células sensibles, permeabilizándolas y provocando desarreglo de los componentes de la membrana que causan problemas metabólicos secundarios: en los sistemas de producción de energía o en la síntesis de macromoléculas (proteínas, DNA y RNA). Se han propuesto modelos de duela de barril para las bacteriocinas de la clase II del tipo pediocina, para explicar la formación de poros entre dos o más especies de péptidos anfipáticos, que resultan en la salida de iones, la pérdida de la fuerza protón-motriz y por último en la muerte de la célula (Jack *et al.*, 1995). La secuencia de eventos que provocan la pérdida de viabilidad de bacterias gram positivas después del tratamiento con pediocina Ach incluyen: 1) Adsorción o unión de las moléculas de pediocina PA-1 sobre receptores específicos sobre la superficie de la célula, 2) entrada de las moléculas de pediocina a través de la pared celular, 3) contacto de la pediocina con la membrana, 4) desestabilización de la integridad funcional por la salida de moléculas pequeñas como iones y ATP y 5) en algunas cepas, la pérdida de integridad estructural de la membrana al evidenciar lisis celular (Bhunja *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006).

En la Figura 1.1 se presentan los modelos propuestos por Cotter *et al.* (2005) para explicar el modo de acción de las bacteriocinas Clase I, Clase II y bacteriolisinas.

1.2.3. Estabilidad al pH y altas temperaturas

Las bacteriocinas difieren en gran medida con respecto a su sensibilidad a la inactivación por cambios en el pH y temperatura. La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son estables a pH ácidos y neutros y son inactivadas a un pH cercano a 8 (nisina, lactostrepcinas, pediocina Ach, leucocina A-UAL 187) (De Vuyst *et al.*, 2003)

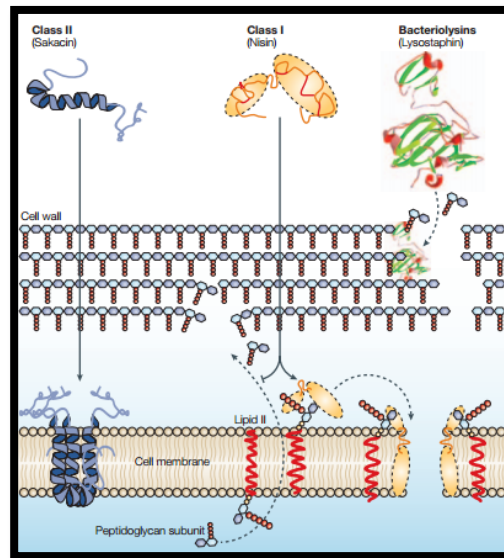


FIGURA 1.1. Modo de acción de Bacteriocinas Clase II familia de las pediocinas (Ej. Sakacina), Clase I (Ej. Nisina), Bacteriolisinas (Ej. Lisostafina) (Cotter *et al.*, 2005).

En condiciones de pH 7, varias de las bacteriocinas de bajo peso molecular son catiónicas, y esto parece ser una característica compartida entre todas las bacteriocinas. Dos importantes características de algunas de estas moléculas están relacionadas con su carga neta; la primera es que muchas de esas bacteriocinas tienen mayor actividad antimicrobiana a un pH menor a 5 que al pH fisiológico. La segunda es que su adsorción en la superficie celular de las bacterias gram positivas (incluyendo las células productoras) es dependiente del pH con una máxima adsorción a pH de 6 y con muy pequeña adsorción a un pH cercano a 2. Las bacteriocinas que no contienen lantionina observan un incremento en la actividad antimicrobiana a pH ácidos (Jack *et al.*, 1995).

La termoestabilidad de las bacteriocinas producidas por BAL es generalmente elevada, aunque puede reducirse significativamente después de su purificación (Klaenhammer, 1988). La termoestabilidad parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Por otro lado, algunas bacteriocinas son termolábiles;

normalmente poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja (Requena, 1995).

La resistencia a las altas temperaturas generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63 °C, 30 minutos; 72 °C, 15 segundos) (Yang *et al.*, 2012)

1.3. Pediocina PA-1

Las bacteriocinas tienen un amplio espectro antimicrobiano incluso con cepas con relación filogénica (Papagianni, 2003). Se ha centrado el interés en las bacteriocinas de la clase II por su termoestabilidad y su acción contra *Listeria monocytogenes* (Kemperman *et al.*, 2003), principalmente de pediocina. Las bacteriocinas se han convertido en una opción atractiva para ser usadas como aditivos en los alimentos debido a su origen natural y a su actividad antimicrobiana. La nisina es la única bacteriocina permitida para ser aplicada en alimentos, y se encuentra en el mercado con el nombre de Nisaplin bajo la marca de Danisco. El uso de pediocina PA-1 para la biopreservación ha sido comercializado por Kerry Bio-Science con el nombre de Alta™ (Benmechernene *et al.*, 2013).

La aplicación de las bacteriocinas en alimentos tiene varias ventajas, son sustancias “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS), tienen un amplio espectro inhibitorio incluyendo a los microorganismos patógenos, son moléculas termoestables, no son de riesgo para la salud, su inclusión en productos podría brindarle varios efectos positivos como mejorar su seguridad, cualidades y sabor (Cotter *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2012)

La pediocina también denominada “*pediocin-like*”, pediocina PA-1 o pediocina Ach es una bacteriocina producida por varias cepas de *Pediococcus acidilactici* (Venema *et al.*, 1995), pertenece a la clase IIa según la clasificación propuesta por Cotter *et al.* (2012) (Tabla 1.1). Es sintetizada como un pre-péptido de 62 aminoácidos que al ser madurado resulta en un péptido formado por 44 residuos de aminoácidos, es de carácter altamente hidrofóbico debido al contenido

relativamente alto de aminoácidos no polares, característica por la cual tiende a formar agregados, inhibe a *Listeria monocytogenes*, positivamente cargado, en su estructura contiene cuatro residuos de cisteína que forman dos puentes disulfuro, y carece de residuos de prolina, fenilalanina, leucina, ácido glutámico y arginina, en el extremo N-terminal contiene 3 láminas β , que originan una conformación de horquilla, en el extremo C-terminal se presenta un alto grado de libertad conformacional a excepción de un enlace disulfuro entre los aminoácidos 24 y 44, que es esencial para su actividad. La presencia de cuatro residuos de lisina, tres de histidina y de un único residuo de ácido aspártico la refleja en un pH básico, entre 6.8 y 10, dependiendo de los autores (Henderson *et al.*, 1992; Jack *et al.*, 1995). Los genes necesarios para la producción de pediocina PA-1 están organizados en un operón. El operón ped, comprende los genes pedA, pedB, pedC y pedD. El gen pedA es el gen estructural, que codifica la síntesis de la pre-bacteriocina, el gen pedB que codifica la proteína que protege a la célula productora de su propia bacteriocina y los genes pedC y pedD participan en la secreción del péptido maduro (Venema *et al.*, 1997).

Se ha propuesto un modelo hipotético para la estructura de la molécula de esta pediocina en la Figura 1.2 (Chen *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2002).

1.3.1. Espectro de inhibición

La pediocina PA-1 presenta un espectro de inhibición amplio contra bacterias Gram positivas, ya sea patógenos o causantes de deterioro, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringes*, *Clostridium botulinum*, y varias especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*, al igual que bacterias gram negativas incluyendo *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas* sp. cuya permeabilidad de la membrana haya sido dañada por congelación, calentamiento suave, exposición a ácido acético o EDTA (Ray *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002)

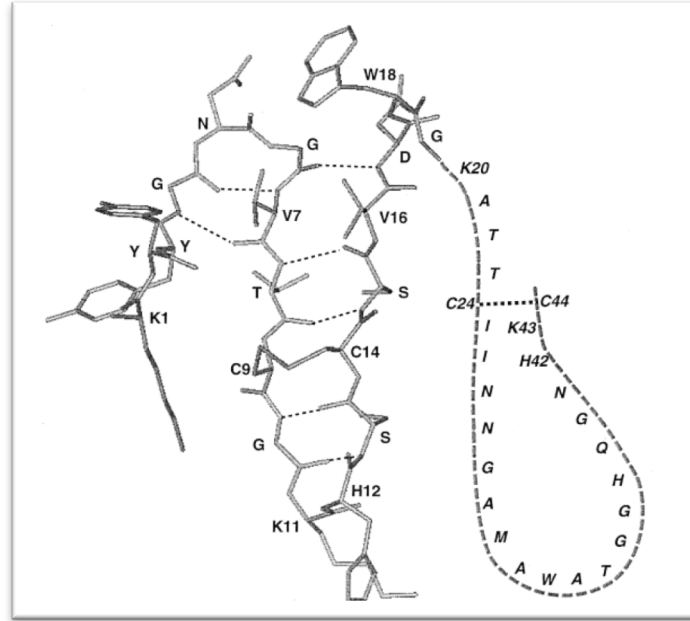


FIGURA 1.2. Modelo tridimensional predicho de la estructura terciaria de 19 aminoácidos N-terminales de la pediocina PA-1.

La secuencia de residuos de 20 a 44 se indica sin una estructura excepto por el enlace disulfuro C24-C44 requerido para la actividad (Chen *et al.*, 1997).

1.4. *Pediococcus acidilactici*

Pediococcus acidilactici es una bacteria ácido-láctica, gram positiva, sus células son de 0.6 a 1 μm de diámetro, agrupadas en pares, tétradas o racimos. Su crecimiento se ha reportado entre pH 4.2 a 8.0. Su temperatura máxima de crecimiento es de 50-53 $^{\circ}\text{C}$, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35-40 $^{\circ}\text{C}$. Puede crecer en presencia de cloruro de sodio de 9-10%. La fermentación de carbohidratos de *Pediococcus acidilactici* es semejante a la *Pediococcus pentosaceus* en relación a ciertas pentosas, la inhabilidad de *Pediococcus acidilactici* de fermentar la maltosa y crecer hasta 50 $^{\circ}\text{C}$ lo diferencia de *Pediococcus pentosaceus*. La incapacidad de producir gas e hidrolizar el almidón desde el gluconato lo diferencia de especies como *Pediococcus dextranicus*. Su capacidad de hidrolizar la arginina lo distingue del resto de las especies de *Pediococcus* a excepción de *Pediococcus pentosaceus*. Las células de esta especie son termoresistentes. Al ser expuestas a temperatura

de 70 °C por 10 minutos es suficiente para causar la muerte celular. Las cepas de *Pediococcus acidilactici* han sido aisladas de varios fermentos de cereales, vegetales y encurtidos (Yáñez *et al.*, 2002).

1.5. *Pediococcus acidilactici* ITV26

El *Pediococcus acidilactici* ITV26 fue aislada a partir de muestras de heces de bebé lactante sano en el Instituto Tecnológico de Veracruz, identificada por medio de la galería API 50 CHL (Biomereúx) y caracterizada molecularmente por el Instituto de Fijación de Nitrógeno de la UNAM, es una cepa productora de bacteriocina (pediocina).

Pediococcus acidilactici ITV26 produce su bacteriocina como un metabolito secundario, ya que esta se produce al final de la fase de crecimiento logarítmico y se acumula en la fase estacionaria tardía. La pediocina es estable a 72 °C por 15 minutos. A 100 °C mantiene el 26% de su actividad después de 10 minutos de calentamiento. La bacteriocina presenta estabilidad en un intervalo de pH de 1.0 a 9.0, perdiendo totalmente su actividad a pH 11.0 y 13.0. Es degradada por enzimas proteolíticas, mientras que con tratamientos con lipasas y amilasas no se observa pérdida de actividad (López del Castillo, 1998).

1.5.1. Espectro de inhibición de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26

En la Tabla 1.4 se presenta un cuadro general de las cepas que son sensibles a la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26.

TABLA 1.4. Espectro de inhibición de la pediocina producida por *P. acidilactici* ITV26.

| Cepa sensible | Fuente |
|---|---|
| <i>Enterococcus faecalis</i> NRRL B-357 | Laboratorio Regional de Investigaciones del Norte E.U.A. (NRRL) |
| <i>Enterococcus faecium</i> ITV45 | Laboratorio de Microbiología (UNIDA) ITV |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1785 | The Wellcome Bacterial Collection Langley Court, Beckenham, Kent Inglaterra |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> 8082 | The Wellcome Bacterial Collection Langley Court, Beckenham, Kent Inglaterra |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> M-128-1 | Depto. de Microbiología, Universidad del Oeste de Australia |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCK 1088 | Depto. de Ciencias de Alimentos, Universidad de Carolina del Norte |
| <i>Morganella morganii</i> | Universidad Veracruzana |
| <i>Staphylococcus xilosus</i> | Universidad Veracruzana |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Universidad Veracruzana |
| <i>Listeria monocytogenes</i> Scout A AST-067 | Universidad Autónoma de Querétaro |
| <i>Listeria innocua</i> AST-062 | Universidad Autónoma de Querétaro |
| <i>Listeria innocua</i> BL | Universidad Complutense de Madrid, España |

Fuente: López del Castillo, 1998; González Gómez, 2002

1.5.2. Propiedades fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas de la pediocina son similares a las de otras bacteriocinas sintetizadas vía ribosomal de bacterias gram positivas, particularmente de aquéllas “de la familia de las pediocinas” (Ray *et al.*, 1999). Algunas de las características de la pediocina PA-1 se muestran en la Tabla 1.5. Debido a que las bacteriocinas son susceptibles al ataque de enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático y gástrico, sus características de termorresistencia y su relativa estabilidad a pH bajo, se pueden considerar como aditivos seguros. Estos compuestos se inactivarían durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidas como compuestos activos y sin causar riesgos relacionados con su uso. Su actividad permanece tras los tratamientos térmicos, como la pasteurización (Rodríguez *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005; Cotter *et al.*, 2012).

TABLA 1.5. Algunas propiedades fisicoquímicas de la pediocina PA-1.

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Masa molecular: 4.6 kDa | Composición de aminoácidos: |
| | No polares: 25% |
| Punto isoeléctrico: 9.6 | Ausentes: Leu, Pro, Phe |
| | Polares: 56.8% |
| Cargas: (pH>6): 3+ | Ácidos: 2.3% |
| (pH<6): 6+ | Ausente: Glu |
| | Básicos: 15.9% |
| Sensibilidad a enzimas: | Ausente: Arg |
| Quimiotripsina: 2, 3, 18, 33 | Cisteínas: 4 |
| Tripsina/Tripsina K:1, 11, 20, 43 | Metionina: 1 |
| Termolisina: 6, 15, 24, 25 | |
| Staph-V8: 17 | |
| Enzimas que no la hidrolizan: | |
| Tripsina R | |
| Trombina | |

Fuente: Naidu, 2000.

1.5.3. Solubilidad de la pediocina

La pediocina es soluble en soluciones acuosas diluidas. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofóbica las moléculas tienden a formar agregados, sobre todo si se encuentran en alta concentración y especialmente a valores de pH por arriba de 6.0 (Ray *et al.*, 1999). La razón de que se formen agregados parece deberse a los componentes del medio de cultivo, ya que la pediocina no forma agregados en sobrenadantes o muestras parcialmente purificadas aún en altas concentraciones (Henderson *et al.*, 1992).

1.6. Métodos de cuantificación de la actividad antimicrobiana

1.6.1. Microensayos en microplacas

Se han utilizado métodos turbidimétricos como ensayo en microplacas para detectar y cuantificar actividad de bacteriocinas. En este sistema una unidad de bacteriocina (UB) es definida como el recíproco de la dilución más alta que inhibe el crecimiento de un microorganismo indicador en un 50% mediante una medición espectrofotométrica. Sin embargo, el método de microplacas es un ensayo semi-cuantitativo, sus resultados son poco precisos y reproducibles, ya que su interpretación depende en gran parte del operador y requiere de la inversión del equipo y accesorios (Turcotte *et al.*, 2004).

1.6.2. Inmunoensayos enzimáticos

Las pruebas inmunológicas constituyen métodos de elección para la detección y cuantificación de bacteriocinas, dentro de las cuales las técnicas inmunoenzimáticas son las más adecuadas. La mayoría de estas pruebas se basan en el fijado del antígeno a una superficie inerte, para que, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico; el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección y cuantificación de bacteriocinas en diferentes medios, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran. Además, dichos ensayos pueden servir de referencia

para el desarrollo de otras pruebas inmunológicas más complejas, por ejemplo, las de inmunolocalización e inmunopurificación (Daeschel, 1989). Sin embargo, este tipo de técnicas requieren la producción de anticuerpos específicos ya sean policlonales o monoclonales de un antígeno específico por lo cual es necesario realizar métodos de purificación con el fin de evitar reacciones cruzadas (Calderón-Pascacio, 2007).

1.6.3. Difusión en agar

La difusión en agar es uno de los métodos más ampliamente utilizado para la detección de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas. Hoy en día, el método de difusión en agar es el preferido para la cuantificación de la nisina y la pediocina, entre otras bacteriocinas de BAL, sin embargo, la falta de exactitud de este ensayo limita la interpretación de los resultados, también es laboriosa, consume mucho tiempo, requiriendo la preparación y refrigeración de cajas, perforación de pozos en el agar de la caja y la medición manual de zonas de inhibición después de 24 a 48 horas de incubación. Los resultados dependen en gran medida de la habilidad y juicio de la persona que realiza la prueba, ya que no se obtienen resultados precisos cuando se presentan zonas de inhibición que no son claras y perfectamente circulares (Turcotte *et al.*, 2004). Varias unidades de actividad han sido definidas para cuantificar la actividad antimicrobiana de la pediocina en medio sólido. Gonzalez & Kunka (1987), definieron la unidad arbitraria (AU) de bacteriocina como 5 μ L de la dilución más alta de un sobrenadante de cultivo que produce una zona de inhibición de crecimiento de *P. pentosaceus* FBB63. Bhunia *et al.* (1988) emplearon unidades de actividad antimicrobiana (AAU), calculadas como el recíproco de la concentración antimicrobiana multiplicado por el factor de dilución y dividido entre la concentración de proteína en miligramos determinado por el método de Lowry. La concentración fue definida como el recíproco de la dilución más alta que produce una zona de inhibición definida de 2 mm o más en un halo de *Lactobacillus. plantarum* WSO-39 (Rodríguez *et al.*, 2002).

1.7. Purificación de bacteriocinas

La purificación de las bacteriocinas, especialmente de las producidas por BAL, es complicada, entre los problemas encontrados durante la purificación destacan los relacionados con la tendencia que tienen dichas moléculas a asociarse con otras a consecuencia de su hidrofobicidad. Debido a que forman un grupo de sustancias extremadamente heterogéneo, los protocolos de purificación específicos necesitan generalmente ser diseñados empíricamente para cada bacteriocina, razón por la cual son pocas las bacteriocinas que han sido purificadas con homogeneidad. Además, la estabilidad de los extractos de bacteriocinas decrece dramáticamente a medida que se incrementa su grado de purificación (De Vuyst *et al.*, 2003).

Hastings & Stiles (1991), desarrollaron un esquema de purificación empleando sólo precipitación a bajo pH y cromatografía de filtración en gel y de interacción hidrofóbica. La cromatografía de intercambio iónico, la diálisis y condiciones de pH alto fueron desechadas al provocar grandes pérdidas de la actividad. Koen Venema *et al.* (1997), desarrollaron un método alternativo, para purificar bacteriocinas de BAL: a) precipitación con etanol; b) electroforesis preparativa de enfoque isoeléctrico y c) ultrafiltración. Este método se empleó para obtener puras la lactococcina B y la pediocina PA-1. Uteng *et al.* (2002), desarrollaron un procedimiento rápido de 2 pasos para la purificación de bacteriocinas de la Clase II y otros péptidos catiónicos. El primer paso consiste en el paso directo del cultivo a través de una columna de intercambio catiónico. En el segundo paso, la fracción de bacteriocina es pasada por una columna de fase reversa, con baja presión. Con este procedimiento se obtuvo un 90% de pureza, analizada por medio de cromatografía analítica en fase reversa y electroforesis capilar.

La pediocina es producida por *Pediococcus* spp. en medios complejos como el MRS (Man, Rogosa y Sharpe), se obtiene un buen crecimiento celular y una buena producción de pediocina. Sin embargo, los procesos de extracción y purificación son muy costosos debido a los componentes presentes en dicho medio (De Vuyst *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2007).

Yang *et al.* (1992), desarrollaron un procedimiento alternativo basado en la propiedad de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas que son frecuentemente adsorbidas en las células de las cepas productoras. Si se ajusta el pH del caldo de cultivo de una cepa productora, después de un tratamiento térmico para inactivar la función biológica de las células, a un valor al que ocurre la máxima adsorción de la bacteriocina a la superficie celular (usualmente pH 6), se permite una fácil separación de las moléculas (adsorbidas en las células) del caldo de cultivo por simple centrifugación. Posteriormente los péptidos son liberados selectivamente de las células a pH bajos (1.5 - 2). Este método se presenta como una técnica que es capaz de obtener péptidos con alta potencia, en una forma más concentrada.

1.8. Alcances y limitaciones de la pediocina

Algunos efectos de la inactivación de las bacteriocinas en alimentos, puede deberse a la actividad de enzimas proteolíticas o bien proteínas y lípidos que se unen a las moléculas de bacteriocinas, impidiendo a su vez que se unan a las membranas de las células blanco. Se ha demostrado que no todas las cepas de *L. monocytogenes* presentan el mismo grado de sensibilidad a las bacteriocinas con actividad antilisterial, además la presencia espontánea de mutantes resistentes a diferentes bacteriocinas también puede ocurrir en poblaciones sensibles de *Listeria spp.* así como en cepas mutantes de *Enterococcus faecalis* resistentes a pediocina PA-1/AcH (Robichon *et al.*, 1997; Opsata *et al.*, 2010; Tessema *et al.*, 2011). Se han realizado varios estudios en los cuales la pediocina ha sido efectiva en el control de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, carne de vacuno, salchichas, extractos de carne y productos cárnicos, así como en productos lácteos (Yáñez *et al.*, 2002). Uno de los factores que podrían limitar el empleo de la pediocina es su inactivación frente a enzimas proteolíticas presentes en los alimentos o ingredientes crudos necesarios para producir productos procesados. Ante esta perspectiva, se requiere implementar estrategias que involucren el uso de la tecnología como la nanoencapsulación para compuestos activos como las bacteriocinas en matrices liposomales. Pudiendo citarse dentro de los primeros trabajos realizados para la encapsulación de la pediocina PA-1 en liposomas a Degnan *et al.* (1993), cuyo

objetivo ha sido incrementar la actividad antilisterial de esta bacteriocina en carne de res, observando resultados alentadores. Con lo cual se busca reforzar, la protección de los productos a los cuales se aplican, logrando la distribución uniforme de las moléculas de bacteriocina en el interior de la matriz de los alimentos, contribuyendo a crear un sistema de barreras que asegure la inocuidad de los alimentos. Por lo que la nanoencapsulación representan una interesante alternativa por investigar con lo cual se puede promover un mejoramiento en cuanto a las características sensoriales de los alimentos como el sabor, olor, color, textura, así como la absorción de nutraceuticos y suplementos alimenticios, y el desarrollo de antimicrobianos de origen natural (Teixeira *et al.*, 2008; Alfadul & Elneshwy, 2010; da Silva-Malheiros *et al.*, 2010).

1.2.4. Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en alimentos

Los resultados obtenidos en la aplicación *in situ* de bacteriocinas en modelos de alimentos, indican que en varios casos la actividad disminuye en comparación con los resultados obtenidos en experimentos *in vitro*. Los factores que contribuyen a la reducción de la actividad de las bacteriocinas en alimentos pueden dividirse en dos grupos: factores que afectan la producción de bacteriocinas a partir de las BAL y factores que afectan la eficacia de las bacteriocinas adicionadas a un alimento, como ambiente inadecuado (pH, temperatura, nutrientes, entre otros), antagonismo debido a la presencia de otros microorganismos presentes en los alimentos, presencia de patógenos o bacterias alterantes resistentes a las bacteriocinas, condiciones que desestabilizan la actividad biológica de las proteínas como pueden ser las proteasas o bien los procesos de oxidación, interacción con los componentes del alimento como son lípidos o proteínas, inactivación por efecto de aditivos, por ejemplo, nitritos presentes en los alimentos, escasa solubilidad y distribución en la matriz de un alimento, efecto del pH del alimento sobre la estabilidad y la actividad de las bacteriocinas (Benech *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2008). En este contexto, existe la necesidad de implementar métodos de protección para la bacteriocina como es la encapsulación. Sin embargo, los tamaños de partículas obtenidos por algunos métodos podrían no ser los adecuados para su adición en los alimentos.

Ante esta perspectiva, se requiere implementar estrategias que involucren el uso de la micro o nanoencapsulación.

1.9. Funciones de la encapsulación

Las principales funciones de la encapsulación se pueden resumir en los siguientes puntos: a) procesos de inmovilización en el caso de células, proteínas o enzimas, b) protección contra la degradación de agentes ambientales como el O₂, humedad, luz, pH, c) liberación de fármacos, fragancias y otros compuestos, d) facilitar el manejo del producto encapsulado mejorando su estabilidad. En la industria de los alimentos, los procesos de encapsulación han causado una revolución en el mercado con la incorporación de nuevos productos llamados nutracéuticos y productos funcionales, como es el caso de los probióticos (Martin-Banderas *et al.*, 2010). Por otra parte, estos métodos reducen la interacción de los antimicrobianos con los componentes de los alimentos y tienen el potencial de mejorar la actividad antimicrobiana (Were *et al.*, 2004; da Silva-Malheiros *et al.*, 2010).

Dentro de las diferentes matrices que se han investigado en el campo de la nanoencapsulación se puede mencionar a los liposomas, los cuales han tenido una gran importancia en numerosas áreas de investigación desde la ciencia básica hasta la biotecnología. Se han utilizado como estructuras biocompatibles para encapsular diversas moléculas como proteínas, ácidos nucleicos o medicamentos con aplicaciones farmacéuticas, químicas y cosméticas (Taylor *et al.*, 2007). Los liposomas pueden atrapar grandes cantidades de sustancias solubles en agua. Recientemente, diversos componentes de los alimentos y aditivos, incluyendo carotenoides, nisina Z y pediocina PA-1, han sido encapsulado con éxito en liposomas (Benech *et al.*, 2003; Laridi *et al.*, 2003; Were *et al.*, 2004) y se utiliza en sistemas alimentarios. La pediocina encapsulada es más estable y activa contra *Listeria spp.*, en comparación con la pediocina adicionada en forma libre (Narsaiah *et al.*, 2013).

1.10. Encapsulación de compuestos con actividad funcional

El aumento en la demanda de alimentos saludables ha provocado el desarrollo de nuevos aditivos e ingredientes alimentarios. Sin embargo, el reto es asegurar que estos ingredientes permanezcan efectivos durante la elaboración y el almacenamiento del producto (Onwulata, 2012).

Dentro de los ingredientes funcionales de mayor importancia utilizados en la preparación de alimentos se encuentran los antioxidantes, ingredientes orgánicos, ácidos grasos omega-3, fibra, minerales, probióticos, entre otros (Day *et al.*, 2009). Por otro lado, la encapsulación de compuestos como las bacteriocinas ha demostrado resultados alentadores disminuyendo de 3 a 4 log UFC/mL las bacterias patógenas y/o alterantes (da Silva-Malheiros *et al.*, 2010; Narsaiah *et al.*, 2013).

1.11. Microencapsulación

La microencapsulación es una operación que consiste en rodear a una base sólida, líquida o gaseosa (núcleo) con una envoltura suficientemente resistente y estable, inmisible, aunque adherente con el núcleo, y que solamente se altera liberando su contenido en determinados medios. El tamaño de las unidades varía entre 0.5 y 200 μm . En general menor que 1 mm (Yáñez *et al.*, 2002).

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 costo (Madene *et al.*, 2006).

Entre las primeras aplicaciones prácticas de la microencapsulación se destaca la industria farmacéutica, médica, textil, alimentos, pesticida, cosmética, química de imprenta, agroquímica, fragancias, tintes, agentes antimicrobianos, biomédica y de plásticos. Respecto al área de alimentos, las aplicaciones de esta técnica se han ido incrementando debido a la protección de los materiales encapsulados de factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. Las microcápsulas, ayudan a que los materiales alimenticios empleados resistan las

condiciones de procesamiento y empaquetado mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos (Yáñez *et al.*, 2002).

1.12. Nanoencapsulación

Una aplicación especialmente importante en alimentos es la nanoencapsulación que involucra la incorporación, absorción o dispersión, de componentes bioactivos en pequeñas vesículas con diámetro nano (o submicrón), estas nanopartículas encapsuladas pueden mejorar la estabilidad de las sustancias activas. Las vesículas sólidas son de tamaño medio inferior 1000 nm (normalmente 10-500 nm) (Bouwmeester *et al.*, 2009).

1.13. Métodos de nanoencapsulación

La técnica de microencapsulación o nanoencapsulación han permitido solucionar algunos problemas limitando las aplicaciones de ingredientes y aditivos alimenticios, puesto que puede controlar la eliminación de saborizantes, así como reducir volatilidad, higroscopicidad y reactividad incrementando la estabilidad de productos bajo condiciones ambientales adversas (Favaro-Trindade *et al.*, 2010). Los procesos de encapsulación se pueden dividir en dos: procesos físicos y procesos fisicoquímicos. Los procesos fisicoquímicos se dividen en las técnicas de coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, inclusión molecular y atrapamiento por liposomas; dentro de los procesos físicos están las técnicas de secado por aspersión, secado por congelamiento/enfriamiento y extrusión (Yáñez *et al.*, 2002; Madene *et al.*, 2006). En el caso de las bacteriocinas se ha observado que la actividad antimicrobiana disminuye por diferentes factores como cambios de solubilidad, carga eléctrica, interacción con los componentes del alimento, inactivación por efecto de las proteasas o cambios en la membrana celular de la cepa sensible (Degnan *et al.*, 1993; Gänzle *et al.*, 1999; Benech *et al.*, 2002). En este contexto, existe la necesidad de implementar métodos de protección para la bacteriocina como la encapsulación. Sin embargo, los tamaños de partículas obtenidos por algunos métodos podrían no ser los adecuados para su adición en los alimentos.

Ante esta perspectiva, se requiere implementar estrategias que involucren el uso de la nanoencapsulación. Por lo que se propone el uso de la tecnología de microfluidización a través de matrices liposomales, para conservar la actividad y controlar la liberación de la bacteriocina. Los liposomas representan un sistema con posibles aplicaciones para el almacenamiento y la liberación controlada de péptidos activos, por lo que se han propuesto como un medio de protección de compuestos biológicos. Los liposomas, debido a su naturaleza anfifílica pueden transportar péptidos como bacteriocinas atrapándolas en el centro acuoso o entre las bicapas de fosfolípidos. Dentro de las ventajas de los liposomas destacan las siguientes: Reducir o impedir la afinidad de la bacteriocina a los componentes de los alimentos y proteger a la bacteriocina de inhibidores o condiciones desfavorables que ocurren naturalmente en una matriz alimentaria.

1.14. Liposomas

Los liposomas son vesículas esféricas de dimensiones coloidales (entre los 80 y los 200 nanómetros) hechas de una o más biláminas fosfolipídicas. El grosor de cada bilámina o bicapa es de alrededor de 4 nm. Las vesículas liposomales están constituidas por un grupo de moléculas anfifílicas que dan a éstas, características especiales. Su estructura se podría describir como series concéntricas de moléculas que tienen una cabeza polar, una cola no polar y en donde cada molécula tiene dos cadenas hidrofóbicas. Los liposomas pueden transportar péptidos activos como las bacteriocinas, éstas al ser moléculas anfifílicas se pueden integrar a los liposomas, entre las bicapas o bien, atrapando los péptidos al interior del liposoma (Benech *et al.*, 2002; Laridi *et al.*, 2003; Were *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2008).

1.14.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los componentes principales de las membranas celulares de los seres vivos. Estructuralmente están compuestos por una molécula de glicerol que está esterificada en los carbonos C1 y C2 con dos cadenas de ácidos grasos, y un grupo fosfato en la posición C3, que puede o no estar unido a un grupo saliente. La fosfatidilcolina es el lípido más abundante en las membranas biológicas.

Estrictamente un fosfolípido posee un dominio no polar, representado por las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos de más de 12 átomos de carbono, un dominio de polaridad intermedia que corresponde al glicerol y sus ésteres, y una zona de alta polaridad representada por el fosfato unido al grupo saliente. Las sustancias que poseen dominios hidrofílicos e hidrofóbicos en la misma molécula se conocen como anfífilos. Este dominio hidrofílico también determina si el fosfolípido en cuestión tiene carga neta negativa, positiva, o se trata de un anfífilo con carga neta nula (Tabla 1.6). Como puede observarse, los fosfolípidos más abundantes presentan carga negativa a pH fisiológico a excepción de la PC y la fosfatidiletanolamina (PE) (Voet, 1992; Lasic, 1996).

TABLA 1.6. Grupos salientes más comunes en la naturaleza, con los nombres de los fosfolípido correspondientes.

| Grupo saliente | Nombre del fosfolípido | Abreviatura | Carga |
|---|------------------------|-------------|----------|
| -H | Ácido fosfatídico | PA | Negativa |
| $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)^{3+}$ | Fosfatidilcolina | PC | Anfífilo |
| $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^{3+}$ | Fosfatidiletanolamina | PE | Anfífilo |
| $-\text{CHCOO}-\text{NH}^{3+}$ | Fosfatidilserina | PS | Negativa |
| $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ | Fosfatidilglicerol | PG | Negativa |
| $-\text{HC}_6\text{H}_5(\text{OH})_5$ | Fosfatidilinositol | PI | Negativa |

Fuente: Hermida, 2006.

Es importante recordar que cuando se habla de fosfolípidos de origen natural, no se hace referencia a una única sustancia. Así, por ejemplo, el término fosfatidilcolina incluye una familia de moléculas que tienen en común el grupo fosfato unido a colina. Sin embargo la composición de ácidos grasos es variable y depende de la fuente del fosfolípido. En la Tabla 1.7 se observa la abundancia relativa de los ácidos grasos que componen la fosfatidilcolina proveniente de soja y de huevo (SPC y EPC respectivamente). Así por ejemplo, mientras que solo un 20% de los ácidos

grasos de la SPC no presentan dobles enlaces, en la EPC el porcentaje de ácidos grasos saturados llega hasta un 50% (Voet, 1992; Lasic, 1996, Hermida, 2006).

TABLA 1.7. Composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina de soja (SPC) y de huevo (EPC).

| Abreviatura | Ácido graso Identificación | Abundancia relativa (% p/p) | |
|-------------|--|-----------------------------|------|
| | | SPC | EPC |
| 16:0 | Ácido palmítico | 17.2 | 35.3 |
| 18:0 | Ácido esteárico | 3.8 | 13.5 |
| 18:1 | Ácido oleico | 22.6 | 26.8 |
| 18:2 | Ácido linoleico | 47.8 | 5.7 |
| 18:3 | Ácido α ó γ – linolénico | 8.6 | 0.2 |
| 20:4 | Ácido araquidónico | - | 1.3 |
| 20:5 | Ácido all cis-eicosapentaenoico ó EPA | - | 3.6 |
| 22:5 | Ácido all cis-docosapentaenoico ó DPA | - | 1.3 |
| 22:6 | Ácido all cis-docosahexaenoico ó DHA | - | 12.6 |

Fuente: Hermida, 2006.

En los ácidos grasos de origen natural, todas las insaturaciones tienen geometría *cis* y no presentan conjugación, estos influirán en la estabilidad química de los fosfolípidos, resultando más estables aquellos que posean un menor número de dobles enlaces. Cabe mencionar que suele haber bastante confusión a la hora de elegir una materia prima de origen natural. El término “lecitina” puede tener distintas acepciones: en algunos casos se emplea como sinónimo de fosfatidilcolina, pero también está difundido su uso para extractos lipídicos de soja u otras fuentes, con contenidos de fosfatidilcolina que pueden ser tan bajos como un 30%. Se trata de productos parcialmente purificados, con altos contenidos de triacilglicéridos, de otros fosfolípidos (PE, PI, etc.) y de glicolípidos. El tipo de estructuras que se obtienen a partir de estas mezclas de sustancias generalmente no son de fácil

caracterización, y los sistemas obtenidos no tendrán el comportamiento que se esperaría para vesículas de PC pura, por lo cual requieren de una caracterización previa (Hermida, 2006).

1.14.2. Clasificación de los liposomas según su estructura física

Además de su composición química, que determina propiedades como la fluidez, la densidad de carga y la permeabilidad, los liposomas pueden ser caracterizados por su forma y su tamaño. Según el método empleado en la preparación, pueden obtenerse desde pequeños liposomas unilamelares (SUV o small unilamellar vesicles) hasta liposomas compuestos por múltiples bicapas concéntricas (MLV o multilamellar vesicles). Los SUV son los liposomas más pequeños. El límite de tamaño está dado por la composición lipídica, la fuerza iónica del medio, el método de preparación y la temperatura, entre los factores más influyentes. Las vesículas más pequeñas que pueden obtenerse son del orden de 15-25 nm. Los MLV suelen ser poblaciones heterogéneas de vesículas en el intervalo de 100 a 5,000 nm, normalmente obtenidas cuando los fosfolípidos se hidratan durante el proceso de obtención, y se aplica al sistema una baja cantidad de energía. Los LUV (large unilamellar vesicles) son liposomas de gran tamaño pero compuestos por una sola bicapa y suelen emplearse cuando se pretende maximizar el volumen acuoso interno (Voet, 1992; Lasic, 1996).

1.14.3. Proceso de formación

Las moléculas lipídicas que constituyen la bicapa adoptan de manera espontánea (una vez que están en solución acuosa) un arreglo que consiste en flexionarse o plegarse y exponer sus grupos polares (cabezas) hacia la fase acuosa. Las partes hidrocarbonadas de naturaleza hidrofóbica (colas), se empaquetan formando un retículo regular en el que cada una de ellas se encuentra unida a sus vecinas mediante interacciones de *van der Waals*. Es decir, se forma una estructura esférica estable a partir de una bicapa, concéntricas, de lípidos bimoleculares que aíslan los compartimientos acuosos. La localización exacta del péptido bioactivo en el liposoma depende sobre todo de las características fisicoquímicas del péptido y de

la composición de los lípidos constituyentes (Taylor *et al.*, 2007; da Silva-Malheiros *et al.*, 2010). Liposomas estables son formados sólo a temperaturas superiores a la temperatura de transición de la mezcla de fosfolípidos (T_m) de la fase “gel a líquido-cristalino”, la cual representa la temperatura del punto de fusión de las cadenas acilo. Todos los fosfolípidos tienen una temperatura de transición (T_m) característica y ésta depende de la naturaleza del grupo polar y de cuan largas son las cadenas acilo así como del grado de insaturación de las mismas (Laridi *et al.*, 2003). Por encima de la temperatura de transición, los fosfolípidos forman una fase líquida-cristalina que presenta una incrementada movilidad de las cadenas acilo. Al disminuir la temperatura por debajo de T_m , se genera una transición a un estado de gel mucho más rígido. Esta transición restringe la movilidad de las cadenas acilo, estrechamente empaquetadas. Cuando las moléculas líquidas adoptan un arreglo para formar estructuras de bicapas cerradas conteniendo agua y solutos, los péptidos son atrapados entre los planos adyacentes de las cabezas polares (Taylor *et al.*, 2007).

1.14.4. Aplicaciones nutricionales de los liposomas

Observando y analizando el éxito de los liposomas en el campo farmacéutico y cosmético, la industria de suplementos dietarios ha comenzado a emplear liposomas que mejoren el desempeño de un producto en uno o más aspectos, como por ejemplo aumentar la solubilidad de una sustancia, controlar su liberación, mejorar la biodisponibilidad del ingrediente y evitar efectos no deseados en las características sensoriales de un alimento, entre otras. El creciente interés en las aplicaciones alimenticias se ve reflejado en la aparición de “reviews” (Porzio, 2004; Desai & Jin Park, 2005).

Una aplicación que ha resultado de gran utilidad en la manufactura de quesos es la incorporación de enzimas en liposomas para reducir el tiempo de maduración y aumentar el desarrollo del sabor. Para varios tipos de quesos, la aplicación de cocteles de proteasas y lipasas incorporadas en liposomas, aceleró significativamente la proteólisis y lipólisis, acortando el tiempo de maduración respecto a los quesos tratados con enzimas libres (Kheadr *et al.*, 2003).

La encapsulación de vitaminas en liposomas también ha sido empleada con fines nutricionales, en particular para aumentar la solubilidad de las liposolubles (Salle *et al.*, 2005).

La estabilidad del ácido ascórbico se ha incrementado luego de su incorporación a liposomas, aún en presencia de sustancias oxidantes (Kirby *et al.*, 1991).

La incorporación de calcio a liposomas se ha aplicado a la fortificación de leche de soja para obtener concentraciones mayores a las encontradas en leche de vaca. También se ha encapsulado sulfato ferroso en liposomas para la fortificación de leche de vaca con hierro. Los liposomas mostraron una biodisponibilidad similar a la del sulfato ferroso libre agregado a la leche, pero el producto liposomal mantuvo inalteradas las características sensoriales de la leche fortificada. Como una curiosidad puede mencionarse el hallazgo de liposomas en la leche materna, verificado mediante criofractura, como componentes microestructurales que podrían desempeñar el rol de aumentar la absorción de los nutrientes así como cumplir una función inmunogénica (Lysionek *et al.*, 2001).

La incorporación del hierro hemínico a liposomas se ha aplicado en la fortificación de harinas. Se observó un efecto positivo en la estabilidad y características reológicas de las masas obtenidas y se investigaron las condiciones de cocción adecuadas para mantener el sistema funcional (Albaldawi *et al.*, 2005).

La encapsulación de saborizantes generalmente se realiza mediante coacervación empleando polímeros naturales o mediante su encapsulación molecular con ciclodextrinas. Sin embargo, el empleo de liposomas permite que el sabor permanezca encapsulado aún después de la dilución en agua, contrariamente a los otros sistemas. También han sido empleados para agregar sabor a los quesos, agregándolos directamente a la leche, y reduciendo las cantidades necesarias para lograr un mismo efecto. Existen unos 50 suplementos dietarios en el mercado a base de liposomas, cuyos componente activos son vitaminas (A, B2, B12, E), coenzima Q10, extracto de ginkgo biloba, equinácea, sulfato de glucosamina, extracto de semilla de uva, melatonina, hipericina, gluconato y sulfato de zinc, y sulfato ferroso, entre otros (Hermida, 2006).

Como se ha descrito anteriormente los liposomas tiene un gran potencial para la protección de moléculas de bajo peso molecular en los alimentos, en este sentido se han utilizado como medio de protección para las bacteriocinas contra la degradación enzimática o la interacción con los componentes de los alimentos. Se han desarrollado sistemas de encapsulación para agentes antimicrobianos como la nisina en liposomas de fosfatidilcolina estabilizada con colesterol para inhibir *Listeria monocytogenes*, mostrando una efectividad superior a la aplicación de nisina en forma directa, indicando el potencial de los liposomas para servir como vehículos de administración de antimicrobianos en los alimentos y al mismo tiempo mejorando la estabilidad de los antimicrobianos. (Were *et al.*, 2004).

Dentro de los fosfolípidos empleados para la elaboración de liposomas, se han estudiado diferentes formulaciones con fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, incluso se han empleado liposomas comerciales (Pro-Liposomas) (Benech *et al.*, 2002; Benech *et al.*, 2003; Laridi *et al.*, 2003), así como muestras parcialmente purificadas de fosfatidilcolina (da Silva-Malheiros *et al.*, 2010), en diferentes alimentos como quesos, leches fermentadas o productos cárnicos (Degnan *et al.*, 1993).

1.18. Investigaciones sobre encapsulación de bacteriocinas en liposomas

Diversos métodos fisicoquímicos como la gelificación iónica (Wan *et al.*, 1997) y físicos como el secado por aspersion (Xiao *et al.*, 2011) se han empleado para encapsular moléculas con actividad biológica, entre los materiales más utilizados para el encapsulamiento se encuentran la goma arábica, goma xantana, k-carragenina, quitosano, alginato, almidón, gelatina, zeína, entre otras matrices. Sin embargo, se han realizado diversas investigaciones acerca de la encapsulación de compuestos biológicamente activos como las bacteriocinas en matrices liposomales destacando principalmente la nisina al ser la bacteriocina más ampliamente estudiada.

Degnan *et al.* (1993), evaluaron la actividad antilisterial de la pediocina AcH en modelos alimenticios (sebo de res y lechadas de carne de res), obteniendo como resultados que en los tratamientos con la pediocina adicionada en forma libre ésta

perdía del 9-35% de su actividad después de 60 minutos, por lo que mejoraron la actividad de la pediocina encapsulándola en vesículas multilamelares de fosfatidilcolina (~28% respecto a la pediocina no encapsulada).

Benech *et al.* (2002), encapsularon nisina Z en liposomas hidrogenados comerciales (Pro-lipo[®] H calentados por encima de su temperatura de transición de fases, además caracterizaron la distribución de nisina Z en queso cheddar empleando un inmunoensayo utilizando anticuerpos monoclonales y microscopía electrónica de transmisión, obtuvieron como resultados que en el queso cheddar adicionado con nisina Z encapsulada ésta fue más efectiva reduciendo 3 log UFC/g el crecimiento de la cepa sensible (*Listeria innocua*) respecto a el queso cheddar adicionado con la cepa productora de bacteriocina que redujo 1.5 log UFC/g.

Laridi *et al.* (2003), encapsularon nisina Z en diferentes liposomas comerciales (Pro-lipo[®] C, Pro-lipo[®] Duo, Pro-lipo[®] S y Pro-lipo[®] H), obtuvieron como porcentajes de eficiencia de encapsulación (%EE), de 9.5 a 34.6% a 65 °C, emplearon colesterol como agente estabilizante en los liposomas y observaron que un incremento en éste, disminuía el %EE, además emplearon anticuerpos monoclonales para la cuantificación usando un inmunoensayo enzimático competitivo.

Were *et al.* (2004), encapsularon nisina y lisozima en liposomas mejorando su eficacia contra *Listeria monocytogenes* empleando liposomas hechos con fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y coloesterol, utilizando el método de hidratación de película fina y sonicación, obtuvieron una eficiencia de encapsulación de 54% y lograron reducir 2 ciclos logarítmicos de UFC/mL a *Listeria monocytogenes* respecto a un control libre de nisina.

Taylor *et al.* (2007), en su estudio, probaron la capacidad de los liposomas para soportar la exposición a las tensiones ambientales y químicas normalmente encontradas en los alimentos y las operaciones de procesamiento de alimentos. Los liposomas hechos con fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG), encapsulando nisina, fueron expuestos a temperaturas elevadas (25-75 °C) y un intervalo de pH (5.5 a 11.0). Evaluaron la eficacia de encapsulación (EE), potencial Z, y la distribución del tamaño de los liposomas. Se mantuvo entre 70-90% EE a pesar de

la exposición a temperatura y pH alcalino o ácido elevado. El tamaño de los liposomas promedio fue entre 100 y 240 nm.

Colas *et al.* (2007), prepararon nano-liposomas preparados a partir de diferentes lípidos (Phospholipon 90H, Phospholipon 100H, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), estearilamina (SA), fosfato de dicetilo (DCP) y colesterol) por un nuevo método, no tóxico y escalable, determinaron su capacidad para encapsular nisina Z. La nisina se atrapó en diferentes nano-liposomas con eficiencias de encapsulación (EE) que fueron desde 12% a 54%. Las vesículas aniónicas poseían la más alta EE.

da Silva-Malheiros *et al.* (2010), encapsularon en liposomas preparados a partir de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificado, al péptido antimicrobiano P34. No encontraron diferencia significativa ($p < 0.05$) en la actividad biológica de P34 libre y encapsulado. El Tamaño e índice de polidispersidad de los liposomas, fueron en promedio de 150 nm y 0.22 respectivamente. El efecto de P34 libre y encapsulado fue probado contra *L. monocytogenes*, que muestran que la bacteriocina libre inhibió el patógeno más rápidamente que la P34 encapsulado. Los liposomas preparados con los lípidos de bajo costo mostraron alta eficiencia de encapsulación para un nuevo péptido antimicrobiano y se mantuvieron estables durante el almacenamiento.

Imran *et al.* (2012), prepararon nanoliposomas utilizando lecitina de soja empleando un microfluidizador a 2000 bar con 5 ciclos lo cual generó un tamaño promedio de 151 nm con 50% de eficiencia de encapsulación. El objetivo principal de este estudio fue la fusión de dos conceptos para mejorar la biodisponibilidad de péptidos activos (Nisina), nanoencapsulación e inmovilización con biopolímeros. Los estudios de microestructura (SEM/TEM) revelaron diferentes (poro, laminares, fusión) modos de liberación de la nisina en nanoliposomas incrustados en la matriz polimérica.

de Mello *et al.* (2013), encapsularon pediocina en nanovesículas preparadas a partir de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada. Observaron que la actividad antimicrobiana se mantuvo durante 13 días a 4 ° C, y después de este período, el encapsulado de pediocina retuvo 50% de su actividad inicial frente a *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Listeria Ivanovii*. El tamaño de las vesículas que

contenían pediocina fueron en promedio 190 nm. Los valores de índice de polidispersidad fueron alrededor de 0.201 lo que indica una distribución de tamaño adecuado de liposomas. La eficiencia de encapsulación fue de 80%.

Narsaiah *et al.* (2013), evaluaron el efecto de parámetros de procesos como la concentración de fosfolípidos, amplitud de sonicación y el tiempo de sonicación, en el tamaño de nanoliposomas cargados con pediocina, observaron que al incrementar la concentración de fosfolípidos aumentaba el tamaño de los nanoliposomas, la amplitud de la sonicación tuvo un efecto significativo obteniendo a 60% los mejores resultados, para observar la liberación de la pediocina contenida en los nanoliposomas realizaron cinéticas, y observaron que aquellos tratamientos con pediocina encapsulada disminuyeron el crecimiento de la cepa sensible en 3 log UFC/mL respecto al control que correspondía a la pediocina en forma libre.

1.14.5. Los liposomas como sistemas de liberación controlada

Los liposomas son probablemente los sistemas de liberación controlada más versátiles estudiados hasta la actualidad. Se han empleado para encapsular desde pequeñas moléculas con acción farmacológica hasta macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos. Las moléculas pueden acomodarse tanto en el interior acuoso, como insertarse en las bicapas, o bien formar complejos con liposomas. Los liposomas, por ejemplo, pueden servir como depósito para la liberación lenta de sustancias biológicas de acción local; pueden mejorar la solubilidad de sustancias hidrofóbicas, entre otras aplicaciones. Desde hace años se sabe que la eficiencia de los liposomas como sistemas de liberación controlada depende de una combinación de los siguientes factores: obtener buenos porcentajes de incorporación de las sustancias activas, retener la sustancia activa encapsulada en forma cuantitativa, poder controlar la velocidad de depuración de las vesículas en diferentes medios modelos. Para cumplir con estos objetivos se han desarrollado numerosos métodos de obtención, se han empleado diversas composiciones y concentraciones de fosfolípidos. En el diseño de una formulación liposomal, deben tenerse en cuenta numerosos factores que influyen en la eficiencia y que son comunes a todos los sistemas de liberación controlada: El tamaño, las

características superficiales, el método de preparación, la eficiencia de encapsulación; Las interacciones que establecen los liposomas con la bacteriocina pueden ser las siguientes: Intercambio de lípidos y/o proteínas con las membranas celulares, adsorción o unión, fusión con la membrana celular (Morilla, 2003).

1.15. Métodos para producción de liposomas

La habilidad de atrapamiento de los liposomas de compuestos solubles en agua, ha sido empleada en farmacología y cosmetología. El encapsulamiento de antimicrobianos en liposomas ofrece una buena solución para protegerlos y garantizar su eficacia y estabilidad en las aplicaciones alimentarias (Were *et al.*, 2004). El principio básico para la formación de liposomas es la interacción hidrofóbica/hidrofílica entre lípido/lípido y lípido moléculas del agua. El añadir energía (ultrasonificación, homogenización, agitación o calor) genera el arreglo de los lípidos en forma de vesículas bicapilares para asignar un equilibrio termodinámico en la fase acuosa (Mozafari, 2005).

Las propiedades funcionales de los acarreadores liposomáticos para encapsular antimicrobianos dependen de la interacción entre la membrana del liposoma y la membrana de la célula bacteriana. Se ha visto que la adición de nisina cargada positivamente a un anión fosfolipídico como el fosfatodiglicerol genera una interacción electrostática en donde al adicionarse liposomas neutros se generan interacciones hidrofóbicas (Colas *et al.*, 2007).

Entre los métodos utilizados para generar estas variedades de liposomas se encuentran: la hidratación de película fina, la ultrasonificación, la evaporación en fase reversa, la microfluidización, entre otros (Pegg y Shaihi, 1999).

1.15.1. Hidratación de película fina

Requiere disolver los fosfolípidos en disolventes orgánicos como cloroformo o metanol, se utiliza rotaevaporación para eliminar el disolvente y formar una película fina de fosfolípidos, para su posterior hidratación con el agente a encapsular. Este método de producción de liposomas requiere baja energía de entrada para su

formación, los liposomas se forman rápidamente y son de alta estabilidad, por otro lado, presenta dispersión altamente heterogénea; baja eficacia de encapsulación frente a vesículas pequeñas unilamelares (LUV) y es casi imposible determinar el área de superficie/vesícula encapsulada en masa (Taylor *et al.*, 2007; da Silva-Malheiros *et al.*, 2010).

1.15.2. Ultrasonicación

La ultrasonicación se realiza de dos formas, la primera con una sonda metálica dentro de la suspensión de una gran cantidad de liposomas, requiere 2 horas; y en la segunda la dispersión lipídica es colocada en un vial de vidrio sellado herméticamente, suspendido en un baño ultrasónico, requiere sólo unos cuantos minutos para realizarse, además, que tiene la ventaja de que puede realizarse en un contenedor cerrado con nitrógeno o argón y no contamina el lípido (Were *et al.*, 2004; Bastarrachea *et al.*, 2010).

1.15.3. Evaporación en fase reversa

La evaporación en fase reversa se realiza al estar los lípidos en una mezcla acuosa no polar como solvente, formando micelas invertidas; el solvente no polar es removido por evaporación rotatoria bajo condiciones de vacío, y el gel intermedio cambia a vesículas unilamelares y oligolamelares. Este procedimiento se caracteriza por un tamaño de vesículas poco uniforme que va de 0.1 a 1 μm de diámetro, además de una eficiencia superior al 65%. Sin embargo, su desventaja principal es que los componentes son expuestos tanto a solventes orgánicos como a sonicación, lo que puede ocasionar una desnaturalización de las proteínas o de otras moléculas de estabilidad similar (Pegg y Shaihi, 1999, Taylor *et al.*, 2007).

1.15.4. Extrucción por membrana

La extrucción por membrana permite procesar altas concentraciones lipídicas (~150 mg/mL), es el método más utilizado para la producción de liposomas a gran escala debido a su alta reproducibilidad, los liposomas se deben mantener sobre su T_m

(temperatura de transición de fases) para facilitar su extrucción, existen extractores manuales para trabajar con volúmenes pequeños (1 mL) (Arulsudar *et al.*, 2004).

1.15.5. Microfluidización

La microfluidización se basa en la dinámica de microcanales; sus principales ventajas son: el gran volumen de liposomas que pueden formarse de manera continua y reproducible, la posibilidad de ajustar el tamaño medio de partícula, la alta eficiencia de encapsulación de agente activo que se logra (>75%), la posibilidad de encapsular solutos sin ser expuestos a solventes orgánicos, formando liposomas estables y sin agregación (Pegg y Shaihi, 1999; Barnadas-Rodríguez & Sabés-Xamani, 2003; Taylor *et al.*, 2007)

La microfluidización es un tipo de homogeneización y es una técnica que puede crear grandes volúmenes de liposomas rápidamente, con tamaños de partícula pequeños y homogéneos (Kosaraju *et al.*, 2006; Thompson & Singh, 2006; Colas *et al.*, 2007). Un microfluidizador consiste en una entrada de fluido, un motor de alta presión y una cámara de interacción donde dos flujos recorren dicha cámara a alta velocidad y colisionan (Figura 1.3).

La microfluidización utiliza una presión muy alta (hasta 1,500 bar), funciona en el principio de dividir una corriente de presión en dos partes, cada parte pasa a través de un orificio fino, y dirigir los flujos de uno al otro en el corazón del microfluidizador, es decir, la cámara de interacción. El microfluidizador utiliza alta presión para guiar la corriente de flujo a través de microcanales hacia el área de incidencia, lo que crea una acción muy alta de cizalla que proporciona una emulsión excepcionalmente estable. Dentro de la cámara de interacción, la cavitación, junto con cizallamiento e impacto, reduce el tamaño de partícula de la matriz liposomal (Jafari *et al.*, 2006). Esta técnica desencadena interacciones fisicoquímicas entre el refinado de fosfatidilcolina de soya y la pediocina y se ha utilizado para formar liposomas para aplicaciones funcionales en diferentes sectores industriales. Esta técnica también es adecuada para su uso en la industria alimentaria porque no requiere el uso de detergentes o disolventes como se mencionó anteriormente (Thompson & Singh,

2006). Imran *et al.* (2012) evaluaron la encapsulación en liposomas de nisina utilizando microfluidización, que dio como resultado una alta capacidad de encapsulación de la bacteriocina. Escasos estudios se han realizado donde se encapsule a través de liposomas a bacteriocinas empleando microfluidización, por lo tanto, resulta interesante estudiar este método para la encapsulación de estos péptidos.

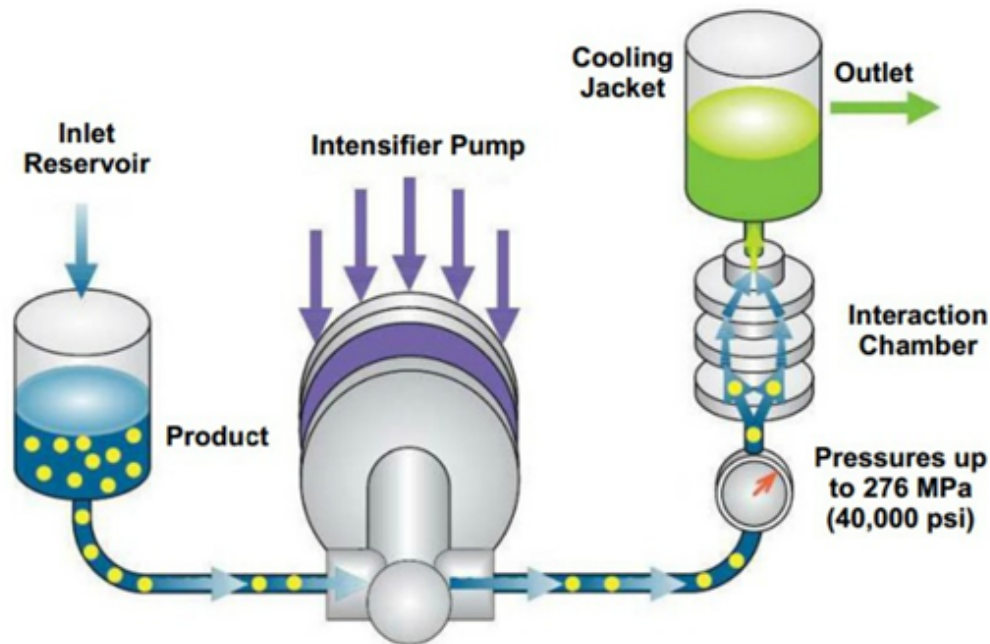


FIGURA 1.3. Diagrama del mecanismo de microfluidización.

1.16. Separación de la fracción no encapsulada.

Los liposomas poseen una capacidad limitada de encapsulación, de tal forma que siempre existirá una parte del material a encapsular no incorporada en las vesículas lipídicas. La separación de la fracción no captada puede llevarse a cabo por cromatografía de filtración en gel, HPLC, centrifugación, diálisis o ultrafiltración. En la filtración a través de los geles aparecen dos picos bien diferenciados; uno de ellos corresponde a los liposomas, y el otro al producto sin encapsular. El inconveniente

radica en la dilución de la dispersión liposomal durante la separación, así como posibles fenómenos de adsorción lipídica en el lecho filtrante (Fang *et al.*, 1997).

1.17. Caracterización de los sistemas encapsulados

La caracterización de las cápsulas constituye una etapa fundamental en el análisis de la micro y macroestructura, propiedades térmicas, propiedades mecánicas y reológicas y el análisis de superficie. En la Tabla 1.8 se muestran algunas de las técnicas de caracterización más empleadas. En cada sistema particular la selección y aplicación de las técnicas, estará en función de las características del encapsulado y de las futuras aplicaciones del mismo.

TABLA 1.8. Caracterización de sistemas encapsulados.

| Característica | Técnicas empleadas |
|---|--|
| Tamaño de partícula y forma | Técnicas microscópicas, tamizado, sedimentación, técnicas de difracción de rayos láser |
| Potencial Zeta | Determinación empleando un equipo de dispersión de luz dinámica. |
| Interacciones polímero-compuesto activo | Difracción de rayos X, Espectroscopía de Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Análisis Térmico Diferencial (DTA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). |
| Análisis morfológico | Microscopía Electrónica de Barrido (SEM/ESEM/SEM-EDX), Microscopía Electrónica de Transmisión/criogénica (TEM, Cryo-TEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) |

Fuente: López-Córdoba, 2012.

1.17.1. Tamaño de partícula

La caracterización del tamaño de partículas es importante en los productos alimenticios porque tiene un fuerte impacto en la estabilidad de los alimentos, la viscosidad, las propiedades ópticas y los atributos sensoriales (McClements, 2007).

Muchas industrias emplean la caracterización del tamaño de partículas para mantener la calidad de los productos y obtener una mejor comprensión de los ingredientes y procesos (Malvern, 2012). La concentración de partículas se informa generalmente como porcentaje de volumen (% de volumen) o porcentaje de número (% de porcentaje), y el tamaño real de las partículas se reporta como diámetro medio de partícula (McClements, 2007). Una variedad de instrumentos analíticos está disponible comercialmente para su uso en la industria para caracterizar partículas, tales como difracción láser, dispersión de luz dinámica, imágenes automatizadas, dispersión de luz electroforética y conteo de pulsos eléctricos (McClements, 2007; Malvern, 2012).

1.17.2. Determinación del potencial zeta

El potencial zeta es la medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas, partículas y/o células en un líquido. Por esto, cuanto mayor sea esta fuerza dispersora, mayor estabilidad tendrá la solución y mayor será su capacidad para acarrear partículas en suspensión. A su vez cuantas más partículas pueden coexistir en el medio, más efectiva resultará la suspensión liposomal (Arulsudar *et al.*, 2004). La Tabla 1.9 muestra, de manera simple, la relación entre la estabilidad de una solución y su potencial zeta.

El potencial zeta se presenta donde se unen la capa difusa y la de Stern y puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial resultan difíciles de determinar. Este potencial puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. Su determinación en una solución, es posible aplicando un campo eléctrico en el líquido, lo que hará que las partículas cargadas se muevan hacia el polo positivo o negativo del campo aplicado. La dirección elegida por las partículas indica claramente el signo de la carga que poseen. La velocidad con la cual se trasladan es proporcional a la magnitud de la carga. Determinando ambas, dirección y velocidad, bajo la influencia de un campo eléctrico conocido es posible calcular la movilidad y el potencial zeta (Kawaguchi *et al.*, 2008).

TABLA 1.9. Relación de estabilidad y potencial zeta de una suspensión

| Estabilidad | Potencial Zeta (mV) |
|-------------------------------------|---------------------|
| Muy buena. Dispersión extrema | -100 a -60 |
| Buena | -60 a -40 |
| Moderada | -40 a -30 |
| Umbral de leve dispersión | -30 a -15 |
| Umbral de aglomeración | -15 a -10 |
| Fuerte aglomeración y precipitación | -5 a +5 |

Fuente: Riddick, 1968; Luxbacher, 2014.

1.17.3. Turbiscan (Luz retrodispersa)

El instrumento Turbiscan, se ha desarrollado para el análisis de la desestabilización física de dispersiones concentradas y líquidas (emulsiones, suspensiones, espumas, etc.). El corazón del Turbiscan es un cabezal de detección que se mueve hacia arriba y hacia abajo a lo largo de una celda cilíndrica de fondo plano. El cabezal de detección está compuesto por una fuente de luz pulsada de infrarrojo cercano ($\lambda = 850\text{nm}$) y dos detectores síncronos. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra, mientras que el detector de retrodispersión recibe la luz dispersa hacia atrás por la muestra. El cabezal de detección explora toda la longitud de la muestra (aproximadamente 45 mm), adquiriendo datos de transmisión y retrodispersión cada 40 μm (1625 adquisiciones de transmisión y retrodispersión por escaneo). La señal se trata primero con el convertidor de corriente a voltaje Turbiscan. El software de microprocesador integrado maneja la adquisición de datos, la conversión de analógico a digital, el almacenamiento de datos, el control del motor y el diálogo de la computadora (Mengual *et al.*, 1999).

1.17.4. Análisis térmico

Los sistemas que contienen fosfolípidos tienen comportamientos de fase complejos; pueden existir en una o más formas líquido-cristalinas o mesomórficas dependiendo de la temperatura y la composición. Un parámetro importante para los sistemas liposomales es la temperatura de transición de gel a cristal líquido (T_m), en la que la bicapa pierde gran parte de su estructura de empaquetado ordenada debido a una fusión de las cadenas hidrocarbonadas. Usualmente, las longitudes de cadena de hidrocarburo más largas se traducen en temperaturas de transición de fase más altas. Cabe señalar que la mayoría de los fosfolípidos naturales contienen cadenas de hidrocarburos que son asimétricas; es decir, las cadenas de ácidos grasos pueden diferir en longitud. Por lo tanto, las transiciones pueden ocurrir en un rango de temperaturas. El grado de insaturación de ácidos grasos en la cadena de hidrocarburos también influye en la transición de fase. La T_m aumenta al aumentar la saturación. Finalmente, las interacciones fuertes de la cabeza polar también pueden aumentar la temperatura de transición de fase (Taylor *et al.*, 2007).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es probablemente la técnica más utilizada en la determinación de las propiedades térmicas de encapsulados, ésta ofrece información relevante acerca del estado físico del compuesto activo dentro de la matriz liposomal. La técnica de DSC mide la diferencia de temperatura entre la muestra y una referencia, causada por un cambio de fase. Las transiciones de primer orden producen picos y las de segundo orden ocasionan un salto en el flujo calórico. La transición de fases es una transición de segundo orden y su determinación mediante DSC y otras técnicas apropiadas es muy importante para inferir la estabilidad de los productos (Gabbott, 2007; Alipour *et al.*, 2010).

1.17.5. Técnicas microscópicas

Para analizar las características morfológicas de los liposomas, se recurre normalmente a técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) o de transmisión (TEM) que también permiten detectar la posible agregación de las partículas, así como determinar el tamaño de las mismas.

El análisis TEM ha sido empleado frecuentemente para examinar las propiedades de superficie y la estructura de un gran número de materiales en el campo de alimentos. Este microscopio ha sido llamado de transmisión, ya que el haz de electrones atraviesa una fina membrana o preparación para proyectar la imagen sobre una pantalla fluorescente colocada al final de la trayectoria de este flujo de electrones que requiere de un espacio con vacío para desplazarse a través del sistema de lentes electromagnéticos. La emisión del haz tiene su origen en un filamento de tungsteno en forma de horquilla que se encuentra rodeado por una pantalla cilíndrica que está polarizada negativamente con respecto al filamento. Como consecuencia de esta polarización negativa, el campo alrededor de la apertura circular actúa como una lente electrostática que produce una imagen de pequeño diámetro en un punto situado debajo de la pantalla cilíndrica antes mencionada. A esta imagen se le conoce como entrecruzamiento. El filamento de tungsteno o cátodo, generalmente posee una tensión de 50 a 80 kV. Gracias al alto voltaje y al vacío en que se conducen los electrones emitidos la longitud de onda del rayo electrónico es tan corta como 0.05 nm, permitiendo un poder de resolución cercano a 1.0 nm (López-Córdoba, 2012).

La microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM) es otro tipo de TEM que puede usarse para determinar las estructuras y morfologías de sustancias que no pueden cristalizarse. En cryo-TEM, una solución de interés (como los liposomas) se congelan en una fina capa de hielo, y esta capa se visualiza en un microscopio electrónico con las condiciones anteriormente mencionadas. Esta técnica es ideal para la visualización de los liposomas suspendidos en buffer de fosfatos (PBS) (Bai *et al.*, 2013)

1.19. Investigaciones realizadas en el Instituto Tecnológico de Veracruz

López del Castillo (1998), aisló una cepa productora de bacteriocina del grupo de las bacterias ácido-lácticas, esta bacteria pertenece a la especie *Pediococcus acidilactici* y se denominó *Pediococcus acidilactici* ITV26.

Calderón-Santoyo (2001), evaluó los factores físicos de crecimiento que determinan la producción de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV26 en el medio MRS, encontrando que las mejores condiciones para la producción de la bacteriocina son a una temperatura de 35 °C, pH de 5,0 y que la agitación no afecta la producción.

Martínez (2001), evaluó el efecto de distintas fuentes de carbono (glucosa, fructosa y sacarosa), encontrando que a una concentración de 166 mM de glucosa se favorece el crecimiento y producción de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV26.

González Gómez (2002), caracterizó parcialmente la bacteriocina purificada de *Pediococcus acidilactici* ITV26 por el método de adsorción celular, la bacteriocina purificada de *Pediococcus acidilactici* ITV26, se mostró estable al encontrarse en condiciones ácidas y alcalinas (pH 1.0 a 9.0). La mayor estabilidad antimicrobiana de la Bacteriocina purificada fue encontrada a pH 6.8. Además, determinó que la acción de la temperatura afecta directamente la actividad antimicrobiana de la bacteriocina purificada, a medida que se aumentó la temperatura, se presentó un descenso en la actividad antimicrobiana, a 63° C se logró una actividad del 81% y a 121 °C perdió completamente su actividad.

De la Fraga Chávez *et al.* (2007), purificaron la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26 utilizando el método de adsorción-desorción. El peso molecular estimado por SDS-PAGE fue de 4,618 Da y su punto isoeléctrico de 9, determinando que este método disminuye varios pasos de purificación al compararlo con protocolos de purificación convencionales.

Barraza (2008), determinó el efecto de la fuente de nitrógeno (extracto de levadura y suero de leche), pH y temperatura sobre la producción de bacteriocina a partir de *Pediococcus acidilactici* ITV26. Obteniendo la mayor producción de bacteriocina en el medio de cultivo formulado con una concentración de 11.8% (g/l) extracto de levadura y 9.6% (g/l) suero de leche, las condiciones de pH y temperatura probadas no mostraron diferencia significativa en la producción.

Portilla (2010), obtuvo la secuencia del gen estructural de la pediocina, y llevó a cabo un análisis sobre: Secuencia de nucleótidos, dominios conservados y relación filogenética.

Jiménez-Hernández (2011), evaluó el efecto de la albumina de suero bovino y glucosa a diferentes concentraciones (0, 2, 5 y 10 % p/v), sobre la actividad antilisterial de la bacteriocina en extracto crudo de *Pediococcus acidilactici* ITV26. Observó la glucosa disminuyó de 33.3 - 50% la actividad antimicrobiana, mientras que la albumina de suero bovino disminuyó de 41.7 - 66.7% la actividad antilisterial.

Álvarez Villagómez (2017), evaluó la viabilidad de *Pediococcus acidilactici* ITV26 encapsulado en un digestor dinámico, encapsuló a la bacteria mediante el método de extrucción utilizando matrices poliméricas de alginato-almidón y alginato-goma xantana. Observó que la mejor formulación fue con alginato-almidón con 2/8% (p/p) con un tamaño de partícula de 219 μm , obtuvo una eficiencia de encapsulación del 98% con una reducción de 2 log UFC en un periodo de 60 días durante el almacenamiento a 2 y 8 °C. Mediante microscopía electrónica de barrido ambiental y microscopía confocal de barrido láser las cápsulas mostraron forma esférica y heterogénea con presencia de poros sobre la superficie de 1.38 μm .

JUSTIFICACIÓN

Debido a los factores que pueden provocar una reducción en la actividad de las bacteriocinas, como la inactivación por enzimas proteolíticas o la interacción con los componentes de los alimentos, existe la necesidad de implementar métodos de protección para la bacteriocina como es la encapsulación. Sin embargo, los tamaños de partículas obtenidos por algunos métodos podrían no ser los adecuados para su adición en los alimentos. Ante esta perspectiva, se requiere implementar estrategias que involucren el uso de la nanoencapsulación. Por lo que se propone el uso de la tecnología de microfluidización a través de matrices liposomales, para conservar la actividad y controlar la liberación de la bacteriocina en un alimento.

HIPOTESIS

Es posible mantener y prolongar la actividad de la bacteriocina producida por *P. acidilactici* ITV26 a través de una formulación liposomal adecuada y controlar su liberación en un alimento.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los factores que determinan la estabilidad fisicoquímica de liposomas conteniendo la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26, así mismo la actividad y liberación del péptido encapsulado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de la concentración de fosfolípidos, presión y número de ciclos para la encapsulación de la bacteriocina purificada en liposomas por microfluidización.

Caracterizar fisicoquímicamente los liposomas conteniendo la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26.

Evaluar la eficiencia de encapsulación y la liberación de la bacteriocina de los liposomas a diferentes valores de pH.

Analizar la microestructura de los sistemas que muestren la mayor estabilidad, liberación y actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Bacterias y condiciones de crecimiento

Cepas microbianas: Se utilizó la cepa *Pediococcus acidilactici* ITV26 productora de una pediocina, aislada en el Instituto Tecnológico de Veracruz a partir de heces de bebe lactante, identificada por medio de la galería API 50 CHL y el manual Bergey's de determinación bacteriológica y caracterizada molecularmente por el Instituto de Fijación de Nitrógeno de la UNAM (Portilla, 2010; Galván, 2012); se empleó *Listeria innocua* AST-062 como cepa sensible, ambos microorganismos se incubaron a 37 °C por 18 horas en medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y caldo LB (Lauria-Bertoni), respectivamente (Apéndice A).

2.1.1. Reactivación de la cepa productora de bacteriocina

Se reactivaron las cepas a partir de cultivos conservados a -70 °C en glicerol al 40% (v/v) de *Pediococcus acidilactici* ITV26 y *Listeria innocua* AST-062, se tomó un inóculo al 1% (100 µL) de ambas cepas y se sembraron en 10 mL de caldo MRS y en 10 mL de caldo LB respectivamente, en una incubadora (Precision Scientific modelo 815) a 37 °C por 18 horas a pH 6.5. A partir de estos cultivos se realizaron dos siembras más en las mismas condiciones (González Gómez, 2002).

2.2. Obtención de la bacteriocina en extracto libre de células.

Se sembró un inóculo al 1% (1×10^7 UFC/mL) de *P. acidilactici* ITV26 en 400 mL de medio MRS, se incubó durante 18 horas a 37 °C, posteriormente se centrifugó (Eppendorf 5810 R) a 12,000 x g durante 15 minutos a 4 °C, se obtuvo por decantación un extracto libre de células al cual se le ajustó el pH a 6.8 con NaOH 2N y se esterilizó por filtración empleando una membrana Millipore de 0.22 µm (MILLEX®GV), finalmente se almacenó a -70 °C en un ultracongelador (REVCO modelo ULT1386-5-A30) hasta su posterior utilización.

3.2. Obtención de la bacteriocina en forma de extracto libre de células

Respecto a los datos obtenidos anteriormente la cepa de *Pediococcus acidilactici* ITV26 fue activada a partir de un cultivo congelado (-70 °C) y conservado en glicerol 40% (v/v), la activación se realizó en 3 resiembras en medio de cultivo MRS a 37 °C durante 18 h (apartado 2.1.1) hasta alcanzar la fase estacionaria tardía (4×10^9 UFC/mL), donde se detectó la máxima actividad de la bacteriocina, se procedió a separar el paquete celular mediante centrifugación para posteriormente por decantación obtener el sobrenadante, se ajustó el pH cercano a la neutralidad para evitar la acción bactericida del ácido láctico y debido a que a pH 6.8 se muestra la máxima actividad de la bacteriocina, posteriormente se esterilizó por filtración, a éste sobrenadante se le llamó extracto libre de células (ELC) (López del Castillo, 1998, González-Gómez, 2002).

2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar

La actividad de los extractos libres de células, purificados y semipurificados se determinó por medio de la técnica de difusión en agar (Schillinger & Lucke, 1989). Se prepararon placas con 15 mL de agar LB, se utilizó un cultivo fresco de *Listeria innocua* AST-062 incubado durante 18 horas a 37 °C, se preparó una dilución 10^{-2} utilizando una solución de cloruro de sodio al 0.85% y se inocularon 105 µL de la dilución, en 15 mL de agar LB fundido por la técnica de vertido en caja. A las placas inoculadas se le perforaron pozos de 5 mm de diámetro empleando pipetas pasteur estériles, se aplicaron 30 µL de las diferentes muestras, con diluciones en un intervalo de 1:10 a 1:310 en un buffer regulador de fosfatos 25 mM pH 6.5.

Las placas inoculadas se pre-incubaron (overnight) a 4 °C durante 12 horas y posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas.

La actividad de los extractos, se estimaron por medio de unidades arbitrarias de bacteriocina por mililitro (UA/mL), utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{UA}{mL} = \frac{1000}{alícuota \times D}$$

D = máxima dilución del extracto.

alícuota = 30 μL .

Una unidad arbitraria de bacteriocina, se define como el recíproco de la más alta dilución que muestra halos de inhibición mayor o igual a 1 cm de diámetro sobre el crecimiento de la cepa indicadora (Jiménez *et al.*, 2011).

2.4. Purificación de la bacteriocina

El péptido se purificó por el método de adsorción-desorción en base a la técnica propuesta por Yang *et al.* (1992) y modificada por De la Fraga *et al.* (2007), la cual se basa en la afinidad de las células productoras de bacteriocinas, para adsorber estas moléculas de bacteriocina en su membrana plasmática, en función del pH, para esto un inóculo al 1% (4mL) de *P. acidilactici* ITV26 se resembró en 400mL de medio MRS durante 18 horas a 37 °C como describió anteriormente (2.2), a continuación se ajustó al pH de mayor adsorción (pH 5.5) reportado por De la Fraga *et al.* (2007) con una solución 2N de NaOH, se realizó un calentamiento a 70 °C durante 20 minutos y choque térmico con un baño de hielo ($T < 25$ °C) para inactivar proteasas que pudieran estar presentes en el medio (Daba *et al.*, 1994), el pellet celular se recuperó por centrifugación (Eppendorf 5810 R) a 12,000 x g durante 15 minutos a 4 °C, el caldo o extracto libre de células se conservó a -70 °C en ultracongelación hasta la determinación de su actividad antimicrobiana. El paquete celular se resuspendió en 20mL de una solución de buffer de fosfatos 25 mM pH 6.5 (Apéndice B) y se realizaron 3 lavados con el mismo volumen y solución, posteriormente se resuspendió el paquete celular en 20mL de NaCl 200mM y se ajustó al pH de mayor desorción (pH 2) (De la Fraga *et al.*, 2007) con ácido fosfórico 5%, las células se mantuvieron en agitación durante 4 horas a 4 °C adaptando un baño con agitación (LAB-LINE 3540) y un baño con recirculación (Fisher Scientific IsoTemp 10135) para lograr una mayor desorción. Pasado este tiempo se recuperó el paquete celular por centrifugación a 10,000 x g por 20 minutos a 4 °C, se resuspendió en solución de buffer de fosfatos (PBS) 25mM pH 6.5 y se almacenó a -70 °C para posteriormente determinar su actividad antimicrobiana.

2.5. Ultrafiltración y liofilización de la bacteriocina

Por otro lado, el sobrenadante libre de células se ultrafiltró empleando tubos Amicon® Ultra-15 Millipore con 2 puntos de corte molecular, primeramente, empleando un tubo de 10 kDa para separar los componentes de mayor peso molecular de la bacteriocina, seguido de un tubo de 3 kDa para concentrar la bacteriocina y eliminar las sales empleadas en el método de purificación, siguiendo las instrucciones del fabricante (5,000 x g durante 30 minutos). La muestra concentrada se congeló a -70 °C para liofilizarla durante 24 horas empleando un liofilizador (Labconco 77500-00), la muestra liofilizada se conservó a -70 °C hasta la determinación de su actividad antimicrobiana. Todas las pruebas de actividad se realizaron por el método de difusión en agar de acuerdo a la técnica descrita por Schillinger & Lucke (1989), descrita en el apartado 2.9.

2.6. Electroforesis SDS-PAGE.

Las electroforesis se realizó a las muestras de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación y la ultrafiltración descritas anteriormente y del extracto libre de células, así como un marcador de peso molecular Bio-Rad Polypeptide SDS-PAGE Standards (Triosafosfatoisomerasa 26.625 kDa, Mioglobina 16.950 kDa, α -lactalbumina 14.437 kDa, Aprotinina 6.512 kDa, Insulina 3.496 kDa y Bacitracina 1.423 kDa), siguiendo la técnica de SDS-PAGE descrita por Bhunia *et al.* (1988) para péptidos pequeños. Esta técnica utiliza dos geles, uno de 4 y otro de 16.5 %T (Concentración de acrilamida más entrecruzador) (ver Apéndice C) para mejorar la separación de los péptidos más pequeños. La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara Mini Protean III (Bio-Rad). Las condiciones de experimentación fueron discontinuas a 40 V durante 2 horas y 80 V durante 2.5 horas en refrigeración a 5 °C. Una vez separados los péptidos, se tiñó con nitrato de plata para la visualización de las bandas empleando el kit ProteoSilver™ (Apéndice D).

La observación de los geles y la obtención de las imágenes se hicieron en un fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc™ XR+) utilizando el software Image Lab™.

2.7. Determinación del contenido de proteína

Se determinó el contenido de proteína de las muestras de bacteriocina purificada y bacteriocina en extracto libre de células, por el método de Bradford (Apéndice E), utilizando un kit Bio-Rad Protein Assay, para lo cual se realizó una curva de calibración, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar a una concentración de 0.05 a 0.5 mg/mL (Apéndice E).

Se tomaron 10 μ L de la muestra problema y se agregó 200 μ L del reactivo de Bradford 5X (1:4). Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de leer a una absorbancia de 570 nm, en un lector de microplacas marca (Bio-Rad Benchmarck Microplate reader).

2.8. Diseño experimental

Para determinar el efecto de las variables de encapsulación se empleó un diseño experimental factorial 3x2x2 como se muestra en la Tabla 2.10, se realizaron 12 experimentos con 3 replicas.

TABLA 2.10. Valores reales y codificados en el diseño factorial completo 3x2x2 sobre la nanoencapsulación de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV26.

| Experimento | Concentración de fosfatidilcolina (PC) | Presión (Bar) | Número de ciclos |
|-------------|--|---------------|------------------|
| 1 | 1% | 500 | 1 |
| 2 | 1% | 500 | 2 |
| 3 | 1% | 1000 | 1 |
| 4 | 1% | 1000 | 2 |
| 5 | 3% | 500 | 1 |
| 6 | 3% | 500 | 2 |
| 7 | 3% | 1000 | 1 |
| 8 | 3% | 1000 | 2 |
| 9 | 5% | 500 | 1 |
| 10 | 5% | 500 | 2 |
| 11 | 5% | 1000 | 1 |
| 12 | 5% | 1000 | 2 |

2.9. Encapsulación de la bacteriocina

2.9.1. Preparación de los liposomas

Los liposomas cargados con pediocina se prepararon usando 1, 3 y 5% de concentración (p/v) de un refinado de fosfatidilcolina de soya (L- α -Phosphatidylcholine for microbiology, PC, Sigma-Aldrich) mezclados con la bacteriocina purificada con una concentración de 0.765 mg/mL resuspendida en PBS pH 6.5, 25 mM. Primero se utilizó un homogenizador rotor-stator (Ultra-Turrax[®] IKA[®] T-25) a 13,500 rpm durante 3 minutos para incorporar la bacteriocina purificada en la matriz fosfolípida, las pre-emulsiones, denominadas “Ciclo 0” se hicieron pasar a través de un equipo microfluidizador (Microfluidics[®] M-110P) a presiones de 500 y 1000 bar, con 1 y 2 ciclos de microfluidización, el tamaño y geometría de la cámara de interacción fueron constantes en configuración Y (Kosaraju *et al.*, 2006).

El microfluidizador se calibró y purgó utilizando agua destilada hasta la presión deseada, posteriormente se colocó la muestra en el reservorio de entrada y se bombeó hasta la cámara de interacción donde las fuerzas de corte, el cizallamiento e incluso la cavitación disminuyeron el tamaño de partícula, la muestra circuló por el sistema de enfriamiento y se recolectaron muestras de 50 mL en tubos falcon estériles.

2.10.2. Separación de la fracción no encapsulada: Cromatografía de filtración en gel

Para la separación de la bacteriocina no encapsulada se utilizó cromatografía de filtración en gel, empleando una columna de vidrio (2.6 x 100 cm) y 50 g de Sephadex G-50 medium (Sigma-Aldrich), con un tamaño de partícula seca de 50 – 150 μ m y un rango de separación para péptidos y proteínas globulares de 1,500 a 30,000 Da, se mantuvo en agua ultrapura durante 3 días y a 4 °C. Durante este tiempo, se decantó varias veces el agua para eliminar las partículas del gel de menor tamaño que quedaron flotando en la superficie. Posteriormente, la suspensión del gel en agua se calentó en baño de agua (100 °C) durante 4 horas,

con el fin de terminar de hinchar el gel y eliminar las burbujas de aire del gel, y se dejó enfriar.

Una vez preparado el gel, se vertió cuidadosamente en la columna de vidrio y se dejó compactar durante 2 días. Posteriormente se midió la altura final del gel compactado. Finalmente se pasaron las suspensiones liposomales a través de la columna a un flujo de 0.5 mL/min hasta obtener las fracciones separadas (Imran *et al.*, 2012). Se recolectaron fracciones a diferentes tiempos y se midió la absorbancia por espectrofotometría (Bio-Rad SmartSpecs™ 3000) a una longitud de onda de 280 nm hasta detectar proteína libre en las fracciones. A partir de este momento se consideró la fracción encapsulada y el resto la fracción no encapsulada (Were *et al.*, 2004; Imran *et al.*, 2012).

2.10. Caracterización de los liposomas

2.10.1. Análisis del tamaño de las microcápsulas

La distribución del tamaño de partícula se presentó en % de volumen por el diámetro medio de partícula (d.nm). El análisis del tamaño de partícula y la distribución se midió por dispersión de luz dinámica empleando el equipo Zetasizer (Malvern Instruments Inc.), este equipo emplea difracción láser y tiene un intervalo de detección de 0.3 nm a 5 µm. El tamaño de partícula reportado es el proporcionado por el equipo como percentil 90 (D90) y se determinó el índice de polidispersidad (Pdl). El Pdl es una medida adimensional que describe la amplitud de la distribución del tamaño de glóbulo; este mide la varianza de la distribución y mientras más monodispersidad tenga la muestra, el valor de Pdl disminuirá. Ambos parámetros se calcularon por el equipo de acuerdo al estándar internacional ISO 13321:1996. Para esto 10 µL de la emulsión de liposomas se diluyeron en 1 mL de agua desionizada; la medición se llevó a cabo a un ángulo de dispersión de 90°, la temperatura se mantuvo a 25 °C, cabe mencionar que cada muestra se analizó por triplicado, los datos se adquirieron y analizaron mediante el Zetasizer software versión 7.11 (Cavazos-Garduño, 2012).

2.10.2. Determinación del potencial zeta

Se analizó la carga superficial de las cápsulas midiendo el potencial zeta de la emulsión de liposomas conteniendo la bacteriocina purificada de *Pediococcus acidilactici* ITV26 con el equipo Zetasizer (Malvern Instruments Inc.), 25 µL de los liposomas se diluyeron en 2 mL de agua desionizada, la determinación se llevó a cabo a un ángulo de dispersión de 90° a temperatura de 25 °C, analizando cada muestra por triplicado, los datos se adquirieron y analizaron mediante el software Zetasizer versión 7.11 (Cavazos-Garduño, 2012).

2.10.3. Cinéticas de estabilidad (Turbiscan)

Se analizó la estabilidad de los liposomas mediante un estudio de luz retrodispersa empleando el equipo de luz retrodispersa (Formulaction Turbiscan LAB), después del proceso de homogenización mediante el rotor-stator y microfluidización, todas las muestras sin diluir (1, 3 y 5% p/v de PC, a 500 y 1000 bar de presión, con 0, 1 y 2 ciclos de microfluidización) se adicionaron a una celda de vidrio hasta la altura de 40 mm, se realizaron 20 barridos de luz retrodispersa en modo “Smart” durante 10 días, a temperatura de 25 °C, los datos se adquirieron y analizaron mediante el software Turbisoft versión 2.1.0.52 y el FAnalyser versión 1.1.25 (Mengual *et al.*, 1999).

2.10.4. Microscopía electrónica de transmisión criogénica (Cryo-TEM)

La Cryo-TEM se realizó en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional, con la finalidad de caracterizar los liposomas cargados con pediocina y para determinar la morfología de los sistemas encapsulados, se utilizó un recubridor de carbono (SPI MODULE™ Carbon Coater), en una atmósfera de argón, se colocó un filamento de carbono y se añadió energía a los electrodos de grafito hasta que se alcanzó la temperatura de fusión del carbono, para cubrir el portamuestras (rejilla de cobre), para hacerla hidrófila. Posteriormente el portamuestras se colocó en una estación de vacío enfriada con nitrógeno líquido. Se licuó gas etano utilizando un recipiente con nitrógeno líquido

para formar etano líquido, luego se colocó en el periférico Cryoplunge 3, previamente enfriado con nitrógeno líquido hasta una temperatura constante de -170 °C. La rejilla se colocó en el periférico y se añadió una gota de la muestra diluida en una relación de 1:3 (liposomas: PBS), el exceso de muestra se absorbió en papel de filtro y se vertió en el etano líquido. Se realizó la transferencia de la rejilla del Cryoplunge 3 a la estación de transferencia criogénica, para posteriormente colocarla en una lanza e introducirla en el microscopio. Se utilizó un microscopio JEOL modelo JEM-2100 a 80 kV constantes con magnificaciones de 12000-40000x, a una dosis mínima (menor intensidad para no destruir la muestra), las micrografías presentadas en este estudio representan una observación general tomada a través de las cuadrículas probadas, las micrografías se analizaron mediante el software DigitalMicrograph™ 3.7.0 (de Mello *et al.*, 2013).

2.10.5. Microscopía confocal de barrido láser

Para los tratamientos de liposomas realizados con el rotor-stator, se realizó una observación empleando microscopía confocal de barrido láser en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional, con la finalidad de observar la heterogeneidad en la distribución de tamaño de partícula del pre-tratamiento o ciclo 0, a 30 µL de las muestras se les adicionó 10 µL de rojo nilo (oxazona del azul nilo), el cual es un colorante lipofílico. Se utilizó un microscopio Carl Zeiss LSM 710 con magnificación de 3000x.

2.10.6. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El estudio de las propiedades térmicas de los encapsulados se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (MDSC TA Q2000), para inferir la temperatura de transición de fase. Los termogramas de DSC registran la potencia diferencial requerida para mantener la referencia y la muestra a la misma temperatura mientras se explora la temperatura de las células a una velocidad constante. La temperatura de transición del gel a fase cristalina líquida (T_m) se determina como la temperatura en el pico máximo, mientras que el área bajo el pico proporciona el cambio de entalpía de la transición correspondiente (ΔH_m) (Barreleiro *et al.*, 2002). Se utilizó

un patrón de indio para la calibración del equipo. Los liposomas (15 mg) se colocaron en charolas de aluminio (TZero Pan T080917), se taparon (TZero Hermetic Lid T160818) y se cerraron herméticamente con una prensa. Como referencia se empleó una charola vacía. Las muestras se calentaron a una velocidad de 4 °C/min, desde 25 hasta 120 °C, los termogramas se analizaron mediante el software Universal Analysis 2000 versión 4.5A (Demetzos, 2008).

2.11. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (%EE)

La eficiencia de encapsulación (%EE) de las diferentes formulaciones, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% EE = \left(\frac{m_c}{m_c + m_e} \right) \times 100$$

Donde m_c corresponde a la masa de bacteriocina encapsulada, y m_e es la masa de bacteriocina presente en el extracto en el cual se originó la formulación, ambas variables se determinaron a través del ensayo de cuantificación de proteínas de Bradford.

El valor de m_c se determinó disolviendo 1 mL de cápsulas en una solución de Triton X-100 (2% v/v) durante 2 horas, en un agitador orbital (Daigger® OR-100) a temperatura ambiente (25 °C) a 125 rpm. El Triton X-100 al ser un detergente desintegra las vesículas de fosfolípidos, permitiendo la liberación del péptido encapsulado, m_e se calculó por diferencia (Laridi *et al.*, 2003).

2.12. Estudios de liberación de la pediocina *In vitro*

Se realizaron experimentos de liberación de la pediocina en todos los experimentos de acuerdo con la metodología de Prombutara *et al.* (2012), suspendiendo 50 mg de liposomas cargados con pediocina al 2.0% (p/v) en 1 mL de NaCl 0.15 M/PBS 0.02 M a pH 4.0, 5.0, 6.0 y 6.8. Las suspensiones se agitaron durante 5 minutos y se mantuvieron a una temperatura de 4 °C bajo agitación a 150 rpm. En el momento indicado, se extrajo 1 mL de muestra de la suspensión y se depositó en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó (Eppendorf 5810 R) a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C,

luego se pasó con un filtro Millipore de 0.22 μm . El contenido de pediocina en el NaCl/PBS se determinó por el método de Bradford, como se describió previamente (2.7). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado (Prombutara *et al.*, 2012).

2.13. Inhibición del crecimiento

El estudio de inhibición del crecimiento se llevó a cabo siguiendo el método de Narsaiah *et al.* (2013), con modificaciones. La actividad biológica de los liposomas cargados con pediocina se evaluó determinando el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por mililitro (UFC/mL) después de la incubación de una suspensión al 1% (v/v) de *Listeria innocua* AST-062 en medio LB a 37 °C durante 24 h.

Se añadieron 100 μL de inóculo de *L. innocua* AST-062 a siete matraces que contenían 50 mL de caldo LB, se adicionó pediocina de la siguiente manera:

(a) pediocina sin encapsular (1 mL; 23,333 UA), (b) pediocina encapsulada en liposomas con 3% PC (p/v) usando 500 bar de presión con 1 ciclo de microfluidización (1 mL), (c) pediocina encapsulada en liposomas con 3% PC (p/v) usando 500 bar de presión con 2 ciclos de microfluidización (1 mL), (d) pediocina encapsulada en liposomas con 5% PC (p/v) usando 500 bar de presión con 1 ciclo de microfluidización (e) pediocina encapsulada en liposomas con 5% PC (p/v) utilizando 500 bar de presión con 2 ciclos de microfluidización.

Se retiró 1 mL de medio de cada matraz, se realizaron diluciones seriadas, se sembró en placa de agar LB a las 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 h y se enumeraron las colonias de *L. innocua* AST-062. Además, los ensayos se establecieron en paralelo con la cantidad equivalente de inóculo de *L. innocua* AST-062 como control. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Minitab Software (2010), versión 16.1.0 (Minitab Inc). Se analizaron las muestras por triplicado en este estudio. El efecto de

las diferentes concentraciones de fosfolípidos, la presión y el número de ciclos de microfluidización se estudiaron mediante ANOVA de una vía, y las medias se compararon mediante una prueba de rango múltiple de Tukey. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, cada experimento se realizó al menos dos veces por triplicado.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cinética de crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ITV26

Se estudió el crecimiento de *Pediococcus acidilactici* ITV26 en medio de cultivo MRS, también se determinó el pH y las unidades de actividad por mililitro (UA/mL) de la bacteriocina producida durante 21 horas a 37 °C. Se empezó a observar la actividad de la bacteriocina a las 6 horas de crecimiento, cuando la bacteria se encontraba al inicio de su fase logarítmica y la máxima actividad de la bacteriocina (3,500 UA/mL) se dio entre las 18 y 21 horas, cuando la cepa se encontraba en fase estacionaria (4×10^9 UFC/mL) con un pH final de 4.14 como se muestra en la Figura 3.4, estos resultados son similares a los reportados por López del Castillo (1998) y Barraza (2008), quienes trabajaron con la misma cepa.

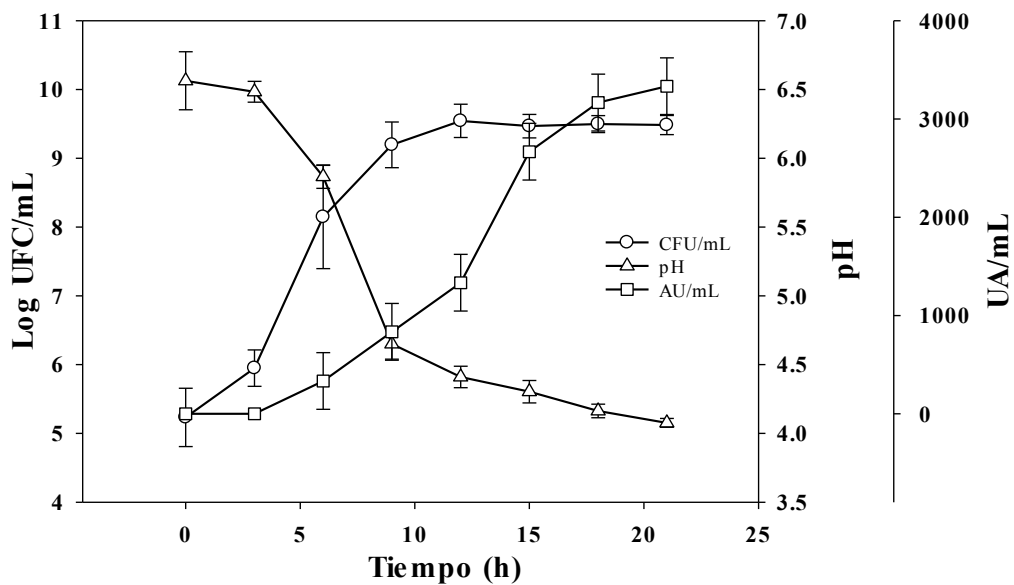


FIGURA 3.4. Cinética de crecimiento, pH y actividad antimicrobiana de *Pediococcus acidilactici* ITV26.

3.3. Purificación de la bacteriocina

Se purificó la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26 con el objetivo de ser utilizada de esta forma en la elaboración de liposomas por microfluidización, para ello se empleó el método de adsorción-desorción (Yang *et al.*, 1992), modificado por De la Fraga *et al.* (2007), para lograr esto se incubó la cepa *Pediococcus acidilactici* ITV26 como se describe en los apartados 2.2 y 2.3, se utilizaron diferentes concentraciones de NaCl (100, 200, 300, 400 y 500 mM) debido a que al aumentar la concentración, se incrementa la desorción de proteínas del paquete celular (De la Fraga *et al.*, 2007).

En la Figura 3.5 se aprecia la presencia de una sola banda en los carriles 4 y 5 se, se encontró que la concentración de 200 mM fue la que permitió una mayor concentración del péptido, comparada con 100 mM [concentración utilizada por Yang *et al.* (1992)], debido a que la banda del carril 4 es más gruesa comparada con la del carril 5, los carriles 1, 2 y 3, presentan múltiples bandas, a medida que incrementa la concentración de NaCl, la presión osmótica es mayor y se desorben otros péptidos con lo cual se comprueba la existencia de diferentes proteínas en el extracto.

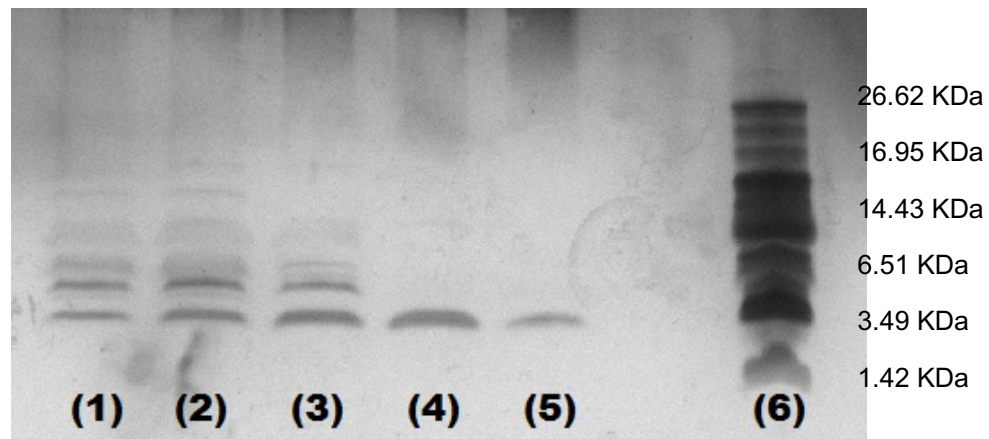


FIGURA 3.5. SDS-Page de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV26 empleando diferentes concentraciones de NaCl para la purificación: (1) 500 mM, (2) 400 mM, (3) 300 mM, (4) 200 mM, (5) 100 mM y (6) Marcador molecular.

La mayor adsorción de la bacteriocina al paquete celular se ve favorecida a pH de 5.5 como se describe en los trabajos de Jiménez *et al.*, 2011, y De la Fraga *et al.* 2007, en los cuales a un pH de 5.5 la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26 se adsorbe entre un 80 a 90%. Por otra parte, Yang *et al.* (1992), observaron que el 100% de las moléculas de pediocina AcH fueron adsorbidas a un pH cercano a 6 y los valores más bajos se tuvieron a pH de 1.5 a 2.0.

El pH de mayor grado de desorción fue 2.0, encontrando a este pH la mayor actividad en el sobrenadante y la menor actividad inhibitoria de la bacteriocina ligada a las células (De la Fraga *et al.*, 2007). Estos valores son similares a los reportados para pediocina AcH (Bhunia *et al.*, 1991) y otras bacteriocinas del tipo leucocina, nisina y sakacina (Yang *et al.*, 1992). El efecto de mayor o menor adsorción de la bacteriocina a las células se debe fundamentalmente a las interacciones electrostáticas entre los fosfolípidos aniónicos de la membrana y la bacteriocina de carácter catiónico (Schanzenbach, 2005).

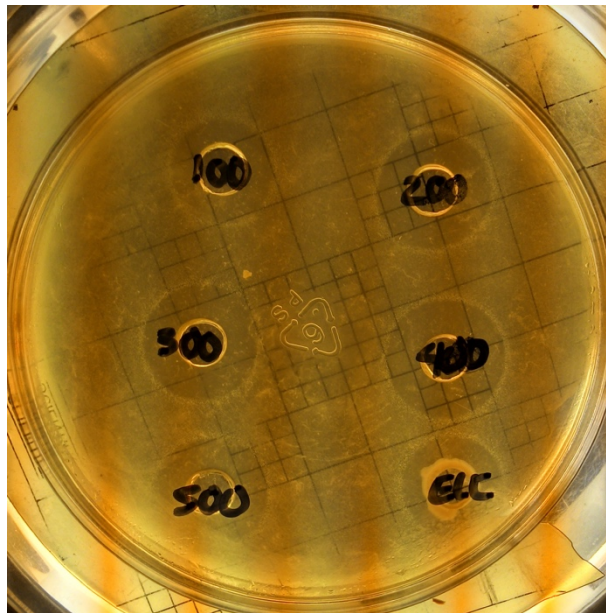


FIGURA 3.6. Prueba de actividad antimicrobiana de los extractos a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 mM y el extracto libre de células (ELC).

Se realizó un ensayo de actividad antimicrobiana a las diferentes concentraciones de NaCl empleadas en la purificación, la concentración de 200 mM presentó un halo de inhibición mayor al de 100 mM, por lo que se decidió que esta concentración fuera la usada para realizar la purificación de la bacteriocina. Como se puede observar en la Figura 3.6 todas las concentraciones probadas presentan halos de inhibición mayores, respecto al testigo de extracto libre de células (ELC), debido a que la concentración de pediocina es incrementada durante el proceso de purificación como se observa en la Tabla 3.11.

La ultrafiltración permitió la concentración de la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26, debido a la presencia de una sola banda como se observa en la Figura 3.7. En comparación con otros métodos de purificación como el de precipitación de proteínas con sulfato de amonio seguido de RP-HPLC (Elegado *et al.*, 1997) o el de elución de proteínas a partir de geles de SDS-PAGE (Anastasiadou *et al.*, 2008), la adsorción-desorción celular seguido de ultrafiltración es un método simple y conveniente en la purificación de la pediocina (Wu *et al.*, 2004).

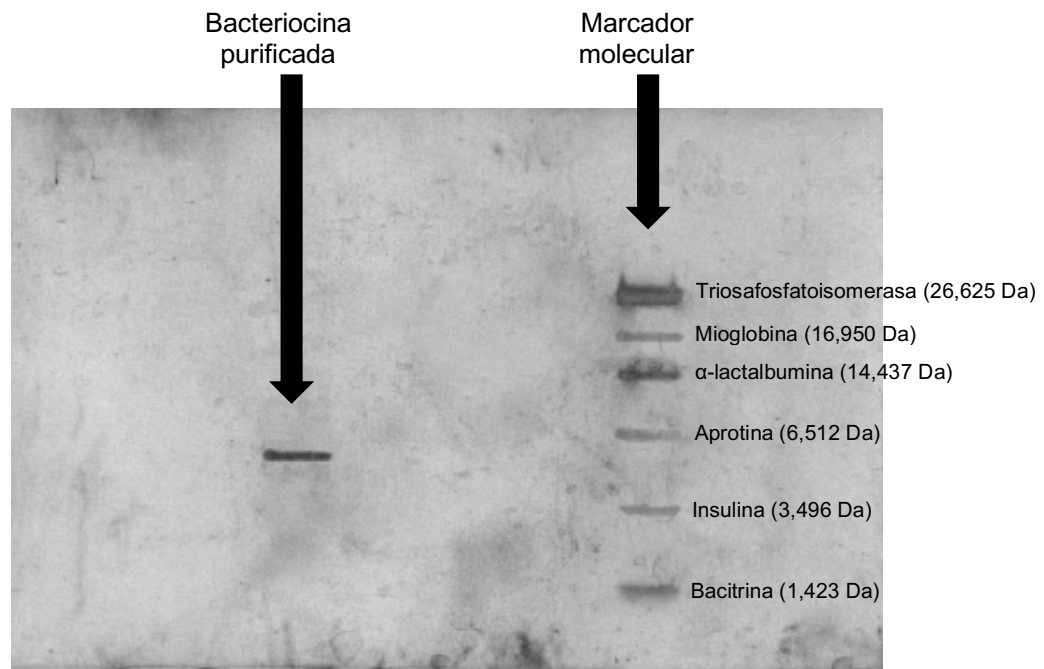


FIGURA 3.7. Electroforesis SDS-PAGE de la bacteriocina purificada de *Pediococcus acidilactici* ITV 26.

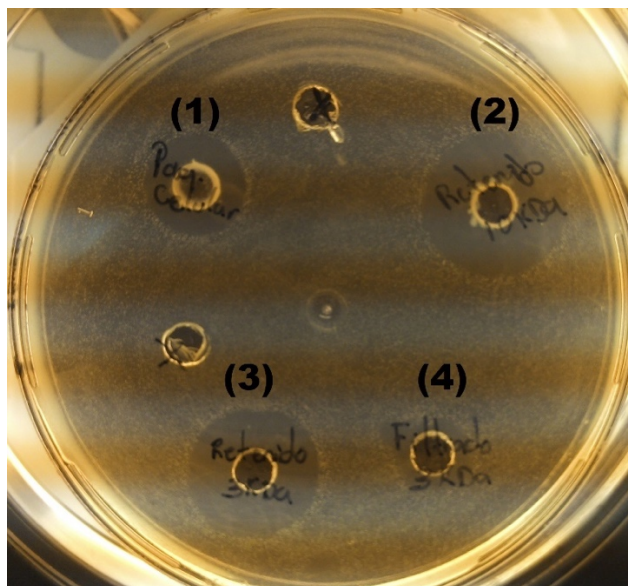


FIGURA 3.8. Prueba de actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones. (1) Paquete celular, (2) Retenido de 10 kDa, (3) Retenido de 3 kDa y (4) Permeado de 3KDa.

3.4. Determinación de la presencia y tamaño del péptido empleando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se empleó un gel discontinuo que consistió en un gel concentrador al 10% y un gel de resolución al 18%. Se corrieron las muestras purificadas por el método de adsorción-desorción y el marcador molecular descrito anteriormente (apartado 2.5). Para determinar el peso molecular (P. M.) de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV26, se linealizaron los pesos moleculares del marcador molecular, graficando el logaritmo del P.M. del marcador contra la movilidad electroforética (RF), e interpolando en la gráfica la movilidad electroforética de la pediocina, dando un peso estimado de 4,610 Da (Figura 3.9), lo cual concuerda con lo que reportaron De la Fraga *et al.* (2007), al trabajar con la misma bacteriocina obtuvieron un peso de 4,618 Da.

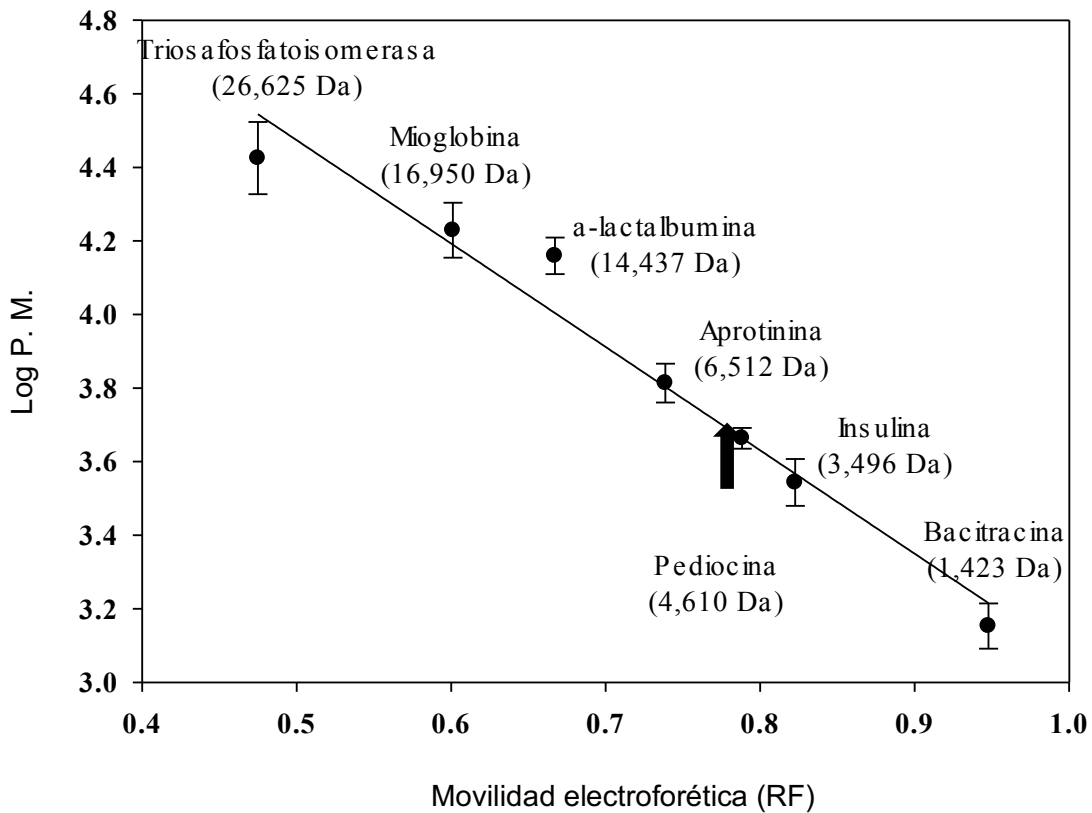


FIGURA 3.9. Curva estándar de peso molecular.

3.5. Resultados de actividad antimicrobiana

En la Tabla 3.11 se presentan los resultados de las pruebas de actividad por el método de difusión en agar (descrito en el apartado 2.9), empleando como cepa sensible a *Listeria innocua* AST-062. De 400 mL de medio MRS, se obtuvieron 20 mL de la bacteriocina purificada con una concentración final de 0.765 mg/mL, como se observa la actividad total para el extracto libre de células (ELC) corresponde a 3,500 UA/mL, mientras que al realizar la purificación por el método de adsorción-desorción las unidades de actividad se incrementaron hasta 20,333 UA/mL. Al concentrar la bacteriocina por ultrafiltración (Tubo amicon 3 kDa) la actividad del permeado fue de 18,166 UA/mL, debido a que en los tratamientos de filtración siempre existen pérdidas en el contenido de proteínas como atestigua el factor de

purificación con un valor de 1.57 para el método de adsorción-desorción y 0.64 para el permeado de 3 kDa. Por lo tanto se demostró que empleando una concentración de 200 mM en el método de adsorción-desorción y utilizando ultrafiltración con dos membranas (10 kDa y 3 kDa) son un método viable para purificar y concentrar bacteriocinas, además el paquete celular tuvo una actividad total de 2,666 UA (Datos no presentados en la Tabla 3.11), esto debido a que no se desorbió completamente el péptido de la membrana celular, esto solo se logró parcialmente incrementando la concentración de NaCl, sin embargo, a concentraciones mayores entre 300 y 500 mM, se desorbieron otras proteínas de mayor peso molecular debido a la alta fuerza iónica como se observa en la Figura 3.5. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

TABLA 3.11. Tabla de purificación.

| Fracción | Volumen inicial (mL) | Proteína total (mg) | Actividad (UA/mL ^{**}) | Actividad total (UA) | Actividad específica (AU/mg) | Factor de purificación |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|
| ELC* | 400 | 83.2 | 3500 ± 500 | 1,400,000 | 16,826 | 1 |
| Adsorción-desorción | 20 | 15.31 | 20333 ± 763 | 406,660 | 26,561 | 1.57 |
| Ultrafiltración 3kDa | 1 | 1.693 | 18166 ± 1040 | 18,166 | 10,730 | 0.64 |

*ELC: Extracto libre de células. **La actividad (UA/mL) se determinó por difusión en agar utilizando a *Listeria innocua* AST-062 como cepa sensible.

3.6. Caracterización fisicoquímica de la bacteriocina encapsulada en liposomas

3.6.1. Dispersión de luz dinámica

En la mayoría de los casos, los péptidos como las bacteriocinas (por ejemplo, pediocina) pueden transformarse en partículas estables mediante encapsulación o atrapamiento mediante sistemas de nanovehículos (por ejemplo, liposomas) (Mozafari *et al.*, 2008). El estudio del tamaño promedio de los liposomas, así como su distribución, son de interés debido a su impacto en la estabilidad de los liposomas y la liberación de bacteriocina (Were *et al.*, 2004).

En la Figura 3.10 se aprecia como el pretratamiento donde se utilizó únicamente homogenización con el rotor-stator, el cual denominamos Ciclo 0, disminuye drásticamente su tamaño de partícula para todos los tratamientos aplicando solamente 1 ciclo de microfluidización, de 5750nm a 144nm respectivamente. Además, el tamaño de partícula es ligeramente reducido (13% de reducción) al aplicar un segundo ciclo de microfluidización (120nm).

A 500 y 1000 bar de presión, con 1 ciclo de microfluidización usando 3 y 5% (p/v) de PC, dieron como resultado un tamaño medio de partícula de 144 nm mediante dispersión de luz dinámica para los liposomas encapsulando a la pediocina, lo cual concuerda con valores obtenidos por otros autores al emplear microfluidización, 150, 119 y 236nm para Imran *et al.* (2012), Prombutara *et al.* (2012) y Narsaiah *et al.* (2013) respectivamente.

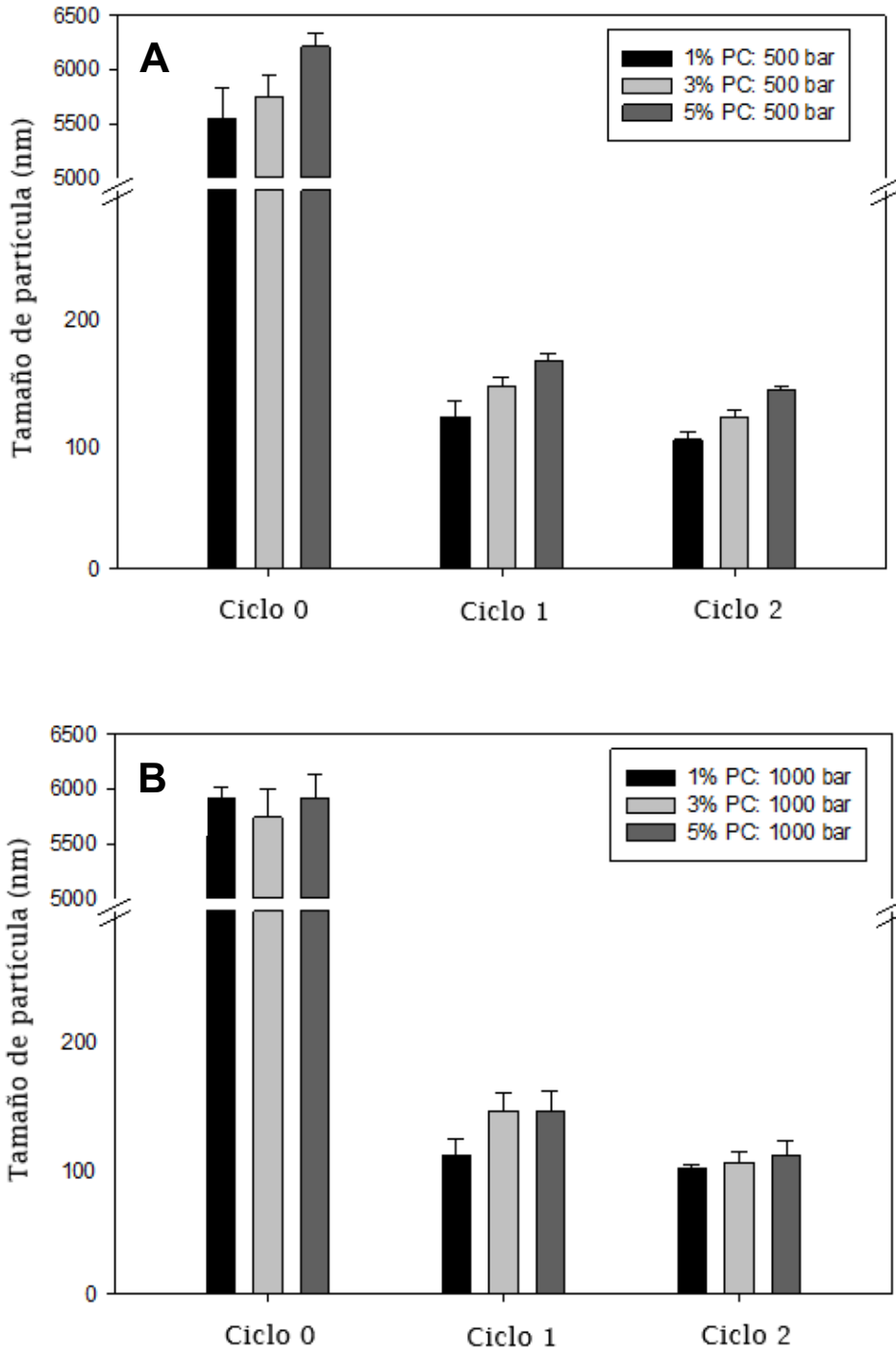


FIGURA 3.10. Tamaño de partícula de los liposomas encapsulando a la pediocina con 1, 3 y 5% (p/v) de PC, usando (A) 500 y (B) 1000 bar de presión de microfluidización.

Al incrementar el número de ciclos, no solo disminuye el tamaño de partícula, sino que la distribución de tamaño de partícula se vuelve más homogénea para todos los tratamientos, como se puede observar en las Figuras 3.11 y 3.12.

La distribución del tamaño de partícula fue unimodal en la mayoría de los casos utilizando dos ciclos de microfluidización, con un índice de polidispersidad estrecho (PDI) de 0.4, lo cual refleja la eficiencia de la microfluidización para la preparación de liposomas.

La microfluidización (Ciclo 1) redujo el tamaño de partícula en un 97.5% con respecto a la pre-emulsión sin tratamiento (Ciclo 0), tanto el tamaño de partícula como el PDI, presentaron diferencia estadísticamente significativa entre los ciclos 1 y 2, por lo tanto, no se observó un sobre-procesamiento de la muestra, este fenómeno ocurre cuando las muestra son sometidas a varios ciclos de microfluidización donde llegado a un determinado punto procesamiento el tamaño de partícula aumenta, en lugar de disminuir, en otras palabras re-coalescencia (Jafari *et al.*, 2008).

En contraste con los transportadores de tamaño milimétrico, los nano-vehículos proporcionan más área de superficie y tienen el potencial de aumentar la solubilidad, mejorar la biodisponibilidad y mejorar la liberación controlada en el tiempo (Mozafari *et al.*, 2008). Por lo que los resultados de las nano-mediciones indicaron que los liposomas formulados con un refinado de fosfatidilcolina de soya (PC) que contienen peditocina, son lo suficientemente pequeños para llevar a cabo las ventajas antes mencionadas (Imran *et al.*, 2012).

A medida que disminuye la concentración de PC, el tamaño de partícula disminuye, se requieren dos ciclos de microfluidización para obtener liposomas homogéneos, de acuerdo con los valores de dispersión de la luz dinámica y a la distribución de tamaño de partícula (Fig. 5 y 6).

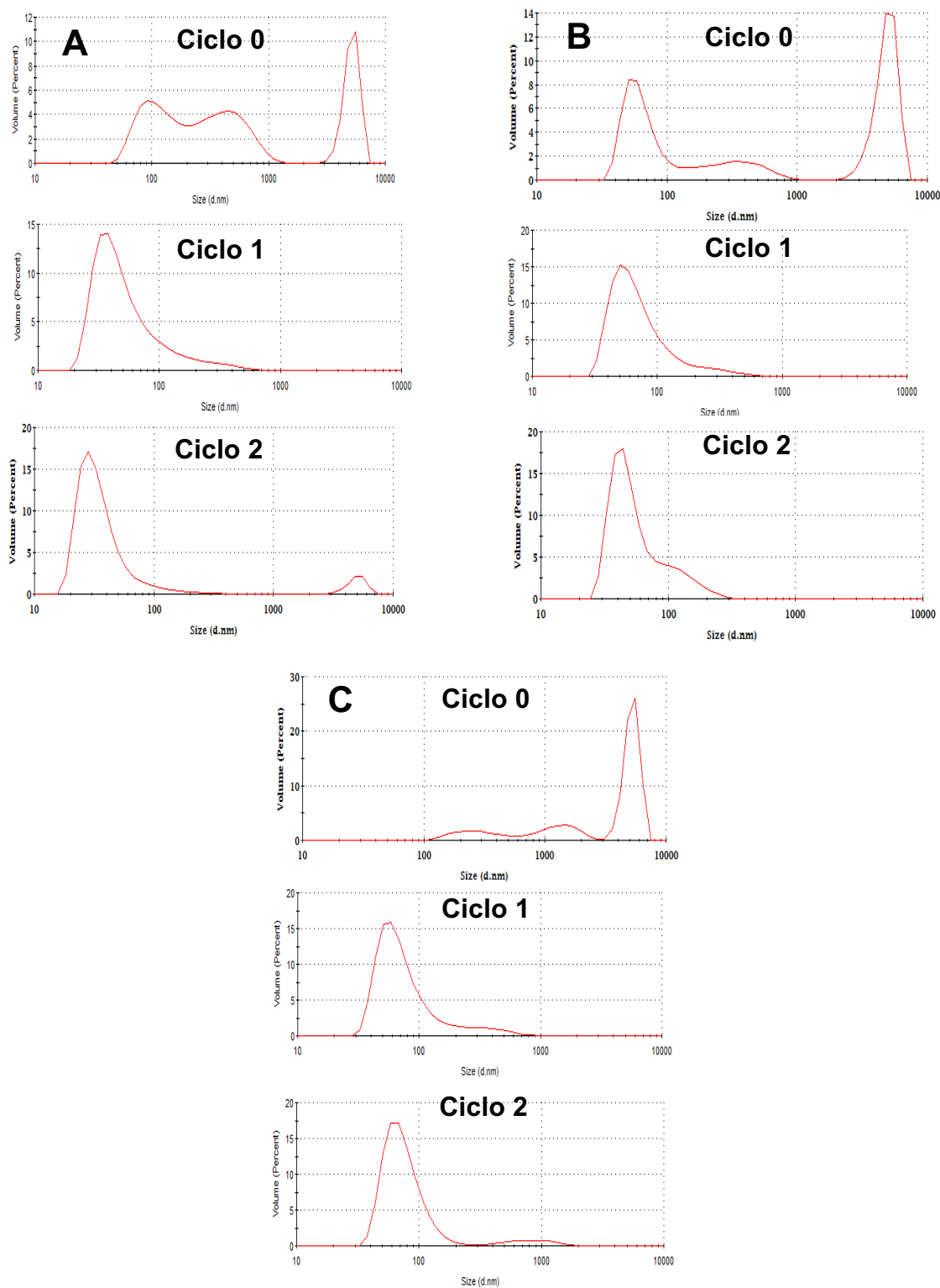


FIGURA 3.11. Distribución de tamaño de partícula de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5 % (p/v) de PC, a 500 bar de presión con 0, 1 y 2 ciclos de microfluidización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

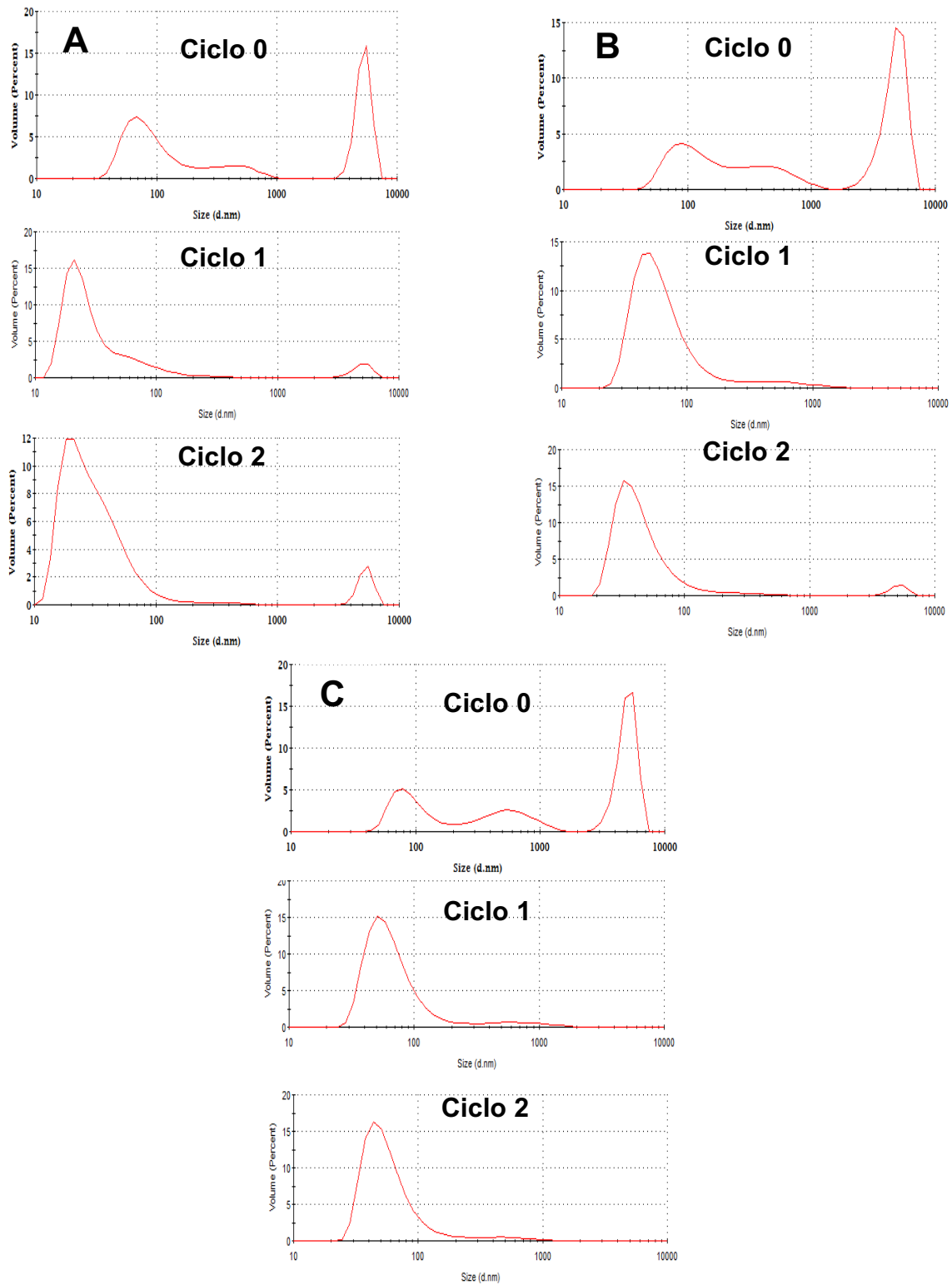


FIGURA 3.12. Distribución de tamaño de partícula de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5 % (p/v) de PC, a 1000 bar de presión con 0, 1 y 2 ciclos de microfluidización.

3.6.1. Potencial zeta

Un parámetro que nos puede indicar la estabilidad en dispersiones es el potencial zeta. El potencial zeta se utiliza generalmente como un indicador de las cargas en la superficie de los liposomas (de Mello *et al.*, 2013). De acuerdo con la literatura (Luxbacher, 2014), valores menores -25mV indican estabilidad. Un potencial zeta para emulsiones mayor de -25 mV indica inestabilidad como coalescencia, floculación, sedimentación o ruptura de la bicapa de fosfolípidos. Por lo tanto, en la Figura 3.13, se puede destacar a los tratamientos con 3 y 5% (p/v) de PC, con 1 ciclo de microfluidización a 500 bar de presión, como los más estables con valores cercanos a -30mV. Valores similares se obtuvieron en trabajos como el de Prombutara *et al.* (2012) con potencial zeta de 28.3 a -29.2 mV.

Los tratamientos con 1% (p/v) de PC, con 1 ciclo de microfluidización a 500 bar de presión, así como todos los liposomas realizados con 1000 bar de presión de microfluidización presentaron valores menores a -20 mV lo cual podría sugerir mecanismos de inestabilidad como se mencionó anteriormente. Por otro lado, es interesante observar como algunos tratamientos donde se empleó el rotor-stator (Ciclo 0) obtuvieron valores adecuados de potencial zeta, debido probablemente a la heterogeneidad en la distribución de partícula y que la medición mediante dispersión de luz dinámica se hace a través de una dilución (1:100). Por lo tanto, estos datos no son concluyentes, ya que el potencial zeta está fuertemente influenciado por el pH. Por lo tanto, estos resultados se necesitan sustentar mediante otro tipo de análisis, como luz retrodispersa.

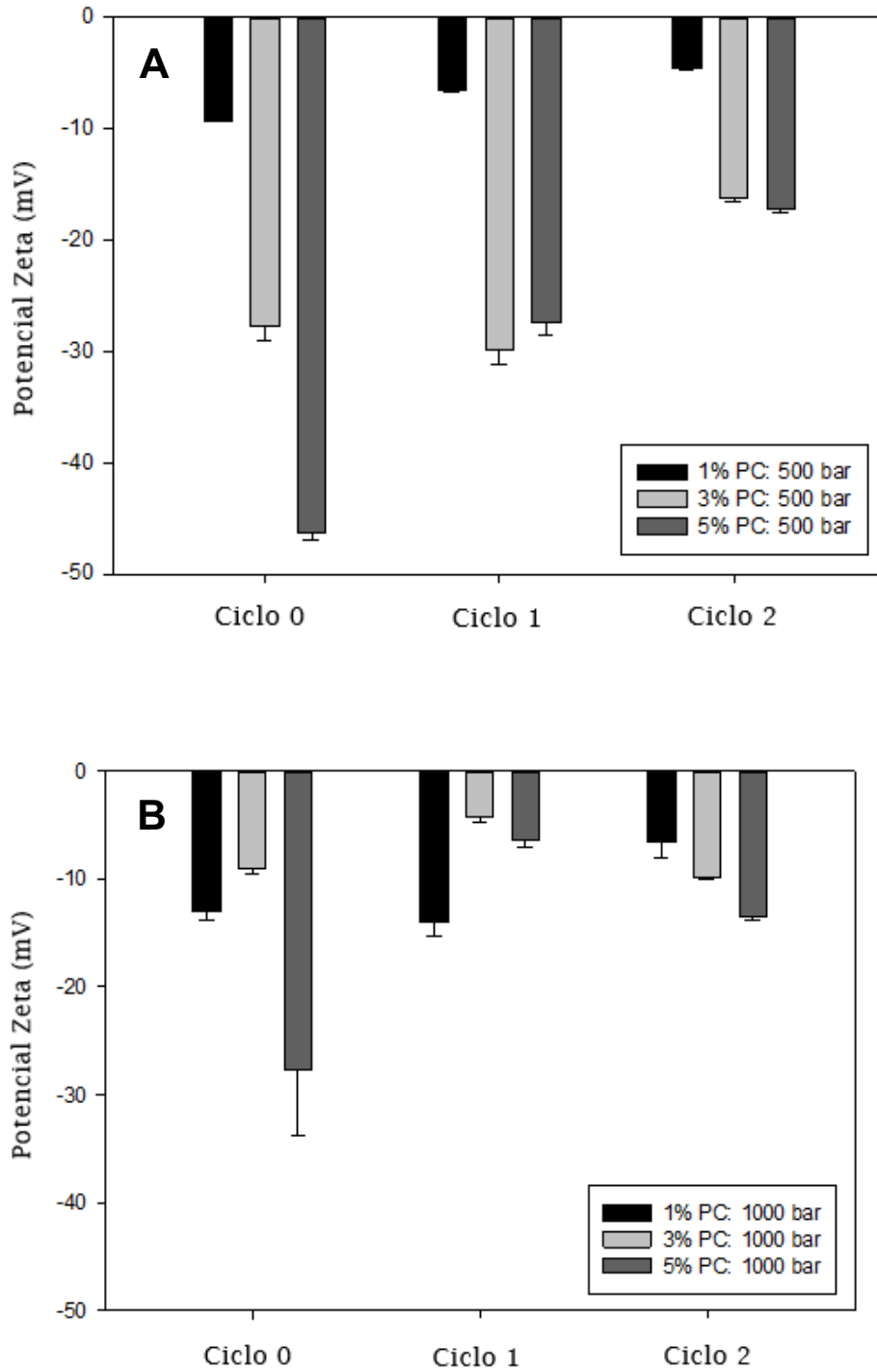


FIGURA 3.13. Valores de potencial zeta de los liposomas encapsulando a la pediocina con 0, 1 y 2 ciclos, usando 1, 3 y 5% (p/v) de PC, a (A) 500 y (B) 1000 bar de presión de microfluidización.

3.6.2. Luz retrodispersa

Otra manera de analizar la estabilidad de las muestras es mediante luz retrodispersa, en este tipo de análisis las muestras no requieren de dilución, por lo tanto, se pueden observar los mecanismos de inestabilidad en tiempo real. Se realizaron cinéticas de estabilidad de los liposomas cargados con pediocina, durante 8 días. Los resultados obtenidos durante los barridos de luz retrodispersa, indican que para todos los tratamientos donde se utilizó el rotor-stator (ciclo 0) presentan sedimentación de fases, a partir del segundo día del análisis, lo que sugiere que las muestras presentan heterogeneidad en la distribución de tamaño de partículas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos durante la determinación de la distribución de tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica (Anteriormente revisado en las Figuras 3.11 y 3.12), es interesante observar como durante el primer día del experimento en todos los tratamientos los mecanismos de inestabilidad son imperceptibles como se aprecia en la línea azul fuerte.

Incluso con valores de potencial zeta cercanos a -30 mV, el análisis de luz retrodispersa muestra mecanismos de inestabilidad para todos los tratamientos. Este comportamiento era el esperado, sin embargo, es interesante analizar cuál de todos los tratamientos es el que presenta menor inestabilidad. Como se dijo anteriormente en la pre-emulsión o ciclo 0, se observó sedimentación de hasta 2 mm con un porcentaje de luz retrodispersa de hasta 17 %BS, de acuerdo con los resultados obtenidos en el equipo Turbiscan [Figuras 3.16 a 3.19 (A)], mientras que para el resto de tratamientos empleando diferentes concentraciones de PC [1, 3 y 5% (p/v)], ciclos de microfluidización (1 y 2) y presión de microfluidización (500 y 1000 bar), todos presentaron el mismo comportamiento, donde el gradiente de luz retrodispersa aumentó conforme pasaban los días, lo cual indica fenómenos de inestabilidad, posiblemente floculación, agregación o coalescencia. Cabe mencionar que los pre-tratamientos (Ciclo 0) con 1% (p/v) de PC, no presentaron sedimentación en comparación con los pre-tratamientos con 3 y 5% (p/v) de PC. Sin embargo, presentaron una marcada floculación/coalescencia de hasta 4% de luz retrodispersa, esto posiblemente debido a la baja concentración de PC.

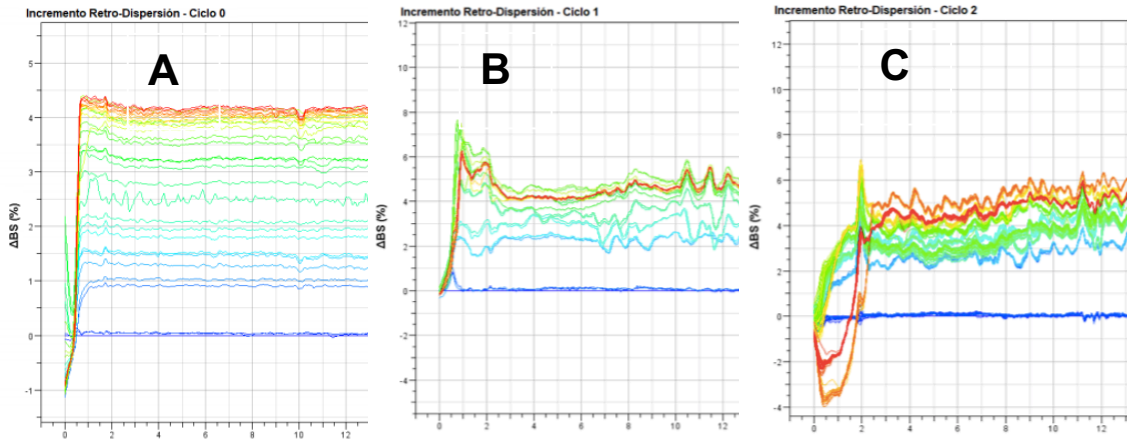


FIGURA 3.14. Cinéticas de destabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 1% (p/v) de PC, a 500 bar de presión de microfluidización.

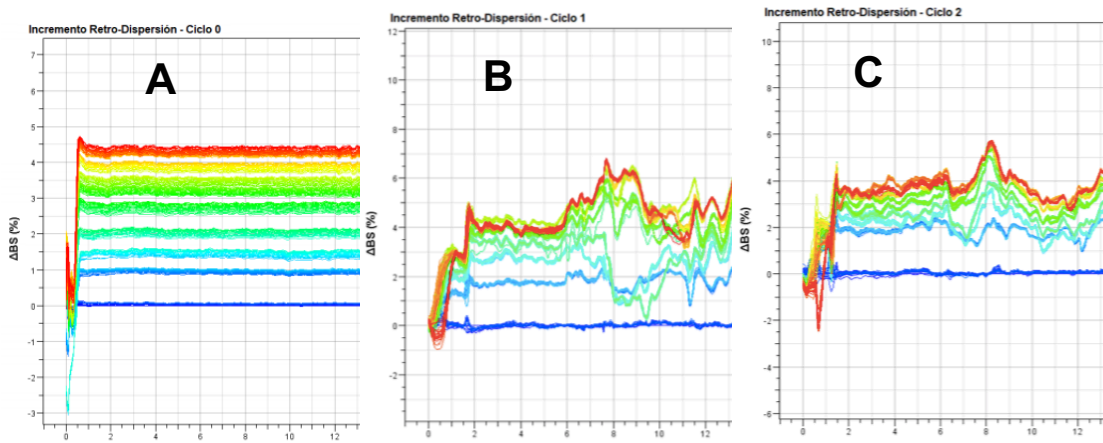


FIGURA 3.15. Cinéticas de destabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 1% (p/v) de PC, a 1000 bar de presión de microfluidización.

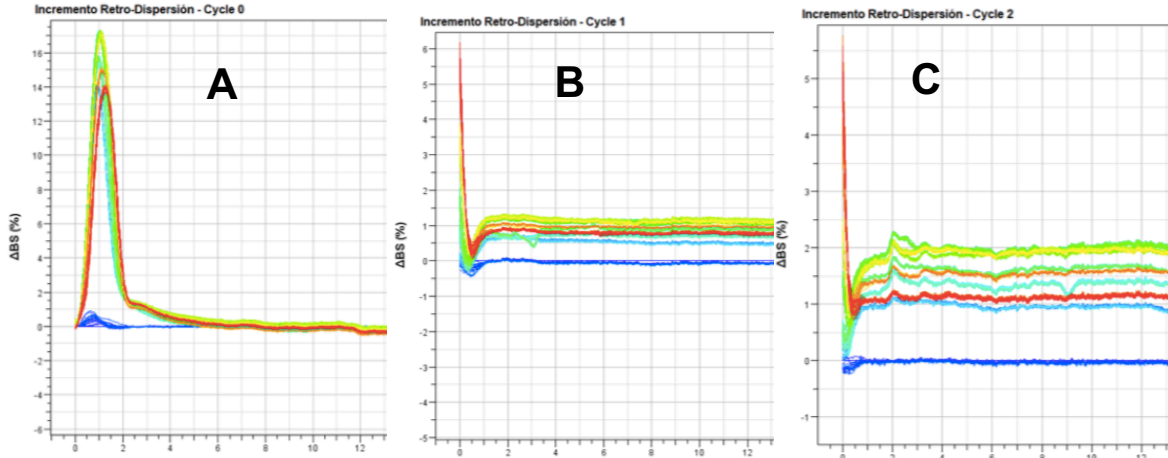


FIGURA 3.16. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 3% (p/v) de PC, a 500 bar de presión de microfluidización.

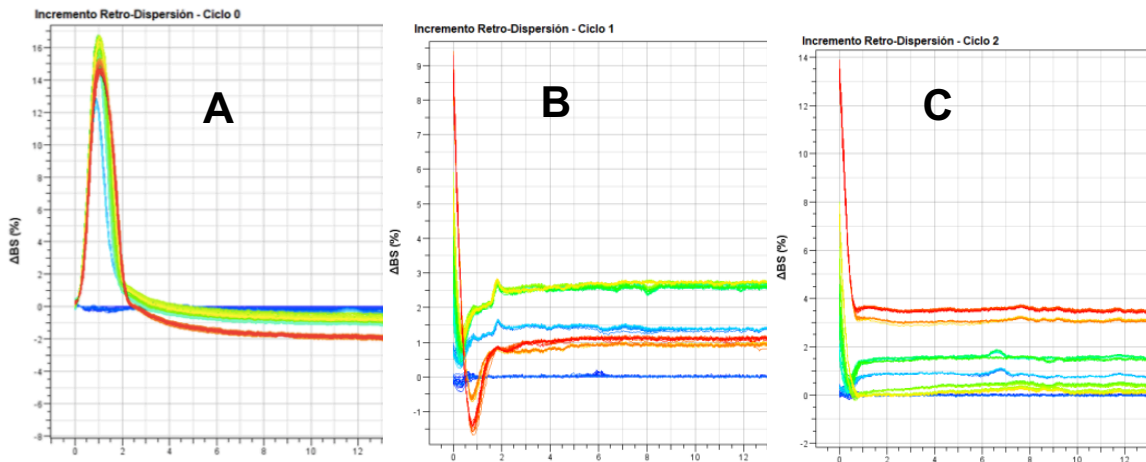


FIGURA 3.17. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 3% (p/v) de PC, a 1000 bar de presión de microfluidización.

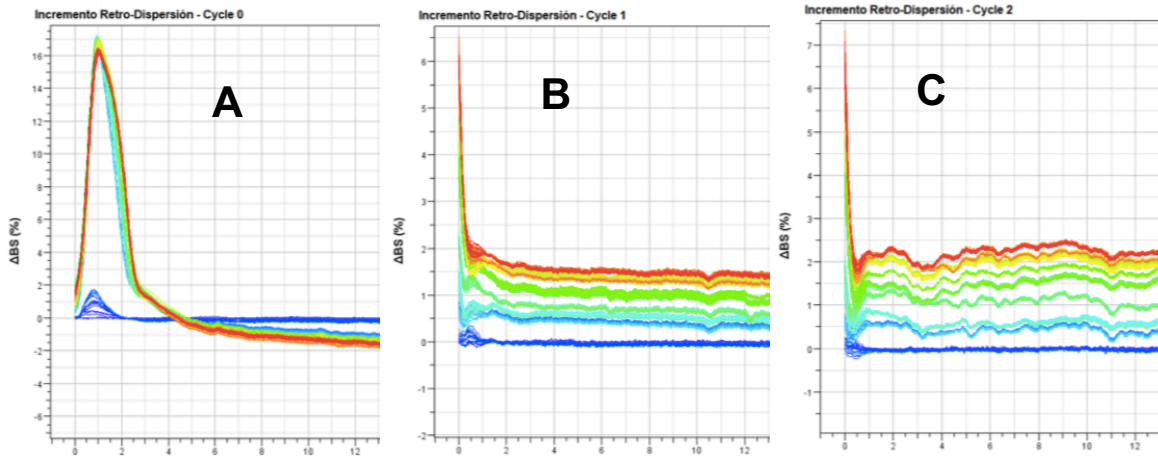


FIGURA 3.18. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 5% (p/v) de PC, a 500 bar de presión de microfluidización.

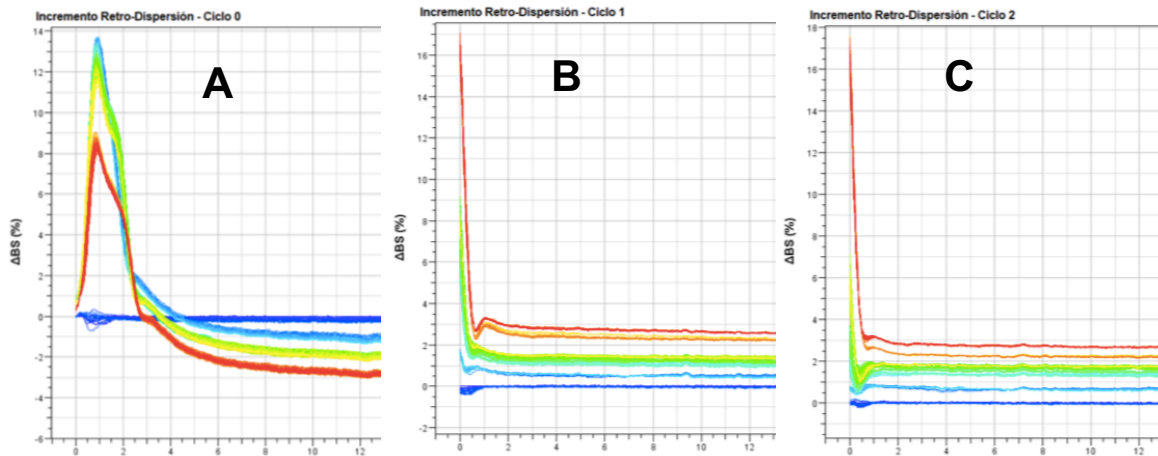


FIGURA 3.19. Cinéticas de desestabilización de los liposomas encapsulando a la pediocina con (A) 0, (B) 1 y (C) 2 ciclos, usando 5% (p/v) de PC, a 1000 bar de presión de microfluidización.

En general comparando los porcentajes de luz retrodispersa (%BS) entre los tratamientos a diferentes concentraciones de PC 1, 3 y 5% (p/v) con 1 y 2 ciclos de microfluidización, se observó un aumento en este valor siempre que se aplicaban 2 ciclos de microfluidización de aproximadamente 1 a 2 %BS, por lo tanto, todos los tratamientos con 1 ciclo de microfluidización fueron los más estables.

Para poder determinar los tratamientos donde se presentaron menores fenómenos de inestabilidad se recurrió a la herramienta TSI del equipo Turbiscan, se analizaron las cinéticas de este parámetro, el cual es un índice que nos da un valor puntual de que tan estable es la suspensión liposomal a analizar, es decir a mayor TSI mayor inestabilidad. Los valores de TSI del equipo Turbiscan sugieren que los tratamientos donde se utilizó 1 ciclo de microfluidización con 500 y 1000 bar de presión para todas las concentraciones de PC evaluadas fueron los más estables con valores más bajos de TSI global, de acuerdo con la Tabla 3.12.

TABLA 3.12. Valores de TSI global

| Concentración de fosfatidilcolina (PC) | Presión de microfluidización | | | |
|---|------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 500 bar | | 1000 bar | |
| | Ciclos 1 | Ciclos 2 | Ciclos 1 | Ciclos 2 |
| 1% | 11.7 | 15.8 | 26.5 | 28.7 |
| 3% | 5.2 | 8.4 | 10.9 | 14.5 |
| 5% | 9.4 | 16.5 | 11.2 | 15.2 |

*Datos de TSI global calculados al octavo día del análisis.

3.6.3. Calorimetría diferencial de barrido

Se realizaron múltiples corridas con el calorímetro diferencial de barrido (DSC) moviendo las variables disponibles en el software como las rampas de temperatura desde 1 hasta 10 °C/minuto, los intervalos del barrido de temperatura de 0 hasta 120 °C, los resultados no fueron alentadores, se obtuvieron termogramas como el

de la Figura 3.20, donde aparentemente, se observaron reacciones endotérmicas. En un proceso endotérmico, como la mayoría de las transiciones de fase, el calor se absorbe y, por lo tanto, el flujo de calor a la muestra es mayor que el de la referencia. Por lo tanto, $\Delta H/dt$ es positivo y se producen procesos que incluyen desnaturalización de proteínas, deshidrataciones, reacciones de reducción y algunas reacciones de descomposición (Feitosa *et al.*, 2006; Barreleiro *et al.*, 2002). Se estimó que la temperatura de transición de fase (T_m) de gel a cristal-líquido de los liposomas encapsulando a la pediocina es de aproximadamente 42 °C. El pico de aproximadamente 73 °C podría representar a la pediocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26. Sin embargo, ambos picos necesitan alrededor de la misma cantidad de energía (0.15 W/g) para la transición o descomposición y el calor específico es relativamente bajo, lo cual no corresponde a valores de muestras biológicas para lípidos y péptidos, por lo tanto, estos valores no son representativos para su análisis.

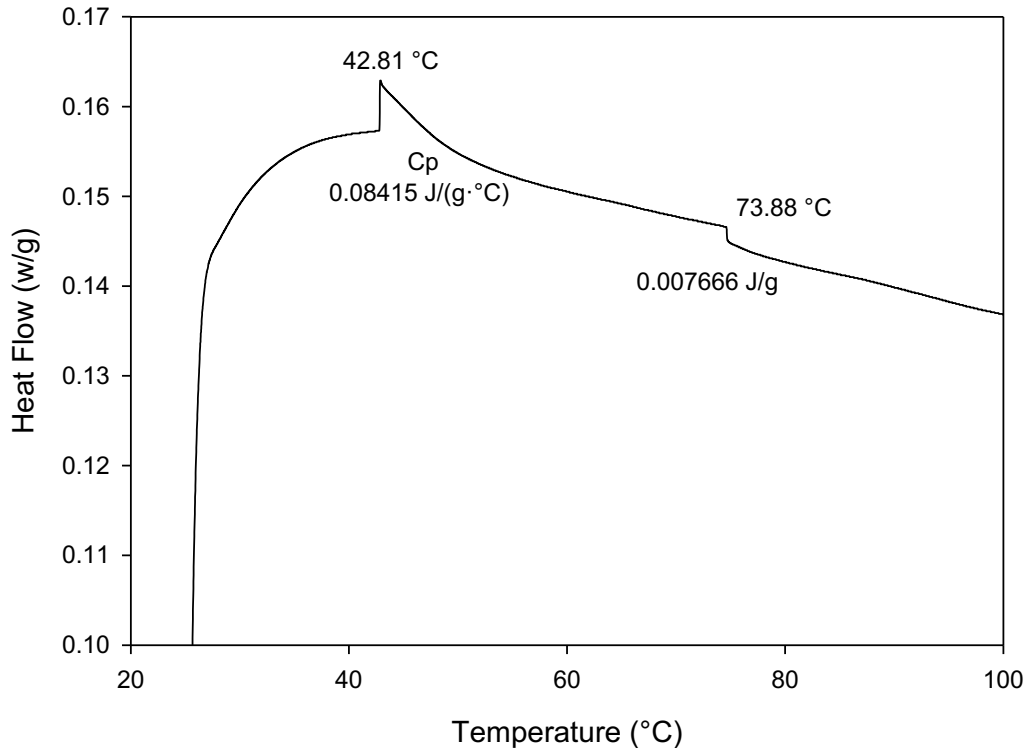


FIGURA 3.20. Termograma DSC; Presión de microfluidización: 500 bar, Concentración de PC: 3%, con 1 ciclo de microfluidización.

3.6.4. Microscopía electrónica de transmisión criogénica

Las fases acuosa y lipídica de los liposomas se pueden observar en la Figura 3.21. La posesión de fases tanto acuosas como lipídicas en los liposomas representa una ventaja importante, ya que les permite incorporar material hidrofílico e hidrofóbico.

De acuerdo con la terminología propuesta por Mozafari *et al.* (2002), donde definieron los liposomas como: "estructuras bilamelares continuas, cerradas, compuestas principalmente de moléculas de lípidos y/o fosfolípidos" (Colas *et al.*, 2007). Esta técnica microscópica atestigua la presencia de estructuras irregulares predominantemente esféricas y de doble capa. Los liposomas están distribuidos uniformemente dentro de la matriz; sin embargo, casi ninguna de las nanopartículas se agrega, lo que muestra una buena repulsión entre los liposomas del refinado de fosfatidilcolina de soya (Imran *et al.*, 2012), dando como resultado una dispersión homogénea (Figura 3.21).

Considerando el mecanismo de acción antimicrobiana, la pediocina es capaz de formar poros en las membranas liposomales (Chen *et al.*, 1997; Breukink & de Kruijff, 2006). Como la pediocina es de naturaleza anfifílica, por lo tanto, está encapsulada en el núcleo acuoso y la bicapa de los liposomas. La lenta degradación de los liposomas y la formación de poros por la pediocina, el pH, el tiempo y la temperatura de almacenamiento pueden, como consecuencia, jugar un papel importante en la liberación controlada de la pediocina (Imran *et al.*, 2012).

Mediante Cryo-TEM, se realizaron mediciones de tamaño de 100 liposomas (20 micrografías diferentes) compuestas de 3% (p/v) de PC utilizando 0, 1 y 2 ciclos de microfluidización con 500 bar de presión de microfluidización, revelaron un diámetro medio de 329 ± 76 , 158 ± 33 y 130 ± 21 (nm) respectivamente, no hubo diferencias estadísticamente significativas para los ciclos 1 y 2, con los valores obtenidos a través de dispersión de luz dinámica de 144 ± 7 y 120 ± 6 (nm) para los mismos liposomas con 1 y 2 ciclos de microfluidización respectivamente (Tabla 3.13). Sin embargo, para el ciclo 0, estos valores difieren con los obtenidos mediante dispersión de luz dinámica (5750 ± 190 nm), por lo que se recurrió a la técnica de microscopía confocal de barrido láser para observar la heterogeneidad en el tamaño

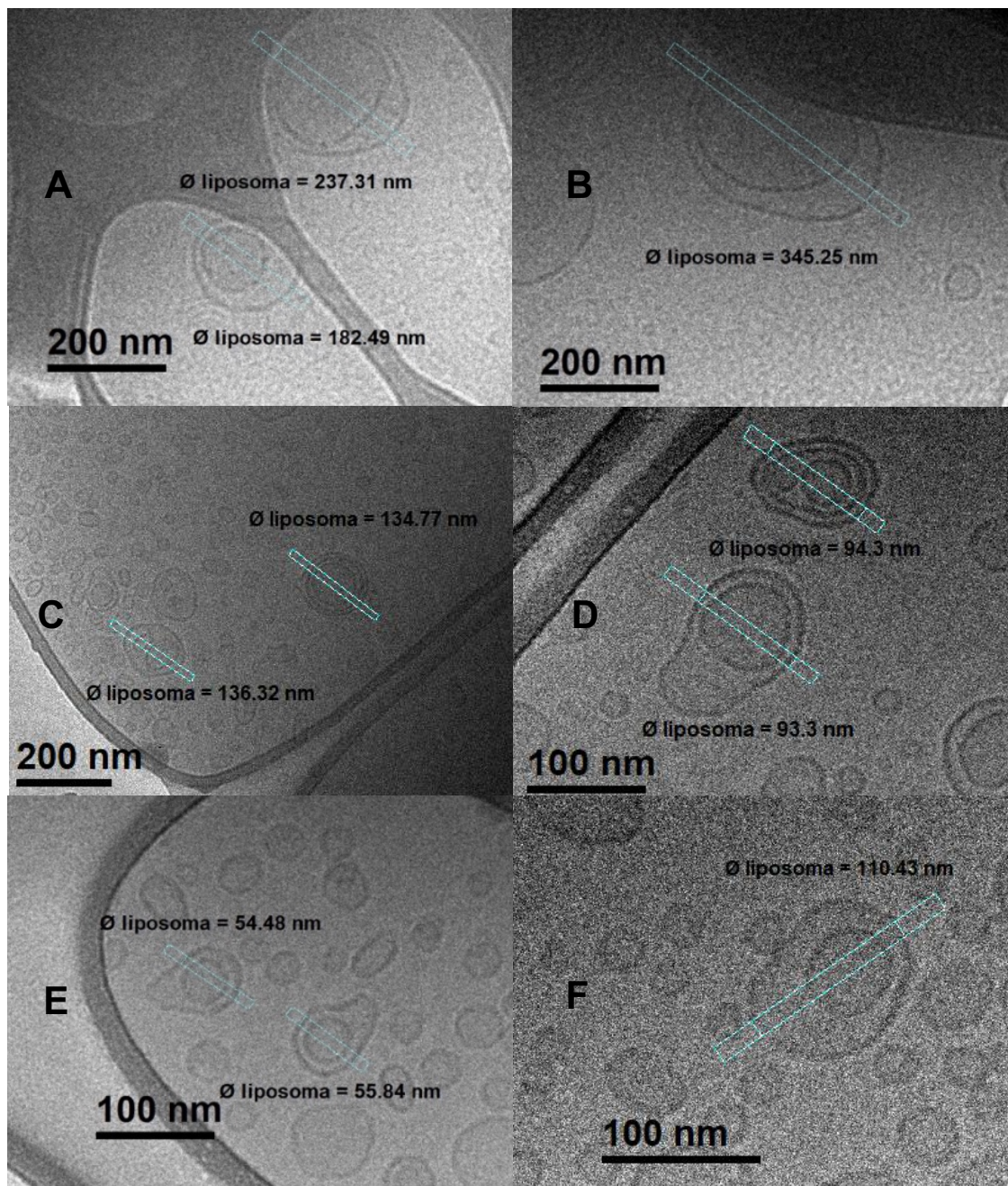


FIGURA 3.21. Micrografías de Cryo-TEM de los liposomas encapsulando a la peditocina

(A y B) Ciclo 0; (C y D) Ciclo 1, (E y F) Ciclo 2 de microfluidización con 3% (p/v) de PC y 500 bar de presión. Las celdas fueron examinadas a 80 kV. Magnificaciones:
 A: x15000, B: x15000, C: x12000, D: x30000, E: x30000, F: x40000.

de partícula del ciclo 0. La Figura 3.22, nos confirma la presencia de liposomas en el orden de las micras, debido a que la homogenización con rotor-stator, no es una técnica adecuada para obtener liposomas pequeños y homogéneos, por lo tanto, los resultados obtenidos mediante microscopía confocal de barrido láser muestra relación con los valores obtenidos a través de dispersión de luz dinámica. Como se esperaba las medias obtenidas en los ciclos 1 y 2 no presentan diferencia estadísticamente significativa entre ellas, además se ven reducidas respecto al ciclo 0, denotando la importancia de la microfluidización para la obtención de liposomas pequeños y homogéneos.

La Cryo-TEM nos permitió analizar la distribución de liposomas y observar si existen fenómenos de desestabilización tales como agregación y/o coalescencia debido al proceso de fabricación (microfluidización) y debido a la adición de la pediocina. Las micrografías revelaron homogeneidad con respecto a la lamelaridad de los liposomas. En general, los liposomas que miden más de 100 nm de diámetro pertenecen al grupo multilamelar en contraste con los liposomas unilamelares (<100 nm) (Imran *et al.*, 2012; Narsaiah *et al.*, 2013), esto indica que la microfluidización es un proceso adecuado para la obtención de liposomas unilamelares. Estos liposomas de una bicapa pueden mejorar la liberación controlada de la pediocina permitiendo una liberación rápida o lenta según sea el caso realizando modificaciones en el pH del medio.

TABLA 3.13. Tamaños de partícula.

| No. De Ciclos | Cryo-TEM (nm) | Dispersión de luz dinámica (nm) |
|----------------------|-------------------------|--|
| Ciclo 0 | 329 ± 76 ^{A,a} | 5750 ± 190 ^{B,a} |
| Ciclo 1 | 158 ± 33 ^{B,b} | 144 ± 7 ^{B,b} |
| Ciclo 2 | 130 ± 21 ^{C,c} | 120 ± 6 ^{C,c} |

Las diferencias significativas fueron determinadas mediante ANOVA y prueba de rango múltiple de Tukey.

Letras minúsculas diferentes entre las filas y letras mayúsculas diferentes entre las columnas indican diferencia significativa (p<0.05).

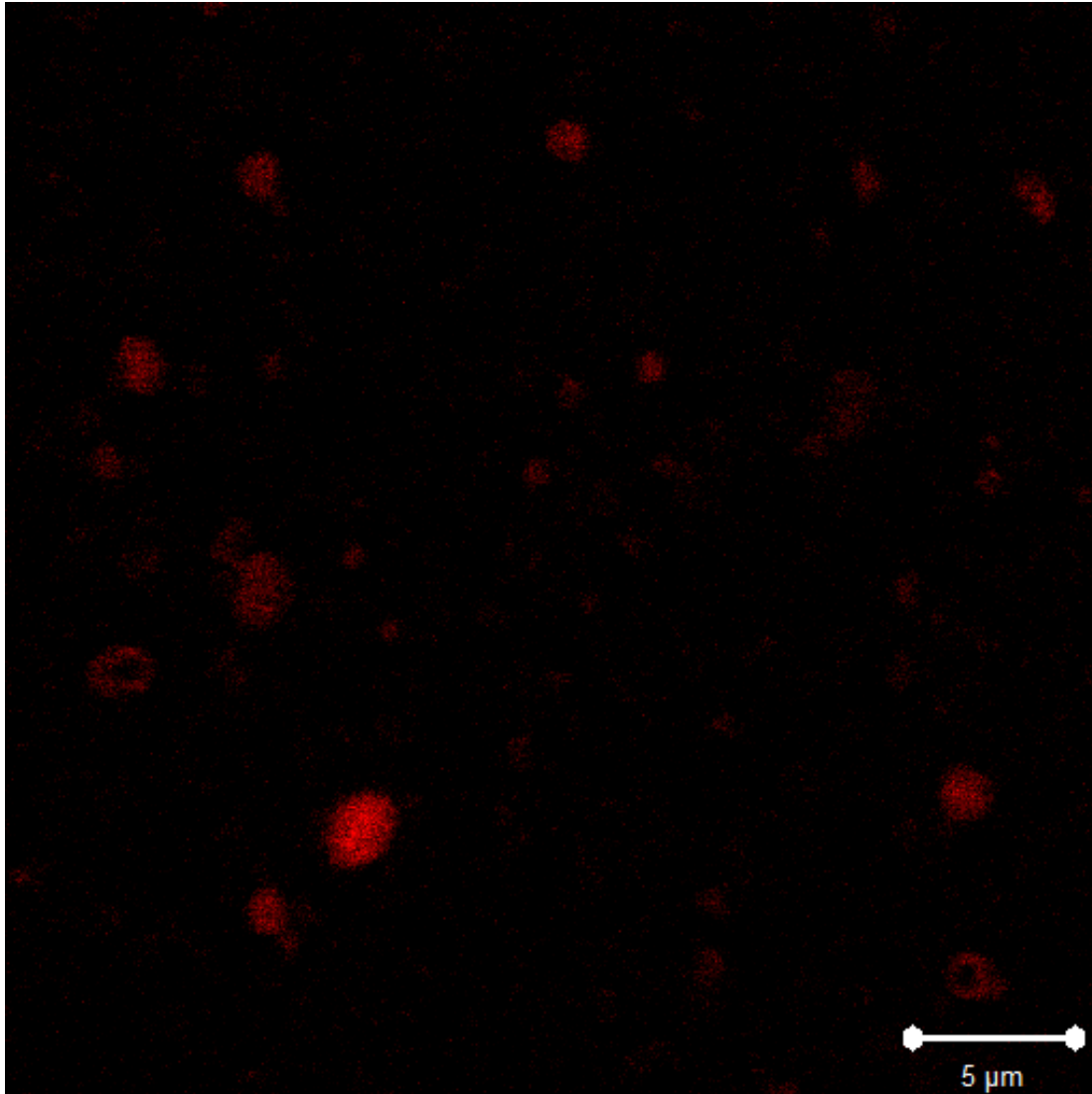


FIGURA 3.22. Microscopía confocal de barrido láser de la pediocina encapsulada en liposomas con 3% (p/v) de PC usando homogenización mediante rotor-stator (Ciclo 0).

3.7. Eficiencia de encapsulación

Después de realizar la separación de la fracción no encapsulada mediante cromatografía de filtración en gel, se calculó la cantidad de proteína de la fracción encapsulada con el método de Bradford y la fracción no encapsulada se determinó por diferencia. En la Tabla 3.14 se presentan los resultados del porcentaje de eficiencia de encapsulación, sin importar la presión y ciclos de microfluidización en todas de las concentraciones de PC [(1, 3 y 5% (p/v)], no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos usando la misma concentración, sin embargo, analizando los ciclos y presiones de microfluidización se aprecia que al incrementar la concentración de PC la eficiencia de encapsulación aumenta. Por otro lado, se observa que entre las concentraciones de 3 y 5%, no hay diferencia significativa entre ellas, excepto el tratamiento con 5% p/v de PC, 500 bar y 1 ciclo de microfluidización, el cual resultó ser el mejor tratamiento debido a su alta eficiencia de encapsulación, como se esperaba la eficiencia de encapsulación se ve afectada en relación con el porcentaje de PC utilizado para encapsular, a una mayor concentración de PC una mayor eficiencia de encapsulación, obteniendo valores promedio de hasta 88% EE aproximadamente para los tratamientos donde se utilizó 5% (p/v) de PC. Todos los tratamientos empleando microfluidización lograron mejores eficiencias de encapsulación comparados con la homogenización por rotor-stator.

TABLA 3.14. Eficiencia de encapsulación.

| Concentración de fosfatidilcolina (PC) | Presión de microfluidización | | | | |
|--|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Rotor-stator Ciclo 0 | 500 bar Ciclos | | 1000 bar Ciclos | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1% | 21.65 ± 7.93 ^{a, A} | 72.41 ± 3.43 ^{a, B} | 73.75 ± 4.26 ^{a, B} | 73.20 ± 2.67 ^{a, B} | 72.84 ± 0.99 ^{a, B} |
| 3% | 31.37 ± 2.25 ^{a, A} | 81.78 ± 1.95 ^{b, B} | 82.36 ± 2.88 ^{b, B} | 80.84 ± 2.83 ^{b, B} | 83.61 ± 3.09 ^{b, B} |
| 5% | 39.48 ± 3.77 ^{b, A} | 88.98 ± 1.12 ^{c, B} | 85.74 ± 0.83 ^{b, B} | 86.38 ± 2.88 ^{b, B} | 87.42 ± 0.32 ^{b, B} |

Las diferencias significativas fueron determinadas mediante ANOVA y prueba de rango múltiple de Tukey. Letras minúsculas diferentes en la misma fila y letras mayúsculas diferentes entre las columnas indican diferencia significativa (p<0.05).

3.8. Cinéticas de liberación

La liberación de los liposomas cargados con pediocina, se estudió mediante la incubación en PBS/NaCl a diferentes valores de pH (4, 5, 6 y 6.8), como se observa en las Figuras 3.23 y 3.24, los liposomas fueron estables y tuvieron una liberación de pediocina lenta y controlada durante las 120 horas del experimento en todos los tratamientos a pH cercano a la neutralidad, valores de pH bajos (pH 4) aceleraron la liberación y dieron como resultado un mayor nivel de pediocina libre en el medio, esto debido a que un pH ácido modifica las interacciones iónicas involucradas en la estabilidad de los liposomas. Algunos autores mencionan que a pH ácido los grupos funcionales sufren cambios como protonación o desprotonación y en algunos casos oxidación o hidrólisis de lípidos (Zimmermann & Mu, 2001). Este mismo comportamiento es reportado por Prombutara *et al.* (2012) donde al acidificar el medio se incrementa la liberación. Por otro lado, al incrementar el número de ciclos de microfluidización el contenido de pediocina libre se incrementa, posiblemente debido a que al aumentar el número de ciclos el tamaño de partícula disminuye, por lo tanto, los liposomas se fraccionan y aumentan en número, de esta manera el área de contacto con el medio ácido se incrementa, liberando mayor cantidad de pediocina, este comportamiento es presentado por todos los tratamientos sin importar la concentración de PC o la presión de microfluidización.

Sin embargo, la actividad antimicrobiana de la pediocina está fuertemente influenciada por el pH, a diferencia de otras bacteriocinas como la nisina que tienen su máxima actividad a pH ácidos, la pediocina es estable a un intervalo de pH de 1 a 9, esto no significa que la actividad no se vea afectada, a un pH de 6.8 se presenta la máxima actividad. Por lo tanto, podemos destacar tres cosas: Primero, a pH ácidos (pH 4) la liberación de la pediocina será mayor alrededor de 0.3 mg/mL para 1% (p/v) de PC y 0.4 mg/mL para 3 y 5% (p/v), a 500 bar de presión, con 1 ciclo de microfluidización, pero la actividad de la bacteriocina disminuirá en un 40 % aproximadamente (López del Castillo, 1998), de este modo el pH ácido más la actividad reducida de la bacteriocina fungirán en sinergismo como una barrera extra para el control de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*.

Segundo, aunque la concentración de bacteriocina sea baja aproximadamente 0.15 mg/mL para 1% (p/v) de PC y 0.2 mg/mL para 3 y 5% (p/v) de PC, a 500 bar de presión, con 1 ciclo de microfluidización, esta tendrá el pH adecuado, debido a que pH neutros (6.8) potencializan el efecto de la actividad antimicrobiana del péptido. Y tercero, debido a que los liposomas están pensados para su adición como un conservador de origen natural, el uso de 2 ciclos de microfluidización repercutirán en gastos operacionales para la obtención de estos, así como el uso de 5% (p/v) de PC, ya que no presenta diferencias significativas respecto al contenido total liberado de bacteriocina como lo atestiguan las Figuras 3.23 y 3.24, ni diferencia significativa respecto a la velocidad de liberación, como se puede observar en la Tabla 3.15, donde se presentan todas las velocidades de liberación. El comportamiento de la velocidad de liberación obedece al discutido anteriormente, donde al acidificar el medio se aumenta la liberación, este mismo comportamiento se observa al incrementar el número de ciclos de microfluidización. Por todo esto, los liposomas son una herramienta versátil para su adición a diferentes tipos de alimentos, desde productos como vegetales fermentados, leche fermentadas, yogurt, entre otros, hasta productos como carnes, lácteos, jugos y demás productos alimentarios.

TABLA 3.15.. Velocidades de liberación.

| Concentración de fosfatidilcolina (PC) | pH | Presión de microfluidización | | | |
|--|-----|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 500 bar Ciclos | | 1000 bar Ciclos | |
| | | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 1% | 4 | 0.0056 ± 0.0009 | 0.0073 ± 0.0008 | 0.0057 ± 0.0006 | 0.0085 ± 0.0004 |
| | 5 | 0.0034 ± 0.0004 | 0.0048 ± 0.0006 | 0.005 ± 0.0004 | 0.0073 ± 0.0004 |
| | 6 | 0.0017 ± 0.0005 | 0.0019 ± 0.0007 | 0.0034 ± 0.0003 | 0.0042 ± 0.0006 |
| | 6.8 | 0.0014 ± 0.0004 | 0.0016 ± 0.0004 | 0.0031 ± 0.0001 | 0.0041 ± 0.0003 |
| 3% | 4 | 0.0058 ± 0.0006 | 0.0079 ± 0.001 | 0.0098 ± 0.0005 | 0.0099 ± 0.0007 |
| | 5 | 0.0051 ± 0.0005 | 0.006 ± 0.0007 | 0.0061 ± 0.0004 | 0.0075 ± 0.0005 |
| | 6 | 0.0045 ± 0.0005 | 0.0048 ± 0.0006 | 0.0054 ± 0.0006 | 0.0069 ± 0.0004 |
| | 6.8 | 0.0036 ± 0.0004 | 0.004 ± 0.0006 | 0.0038 ± 0.0004 | 0.0046 ± 0.0003 |
| 5% | 4 | 0.0063 ± 0.0003 | 0.0098 ± 0.0003 | 0.0066 ± 0.0004 | 0.0105 ± 0.0005 |
| | 5 | 0.0051 ± 0.0005 | 0.0098 ± 0.0004 | 0.0062 ± 0.0006 | 0.0092 ± 0.0006 |
| | 6 | 0.0042 ± 0.0001 | 0.0062 ± 0.0003 | 0.0061 ± 0.0002 | 0.0069 ± 0.0002 |
| | 6.8 | 0.0041 ± 0.0002 | 0.0044 ± 0.0004 | 0.004 ± 0.0002 | 0.0048 ± 0.0003 |

* Datos presentados en mg/mL.h

*Los datos se expresan como la media ± DS, y se derivan de tres repeticiones independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

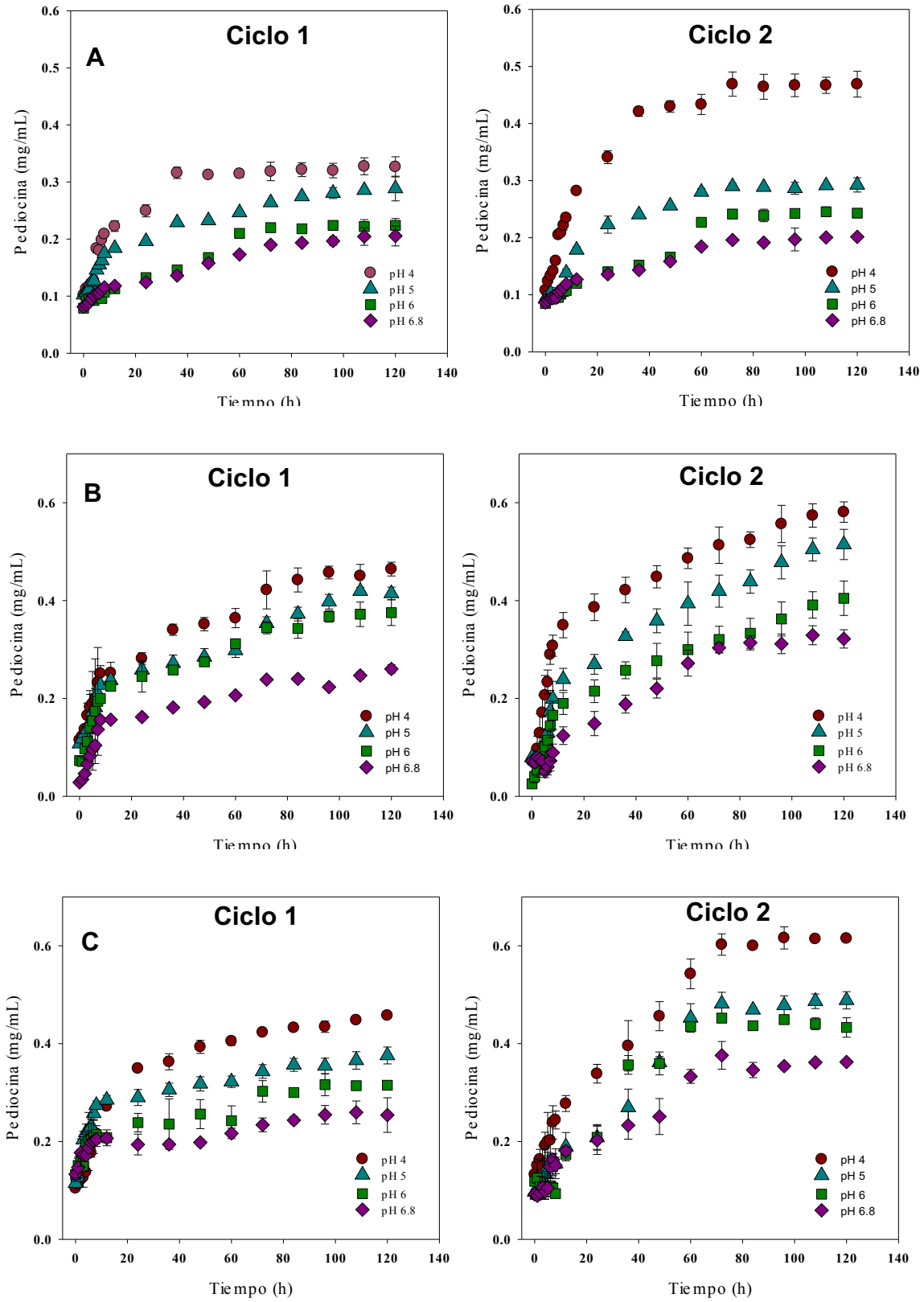


FIGURA 3.23. Cinéticas de liberación de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5% (p/v) de PC a 500 bar de presión de microfluidización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

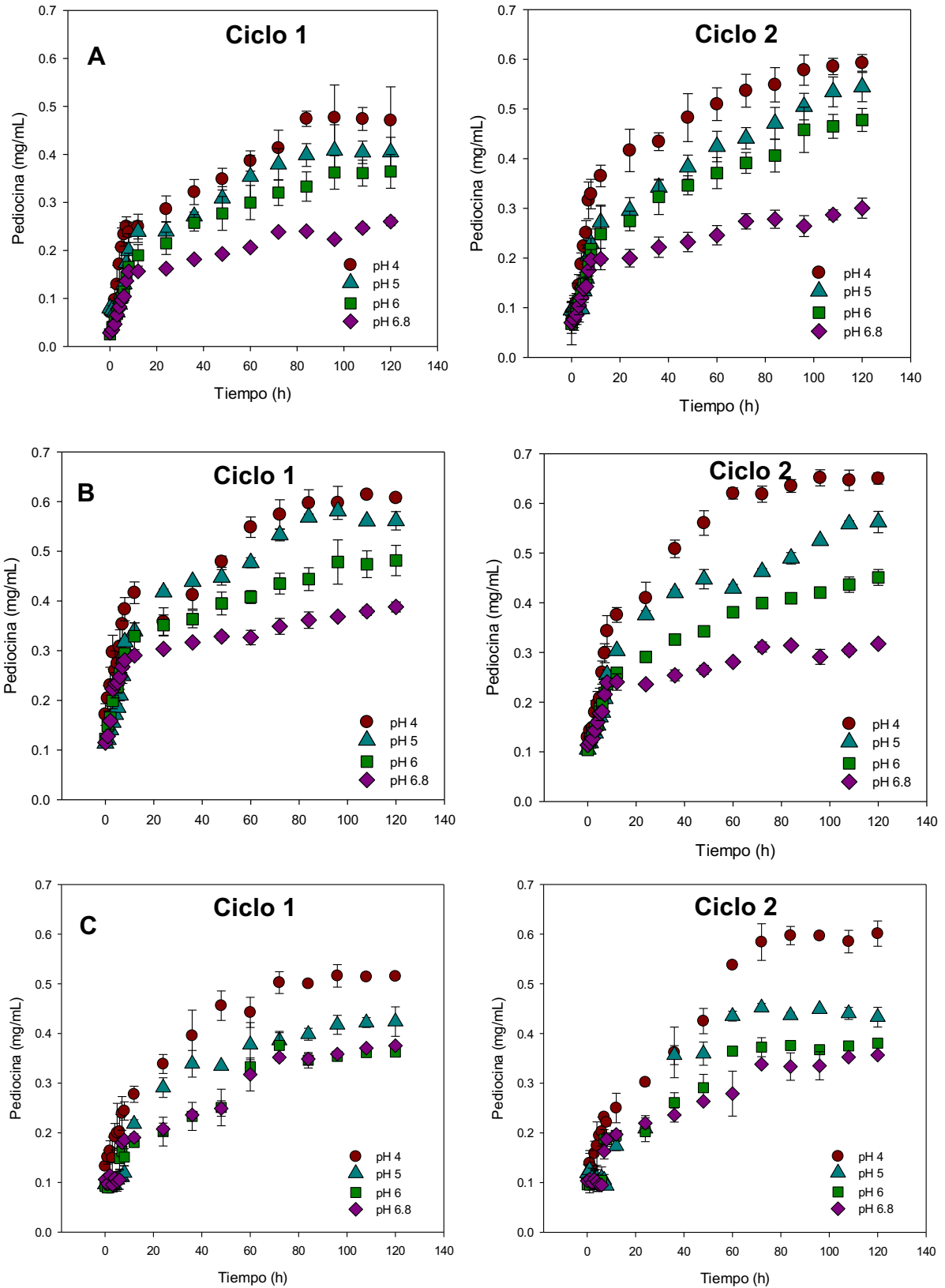


FIGURA 3.24. Cinéticas de liberación de la pediocina encapsulada en liposomas con (A) 1, (B) 3 y (C) 5% (p/v) de PC a 1000 bar de presión de microfluidización.

3.9. Inhibición del crecimiento de *Listeria innocua* AST-062 por la bacteriocina encapsulada en liposomas

La nanoencapsulación con diferentes concentraciones de PC [3 y 5% (p/v)] permitieron la obtención de liposomas encapsulando a la pediocina de aproximadamente 144 nm, la incubación de la pediocina encapsulada en liposomas no causó una disminución en el número de células viables de la cepa sensible durante las primeras 4 horas del experimento respecto al testigo. Después de 4 horas, el grupo testigo presentó recuentos viables de aproximadamente 2 unidades logarítmicas más que la pediocina encapsulada en liposomas, este comportamiento se mantuvo hasta el final del experimento (72 horas) para todos los tratamientos con liposomas, resultados similares obtuvieron Da Silva Malheiros *et al.* (2011), donde la incubación del péptido encapsulado no disminuyó el crecimiento de la cepa sensible durante las primeras 4.5 horas. Posterior a 4.5 horas, el testigo presentó recuentos de células viables de aproximadamente 1 ciclo logarítmico más que el péptido encapsulado, a diferencia del presente trabajo donde se pudo inhibir hasta 2 ciclos logarítmicos el crecimiento de *Listeria innocua* AST-062.

Al analizar el crecimiento de la cepa sensible en la Figura 3.25, se observó que durante las primeras 4 horas del experimento en la fase logarítmica de crecimiento temprana, los tratamientos con liposomas no presentaban la misma efectividad, a diferencia del tratamiento con pediocina libre, esto puede deberse al pH neutro del medio, al encontrarse a pH 7 la liberación de la pediocina de los liposomas fue lenta, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en las cinéticas de liberación (Figuras 3.23 y 3.24). Por otro lado, después de 4 horas y hasta la fase estacionaria, todos los tratamientos fueron mejores estadísticamente respecto al tratamiento con pediocina en forma libre y al testigo, además el tratamiento donde se utilizó 3% (p/v) de PC, 500 bar y 2 ciclos de microfluidización fue el más efectivo al presentar un mayor control del crecimiento (Y_{max}) de *Listeria innocua* AST-062, como se observa en la Tabla 3.16.

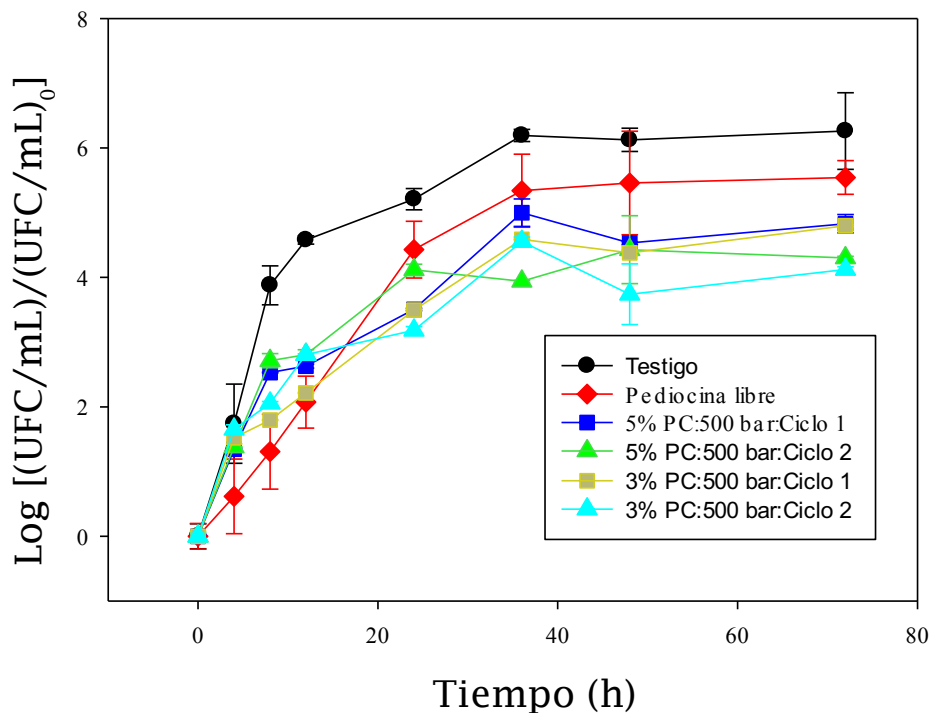


FIGURA 3.25. Cinética de crecimiento de *Listeria innocua* AST-062

TABLA 3.16. Parámetros cinéticos del crecimiento de *Listeria innocua* AST-062

| Tratamiento | Y_{max} (Log UFC/mL) | μ (h^{-1}) |
|-------------------------|------------------------|----------------------|
| Testigo | 5.803 ± 0.213^a | 0.363 ± 0.030^a |
| Bacteriocina libre | 5.537 ± 0.069^a | 0.175 ± 0.021^b |
| 5% PC: 500 bar: Ciclo 1 | 4.598 ± 0.318^b | 0.215 ± 0.026^c |
| 5% PC: 500 bar: Ciclo 2 | 4.223 ± 0.171^b | 0.223 ± 0.019^c |
| 3% PC: 500 bar: Ciclo 1 | 4.629 ± 0.282^b | 0.212 ± 0.0046^c |
| 3% PC: 500 bar: Ciclo 2 | 3.787 ± 0.275^c | 0.229 ± 0.011^c |

*Todos los valores cinéticos fueron obtenidos mediante el modelo de Gompertz. Las diferencias significativas fueron determinadas mediante ANOVA y prueba de rango múltiple de Tukey.

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Por otra parte, se aprecia que la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento con pediocina libre es significativamente menor que el testigo y los tratamientos con liposomas, esto se debe a que la bacteriocina en forma libre es capaz de inhibir de manera óptima el crecimiento durante las primeras horas del experimento ($\mu = 0.17 \text{ h}^{-1}$) hasta agotar su actividad antimicrobiana (12 horas), pasado este tiempo, el crecimiento de la cepa sensible se incrementa hasta llegar al punto de no presentar diferencia estadísticamente significativa respecto al valor de Y_{max} .

Los tratamientos con liposomas a diferentes concentraciones y ciclos controlan de manera lenta al principio del experimento con velocidades específicas de crecimiento de alrededor de 0.22 h^{-1} . Conforme pasa el tiempo la liberación de la pediocina de los liposomas es constante y logra controlar hasta 2 unidades logarítmicas en crecimiento de *Listeria innocua* AST-062, este comportamiento es similar al reportado por Degnan *et al.* (1993) donde los liposomas cargados con pediocina lograron controlar de manera efectiva el crecimiento de la cepa sensible respecto a la bacteriocina en forma libre. Al comparar las velocidades específicas de crecimiento de los tratamientos con liposomas, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ellos, todos estos tratamientos fueron significativamente menores respecto al testigo y significativamente mayores comparados con el tratamiento con pediocina libre (Tabla 3.16), estos valores concuerdan con los reportados por Narsaiah *et al.* (2013).

CONCLUSIONES

El método de adsorción-desorción con una concentración de 200mM de NaCl, seguido de ultrafiltración, permitió obtener la bacteriocina purificada de *Pediococcus acidilactici* ITV26, con un peso molecular de 4,610 Da de acuerdo con SDS-PAGE.

La microfluidización permitió disminuir significativamente el tamaño de los liposomas respecto a los elaborados con el rotor-stator. El aumento del tamaño de partícula es directamente proporcional al aumento de la concentración de PC.

Los liposomas elaborados con 3 y 5% (p/v) de PC empleando 500 bar de presión y 1 ciclo de microfluidización, son los más estables con valores más elevados de potencial zeta.

De acuerdo con las cinéticas de luz retrodispersa, un solo ciclo de microfluidización permitió la mejor estabilidad de los liposomas.

Los valores de tamaño de partícula encontrados en Cryo-TEM son iguales a los obtenidos mediante dispersión de luz dinámica para los tratamientos con 1 y 2 ciclos de microfluidización.

Se obtuvieron liposomas con una eficiencia de encapsulación de hasta 88%. La eficiencia de encapsulación aumentó al incrementar la concentración de PC para todos los tratamientos.

A pH ácidos se lleva a cabo una liberación rápida de la bacteriocina contenida en los liposomas. Por lo tanto, pH neutros, son necesarios para llevar a cabo una liberación lenta y controlada.

Los liposomas obtenidos después de la nanoencapsulación con 3 y 5% (p/v) de PC con 1 y 2 ciclos de microfluidización lograron reducir hasta 2 unidades logarítmicas el crecimiento de *Listeria innocua* AST-062.

RECOMENDACIONES

Evaluar la estabilidad de la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV26 encapsulada en liposomas en diferentes matrices alimentarias.

Encapsular otras bacteriocinas de interés en liposomas mediante microfluidización.

REFERENCIAS

- Aditya, N. P., Espinosa, Y. G., & Norton, I. T. (2017). Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnology Advances*, 35(4), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.012>
- Albaldawi, A., Brennan, C. S., Alobaidy, K., Alammar, W., & Aljumaily, D. (2005). Effect of flour fortification with haem liposome on bread and bread doughs. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(8), 825–828.
- Alfadul, S. M., & Elneshwy, A. A. (2010). Use of nanotechnology in food processing, packaging and safety – review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*.
- Alipour, S., Montaseri, H., & Tafaghodi, M. (2010). Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), 521–529.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., & Koidis, P. (2008). Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, 99(13), 5384–5390.
- Arulsudar, N., Subramanian, N., Mishra, P., Chuttani, K., Sharma, R. K., & Murthy, R. S. R. (2004). Preparation, characterization, and biodistribution study of technetium-99m-labeled leuprolide acetate-loaded liposomes in ehrlich ascites tumor-bearing mice. *The AAPS Journal*, 6(1), 45–56.
- Bai, X. C., Fernandez, I. S., McMullan, G., & Scheres, S. H. W. (2013). Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles. *eLife*, 2013(2), 2–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.00461>
- Barnadas i Rodríguez, R., & Sabés i Xamaní, M. (2003). Liposomes Prepared by High-Pressure Homogenizers. *Methods in Enzymology*, 367, 28–46. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67004-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67004-7)
- Barraza, J. A. “Efecto de la fuente de nitrógeno, pH y temperatura en la producción de bacteriocina a partir de *Pediococcus acidilactici* ITV26”. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2008.
- Barreleiro, P. C. A., Olofsson, G., Brown, W., Edwards, K., Bonassi, N. M., & Feitosa, E. (2002). Interaction of octaethylene glycol n-dodecyl monoether with dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles. *Langmuir*, 18(4), 1024–1029. <https://doi.org/10.1021/la010876z>
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S. S., Mah, J. H., Kang, D. H., Zhang, J., & Tang, J. (2010). Biodegradable poly(Butylene adipate-co-terephthalate) films

- incorporated with nisin: Characterization and effectiveness against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 75(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01591.x>
- Beaulieu, J., Moles, A., Leitch, I., Bennett, M., Dickie, J., & Knight, C. (2007). Correlated evolution of genome size and seed mass. *The New Phytologist*, 173(2), 422–37. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01919.x>
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of *Lactobacillus* added-Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 1895–1909. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73776-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73776-X)
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C., Fliss, I., & Laridi, R. (2002). Antibacterial Activities of Nisin Z Encapsulated in Liposomes or Produced In Situ by Mixed Culture during Cheddar Cheese Ripening Antibacterial Activities of Nisin Z Encapsulated in Liposomes or Produced In Situ by Mixed Culture during Cheddar Cheese Ripe. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5607–5619. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3683>
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Laridi, R., Lacroix, C., & Fliss, I. (2002). Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3683–3690.
- Benmechernene, Z., Fernandez-No, I., Kihal, M., Böhme, K., Calo-Mata, P., & Barros-Velazquez, J. (2013). Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 7(1), 66–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921084>
- Bennik, M. H. J., Smid, E. J., & Gorris, L. G. M. (1997). Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 2074–2076.
- Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B., & Kalchayanand, N. (1991). Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology*, 70(1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb03782.x>
- Bhunia, a K., Johnson, M. C., & Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 261–268.
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M. Y., Hagens, W. I., Bulder, A. S., de Heer, C., ... Sips, A. J. A. M. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 53(1), 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.10.008>
- Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 321–323. <https://doi.org/10.1038/nrd2004>

- Calderón-Pascacio, R. V. (2007). *Curso de Inmunología*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Calderón, S. M., Mendoza, G. P., García, A. M. and Escudero, A. B. 2001. Effect of Physical Factors on the Production of Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* ITV26. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 191-195.
- Cavazos-Garduño, A. Formación y caracterización de nanoemulsiones O/W de ácido betulínico elaboradas a partir de lecitina enriquecida con ácidos grasos omega-3. Tesis doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz. Febrero, 2012.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T. J., Chen, Y., Shapira, R., & Eisenstein, M. (1997). Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure . *Functional Characterization of Pediocin PA-1 Binding to Liposomes in the Absence of a Protein R*, 63(2), 524–531.
- Colas, J. C., Shi, W., Rao, V. S. N. M., Omri, A., Mozafari, M. R., & Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8), 841–847.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 777–788.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics ? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- 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 Microbiology*, 27(1), 175–178.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0278-2>
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R. E., & Lemieux, L. (1994). Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *The Journal of Applied Bacteriology*, 77(6), 682–688.
- Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology (USA)*, 43(1), 164–167. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8900157>
- Day, L., Seymour, R. B., Pitts, K. F., Konczak, I., & Lundin, L. (2009). Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 388–395.

- De la Fraga, C. M., González, R. V., Ramírez L. M. y García M. P. 2007. Purificación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26 por el método de absorción celular. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Morelia Mich.
- 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 and Antimicrobial Proteins*, 5(1), 43–50. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9125-3>
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M. R., & Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299–318. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00425-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00425-7)
- Degnan, A. J., Buyong, N., & Luchansky, J. B. (1993). Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90217-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90217-5)
- Demetzos, C. (2008). Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research*, 18(3), 159–173.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*. *Drying Technology* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1081/DRT-200063478>
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. In *International Dairy Journal* (Vol. 14, pp. 273–285).
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 70(2), 564–582.
- Elegado, F. B., Kim, W. J., & Kwon, D. Y. (1997). Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *International Journal of Food Microbiology*, 37(1), 1–11.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J. C., & Hasselmann, C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4381–4387.

- Fang, J. Y., Lin, H. H., Hsu, L. R., & Tsai, Y. H. (1997). Characterization and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(9), 1504–1509.
- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. a., & Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>
- Feitosa, E., Alves, F. R., Niemiec, A., Real Oliveira, M. E. C. D., Castanheira, E. M. S., & Baptista, A. L. F. (2006). Cationic liposomes in mixed didodecyldimethylammonium bromide and dioctadecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions studied by differential scanning calorimetry, Nile Red fluorescence, and turbidity. *Langmuir*, 22(8), 3579–3585. <https://doi.org/10.1021/la053238f>
- Foegeding, P. M., Thomas, a. B., Pilkington, D. H., & Klaenhammer, T. R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 884–890.
- Gabbott, P. (2007). A practical introduction to differential scanning calorimetry. In *a practical introduction to differential scanning calorimetry* (p. 49). <https://doi.org/10.1002/9780470697702>
- Galván Jiménez, M. O. “Análisis filogenético del gen 16s rRNA de la cepa *Pediococcus* ITV26 y estudio de su producción de Pediocina en un medio definido”. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Abril, 2012.
- Gänzle, M. G., Weber, S., & Hammes, W. P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 207–217.
- Gonzalez, C. F., & Kunka, B. S. (1987). Plasmid-Associated Bacteriocin Production and Sucrose Fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2534–2538.
- González Gómez, N. “Caracterización parcial de la bacteriocina purificada de *Pediococcus acidilactici* ITV26”. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. 2002.
- Goulhen, F., Meghrous, J., & Lacroix, C. (1999). Production of a nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), 399–406.
- Green, G., Dicks, L. M., Bruggeman, G., Vandamme, E. J., & Chikindas, M. L. (1997). Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology*, 83(1), 127–132.
- Hastings, J. W., & Stiles, M. E. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *The Journal of Applied Bacteriology*, 70(2), 127–134.

- Henderson, J. T., Chopko, A. L., & Van Wassenaar, P. D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 295(1), 5–12.
- Hermida, L. G. “Preparación y caracterización de formulaciones liposomales para administración por vía oral”. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 2006.
- Hoover, D. G., Dishart, K. J., & Hermes, M. A. (1989). Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnology (New York)*, 3(2), 183–196.
- Imran, M., Revol-Junelles, A. M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E., ... Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407–419. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.010>
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2), 171–200.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006>
- Jiménez, H. M., Mendoza, G. P., Tejero, J. y Oliart, R. R. 2011. Estudio de la actividad y encapsulación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26. VIII *Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*.
- Kawaguchi, E., Shimokawa, K. I., & Ishii, F. (2008). Physicochemical properties of structured phosphatidylcholine in drug carrier lipid emulsions for drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.027>
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O., & Kok, J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1589–1597.
- Kheadr, E. E., Vuilleumard, J. C., & El-Deeb, S. A. (2003). Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International*, 36(3), 241–252.
- Kirby, C. J., Whittle, C. ., Rigby, N., D.A, C., & Law, B. A. (1991). Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *International Journal of Food Science & Technology*, 26(5), 437–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb01988.x>
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337–349.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid

- bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 39–85.
- Kosaraju, S. L., Tran, C., & Lawrence, A. (2006). Liposomal delivery systems for encapsulation of ferrous sulfate: Preparation and characterization. *Journal of Liposome Research*, 16(4), 347–358. <https://doi.org/10.1080/08982100600992351>
- 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.
- Lasic, D. D. "Liposomes". *Science & Medicine*, 34-42, 1996.
- López-Córdoba, A. (2012). *Desarrollo De Sistemas De Encapsulación Compuestos Para La Protección De Extractos Antioxidantes De Yerba Mate*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de la Plata.
- López del Castillo, L.M. "Aislamiento de *Pediococcus acidilactici* ITV26 y Caracterización Parcial de la Bacteriocina Producida". Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Noviembre, 1998.
- Lysionek, A. E., Zubillaga, M. B., Salgueiro, M. J., Caro, R. A., Weill, R., & Boccio, J. R. (2001). Bioavailability study of dried microencapsulated ferrous sulfate--SFE 171--by means of the prophylactic-preventive method. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 15(4), 255–259.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21.
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—A Comparison. *International Journal of Food Properties*.
- Malvern. (2012, May 30). Back to basics with Malvern Instruments particle characterization white paper. Retrieved from Malvern Instruments Ltd.: <http://www.malvern.com/malvern/pr.nsf/id/pr2437>
- Martin-Banderas, L., Ganan-Calvo, A. M., & Fernandez-Arevalo, M. (2010). Making Drops in Microencapsulation Processes. *Letters in Drug Design & Discovery*.
- Martínez, G.J. "Efecto de Diferentes Fuentes de Carbono Sobre la Producción de una Bacteriocina a partir del *Pediococcus acidilactici* ITV26". Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2001.
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical

- analyser: The TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1–2), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00680-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00680-3)
- Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., & Manachini, P. L. (1997). Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 151(2), 231–236.
- Morilla, M.J. 2003. Incorporación de drogas antichagásicas en liposomas. Universidad Nacional de Quilmes.
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10(4), 711–719.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 309–327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>
- Mozafari, M. R., Reed, C. J., Rostron, C., Kocum, C., & Piskin, E. (2002). Construction of Stable Anionic Liposome-Plasmid Particles Using the Heating Method: a Preliminary Investigation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(September), 923–927. Retrieved from <http://www.cmbi.org.pl>
- Naidu, A. S. (2000). Natural food antimicrobial systems. *Catechins*, 382.
- Narsaiah, K., Jha, S. N., Wilson, R. A., Mandge, H. M., Manikantan, M. R., Malik, R. K., & Vij, S. (2013). Pediocin-Loaded Nanoliposomes and Hybrid Alginate-Nanoliposome Delivery Systems for Slow Release of Pediocin. *BioNanoScience*, 3(1), 37–42. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0069-y>
- Nes, I. F., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*.
- Onwulata, C. I. (2012). Encapsulation of new active ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 183–202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149076>
- Opsata, M., Nes, I. F., & Holo, H. (2010). Class IIa bacteriocin resistance in *Enterococcus faecalis* V583: the mannose PTS operon mediates global transcriptional responses. *BMC Microbiology*, 10, 224.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6), 465–499.
- Pegg, R. B., and Shaihi, F. 1999. Encapsulation and controlled release in food preservation. M. S. Rahman (Ed). *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker. EE. UU. pp. 611-667.

- Portilla Vázquez, S. “Análisis molecular del gen estructural pedA de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV26”. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2010.
- Porzio, M. (2004). Flavor encapsulation: A convergence of science and art. *Food Technology*.
- Prombutara, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I., & Chareonpornwattana, S. (2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*, 24(1–2), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.025>
- Pucci, M. J., Vedamuthu, E. R., Kunka, B. S., & Vandenberg, P. A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2349–2353.
- Ray, B., Schamber, R., & Miller, K. W. (1999). The pediocin Ach precursor is biologically active. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2281–2286.
- Requena, T. (1995). Revisión: actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 35(1), 19–44.
- Riddick, T. 1968. Control of colloid stability through zeta potential, with a closing chapter in its relationship to a cardiovascular disease. *Zeta-Meter*, Inc. New York, NY. U. S. A.
- Robichon, D., Gouin, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., & Hechard, Y. (1997). The rpoN (??54) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*, 179(23), 7591–7594.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., & Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2), 91–121. <https://doi.org/10.1080/10408690290825475>
- Salle, B.-L., Delvin, E., & Claris, O. (2005). Fat-soluble vitamins in infants. *Archives of Pediatrics*, 12(7), 1174–1179.
- Schanzenbach, R. S. (2005). “ Caracterización bioquímica y molecular de las MXVK133 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aisladas de.
- Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1989). Antibacterial Activity of *Lactobacillus-Sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901–1906. Retrieved from si
- Taylor, T. M., Bruce, B. D., Weiss, J., & Davidson, P. M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, 28(2), 183–197.

- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by ζ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11483-007-9023-x>
- Teixeira, M. L., dos Santos, J., Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 49–53.
- Tessema, G. T., Møretrø, T., Snipen, L., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2011). Global transcriptional analysis of spontaneous sakacin p-resistant mutant strains of *Listeria monocytogenes* during growth on different sugars. *PLoS ONE*, 6(1).
- Thompson, a K., & Singh, H. (2006). Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 410–419. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72105-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72105-1)
- Turcotte, C., Lacroix, C., Kheadr, E., Grignon, L., & Fliss, I. (2004). A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 283–293. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00315-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00315-5)
- Uteng, M., Hauge, H. H., Brondz, I., Nissen-Meyer, J., & Fimland, G. (2002). Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 952–956.
- Venema, K., Chikindas, M. L., Seegers, J. F. M. L., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Venema, G., & Kok, J. (1997). Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: Purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 305–309.
- Venema, K., Kok, J., Marugg, J. D., Toonen, M. Y., Ledebøer, A. M., Venema, G., & Chikindas, M. L. (1995). Functional analysis of the pediocin operon of *Pedococcus acidilactici* PAC1.0: PedB is the immunity protein and PedD is the precursor processing enzyme. *Molecular Microbiology*, 17(3), 515–522.
- Voet, D., 1992. “Bioquímica”. *Ediciones Omega*. Barcelona, España. 293-328.
- Wan, J., Gordon, J. B., Muirhead, K., Hickey, M. W., & Coventry, M. J. (1997). Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. *Letters in Applied Microbiology*, 24(3), 153–158.
- 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.
- Wu, C.-W., Yin, L.-J., & Jiang, S.-T. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pedococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146–1151.

- Xiao, D., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 1977–1985.
- Yáñez, J. F., Salazar, J. a M., Chaires, L. M., Jiménez, J. H., Márquez, M. R., & Ramos, E. G. R. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance Y Perspectiva*, 21, 313–319.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Benmechernene, Z., ... Zarazaga, M. (2013). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 7(1), 48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921084>
- Yang, R., Johnson, M. C., & Ray, B. (1992). bacteriocins from lactic acid bacteria . Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteriat. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3355–3359.
- Zimmermann, E., & Mu, R. H. (2001). Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52, 203–210.

APÉNDICE A. Medios de cultivos empleados.**TABLA A.17.** Medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe).

| Medio MRS | g/L |
|-----------------------------|------------|
| Glucosa | 20 |
| Peptona de caseína | 10 |
| Extracto de carne | 8 |
| Extracto de levadura | 4 |
| Fosfato de potasio dibásico | 2 |
| Acetato de sodio | 5 |
| Citrato de amonio | 2 |
| Sulfato de magnesio | 0.2 |
| Sulfato de manganeso | 0.05 |
| Tween 80 | 1 mL |

Disolver en agua destilada y esterilizar a 121 °C/15 minutos pH 6.8 ± 0.1 a 25 °C.

Nota: Si se desea preparar Agar MRS agregar 15 g/L de Agar bacteriológico.

TABLA A.18. Medio de cultivo LB (Lauria-Bertoni).

| Medio LB | g/L |
|----------------------|------------|
| Triptona | 20 |
| Extracto de levadura | 10 |
| NaCl | 8 |

Disolver en agua destilada y esterilizar a 121 °C/15 minutos pH 6.8 ± 0.1 a 25 °C.

Nota: Agregar 15 g/L de Agar bacteriológico si se desea preparar Agar LB, o 12 g/L si se desea preparar Agar LB suave.

APÉNDICE B. Preparación de buffer de fosfatos de sodio 25 mM, pH 6.5.

Reactivos:

- Fosfato de sodio dibásico, Na₂PO₄·7H₂O (J. T. Baker)

3.459 g en 1 L de agua destilada (pH básico)

- Fosfato monobásico de sodio, NaH₂PO₄·H₂O (J. T. Baker).

3.44975 g en 1 L de agua destilada (pH ácido)

Ajustar el fosfato de sodio dibásico (pH básico) con el fosfato monobásico de sodio (pH ácido).

APÉNDICE C. Preparación de geles para SDS-PAGE.

TABLA A.19. Formulaciones SDS-PAGE

Gel separador (16.5%T*, 3%C**):

| Soluciones | mL |
|--------------------------------|-----------|
| Acrilamida/Bisacrilamida | 1.5 |
| Buffer gel | 1.25 |
| Glicerol 50% | 1 |
| Persulfato de amonio 10% (APS) | 30 µL |
| TEMED | 3 µL |

* %T: acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 mL.

** %C: bis-acrilamida, determina el grado de entrecruzamiento.

Gel concentrador (4%T, 3%C):

| Soluciones | mL |
|--------------------------------|-----------|
| Acrilamida/Bisacrilamida | 0.150 |
| Buffer gel | 0.380 |
| Agua destilada | 0.970 |
| Persulfato de amonio 10% (APS) | 25 µL |
| TEMED | 2.5 µL |

* %T: acrilamida + entrecruzador en gramos por 100 mL.

** %C: bis-acrilamida, determina el grado de entrecruzamiento.

Buffer gel:

- Tris 36.33 g (3M)
- SDS 0.3 g (0.3%)
- Ajustar a pH 8.25 con HCl hasta 100 mL con agua mQ.

Glicerol 50%:

- 25 g de glicerol hasta 50 mL con agua mQ.

APS 10% (Persulfato de amonio):

- Pesar 10 µg de APS, añadir 100 µL de agua destilada.

Acrilamida/Bisacrilamida:

- 38.932 g de acrilamida
- 1.068 g de bisacrilamida
- hasta 100 mL con agua mQ

APÉNDICE D. Tinción de geles de electroforesis.

Los geles de SDS-PAGE se tiñeron empleando el kit ProteoSilver™ empleando el siguiente protocolo:

1. Fijado – Después de correr la SDS-PAGE se retiró el gel y se colocó en un recipiente limpio con 100 mL de la solución de fijado por 20 minutos.

Nota: Un fondo más claro se puede alcanzar por tiempos de fijado prolongados (40 minutos – toda la noche).

2. Lavado con etanol – Se decantó la solución de fijado y se lavó el gel por 10 minutos con 100 mL de una solución de etanol al 30%.

3. Lavado con agua – Se decantó la solución de etanol al 30% y se lavó el gel por 10 minutos con 200 mL de agua ultrapura.

4. Sensibilización – Se decantó el agua y se incubó el gel por 10 minutos con 100 mL de la solución sensibilizadora.

5. Lavado con agua – Se decantó la solución sensibilizadora y se lavó el gel dos veces, cada vez por 10 minutos con 200 mL de agua ultrapura.

6. Equilibrio de plata – Se decantó el agua y se incubó el gel por 10 minutos con 100 mL de la solución de plata.

7. Lavado con agua – Se decantó la solución de plata y se lavó el gel durante 1 a 1.5 minutos con 200 mL de agua ultrapura.

Nota: Lavar por más de 1.5 minutos puede resultar en un decremento en la sensibilidad.

8. Revelado del gel – Se decantó el agua y se reveló el gel con 100 mL de la solución reveladora. Un tiempo de revelado de 3 a 7 minutos son suficientes para producir una tinción intensa deseada para la mayoría de los geles. Tiempos de revelado de 10 a 12 minutos pueden ser requeridos para detectar bandas con muy poca concentración de proteína (0.1 ng/mm²).

9. Se añadieron 5 mL de la solución de parada ProteoSilver al gel con la solución reveladora para detener la reacción de revelado y se incubaron por 5 minutos. Se produjeron algunas burbujas de CO₂ en la mezcla.

10. Almacenamiento – Se decantó la solución reveladora mezclada con la solución de parada y se lavó el gel por 15 minutos con 200 mL de agua ultrapura. Se almacenó a temperatura ambiente el gel hasta la posterior captura de imagen empleando un fotodocumentador.

Soluciones empleadas para la tinción de geles de electroforesis.

1. Solución de fijado.

Añadir 50 mL de etanol con 10 mL de ácido acético a 40 mL de agua ultrapura.

2. Solución de etanol al 30%.

Añadir 30 mL de etanol a 70 mL de agua ultrapura.

3. Solución de sensibilización.

Añadir 1 mL de ProteoSilver Sensitizer a 99 mL de agua ultrapura. La solución preparada debe usarse dentro de las 2 primeras horas. Un precipitado puede

formarse en el ProteoSilver Sensitizer. Este precipitado no afectará el desempeño de la solución. Simplemente dejar precipitar y tomar 1 mL del sobrenadante.

4. Solución de plata.

Añadir 1 mL de la solución de plata ProteoSilver a 99 mL de agua ultrapura. La solución preparada debe usarse dentro de las 2 primeras horas.

5. Solución de revelado.

Añadir 5 mL de ProteoSilver Developer 1 y 0.1 mL de ProteoSilver Developer 2 a 95 mL de agua ultrapura. La solución de revelado debe prepararse inmediatamente (<20 minutos) antes de usarse.

APÉNDICE E. Determinación de proteínas

Método de Bradford (Bradford, M. 1976)

El método está basado en el cambio de color del colorante Azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aminoácidos aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del Azul brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancia entre 595 y 465 nm.

Procedimiento estándar para microplacas:

1. Preparar el reactivo colorante diluyendo 1 parte del reactivo colorante concentrado con 4 partes de agua ultrapura. Filtrar a través de un filtro Whatman # 1 (o equivalente) para eliminar partículas. Este reactivo diluido se puede utilizar durante aproximadamente 2 semanas cuando se mantiene a temperatura ambiente.
2. Preparar de tres a cinco diluciones de un estándar de proteína, que es representativa de la solución de proteína a ensayar. El intervalo lineal de este ensayo de microplacas es de 0.05 mg/mL a aproximadamente 0.5 mg/mL. Se analizará por duplicado o triplicado.

3. Pipetear 10 μL de cada solución patrón y la muestra en pocillos separados de la microplaca.
4. Añadir 200 μL de reactivo colorante diluido a cada pocillo. Mezclar la muestra y el reactivo.
5. Incubar a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos. La absorbancia aumenta con el tiempo; las muestras no deben incubarse a temperatura ambiente durante más de 1 hora.
6. Medir la absorbancia a 570 nm.

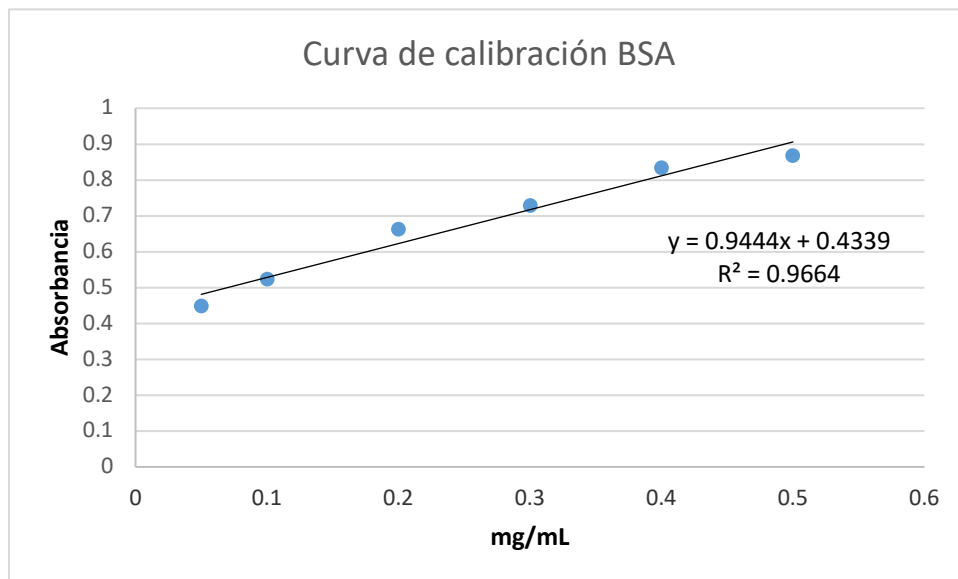


FIGURA E.26. Curva patrón de albúmina de suero bovino para la determinación de proteína.