



Primera Edición

2017

**AVANCES EN LA SEGURIDAD Y ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS Y
PROBIÓTICOS**

Editores:

Dr. Hugo Espinosa Andrews

Dra. Zaira Yunuen García Carvajal

Dr. Eristeo García Márquez

Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y Diseño
del Estado de Jalisco A.C.

ISBN: 978-607-97548-6-0



Primera Edición, 2017

ISBN: 978-607-97548-6-0

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C

Av. Normalistas 800. Colinas de la Normal, Guadalajara Jalisco, México. CP 44270.

CIA760825



Sello Editorial: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (607-97548)

<Se prohíbe la reproducción total o parcial de este documento por cualquier medio sin el previo y expreso consentimiento por escrito del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. a cualquier persona y actividad que sean ajenas al mismo>

Editores

Dr. Hugo Espinosa Andrews.

El Dr. Espinosa obtuvo el título de Doctor en Ciencias (Ingeniería Química) en la Universidad Autónoma Metropolitana en la Ciudad de México. Actualmente es investigador titular “C” del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Unidad Zapopan. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1.



Sus intereses de investigación se centran en el diseño de sistemas de liberación controlada de compuestos bioactivos. Ha publicado quince artículos científicos en revistas internacionales (h-index 7). Ha editado dos libros con registro ISBN. Cuenta con tres solicitudes de patente con registro en PCT y cinco solicitudes de patente registradas en el IMPI.

Dra. Zaira Yunuen García Carvajal

La Dra. García obtuvo el título de Doctor en Farmacia y Tecnología Farmacéutica por la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Actualmente es investigador titular A del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1.



Sus intereses de investigación se centran en el diseño, síntesis, preparación, caracterización fisicoquímica y evaluación biológica de biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y como sistemas de liberación de sustancias bioactivas artículos. Ha publicado 14 científicos en revistas internacionales (h-index 6). Cuenta con una solicitud de patente con registro en PCT y dos solicitudes de patente registradas en el IMPI.

Dr. Eristeo García Marquez

El Dr. García Márquez obtuvo el título de Doctor en Biotecnología en la Universidad Autónoma Metropolitana en la Ciudad de México. Actualmente es investigador titular “A” del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Unidad Noreste. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel Candidato.



Sus intereses de investigación se centran en el desarrollo de sistemas micro y nano-ensamble intermolecular. Principalmente, en estabilizar sustancias antioxidantes, y minerales catiónicos de interés biológico. Ha publicado ocho artículos científicos en revistas internacionales (h-index 3). Ha editado dos libros con registro ISBN. Cuenta con una solicitud de patente registrada en PCT.

LISTA DE AUTORES

Depto. de Ing. Química. Universidad de Guadalajara

Dr. Órfil González Reynoso

Departamento de Proceso y Tecnología. Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Cuajimalpa

Dr. Roberto Olivares Hernández

Technische Universität Braunschweig. Braunschweig, Alemania

Prof. María del Refugio Ramos-Jerz

Prof. Peter Winterhalter

Catedrática CONACYT- Instituto Tecnológico de Veracruz

Dra. Figueroa Hernández Claudia

Escuela de Enología y Gastronomía. Universidad Autónoma de Baja California

Dr. Alonso Villegas Rodrigo

Biología Médica y Farmacéutica. CIATEJ, A.C.

Dra. Erika N. Marino Marmolejo

Dra. Marisela González Avila

Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez

Dra. Zaira Yunuen García Carvajal

M en C. Flor Y. Flores Hernández

Dr. Eduardo Padilla Camberos

Dr. Jorge Bravo Madrigal

Dr. Moisés Martínez Velázquez

Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez

Biología Vegetal. CIATEJ, A.C.

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar

Dr. Gabriel Rincón Enríquez

Tecnología Alimentaria. CIATEJ, A.C.

Dra. Judith Esmeralda Urías Silvas

Dra. Socorro Villanueva Rodríguez

Dr. Luis Alfonso Mojica Contreras

Dr. José Daniel Padilla de la Rosa

Dr. Hugo Espinosa Andrews

Posgrado en Ciencias en Innovación Biotecnológica. CIATEJ, A.C.

M en C. Brenda San Pablo Osorio

Jesús Rafael Trinidad Cruz

I.Q. Gladys Páez Hernández

IBT. Rosa Jarumy López Rivera

Dra. Albertina Cárdenas Vargas

PICYT - Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología. CIATEJ, A.C.

M en C y T. María Gretel Michel Barba

M en C y T. Karina Esmeralda Enríquez Ramirez

M en C. Alma Rosa Oaxaca Camacho

Dra. Elizabeth Cortés Pérez

Contenido

1. EVALUACIÓN DE SEGURIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS.....	1
Introducción	1
Métodos de evaluación de seguridad de sustancias bioactivas.	2
Toxicología de nanopartículas.	3
Métodos de actividad biológica de las sustancias bioactivas	3
1. Actividad antimicrobiana.....	4
2. Actividad citotóxica y antitumoral.....	4
3. Actividad antiinflamatoria.	4
4. Actividad antidiabética.	4
5. Actividad hipocolesterolémica.	4
6. Actividad analgésica.	5
7. Actividad gastroprotectiva.....	5
8. Actividad inmunomoduladora.	5
Referencias	5
2. LA LEGISLACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y SUS EFECTOS TERAPÉUTICOS Y TÓXICOS IN VITRO	7
Introducción	7
Nanopartículas.....	8
Usos de las nanopartículas en biomedicina.....	9
1. Liposomas.....	11
2. Nanocápsulas	11
3. Nanotubos	12
4. Dendrímeros	12
5. Nanoemulsiones.....	12
Efectos vs seguridad de las nanopartículas en sistemas biológicos	14
Regulación del uso de nanopartículas.	16
Ensayos prebiológicos para el uso de las NPs.....	18
1. Pruebas biológicas in vitro: Células.....	19
2. Ejemplos de efectos de nanotoxicidad en ensayos in vitro	21
3. Efecto agudo versus efecto crónico de las NPs	21
4. Efectos biológicos de utilidad probados en ensayos in vitro	22
5. Ejemplo de uso de nanoemulsiones contra C. albicans	23

Conclusiones	24
Bibliografía	25
3. NANOMATERIALES: INMUNIDAD Y SISTEMA GASTROINTESTINAL	28
Introducción	28
Interacción de NP, macrófagos, dendríticas y neutrófilos en tejido linfoide intestinal.....	36
Conclusión.....	37
Referencias.....	37
4. PÉPTIDOS CON POTENCIAL HIPOGLUCEMIANTE	43
Introducción	43
Ensayos <i>in silico</i>	47
Ensayos <i>in vitro</i>	47
Ensayos <i>in vivo</i>	48
Generación de péptidos bioactivos.....	49
Metabolismo de péptidos	51
Potencial hipoglucemiante de péptidos de frijol: métodos y modelos de evaluación	52
Perspectiva a futuro.....	55
Referencias	56
5. PÉPTIDOS BIOACTIVOS: CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA	60
Introducción	60
Fuente de péptidos bioactivos:	61
Péptidos antihipertensivos:.....	62
Mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo de los péptidos	64
Obtención de péptidos bioactivos	66
Bibliografía	66
6. MODELOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA.....	70
Introducción	70
Rutas de administración de sustancias activas	71
Modelos de liberación de sustancias activas	72
Mecanismos de liberación.....	75
1. Mecanismo de difusión.....	76
2. Mecanismo de hinchamiento	76
3. Mecanismo de erosión	77
Caracterización de sistemas de liberación.....	78

Aplicaciones.....	79
Conclusión.....	80
Referencias.....	81
7. MODELADO <i>in silico</i> DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.....	84
Introducción.....	84
Ingeniería Metabólica: modelado <i>in silico</i> del microbioma.....	86
Metodologías de ingeniería metabólica.....	86
Balance de flujos metabólicos (FBA), punto de partida para el conocimiento de la fisiología celular.	87
Modelos metabólicos a escala genómica (GEMs).....	88
Bibliografía.....	89
8. MODELADO MATEMÁTICO DEL METABOLISMO PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES.....	91
Resumen.....	91
Introducción.....	92
Organización del metabolismo celular.....	95
Construcción de los modelos metabólicos del metabolismo.....	101
Aplicación de los modelos metabólicos.....	111
Los modelos del metabolismo, herramientas computacionales y los datos ‘ómicos’.....	118
Perspectivas de aplicación de los modelos metabólicos.....	119
Bibliografía.....	120
9. ARIS: MODELO DE EVALUACIÓN <i>ex vivo</i>	126
Introducción.....	126
ARIS.....	129
Conclusión.....	130
Referencias.....	131
10. NANOENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU IMPACTO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.....	132
Introducción.....	132
Tratamiento contra el cáncer.....	135
Biodisponibilidad.....	137
Tecnologías de dosificación de sustancias activas.....	137
Compuestos bioactivos.....	140
1. Curcumina.....	140

2.	Quercetina.....	142
3.	Carotenoides	146
4.	Capsaicina.....	148
	Conclusión.....	149
	Referencias	149
11.	BIODISPONIBILIDAD EN UN MODELO MURINO: ANTIOXIDANTES DE GRANADA Y COENZIMA Q10 NANOENCAPSULADOS.....	154
	Introducción	154
	Biodisponibilidad en modelo murino <i>in vivo</i>	158
	Conclusiones	160
	Bibliografía	160
12.	ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN EXTRACTO DE SEMILLAS DE AGUACATE (<i>Persea americana</i> mill.) EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.....	162
	Introducción	162
	Materiales y métodos	164
1.	Extracto de semillas de aguacate	164
2.	Líneas celulares.....	164
3.	Propagación de las líneas celulares.....	164
4.	Tripsinización celular	165
5.	Ensayo de citotoxicidad.....	165
6.	Ensayo colorimétrico MTT.....	166
	Resultados	166
	Referencias	170
13.	EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y/O ANTIINFLAMATORIAS DE NUEVAS MOLÉCULAS, MEDICAMENTOS Y/O SUSTANCIAS DE ORIGEN NATURAL SOBRE UN MODELO “ <i>IN VIVO</i> ”.....	172
	Introducción	172
	Evaluación inhibitoria en oído	174
	Evaluación terapéutica	176
	Conclusiones	178
	Referencias	178
14.	CONTROL DE <i>Helicobacter pylori</i> CON EXTRACTOS VEGETALES	180
	Resumen.....	180
	Introducción	181

Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	182
Extractos vegetales con actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i>	184
Perspectivas sobre el control de <i>Helicobacter pylori</i> con extractos vegetales.....	191
Conclusión.....	191
Referencias.....	192
15. ENCAPSULACIÓN APLICADA A LA PROTECCIÓN Y VIABILIDAD DE PROBIÓTICOS.....	203
Introducción.....	203
Microencapsulación.....	205
Métodos de microencapsulación empleados para probióticos.....	207
1. Microencapsulado por emulsión.....	213
2. Microencapsulado por lecho fluidizado.....	214
3. Microencapsulado por gelificación con proteína.....	216
4. Microencapsulado por secado por aspersión.....	217
5. Microencapsulado por aspersión en frío (Spray chilling/Spray cooling).....	219
6. Microencapsulado por liofilización.....	220
7. Combinación de varias técnicas.....	221
8. Microencapsulado por aerosol incidente.....	221
9. Microencapsulado por electrohilado.....	221
10. Microencapsulado por coacervación.....	222
Materiales encapsulantes más empleados en la microencapsulación de probióticos.....	223
1. Alginato.....	224
2. Exopolisacáridos microbianos (goma xantana y gelana).....	224
3. Carrageninas.....	225
4. Ftalato acetato de celulosa.....	225
5. Quitosano.....	226
6. Almidón modificado.....	226
7. Gelatina.....	227
8. Proteínas de la leche.....	227
Conclusión.....	227

Prefacio

Desde siempre se ha sabido que una adecuada alimentación es muy importante para la salud y el normal funcionamiento del cuerpo. Actualmente los enfoques nutricionales están comenzando a reflejar un cambio fundamental en nuestra comprensión de la salud. A la hora de hacer la compra de insumos alimentarios, la salud es uno de los principales motivos que se tienen en cuenta por los miembros de las sociedades desarrolladas para la elección de los alimentos.

A pesar de esto, muchos de los conceptos empleados en el campo de la nutrición no son del todo claros ni para los profesionales ni para los consumidores. Tal es el caso de los denominados “alimentos funcionales”, que prometen un beneficio a la salud más allá del beneficio nutricional. Estos beneficios a la salud que los hacen funcionales dependen en gran medida en los “*compuestos bioactivos*” que tenga ese alimento funcional.

Pero, ¿qué es un *compuesto bioactivo*? Contestar a esta pregunta no es tarea fácil. En la 23^a Reunión del Consenso de Hohenheim en la Universidad de Hohenheim en Stuttgart. Se reunieron científicos que habían publicado y revisado artículos científicos y regulatorios sobre el tema, entre ellos investigadores básicos, toxicólogos, clínicos y nutricionistas y después de un arduo trabajo y de manera consensuada dieron una definición para *compuesto bioactivo*:

Los compuestos bioactivos son componentes esenciales y no esenciales (por ejemplo, vitaminas o polifenoles, prebióticos, probióticos, etc.) que se producen en la naturaleza, son parte de la cadena alimentaria y pueden demostrar que tienen un efecto sobre la salud humana

La dieta no sólo proporciona nutrientes adecuados para satisfacer los requisitos metabólicos, sino que también puede contribuir a la mejora de la salud humana. En consecuencia, los *compuestos bioactivos* que se cree que benefician a la salud humana necesitan ser identificados y desarrollados para el mercado de alimentos para complementar una dieta equilibrada. La evaluación de la eficacia y seguridad de estos *compuestos bioactivos* naturales representa un desafío para los científicos.

Debido a esto, a lo largo de los capítulos del libro quisimos abordar esta temática, presentando avances científicos relacionados a la evaluación en la seguridad y actividad

Prefacio

biológica de sustancias bioactivas y probióticos. También se abordaron temas de Nanotecnología.

Es importante destacar que muchos de los resultados presentados en este libro son trabajos originales de los autores y otros más son opiniones científicas de expertos.

Dra. Zaira Yunuen García Carvajal.

1. EVALUACIÓN DE SEGURIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS.

Eduardo Padilla Camberos

Biología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, A.C.

epadilla@ciatej.mx

Introducción

El uso de sustancias bioactivas obtenidas de productos naturales para el tratamiento de diversas enfermedades se ha basado principalmente en el conocimiento empírico, documentado por varias culturas a lo largo de la historia de la humanidad. En la actualidad, ese conocimiento se ha tratado de retomar para otorgarle validez científica y poder así llevar este tipo de productos a su aplicación en la prevención o tratamiento de enfermedades. La búsqueda de sustancias bioactivas a partir de productos naturales para el tratamiento de enfermedades donde no se ha logrado un tratamiento idóneo, es justificable, debido a que la naturaleza ofrece una gran diversidad de estructuras químicas con un posible efecto biológico. Este potencial de actividad biológica en los productos naturales apenas comienza a conocerse, de hecho, se estima que menos del 10% de la biodiversidad ha sido evaluada para conocer su potencial actividad biológica (Dias *et al.*, 2012).

Lo anterior hace necesario contar con métodos analíticos que demuestren que, el uso de sustancias bioactivas sea seguro; es decir que no ocasionen efectos toxicológicos indeseables, así como demostrar que son eficaces para determinado padecimiento. Esto hace que la evaluación de seguridad y actividad biológica cobren vital importancia para lograr que este tipo de sustancias puedan ser consideradas para su utilización clínica. Este punto ha sido tomado por las regulaciones de varios países para controlar su estudio y asegurar el bienestar de la población.

Los métodos para evaluar la seguridad y actividad biológica (bioensayos) de las sustancias pueden clasificarse en base a diferentes criterios:

- a) por su efecto, se pueden realizar métodos de actividad antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria, hipocolesterolemica, etc.
- b) por el tipo de organismo utilizado en la evaluación, los bioensayos pueden utilizar animales completos, órganos aislados, organismos inferiores (insectos, microorganismos, plantas), cultivos celulares y sistemas subcelulares aislados como enzimas y receptores.
- c) por el nivel de complejidad del método, se pueden utilizar métodos *in silico*, *in vitro*, modelos animales y estudios clínicos.

Métodos de evaluación de seguridad de sustancias bioactivas.

Los principales métodos para evaluar la seguridad de sustancias bioactivas son los estudios toxicológicos, entre los que podemos encontrar tanto estudios *in vitro*, como estudios *in vivo*. Entre los estudios de seguridad *in vitro* podemos mencionar el ensayo de letalidad en *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982), el cual se utiliza para evaluar posibles efectos tóxicos, así como actividad biológica. Citotoxicidad en líneas celulares, genotoxicidad mediante ensayos con insectos como la *Drosophila*, microorganismos como la prueba de Ames o componentes celulares como la prueba de inducción de micronúcleos.

Respecto a los estudios *in vivo* es posible evaluar la toxicidad sistémica mediante la prueba de toxicidad aguda en roedores, con esta prueba es posible determinar la dosis letal media o DL₅₀. Los estudios de irritación dérmica e irritación ocular son también estudios agudos de una sola exposición, comunmente utilizada en productos de aplicación tópica o que puedan dañar el ojo. Otros estudios en modelos animales son los estudios de toxicidad en dosis repetidas con las cuales se evalúan los efectos de la exposición por periodos desde 28 días a 24 meses.

Existen también los estudios de toxicidad órgano-específica, como los estudios de inmunotoxicidad, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, etc. Asimismo, los

efectos en la reproducción y desarrollo embrionario pueden también evaluarse en modelos animales. Los estudios de sensibilización se utilizan para identificar el potencial alergénico de las sustancias (Parasuraman, 2011).

Toxicología de nanopartículas.

Debido a que la exposición a las nanopartículas es cada vez más frecuente ya que las podemos encontrar en nuestra vida cotidiana en cosméticos, empaques de alimentos, fármacos, entre otros, es necesario evaluar su potencial efecto toxicológico, ya que cada vez hay mayores evidencias de sus efectos adversos en pulmones, riñón, hígado, sistema nervioso y alergias, entre otros. En las nanopartículas, las propiedades fisicoquímicas como tamaño, área superficial, rugosidad y aglomeración son determinantes en su grado de toxicidad (Gatoo *et al.*, 2014).

Además de la caracterización fisicoquímica, se requiere el análisis toxicológico de las nanopartículas mediante pruebas de internalización y biodistribución mediante ensayos *in vitro* con líneas celulares, potencial hemolítico y agregación plaquetaria para evaluar posibles efectos anticoagulantes y trombogénicos. La prueba de activación del sistema de complemento, así como la proliferación linfocitaria y el ensayo de fagocitosis permiten evaluar daños en el sistema inmune.

Los posibles daños al material genético pueden evaluarse mediante el ensayo cometa o la prueba de micronúcleos. La citotoxicidad mediante necrosis o apoptosis es una de las pruebas más utilizadas para evaluar las nanopartículas, así como la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno en hepatocitos de ratón. El potencial neuroinflamatorio de las nanopartículas se debe evaluar en células cerebrales (Love *et al.*, 2012; Kardos *et al.*, 2015). Los métodos de toxicidad *in vivo* mencionados previamente pueden ser utilizados para evaluar nanopartículas.

Métodos de actividad biológica de las sustancias bioactivas

Los métodos de evaluación de actividad biológica de las sustancias bioactivas tratan de representar una condición fisiológica específica donde puede observarse un efecto. Por lo

general, se utilizan varios métodos para evaluar un efecto biológico, de tal manera que se pueda generar información acerca de la dosis o concentración efectiva y del posible mecanismo de acción.

La mayoría de los padecimientos tienen representación mediante un modelo experimental *in vitro* o *in vivo*. A continuación, se enlistan algunos de los métodos más utilizados.

1. *Actividad antimicrobiana.*

Los métodos más utilizados son el método de difusión en agar con el cual se observan zonas o halos de inhibición producidos por el efecto microbicida de las sustancias y el método de dilución agar o medio líquido donde puede determinarse el efecto bacteriostático y determinar la concentración mínima inhibitoria. Estos métodos se utilizan también para evaluar actividad fungicida (Atta-ur-Rahman *et al.*, 2001).

2. *Actividad citotóxica y antitumoral.*

Se utilizan líneas celulares provenientes de diferentes tumores de mamíferos donde se determina el efecto antiproliferativo de las sustancias, ya sea mediante conteo directo de células o a través de la inhibición de función metabólica celular. La actividad antitumoral se realiza en animales a los que se les induce el desarrollo de tumores y se evalúa el tiempo de supervivencia o la disminución de masa tumoral (Padilla-Camberos *et al.*, 2010).

3. *Actividad antiinflamatoria.*

Se induce un edema en la planta de la pata del roedor y se mide la inflamación mediante un pletoisómetro. *In vitro* puede medirse la inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual está involucrada en el proceso inflamatorio (Chen *et al.*, 2008).

4. *Actividad antidiabética.*

En roedores o conejos se administran sustancias a determinadas dosis como el aloxano y la estreptomina que dañan el páncreas, con lo cual se ocasiona un padecimiento similar a la *Diabetes mellitus* tipo 2. Para determinar un posible mecanismo de acción existen ensayos que evalúan la inhibición de enzimas como α -amilasa y α -glucosidasa (Padilla-Camberos *et al.*, 2014).

5. *Actividad hipocolesterolemica.*

El modelo utilizado generalmente es inducido mediante dieta alta en grasas con el fin de incrementar los niveles de lípidos (Zhong *et al.*, 2007).

6. *Actividad analgésica.*

Este método se basa en la colocación del roedor sobre una placa caliente y se mide el tiempo de respuesta del roedor al lamer su pata o tratar de retirarla de la superficie (De Souza, 2011).

7. *Actividad gastroprotectiva.*

La inducción del daño gástrico o ulcerativo se realiza en roedores mediante la administración de sustancias químicas como alcoholes y se evalúa la disminución de lesiones mediante técnicas de microscopia (Rozza *et al.*, 2013).

8. *Actividad inmunomoduladora.*

El método se basa en la medición de la estimulación de componentes del sistema inmune celular como macrófagos, granulocitos, algunos linfocitos T y la activación del sistema del complemento, así como la producción de anticuerpos humorales. Por lo general se utilizan animales con alguna enfermedad infecciosa o con algún tipo de tumor, donde se presenta deprimido el sistema inmune (Makare *et al.*, 2001).

Referencias

- caAtta-ur-Rahman, Choudhary, M. I., & Thomsen, W. J. *Bioassay techniques for drug development* (Vol. 16) 2001. The Netherlands: Harwood academic publishers.
- Chen, L. G., Yang, L. L., & Wang, C. C. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46(2), 688-693.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012, 2(2), 303-336.
- De Sousa, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules*. 2011, 16(3), 2233-2252.
- Gatoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Mahmood Dar, A., Qasim, K., & Zubair, S. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international*, 2014.
- Kardos, J., Jemnitz, K., Jablonkai, I., Bóta, A., Varga, Z., Visy, J., & Héja, L. The Janus Facet of Nanomaterials. *BioMed Research International*. 2015.
- Love, S. A., Maurer-Jones, M. A., Thompson, J. W., Lin, Y. S., & Haynes, C. L. Assessing nanoparticle toxicity. *Annual review of analytical chemistry*. 2012, 5, 181-205.

- Makare, N., Bodhankar, S., & Rangari, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, 78(2), 133-137.
- Padilla-Camberos, E., Zaitseva, G., Padilla, C., & Puebla, A. M. Antitumoral activity of allicin in murine lymphoma L5178Y. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010, 11(5), 1241-4.
- Padilla-Camberos, E., Lazcano-Díaz, E., Flores-Fernandez, J. M., Owolabi, M. S., Allen, K., & Villanueva-Rodríguez, S. Evaluation of the Inhibition of Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes, the Antioxidant Activity, and the Polyphenolic Content of *Citrus limetta* Peel Extract. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Parasuraman, S. Toxicological screening. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2011, 2(2), 74.
- Rozza, A. L., Hiruma-Lima, C. A., Takahira, R. K., Padovani, C. R., & Pellizzon, C. H. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. *Chemico-biological interactions*. 2013, 206(2), 272-278.
- Zhong, F., Liu, J., Ma, J., & Shoemaker, C. F. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food research international*. 2007, 40(6), 661-667.

2. LA LEGISLACIÓN DE NANOPARTÍCULAS Y SUS EFECTOS TERAPÉUTICOS Y TÓXICOS *IN VITRO*

Sara Elisa Herrera-Rodríguez*

Rosa Jarumy López-Rivera

Flor Yohana Flores Hernández

Albertina Cárdenas- Vargas

sherrera@ciatej.mx

Introducción

Industrias como la biomedicina, alimenticia, agrícola y electroquímica usan nanopartículas para el desarrollo de nuevos productos. Con respecto a la biomedicina, el uso de nanopartículas se ha enfocado a las áreas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diversas enfermedades, principalmente infecciosas y cáncer. La nanotecnología farmacéutica, utiliza nanopartículas como: polímeros, liposomas, nanotubos de carbón y dendrímeros para mejorar la liberación del fármaco y su biodisponibilidad. En la actualidad, varias nanoformulaciones ya se encuentran en el mercado. No obstante, no se cuenta con una regulación internacional sobre la producción de nanopartículas, por lo que es necesario que los sistemas gubernamentales e industrias, normalicen ensayos para determinar la seguridad, toxicidad y daño ambiental de los productos.³⁶ Estudios han demostrado que algunas nanopartículas pueden llegar a generar un riesgo para la salud, por lo que se ha limitado su uso terapéutico. Se requiere, conocer los efectos tóxicos y terapéuticos de las nanopartículas por medio de los ensayos *in vitro*. Debido a que estos estudios, permiten caracterizar las partículas de manera rápida, económica y sencilla.

Nanopartículas

La nanotecnología implica la exploración de la materia a nivel atómico y molecular. Este campo emergente de la ciencia, se encarga de la fabricación, caracterización y aplicación de sustancias en dimensiones de escala nanométrica (1-500 nm). El desarrollo de productos a este nivel, permite modificar y controlar las propiedades y funciones de la materia, además del desarrollo de productos.¹⁴

Estas nanopartículas se encuentran clasificadas en tres tipos, cada una de ellas con diferentes propiedades:

- 1.-Nanopartículas de una dimensión: El sistema unidimensional corresponde a películas delgadas en monocapa, que se utilizan en tecnología, sensores químicos y biológicos, sistemas de almacenamiento de información, dispositivos magneto-ópticos y sistemas de fibra óptica.
- 2.- Nanopartículas de dos dimensiones: Nanotubos de carbono
- 3.-Nanopartículas tridimensionales: liposomas, dendrímeros, micelas, partículas de oro. Son las más empleadas como sistemas de entrega.²⁵

Es importante resaltar que la estructura química determina las propiedades y función de las nanopartículas. Por ejemplo, su tasa de degradación y liberación de compuestos químicos.

Las nanopartículas se encuentran compuestas de diversos materiales, como: grasas (fosfolípidos, ácidos grasos), proteínas (gelatina, albúmina) y polímeros, ya sea naturales (dextrano, quitosano), semi-sintéticos (derivados de celulosa) o sintéticos poli-acrilatos, poli-anhídridos, poli-acrilamida y poli-ésteres.¹⁴

La estructura física de las nanopartículas las hace altamente reactivas. Por lo que pueden interactuar con una molécula (Ejemplo: principio activo) por medio de dos mecanismos: 1) Como señalizadores superficiales o nanoesferas, donde el componente se encuentra disperso en la superficie o matriz polimérica, y 2) Como acarreadores o nanocápsulas, que son sistemas de tipo reservorio, donde el componente se encuentra en la cavidad central, cubierta por una membrana polimérica que controla la cinética de liberación (Fig. 1).²⁹ La selección de la nanopartícula, dependerá de las necesidades de uso, de las propiedades fisicoquímicas del polímero y de las características de la molécula empleada.

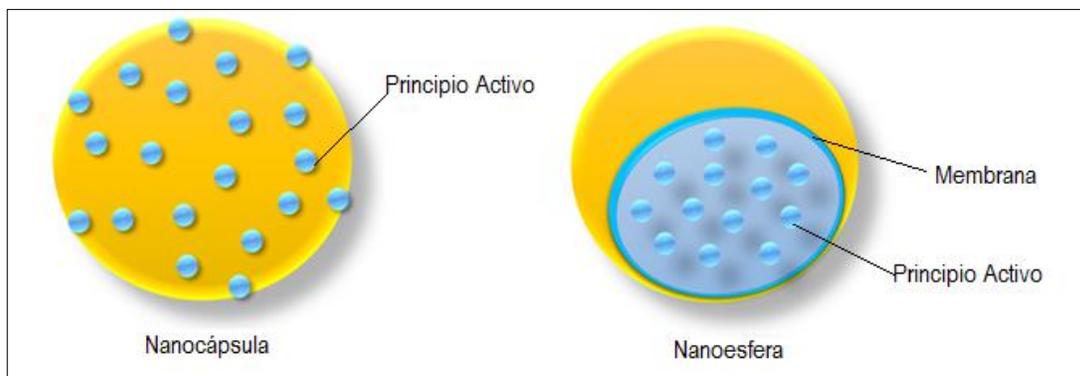


Fig. 1. Estructura física de las nanopartículas y su interacción con el principio activo.

Usos de las nanopartículas en biomedicina

En los últimos años la nanotecnología ha mostrado logros significativos en diversas disciplinas como la electrónica, química de materiales y área médica. Considerando esta última, la nanotecnología ha permitido mejorar los productos farmacéuticos, el desarrollo de los sistemas de administración de fármacos, las imágenes médicas, diagnóstico, terapia del cáncer y medicina regenerativa ¹⁰.

Son múltiples las propiedades y ventajas que tienen las nanopartículas que se utilizan en la industria farmacéutica.¹⁴ A continuación se enumeran las más importantes:

- 1.- Permiten liberar el fármaco en un sitio específico.
- 2.- Incrementan la biodisponibilidad de un fármaco en sangre y por lo tanto su eficacia terapéutica.
- 3.- Pueden ser administradas por varias vías, incluyendo oral, nasal, parenteral e intramuscular.
- 4.- Debido a su tamaño pueden atravesar barreras fisiológicas y entrar fácilmente en vasos sanguíneos, epitelio de estómago y barrera hematoencefálica.
- 5.- Reducen toxicidad de los fármacos convencionales y mejoran su distribución.
- 6.- Sirven para el diagnóstico de enfermedades.
- 7.- Se presenta mayor estabilidad de los componentes.
- 8.- Ayudan a disminuir efectos tóxicos no deseados.

Los fármacos de uso convencional, presentan una biodistribución deficiente, eficacia limitada, efectos secundarios y falta de selectividad. Es por ello, que las nanoformulaciones

ofrecen un potencial novedoso en la industria farmacéutica. Por sus características, las nanopartículas presentan mayor solubilidad, estabilidad y permeabilidad, en comparación con fármacos convencionales, dando como resultado una biodisponibilidad y una eficacia mejoradas.⁸

En los últimos años se han desarrollado formulaciones con tamaños entre 10-100nm. Al momento de diseñar un nuevo nanofármaco se debe asegurar que este facilite el transporte del compuesto activo y llegue hasta al sitio de acción, así como también lo debe proteger de cambios en el pH, enzimas y degradación bioquímica.¹³ En una formulación, podemos encontrar que los nanomateriales pueden fungir como principio activo (Ejemplo. nanocristales); como excipientes (Ejemplo. complejos fármaco-nanoesfera) y, como vehículo o acarreadores de fármaco (Ejemplo. liposomas). De todas las nanopartículas, los liposomas son los más empleados en productos farmacéuticos, seguidos por los nanocristales, emulsiones y polímeros (Fig. 2)⁸. Sin embargo, cada día se crean e investigan nuevas formulaciones, utilizando una amplia variedad de nanopartículas como: los dendrímeros, nanocápsulas, nanoemulsiones, partículas de oro, nanotubos, polímeros biodegradables, etc. (Fig. 3).³⁴

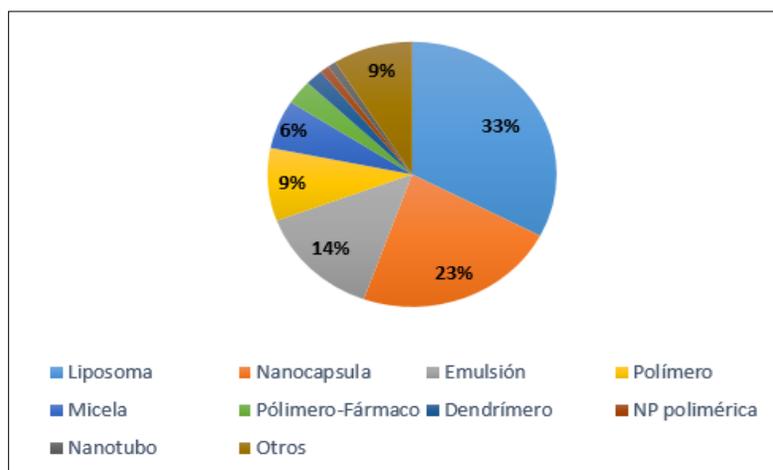


Fig. 2. Distribución del uso de nanomateriales en los productos farmacéuticos de 1973 a 2015. Desglose de los tipos de nanomateriales utilizados en los productos farmacéuticos. Editado de Chen *et al.*, 2017

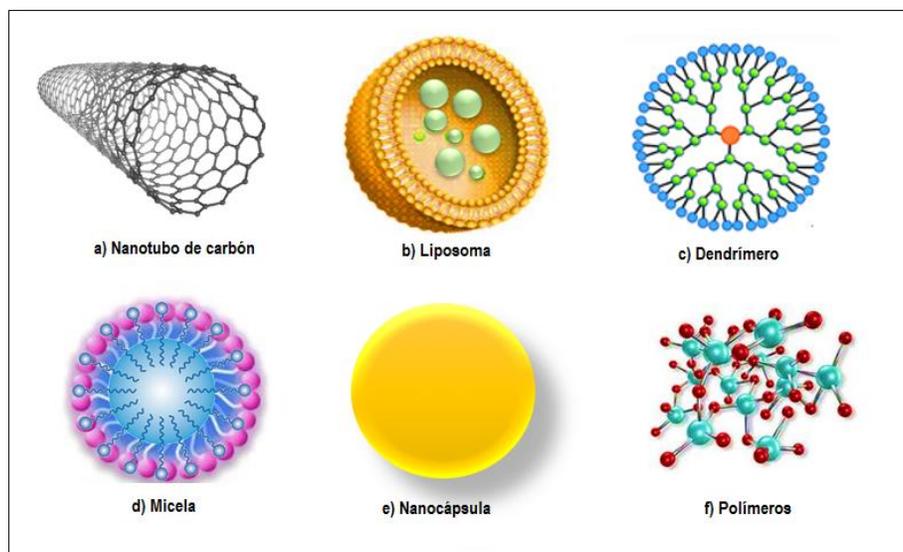


Fig. 3 Diferentes tipos de nanopartículas comúnmente utilizadas para aplicaciones biomédicas. Modificada de Mc Carthy *et al.*, 2015 ²

1. *Liposomas*

Los liposomas fueron las primeras nano plataformas desarrolladas, están compuestos principalmente por fosfolípidos y moléculas anfifílicas, las cuales en un ambiente acuoso forman dos capas lipídicas, las cadenas hidrofóbicas de cada capa quedan una frente a la otra, formando un compartimento lipofílico que actúa como barrera permeable⁴.

El uso clínico de los liposomas abarca el transporte de agentes anti-infecciosos, ADN, oligonucleótidos, ribosomas, entre otros¹. Actualmente, existen en el mercado productos farmacéuticos que emplean liposomas y muchos más en proceso de investigación.

2. *Nanocápsulas*

Las nanocápsulas poliméricas consisten en estructuras coloidales en las cuales, dependiendo del método de preparación, el compuesto activo puede ser disuelto, atrapado, encapsulado o unido a la misma matriz de la nanocápsula. Los materiales poliméricos que se suelen utilizar, independientemente de que sean sintéticos o de fuentes naturales, deben presentar ciertas propiedades como biocompatibilidad, ser biodegradables, modificables de superficie y funcionales. Una de las ventajas de este tipo de sistemas poliméricos es que mejora el comportamiento farmacocinético del compuesto activo que se desea liberar.²⁸

3. *Nanotubos*

Por otra parte, los nanotubos son estructuras en forma de cilindros conformada por átomos, por lo general de carbono. Las principales aplicaciones de los nanotubos de carbono en el área farmacéutica y de medicina incluyen: la liberación de fármacos, biomoléculas y genes en las células o en órganos, así mismo puede ser utilizado para la regeneración de tejidos o como sistemas de diagnóstico¹³. Para la liberación de compuestos activos, estos se unen a la superficie de los nanotubos o dentro de la estructura, el conjugado se introduce al cuerpo ya sea por vía oral o intravenosa y, por medio de un magneto externo, es guiado al órgano donde se desea que se libere el compuesto.¹⁷

4. *Dendrímeros*

Otro tipo de nanoformulación puede presentarse como dendrímero, los cuales consisten en polímeros sintéticos hiperamificados que rodean un núcleo bien definido. Los dendrímeros imitan las propiedades de las micelas, liposomas y algunas biomoléculas. Tienen la capacidad de acarrear distintos compuestos activos con conjugaciones covalentes o mediante encapsulamiento en el núcleo. Se usan como portadores de fármacos e inmunógenos.²⁷ A pesar de que los dendrímeros tienen un gran potencial como transportadores de compuestos a sitios específicos, es necesario mejorar los aspectos de biocompatibilidad y biodistribución.^{28 y 21}

5. *Nanoemulsiones*

Las nanoemulsiones, son los sistemas más eficientes en la liberación de compuestos activos, en comparación con otros sistemas de liberación transdérmicos. Son dispersiones de dos líquidos no miscibles, estabilizados mediante un surfactante, con tamaños de partícula ente los 10 -100 nm. Dentro de las aplicaciones de las nanoemulsiones en el ámbito de farmacia, se encuentra la liberación de proteínas recombinantes o microorganismos inactivados en la mucosa para producir una respuesta inmune, así como también para mejorar la solubilidad de compuesto lipofílicos, que forman parte de productos farmacéuticos contra distintas enfermedades (Fig. 3).

Nanoemulsiones con tamaños entre los 200-600 nm han demostrado tener efectos antimicrobianos contra patógenos responsables de diversas infecciones. En algunas ocasiones, dichas nanoemulsiones pueden utilizar aceites esenciales con propiedades antimicrobianas, generando efectos más potentes, incluso mejor que algunos antibióticos/antifúngicos con los que se pueden llegar a generar resistencia.³² Algunas de ellas presentan efectos terapéuticos antifúngicos, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, etc.² Ejemplos de nanoformulaciones que se encuentran disponibles en el mercado se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Nanoformulaciones que se encuentran en el mercado.

<i>Nanoformulación</i>	Nombre del producto	Compuesto activo	Indicaciones
<i>Liposoma</i>	AmBisome	Anfotericina B	Infecciones fúngicas
	Epaxal	Virus hepatitis A inactivo	Hepatitis A
	Evacet	Doxorubicin	Tumores solidos
<i>Nanoemulsión</i>	Diprivan	Propofol	Anestésico
	Limethason	Dexametasona	Antiinflamatorio
	Ropion	Fulbiprofen axetil	Dolor agudo
<i>Dendrímeros</i>	VivaGel	SPL7013	Infección HSV,HIV
<i>Nanocápsula polimérica</i>	Abraxane	Paclitaxel	Cáncer de mama
	Ritalin LA	Clorhidrato de metilfenidato	Desorden hiperactividad

A pesar de las ventajas de solubilidad y biodisponibilidad en el uso de nanopartículas, se ha observado que sus propiedades farmacocinéticas a menudo difieren de su composición convencional. El cambio en el tamaño de partícula, la carga, y las características

superficiales, modifican su eficacia y seguridad (tabla 2). Estas propiedades pueden desencadenar una respuesta inmune, o favorecer la eliminación de la partícula. Por lo tanto, las investigaciones que involucran nanotecnología se deben enfocar a evaluar la incorporación y liberación de principios activos, caracterizar la partícula, conocer la estabilidad de la formulación y su vida media, evaluar su biocompatibilidad, biodistribución, blanco farmacológico y su toxicidad ³.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> • El fármaco puede ser liberado en distintas partes del cuerpo dependiendo del tamaño de partícula • Mejora la solubilidad en agua de ciertos fármacos • Pueden ser direccionados • Mejoran la distribución del fármaco • Pueden penetrar fácilmente a diferentes tipos de tejidos (tumores) 	<ul style="list-style-type: none"> • Presentan dificultades en su manejo, almacenamiento y administración ya que son susceptibles a la agregación • Riesgo de que penetren zonas donde pudiera haber consecuencias dañinas

Tabla 2. Ventajas y limitaciones de las nanoformulaciones. ¹⁸

Efectos vs seguridad de las nanopartículas en sistemas biológicos

Cada uno de los diferentes tipos de nanopartículas presenta características físicas y químicas que se relacionan directamente con su eficacia y función. Es necesario conocer a detalle las propiedades de cada una para determinar su uso en el mercado. Los principales aspectos a estudiar en las nanopartículas deben incluir: 1) estructura y morfología, 2) composición química, 3) superficie, 4) tamaño de partícula, 5) distribución de tamaño, 6) carga superficial y 7) coeficiente de distribución (Fig. 4)¹⁶.

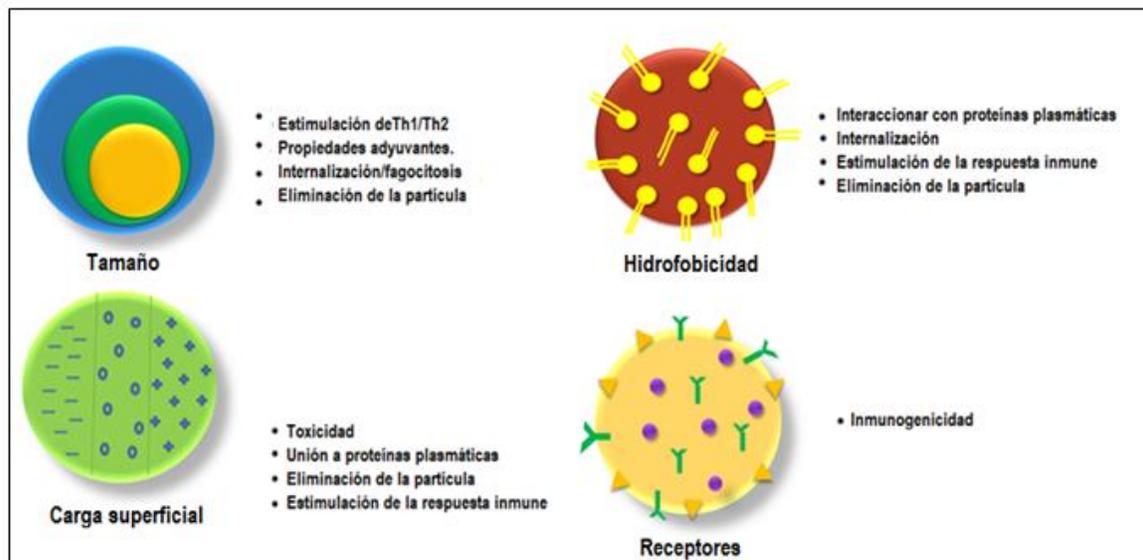


Fig. 4 Principales propiedades de la nanopartícula y sus efectos. Editado de Dobrovolskaia, *et al.*, 2007⁸

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, se han asociado a su seguridad y efecto en los sistemas biológicos.¹⁹ En el caso de los mecanismos físicos, el tamaño de las NPs es comparable con las proteínas y, por lo tanto, ingresan al sistema biológico con gran facilidad. Dicha capacidad puede inducir efectos citotóxicos, genotóxicos o neurotoxicidad³. Un ejemplo de ello, es que las partículas de oro de 1,4 nm inhiben el crecimiento de fibroblastos, células epiteliales, macrófagos y células de melanoma, pero no así las partículas de 15 nm. Las nanopartículas, han demostrado capacidad para inducir la ruptura de la membrana celular, ya sea por la formación de agujeros o por erosión de la misma.⁹ También pueden provocar alteraciones en la actividad de la membrana, regular las vías de señalización intracelular, interrumpir el citoesqueleto y formar agregados de proteínas intranucleares²⁶ (Fig. 5).

Se ha descubierto que algunas propiedades fisicoquímicas generan toxicidad, ya que promueven la generación de especies reactivas de oxígeno y la formación de radicales libres, eso a su vez incrementa el estrés oxidativo que desencadena el proceso de inflamación, altera el ciclo celular y provoca daño en el ácido desoxirribonucleico.⁶ En el caso de mecanismos químicos, las nanopartículas tienen un área superficial para someterse a reacciones, manifestando así una mayor reactividad química en comparación con la misma masa de materiales convencionales.

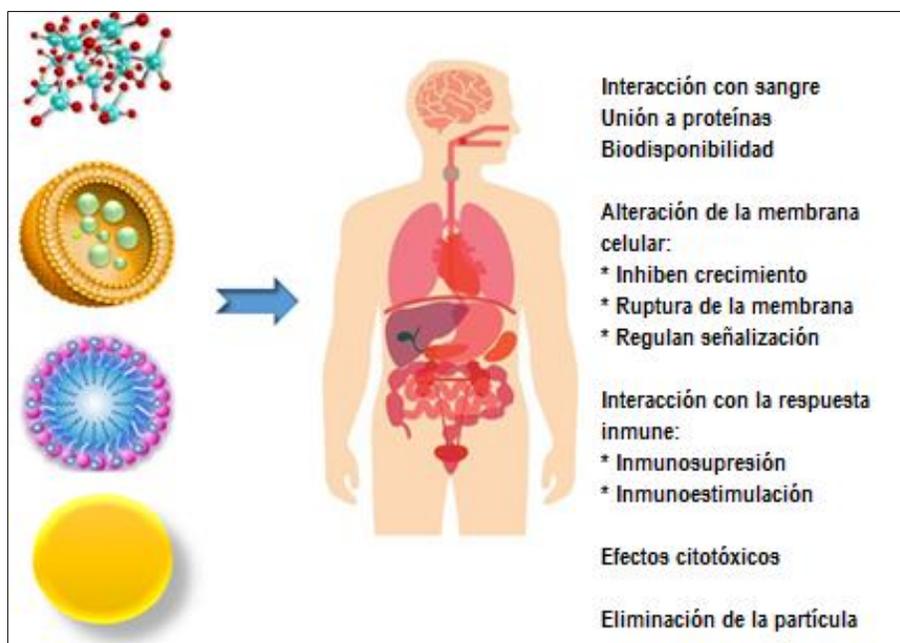


Fig. 5 Efecto de las nanopartículas en el cuerpo humano. Editado de Dobrovolskaia *et al.*, 2007⁹

Los ejemplos anteriores demuestran que las propiedades de los fármacos a nanoescala, podrían afectar fuertemente su eficacia, seguridad y propiedades farmacocinéticas. Por lo anterior, es muy importante contar con una guía reguladora, que permita normalizar las fases de desarrollo de las nanomedicinas.³⁶

Regulación del uso de nanopartículas.

La principal limitación en el área de implementación y comercialización de productos nanotecnológicos, es la ausencia de regulación sobre los efectos potenciales y adversos, que se generen al exponerse a estos productos.

A nivel mundial, el empleo de nanomateriales, principalmente en el área médica, ha incrementado la necesidad de establecer protocolos que contemplen la caracterización física, biológica y química de las nanopartículas. Hasta el momento, no existe una normativa ni legislación internacional específica para la nanomedicina, por lo que aún no se cuenta con estándares comparativos durante las diferentes etapas del desarrollo. Sin embargo, varias

agencias gubernamentales y empresas, han logrado establecer normativas útiles para la seguridad en el uso y creación de nanopartículas.

La administración de drogas y alimentos (FDA) de los Estados Unidos, generó una guía en la cual se especifican los análisis químicos, los procesos de fabricación, ensayos de farmacocinética y biodisponibilidad, que se deben realizar a las nanopartículas, principalmente en liposomas. En este documento se determinó que las NP tienen propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las mostradas por sus contrapartes de mayor tamaño; y que estas diferencias incluyen alteraciones en las propiedades magnéticas, eléctricas y ópticas, una mayor integridad estructural o alteraciones en sus propiedades químicas y de actividad biológica.¹⁰ Por otro lado, las nanopartículas como los dendrímeros, micelas, nanoemulsiones, nanocristales y coloides metálicos, continúan sin una orientación regulatoria apropiada que ayude a su desarrollo. Para realizar el estudio de las NPs, la FDA estipuló que un producto será regulado bajo los términos de nanopartícula si cumple con los siguientes dos apartados: 1) El producto diseñado debe tener al menos una de sus dimensiones en el rango de nanoescala (1-100 nm) y (2) El material o producto final presenta propiedades químicas o efectos biológicos atribuibles a su dimensión, e incluso si estas dimensiones caen fuera del rango de nanoescala, hasta 1 μm (1000 nm).¹⁶ Además, determina que los productos farmacéuticos que contienen nanomateriales deben cumplir los mismos estándares de calidad, seguridad y eficacia que los productos farmacéuticos que no contienen nanomateriales. Actualmente, la FDA continúa estudiando las propiedades de los nanomateriales y su efecto en los controles, estándares, y especificaciones en la manufactura de estos productos.

Por otro lado, el 2013, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) implementó cuatro proyectos para documentar y generar información, que permita la obtención detallada de propiedades fisicoquímicas para los productos como micelas y liposomas. Además, la Comisión Europea, generó un plan de farmacovigilancia, donde determinó el seguimiento de todo material cuyas longitudes abarquen un tamaño de 1-100 nm. En abril de 2013, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) sobre Nanotecnología (WPN) inició un proyecto denominado Marco Regulatorio para la

Nanotecnología en Alimentos y Productos Médicos. Este proyecto proporcionó una visión general de algunos de los marcos regulatorios aplicables a los alimentos y productos médicos, que contengan o utilicen nanomateriales.¹⁵

En el contexto latinoamericano, México ocupa el segundo lugar después de Brasil, en el desarrollo de las nanotecnologías.¹¹ Debido a esto, se ha incorporado a las iniciativas internacionales concernientes a la seguridad sobre el uso de nanopartículas. México creó el Consejo de Alto Nivel para la Cooperación Regulatoria en el que, junto a Estados Unidos, tiene la finalidad de desarrollar guías para establecer normas relacionadas al uso de NPs. Posteriormente, se creó el Comité Técnico Nacional de Normalización de las Nanotecnologías (CTNNN), en el cual participan organizaciones del sector industrial, salud, académico y gobiernos entre otras, con el propósito de iniciar la generación de normas que contemplen estrategias de regulación en la producción y uso de nanomateriales en el país. Recientemente en México, se crearon dos proyectos con estándares internacionales, donde se hace referencia a la actividad biológica y el riesgo, relacionados con la exposición a las nanopartículas. Con estas normas se da comienzo a la regulación del uso de nanopartículas en el área biomédica del país.³⁷

Ensayos prebiológicos para el uso de las NPs

Históricamente los ensayos *in vitro* han sido utilizados como una herramienta útil que nos proporciona información sobre el comportamiento de diversas moléculas o sustancias, principalmente en cuanto a su eficacia, su eficiencia y su seguridad.

Como pruebas de su uso, se sabe que los ensayos *in vitro*, son la base para estudiar la funcionalidad y viabilidad ante diferentes agentes xenobioticos. Entre los sistemas mayormente estudiados se encuentran: células, tejidos, órganos, bacterias, microalgas u hongos, fracciones subcelulares entre otras diversas muestras biológicas o inclusive materiales no biológicos.²⁶

Los ensayos *in vitro* también pueden ser útiles para evaluar rutas mecánicas específicas, tales como potencial reactivo e inflamatorio y captación celular de nanomateriales.²⁰

Estos ensayos, tomaron importancia como métodos alternativos de análisis a finales de los años sesentas, tanto en Estados Unidos mediante la UAA (The United Action for Animals),

como en Inglaterra mediante la FRAME (Fun for the Replacement of Animal in Medical Experiments), se promovió la disminución del uso de animales o ensayos *in vivo* impulsando la experimentación *in vitro*, aunque se tiene claro que no suplantán en su totalidad a los ensayos *in vivo*, pero sí contribuyen en gran medida con información de gran utilidad y el área nanotecnológica no es la excepción.²⁶

La aplicación extensiva de ensayos *in vitro*, permite dilucidar la toxicidad de productos nanotecnológicos.³⁰ A continuación se presentan algunos de los análisis más importantes que se emplean para determinar las propiedades fisicoquímicas de una nanopartícula:

Caracterización Pre-biológica de Nanopartículas: Proporcionan control de calidad de los materiales en sus estados físicos, químicos y determina su estabilidad.

1.- Características químicas de las superficies, el recubrimiento de la superficie, y la porosidad.¹⁸

- Carga superficial.
- Pureza

2.- Caracterización toxicológica de superficies. Es necesario determinar contaminantes en la superficie de la partícula, estos contaminantes se pueden obtener de la fuente de producción de la partícula, generando respuestas tóxicas e inflamatorias en un organismo.²⁵

- Contaminación de superficie
- Contaminación por endotoxinas como LPS
- Otros contaminantes, hidrocarburos poliaromáticos.¹⁸

3.- Tamaño de partícula y agregación. Los nanomateriales deben tener una dimensión por debajo de 100nm para conservar sus propiedades. Por otro lado, la elevada dispersión intrínseca y la energía superficial, generan agregación de partículas en los medios biológicos.²³

- Microscopía electrónica. Determina morfología, distribución de tamaño y agregación.
- Espectroscopia óptica. Determinación de cargas.
- Dispersión dinámica de la luz.¹⁸

1. Pruebas biológicas *in vitro*: Células

Los ensayos *in vitro* con células, permiten definir la citotoxicidad, las interacciones, la influencia y la compatibilidad del producto nanotecnológico con la célula.²⁶ En estos

ensayos, se emplea comúnmente líneas celulares comerciales o cultivos primarios, se pueden realizar en determinados medios fisiológicos con la finalidad de generar un ambiente similar al de un organismo vivo. La importancia de estos ensayos es poder conocer el mecanismo que desempeña la NP dentro de una célula.³³ A continuación se mencionan los efectos de las interacciones nanopartícula-célula de mayor interés:

- Mecanismo de captación celular
- Activación de vías de señalización
- Respuesta inmune
- Producción de especies reactivas de oxígeno
- Mecanismo de eliminación de la nanopartícula.
- Regulación genética
- Toxicidad observable
- Necrosis y apoptosis

Las metodologías más comunes para determinar la citotoxicidad *in vitro* sobre cultivos celulares, son los ensayos de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y por último el de reducción del bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico (MTT) entre otros³⁰, en la Fig. 6 se muestra un ejemplo de pruebas de nanotoxicidad. Además de las pruebas que evalúan la citotoxicidad, se incluyen ensayos para determinar daño en el ADN y la secreción de marcadores pro-inflamatorios e inmunes, lo que indica un alto potencial de generar problemas de salud a largo plazo.

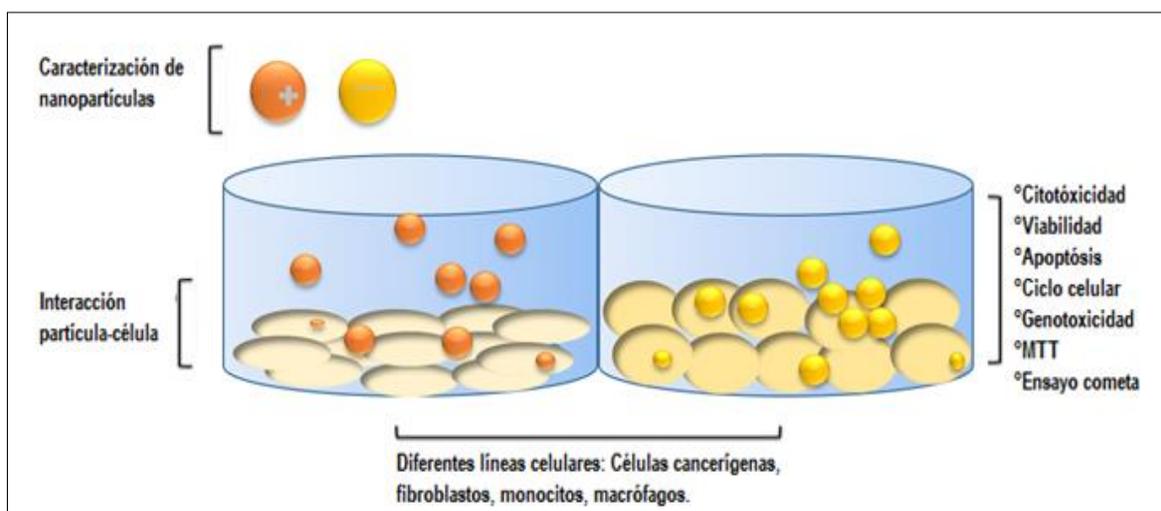


Fig. 6 Esquema general de ensayos de nanotoxicidad. Editado de Franchi *et al.*, 2015¹²

2. *Ejemplos de efectos de nanotoxicidad en ensayos in vitro*

Nanopartículas de metales como: plata, molibdeno y aluminio, se han evaluado y mostraron que en células de espermatogonia de ratón C18-4 generan nanotoxicidad. Los resultados muestran que la toxicidad es dependiente de la concentración para todos los tipos de partículas mencionados; sin embargo, las nanopartículas de plata mostraron ser más tóxicas, mientras que el trióxido de molibdeno (MoO₃) presentó menor efecto.⁵

Hallazgos del efecto de NPs de óxido de zinc (ZnO) mostrado sobre células de adenocarcinoma humano pulmonar, LTEP-a-2, mostraron que las NPs inhiben la proliferación en LTEP-a-2, además inducen apoptosis, con estos estudios se concluyó que las NPS ejercen un efecto citotóxico en células de pulmón.³⁵

Varios de los ensayos para determinar los efectos de NPs sobre líneas celulares se han realizado en cultivos celulares tradicionales en dos dimensiones (2D), que cuentan con las desventajas tales como: el cambio de forma de las células, la función celular, la respuesta celular y la pérdida del contacto célula-célula. Es por ello que investigadores en la búsqueda de mimetizar las condiciones de los sistemas vivos, han generado cultivos celulares 3D en esferoides. Por ejemplo, en las líneas celulares A549 y NIH-3T3 se investigó el efecto de NPs de ZnO. Mostrando que el cultivo celular en 3D A459 presenta una mayor sensibilidad a la citotoxicidad en comparación al cultivo en 2D. En las células NIH-3T3 se observó el mismo efecto citotóxico tanto en cultivos celulares de 2D como en 3D. Estos resultados muestran la importancia de evaluación de los efectos de las NPs en cultivos celulares 3D para los ensayos de seguridad, los que además tienen la ventaja de representar en mayor proporción las condiciones fisiológicas más que los cultivos 2D.³¹

3. *Efecto agudo versus efecto crónico de las NPs*

Otro de los cuestionamientos en cuanto a las pruebas de citotoxicidad sobre los efectos en las líneas celulares con NPs son los tiempos de exposición a las mismas. Pues existe un conflicto con la correlación de los ensayos de citotoxicidad aguda, evaluada a 24 horas de exposición *in vitro* y los resultados obtenidos en modelos animales *in vivo* que evalúa los efectos crónicos; esto lleva la necesidad crítica de un nuevo enfoque para hacer posible y fiable el

evaluar los efectos de las NPs. M. Hussain, comentó que numerosos estudios de efectos toxicológicos de los nanomateriales, suelen abordarse empleando una sola exposición a dosis altas (efecto toxicológico agudo) las que son irrelevantes para considerarlas en una exposición en humanos de forma realista. Puesto que, el efecto agudo *in vitro* muestra muy baja correlación con estudios *in vivo* de NPs, junto con el reconocimiento de que las características únicas que distinguen a los nanomateriales varían en función del tiempo, Hussain y su equipo, proponen el desarrollo de un modelo que permita la evaluación del comportamiento del NPs durante un período de al menos 3 meses y que se pueda llevar a cabo en modelos *in vitro*.

4. *Efectos biológicos de utilidad probados en ensayos in vitro*

El potencial de uso de las NPs como agentes que inhiben el crecimiento de hongos y microorganismos se ha dilucidado a través de diversas experimentaciones, existe un estudio prometedor del 2015, que mostró el efecto antimicrobiano de la exposición de nanopartículas de ZnO contra *L. monocytogenes* and *B. cereus* en leche, este efecto le permitirían ser utilizado como un método efectivo para el control de contaminantes microbianos en comida, extendiendo así la vida útil de la leche en anaquel y favoreciendo la calidad de las misma durante la cadena productiva.²² Este ejemplo muestra el potencial de la adición de NPs en alimentos, sin embargo debido a otros resultados mostrados de efectos citotóxicos *in vitro* en líneas celulares, no se puede concluir acerca de la inocuidad de los mismos.

Aun lo anterior, en el ámbito del área de alimentos algunas NPs son utilizadas, mediante la combinación de diferentes plásticos y nanopartículas, como el grafeno u óxido de grafeno (OG), los que han sido propuestos para el desarrollo de envases inteligentes para alimentos, los que son prometedores por haber mostrado un buen impacto en cuanto a preservación (Fig. 7).

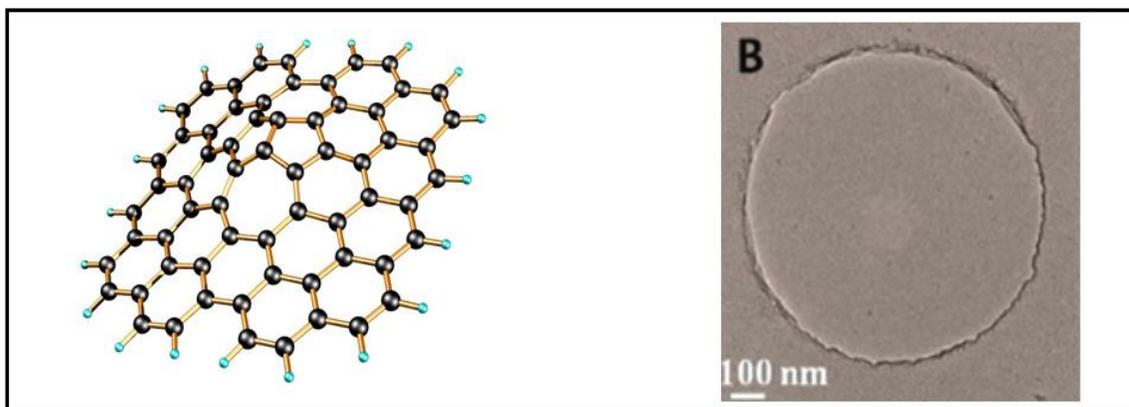


Fig. 7 A. Estructuración del grafeno y el B. grafeno en conformación de obleas

Sin embargo, a la fecha aún existen la preocupación de los consumidores y la comunidad científica sobre la toxicidad potencial y biocompatibilidad de los mismos. Usando también OG en un estudio, se investigaron las propiedades antibacterianas contra bacterias intestinales humanas, pero también la citotoxicidad *in vitro* sobre la línea celular Caco-2 derivada de un carcinoma de colon. La microscopía electrónica se utilizó para investigar la morfología de OG y la interacción entre éste con las células Caco-2. Se emplearon diferentes concentraciones (de 10 a 500 g/mL), que no mostraron toxicidad contra las bacterias seleccionadas, pero si se observó una acción citotóxica moderada en células Caco-2 después de 24 horas de exposición. Este estudio sugiere que OG es biocompatible y tiene un potencial para ser utilizado en la agricultura y en los alimentos, pero a su vez, indica que se necesitan más estudios para explotar sus aplicaciones potenciales.²⁴

5. Ejemplo de uso de nanoemulsiones contra *C. albicans*

Tres emulsiones con distintas características fisicoquímicas fueron desarrolladas a base aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), su efecto inhibitorio fue evaluado contra el patógeno oportunista *C. albicans*. Tres diferentes agentes emulsionantes fueron empleados: Goma arábiga (GA), polisorbato 80 (80) y lecitina hidroxilada (LecH). El ensayo de inhibición fue evaluado mediante la técnica de difusión en agar, para el cual se sembró por extensión en cajas petri con agar YPD, un cultivo de *C. albicans* de una densidad óptica de 0.3. Inmediatamente, se colocó un disco de papel filtro previamente sumergido en la emulsión a evaluar. Como control, se utilizó la misma formulación de las emulsiones, donde

en lugar de utilizar el bioactivo, se utilizó un aceite mineral para la fase oleosa. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, fue posible observar que a pesar de utilizar la misma cantidad de bioactivo, se pueden obtener distintos grados de inhibición con base en el emulsionante utilizado y por ende con las características fisicoquímicas de cada emulsión (Fig. 8). En este experimento, se pudo observar que las tres emulsiones presentaron un efecto inhibitorio, siendo la más eficiente la emulsión con GA.

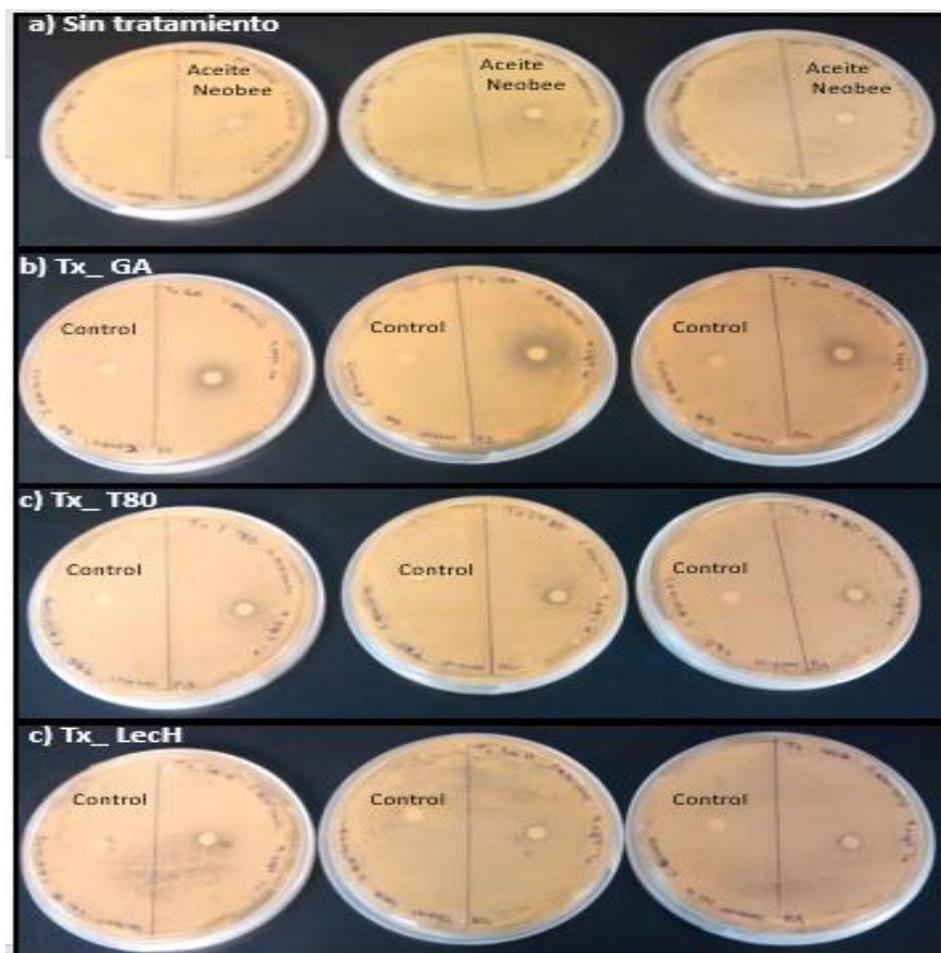


Fig. 8 Halos de inhibición de *Candida albicans* con las tres emulsiones.

Conclusiones

Las distintas nanoformulaciones han abierto la posibilidad de obtener fármacos más eficaces, y a su vez han permitido cambiar el esquema de administración de fármacos y tratamiento de enfermedades. Por lo tanto, es necesario establecer regulaciones de NPs en función de parámetros éticos. Actualmente la Unión Europea y Estados Unidos, han establecido comités

y legislaciones de regulación en el uso de nanopartículas en productos médicos, no obstante, aún no existe una legislación que permita y regule su uso.

Bibliografía

1. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* 8, 102 (2013).
2. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine* 1, 10–29 (2016).
3. Bailon-Moscoso, N. & Romero-Benavides, J. C. Genotoxicidad de los nanomateriales, grandes discrepancias y desafíos. *Revista de Toxicología* 33, (2016).
4. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* 975 (2015). doi:10.2147/IJN.S68861
5. Braydich-Stolle, L. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* 88, 412–419 (2005).
6. Clinton Jones and David W. Grainger. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev.* 6, 2166–2171 (2009).
7. Darling-Hammond, L. Teacher Quality and Student Achievement. *education policy analysis archives* 8, 1 (2000).
8. D’Mello, S. R. *et al.* The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology* 12, 523–529 (2017). doi:10.1038/nnano.2017.67
9. Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* 2, 469–478 (2007).
10. D’Souza, S. A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics* 2014, 1–12 (2014).
11. Foladori, G. POLÍTICAS PÚBLICAS EN NANOTECNOLOGÍA EN AMÉRICA LATINA. *Problemas del Desarrollo* 47, 59–81 (2016).
12. Franchi, L. P. *et al.* Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast. *Toxicology in Vitro* 29, 1319–1331 (2015).
13. Gálvez, P., Ruiz, A. & Clares, B. El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: terapia celular, génica y nanomedicina. *Medicina Clínica* 137, 645–649 (2011).

14. Gómez-gaete, C. Nanopartículas Poliméricas: Tecnología y Aplicaciones Farmacéuticas. *Rev. Farmacol. Chile* 7, 7–16 (2014)
15. Grieger, K. D., Baun, A. & Owen, R. Redefining risk research priorities for nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 383–392 (2010).
16. Guo, J.-W. *et al.* Development of Taiwan’s strategies for regulating nanotechnology-based pharmaceuticals harmonized with international considerations. *International Journal of Nanomedicine* 4773 (2014). doi:10.2147/IJN.S68134
17. He, H. *et al.* Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *BioMed Research International* 2013, 1–12 (2013).
18. Hofmann-Amttenbrink, M., Grainger, D. W. & Hofmann, H. Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11, 1689–1694 (2015).
19. Jeevanandam, J., Chan, Y. S. & Danquah, M. K. Nano-formulations of drugs: Recent developments, impact and challenges. *Biochimie* 128–129, 99–112 (2016).
20. Jones, C. F. & Grainger, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 438–456 (2009).
21. Mc Carthy, D. J., Malhotra, M., O’Mahony, A. M., Cryan, J. F. & O’Driscoll, C. M. Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance. *Pharmaceutical Research* 32, 1161–1185 (2015).
22. Mirhosseini M.; Firouzabadi B.; Iran Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in Milk by Zinc Oxide Nanoparticles. 2015 *J. Pathol.* Spring;10(2):97-104.
23. Mohanraj, V., Chen, Y. & Chen, M. &. Nanoparticles – A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* *Trop J Pharm Res* 5, 561–573 (2006).
24. Nguyen, T.H.D., Lin, M., and Mustapha, A. (2015). Toxicity of Graphene Oxide on Intestinal Bacteria and Caco-2 Cells. *Journal of Food Protection* 78, 996–1002.
25. Pal, A. K., Bello, D., Cohen, J. & Demokritou, P. Implications of *in vitro* dosimetry on toxicological ranking of low aspect ratio engineered nanomaterials. *Nanotoxicology* 9, 871–885 (2015).
26. Park, M. V., Lankveld, D. P., van Loveren, H. & de Jong, W. H. The status of *in vitro*

- toxicity studies in the risk assessment of nanomaterials. *Nanomedicine* 4, 669–685 (2009).
27. Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. & Saraf, S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1790–1798 (2006).
 28. Rashidi, L., & Khosravi-Darani, K. (2011). The Applications of Nanotechnology in Food p
 29. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chemical Reviews* 112, 5818–5878 (2012).
 30. Repetto G., & Repetto M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. 3er ed. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición; pp. 303-305 (2002).
 31. Sambale; Lavrentieva; Stahl; Blume; Stiesch; Kasper; Bahnemann; Scheper. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *J Biotechnol.* 205:120-9.
 32. Shah, P., Bhalodia, D. & Shelat, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy* 1, 24 (2010).
 33. Shishatskaya, E. I. *et al.* Short-term culture of monocytes as an in vitro evaluation system for bionanomaterials designated for medical use. *Food and Chemical Toxicology* 96, 302–308 (2016).
 34. Tiruwa, R. A review on nanoparticles – preparation and evaluation parameters. *Indian J. Pharm. Biol. Res.* 3, 27–31 (2015).
 35. Wang C.; Lin M.; Hu X. ZnO nanoparticles induced cytotoxicity on human pulmonary adenocarcinoma cell line LTEP-a-2. 2015 Process Safety and Environmental Protection. Volume 93, Pages 265–273. (acceso Octubre 01 2015).
 36. Wilson, R.F. (2006). Nanotechnology: the challenge of regulating known unknowns. *J Law Med Ethics* 34, 704–713.
 37. Zayago Lau, E. & Foladori, G. ¿Se estudian los riesgos de los nanomateriales en México? *Temas Cienc. y Tecnol.* 19, 17–27 (2015).

3. NANOMATERIALES: INMUNIDAD Y SISTEMA GASTROINTESTINAL

Gerardo Arevillaga Boni

Zaira Yunuen García Carvajal

Guadalajara, CIATEJ A.C.

Introducción

Durante los últimos quince años, el gobierno de Estados Unidos ha invertido más de \$ 20 mil millones de dólares en investigación en Nanotecnología y además, desarrolló la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI). En una revisión reciente de la NNI por el Consejo Presidencial de Asesores en Ciencia y Tecnología (PCAST) se concluyó que el campo de la nanotecnología está en un punto de transición crítico y ha entrado en su segunda época, que llaman NNI 2.0. Esta nueva generación tecnológica verá la evolución de los componentes a nanoescala con nano-sistemas interdisciplinarios. Además, el movimiento a partir de investigación básica y aplicada proporcionará los cimientos y enfoques necesarios para garantizar la rápida comercialización de la nanotecnología [1].

Según algunas estimaciones privadas, la nanotecnología producirá un nuevo y renovado impulso en el desarrollo tecnológico: sólo en China, existen 800 empresas probando suerte en un mercado de unos 30,000 millones de dólares de facturación en el 2012 y que promete representar una facturación de hasta 144,900 millones de dólares en el 2015 [2]. Entre las empresas relacionadas con la nanotecnología, podemos encontrar a algunas firmas con desarrollos muy importantes que no representan gran parte de su facturación por el tamaño de las empresas como Dupont (DD), General Electric (GE) que cuenta con una de las organizaciones de investigación industrial más diversificadas del mundo -GE Global Research- con innovaciones en áreas como medicina molecular, energías alternativas, nanotecnología, propulsión avanzada y tecnologías de seguridad, o incluso 3M (MMM) que fabrica productos industriales en diferentes áreas (artículos de oficinas, comunicaciones, etc.) y que se encuentra enfocada en investigaciones para mejorar el rendimiento de sus productos

con aplicaciones de nanotecnología. Hewlett-Packard (HP), NEC y L'Oreal también están invirtiendo en nanotecnología [2].

Está claro que se espera que las aplicaciones de la nanotecnología traigan una serie de beneficios para el sector de los alimentos, con el objetivo de ofrecer una mejor calidad y conservación. Sin embargo, un número creciente de estudios indican que la exposición a ciertos nanomateriales tiene un potencial a conducir complicaciones de salud y que existe una necesidad de nuevas investigaciones con el fin de desentrañar los riesgos para la salud (desde el punto de vista biológico) como resultado del consumo de nanoalimentos [3].

En el Foro de Alimentos de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de América (Food Forum. Nanotechnology in Food Products: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009), se destacaron varias aplicaciones potenciales adicionales de la nanotecnología en el campo de la liberación con aplicaciones en los alimentos:

- a) Sistemas que mejoren la entrega de micronutrientes y componentes bioactivos de los alimentos. En este sentido, se identificaron cuatro grandes retos asociados con la entrega de nutrientes: (1) la estabilidad (es decir, contra el calor, el pH y la oxidación durante el procesamiento de alimentos), (2) el sabor y el color (evitar sabores desagradables o colores), (3) seguridad, y (4) la biodisponibilidad. La nanotecnología podría utilizarse para abordar cada uno de estos. Por ejemplo, mientras que las personas están dispuestas a soportar sabores horribles en los medicamentos, en los alimentos no pasa lo mismo. Por otra parte, los consumidores son cada vez más exigentes y con ganas de alimentos más apetecibles que en el pasado.
- b) Sistemas que liberen de manera controlada los compuestos bioactivos (como los ácidos grasos omega-3). Así como en la medicina, donde el objetivo es eliminar el potencial de sub o sobre-dosificación, el principal objetivo de la liberación controlada de compuestos bioactivos es evitar acciones cíclicas y los posibles efectos secundarios. Esto tiene importantes aplicaciones para los alimentos destinados a las personas con diabetes, por ejemplo, en la que sería deseable mantener un estado estacionario de la liberación de glucosa [4].

En nuestro país no se cuenta con un plan estratégico para el desarrollo de la nanotecnología [5]. Además, el concepto de “nanotecnología” aún no es muy conocido en la sociedad mexicana. Nueve entidades federativas, con alrededor de 67 empresas, realizan proyectos de nanotecnología en una alianza con instituciones de educación superior, gobiernos estatales e instituciones federales, en sectores como la biotecnología, salud, construcción, acero, automotriz y plástico. En el Foro Nano Monterrey 2011 se comentó que las entidades con mayor actividad en nanotecnología son Nuevo León, Estado de México, Chihuahua, Guanajuato, San Luis Potosí, Puebla y Yucatán. También se comentó que hasta noviembre de 2011, CONACYT había apoyado más de 128 proyectos nano en todo el país. Además, se dijo que las empresas también han incrementado su participación en esa rama, ya que en el 2008 existían alrededor de 94 proyectos y para 2011, 45 proyectos recibieron recursos por alrededor de 25 millones de dólares [6].

Numerosas aplicaciones relacionadas con la alimentación de nanomateriales tienen el potencial de ser ingeridos directa o indirectamente, creando un tema de interés actual del estudio de los posibles efectos adversos para la salud de los nanomateriales en el tracto gastrointestinal (GIT). Muchos productos que están presentes en los alimentos están en el intervalo de tamaño nanométrico, y la selectiva absorción de nutrientes con dimensiones a nanoescala por el GIT es un proceso fisiológico normal [7].

Toda la cascada de eventos que se producen después de la ingestión, -incluyendo la absorción, distribución, metabolismo y excreción /eliminación (ADME),- que se producen después de la ingestión determina la exposición interna y la toxicidad de los nanoalimentos. El panorama se complica debido a las interacciones de los nanoalimentos con la matriz circundante (fluidos gastrointestinales, matriz alimentaria, la microflora) y los efectos inesperados que resultan de esto [3] (Fig. 1).

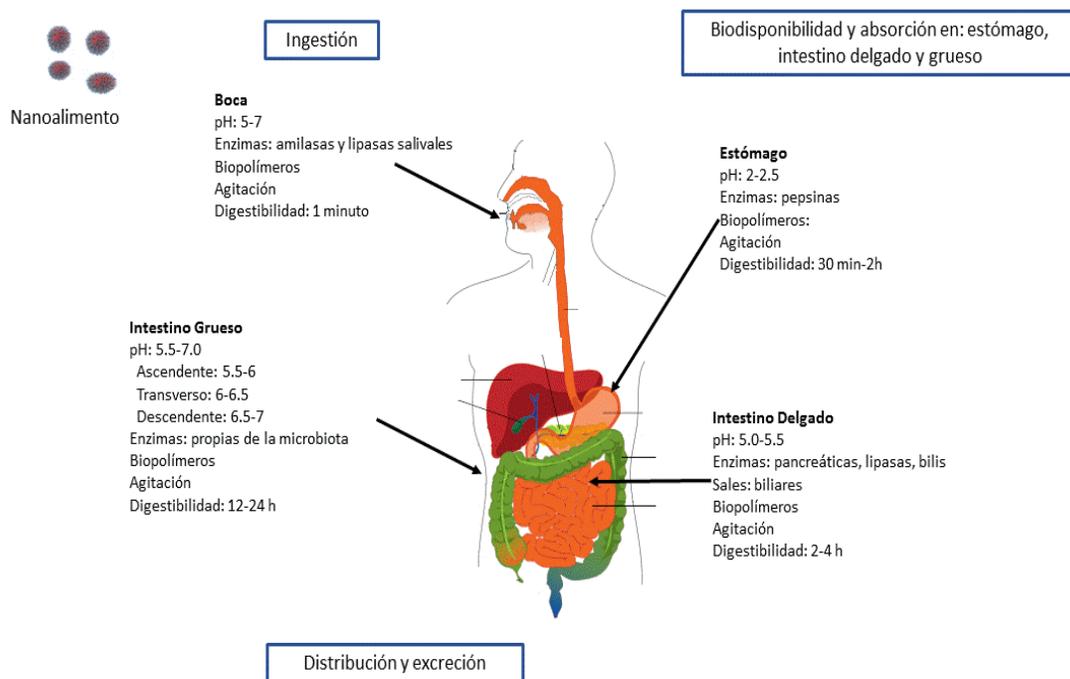


Fig. 1 Diagrama esquemático de las condiciones fisiológicas y fisicoquímicas en las diferentes regiones del tracto gastrointestinal humano (GIT) a las que están expuestos los nanoalimentos.

Desde este punto de vista, se abre un abanico de posibilidades de investigaciones que den como resultado publicaciones científicas, innovaciones, soluciones prácticas a problemas de salud [8]. La evaluación de la seguridad de los nanoalimentos dependerá de sus propiedades fisicoquímicas y algunos de los parámetros críticos incluyen biopersistencia y digestibilidad. Durante su paso por el tracto GI, los nanoalimentos experimentan cambios en las condiciones ambientales (temperatura, pH, fuerza iónica, actividad enzimática, y las fuerzas mecánicas) que pueden alterar considerablemente sus propiedades estructurales y fisicoquímicas. Por lo tanto, es importante reconocer que las propiedades de los nanoproductos ingeridos pueden cambiar considerablemente antes que alcancen el sitio donde se produce la absorción [9, 10]. Aunado a esto, algunas macromoléculas funcionalizadas y formuladas en forma “nanométrica” pueden mejorar la nutrición, potenciando la absorción y permeabilidad de nutrientes y fármacos en el sistema GI [11]. Más aún, la biodisponibilidad oral de muchos

agentes bioactivos lipófilos (productos farmacéuticos y nutracéuticos) es limitado debido a varios procesos fisicoquímicos y fisiológicos: una pobre liberación de los nutrientes procedentes de las matrices alimenticias; baja solubilidad en los fluidos gastrointestinales; metabolismo o transformación química dentro de la vía gastrointestinal; baja permeabilidad del epitelio. La biodisponibilidad de estos agentes se puede mejorar al diseñar matrices alimenticias inteligentes: que controlen la liberación, la solubilización, mejora del transporte, el metabolismo, y la absorción dentro del tracto gastrointestinal. En este sentido, el impacto que tiene la composición de los alimentos (excipientes, nutrientes, etc.) en su biodisponibilidad oral pudieran o no mejorarla [12].

Como hemos dicho anteriormente, el tracto GI desempeña un doble papel en la fisiología humana: por un lado, la de digestión y absorción de nutrientes y por otro lado, mantiene la homeostasis inmune, es decir, protege a el cuerpo de microbios potencialmente nocivos, induciendo respuestas tolerogénicas a alimentos inocuos, comensales y autógenos. En este sentido, los materiales nanoestructurados exhiben diferentes mecanismos de entrada en una célula: en vez de pasar directamente a través de una pared celular, pueden estar endo o fagocitados activamente. Las numerosas propiedades fisicoquímicas y biológicas de las nanopartículas (no sólo el tamaño, la forma y el material) podrían modular la respuesta inmunitaria celular individual, que en este punto representa en gran medida una "caja negra" en los tejidos de la mucosa. El establecimiento de ensayos inmunotoxicológicos in vitro estandarizados y significativos para los nanomateriales es un desafío [13].

A través de la caracterización de la inmunoreactividad de los nanomateriales en sus distintas formas, tamaños, dosis, y rutas de administración, se está gestando un progreso notable en tratamientos localizados en tejidos específicos como el pulmonar o gastrointestinal enfocados a la inmunoregulación en general y vacunación [14].

En el caso de nanopartículas que son ingeridas, éstas pueden traspasar la barrera epitelial, principalmente a través de las células M por el proceso de transocitosis. Cuando la partícula traspasa el epitelio, ésta es captado principalmente por células fagocíticas dendríticas y macrófagos; sin embargo, es posible dirigir el nanomaterial a ciertos tipos y subtipos

celulares, donde pueden actuar en distintos niveles de regulación dependiendo la naturaleza de la formulación, tamaño y la carga utilizada [15].

Muchas de las NP son reconocidas como material extraño y algunas de ellas son eliminadas por el cuerpo; sin embargo, otras no pueden ser eliminadas lo que representan una amenaza para la homeostasis del organismo. Se ha documentado en modelo murino, que NP de poliestireno fluorescentes de 20 y 100 nm de diámetro, inyectadas por vía intravenosa, desaparecen del flujo sanguíneo cuatro horas posteriores a la inyección y se distribuyen de manera sistémica, ubicándose principalmente en hígado, pulmones, bazo, riñones y sistema urinario [16].

El sistema inmunitario (SI) puede dividirse desde el punto de vista funcional en dos niveles:

- Inmunidad innata*: primera línea de defensa frente a agentes infecciosos; la mayoría de los agentes patógenos pueden controlarse antes de que se produzca una infección declarada.
- Inmunidad adaptativa*: entra en acción cuando falla la inmunidad innata. Elabora una respuesta específica para cada agente infeccioso y guarda memoria de él (puede impedir la reinfección).

La *inmunidad innata* se refiere a un tipo de respuesta inespecífica en la que participan estirpes celulares que responden de manera temprana y actúan como primera línea de defensa, como los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células naturales asesinas (NKs; por sus siglas en inglés) entre otras; las cuales expresan receptores que reconocen un amplio rango de patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs o DAMPs respectivamente; por sus siglas en inglés). Entre los receptores mejor caracterizados se encuentran los receptores detectores de ácidos nucleicos tipo NOD (NLRs) y tipo toll (TLRs; por sus siglas en inglés) [17]. Los receptores TLR son glicoproteínas tipo 1 que comparten un dominio TIR a través del cual, reclutan moléculas adaptadoras como MYD88, que dan inicio a cascadas de señalización que promueven la secreción de citosinas, quimosinas e interferón tipo 1. Los TLRs son capaces de reconocer lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, fibrinógeno, material genético e incluso Ni^{2+} que es un activador inorgánico directo descubierto para TLRs [18]. Entre las NP capaces de regular la expresión de TLRs se encuentran el TiO_2 y ZrO_2 , que

incrementan el nivel de mensajero de ácido ribonucleico (mARN) de TLR7 y TLR10 en la línea celular de macrófagos de origen murino U-937, mientras que tiopronina recubierta con NP de plata, inducen la producción de interleucina proinflamatoria 6 (IL-6) asociada a su inducción por TLR3 y TLR9 en la línea de macrófagos murinos Raw264.7 [19]. Los niveles de citosinas proinflamatorias y los tipos de estirpe celular reclutadas al sitio de inflamación, se utilizan como biomarcadores del efecto inmunoregulator de las NP [20].

La *inmunidad adaptativa* entra en acción cuando falla la inmunidad innata. Las células que entran en acción en este tipo de inmunidad son los linfocitos T y B. Una de las funciones de las células presentadoras de antígeno (macrófagos, dendríticas y linfocitos B) consiste en presentar antígenos procesados a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I o II (MHC) a linfocitos T CD8⁺ o T CD4⁺ específicos respectivamente, el linfocito T se activa y monta una respuesta específica [21]; existen distintos tipos de linfocitos T como los ayudadores (CD4⁺), los reguladores (Treg) y citotóxicos (CT), las alteraciones del proceso de coestimulación intercelular entre la célula presentadora y el linfocito repercuten en la respuesta inmune adaptativa y resolución del proceso inflamatorio [22]. Se ha reportado que NP de TiO₂ [23] y poliestireno [24] activan la respuesta de las células T con perfil proinflamatorio Th1 en el que predomina la producción de IL-2, IFN- γ , e IL-3 como resultado de la maduración de células dendríticas [23, 24]. En contraparte se ha observado disminución en capacidad de maduración de células dendríticas por efecto de NP de oro menores a 10nm estimuladas con LPS promoviendo un perfil Th2, donde predominan las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10. En el mismo estudio se observa que las partículas de 50nm inducen un perfil TH17 [25]. Estos estudios permiten visualizar el potencial terapéutico de los nanomateriales en cuanto a la posibilidad de modificación de los perfiles de las respuestas de los linfocitos T. En el caso de los linfocitos B, una vez que encuentran un antígeno que corresponda a su receptor de células B BCR (por sus siglas en inglés) se internaliza y presenta a través de MHC-II a linfocitos CD4⁺, la co-estimulación entre estas dos células induce la maduración y proliferación de células B secretoras de anticuerpo [21], una manera de regular y activar a estas células a través de nanopartículas, es utilizando el fosfato de calcio como nanomaterial recubierto de un antígeno, este es

directamente internalizado y presentado por el linfocito B el cual se activa y se induce la producción de anticuerpo de manera muy eficiente [26].

Una vez que vez que hemos puesto de manifiesto que el tamaño, forma, composición y carga son factores determinantes en la respuesta inmune a nivel sistémico, es lógico suponer que en el tracto GI estos factores también serán determinantes. Las células del sistema inmune del intestino, se localizan en estructuras especializadas llamadas placas de Peyer (PP) [27]. La organización del tejido linfático asociado a la mucosa se separa del lumen a través del epitelio intestinal que posee enterocitos y células M. Estas últimas permiten el tránsito de algunos microorganismos y materia particulada que son captados en las PP, donde actúan células del sistema inmune que se encuentran en el lado basal [27]. Se han probado distintas formulaciones nanoparticuladas, que permiten la optimización de la capacidad de captura y tránsito a través de las células M, como el copolímero biodegradable ácido poli láctico coglicólico y polietilenglicol (PEG) asociados al péptido RGD para el reconocimiento dirigido a la integrina 1 expresada en células M [28] (Fig. 2).

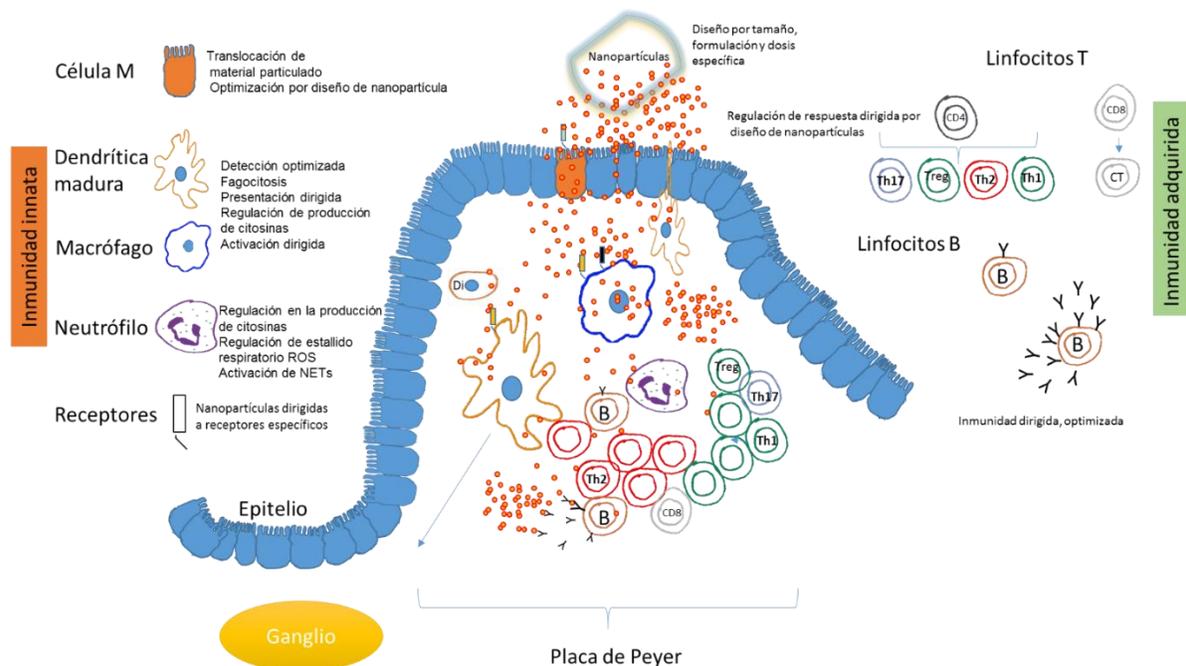


Fig. 2 Esquema representativo de la respuesta inmune en presencia de materiales nanoestructurados.

Interacción de NP, macrófagos, dendríticas y neutrófilos en tejido linfoide intestinal

La fagocitosis de patógenos y materia particulada, llevada a cabo por las células fagocíticas como los macrófagos y células dendríticas, funciona a través de un sistema de receptores especializados en el reconocimiento de motivos conservados característicos que dan inicio al proceso de fagocitosis [17]. Los mecanismos de internalización de las partículas son dependientes de la naturaleza química o biológica de la partícula y del receptor involucrado [29]. En el caso particular de la ingestión de NP por vía oral, una vez que las NP traspasan el epitelio intestinal y entran en contacto con el tejido linfoide asociado a intestino (GALT; por sus siglas en inglés) se asocian a células fagocíticas [30]. Se han utilizado NP compuestas 1,3 β -glucano que se acumulan en cuestión de minutos en células dendríticas CD11c+ situadas en las PP y persisten durante varios días posteriores a su administración en modelos murinos [31]. Algunos de los receptores expresados en la superficie celular son particulares de cada estirpe; por lo que es posible recubrir NP con ligandos específicos que le dan preferencia de interacción con estirpes celulares específicas como las dendríticas DEC205+ [32]. A través de este mecanismo es posible dirigir o regular la respuesta del sistema inmune de manera precisa y localizada. Los macrófagos gastrointestinales (MG) que incluyen a los intestinales y de colon, representan la mayor subpoblación de fagocitos mononucleares en el cuerpo [33], se localizan en el subepitelio de la lámina propia, y son la primera línea de defensa y reconocimiento cuando agentes externos cruzan el epitelio intestinal. Son fundamentales en la protección y reconocimiento contra patógenos y cuerpos extraños como las NP, así como en la regulación de la respuesta inmune hacia la flora intestinal [34]. Una de las particularidades de los MG es que no producen algunos receptores de reconocimiento a inmunoglobulinas (CD14, CD16, CD32, CD80, CD89) [35-39], lipopolisacáridos [33] además de ausencia de estallido respiratorio (ROS y NOS) [36], lo que permite mantener un estado proinflamatorio anérgico, es decir, no producen citosinas proinflamatorias en condiciones de homeostasis [39]. Sin embargo, durante procesos inflamatorios agudos y crónicos salen de su estado anérgico y mantienen un perfil proinflamatorio [34].

Los neutrófilos o polimorfo nucleares (PMN) tienen un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, su función primaria consiste en eliminar microbios que transitan a

través del epitelio e invaden mucosa, defectos en la función de los neutrófilos se asocian a inflamación intestinal similar a la observada durante enfermedad de Crohn [37]. Son células de vida corta que bajo condiciones fisiológicas se mantienen en circulación entre 12 y 24 horas, una vez cumplido este lapso, mueren por apoptosis [39]. Sin embargo, en condiciones de inflamación y una vez activados, los neutrófilos incrementan su periodo de vida y desarrollan propiedades proinflamatorias y microbicidas que incluyen la fagocitosis del microorganismo o partículas extrañas, la producción de citosinas, defensinas, y la liberación de trampas extracelulares neutrofílicas (NETs; por sus siglas en inglés) que están formadas por cromatina, histonas y proteínas granulares, estas redes de cromatina y proteínas con propiedades microbicidas, desempeñan un papel fundamental en la defensa del organismo. Se ha encontrado que las NP de oro y plata inducen NETosis, es decir, la muerte del neutrófilo [38-40]. Es posible prevenir la inflamación vascular a través de NP de albúmina recubiertas con dirigidas a neutrófilos [39].

Conclusión

Debido a las muchas rutas posibles de entrada al tracto gastrointestinal, los mecanismos de defensa de las células inmunes del tracto gastrointestinal son complejas y aún no están muy bien comprendidas. La respuesta inmune del tracto gastrointestinal es el resultado de muchas interacciones complejas que ocurren dentro de él, ya que debe responder correctamente a los antígenos ingeridos, tomando en cuenta la respuesta inflamatoria a bacterias patógenas y no-patógenas, etc. Por lo que poder entender los mecanismos implicados en todo este proceso es todo un reto para los científicos. Promover la investigación en este campo es necesario para comenzar a entender cómo todos los actores de la respuesta inmune trabajan en conjunto.

Agradecimiento

Se agradece al Proyecto Sistema Nacional de Evaluación Nanotoxicológica “SINANOTOX”. Proyecto FOSSIS 234073.

Referencias

1. Blog de la Casa Blanca. Presidente Barack Obama. New Initiatives to Accelerate the Commercialization of Nanotechnology. MAY 20, 2015 AT 5:42 PM ET BY LLOYD

- WHITMAN, TOM KALIL, AND JJ RAYNOR. Internet. Disponible en: <https://www.whitehouse.gov/blog/2015/05/20/new-initiatives-accelerate-commercialization-nanotechnology>
2. Blog. El Economista. Nanotecnología: Una llamativa oportunidad de inversión. SALA DE INVERSIÓN. EL ECONOMISTA, FEB 7, 2014. Internet. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/fondos/2014/02/07/nanotecnologia-llamativa-oportunidad-inversion>
 3. Alina Martirosyan and Yves-Jacques Schneider. Engineered Nanomaterials in Food: Implications for Food Safety and Consumer Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014, 11, 5720-5750; doi:10.3390/ijerph110605720
 4. Institute of Medicine (US) Food Forum. Nanotechnology in Food Products: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009. 1, Introduction. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32737/>
 5. Red Nanotecnología y Nanociencias-Conacyt, 2008. Diagnóstico y Prospectiva de la Nanotecnología en México. Internet. Diagnóstico y Prospectiva de la Nanotecnología en México. (<http://www.nanored.org.mx/documentos/diagnostico%20y%20prospectiva%20nanotecnologia%20en%20mexico.pdf>)
 6. Blog. El Economista. Nueve estados van en grande por la nanotecnología. Armando Torres. EL ECONOMISTA, NOV 10, 2011. Internet. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/estados/2011/11/10/nueve-estados-van-grande-nanotecnologia>
 7. Bellmann, S., Carlander, D., Fasano, A., Momcilovic, D., Scimeca, J. A., Waldman, W. J., Gombau, L., Tsytsikova, L., Canady, R., Pereira, D. I. A. and Lefebvre, D. E. (2015), Mammalian gastrointestinal tract parameters modulating the integrity, surface properties, and absorption of food-relevant nanomaterials. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* doi: 10.1002/wnan.1333
 8. Future of Nanotechnology in New Food Product Development. [Internet], disponible en: <http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.euronanoforum2013.eu%2Fwp-content%2Fuploads%2F2013%2F07%2FH-Singh->

- ENF2013.pdf&ei=_3dwVYDKDI6oyATF-4GQAw&usg=AFQjCNHY6cwSRm_WJ0lsveXr6qeMEud0Qg&sig2=VhVqyQckabxQ_QZGaf_DMQ&bvm=bv.94911696,d.cWc
9. McClements DJ. 2013. Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Prog Lipid Res* 52(4):409–23.
 10. Yada, R. Y., Buck, N., Canady, R., DeMerlis, C., Duncan, T., Janer, G., Juneja, L., Lin, M., McClements, D. J., Noonan, G., Oxley, J., Sabliov, C., Tsytsikova, L., Vázquez-Campos, S., Yourick, J., Zhong, Q. and Thurmond, S. (2014), Engineered Nanoscale Food Ingredients: Evaluation of Current Knowledge on Material Characteristics Relevant to Uptake from the Gastrointestinal Tract. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 730–744. doi: 10.1111/1541-4337.12076
 11. M. Thanou, J.C. Verhoef, H.E. Junginger. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50 (2001) S91–S101
 12. David Julian McClements and Hang Xiao. Excipient foods: designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. *Food Funct.*, 2014,5, 1320-1333
 13. Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. *Adv Exp Med Biol.* 2008;635:1-14. doi: 10.1007/978-0-387-09550-9_1.
 14. Seth, A.; Oh, D. B.; Lim, Y. T., Nanomaterials for enhanced immunity as an innovative paradigm in nanomedicine. *Nanomedicine* **2015**, *10* (6), 959-75.
 15. Ensign, L. M.; Cone, R.; Hanes, J., Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Advanced drug delivery reviews* 2012, 64 (6), 557-70.
 16. Chen, K. H.; Lundy, D. J.; Toh, E. K.; Chen, C. H.; Shih, C.; Chen, P.; Chang, H. C.; Lai, J. J.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S.; Hsieh, P. C., Nanoparticle distribution during systemic inflammation is size-dependent and organ-specific. *Nanoscale* 2015, 7 (38), 15863-72.
 17. Piccinini, A. M.; Midwood, K. S., DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of inflammation* **2010**, 2010.
 18. Rachmawati, D.; Bontkes, H. J.; Verstege, M. I.; Muris, J.; von Blomberg, B. M.; Scheper, R. J.; van Hoogstraten, I. M., Transition metal sensing by Toll-like receptor-4:

- next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact dermatitis* 2013, 68 (6), 331-8
19. Schrand, A. M.; Rahman, M. F.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J.; Smith, D. A.; Syed, A. F., Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 2010, 2 (5), 544-68;
 20. Castillo, P. M.; Herrera, J. L.; Fernandez-Montesinos, R.; Caro, C.; Zaderenko, A. P.; Mejias, J. A.; Pozo, D., Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands. *Nanomedicine* 2008, 3 (5), 627-35.
 21. Storey, M.; Jordan, S., An overview of the immune system. *Nursing standard* 2008, 23 (15-17), 47-56; quiz 58, 60
 22. Van Meirvenne, S.; Dullaers, M.; Heirman, C.; Straetman, L.; Michiels, A.; Thielemans, K., In vivo depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances the antigen-specific primary and memory CTL response elicited by mature mRNA-electroporated dendritic cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2005, 12 (5), 922-32.
 23. Schanen, B. C.; Karakoti, A. S.; Seal, S.; Drake, D. R., 3rd; Warren, W. L.; Self, W. T., Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an *in vitro* human immune construct. *ACS nano* 2009, 3 (9), 2523-32.
 24. Frick, S. U.; Bacher, N.; Baier, G.; Mailander, V.; Landfester, K.; Steinbrink, K., Functionalized polystyrene nanoparticles trigger human dendritic cell maturation resulting in enhanced CD4+ T cell activation. *Macromolecular bioscience* 2012, 12 (12), 1637-47.
 25. Tomic, S.; Ethokic, J.; Vasilijic, S.; Ogrinc, N.; Rudolf, R.; Pelicon, P.; Vucevic, D.; Milosavljevic, P.; Jankovic, S.; Anzel, I.; Rajkovic, J.; Rupnik, M. S.; Friedrich, B.; Colic, M., Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells *in vitro*. *PloS one* 2014, 9 (5), e96584.
 26. Temchura, V. V.; Kozlova, D.; Sokolova, V.; Uberla, K.; Epple, M., Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. *Biomaterials* 2014, 35 (23), 6098-105.

27. Jang, M. H.; Kweon, M. N.; Iwatani, K.; Yamamoto, M.; Terahara, K.; Sasakawa, C.; Suzuki, T.; Nochi, T.; Yokota, Y.; Rennert, P. D.; Hiroi, T.; Tamagawa, H.; Iijima, H.; Kunisawa, J.; Yuki, Y.; Kiyono, H., Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101 (16), 6110-5.
28. Garinot, M.; Fievez, V.; Pourcelle, V.; Stoffelbach, F.; des Rieux, A.; Plapied, L.; Theate, I.; Freichels, H.; Jerome, C.; Marchand-Brynaert, J.; Schneider, Y. J.; Preat, V., PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2007, 120 (3), 195-204.
29. Aderem, A.; Underhill, D. M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 1999, 17, 593-623.
30. des Rieux, A.; Fievez, V.; Garinot, M.; Schneider, Y. J.; Preat, V., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 2006, 116 (1), 1-27.
31. De Jesus, M.; Ostroff, G. R.; Levitz, S. M.; Bartling, T. R.; Mantis, N. J., A population of Langerin-positive dendritic cells in murine Peyer's patches involved in sampling beta-glucan microparticles. *PloS one* 2014, 9 (3), e91002.
32. Katakowski, J. A.; Mukherjee, G.; Wilner, S. E.; Maier, K.; Harrison, M. T.; DiLorenzo, T. P.; Levy, M.; Palliser, D., Delivery of siRNAs to dendritic cells using DEC205-targeted lipid nanoparticles to inhibit immune responses. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 2015.
33. Lee, S. H.; Starkey, P. M.; Gordon, S., Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. *Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. The Journal of experimental medicine* 1985, 161 (3), 475-89.
34. Smith, P. D.; Smythies, L. E.; Shen, R.; Greenwell-Wild, T.; Gliozzi, M.; Wahl, S. M., Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal immunology* 2011, 4 (1), 31-42.

35. Grimm, M. C.; Pavli, P.; Van de Pol, E.; Doe, W. F., Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clinical and experimental immunology* 1995, 100 (2), 291-7.
36. Fournier, B. M.; Parkos, C. A., The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 2012, 5 (4), 354-66.
37. Liz, R.; Simard, J. C.; Leonardi, L. B.; Girard, D., Silver nanoparticles rapidly induce atypical human neutrophil cell death by a process involving inflammatory caspases and reactive oxygen species and induce neutrophil extracellular traps release upon cell adhesion. *International immunopharmacology* 2015, 28 (1), 616-25.
38. Bartneck, M.; Keul, H. A.; Zwadlo-Klarwasser, G.; Groll, J., Phagocytosis independent extracellular nanoparticle clearance by human immune cells. *Nano letters* 2010, 10 (1), 59-63.
39. Wang, Z.; Li, J.; Cho, J.; Malik, A. B., Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils. *Nature nanotechnology* 2014, 9 (3), 204-10.
40. Storey, M.; Jordan, S., An overview of the immune system. *Nursing standard* 2008, 23 (15-17), 47-56; quiz 58, 60.

4. PÉPTIDOS CON POTENCIAL HIPOGLUCEMIANTE

Luis Alfonso Mojica Contreras

Tecnología alimentaria, CIATEJ, A. C.

lmojica@ciatej.mx

Introducción

Los avances en la ciencia y la biomedicina han dado lugar al descubrimiento y generación de nuevas moléculas con potencial relevancia fisiológica. Las cuales pueden ser parte del metabolismo secundario de plantas, sintetizadas por microorganismos, químicamente o generadas durante la hidrólisis de proteínas alimentarias como en el caso de péptidos bioactivos. La mayoría de los compuestos bioactivos y fármacos son susceptibles a degradación durante su paso por el tracto intestinal. Por esta razón, se han desarrollado una serie de tecnologías nanoescala y sistemas de protección, administración y entrega que tienen por objetivo incrementar su biodisponibilidad y asegurar su función biológica. En la tabla 1 se enlista una serie de sistemas de dosificación y entrega cuya función es incrementar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos y fármacos, asegurando que el compuesto activo logre alcanzar el tejido donde ejercerá su acción. Entre los que se encuentran sistemas de retención y dosificación gástrica, liposomas, emulsiones múltiples, partículas sólidas de grasa, partículas de biopolímeros, cubosomas, aerogeles, nanoportadores, sistemas de autoentrega, exosomas, péptidos, dendrímeros, dendrones, entre otros. Además de sistemas de simulación matemática para evaluar y predecir la administración de fármacos basados en diferentes modelos de liberación a nivel de membranas celulares (1-14). No obstante, la evaluación de la efectividad de estos sistemas de entrega y de la biodisponibilidad, mecanismos de acción y toxicidad de fármacos o compuestos de interés depende de modelos biológicos diseñados para este propósito. Estos modelos se clasifican en: *in silico*, *in vitro*, *in vivo* y finalmente cuando no existe riesgo toxicológico se realizan ensayos clínicos (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas de evaluación biológica de sistemas de entrega de moléculas con relevancia fisiológica

Tipo de sistema	Objetivo	Clasificación	Sistemas de evaluación	Aplicación	Referencia
Sistemas de administración de fármacos	Estudios de permeabilidad y transporte de fármacos, biomoléculas y partículas a través de barreras celulares	Cultivo de células en insertos, co-cultivo de células humanas	Los modelos <i>in vitro</i> de barreras biológicas permiten estudiar absorción y transporte de moléculas, así como sus mecanismos involucrados	Administración de fármacos, nano-medicamentos, transporte de compuestos bioactivos, absorción de nutrientes	Schneider <i>et al.</i> (1)
Modelos matemáticos para simulación de liberación local	Evaluar barreras para la administración localizada de moléculas y guiar el diseño de dispositivos para terapias locales óptimas	Considera tres fases en un sistema de liberación controlada: espacio intracelular, membrana celular, y espacio extracelular	Predice matemáticamente los mecanismos de liberación controlada: difusión del agente dentro del dispositivo, degradación de un polímero portador, bombeo osmótico, hinchazón, hidrólisis, y desintegración dentro de un dispositivo	Sistemas de entrega de polímeros implantables o inyectables para el tratamiento local de tumores cerebrales, enfermedades vasculares, enfermedades oculares, salud reproductiva, y cicatrización de heridas	Weiser <i>et al.</i> (2)
Modelos matemáticos en la administración de fármacos	Diseñar sistemas y dispositivos de administración de fármaco simples y complejos y predecir el comportamiento de liberación	Basado en mecanismos de liberación de fármaco: 1) control por difusión; 2) control químicamente; 3) control osmótico; 4) control de hinchazón y/o disolución	Simulación y evaluación en el diseño de formulaciones farmacéuticas, análisis de sistemas de liberación de fármacos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Predecir el tiempo y mecanismo de liberación controlada de la molécula encapsulada	Peppas <i>et al.</i> (3)
Sistemas de lípidos a nanoescala para la administración de fármacos	Caracterizar el vehículo lipídico nanoestructurado cargado con ácido ferúlico y su efecto citotóxico	Nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas y vehículos lipídicos nanoestructurados	El efecto citotóxico sobre las células U87MG de cáncer de glioblastoma humano	El vehículo lipídico nanoestructurado cargado con ácido ferúlico tiene potencial para el tratamiento de glioblastoma	Carbone <i>et al.</i> (4)
Sistemas de entrega coloidales para compuestos bioactivos hidrófilos	Incorporar sistemas de entrega coloidales de moléculas hidrófilas en productos alimenticios sin modificar características sensoriales	Liposomas, emulsiones múltiples, partículas sólidas de grasa, emulsiones múltiples, partículas de biopolímero, cubosomas, y sistemas biológicos derivados	Modelos de liberación/absorción dentro tracto gastrointestinal: boca, estómago, intestino delgado, y colon	En alimentos, productos farmacéuticos y otros productos destinados a la ingestión oral	McClements <i>et al.</i> (5)

Continuación tabla 1.

Tipo de sistema	Objetivo	Clasificación	Sistemas de evaluación	Aplicación	Referencia
Aerogeles como sistemas de liberación de fármacos	Preparación de aerogeles por medio de tecnología de fluidos supercríticos	De acuerdo al material de elaboración sílice, almidón, y alginato de sodio	Pruebas de disolución <i>in vitro</i> de fármacos (AT Sotax 7 Smart ", Sotax", Suiza). Estudios <i>in vivo</i> (Ratas Wistar) para determinar la biodisponibilidad	Sistema de administración de fármacos para mejorar la farmacocinética de los compuestos activos	Lovskaya <i>et al.</i> (6)
Sistema de administración de fármacos de retención gástrica	Retener dosificación de fármacos en el estómago durante un período prolongado de tiempo y liberar el fármaco lentamente	Gastro-retención asistida por campo magnético, sistema de hinchamiento de tipo tapón, técnica muco-adherencia, sistema flotante con o sin efervescencia, hidrogeles súper porosos, los sistemas de alta densidad	<i>In vitro</i> : agua desionizada y simulación de fluido gástrico, medio de disolución (HCl 0,1 N). <i>in vivo</i> : modelos animales como perros, ratas Sprague Dawley, conejos, ratas albinas, y en sujetos humanos	Mejorar el tiempo de retención gástrica y la liberación prolongada del fármaco	Mandal <i>et al.</i> (7)
Péptidos de penetración celular como vectores transmembrana no invasivos	Desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos multifuncionales	Péptidos cortos de máximo 30 en amino ácidos: 1) motivo estructural de polipéptido derivado de proteínas naturales con funciones de penetración. 2) polipéptidos diseñados y sintetizados artificialmente	Predicción por medio de "Ph.D. TM -C7C Phage Display Peptide Library Kit" evaluación en modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de tracto intestinal y piel	Transportan macromoléculas a través de biomembranas, lo que permite su localización al núcleo y citoplasma celular de diversos tejidos	Zhang <i>et al.</i> (8)
Sistemas de suministro fármaco/gen (nanoportadores)	Describir las técnicas experimentales utilizadas comúnmente, así como los métodos computacionales	Dendrímeros y dendrones, nanoportadores basados en polímeros, péptidos, ácidos nucleicos, lípidos, y carbono, así como nanopartículas de oro	Evaluación experimental y computacional complementaria para entender mecanismos de acción de e interacciones con drogas, biomembranas y otras moléculas biológicas	El desarrollo de nanoportadores mezcla estudios computacionales multi-escala con datos de caracterización biofísica. Con importancia biomédica y biotecnológica	Ramezanpour <i>et al.</i> (9)

Continuación tabla 1.

Tipo de sistema	Objetivo	Clasificación	Sistemas de evaluación	de Aplicación	Referencia
Liposomas catiónicos para la administración de fármacos	Crear liposomas caseros portadores de moléculas activas y evaluar los complejos liposomas-complejo modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio; DOPE: 1,2-dioleoil glicero-3-fosfoetanolamina; PEG-PE: polietileno glicol de polietileno	Células humanas de próstata metastáticas PC3, modelo animal con tumor xenoinjertado (ratones desnudos atímicos hembra (BALB/c)	Los liposomas caseros tienen una alta eficiencia en la transfección de fármacos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Qi <i>et al.</i> (10)
Sistemas de entrega basados en nanoemulsiones	Desarrollo de sistemas basados en nanoemulsiones para entrega de moléculas hidrofóbicas	Nanoemulsiones de aceite-en-agua con gama de diámetros de partícula (40 a 500 nm)	Caenorhabditis elegans	La entrega de moléculas hidrofóbicas por medio de nanoemulsiones	Colmenares <i>et al.</i> (11)
Exosomas como vehículos para fármacos terapéuticos y vehículos de administración	Evaluar los exosomas como vehículos para fármacos terapéuticos y vehículos de administración	Se clasifican en función de su tamaño (40 a 100 nm), contenido de proteínas, y el contenido de lípidos	<i>In vitro</i> : macrófagos tratados con curcumina exosomal. <i>in vivo</i> : modelo animal de shock séptico inducido por lipopolisacáridos tratados con curcumina exosomal	Suministrar diferentes tipos de moléculas, incluyendo fármacos anticáncer, medicamentos antihongos, y analgésicos	Ha <i>et al.</i> (12)
Nanopartículas basadas en polisacáridos	Evalúa metodologías para sintetizar nanopartículas de polisacáridos, principalmente centrado en nanogeles como portadores farmacéuticos	Acomplejamiento polielectrolítico, autoensamblaje, entrecruzamiento covalente y entrecruzamiento iónico	Evaluación <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> de nanogeles orientados hacia la entrega de fármacos en tumores	Las nanopartículas de polisacáridos tiene aplicación en medicina ya que pueden ser portadores de diferentes agentes farmacéuticos	Debele <i>et al.</i> (13)
Sistemas de autoentrega de fármacos	Evaluar los sistemas auto-entrega de fármacos a nivel nano escala con potencial de realizar auto-administración intracelular	Profármacos de autoentrega, fármaco puro de autoentrega, transportador terapéutico de auto-entrega y agentes no tóxicos con características de autoentrega	Modelos celulares de cáncer y modelos animales	Gran potencial en el tratamiento del cáncer	Qin <i>et al.</i> (14)

Por tanto, el objetivo de este capítulo es revisar algunos modelos de evaluación biológica y sistemas de entrega de compuestos bioactivos o fármacos y describir su aplicación en el desarrollo de ingredientes con potencial nutracéutico.

Ensayos *in silico*

Los ensayos de modelación y predicción *in silico* pueden ser utilizados para simular interacciones entre moléculas bioactivas con enzimas, transportadores, receptores relacionados con mecanismos de acción específicos y expresión experimental de genes relacionados con enfermedades crónicas. En adición, estos métodos ofrecen la oportunidad de simular mecanismos de liberación controlada en espacios intracelular, extracelular y de membrana celular, por medio de diferentes mecanismos control como difusión, químico, osmótico, hinchazón y disolución. Con la ventaja de rapidez y bajo costo para realizar barridos un gran número de moléculas o modelos de liberación y generar información que permita de manera acertada seleccionar aquellos con mayor potencial para analizar su relevancia biológica por otros ensayos. Lo que permite delimitar diseños experimentales y finalmente optimizar recursos. Sin embargo, estos modelos computacionales ofrecen predicciones teóricas que cuentan un margen de error asociado que debe ser tomado en consideración.

Ensayos *in vitro*

Los modelos *in vitro* consisten en el cultivo células provenientes de tejidos humanos y otros organismos con ciertas alteraciones o sanos. Por medio de estímulos químicos o físicos, se induce la diferenciación o expresión genotípica y fenotípica en las células que simulan las condiciones generadas durante enfermedades crónicas, entre las que se encuentran diferentes tipos y etapas de cáncer, inflamación, obesidad, diabetes, entre otras. Estos modelos permiten evaluar de manera rápida el potencial biológico de moléculas y permiten la evaluación potencial de los mecanismos de acción. Asimismo, se han desarrollado sistemas de barreras biológicas utilizando el cultivo de células en insertos, por medio de los cuales se puede evaluar absorción y transporte de moléculas a través de películas celulares (Fig. 1).

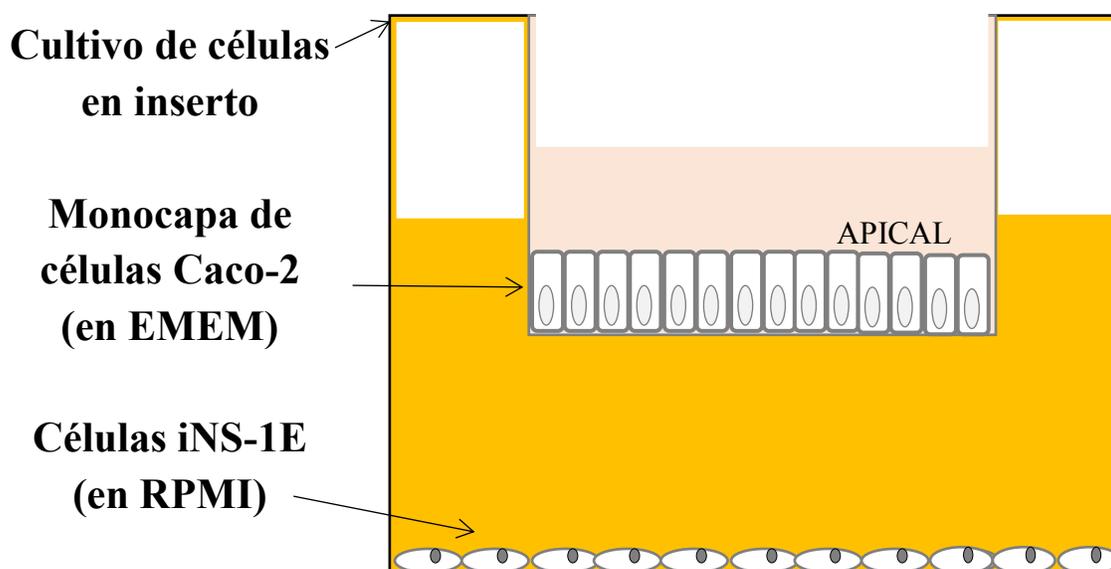


Fig. 1. Esquema de cocultivo celular en insertos para modelo diabetes. Adaptado de Johnson *et al.* (15).

Mediante el uso de modelos *in vitro* de permeabilidad se puede realizar de manera eficaz un barrido de moléculas de interés durante las primeras etapas del desarrollo de fármacos y de busca correlacionar y predecir mecanismos relacionados transporte de estos compuestos a través de membranas *in vivo*. Esta información resulta importante en el diseño, optimización y selección de medicamentos y productos farmacéuticos de entrega no invasiva. Por otra parte, utilizando este tipo de ensayos se puede evaluar de manera rápida la citotoxicidad potencial de los compuestos bioactivos de interés. Existe una gran cantidad de líneas celulares disponibles, solamente “American Type Culture Collection” (ATCC)[®] tiene disponibles casi 4000 líneas celulares humanas y más de 150 líneas celulares de animales para usos en diferentes aplicaciones relacionadas con biomedicina y salud pública.

Ensayos *in vivo*

Los modelos *in vivo* consisten en la utilización de animales de laboratorio bajo condiciones determinadas para evaluar la efectividad y/o toxicidad de fármacos y compuestos bioactivos y elucidar potenciales mecanismos de acción en diversas enfermedades que afectan al ser humano. Así como cinéticas y mecanismos de absorción, distribución, metabolismo excreción de estos compuestos. Entre los modelos más usados se encuentran el ratón (*M. musculus*), rata (*R. norvegicus*), conejo (*O. cuniculus*), hámster (*C.*

Cricetinae), perro (*C.l. familiaris*), cerdo de guinea (*C. porcellus*), entre otros. Compañías como Envigo Inc. ha desarrollado y ofrece comercialmente modelos animales para diferentes disciplinas y aplicaciones específicas como inmunología, oncología, toxicología, trasplantes, envejecimiento, estudios generales, comportamiento, teratología, crecimiento de tumores celulares, cardiovascular, producción de anticuerpos, nutrición, enfermedad autoinmune, obesidad inducida por dieta, metabolismo, carcinogénesis, enfermedades infecciosas y encefalomiелitis alérgica experimental. Un aspecto importante del uso de modelos animales, es el diseño adecuado de los experimentos para seleccionar el número de animales necesarios y desarrollar los protocolos con ética y actitud responsable en el uso de animales de laboratorio. Por ejemplo, en investigación en diabetes existen modelos animales espontáneos, inducidos y transgénicos. La selección del modelo depende de la hipótesis de investigación, pues se debe considerar el mecanismo por medio del cual el animal desarrolla el padecimiento y relacionarlo con el potencial mecanismo de acción del fármaco o molécula de interés, que podría estar relacionado con estudios de la patogénesis, la prevención o el tratamiento de la enfermedad (16).

Generación de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son secuencias de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos que muestran beneficios fisiológicos cuando se consumen. Dichos péptidos están inactivos dentro de la secuencia de proteínas y son liberados durante la hidrólisis de proteínas. Los péptidos bioactivos pueden ejercer su función en el tracto intestinal o dentro del cuerpo después de haber sido absorbidos. La investigación sobre la bioactividad de péptidos de frijol se centra en beneficios para la salud, tales como antihipertensión, antioxidante, anticáncer y antidiabético (Fig. 2) (17).

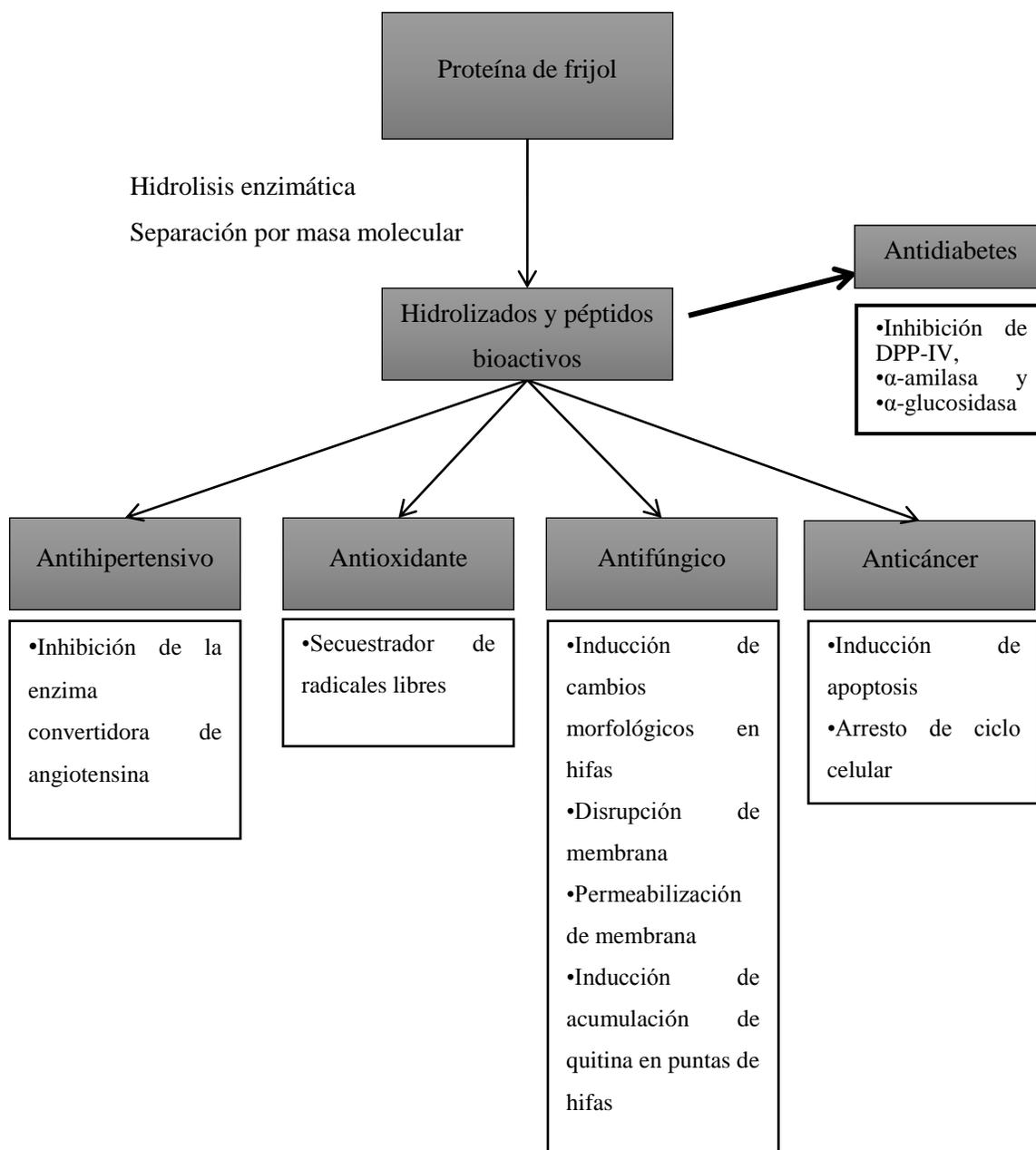


Fig. 2. Potencial biológico de péptidos generados a partir de proteína de frijol. Adaptado de Luna-Vital *et al.* (17).

Para generar péptidos bioactivos a partir de las proteínas de frijol se han utilizado proteasas tales como alcalasa, flavourzima, pepsina, pancreatina, quimiotripsina, papaína, tripsina y la termolisina (18). Sin embargo, existen variaciones en el proceso de generación de péptidos como son la relación de enzima/sustrato, el tratamiento previo de proteína, el tiempo de hidrólisis y la enzima utilizada o la combinación que todo en conjunto juegan un

papel importante en la bioactividad de los péptidos generados. Entre los factores que más influyen en la generación de péptidos bioactivos, se encuentran las características de las enzimas utilizadas y las condiciones de hidrólisis. Otro factor es la especificidad de la proteasa; por ejemplo, la alcalasa que es una endoproteasa tiene un mayor potencial de hidrolizar la proteína y presentar un mayor grado de hidrólisis. Otro modelo utilizado en la generación de péptidos es la simulación de la digestión gastrointestinal utilizando pepsina-pancreatina, que es una combinación de varias enzimas gástricas incluyendo proteasas; que tienen una amplia especificidad de acción. De manera similar a la digestión gastrointestinal, se ha observado un efecto sinérgico con la combinación de diferentes enzimas. El tiempo de hidrólisis juega un papel importante en el grado de hidrólisis y la generación de péptidos. Por otra parte, el pre-tratamiento térmico aumenta el grado de hidrólisis de las proteínas. La aplicación de temperatura favorece la desnaturalización parcial de las proteínas y la exposición de sus residuos hidrofóbicos en especialmente proteínas globulares como la faseolina (17,18).

Metabolismo de péptidos

Los péptidos se generan a partir de proteínas de la dieta durante la digestión normal o pueden ser consumidos como un extracto o fracción de proteína procesada. Su biodisponibilidad después de la administración oral depende de su capacidad para resistir la hidrólisis adicional en el digestivo y su absorción para alcanzar el órgano de interés (19). Las células epiteliales del intestino delgado son el sitio principal de absorción de nutrientes tales como glucosa y aminoácidos. La mayoría de los oligopéptidos son extracelularmente hidrolizados por enzimas de las vellosidades en la membrana del epitelio intestinal, para generar aminoácidos libres que pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal. Sin embargo, algunos péptidos pueden resistir el ataque enzimático, debido a su composición de aminoácidos. Estos péptidos pueden ser transportados a través del epitelio intestinal mediante el transporte paracelular, transcelular o rutas transcitóticas (20). Los péptidos más pequeños, di- y tripéptidos pueden ser absorbidos por transportadores de oligopéptidos acoplados a H⁺ que utilizan un gradiente de protones electroquímico transmembrana como fuerza de transporte de amplia especificidad. La familia de transportadores de oligopéptidos acoplados a protones SLC15 consiste en cuatro isoformas diferentes: transportadores de péptidos 1 y 2 (PEPT1/SLC15A1 y PEPT2/SLC15A2) y los transportadores péptido-histidina 1 y 2

(PHT1/SLCA4 y PHT2 SLCA3). El transporte paracelular para oligopéptidos es una vía acuosa que implica la difusión del péptido en el espacio extracelular entre las células adyacentes que se limita por uniones estrechas de las células (21). Los péptidos más grandes son internalizados principalmente las vías endocítica en la membrana celular por las rutas de clatrina, caveolas y macropinocitosis (20, 22).

Potencial hipoglucemiante de péptidos de frijol: métodos y modelos de evaluación

La investigación acerca del potencial biológico de péptidos o hidrolizados de proteína de frijol se ha enfocado en su potencial efecto antiinflamatorio, antioxidante, antihipertensivo, anticancerígeno y antidiabético. Estos estudios utilizan diferentes modelos para evaluar el potencial biológico de dichos péptidos o hidrolizados de proteína de frijol entre los que se encuentran modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, no existen estudios clínicos para validar el efecto biológico de estos extractos o hidrolizados de proteína de frijol.

El potencial antidiabético de los hidrolizados de frijol ha sido estudiado recientemente (Tabla 2). En general la primera aproximación para diagnosticar el potencial biológico de compuestos bioactivos es mediante el uso de ensayos *in silico*, lo cual permite de manera rápida y económica predecir el potencial biológico de dichos compuestos. Este tipo de ensayos incluye revisiones de bases de datos, por ejemplo, en el estudio de péptidos bioactivos la base de datos “BioPep database” recopila información sobre el potencial biológico de diferentes péptidos y secuencias de proteína. Esta predicción es válida cuando se ha logrado caracterizar las secuencias de péptidos dentro del hidrolizado (18, 23, 24).

Por otra parte, el modelado computacional ofrece una amplia gama de aplicaciones en la búsqueda del potencial biológico de péptidos, ya que se puede evaluar el potencial de estas secuencias de aminoácidos para interactuar o bloquear enzimas, receptores o proteínas de señalización importantes como blancos moleculares en el tratamiento enfermedades crónicas. Por tanto, el potencial hipoglucemiante de estos péptidos de frijol ha sido evaluado por medio de simulaciones computacionales para medir la interacción entre péptidos y algunos blancos

moleculares relacionados con diabetes como son las enzimas α -glucosidasa, α -amilasa y dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), así como con los transportadores de glucosa GLUT2 y SGLT1 mediante la plataforma DockingServer.

Tabla 2. Generación y modelos de evaluación del potencial antidiabético de péptidos de frijol

Variedad de Frijol	Procesamiento	Enzima	Función biológica	Modelo usado	Reference
Negro-Otomí	Aislado de proteína de frijol proceso térmico 20 min, 121C	Tripsina, Flavourzima, Proteinasa k, Termolisina, Alcalasa, Pepsina, Papaína, Quimotripsina,	Inhibidor de DPP-IV, inhibidor de α -amilasa inhibidor, inhibidor de α -glucosidasa, capacidad antioxidante	<i>In silico</i> , modelado computacional, ensayos bioquímicos	Mojica y de Mejía, (18)
Black, Pinto, Red, Navy, and Great Northern	Precocido, alta temperatura/presión	Pepsina-pancreatina	Inhibición de ECA, inhibición de DPP-IV, inhibición de α -amilasa, inhibición de α -glucosidasa, capacidad antioxidante	<i>In silico</i> , ensayos bioquímicos	Mojica <i>et al.</i> (23)
Pinto-Bayacora, Pinto-Bravo, Pinto-Centenario, Pinto-Saltillo, FJ-León, FJ-Marcela, FM-Eugenia; FM-67, FM-199, FM -202; Negros, Negro-Frijozac, Negro-Otomí, Horizonte, Pontal, Perola	Aislado de proteína de frijol	Pepsina/pancreatina	Inhibidor de ECA, inhibidor de DPP-IV, capacidad antioxidante	<i>In silico</i>	Mojica y de Mejía, (24)
Negro 8025 y Pinto Durango	Frijol duro de cocer	Alcalasa, Bromelina	Inhibición de α -amilasa, α -glucosidasa, inhibición de NO, secreción de insulina	Modelado computacional, <i>in vitro</i> INS-1E Células β , ensayos bioquímicos	Oseguera-Toledo <i>et al.</i> (25)
Negro-Otomí, Horizonte, Pontal, Perola	Aislado de proteína de frijol	Pepsina/pancreatina	Inhibidor de ECA, inhibidor de DPP-IV, capacidad antioxidante, inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa	<i>In silico</i> , modelado computacional, ensayos bioquímicos,	Mojica <i>et al.</i> (26)
Negro 8025 y Pinto Durango	Frijol duro de cocer	Alcalasa, Bromelina	Secreción de Insulina, reducción de ROS, metabolismo de diabetes, acumulación de lípidos	<i>In vitro</i> INS-1E Células β , 3T3-L1 adipocitos	Oseguera-Toledo <i>et al.</i> (27)
Negro-Otomí	Aislado de proteína de frijol proceso térmico 20 min, 121C	Alcalasa	Absorción de glucosa, inhibición de ROS, glucosa postprandial, Insulina,	<i>In silico</i> , modelado computacional, ensayos bioquímicos, <i>in vitro</i> células Caco-2, <i>in vivo</i> ratas Wistar	Mojica <i>et al.</i> (28)

ECA: enzima convertidora de angiotensina; DPP-IV: dipeptidil peptidasa IV; NO: óxido nítrico; FJ: flor de Junio; FM: flor de mayo; ROS: especies reactivas de oxígeno.

Por medio de estos ensayos se puede predecir la interacción de dichos compuestos con aminoácidos en el sitio catalítico de enzimas o en los motivos de los transportadores (Fig. 3) (18, 25, 26).

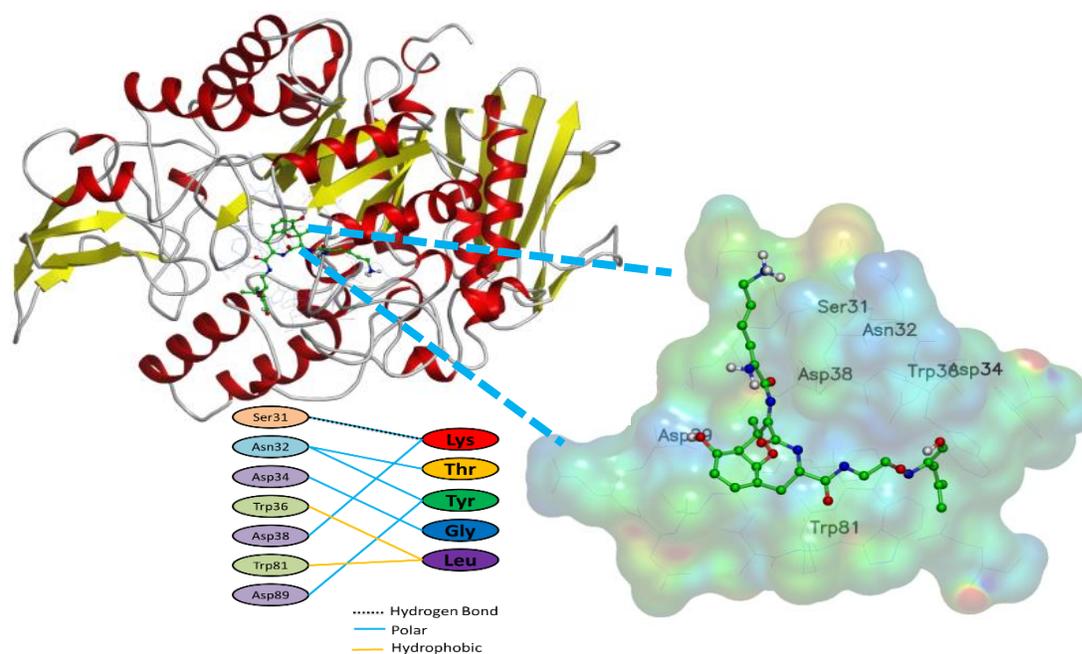


Fig. 3. Ejemplo representativo del péptido KTYGL interactuando en el sitio catalítico de la enzima α -glucosidasa. Adaptado de Mojica *et al.* (26).

Por otra parte, mediante estudios *in vitro* se evaluó el potencial de los péptidos de frijol para disminuir la absorción de glucosa en células intestinales, estimular de secreción de insulina en células β pancreáticas, aumentar la internalización de glucosa e inhibir la acumulación de lípidos en adipocitos, así como la disminución de especies reactivas de oxígeno en células β pancreáticas y células Caco-2 (25-28). Mojica *et al.* (28) reportó el potencial hipoglucemiante de los péptidos de frijol en curvas de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar sanas y en un modelo de ratas Wistar con hiperglicemia inducida por estreptozotocina. Estos resultados confirman el poder hipoglucemiante de los hidrolizados de frijol y correlacionan positivamente con lo reportado en análisis realizados por medio de simulaciones computacionales y cultivos celulares.

Perspectiva a futuro

Actualmente, no existe reporte de estudios clínicos con suplementos a base de hidrolizados de frijol. Sin embargo, su potencial utilización como ingrediente en alimentos depende de varios factores como su naturaleza proteica y susceptibilidad a hidrólisis subsecuente por enzimas gastrointestinales, baja biodisponibilidad, sabor amargo, higroscopicidad, e interacciones con la matriz alimentaria. En este sentido, es importante utilizar mecanismos de protección y de liberación como la encapsulación que permita a estos compuestos llegar intactos al órgano deseado, mejorando su biodisponibilidad y propiedades organolépticas. En la Fig. 4 se enlistan las ventajas y desventajas de materiales utilizados para encapsular péptidos bioactivos como son otras proteínas, polisacáridos y lípidos. En donde los sistemas de proteínas y polisacáridos pueden enmascarar sabores indeseables y reducir la higroscopicidad de los péptidos, y los sistemas lipídicos mejoran la biodisponibilidad y bioestabilidad de péptidos encapsulados (29).

Materiales para encapsulación de péptidos	Proteína	<p>Ventajas: Nutrición, emulsificante, gelificante.</p> <p>Desventajas: Alta energía para nanoescala, material similar.</p>
	Carbohidratos (Polisacáridos)	<p>Ventajas: Estable, bajo costo.</p> <p>Desventajas: Alta energía para nanoescala, grupo funcional reactivo.</p>
	Lípidos	<p>Ventajas: Baja energía para nanoescala,</p> <p>Desventajas: Oxidación, inestabilidad térmica.</p>

Fig. 4. Materiales con potencial aplicación en la encapsulación de péptidos bioactivos.

Adaptado de Mohan *et al.* (29).

En tales circunstancias, la selección de la tecnología de encapsulación y entrega dependerá de un estudio de costo/beneficio, además del entendimiento de los mecanismos y cinéticas de liberación, estabilidad en el tracto intestinal, biodisponibilidad, bioactividad fisiológica de los péptidos encapsulados y producto alimenticio que se utilizará como vehículo de entrega.

Referencias

1. Schneider, M., Windbergs, M., Daum, N., Loretz, B., Collnot, E.-M., Hansen, S., . . . Lehr, C.-M. (2013). Crossing biological barriers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 239-241. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.03.009>
2. Weiser, J. R., & Saltzman, W. M. (2014). Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. *Journal of Controlled Release*, 190, 664-673. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.048>
3. Peppas, N. A., & Narasimhan, B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 75-81. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.041>
4. Carbone, C., Campisi, A., Musumeci, T., Raciti, G., Bonfanti, R., & Puglisi, G. (2014). FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 12-20.
5. McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27-53.
6. Lovskaya, D. D., Lebedev, A. E., & Menshutina, N. V. (2015). Aerogels as drug delivery systems: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *The Journal of Supercritical Fluids*, 106, 115-121. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.07.011>
7. Mandal, U. K., Chatterjee, B., & Senjoti, F. G. (2016). Gastro-retentive drug delivery systems and their *in vivo* success: A recent update. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(5), 575-584. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.04.007>
8. Zhang, D., Wang, J., & Xu, D. (2016). Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery

- systems. *Journal of Controlled Release*, 229, 130-139.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.020>
9. Ramezanzpour, M., Leung, S. S. W., Delgado-Magnero, K. H., Bashe, B. Y. M., Thewalt, J., & Tieleman, D. P. (2016). Computational and experimental approaches for investigating nanoparticle-based drug delivery systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(7, Part B), 1688-1709.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.028>
 10. Qi, P., Cao, M., Song, L., Chen, C., Liu, M., Li, N., . . . Zhao, J. (2016). The biological activity of cationic liposomes in drug delivery and toxicity test in animal models. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 47, 159-164.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.015>
 11. Colmenares, D., Sun, Q., Shen, P., Yue, Y., McClements, D. J., & Park, Y. (2016). Delivery of dietary triglycerides to *Caenorhabditis elegans* using lipid nanoparticles: Nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chemistry*, 202, 451-457.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.022>
 12. Ha, D., Yang, N., & Nadithe, V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), 287-296.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>
 13. Debele, T. A., Mekuria, S. L., & Tsai, H.-C. (2016). Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 964-981.
 14. Qin, S.-Y., Zhang, A.-Q., Cheng, S.-X., Rong, L., & Zhang, X.-Z. (2017). Drug self-delivery systems for cancer therapy. *Biomaterials*, 112, 234-247.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.016>
 15. Johnson, M. H., & de Mejia, E. G. (2016). Phenolic Compounds from Fermented Berry Beverages Modulated Gene and Protein Expression To Increase Insulin Secretion from Pancreatic β -Cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(12), 2569-2581. doi:10.1021/acs.jafc.6b00239

16. King, A., & Bowe, J. (2016). Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochemical Pharmacology*, *99*, 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108>
17. Luna-Vital, D. A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*, *76*, Part 1, 39-50. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>
18. Mojica, L., & de Mejia, E. G. (2016). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. *Food & Function*, *7*(2), 713-727. doi:10.1039/C5FO01204J
19. Oseguera-Toledo, M. E., González de Mejía, E., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A., & Amaya-Llano, S. L. (2014). Proteins and bioactive peptides. *Nutrafoods*, *13*(4), 147-157. doi:10.1007/s13749-014-0052-z
20. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., & Hernandez-Escalante, V. M. (2011). Bioavailability of Bioactive Peptides. *Food Reviews International*, *27*(3), 213-226. doi:10.1080/87559129.2011.563395
21. Fernández-Musoles, R., Salom, J. B., Castelló-Ruiz, M., Contreras, M. d. M., Recio, I., & Manzanares, P. (2013). Bioavailability of antihypertensive lactoferricin B-derived peptides: Transepithelial transport and resistance to intestinal and plasma peptidases. *International Dairy Journal*, *32*(2), 169-174. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.05.009>
22. Cam, A., Sivaguru, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2013). Endocytic Mechanism of Internalization of Dietary Peptide Lunasin into Macrophages in Inflammatory Condition Associated with Cardiovascular Disease. *PLoS ONE*, *8*(9), e72115. doi:10.1371/journal.pone.0072115
23. Mojica, L., Chen, K., & de Mejía, E. G. (2015). Impact of Commercial Precooking of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the Generation of Peptides, After Pepsin–Pancreatin Hydrolysis, Capable to Inhibit Dipeptidyl Peptidase-IV. *Journal of Food Science*, *80*(1), H188-H198. doi:10.1111/1750-3841.12726
24. Mojica, L., & de Mejía, E. G. (2015). Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars

- (Phaseolus vulgaris L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 105-112. doi:10.1007/s11130-015-0477-6
25. Oseguera-Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E., & Amaya-Llano, S. L. (2015). Hard-to-cook bean (Phaseolus vulgaris L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International*, 76, Part 3, 839-851. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.046>
26. Mojica, L., Luna-Vital, D. A., & de Mejía, E. G. (2016). Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a-n/a. doi:10.1002/jsfa.8053
27. Oseguera Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E., Sivaguru, M., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Common bean (Phaseolus vulgaris L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation *in vitro*. *Journal of Functional Foods*, 27, 160-177. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.001>
28. Mojica, L., De Mejia, E. G., Menjivar, M., & Granados-Silvestre, M. Á. (2016). Antidiabetic Effect of Black Bean Peptides through Reduction of Glucose Absorption and Modulation of SGLT1, GLUT2 and DPP-IV in *in vitro* and *in vivo* Models. *The FASEB Journal*, 30(1 Supplement), 125.126-125.126.
29. Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advances*, 5(97), 79270-79278. doi:10.1039/C5RA13419F

5. PÉPTIDOS BIOACTIVOS: CAPACIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Judith Esmeralda Urías Silvas

Brenda San Pablo Osorio

jurias@ciatej.mx

Unidad Zapopan, CIATEJ A. C.

Introducción

Las proteínas, desde un punto de vista nutricional, son fuente de energía y aminoácidos, los cuales son necesarios para el crecimiento y desarrollo, ahora bien, funcionalmente, las proteínas contribuyen a las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de los alimentos. En los últimos años se ha reconocido que las proteínas dietarias son además una fuente importante de péptidos biológicamente activos. Tales péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína de origen y pueden ser liberados a través de diferentes mecanismos: hidrólisis por enzimas digestivas, fermentación por microorganismos proteolíticos y/o a través de la acción de enzimas derivadas de microorganismos o plantas (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido definidos como fragmentos de proteínas que tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones del cuerpo y pueden influenciar su estado de salud (Kitts y Weiler, 2003). Dependiendo de la secuencia de aminoácidos que presenten los péptidos y sobre una administración vía oral, los péptidos bioactivos pueden llegar a afectar ya sea al sistema cardiovascular, digestivo, inmune o nervioso. Dentro de las propiedades reportadas para péptidos bioactivos obtenidos por los mecanismos mencionados previamente, se encuentran la de disminución de la presión sanguínea por medio de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, por sus siglas en inglés), efecto antiobesidad, capacidad de disminución de los niveles de colesterol, actividades antitrombótica y antioxidante, aumento en la biodisponibilidad/absorción de minerales, efecto cito- o inmuno-modulador, antimicrobianos y actividad opioide, entre otras (Hartmann y Meisel, 2007). Por lo que, el término bioactivo se ha sugerido que sea utilizado solamente

para péptidos que muestren modulación *in vivo* de condiciones fisiológicas durante experimentación humana y/o animal (Aluko, 2015).

Algunos fragmentos de la secuencia de proteínas alimentarias pueden ser liberados por hidrólisis y una vez que son liberados pueden llegar a mostrar alguna actividad biológica. Dichos fragmentos o péptidos bioactivos usualmente son generados *in vivo* por la acción de las enzimas gastrointestinales e *in vitro* se pueden obtener por medio del uso de enzimas específicas o bien producidos durante el procesamiento de ciertos alimentos (Aleixandre y Miguel, 2012).

Hoy en día se han identificado péptidos bioactivos con capacidad inhibitoria de la ACE, siendo la mayoría de dichos péptidos de bajo peso molecular y derivados principalmente de diferentes proteínas como la caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina. Varios de los hidrolizados de las proteínas del suero digeridos con enzimas como pepsina, tripsina y proteinasa K han mostrado efecto hipotensivo cuando se han administrado a ratas espontáneamente hipertensivas (Costa y col., 2005). La combinación de pepsina-pancreatina o pepsina-quimotripsina-tripsina usualmente es utilizada para simular la degradación intestinal de las proteínas alimentarias en humanos.

Fuente de péptidos bioactivos:

De las fuentes más estudiadas para la obtención de péptidos se encuentran las proteínas de la leche (caseínas, proteínas del suero), de la carne (principalmente pescado), así como las proteínas del huevo (Korhonen y Pihlanto, 2006). Ahora bien, las plantas constituyen una de las más abundantes fuentes de biopolímeros comestibles, especialmente proteínas, debido a que son ubicuas en la naturaleza, ya sea como proteínas de reserva, importantes para el crecimiento de la plántula, o como proteínas funcionales tales como enzimas, hormonas o componentes de membrana (Aluko, 2015). En cuanto a fuentes vegetales, se han obtenido péptidos a partir de proteínas de cereales y de leguminosas, entre otras (Li y col., 2005; Cho y col., 2004; Megías y col., 2004; Yust y col., 2003; Pedroche y col., 2002; Miyoshi y col., 1991). Las fuentes de proteínas/péptidos de origen vegetal, tienen a su favor el menor costo que representa obtenerlas, así como su disponibilidad, en comparación a las de origen animal. Puntualmente, se han obtenido péptidos a partir de ajonjolí (Nakano y col., 2006), del frijol mungo (Li y col., 2005), de soya (Cho y col., 2004), de semillas de girasol (Megías y col.,

2004), garbanzo (Yust y col., 2003), chícharo (Pedroche y col., 2002) y de maíz (Miyoshi y col., 1991), entre otros.

Péptidos antihipertensivos:

La ACE cataliza la etapa de la reacción del sistema renina-angiotensina que produce una potente vasoconstricción y puede también hidrolizar e inactivar la bradiquinina (Segall y col., 2007). Consecuentemente, la ACE ha sido investigada como el principal blanco para desarrollar medicamentos y productos naturales antihipertensivos. Aunque los medicamentos que inhiben ACE se prescriben clínicamente para reducir la presión sanguínea, llegan a generar efectos secundarios provocando que se dejen de usar.

Las proteínas de origen vegetal pueden ser sometidas a hidrólisis enzimática con la finalidad de generar un amplio rango de péptidos inhibidores de la ACE, o bien se pueden combinar métodos que permitan obtener una mayor producción de dichos péptidos, por ejemplo, proteína de germen de trigo pretratada con ultrasonido generó péptidos con mayor actividad inhibitoria de ACE (~32%) comparada con la misma proteína sin tratar (Huang y col., 2014). Para el caso de proteínas de chícharo pretratadas con altas presiones (600 MPa), Chao y col. (2013) obtuvieron un incremento significativo de actividad inhibitoria de ACE. Resultados similares fueron obtenidos por García-Mora y col. (2015) para las proteínas de lenteja sometidas a altas presiones de 300 MPa.

Los tratamientos como ultrasonido o altas presiones, son utilizados para aumentar el desplegamiento de las proteínas, lo cual incrementa la exposición de enlaces peptídicos susceptibles, permitiendo así, alcanzar una mayor hidrólisis y usualmente, mayores niveles de péptidos activos.

León-Espinosa y col. (2010) reportaron la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva a partir de hidrolizados de las proteínas de la semilla de lenteja mediante el uso de tripsina, quimotripsina y pancreatina. En el mismo tenor, Vioque y col. (2006), encontraron este tipo de péptidos en diversos hidrolizados proteicos vegetales como los de garbanzo obtenidos por el uso de alcalasa, a partir de proteínas de girasol utilizando pepsina y pancreatina y en colza también con alcalasa. En el caso particular del girasol, el péptido obtenido con actividad inhibitoria de ACE, fue secuenciado y encontraron que su secuencia correspondía a un fragmento de la proteína tipo globulina 11S, la heliantina. Es decir,

encontraron que la proteína de reserva mayoritaria del girasol es una fuente de péptidos inhibidores de ACE. También se ha reportado que los péptidos obtenidos a partir de la semilla de ajonjolí, utilizando papaína como la enzima hidrolizante, poseen actividad inhibitoria de ACE (Nakano y col., 2006).

Li y col. (2002) evaluaron la capacidad de las proteínas de trigo sarraceno para inhibir la ACE y encontraron una concentración de 0.36 mg de proteína/mL necesaria para inhibir el 50% de la actividad enzimática (IC_{50}). Posteriormente, sometieron a hidrólisis con pepsina a las proteínas no encontrando una mejora en la actividad, sin embargo, cuando utilizaron pepsina, seguida de quimotripsina y tripsina, obtuvieron un incremento significativo en la actividad inhibitoria con IC_{50} de 0.14 mg de proteína/mL. Sin embargo, a fin de que los péptidos que tienen potencial aplicación como agentes antihipertensivos se requiere de confirmación de la actividad en estudios *in vivo* ya sea con modelo animal o humano (Aluko, 2015).

El uso de péptidos potencialmente bioactivos depende de su biodisponibilidad después de administración oral, asegurando su efecto en el órgano o tejido blanco. Los péptidos que resisten el proceso digestivo y llegan intactos al intestino pueden tener una función local o pueden ser capaces de atravesar el epitelio intestinal, entrar al torrente sanguíneo y tener un efecto sistémico. Por lo tanto, es importante estudiar la estabilidad de los péptidos durante la digestión, absorción, distribución, metabolismo y excreción. Las células epiteliales del intestino delgado son el primer sitio de absorción de nutrientes tales como glucosa y aminoácidos. Algunos oligopéptidos son extracelularmente hidrolizados por enzimas en la membrana del epitelio intestinal y citoplasma, produciendo aminoácidos que pueden ser absorbidos en la mucosa intestinal (Oseguera-Toledo y col., 2014).

De los péptidos antihipertensivos que han sido aislados de proteínas de origen vegetal, los derivados de las proteínas de soya son de particular interés. El primer estudio de este tipo de péptidos se realizó en 1995, donde obtuvieron hidrolizados de proteínas de soya con actividad inhibitoria de ACE (Shin y col., 1995) y con actividad antihipertensiva (Yu y col., 1995).

Siguiendo con las proteínas de soya, Wu y Ding (2001) utilizaron alcalasa para hidrolizar dichas proteínas y obtuvieron péptidos con actividad inhibitoria de ACE y actividad antihipertensiva. Hoy en día se han seguido obteniendo derivados de soya con actividad

inhibitoria de ACE por medio de digestión secuencial de las proteínas de soya con pepsina y pancreatina (Lo y Li-Chan, 2005). Por otro lado, Cha y Park (2005) obtuvieron hidrolizados de proteínas de soya con alta actividad inhibitoria de ACE utilizando proteasas derivadas de *Bacillus* sp.

Mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo de los péptidos

Dentro de los mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo se pueden mencionar la capacidad de inhibición de ACE, el efecto vascular o la capacidad antioxidante. Siendo entre estos, la capacidad de inhibición de ACE, el principal mecanismo implicado en el efecto antihipertensivo de los péptidos. La actividad de ACE es decisiva para la eficacia del sistema renina-angiotensina, el cual juega un papel importante en el mantenimiento de la presión arterial (Martínez-Maqueda y col., 2012).

La relación entre la capacidad antihipertensiva y antioxidante de muchos compuestos cada día es más clara. En el caso del sistema renina angiotensina, uno de los principales efectos dañinos de la angiotensina II es un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno, debido a que la angiotensina II activa una potente oxidasa de membrana produciendo peróxido de hidrogeno y el anión superóxido (Dzau, 2001; Laursen y col., 1997).

En relación a la capacidad antihipertensiva y antioxidante, el captopril presenta ambas capacidades y hoy en día se ha reportado que diferentes compuestos que presentan actividad antioxidante tienen la habilidad de inhibir ACE *in vitro*. Tales compuestos pueden reducir la presión arterial por medio de la combinación de acción vasodilatadora y antioxidante (Baykal y col., 2003).

La inhibición *in vitro* de la formación de angiotensina II, la cual refleja la interacción de un compuesto dado con ACE es una prueba común en la evaluación de efectos antihipertensivos. La capacidad de inhibición de ACE se expresa usualmente como IC₅₀, siendo el valor de IC₅₀ una aproximación del posible efecto antihipertensivo que pudiera mostrar *in vivo* (Li y col., 2005). El captopril es uno de los medicamentos considerados como prototipo para la inhibición de ACE, el cual presenta un valor de IC₅₀ cercano a 0.02 µM.

Hablando de la medición de la capacidad de inhibir ACE *in vitro*, en el caso de hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias, se han utilizado técnicas

espectrométricas, fluorimétricas, cromatográficas, así como también, de electroforesis capilar. Sin embargo, siempre se debe tener en mente que la determinación de la actividad de inhibición de ACE es sólo el inicio del proceso de selección de péptidos con dicha actividad, ya que muchos de los péptidos que presentan actividad inhibitoria de ACE *in vitro*, no llegan a presentar dicha actividad *in vivo*, no ejerciendo efecto antihipertensivo. Para tratar de explicar lo anterior, se ha postulado como una posibilidad lo siguiente:

Hidrolizados y/o péptidos de proteínas alimentarias que han mostrado actividad inhibitoria de ACE, han presentado dificultad para alcanzar su sitio de acción en el organismo y por consecuencia en producir el efecto fisiológico. Siendo una de las formas de administración la vía oral, es importante que los péptidos sean resistentes al proceso de digestión.

La hidrólisis de péptidos por pepsina en el estómago y por algunas enzimas pancreáticas, tales como tripsina y quimotripsina, usualmente genera péptidos de menor tamaño los cuales llegan a presentar diferente actividad inhibitoria de ACE en relación a los péptidos originalmente administrados. Pueden presentar misma actividad, es decir, la actividad inhibitoria de ACE no se ve afectada por el paso a través del tracto gastrointestinal, o bien, pueden presentar menor o mayor actividad, es decir, pueden obtenerse otros productos por la hidrólisis digestiva con menor o mayor habilidad de inhibir a ACE.

Así, por ejemplo, el péptido Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu (YKVPQL), el cual se encontró en una secuencia identificada de un hidrolizado de caseína, mostró alta actividad inhibitoria de ACE *in vitro* ($IC_{50} = 22\mu M$), pero no así actividad antihipertensiva. En el mismo hidrolizado se identificó otra secuencia peptídica, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln (KVLVPVQ), la cual mostró actividad antihipertensiva a pesar de su baja actividad inhibitoria de ACE *in vitro*, pudiendo lo anterior ser explicado por el hecho de que la digestión pancreática de dicha secuencia, liberó el extremo C-terminal formando el péptido Lys-Val-Leu-Pro-Val (KVLVPV) exhibiendo una potente actividad inhibitoria de ACE *in vitro* ($IC_{50} = 5\mu M$) y fue probablemente el responsable de la actividad antihipertensiva observada con los péptidos iniciales (Maeno, Yamamoto y Takano, 1996).

Obtención de péptidos bioactivos

Hoy en día hay un interés comercial cada vez mayor en relación a la obtención/producción de péptidos bioactivos a partir de diferentes fuentes. La producción a escala industrial de tales péptidos es, sin embargo, obstaculizado por la falta de tecnologías apropiadas. Por lo que hoy en día se considera necesario el desarrollo de tecnologías que conserven o aún mejor, aumenten la actividad de péptidos bioactivos en sistemas alimenticios.

El método más ampliamente utilizado para la producción de péptidos bioactivos *in vitro* es por medio de hidrólisis enzimática con enzimas pancreáticas, especialmente tripsina. Una vez que la secuencia de aminoácidos de la molécula es conocida, los péptidos pueden ser sintetizados por medio de síntesis química (secuencias cortas) o tecnología de DNA recombinante (secuencias de mayor tamaño) (Moller y col., 2008).

El sabor amargo que llegan a presentar algunos hidrolizados proteicos y que llega a dificultar su aplicación como ingrediente en el desarrollo y formulación de alimentos es un reto a vencer para el área de ciencia y tecnología de los alimentos, así como también lo representa la necesidad de que sean estables durante la vida de anaquel del producto. Por lo que hoy en día en el mercado existen pocos productos que han comprobado su efecto antihipertensivo *in vivo* y se mantiene durante su vida de anaquel, ejemplo de tales productos son Calpis® y Evolus®, los cuales contienen tripéptidos antihipertensivos (Moller y col., 2008).

Bibliografía

- Aleixandre, A. and Miguel, M. 2012. Food peptides as antihypertensive agents. En: Bioactive food proteins and peptides: Applications in human Health. Ed. Hettiarachchy, N.S. CRC Press. pp. 131-180.
- Aluko, R. E. 2015. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. Current Op. Food Sci., 4: 44-50.
- Baykal, Y., Yilmaz, M. I., Celik, T. and col. 2003. Effects of antihypertensive agents, alpha-receptor blockers, beta blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers and calcium channel blockers, on oxidative stress. J. Hypertens., 21: 1207-1211.

- Cha, M. and Park, J. R. 2005. Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate. *J. Med. Food*, 8: 305-310.
- Chao, D. He, R., Jung, S. and Aluko, R. E. 2013. Effect of pressure or temperature pretreatment of isolate pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. *Food Research Int.*, 54: 1528-1534.
- Cho, M. J., Unklesbay, N., Hsieh, F. H. and Clarke, A. D. 2004. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5895-5901.
- Costa, E. L., Almeida, A. R., Netto, F. M. and Gontijo, J. A. 2005. Effect of intraperitoneally administered hydrolyzed whey protein on blood pressure and renal sodium handling in awake spontaneously hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 1817-1824.
- Dzau, V. J. 2001. Theodore Cooper lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 37: 1047-1052.
- García-Mora, P., Peñas, E., Frías, J., Gomez, R. and Martínez-Villaluenga, C. 2015. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chem.*, 171: 224-232.
- Hartmann, R. and Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Op. Biotech.*, 18:163-169.
- Huang, L., Liu, B. and Zhang, X. 2014. Combined effect of ultrasound and enzymatic treatments on production of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein. *J. Food Process Preserve*, 38: 1632-1640.
- Kitts, D. D. and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food source. Applications of bioprocess used in isolation and recovery. *Current Pharm Des.*, 9(16): 1309-1323.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*, 16: 945-960.
- Laursen, J. B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B. A. and Harrison, D. G. 1997. Role of superoxide in angiotensin II-induced but catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, 95: 588-593.
- León-Espinosa, E. B., Jiménez-Martínez, J. and Dávila-Ortiz, G. 2010. Determination of antihypertensive and antioxidant of peptides from lentil (*Lentil sculenta*) protein

- hydrolysates. Presentado en: International Conference on Food Innovation. Universidad Politécnica de Valencia.
- Li, C. H., Matsui, T., Matsumoto, K., Yamasaki, R. and Kawasaki, T. 2002. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *J. Pept. Sci.*, 8 (6): 267-274.
- Li, G. H., Le, G. W., Liu, H. and Shi, Y. H. 2005. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Sci. Technol. Int.*, 11 (4): 281-287.
- Lo, W. M. and Li-Chan, E. C. 2005. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from *in vitro* pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 3369-3376.
- Maeno, M., Yamamoto, N. and Takano, T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 79: 1316-1321.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I. and Hernández-Ledesma, B. 2012. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food and Function*, 3: 350-361.
- Megías, C. Yust, M. M., Pedroche, J., Lquari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. and Vioque, J. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annus* L.) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1928-1932.
- Miyoshi, S. Ishikawa, H., Haneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Structure and activity of angiotensin-converting enzyme-inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 1313-1318.
- Moller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N. and Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indications for health effects. *Eur. J. Nutr.*, 47: 171-182.
- Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., Kwak, C., Ikemura, K., Takaoka, M., Moriguchi, S., Iino, T., Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y. and Matsumura, Y. 2006. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (5), 1118-1126.

- Oseguera-Toledo, M. E., González de Mejía, E., Reynoso-Camacho, R., Cardador-Martínez, A. and Amaya-Llano, S. 2014. Proteins and bioactive peptides- Mechanisms of action on diabetes management. *Nutrafoods*, 13: 147-157.
- Pedroche, J., Yust, M. M. Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F. and Vioque, J. 2002. Utilization of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *J. Sci. Food Agric.*, 82: 960-965.
- Segall, L., Covic, A. and Goldsmith, D. J. A. 2007. Direct renin inhibitors: the dawn of a new era, or just a variation on a theme?. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 22, 2435-2439.
- Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J., Lee, H. J. and Moon, T. H. 1995. Fraction of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from soybean paste. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 27: 230-234.
- Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M.M., Lqari, H., Megías, C., Girón-Calle, J., Alaiz, M. and Millán, F., 2006. Bioactive peptides in storage plant proteins. *Brazilian J. Food Technol.*, 99-102.
- Wu, J. and Ding, X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 501-506.
- Yu, R., Park, S. A., Chung, D. K., Nam, H. and Shin, Z. I. 1995. Effect of soybean hydrolysate on hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 1031-1036.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. and Millán, F. 2003. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chem.*, 81: 363-369.

6. MODELOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

María Gretel Michel-Barba

Karina Esmeralda Enríquez-Ramirez

Hugo Espinosa-Andrews

Tecnología alimentaria, CIATEJ, A.C.

hespinosa@ciatej.mx

Introducción

En 1952, la farmacéutica Smith Kline & French (SKF) introdujo al mercado la primera formulación de liberación sostenida. Durante más de dos décadas, la comprensión de la liberación controlada de fármacos fue establecida con base en los mecanismos de disolución, difusión, ósmosis e intercambio iónico. Estos sistemas de liberación de primera generación permitían una dosificación oral de una a dos veces al día y en sistemas transdérmicos las aplicaciones solían ser entre una vez al día o una vez a la semana. La segunda generación de sistemas de liberación fue desarrollada entre 1980 y el 2010. Estos sistemas son caracterizados por mantener una tasa de liberación de orden cero. Hidrogeles y polímeros inteligentes sensibles al entorno, por ejemplo, pH, temperatura o niveles de glucosa, auto-regulan la liberación del principio activo (Park, 2014). En la última década, el desarrollo de las nanociencias permitió a científicos y tecnólogos, realizar avances significativos en el desarrollo de nanopartículas de la liberación controlada dirigida específicamente a tumores y liberación de genes. Las nanopartículas son referidas a aquellos materiales que contienen tamaños de aproximadamente 1 nm a 100 nm. A esta escala, las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las nanopartículas difieren a las propiedades en la macroescala (Bhardwaj y Kumar, 2006). Durante los últimos años, una incontable cantidad de estudios han sido desarrollados con la finalidad de demostrar que la gran área superficial que ofrecen estos sistemas, pueden mejorar la disolución de sustancias de baja solubilidad en el tracto gastrointestinal (Park, 2014). Algunas otras ventajas del uso de nanopartículas son la

facilidad de uso, reducción del volumen de las dosis, reducción de la viscosidad de la formulación, así como una acción terapéutica más rápida (Junghanns y Müller, 2008). Sin embargo, estos mismos efectos puede presentar la desventaja de producir mayores efectos secundarios o reacciones adversas en el organismo, por lo que los entes regulatorios de cada país deben poner un mayor énfasis en determinar nuevas regulaciones que aseguren el bienestar de los consumidores.

Los sistemas de liberación de tercera generación, enfrentan cuatro principales retos (Park, 2014), 1) autorregulación de insulina, ej. sistemas de liberación sensibles a la glucosa, los cuales puedan ser capaces de liberar o no, insulina; 2) sistemas de liberación controlada de agentes anticancerígenos o siRNA a tumores, 3) sistemas de liberación de larga duración, ej. implantes que puedan controlar la liberación del principio activo de 6 meses hasta un año, y 4) desarrollo de métodos de prueba *in vitro* que sean capaces de predecir perfiles farmacocinéticos.

Rutas de administración de sustancias activas

Varias son las rutas de liberación desarrolladas para la administración de sustancias bioactivas. Entre ellas podemos encontrar las inyecciones intravenosas, infusiones intravenosas, inyecciones subcutáneas, inyección intra-arterial, administración oral, sublingual o bucal, oftálmica, tópica, rectal, transdermal, vaginal e implantes de liberación controlada. Entre todas ellas, la vía de administración oral es una de las rutas de administración de mayor aceptación por los consumidores. Sin embargo, esta forma de administración presenta la desventaja de una limitada absorción de muchas de las sustancias activas, así como la posible degradación de las mismas antes de la absorción (Saltzman, 2001).

El diseño de sistemas de liberación por la vía oral requiere del conocimiento adecuado de diversos factores farmacocinéticos y farmacodinámicos (dosis, tasa de disolución, mecanismo de transporte de masa que involucra al proceso de liberación y la determinación cuantitativa de la cinética de liberación), así como de las características de los polímeros (tipo y peso molecular, composición, estructura), sustancia activa (solubilidad, estabilidad, carga,

interacción con la matriz y propiedades fisicoquímicas), medio de liberación (pH, temperatura, fuerza iónica, enzimas, polaridad y presencia de coadyuvantes) (Andreetta 2003, Laviña, Angulo *et al.* 2004). Para una dosis, la cantidad de partículas tomadas en exceso, podrían resultar en efectos tóxicos en el organismo, así como en una baja absorción del principio activo, lo que podría generar una baja acción terapéutica (Bhardwaj y Kumar, 2006).

El comportamiento de estos sistemas depende factores fisiológicos, incluyendo la temperatura, volumen y composición de los fluidos gastrointestinales, enzimas, tránsito y movilidad gástrica, microflora bacteriana y el pH; estos son influenciados por el sexo, actividad física, la edad y hábitos alimenticios. Estos parámetros deben considerarse para el diseño de sistemas de liberación; sin embargo, la variabilidad y complejidad de estos factores no se toma en cuenta en las pruebas *in vitro*. De hecho, la variabilidad entre individuos y poblaciones específicas es significativa, por lo que es necesario la evaluación y validación de los sistemas de liberación en modelos preclínicos adecuados (McConnell, Fadda *et al.* 2008). Entre mayor sea la comprensión de los parámetros que interfieren en la liberación, mejor será el diseño y por ende mejor será la correlación *in vitro- in vivo* (Benita 2005). Los sistemas de liberación de moléculas tienen diversas morfologías internas y externas, las cuales determinan su estabilidad y funcionalidad (Davidov-Pardo, Joye *et al.* 2015).

Modelos de liberación de sustancias activas

Las cinéticas de liberación pueden ser comprendidas empleando varios modelos basados en su naturaleza, mediante modelos teóricos, semi-empíricos o empíricos (Tabla 1).

Tabla 1. Modelos matemáticos de cinéticas de liberación (Flores y Kong, 2017).

Modelo	Ecuación	Detalles
Modelos teóricos		
Difusión Fickiana (película delgada)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{4d_c^2}\right)$ $\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\pi d_c^2}}$	Tiempos largos: $0.4 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 1$ Tiempos cortos: $0 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 0.6$
Difusión Fickiana (esfera)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{d_c^2}\right)$ $\frac{M_t}{M_\infty} = 6 \sqrt{\frac{Dt}{\pi d_c^2}} - \frac{3Dt}{d_c^2}$	Tiempos largos Tiempos cortos
Modelos semi-empíricos		
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{0.5}$	$0.1 \leq \frac{M_t}{M_\infty} \leq 0.6$
Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_d t^m + k_r t^{2m}$	$k_d t^m$ para difusión $k_r t^{2m}$ para transporte caso II
Korsmeyer-Peppas / Ritger-Peppas/Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$	Para partículas esféricas: $n \leq 0.43$; Difusión Fickiana (Transporte caso I) $0.43 \leq n < 0.85$; no Fickiana (difusión e hinchamiento) $n \geq 0.85$; transporte caso II $n > 1$; transporte súper caso II

Abreviaciones: d_c , dimensión característica; M_t (o Q_t), cantidad (o fracción) liberada después del tiempo t ; M_∞ (o Q_∞) cantidad (o fracción) liberada en equilibrio.

Tabla 1 (*continuación*). Modelos matemáticos de cinéticas de liberación.

Modelos empíricos		
Orden cero	$\frac{M_t}{M_\infty} = 100(1 - kt)$	Fracción liberada independiente de la concentración inicial
	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt$	Fuente de actividad constante
	$Q_t = Q_0 - kt$	
Primer orden	$\frac{M_t}{M_\infty} = 100(1 - e^{-kt})$	Fuente de actividad no constante
	$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = -kt$	
	$\ln Q_t = \ln Q_0 - kt$	

Abreviaciones: M_t (o Q_t), cantidad (o fracción) liberada después del tiempo t ; M_∞ (o Q_∞) cantidad (o fracción) liberada en equilibrio.

Los materiales encapsulantes generalmente liberan su contenido por difusión Fickiana o en múltiples etapas. La solución analítica de las ecuaciones Fickianas pueden simplificarse de acuerdo a su geometría. Estos modelos teóricos pueden utilizarse para comparar coeficientes de difusión de un bioactivo con diferentes matrices acarreadoras, diferentes concentraciones de matrices o para evaluar la posible desviación del estado estacionario de las ecuaciones empíricas (Flores y Kong 2017). Por otra parte, la ecuación semi-empírica de Korsmeyer-Peppas permite identificar el o los mecanismos (difusión, hinchamiento o erosión) que predominan en la liberación a través del exponente n .

La cinética de orden cero es la tasa de liberación del principio activo más deseable con el fin de minimizar oscilaciones de la concentración del bioactivo en la sangre. La Fig. 1 muestra el perfil de concentración del principio activo sobre el plasma cuando estos son administrados desde sistemas de liberación de dosificación rápida. Generalmente, existe un

rango deseado del principio activo a nivel plasmático en el cual se puede garantizar el efecto terapéutico, mientras que una baja o elevada concentración de éste podría exponer al paciente a los niveles de baja eficiencia terapéutica o toxicidad del principio activo, respectivamente.

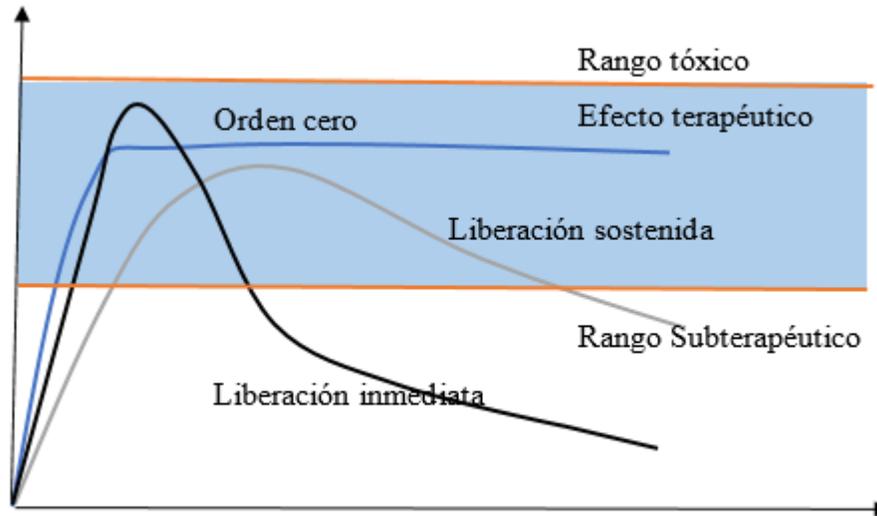


Fig. 1 Perfiles de concentración del principio activo (Adaptado de Siegel y Rathone, 2012).

Si se requiere de una interpretación profunda de los fenómenos que ocurren en la liberación es recomendable utilizar métodos matemáticos exactos, ya que los modelos semi-empíricos no tienen en cuenta en su totalidad estos parámetros, sin embargo, estos últimos son útiles, por ejemplo, cuando son empleados en nuevos sistemas de liberación.

Mecanismos de liberación

La liberación de bioactivos encapsulados comprende principalmente tres etapas: liberación superficial, difusión a través del hinchamiento de la matriz y la erosión de la misma (Peng, Xiong *et al.* 2010). Siepmann y Siepmann (2008) proponen más mecanismos como la degradación de la matriz (por acción enzimática y pH), presión hidrostática, desarrollo de fisuras, y cambios en la geometría.

1. *Mecanismo de difusión*

El proceso de difusión ocurre cuando el agente activo atraviesa el polímero que conforma el material de barrera, estimulado por el gradiente de concentración entre el sistema de liberación y el medio que lo rodea. Los mecanismos de difusión pueden ser descritos por la ley de Fick (Siepmann y Peppas 2011), en la cual el Flux difusivo de transferencia de masa de una sustancia es proporcional al gradiente de concentración.

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}$$

Donde, J representa el flux de transferencia de masa, D es el coeficiente de difusión del principio activo en el medio de liberación y $\partial C/\partial x$ es el gradiente de difusión del principio activo en la dirección x . En la mayoría de estos sistemas las principales consideraciones son 1) la difusión del principio activo es limitado por la tasa de liberación, 2) el dispositivo no presenta un cambio de volumen relacionado con el hinchamiento, o erosión, 3) el coeficiente de difusión de la sustancia activa permanece constante durante el proceso de liberación.

Los coeficientes de difusión en ambientes acuosos son usualmente medidos mediante la observación de los cambios de concentración en el tiempo. Usualmente, el coeficiente de difusión de una sustancia en un medio de dispersión depende del peso molecular, forma y concentración de los principios activos; así como del medio de liberación. Para una completa derivación de las ecuaciones de conservación, así como una comprensión más profunda sobre los mecanismos de transporte gobernados por difusión, el lector puede consultar Siepmann y Siepmann, (2012).

2. *Mecanismo de hinchamiento*

Cuando la matriz es termodinámicamente compatible con el medio, el polímero tiene la capacidad de hincharse y el agente activo, puede difundirse hacia el exterior de la matriz. En este tipo de mecanismo la membrana sufre una transición de un estado vítreo a uno gelificado, lo cual provoca una mayor movilidad de las cadenas poliméricas al interaccionar con el medio (Andretta 2003, Javier; González Santos *et al.* 2010). La velocidad de liberación se determina por el proceso de transición vítreo-gel y está representada a través de la ecuación

de Korsmeyer-Peppas / Ritger-Peppas/Peppas. Esta ecuación es el resultado de la combinación de dos procesos independientes, el transporte del agente activo, que obedece la ley de Fick, y el hinchamiento del gel. Donde, k es una constante que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación, n es el exponente que indica el mecanismo de liberación de la sustancia activa.

En el caso de $n = 1$ la cinética del sistema de liberación es de orden cero y el proceso de liberación es controlado por la relajación de las cadenas poliméricas (Pothakamury y Barbosa-Cánovas 1995). En este caso, la difusión se produce a velocidad constante, mientras no cambie la geometría del sistema durante el proceso de liberación (transporte Caso II). Es decir, la sustancia activa se transporta desde la matriz de disolución, sin que ésta se desintegre, ej. sistemas transdérmicos o sistemas osmóticos. Cuando el valor de n es 0.50 la liberación sigue un mecanismo de difusión de tipo Fickiano o transporte caso I. Una difusión anómala o no Fickiana se produce cuando los valores de n son mayores que 0.50 y menores de 1.

Peppas y Sahlin (1989) propusieron una ecuación para un sistema de cualquier forma y en la cual K_d representa la contribución del mecanismo Fickiano y K_r representa la contribución al mecanismo de relajación de las cadenas poliméricas y n es el exponente de difusión Fickiano (Tabla 1).

3. *Mecanismo de erosión*

La erosión se define como el proceso de pérdida de material de la masa de polímero (Göpferich, 1996) y se presenta de dos maneras: heterogénea y homogénea, dependiendo de la hidrofobicidad y morfología del polímero. En el primer caso, la escisión de la cadena polimérica es mucho más rápida que la penetración de agua en el sistema. En consecuencia, el proceso de degradación o erosión afecta predominantemente en la superficie. Por el contrario, sí la penetración de agua es mucho más rápida que la escisión de la cadena polimérica, todo el sistema se humedece rápidamente y la degradación ocurre en todo el polímero (erosión homogénea) (Langer y Peppas, 1983). La erosión heterogénea es deseable debido a que puede conducir a una velocidad de liberación constante, independiente de las propiedades químicas y físicas del agente activo (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 r}\right]^n$$

Donde, M_t es la cantidad absoluta del agente activo liberada al tiempo t , C_0 es la concentración inicial del agente activo en el sistema matricial, M es la cantidad total del agente activo liberada a tiempo infinito; k_0 constante de velocidad de erosión; r es el radio de la geometría de la matriz (esfera, cilindro o media del espesor de una placa), $n= 3$ para una esfera, $n=2$ para un cilindro y $n=1$ para una placa.

Caracterización de sistemas de liberación

La liberación de un agente activo puede estar basada en uno o una combinación de los mecanismos de liberación anteriores. Siepmann y Siepmann (2011) sugieren caracterizar fisicoquímicamente los sistemas de liberación, antes y después de la exposición a los medios de liberación de la siguiente manera:

1. Realizar estudios de liberación bajo condiciones que simulen el ambiente *in vivo*
2. Conocer mediante estudios gravimétricos la captación y pérdida de agua
3. Conocer los cambios de la macro o microestructura, morfología, y porosidad
4. Monitorear la distribución del principio activo y el agua dentro de los sistemas de liberación
5. Medir las propiedades térmicas del sistema
6. Conocer el perfil de difracción de rayos X
7. Medir las condiciones de humectabilidad y propiedades mecánicas

Los análisis térmicos y de difracción de rayos X pueden ayudar a identificar el estado físico de los compuestos bioactivos y matrices poliméricas en el sistema, especialmente en el caso de compuestos que pueden cristalizar en diferentes formas, exhibiendo diferentes propiedades claves como la solubilidad en soluciones acuosas (Kreye, Siepmann *et al.* 2011). Una vez que se conocen los parámetros específicos del sistema (p. ej. el coeficiente de difusión aparente del compuesto en estudio), las teorías matemáticas apropiadas permiten predicciones cuantitativas de los efectos de diferentes parámetros de formulación y procesamiento sobre la cinética de liberación (Seidenberger, Siepmann *et al.* 2011).

Aplicaciones

La encapsulación de bioactivos ha sido utilizada para proteger la funcionalidad de las sustancias, mejorar la estabilidad de los compuestos de interés, enmascarar sabores indeseables, y a su vez, pueden diseñarse para que liberen su contenido de manera prolongada, incrementando la biodisponibilidad de los mismos (Davidov-Pardo, Joye *et al.* 2015). Esta tecnología consiste en recubrir un principio activo con un material encapsulante o acarreador (Madene, Jacquot *et al.* 2006).

Uno de los biomateriales de mayor atención en las últimas décadas es el quitosano. El quitosano es un polímero biodegradable y altamente biocompatible empleado en el desarrollo de sistemas de liberación controlada. Gomathi, Govindarajan *et al.* (2014) evaluaron los perfiles de liberación controlada de lenalidomida en nanopartículas de quitosano reticuladas por gelación iónica con hexametáfosfato de sodio. Las partículas generadas se encontraron en el intervalo de 220 a 295 nm y una eficiencia de encapsulación fue 99.4%. Los resultados mostraron que el mecanismo de liberación fue controlado por difusión, alcanzando 60% de liberación en un periodo de 80 h.

Por otra parte, Zou, Zhao *et al.* (2015) encapsularon albúmina de suero bovino en microesferas de quitosano empleando tripolifosfato de sodio y glutaraldehído como agentes reticulantes. Las microesferas de quitosano presentaron tamaños promedio entre 5 a 10 μm , superficie lisa, alta productividad y capacidad de respuesta al pH. Estos sistemas fueron ajustados a diferentes modelos matemáticos: orden cero, primer orden, modelo de Higuchi y modelo de Korsmeyer-Peppas. Con base en el coeficiente de correlación, se estableció que el modelo de Korsmeyer-Peppas fue el modelo más apropiado para describir la cinética de liberación. Los valores obtenidos del exponente n fueron estimados entre 0.081 y 0.176, sugiriendo un comportamiento de liberación controlado por difusión.

Paini, Aliakbarian *et al.* (2015) prepararon microcápsulas de quitosano/dextrano producidas por la técnica electrostática de autoensamblaje capa por capa para encapsular mezclas de cuatro polifenoles. La máxima eficiencia de encapsulación fue obtenida en una relación de 35:65 etanol:agua, con un porcentaje de carga del $42.0 \pm 0.6\%$. En medio ácido, los polifenoles fueron liberados en ausencia de etanol en los primeros 30 min, mientras que

para las nanocápsulas cargadas en presencia de etanol, presentaron perfiles de liberación dentro de los primeros 60 min. La cantidad total de polifenoles liberados fue mayor cuando el etanol se encontraba presente en la solución en el interior del encapsulado. Los resultados sugirieron que las nanocápsulas a base de polisacáridos pueden ser utilizadas para encapsular y liberar moléculas de baja solubilidad en agua.

Seidenberger, Siepmann *et al.* (2011) realizaron un estudio con el objetivo de controlar simultáneamente la liberación de múltiples vitaminas (nicotinamida, hidrocloreuro de piridoxina, riboflavina 5'-fosfato, riboflavina, hidrocloreuro de tiamina y nitrato de tiamina) las cuales presentan diferente solubilidad en agua y pesos moleculares. En este trabajo se estudiaron varios tipos de ésteres de sacarosa y triglicéridos como materiales formadores de matrices. Las partículas fueron preparadas por granulación vía húmeda, granulación por fusión o por compresión y molienda. En estos sistemas, el mecanismo de transporte de masa dominante fue el difusivo. Los resultados permitieron predecir cuantitativamente los efectos de la composición y dimensiones de los sistemas en los medios de liberación.

Serrano-Cruz, Villanueva-Carvajal *et al.* (2013) evaluaron la liberación de compuestos fenólicos a partir de extracto de *Hibiscus sabdariffa* encapsulada con mezclas binarias y ternarias de proteína de suero, carboximetil celulosa y pectina. Los perfiles de liberación fueron obtenidos mediante la cuantificación de los polifenoles totales y la actividad antioxidante en el tiempo. Los datos obtenidos fueron correlacionados con un modelo cinético de primer orden ($R^2 > 0.9$): $B=A_0(1-\exp[-kt])$, donde B representa la absorbancia de los polifenoles o unidades de capacidad antioxidante en el tiempo t , k es una constante de velocidad, y A_0 es la concentración de los polifenoles o unidades de capacidad antioxidante en el tiempo infinito. Los autores concluyeron que, es posible controlar los perfiles de liberación de los polifenoles mediante el control de la composición de la matriz polimérica.

Conclusión

La liberación de compuestos bioactivos depende de múltiples factores fisicoquímicos y fisiológicos. Una manera de mejorar el diseño y la comprensión de estos sistemas es a través del desarrollo de herramientas matemáticas y estadísticas que permitan el ajuste y

comparación de modelos con el fin de determinar los mecanismos de liberación que influyen en una aplicación en particular. Los modelos teóricos, empíricos y semi-empíricos tienen ventajas y desventajas dependiendo de su aplicación, sin embargo, todos ellos son herramientas valiosas para la interpretación de los fenómenos físicos, químicos y biológicos, producto de la interacción entre bioactivo, matriz y medio de liberación.

Agradecimiento

Los autores extienden su agradecimiento al “Fondo de Investigación Básica SEP-CONACYT” CB-2015-01-258118.

Referencias

- Andretta, H. A. (2003). "Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos." *Acta Farmacéutica Bonaerense* 22(4): 355-364.
- Bhardwaj, V. y Kumar, M.N.V.R. Polymeric nanoparticles for oral drug delivery. In *Nanoparticle Technology for drug delivery*. Edited by Gupta, R.B. & Kompella, U.B. Taylor & Francis, New York, London. 2006, 231-262.
- Benita, S. (2005). *Microencapsulation: methods and industrial applications*, CRC Press.
- Davidov-Pardo, G., I. J. Joye y D. J. McClements (2015). "Food-Grade Protein-Based Nanoparticles and Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, and Utilization." *Advances in protein chemistry and structural biology* 98: 293-325.
- Flores, F. P. y F. Kong (2017). "*In Vitro* Release Kinetics of Microencapsulated Materials and the Effect of the Food Matrix." *Annual Review of Food Science and Technology* 8: 237-259.
- Gomathi, T., C. Govindarajan, M. H. Rose H.R, P. N. Sudha, P. K. M. Imran, J. Venkatesan y S.-K. Kim (2014). "Studies on drug-polymer interaction, *in vitro* release and cytotoxicity from chitosan particles excipient." *International Journal of Pharmaceutics* 468(1-2): 214-222.
- Göpferich, A. (1996). "Polymer degradation and erosion: mechanisms and applications." *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 42(1): 1-11.
- Javier; A. F., R. González Santos y G. Fuentes Esteves (2010). "Estudio *in vitro* de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto." *Revista CENIC. Ciencias Químicas*: 1-8.

- Junghanns, J.-U. A. H.; Müller, R. H., Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine* 2008, 3 (3), 295-310
- Kreye, F., F. Siepman, J. F. Willart, M. Descamps y J. Siepman (2011). "Drug release mechanisms of cast lipid implants." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78(3): 394-400.
- Langer, R. y N. Peppas (1983). "Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review." *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics* 23(1): 61-126.
- Laviña, E. H., L. J. S. Angulo y V. Sáez (2004). "Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros." *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5(1): 5.
- Madene, A., M. Jacquot, J. Scher y S. Desobry (2006). "Flavour encapsulation and controlled release—a review." *International journal of food science & technology* 41(1): 1-21.
- McConnell, E. L., H. M. Fadda y A. W. Basit (2008). "Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery." *International journal of pharmaceutics* 364(2): 213-226.
- Paini, M., B. Aliakbarian, A. A. Casazza, P. Perego, C. Ruggiero y L. Pastorino (2015). "Chitosan/dextran multilayer microcapsules for polyphenol co-delivery." *Materials Science and Engineering: C* 46: 374-380.
- Park, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release* 190, 2014, 3-8
- Peng, H., H. Xiong, J. Li, M. Xie, Y. Liu, C. Bai y L. Chen (2010). "Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol." *Food Chemistry* 121(1): 23-28.
- Peppas, N. A. y J. J. Sahlin (1989). "A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation." *International Journal of Pharmaceutics* 57(2): 169-172.
- Pothakamury, U. R. y G. V. Barbosa-Cánovas (1995). "Fundamental aspects of controlled release in foods." *Trends in Food Science & Technology* 6(12): 397-406.
- Saltzman, W. M. Drug delivery. Engineering principles for drug therapy. 2001. Oxford university press. pp 12
- Seidenberger, T., J. Siepman, H. Bley, K. Maeder y F. Siepman (2011). "Simultaneous controlled vitamin release from multiparticulates: Theory and experiment." *International Journal of Pharmaceutics* 412(1–2): 68-76.

Serrano-Cruz, M. R., A. Villanueva-Carvajal, E. J. M. Rosales, J. F. R. Dávila y A. Dominguez-Lopez (2013). "Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin." *LWT-Food Science and Technology* 50(2): 554-561.

Siegel R. A. and Rathbone M. J. Overview of Controlled Release Mechanisms. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* Editors: Juergen Siepmann, Ronald A. Siegel, Michael J. Rathbone. Cap 2. 2012

Siepmann, J. y N. A. Peppas (2011). "Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse." *International Journal of Pharmaceutics* 418(1): 6-12.

Siepmann, J. y F. Siepmann (2008). "Mathematical modeling of drug delivery." *International journal of pharmaceutics* 364(2): 328-343.

Siepmann, J. y F. Siepmann (2011). "Mathematical modeling of drug release from lipid dosage forms." *International Journal of Pharmaceutics* 418(1): 42-53.

Siepmann, J. y F. Siepmann (2012). "Modeling of diffusion controlled drug delivery" *Journal of Controlled Release* 161: 351-362.

Uhrich, K. E., S. M. Cannizzaro, R. S. Langer y K. M. Shakesheff (1999). "Polymeric systems for controlled drug release." *Chemical reviews* 99(11): 3181-3198.

Zou, X., X. Zhao, L. Ye, Q. Wang y H. Li (2015). "Preparation and drug release behavior of pH-responsive bovine serum albumin-loaded chitosan microspheres." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 21: 1389-1397.

7. MODELADO *in silico* DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.

Dr. Órfil González Reynoso

Depto. de Ing. Química. Universidad de Guadalajara

Dr. José Daniel Padilla de la Rosa*

Tecnología alimentaria, CIATEJ, A.C.

orfil.gonzalez@cucei.udg.mx; * jdpadilla@ciatej.mx

Todas las enfermedades empiezan en el intestino. Hipócrates (460-370 A.C.)

Introducción

El microbioma intestinal es el conjunto de especies microbianas que predominan en el intestino de un ser humano, y que tiene como principal función contribuir en el proceso de digestión de los alimentos vía actividad metabólica, impactando la fisiología humana y repercutiendo, tanto en la conservación de la salud, como en la aparición de ciertas enfermedades tales como obesidad, diabetes tipo 2 y aterosclerosis¹⁻³. Mientras que nuestros genomas son esencialmente estáticos, nuestros microbiomas son inherentemente dinámicos⁴. Estudios de metagenómica en el intestino humano han encontrado que, el número de genes presentes en la microbiota intestinal, es al menos 150 veces más grande que el conjunto de genes humanos en un individuo³. De las más de 1000 especies presentes en los consorcios intestinales, 160 especies predominan en los seres humanos. La composición bacteriana corresponde principalmente a las especies pertenecientes al *phylum Firmicutes* y *phylum Bacteroides*, las cuales representan más del 90% de la densidad microbiana en el colon y en menor medida a *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Euryarchaeota*^{3,5}.

La función del intestino, específicamente la microbiota residente, en la salud general y el bienestar de los seres humanos es ahora reconocido como fundamental. Esta comunidad de microorganismos tiene profundos efectos en el bienestar cotidiano de la huésped, el suministro de energía, nutrientes, compuestos bioactivos, la desintoxicación, y resistencia a enfermedades infecciosas⁶.

Uno de los retos hoy en día es entender la fisiología de los consorcios intestinales y su interrelación con las enfermedades cuyo entendimiento es la vía para su detección oportuna y tratamiento.

El Proyecto Genoma Humano fue terminado hace una década, dejando un legado de procesos y herramientas. Actualmente, la infraestructura se enfocó hacia el estudio de los microbios que viven en el cuerpo humano como determinantes de la salud y la enfermedad, y ha sido denominado <El Proyecto Microbioma Humano> ⁷. Dicho proyecto surge como una esfuerzo en conjunto de los institutos nacionales de salud en los Estados Unidos para caracterizar el microbioma intestinal, con el fin de determinar la existencia de un microbioma humano común y a partir de ese conocimiento, estudiar los cambios del microbioma y su correlación con las enfermedades humanas ⁸.

La microbiota intestinal simbiótica modulan la salud y la enfermedad del hospedero a través de una serie de ejes transgenómicos, metabólicos y de regulación inmune ⁹. Se ha encontrado que la interrelación del microbioma humano con las funciones fisiológicas del organismo humano, son atribuibles a ácidos grasos de cadena corta, acetato, propionato y butirato los cuales, son productos del metabolismo microbiano ⁸ y que a su vez modulan la composición de la microbiota intestinal. Algunos de los principales efectos se ilustran a continuación.

Tabla 1. Efectos metabólicos y microbianos. Holmes *et al.* (2012)

Intervención	Efecto en la microbiota	Efecto en el metabolismo
Prebióticos	Incrementa las <i>Bifidobacteria</i> y población de <i>Lactobacillus</i>	
Probióticos	Equilibrio comunidad microbiana intestinal	Producción de ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y acetato).
Fibra	A la inversa asociada con <i>Bacteroides</i> y <i>Actinobacteria</i> y positivamente asociada con <i>Firmicutes</i> y <i>Proteobacteria</i> .	

Dada la dificultad para acceder a los principales sitios del intestino, en se han desarrollado modelos *in vitro* para monitorear dinámicamente los procesos microbianos en el sitio de la actividad metabólica. Estos modelos van desde fermentaciones por lotes simples a complejos sistemas continuos multicompartimentados. Estos últimos incluyen diferentes

modelos, pero enfocados en distintos parámetros digestivos. Los más intensamente utilizados incluyen sistemas de cultivos en continuo en tres etapas, SHIME, EnteroMix, modelo Lacroix y TIM-2.⁵ Un caso de éxito es el caso del modelo *ex vivo* desarrollado en CIATEJ⁽¹⁰⁾.

A partir de estos sistemas es posible contar con datos experimentales en cuanto a la composición de la microbiota, así como también del monitoreo de metabolitos clave para el estudio de la fisiología de la microbiota intestinal.

La ingeniería metabólica posee diferentes metodologías que pueden ser útiles en el estudio de la fisiología de microbiota intestinal con un enfoque sistémico y que pueda ayudar a identificar la interacción de metabolitos clave y su rol en el metabolismo humano.

Dado la complejidad del metabolismo celular estudiarlo requiere de metodologías con un enfoque sistémico, usadas actualmente en la ingeniería metabólica, la cual ha cobrado mucha fuerza en las últimas décadas.

Ingeniería Metabólica: modelado *in silico* del microbioma

La ingeniería metabólica es una ciencia multidisciplinaria enfocada en el análisis y modificación de rutas metabólicas. La ingeniería metabólica busca mejorar la capacidad de producción de metabolitos o de dotar de ciertas capacidades deseables en las células mediante la tecnología del ADN recombinante. En cuanto al análisis del metabolismo celular, toma como base las distribuciones de flujos metabólicos¹¹ que es el objetivo medular de algunas metodologías de la ingeniería metabólica y cuya estimación está fundamentada en el conocimiento de la estequiometría de organismos ya secuenciados.

La distribución de flujos metabólicos constituye en sí misma una radiografía del sistema metabólico, es decir, la esencia de su fisiología, de su fenotipo y sus diferentes cambios asociados a diferentes factores (dieta, composición, pH, concentración de metabolitos clave) nos permiten estudiar de manera clara la interrelación de las diferentes especies microbianas y su efecto en el metabolismo humano.

Metodologías de ingeniería metabólica

Diferentes metodologías se han desarrollado para el análisis del metabolismo celular y su regulación, sin embargo, algunas de estas metodologías requieren de información

detallada de la cinética, concentraciones de enzimas y de varios cofactores que muchas veces no es posible contar con ellas ¹². Las metodologías más comunes de la ingeniería metabólica reportadas en literatura son: Análisis de flujos metabólicos (MFA, por sus siglas en inglés), análisis de rutas metabólicas (MPA, por sus siglas en inglés), análisis y balance de flujos (FBA, por sus siglas en inglés), análisis dinámico y balance de flujos metabólicos (DFBA, por sus siglas en inglés) y análisis y control metabólico (MCA, por sus siglas en inglés) entre otros.

De todas las metodologías antes mencionadas, la metodología FBA es una excelente herramienta para la predicción de la distribución de flujos metabólicos y que puede ser enriquecida con datos experimentales. Su limitante es que debe ser aplicable, ya sea para el estado estacionario o en la fase lineal de crecimiento de los microorganismos.

Balance de flujos metabólicos (FBA), punto de partida para el conocimiento de la fisiología celular.

Empleando la metodología de FBA ¹³, es posible desarrollar un modelo metabólico, que a pesar de no contar con información de la cinética, sea capaz de calcular y predecir las distribuciones de flujos para la red metabólica, basado en restricciones termodinámicas. La metodología se fundamenta en un balance de masa para cada metabolito considerado en la red de reacciones bioquímicas. Esta metodología ha sido usada exitosamente en bacterias para estudiar las capacidades del metabolismo celular en *E. coli* ¹⁴⁻¹⁶ combinando así satisfactoriamente la biología *in silico* con la biología experimental, y demostrando como esta metodología nos permite obtener una relación cuantitativa del genotipo-fenotipo del microorganismo.

La información genómica acoplada con bioquímica e información específica de cepas de microorganismos han sido utilizadas para reconstruir redes metabólicas para organismos secuenciados genéticamente ¹². Sin embargo, esta información por sí sola no es suficiente para especificar completamente la expresión del fenotipo metabólico bajo las diferentes condiciones de fermentación. El fenotipo metabólico de un microorganismo puede ser analizado en base a distribuciones de flujos en una red metabólica. La interpretación y

predicción de distribuciones de flujos metabólicos requiere del modelado matemático y simulación por computadora ¹².

Modelos metabólicos a escala genómica (GEMs)

La secuenciación del genoma de un sinnúmero de microorganismos ha permitido el desarrollo de los modelos metabólicos a escala genómica. Los modelos metabólicos a escala genómica (GEMs) son colecciones de reacciones bioquímicas y los genes asociados, que indican la existencia de proteínas en el organismo objetivo. Varios modelos metabólicos han sido reconstruidos como por ejemplo: *E. coli*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium crysogenum* ³. Debido a la extrema complejidad de los trastornos de obesidad, diabetes tipo 2 y cáncer, es necesario desarrollar modelos matemáticos para descifrar el papel de sus elementos individuales, así como todo el sistema y dichos modelos pueden ayudar a un mejor entendimiento de las interacciones entre las bacterias en el intestino humano y el hospedero mediante el uso de modelos metabólicos a escala del genoma (GEMs) ³.

La construcción de los modelos metabólicos (Fig. 1) a escala genómica, parte de bases de datos de organismos secuenciados (KEGG, Brenda, Bio-CYC), para los cuales se conoce la estequiometría de sus rutas metabólicas. A partir de la estequiometría de las rutas se construye una matriz estequiométrica, que, aunado a restricciones termodinámicas, compartimentales y fisiológicas hace posible el cálculo de distribución de flujos de metabolismo celular mediante técnicas de optimización lineal.

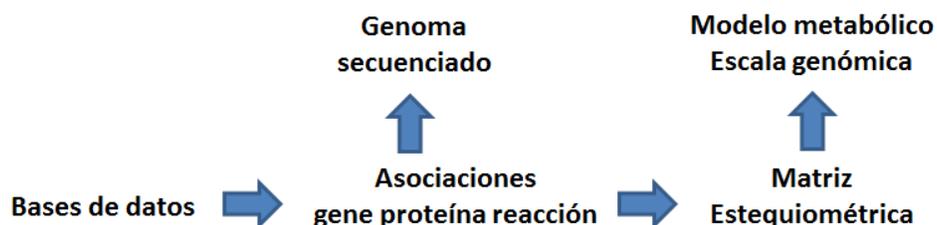


Fig. 1. Esquema global de la reconstrucción de un modelo metabólico a escala genómica.

Shoaie & Nielsen (2014).

Los modelos metabólicos sirven para estudiar la interrelación en dos o más microbios haciendo evidente la existencia o no de interacciones (competencia o cooperación). En el caso de la competencia, los microorganismos compiten por los mismos sustratos, mientras

que en el caso de la cooperación, se establecen relaciones simbióticas, como es el caso del comensalismo (interacción en una vía) o mutualismo (interacción de dos vías)^{3,17}. Así las ciencias óhmicas desde la genómica hasta la metabolómica requieren de conocer el fenotipo del microorganismo a través de su fisiología mediante la estimación distribución de flujos metabólicos que es la esencia de la ingeniería metabólica. El uso de metodologías como FBA para el estudio de la fisiología de microbiota intestinal con un enfoque sistémico, es una de las nuevas tendencias actuales para entender la interacción de los microorganismos clave y su rol en el metabolismo humano.

Bibliografía

1. Krishnan, S., Alden, N. & Lee, K. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **36**, 137–145 (2015).
2. Karlsson, F. H., Nookaew, I., Petranovic, D. & Nielsen, J. Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome. *Trends Biotechnol.* **29**, 251–258 (2011).
3. Shoaie, S. & Nielsen, J. Elucidating the interactions between the human gut microbiota and its host through metabolic modeling. *Front. Genet.* **5**, 86 (2014).
4. Gerber, G. K. The dynamic microbiome. *FEBS Lett.* **588**, 4131–4139 (2014).
5. Venema, K. & van den Abbeele, P. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **27**, 115–126 (2013).
6. Ndagijimana, M. *et al.* Effect of a synbiotic food consumption on human gut metabolic profiles evaluated by ¹H Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 147–153 (2009).
7. Dave, M., Higgins, P. D., Middha, S. & Rioux, K. P. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl. Res.* **160**, 246–257 (2012).
8. Shoaie, S. *et al.* Understanding the interactions between bacteria in the human gut through metabolic modeling. *Sci. Rep.* **3**, 2532 (2013).
9. Holmes, E., Li, J. V, Marchesi, J. R. & Nicholson, J. K. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab.* **16**, 559–564 (2012).

10. Gonzalez Avila Marisela (CIATEJ) & Diana, A. S. (CIATEJ). Proceso para simulación de tracto digestivo humano. (2013). Solicitud de patente MX2012005418A.
11. Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. a & Nielsen, J. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies. Metabolic Engineering* **54**, (1998).
12. Edwards, J. S., Covert, M. & Palsson, B. Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environ. Microbiol.* **4**, 133–140 (2002).
13. Schilling, C. H. & Palsson, B. O. The underlying pathway structure of biochemical reaction networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4193–4198 (1998).
14. Edwards, J. S., Ibarra, R. U. & Palsson, B. O. *In silico* predictions of Escherichia coli metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat. Biotechnol.* **19**, 125–130 (2001).
15. Edwards, J. S. & Palsson, B. O. Metabolic flux balance analysis and the in silico analysis of Escherichia coli K-12 gene deletions. *BMC Bioinformatics* **1**, 1 (2000).
16. Varma, A. & Palsson, B. O. Metabolic Capabilities of Escherichia coli: I. Synthesis of Biosynthetic Precursors and Cofactors. *J. Theor. Biol.* **165**, 477–502 (1993).
17. Mahadevan, R. & Henson, M. A. Genome-based Modeling and Design of Metabolic Interactions in Microbial Communities. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, e201210008 (2012).

8. MODELADO MATEMÁTICO DEL METABOLISMO PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

Roberto Olivares Hernández

Departamento de Proceso y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

*rolivares@correo.cua.uam.mx

Resumen

La tecnología de ADN recombinante dio paso a una era moderna en el campo de desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, ya que permitió la posibilidad de expandir las capacidades de los microorganismos biológicos para la producción de compuestos a través de la modificación genética. De manera semejante, la secuenciación genómica ha impulsado el uso de técnicas que permiten caracterizar y cuantificar los procesos celulares y poder optimizar su uso para nuevas aplicaciones en la producción de compuestos para los sectores de alimentos, salud, química y energía. Como parte de las estrategias para la producción de compuestos con base biológica, los modelos matemáticos y computacionales se aplican para interpretar, evaluar datos, diseñar experimentos, caracterizar funciones y generar estrategias de optimización. En un caso particular, a través del modelado matemático se ha logrado alcanzar una visión integral del desempeño metabólico de los microorganismos y células en función de los estímulos externos a los que se encuentran sujetos. Este capítulo tiene el objetivo de introducir al lector sobre el conocimiento de los modelos y herramientas computacionales para el modelado matemático de metabolismo celular y se mencionan diversas aplicaciones de los modelos para la producción de distintos compuestos incluyendo los bioactivos.

Introducción

Los modelos matemáticos son una representación abstracta de la realidad. Tienen como objetivo principal, utilizarse como herramientas para la caracterización de las funciones biológicas, diseño de experimentos, interpretación de datos y generación de estrategias para el diseño y optimización. Existen distintos tipos de modelos; los modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias y parciales; modelos probabilísticos (estocásticos); ecuaciones algebraicas y modelos que utilizan algoritmos de optimización (Cameron and Hangos 2001) . Un modelo debe tener un carácter predictivo, es decir, poder simular nuevas condiciones de manera exacta. Los modelos matemáticos son ampliamente usados en campos de la Ingeniería, Física y Matemáticas, y en las últimas dos décadas han adquirido mayor relevancia en el campo de la Biología. Un ejemplo del uso de modelos matemáticos es el caso del modelado matemático del metabolismo celular. El objetivo de este tipo de modelos es aplicar un marco teórico matemático para caracterizar el ajuste del metabolismo celular ante los distintos estímulos externos y poder optimizar las funciones metabólicas, esto es, comprender la relación entre el genotipo y el fenotipo.

¿Qué hace que un modelo matemático funcione? Realmente no hay una sola respuesta, pero sí hay una metodología para construirlo y evaluar sus capacidades. Un primer paso, es que se conozca de manera precisa el fenómeno a representar; tratándose del metabolismo, se requiere conocer las rutas metabólicas involucradas y la relación entre genotipo y fenotipo, además de adquirir una visión sistémica de la célula.

El estudio del metabolismo y su modelado adquirió nuevas dimensiones gracias a los avances de la secuenciación genómica, ya que permitió obtener mayor información respecto a la organización de los sistemas biológicos. El fenotipo de un sistema biológico es el resultado de un conjunto de procesos fisiológicos que involucran una gran diversidad componentes como metabolitos, proteínas, ARNm y ADN, y que interaccionan de manera dinámica respondiendo a estímulos externos e internos conformando un sistema altamente complejo. Bajo este panorama surge una pregunta, ¿Cómo abordar la complejidad de un sistema de manera cuantitativa y cualitativa? La teoría de sistemas propuestas por Norbert Wiener y Ludwig von Bertalanfy se apropió como un marco teórico para abordar los sistemas biológicos. Una definición consenso de la Teoría de Sistemas es la siguiente:

Si inicialmente se define un sistema, el cual es una pequeña parte del universo con fronteras definidas y elementos operando dentro y/o interaccionando con el exterior, se establece que todas las partes de este sistema están conectadas y trabajando de manera coordinada para alcanzar un objetivo específico, y por medio de un análisis formal de la coordinación e interacción de los elementos es posible elucidar principios que involucran la composición y comportamiento del sistema. Por lo tanto, aplicar teoría de sistemas tiene el objetivo de elucidar los principios que rigen dentro del marco de análisis.

Con base en la definición anterior la teoría de sistemas aplicada en el campo de Biología da origen a la biología de sistemas, o biología sistemática (Systems Biology, en inglés), en donde obviamente el objeto de estudio es un sistema biológico (microorganismos, células de plantas o mamíferos e inclusive conjunto de microorganismos como la microbiota) (Kitano 2002, Kitano 2002, Chuang, Hofree *et al.* 2010). Dos son los factores importantes para el estudio de la biología de sistemas: disponibilidad de datos y el uso de herramientas matemáticas y computacionales. La disponibilidad de datos manera masiva es el resultado de la secuenciación de ADN a nivel genoma ya que permitió identificar todos los genes codificados. Eventualmente con la información decodificada del genoma, se impulsó el desarrollo de técnicas con la misma capacidad para generar datos masivos; la posibilidad de cuantificar ARNm y proteínas, por ejemplo, dio paso a las técnicas ómicas¹. En el Cuadro 1 se definen las técnicas ómicas más comunes y que se conocen como las técnicas de la era post-genómica, además estas técnicas han sido utilizadas para el modelado del metabolismo celular (Chuang, Hofree *et al.* 2010).

Con esta capacidad de generar datos, los procesos celulares pueden ser abordados desde un punto de vista holístico y lograr desentrañar el funcionamiento y organización entre los componentes biológicos involucrados.

¹ El prefijo “omica”, u “ómicas” en plural, se adapta del inglés “omic”, u “omics”, respectivamente, y es un neologismo que se utiliza para definir todas esas técnicas de la era postgenómica relacionadas con la obtención de datos de manera sistémica y masiva.

Cuadro 1. Definición de las técnicas ómicas más comunes y cómo son utilizadas en el modelado del metabolismo celular.

Técnica ómica	Descripción
Genómica	Consiste en la decodificación de la secuencia de ADN del genoma. A partir de la anotación del genoma se han construido las bases de datos que alojan toda la información referente a las enzimas que catabolizan el metabolismo celular (Mardis 2008).
Transcriptómica	La transcriptómica cuantifica el estado de expresión genética midiendo las abundancias de ARN mensajero. Lo que se puede interpretar en un análisis de un estado dinámico de la célula y comprender los mecanismos celulares activos en una determinada condición. De manera inferencial permite medir la actividad de las proteínas, sin embargo, la presencia de modificaciones postraduccion no permiten la correlación directa (Blazier and Papin 2012, Lee, Smallbone <i>et al.</i> 2012).
Proteómica	La identificación del nivel de proteínas es una indicación directa de la presencia las enzimas que cataboliza la reacción metabólica. También se puede identificar las proteínas que regulan la expresión de la enzima. Es una de las técnicas ómicas más complejas ya que difícilmente se logra identificar todas las proteínas expresadas. (Bantscheff and Kuster 2012)
Metabolómica	Esta técnica tiene como objetivo cuantificar los metabolitos que participan en las reacciones bioquímicas presentes en la célula. En los primeros reportes de metabolómica se cuantificaban hasta 20 metabolitos los cuales en realidad representan no más de un 5% de los que se conocen actualmente. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado este número de manera considerable (Kell 2006, Wishart 2011).
Fluxómica	El cálculo de los balances de masa para cuantificar cómo se distribuye la materia a lo largo de la red metabólica permite identificar las partes activas del metabolismo. Estas distribuciones son guías para aplicaciones en ingeniería metabólica y algunas se basan en técnicas de carbono etiquetado (Winter and Kromer 2013).
Interactómica	Las comunicaciones intracelulares se llevan a cabo por medio de las interacciones entre genes, proteínas y metabolitos. El proceso es altamente dinámico y es por medio de esta comunicación que se establecen los fenotipos celulares. Estos mapas de interacciones conforman redes biológicas las cuales se pueden diferenciar de acuerdo a su función, por ejemplo, redes metabólicas, redes genéticas o redes de proteínas, por mencionar algún ejemplo (Ivanov, Zgoda <i>et al.</i> 2011).

Sin embargo, el manejo y generación de estos datos requirió de manera paralela el desarrollo de herramientas computacionales y matemáticas. Esto implicó el segundo factor en las teorías de los sistemas biológicos: los modelos matemáticos, cuya finalidad es modelar la dinámica e interacciones que existen entre los componentes (Palsson and Palsson 2015).

En la actualidad, el procesamiento de la información de los datos generados por las técnicas ómicas hace referencia a las estrategias de procesamiento de datos en el campo de informática, es decir, el sistema biológico se puede analizar con una aproximación constructivista ascendente (bottom-up) o reduccionista descendente (top-down). En la estrategia reduccionista descendente, el objetivo es analizar el sistema biológico con una visión holística, usando datos multidimensional y multivariantes; haciendo uso de los algoritmos computacionales como los que se ocupan en la minería de datos permiten un análisis de datos ómicos para distintas enfermedades (Touw, Bayjanov *et al.* 2013). En la estrategia constructivista ascendente, la descripción del sistema se inicia a nivel molecular. Generalmente, en este nivel es muy común hacer uso de modelos basados en ecuaciones diferenciales ordinarias y parciales, para caracterizar procesos biológicos cuyas funciones impactan de forma global en el sistema biológico, por ejemplo, el análisis de las redes de señalización de quinasas que están involucradas en el desarrollo de cáncer (Pappalardo, Russo *et al.* 2016). En resumen, la biología de sistemas implica la descripción formal de los sistemas biológicos haciendo uso de técnicas experimentales que generan datos a nivel masivo, y el uso de herramientas computacionales y matemáticas para la comprensión de los principios que rigen a un sistema biológico (Klipp, Liebermeister *et al.* 2016). Por lo tanto, el uso de la biología de sistemas permite abordar el modelado del metabolismo celular y la comprensión de su funcionamiento.

Organización del metabolismo celular

Como se mencionó anteriormente, parte esencial del proceso de creación de un modelo matemático es comprender el funcionamiento del fenómeno observado. En esta sección se hace una descripción breve del metabolismo señalando la importancia de las partes involucradas y, sobre todo, se tiene que tener en mente que es un proceso el cual se puede cuantificar a través de estrategias experimentales como fermentaciones o técnicas ómicas.

El metabolismo celular es un proceso fisiológico de la célula que involucra un vasto compendio de reacciones bioquímicas, involucrando una gran variedad de enzimas y compuestos químicos; generalmente denominados metabolitos. Muchos de estos metabolitos producidos por la célula tienen un valor comercial, por ejemplo, el ácido láctico, el cual es el compuesto base para biopolímeros de ácido poliláctico; o los que sirven como combustibles que reemplazan el uso de gasolinas, como el etanol o butanol. Igualmente, están los compuestos bioactivos como los carotenoides, licopeno, fitoesteroles y polifenoles (Gottschalk 2012).

Las reacciones bioquímicas que componen el metabolismo celular se organizan formando rutas metabólicas. Cada ruta se puede identificar por el tipo de metabolito que involucra, ya que por medio de éstos las rutas se conectan y coordinan los procesos. La organización de las reacciones permite identificar rápidamente cuáles rutas pertenecen al catabolismo y cuáles al anabolismo. El catabolismo consiste en transformar moléculas obtenidas del medio y generar la energía necesaria para que se lleven a cabo las reacciones de síntesis de moléculas complejas y componentes celulares; estas últimas pertenecen al anabolismo. El objetivo global del metabolismo es transformar un sustrato (alguna fuente de carbono como la glucosa o glicerol) en energía, poder reductor, metabolitos, monómeros y macromoléculas que sustentan la reproducción celular. No es un proceso aislado, es decir, depende de las respuestas de otros procesos celulares como los procesos de regulación genética, señalización y transporte a través de la pared o membrana celular. Como todos los demás procesos responde de manera dinámica a los estímulos externos y es el principal actor en determinar la cantidad de materia y energía que se intercambia para sostener la homeostasis (Nelson and Cox 2014).

El intercambio de materia y energía que existe entre la célula y sus alrededores debe comprenderse como el resultado de la red de metabolitos y enzimas que componen el metabolismo. Para poder caracterizar y optimizar el metabolismo se debe cuantificar todos los elementos funcionales y la relación que tienen. Como se había comentado, una visión sistémica como la que ofrece la disciplina de biología de sistemas puede apoyar el diseño y análisis del metabolismo. Para lograrlo es necesario comprender el proceso metabólico con la perspectiva de las rutas metabólicas y la relación que tiene con los procesos fisiológicos de la célula y no solamente considerar al sistema biológico como una caja negra.

Generalmente, para iniciar el estudio del metabolismo se comienza comprendiendo el objetivo de cuatro rutas principales, elegidas tanto por su descubrimiento histórico como por su función dentro del metabolismo, estas rutas son: la ruta de glicólisis o EMP (Embden-Meyerhof-Parnas); el Ciclo de Krebs o el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT); la ruta de las pentosas fosfato (RPP); y la ruta ED (Entner-Duodoroff). Actualmente, con la secuenciación de cientos de genomas y su anotación, se tiene registrado que estas rutas están conservadas en la gran mayoría de los organismos. Esto se puede comprobar en bases de datos como la base de datos KEGG (Kanehisa, Goto *et al.* 2014). Comúnmente a estas rutas se le denomina el metabolismo primario y son esencialmente las responsables del proceso catabólico, mientras que al resto de las rutas se le ha denominado metabolismo secundario y son parte del proceso anabólico.

La importancia de las rutas del proceso catabólico se debe a que incluyen la construcción de los doce metabolitos denominados precursores primarios (“building blocks”) los cuales son el esqueleto para la síntesis de amino ácidos, lípidos, carbohidratos y moléculas más complejas y de mayor tamaño. Por ejemplo, el piruvato es parte de la ruta del glicólisis y es el precursor para la producción de aminoácidos como la alanina, leucina, isoleucina y valina, y también es precursor de compuestos bioactivos de la familia de los isoprenoides, por ejemplo, el beta-caroteno (Neidhardt, Ingraham *et al.* 1990). En la Tabla 1 se listan los doce metabolitos precursores y las moléculas que se sintetizan a partir de ellos tanto en el catabolismo como en el anabolismo. Es importante mantener en mente esta información, ya que el impacto de la presencia de los precursores se traduce en productividad y rendimiento en la producción de los compuestos de interés. También es necesario mencionar que la producción de muchos de los compuestos bioactivos requiere de moléculas precursoras como los aminoácidos, tal es el caso de la producción de polifenoles los cuales utilizan como precursores a la tirosina y fenilalanina (Wang, Guleria *et al.* 2016).

La manera en que se conectan las rutas metabólicas, es decir, la red metabólica permite rastrear el proceso de transformación de materia, por lo cual, el cálculo de un balance de materia nos dicta cuánto sustrato es convertido en producto y precursores para la producción de biomasa celular. En cuanto al balance energético, hay que tener presente que existen metabolitos que tienen la capacidad de funcionar como cofactores para catalizar reacciones

liberando la energía necesaria para llevar a cabo la reacción. En términos termodinámicos se requiere energía libre de Gibbs para balancear el proceso energético y hacer que una reacción sea favorable. El principal metabolito que participa en el intercambio de energía libre de Gibbs es el ATP (adenosín trifosfato) el cual se sintetiza en el metabolismo anabólico, pero tiene una participación como cofactor en muchas de las reacciones del catabolismo.

La hidrólisis de ATP en ADP (adenosín difosfato) es un proceso el cual favorece la termodinámica de la reacción en donde participa como cofactor y mantiene una estrecha relación con la eficiencia del metabolismo para formar más células. El ADP se regenera nuevamente en ATP al participar como cofactor en otra reacción. De manera cuantitativa este proceso de intercambio de energía mantiene una relación ATP/ADP que establece el estado del metabolismo. La mayor fuente de ATP por medio de la regeneración de ADP es en las rutas del CAT y glicólisis.

Otro factor importante en el desempeño metabólico de una célula es el poder reductor el cual implica la coenzima NADH (nicotinamida adenina dinucleótido). El NADH se oxida produciendo NAD^+ , y al igual que el ATP, participa como cofactor en las reacciones de reducción-oxidación. Al igual que la relación energética, la relación de poder reductor NADH/NAD^+ . Otros metabolitos que tienen un papel semejante al ATP y NADH son el GTP y el NADPH, respectivamente. El GTP se produce principalmente en el CAT en células eucariotas y se ocupa en reacciones de síntesis de proteínas. El NADPH participa en un par de reacciones del catabolismo, pero al igual que el GTP participa principalmente en reacciones del anabolismo (Villadsen, Nielsen *et al.* 2011).

Otra ruta metabólica de interés debido a su impacto en la eficiencia del metabolismo respiratorio es la denominada razón P/O, el cuál es el número de moléculas de ATP generadas en por cada par de electrones intercambiados en las rutas de la fosforilación oxidativa. En resumen, la eficiencia del metabolismo requiere de la integración de todos los aspectos energéticos y reductores. Cada vez que se quiera cuantificar el metabolismo por medio de un modelo matemático es importante comprender la presencia y ausencia de las reacciones para poder evaluar su impacto en el desempeño metabólico de la célula.

Tabla 1. Lista de precursores primarios y las distintas moléculas que se pueden obtener. El número de reacciones que se requieren para producir los compuestos a partir de precursores primarios es función de la diversidad del metabolismo.

Precursor primario (Ruta metabólica)	Moléculas	Precursor primario (Ruta metabólica)	Moléculas	Precursor primario (Ruta metabólica)	Moléculas
Glucosa 6-fosfato (glicolisis)	Lípidos y carbohidratos Inositol UDP-glucosa UDP-galactosa Bioactivos Polisacáridos	Piruvato (glicolisis)	Aminoácidos L-alanina L-isoleucina L-leucina L-valina Bioactivos Isoprenoides	Oxaloacetato (TCA)	Aminoácidos L-asparagina, L-aspartato, L-isoleucina, L-prolina y L-treonina Nucleótidos Uridín monofosfato (UMP), Citidina monofosfato (CMP), Desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP) y Desoxicitidina 5'-monofosfato (dCMP)
Fructosa 6-fosfato (glicólisis)	Lípidos y carbohidratos UDP-N-acetilglucosamina Bioactivos Polisacáridos	Fosfoenolpiruvato (glicolisis)	Aminoácidos L-fenilalanina L-triptófano L-tirosina	Succinil CoA (TCA)	Producción del grupo prostético hemo
Gliceraldehído 3-fosfato	Lípidos y carbohidratos Glicerol 3-fosfato Bioactivos Isoprenoides	Acetil-CoA (TCA)	Aminoácidos L-leucina y L-lisina Lípidos y carbohidratos Palmitol-CoA, Esteroil-CoA, Oleoil-CoA, Linoleoil-CoA Ergosterol y UDP-N-acetilglucosamina Bioactivos Isoprenoides	Ribosa 5-fosfato (PPP)	Aminoácidos L-histidina y L-triptófano Nucleótidos Adenosín monofosfato (AMP), Guanosín monofosfato (GMP), Uridín monofosfato (UMP), Citidina monofosfato (CMP), Desoxicitidina 5'-monofosfato (dCMP), Desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP), Desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP), Desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP). Bioactivos Fenoles
3-fosfoglicerato (glicolisis)	Aminoácidos L-cisteína, L-glicina y L-serina Nucleótidos Adenosín monofosfato (AMP), Guanosín monofosfato (GMP), Desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP), Desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP), Lípidos y carbohidratos Etanolamina y Colina	alfa-Cetoglutarato (TCA)	Aminoácidos L-arginina L-glutamato L-glutamina L-lisina L-metionina	Eritrosa 4-fosfato (PPP)	Aminoácidos L-triptófano L-tirosina Bioactivos Fenoles Alcaloides

Construcción de los modelos metabólicos del metabolismo

En el caso del modelado matemático del metabolismo el objetivo es aplicar un marco matemático para poder caracterizar y optimizar las capacidades metabólicas de un sistema biológico. Por lo tanto, es importante relacionar las variables medibles de forma experimental con las variables del proceso metabólico que se quieren analizar. Los modelos metabólicos se construyen a partir de la información de las reacciones bioquímicas involucradas en el metabolismo, y como se había comentado anteriormente, conocer sus funciones y organización. Un primer paso para elaborar un modelo matemático del metabolismo es realizar el listado de las reacciones de las rutas metabólicas, identificando los metabolitos incluidos, el nombre de las enzimas que catalizan las reacciones y genes que las codifican (gen-proteína-reacción-metabolito) (Orth, Fleming *et al.* 2010). Otra información importante es conocer la regulación del gen que codifica a la enzima. Las condiciones ambientales en las que se quiere modelar el metabolismo las percibe la célula y dispara los procesos de regulación dictando cuáles genes deben estar expresado. Un ejemplo básico es el caso la cepa facultativa como *Escherichia coli* tiene la capacidad de crecer en condiciones aerobias y anaerobias, en cada escenario las vías metabólicas involucradas son distintas; en muchos casos la ruta del CAT se encuentra activa en el proceso aerobio y deja de funcionar cuando se tiene el caso de crecimiento anaerobio. Estos efectos de actividad metabólica se ven reflejados en parámetros cinéticos como tasas crecimiento, consumo y producción de metabolitos.

El listado de las reacciones se le denomina anotación del metabolismo celular. En la Tabla 2 se presenta como ejemplo de una red hipotética de seis reacciones enzimáticas. Estas reacciones están asociadas a la anotación en el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la información se obtiene de la base de datos SGD (Saccharomyces Genome Database) (Costanzo, Engel *et al.* 2014). Como se puede ver, la información está organizada de tal manera que incluya la relación gene-proteína-reacción. Por ejemplo, para el primer registro se tiene el nombre del gen (YDL021W) que codifica a la enzima (hexoquinasa) que cataliza la reacción (HXK) que transforma la glucosa en glucosa-6 fosfato. Con esta relación los modelos metabólicos contienen la capacidad de relacionar el genotipo con el fenotipo. Por lo tanto, una de las habilidades necesaria para construir los modelos metabólicos es el

manejo de bases de datos y herramientas bioinformáticas que permitan extraer la información necesaria y organizarla. Es muy importante que durante el proceso de reconstrucción del modelo se tenga la evidencia de la existencia de cada reacción, por lo que en ocasiones además de la información de la base de datos, se requiere realizar una búsqueda extensa de evidencias en la literatura y en caso de ser necesario se llevan a cabo experimentos (Thiele and Palsson 2010).

Tabla 2. Anotación de las reacciones bioquímicas presentes en el metabolismo celular.

ID de la reacción	Enzima	Reacción	E.C.	ID del gen en SGD	Ruta metabólica
HXK (v ₁)	hexoquinasa	Glu → G6P	2.7.1.1	YDL021W YKL152C YOL056W	Glicólisis / Gluconeogénesis
ENZ1 (v ₂)	producción de glicerol	G6P + ADP ↔ 2 Gli + ATP	-----	-----	Metabolismo del glicerol
FGI (v ₃)	glucosa-6 fosfato isomerasa	G6P ↔ F6P	5.3.1.9	YKR067W	Glicólisis / Gluconeogénesis
PFK (v ₄)	fosfofructoquinasa-1	F6P + ATP ↔ FBP + ADP + H ⁺	2.7.1.11	YGR240C	Glicólisis / Gluconeogénesis
ENZ2 (v ₅)	producción de etanol	FBP + ADP + P _i → 3 Eth + ATP	-----	-----	Metabolismo del etanol
ALD (v ₆)	producción de ATP	ADP → ATP	-----	YKR067W	Oxidación fosforilativa
ATPS (v ₇)	hidrólisis de ATP	ATP → ADP	-----	-----	Oxidación fosforilativa
ADK (v ₈)	adenilato quinasa	ATP + AMP ↔ 2 ADP	2.7.4.3	YDR226W	Síntesis <i>de novo</i> de nucleótidos

Para modelar un fenómeno es necesario recabar información sobre las propiedades de las reacciones. De manera general, los modelos metabólicos se basan en dos propiedades de las reacciones bioquímicas: la estequiometría y la cinética enzimática. La estequiometría permite conocer la proporción en las que los metabolitos se combinan e impone las restricciones termodinámicas para la producción de metabolitos. A partir de esta información se puede lograr determinar los rendimientos máximos posibles. Por ejemplo, si tomamos en cuenta las dos primeras reacciones de la Tabla 2, HXK y ENZ1, se puede calcular que el

rendimiento máximo posible de glicerol a partir de glucosa es de 2 mol-glicerol/mol-glucosa. Esto implica que no hay manera de rebasar este límite con la red de reacciones que se tienen, y la única manera de lograrlo es modificando la red reacciones; se podría encontrar alguna reacción que tenga una estequiometría distinta para la producción de glicerol. Cuando se pretende utilizar un modelo del metabolismo para producir un compuesto de interés se debe tener en mente que el rendimiento impacta los costos de producción, por lo que se debe mantener en mente esta restricción en el diseño. En la Fig. 1 se representa la red metabólica y las reacciones involucradas. Esta información es la que se obtiene a partir la anotación del metabolismo.

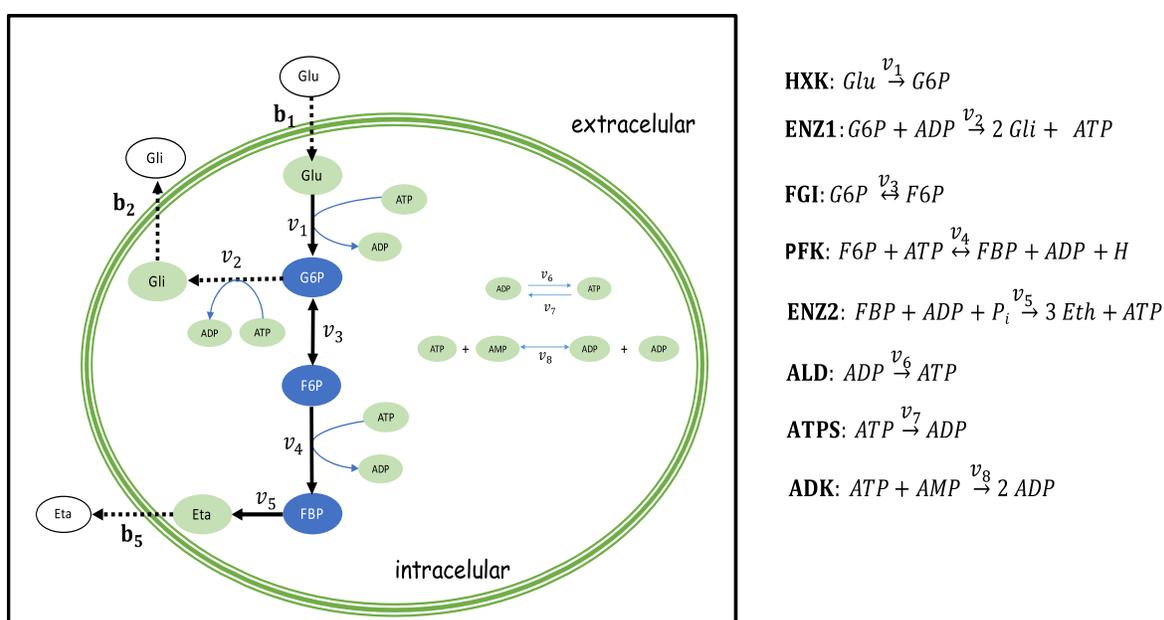


Fig. 1 Representación de la red metabólica y las ecuaciones del balance de materia. Metabolitos extracelulares, Gli: glicerol; Eta: etanol; Glu: glucosa. Metabolitos intracelulares, G6P: glucosa-6 fosfato; F6P: fructosa-6 fosfato; FBP: fructosa-1,6 fosfato; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; AMP: adenosín monofosfato. Estas reacciones se seleccionan con base en las características metabólicas del microorganismo y el fenotipo que se quiere simular

Además de la estequiometría, la cinética enzimática es una propiedad que se puede utilizar para el modelado. La cinética dicta la velocidad con la que un sustrato se transforma en presencia de una enzima. Una manera de medir esta cinética es por medio de los modelos cinéticos y sus parámetros. El más conocido es el modelo cinético de Michaelis-Menten pero existen otras expresiones las cuales se escogen con base en el comportamiento cinético de la

reacción (Illanes 2008). Este tipo de expresiones matemáticas intentan captar los fenómenos de los mecanismos enzimáticos, tales como los efectos de inhibición enzimática y que pueden darse de manera competitiva o no competitiva.

Cuando se han compilado el valor de los parámetros asociados a la red metabólica bajo análisis, el paso siguiente es construir un modelo matemático. Por medio de un balance de materia de los metabolitos involucrados se pueden construir un conjunto de ecuaciones. Por ejemplo, en la Fig. 2 se presentan las ecuaciones del balance de materia para cada uno de los metabolitos involucrados en la red. En el balance de materia se consideran términos de acumulación, generación, consumo y un término de dilución debido al crecimiento celular; ver Fig. 2.

BALANCES DE MATERIA

$$\frac{d[\text{Glu}]}{dt} = -v_1 - [\text{Glu}] * \mu \quad \dots \text{Ec.1}$$

$$\frac{d[\text{Gli}]}{dt} = 2 v_2 - [\text{Gli}] * \mu \quad \dots \text{Ec.2}$$

$$\frac{d[\text{Eth}]}{dt} = 3 v_5 - [\text{Eth}] * \mu \quad \dots \text{Ec.3}$$

$$\frac{d[\text{G6P}]}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 - [\text{G6P}] * \mu \dots \text{Ec.4}$$

$$\frac{d[\text{F6P}]}{dt} = v_3 - v_4 - [\text{F6P}] * \mu \dots \text{Ec.5}$$

$$\frac{d[\text{FBP}]}{dt} = v_4 - v_5 - [\text{FBP}] * \mu \dots \text{Ec.6}$$

$$\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = -v_1 - v_2 - v_4 + v_6 - v_8 - [\text{ATP}] * \mu \dots \text{Ec.7}$$

$$\frac{d[\text{ADP}]}{dt} = v_1 + v_2 + v_4 - v_6 + v_7 + 2 v_8 - [\text{ADP}] * \mu \dots \text{Ec.8}$$

$$\frac{d[\text{AMP}]}{dt} = -v_8 - [\text{AMP}] * \mu \dots \text{Ec.9}$$

Fig. 2 Balances de materia para cada metabolito de la red metabólica de ejemplo. Los valores de positivos y negativos de las variables v_i representan las tasas de consumo y producción respectivamente.

En la Fig. 2 se observan nueve balances de materia que corresponden a los nueve metabolitos de la red metabólica que se tiene como ejemplo. Las variables v_i del balance de masa son las tasas de consumo y producción del metabolito respectivo, a estos se les denomina flujos metabólicos internos, o fluxes, y por conveniencia tienen unidades de mmol/gDWC/h. Las variables b_i son los flujos de intercambio entre el medio exterior e intracelular, y mantienen las mismas unidades que los fluxes. De hecho, estos valores son los que se pueden obtener experimentalmente al cuantificar las concentraciones en el medio de

cultivo y se les conoce generalmente como las tasas específicas de consumo y producción. Igualmente, la tasa específica de crecimiento μ (h^{-1}) es un valor experimental. El término dilución puede considerarse un término de salida del metabolito y lo que representa es el proceso cuando una célula se duplica parte del contenido en el citosol de la célula madre se diluye a la célula hija. Para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales de la Fig. 2 se pueden aplicar metodologías distintas.

Metodologías para el modelado de la red metabólica.

Una vez obtenidas las ecuaciones del balance de materia se pueden ocupar dos metodologías. La primera metodología está basada en la información de los parámetros de la cinética enzimática y se les denominan modelos dinámicos de la red metabólica. En este tipo de modelos mecanísticos las expresiones de la cinética enzimáticas requieren de los parámetros cinéticos tal como se ve en la Fig. 3.

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Glu}]}{dt} &= -\frac{V_{max1} [\text{ATP}][\text{Glu}]}{K_{ATP,1} + [\text{ATP}][\text{Glu}]} - [\text{Glu}] * \mu & \text{Modelado con parámetros cinéticos} \\ \frac{d[\text{Gli}]}{dt} &= 3 k_2 [\text{ATP}][\text{G6P}] - [\text{Gli}] * \mu \\ \frac{d[\text{Eth}]}{dt} &= 2 k_5 [\text{FBP}] - [\text{Eth}] * \mu \\ \frac{d[\text{G6P}]}{dt} &= \frac{V_{max1} [\text{ATP}][\text{Glu}]}{K_{ATP,1} + [\text{ATP}][\text{Glu}]} - k_2 [\text{ATP}][\text{G6P}] - (k_3 [\text{G6P}] - k'_3 [\text{F6P}]) - [\text{G6P}] * \mu \\ \frac{d[\text{F6P}]}{dt} &= (k_3 [\text{G6P}] - k'_3 [\text{F6P}]) - k_4 [\text{F6P}] - [\text{F6P}] * \mu \\ \frac{d[\text{FBP}]}{dt} &= k_4 [\text{F6P}] - k_5 [\text{FBP}] - [\text{FBP}] * \mu \\ \frac{d[\text{ATP}]}{dt} &= k_6 [\text{ATP}] - \frac{V_{max1} [\text{ATP}][\text{Glu}]}{K_{ATP,1} + [\text{ATP}][\text{Glu}]} - k_2 [\text{ATP}][\text{G6P}] - k_4 [\text{F6P}] - [\text{ATP}] * \mu \\ \frac{d[\text{AMP}]}{dt} &= -k_8 \text{ATP AMP} - [\text{AMP}] * \mu \\ \frac{d[\text{ADP}]}{dt} &= \frac{V_{max1} [\text{ATP}][\text{Glu}]}{K_{ATP,1} + [\text{ATP}][\text{Glu}]} + k_2 [\text{ATP}][\text{G6P}] + k_4 [\text{F6P}] - [\text{ADP}] * \mu \end{aligned}$$

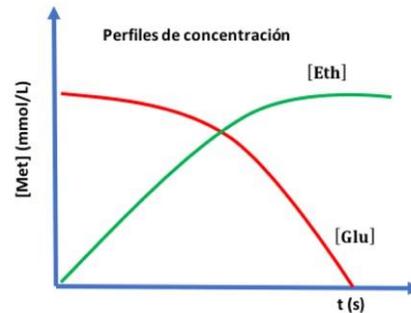


Fig. 3 Los modelos dinámicos hacen uso de expresiones cinéticas y sus parámetros. Las soluciones de estos modelos nos permiten entender el estado dinámico de la red por medio de obtener los cambios de concentración de los metabolitos en el tiempo. La ventaja de estos modelos es que de manera explícita se pueden incluir aspectos de regulación de cada reacción por medio de las expresiones cinéticas.

En las ecuaciones se han sustituido las variables v_i por expresiones tipo Michaelis-Menten o cinéticas lineales. Debido a la información que se incluye del mecanismo enzimático se pueden incluir términos de inhibición y regulación (Illanes 2008). La información de esta metodología permite obtener análisis sobre el control que existen en las rutas metabólicas por medio de lo que se conoce el análisis del control metabólico (Moreno-Sánchez, Saavedra *et al.* 2008).

La segunda metodología consiste en omitir la información cinética y resolver las ecuaciones del balance de materia en estado estacionario (Fig. 4). A este tipo de modelado se le denominan modelado estequiométrico del metabolismo ya que se basa solamente en los coeficientes estequiométricos de las reacciones y las tasas de consumo de metabolitos extracelulares. Es decir, no se requiere de parámetros cinéticos de las enzimas involucradas. La capacidad predictiva de estos modelos está en función de lograr compilar de forma precisa el conjunto de reacciones que representen el metabolismo del microorganismo, tal como se había comentado anteriormente. Para eliminar el término de acumulación se debe considerar el estado estacionario del metabolismo, es decir, la concentración de los metabolitos sea constante. Para hacer válida esta suposición se plantea que es posible alcanzar un estado estacionario cuando la tasa de crecimiento de las células es constante. En este estado de crecimiento los tiempos característicos de los procesos de reacción enzimáticos son mucho más rápidos (10^{-4} s) que el proceso de duplicación celular (10^2 s), por lo tanto, se puede considerar que las piscinas de los metabolitos intracelulares permanecen constantes. Con esta simplificación, el objetivo es obtener un sistema de ecuaciones lineales que al resolverlo nos permite obtener los valores de los fluxes (v_i) a lo largo de la red. A esta solución también se le conoce como la distribución de flujos metabólicos. Con esta distribución se puede inferir cómo opera la red metabólica bajo diferentes condiciones de crecimiento y generar estrategias de modificación de las vías con la finalidad de dirigir el flujo de masa hacia el metabolito objetivo.

Modelado estequiométrico

$$\begin{array}{l}
 0 = -v_1 \\
 0 = 2v_2 \\
 0 = 3v_5 \\
 0 = v_1 - v_2 - v_3 \\
 0 = v_3 - v_4 \\
 0 = v_4 - v_5 \\
 0 = -v_1 - v_2 - v_4 + v_6 - v_8 \\
 0 = v_1 + v_2 + v_4 - v_6 + v_7 + 2v_8 \\
 0 = -v_8
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{c}
 \text{Forma matricial} \rightarrow
 \end{array}
 \begin{array}{l}
 \text{Glu} \\
 \text{Gli} \\
 \text{Eth} \\
 \text{G6P} \\
 \text{F6P} \\
 \text{FBP} \\
 \text{AMP} \\
 \text{ADP} \\
 \text{ATP}
 \end{array}
 \begin{bmatrix}
 -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 3 & 0 & 0 & 0 \\
 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\
 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & -1 & 1 & 2 \\
 -1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 & -1 & -1
 \end{bmatrix}
 \begin{bmatrix}
 v_1 \\
 v_2 \\
 v_3 \\
 v_4 \\
 v_5 \\
 v_6 \\
 v_7 \\
 v_8
 \end{bmatrix}
 =
 \begin{bmatrix}
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0 \\
 0
 \end{bmatrix}$$

Fig. 4 Las ecuaciones del balance de materia se reducen para considerar una solución en estado estacionario. Matemáticamente se tiene un sistema de ecuaciones lineales las cuales se tiene que resolver para encontrar el valor de las variables v_i .

Los cálculos de la distribución de fluxes tienen como objetivo conectar los flujos intracelulares con los flujos de los metabolitos extracelulares. Estos últimos se pueden obtener experimentalmente, por ejemplo, las tasas específicas de consumo de glucosa y de producción de metabolitos extracelulares se pueden cuantificar por medio de cultivos en biorreactores operando en modo lote o continuo. Con la obtención de datos experimentales de flujo el sistema de ecuaciones se reescribe de tal forma que los valores experimentales permiten tener una solución distinta a la trivial, Fig. 5. Por ejemplo, si en total se tienen 6 metabolitos internos y 8 flujos que calcular, utilizando los principios de álgebra lineal para la solución de sistemas de ecuaciones lineales se tienen dos grados de libertad para poder tener un sistema determinado que nos conduzca a una única solución.

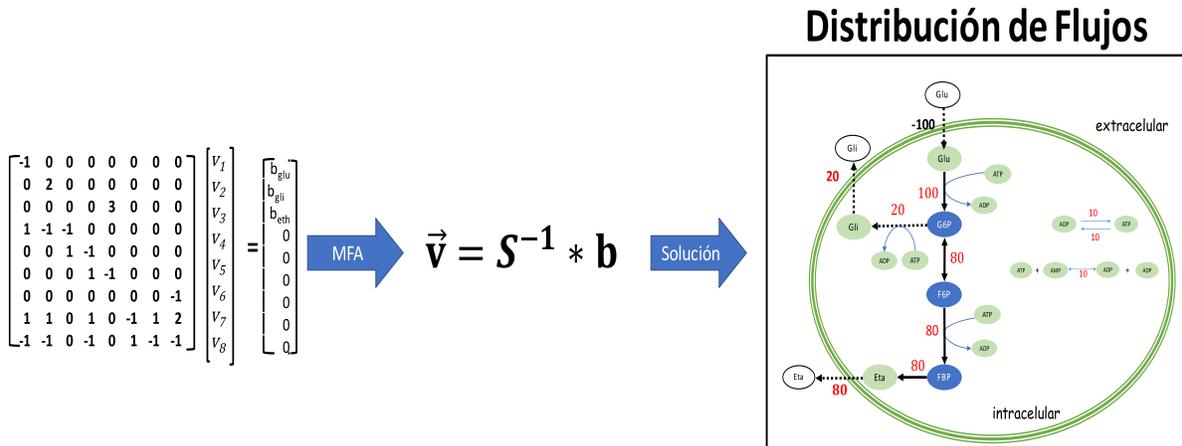


Fig. 5 La aproximación de análisis de flujos metabólicos (MFA) se basa en calcular la distribución de flujos utilizando las tasas de consumo de sustratos (b_{glu}) y tasas de producción de metabolitos (b_{gli} , b_{et}) que se obtienen experimentalmente. Al elegir los datos experimentales se logra obtener la solución al sistema de ecuaciones lineales. Los valores v_i es la solución del sistema de ecuaciones lineales y se denomina la distribución de flujos, o fluxes, la cual se puede visualizar sobre el mapa para lograr una interpretación de la capacidad metabólica del microorganismo.

La estrategia para lograr soluciones únicas con modelos estequiométricos se denominó Análisis del Flujo Metabólico (MFA, siglas en inglés) (Stephanopoulos, Aristidou *et al.* 1998). A partir de estos modelos fue posible caracterizar las capacidades metabólicas que tiene un microorganismo. Aunque matemáticamente el procedimiento para obtener la solución podría considerarse trivial, la mayor complejidad surge de la selección de las reacciones para lograr representar el metabolismo. Cuando comenzaron a operar los primeros modelos del metabolismo la cantidad de información disponibles sobre la composición del metabolismo era limitada, no obstante, fue posible caracterizar el metabolismo en diferentes condiciones de cultivo. El tamaño de los modelos incluía la información de decenas de reacciones pero se formulaban de tal manera que lograban captar las características del metabolismo bajo las condiciones de estudio (Nookaew, Olivares-Hernández *et al.* 2011).

Como se mencionó anteriormente, a partir de los trabajos de secuenciación genómica de microorganismos, se logró tener acceso a la información de cientos de genes y las proteínas asociadas (enzimas) que catalizan las numerosas reacciones que componen el metabolismo. Por lo tanto, se comenzó a trabajar con la idea de generar modelos del

metabolismo celular con base en un listado que involucrara la mayor cantidad de reacciones del metabolismo. Como resultado se obtuvieron los denominados modelos metabólicos a escala genómica (GSMM, siglas en inglés).

La reconstrucción de estos modelos parte de la secuencia genómica de un microorganismo, de datos bioquímicos y fisiológicos. Cuando se trata de microorganismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* o *Escherichia coli*, es posible acceder a una gran cantidad de información alojadas en bases de datos las cuales pueden ser organismo-específicas, tales como Saccharomyces Genome Database (SGD) (Costanzo, Engel *et al.* 2014) y Ecocyc (Keseler, Mackie *et al.* 2013). Otras bases de datos como KEGG (Kanehisa, Goto *et al.* 2014) y Reactome (Haw, Wu *et al.* 2014) se centran en la organización de información de rutas metabólicas. Cuando se trata de microorganismos cuyas secuencias genómicas se generan por primera vez, se requiere de una serie de herramientas bioinformáticas para encontrar las funciones de los genes codificados en las secuencias. Las herramientas bioinformáticas como BLAST (Neumann, Kumar *et al.* 2014) permiten encontrar genes ortólogos y asociar funciones a los genes metabólicos cuando se tienen nuevas secuencias genómicas. Bases de datos como PFAM (Finn, Miller *et al.* 2014) y PDB (Rose, Bi *et al.* 2013) ofrecen representaciones un repositorio de regiones funcionales con las cuales se pueden asociar funciones a regiones codificantes de genes. Existen protocolos bien definidos para poder organizar, simular y validar GSMM (Thiele and Palsson 2010). Debido a que continuamente se genera información derivada de la secuenciación y anotación de los genomas, se requiere de una actualización de los modelos de forma constante. Por ejemplo, el primer modelo de *Saccharomyces cerevisiae* a escala genómica consistía en 1175 reacciones y 708 genes metabólicos (Famili, Forster *et al.* 2003, Famili and Palsson 2003, Forster, Famili *et al.* 2003). Actualmente, el último modelo consenso reporta 932 genes metabólicos y 1865 reacciones (Dobson, Smallbone *et al.* 2010). La información en el modelo se lista de tal manera que cada reacción se puede asociar al enzima y el gen que la codifica.

Debido a un mayor número de reacciones involucradas en estos modelos, la solución de un sistema de ecuaciones lineales con la metodología usada en MFA no era viable, ya que al analizar los grados de libertad se podrían tener hasta un centenar de estos, lo que implicaba

la necesidad de medir experimentalmente una gran cantidad de tasas de consumo y producción de metabolitos extracelulares e intracelulares. Debido a esto, se formuló una aproximación matemática alterna para calcular la distribución de fluxes y que está basada en teorías de programación lineal. Para lograrlo, el sistema de ecuaciones lineales, que se obtiene inicialmente de los balances, funciona como un conjunto de restricciones para un modelo de optimización donde se seleccionó una función objetivo que representa un objetivo del metabolismo. En la Fig. 6 se observa la representación del marco matemático de FBA.

$$\begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 3 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & -1 & 1 & 2 \\ -1 & -1 & 0 & -1 & 0 & 1 & -1 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \\ v_6 \\ v_7 \\ v_8 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$



$$\begin{array}{l} \text{Max } Z \\ \text{Sujeta a :} \\ S \cdot v = 0 \\ \alpha \leq v_i \leq \beta \\ \alpha, \beta \in \mathfrak{R} \end{array}$$

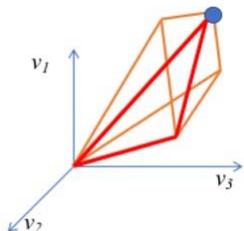


Fig. 6 La metodología de FBA se basa en un problema de optimización lineal, al igual que en MFA se hace uso de los valores experimentales de las tasas específicas de consumo y producción.

La primera aproximación fue considerar la tasa de producción de biomasa como la función objetivo sujeta a una serie de restricciones los cuales son los flujos extracelulares que se obtienen experimentalmente (Varma and Palsson 1994). A esta metodología se le llamó Análisis del Balance de Flujos (FBA, siglas en inglés). Este marco de modelado permite utilizar distintos tipos de funciones objetivo que representen el estado fisiológico de la célula. Algunas hipótesis que se han manejado son, la eficiencia para producir energía, la utilización de nutrientes y la capacidad de producir un metabolito. Todas estas hipótesis pueden ser consideradas para generar estrategias de ingeniería metabólica (Schuetz, Kuepfer *et al.* 2007).

Cuando se considera una función objetivo como la biomasa, hay que tomar en cuenta que ésta es una representación de las necesidades metabólicas que tiene el sistema para producir más células. Estos requerimientos se cuantifican experimentalmente y se representan como una reacción más del modelo a nivel de macromoléculas como proteínas, carbohidratos y ácidos grasos. Se ha reportado que la selección de la biomasa como función objetivo es la aproximación que mejores resultados ha ofrecido en el cálculo de la distribución de fluxes (Feist and Palsson 2010). La validación de un GSMM se logra al comparar la capacidad de predecir observaciones experimentales como tasas de crecimiento, tasas de consumo de sustratos y de formación de productos y análisis de viabilidad. Una vez establecida la validación, se pueden generar aproximaciones de ingeniería metabólica insertando o eliminando reacciones con la finalidad de observar el efecto en la productividad del metabolito objetivo.

Aplicación de los modelos metabólicos

Los modelos matemáticos del metabolismo se han aplicado para la caracterización de los sistemas biológicos dentro del campo de la biología de sistemas. Con los modelos se han caracterizado las capacidades metabólicas de los microorganismos. Sin embargo, cuando se trata de la producción de compuestos de interés industrial o médico, el modelado del metabolismo, además de caracterizar, apoya a la optimización de la capacidad productiva de un microorganismo. De manera natural, los modelos matemáticos se han convertido en una herramienta poderosa para la generación de estrategias en aplicaciones de ingeniería metabólica. La ingeniería metabólica como disciplina se ocupa de hacer uso de las tecnologías de ADN recombinante para modificar los flujos metabólicos por medio de distintas estrategias dependiendo del objetivo, ver cuadro 2.

Cuadro 2. Objetivos de la ingeniería metabólica.

Objetivo	Estrategia
Incrementar la productividad y el rendimiento de los metabolitos presentes en las rutas metabólicas.	<p>Insertar genes heterólogos para que expresen las enzimas que catalizan las reacciones que conducen a la formación del metabolito objetivo.</p> <p>Deletar genes para eliminar productos no deseados.</p> <p>Sobre expresar enzimas para incrementar la actividad de las rutas.</p>
Proveer o mejorar la capacidad de los microorganismos para metabolizar distintos sustratos.	<p>Modificar la capacidad de los microorganismos para consumir distintos sustratos expresando enzimas heterólogas. Las enzimas pueden ser transportadores específicos para los sustratos y las enzimas que los metabolizan. Por ejemplo, la xilosa no es metabolizada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, por lo que se han incluido las rutas necesarias en la producción de etanol.</p>
Síntesis de metabolitos que no se encuentran de forma natural.	<p>Aprovechando la capacidad de las enzimas para reconocer distintos sustratos, se construyen rutas que no existen naturalmente.</p> <p>Las enzimas son manipuladas por medio de ingeniería de enzimas para proveerles nuevas capacidades catalíticas.</p>
Adaptación de fenotipos idóneos para condiciones de proceso.	<p>Existen bacterias como <i>E. coli</i> diseñadas para la producción de isobutanol, pero que no tienen la misma capacidad de tolerar el estrés por altas concentraciones de alcohol, como las que podría tener una levadura. Por medio de una adaptación evolutiva es posible que se desarrolle el fenotipo requerido. También la evolución metabólica ha permitido mejores capacidades de las cepas para lograr mayores productividades.</p>
Degradación de químicos no biológicos	<p>Para llevar a cabo la degradación xenobiótica se incluyen rutas metabólicas para lograr la asimilación metabólica. En estos casos también se requiere de la ingeniería de los transportadores específicos para la molécula.</p>

Una de las primeras aplicaciones de la cuantificación de fluxes por medio de un modelo metabólico se realizó en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* utilizada para la producción de lisina (Vallino and Stephanopoulos 1993). El objetivo de este estudio era comprender a través del cálculo de fluxes la forma en que operaba la red metabólica de una

cepa especializada en producir lisina. Las observaciones en los resultados lograron determinar la existencia de nodos, como la glucosa-6 fosfato, que permitían localizar el flujo de carbono para optimizar la producción de lisina. En cuanto a microorganismos eucariotas, como *Saccharomyces cerevisiae*, los primeros modelos se construyeron con la información de aproximadamente 80 reacciones. Dependiendo de las condiciones de cultivo y el sustrato utilizado se manejaron diferentes conjuntos de reacciones para simular las respuestas del metabolismo. De esta manera fue posible diferenciar cómo opera el metabolismo en condiciones anaerobias y aerobias empleando distintas fuentes de carbono como glucosa, etanol y acetato. Como conclusión se observó la influencia que tiene la relación P/O y el coeficiente de mantenimiento en el crecimiento celular (van Gulik and Heijnen 1995). Posterior a este trabajo, se llevó a cabo una anotación más rigurosa de las reacciones por medio de mediciones experimentales de composición de biomasa y proteínas, de esta manera se logró construir un modelo para cuantificar los flujos en condiciones de cultivo anaerobias considerando como fuente de carbono la glucosa (Nissen, Schulze *et al.* 1997). De los resultados obtenidos fue interesante observar que existe un incremento en un subproducto como el glicerol cuando se incrementaba la tasa de crecimiento y éste incremento acompaña la disminución en la actividad del ciclo de los CAT. La observación conduce a evaluar que existen otras reacciones que proveen del ATP y NADH requerido para incrementar el crecimiento en condiciones anaerobias. El modelo también sirvió como herramienta para examinar la presencia y localización de reacciones en el metabolismo. Por ejemplo, se consideró en el modelo la existencia de una enzima encargada de transportar NADH de la mitocondria hacia el citosol, al eliminar esta reacción del modelo se encontraron inconsistencias en los fluxes del CAT, como sugerencia, se determinó la importancia del intercambio de NADH entre citosol y mitocondria. Estos primeros resultados demostraron que el modelado del metabolismo tiene tres propósitos principales: la evaluación de datos fisiológicos y de flujos intracelulares, el análisis del impacto que tiene en el metabolismo la presencia o ausencia de reacciones, y la posibilidad de medir rendimientos de metabolitos intracelulares. Partiendo de estos trabajos se asentaron los principios requeridos para lograr tener modelos del metabolismo para poder caracterizar y optimizar las capacidades metabólicas con miras a aplicaciones industriales.

Al simular el efecto que tiene la reconfiguración de rutas metabólicas fue posible mejorar la producción de ácido succínico en *Escherichia coli* (Lee and Hong 2002). Con base en el modelo los autores propusieron rutas metabólicas distintas a las conocidas y se calcularon los rendimientos. Con las rutas propuestas que fueron resultado de aplicar el modelo se generaron las cepas modificadas de forma experimental y se compararon los rendimientos contra rutas convencionales que producen el ácido succínico. El resultado fue un incremento en la eficiencia de *Escherichia coli* para producir ácido succínico.

Una de las estrategias de ingeniería metabólica que ha resultado efectivas es la delección de genes. Para evaluar la producción de licopeno, un caroteno que resulta atractivo como nutracéutico, se utilizó el GSMM de *Escherichia coli* y por medio de FBA se llevó a cabo un estudio eliminación de genes. Por medio de la simulación sistemática de eliminación de genes, se logró identificar las mutaciones que hacían posible el incremento en la producción de licopeno (Alper, Jin *et al.* 2005). En específico, la estrategia de modelado consistió en eliminar una por una las reacciones anotadas en el modelo y observar si la predicción resultaba en un incremento de la producción de licopeno. Sobre esta se repitió el mismo procedimiento, pero incrementando a dos y tres eliminaciones a la vez. Experimentalmente se construyeron las cepas mutantes con base en las predicciones del modelo que predijeron mejores rendimientos. Como resultado se obtuvieron cepas que lograron incrementar el rendimiento en un 40%.

Utilizando el modelo de *Saccharomyces cerevisiae* se exploraron las capacidades del metabolismo redox para disminuir la producción de glicerol e incrementar la producción de etanol en cultivos anaerobios. Por medio de simular con FBA la eliminación de genes de las vías metabólicas, se logró generar diferentes escenarios donde se reducía el glicerol y se aumentaba el etanol. Los resultados de la simulación se concretaron con la obtención de una cepa con la capacidad de reducir el rendimiento de glicerol hasta en un 40% e incrementar el rendimiento de etanol en un 3%, esto sin afectar la tasa de crecimiento (Bro, Regenberg *et al.* 2006). Más recientemente, con el modelo de *Saccharomyces cerevisiae* se exploró la eliminación de tres genes que resultó en un incremento de la producción de ácido succínico, demostrando nuevamente el potencial que tienen los modelos en la predicción de experimentos (Agren, Otero *et al.* 2013). Otros casos de interés son la producción de terpenos

(Asadollahi, Maury *et al.* 2009, Sun, Meng *et al.* 2014) y la producción de combustibles de segunda generación como butanol (Ohno, Furusawa *et al.* 2013).

Por medio de usar FBA y simular la construcción de vías metabólicas, es decir la inserción de genes, fue posible diseñar una cepa capaz de producir 1-propanol. Por medio de la aproximación de FBA se pudieron calcular los rendimientos teóricos de tres distintas rutas metabólicas que conducían a la producción de 1-propanol: la ruta nativa de treonina, una ruta no nativa de citramalato, y una ruta que era el resultado de la combinación de éstas. Al llevar a cabo la simulación con FBA usando el GSMM de *Escherichia coli*, se predijo que en el escenario donde se combinan ambas rutas, se logra tener un incremento en el rendimiento del 33%. Basados en los resultados del modelado, los autores construyeron las cepas y lograron comprobar que, efectivamente el rendimiento fue mayor al combinar las rutas metabólicas (Shen and Liao 2013).

Tabla 4. Casos de éxito en donde se han ocupado los GSMM y la aproximación de FBA para generar fabricas celulares con mayor rendimiento en la producción de metabolitos.

Objetivo de usar el modelo	Microorganismo
Síntesis de ácido succínico	<i>Escherichia coli</i> (Lee, Hong <i>et al.</i> 2002) <i>Aspergillus niger</i> (Meijer, Nielsen <i>et al.</i> 2009) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Agren, Otero <i>et al.</i> 2013)
Producción de licopeno	<i>Escherichia coli</i> (Alper, Jin <i>et al.</i> 2005, Alper, Miyaoku <i>et al.</i> 2005)
Disminución de glicerol e incremento de etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bro, Regenber <i>et al.</i> 2006)
Producción de treonina	<i>Escherichia coli</i> (Lee, Park <i>et al.</i> 2007)
Producción de L-valina	<i>Escherichia coli</i> (Park, Lee <i>et al.</i> 2007)
Optimización de medio de cultivo y producción de ácido succínico	<i>Manhemia succiniproducens</i> (Song, Kim <i>et al.</i> 2008)
Producción de butanol, propanol, propanodiol	<i>Escherichia coli</i> (Ohno, Furusawa <i>et al.</i> 2013, Shen and Liao 2013) <i>Clostridium acetobutylicum</i> (McAnulty, Yen <i>et al.</i> 2012)
Síntesis de terpenos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Swainston, Smallbone <i>et al.</i> 2011)
Producción de ácido 3-hidroxipropanoico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Borodina, Kildegaard <i>et al.</i> 2015)

En todos los ejemplos descritos, el modelo del metabolismo permite alcanzar dos objetivos: la caracterización y comprensión de las redes metabólicas, y la identificación de genes cuya eliminación o inserción puede incrementar la productividad de un metabolito objetivo. En la Fig. 7 se presenta el panorama general de cómo se utilizan los GSMM en ingeniería metabólica.

A pesar de los casos de éxito mencionados, aún existen limitaciones en la aproximación de FBA para modelar el metabolismo. La metodología no logra predecir con precisión la sobreexpresión de una enzima o represión de la misma. En concreto, los aspectos regulatorios de las rutas metabólicas no están considerados en el modelado de FBA, pero existen nuevos algoritmos que permiten integrar parte de estos conceptos. Considerando estas limitaciones existen trabajos de modelado cinético. En estos modelos, no sólo la información estequiométrica es necesaria, también se requiere de parámetros cinéticos. Y es precisamente, el uso de parámetros cinéticos donde aún existen limitantes para lograr aplicar con éxito los modelos dinámicos. En comparación con los modelos estequiométricos, la cantidad de casos donde se han aplicado modelos dinámicos para generar fábricas celulares son pocos (Link, Christodoulou *et al.* 2014).

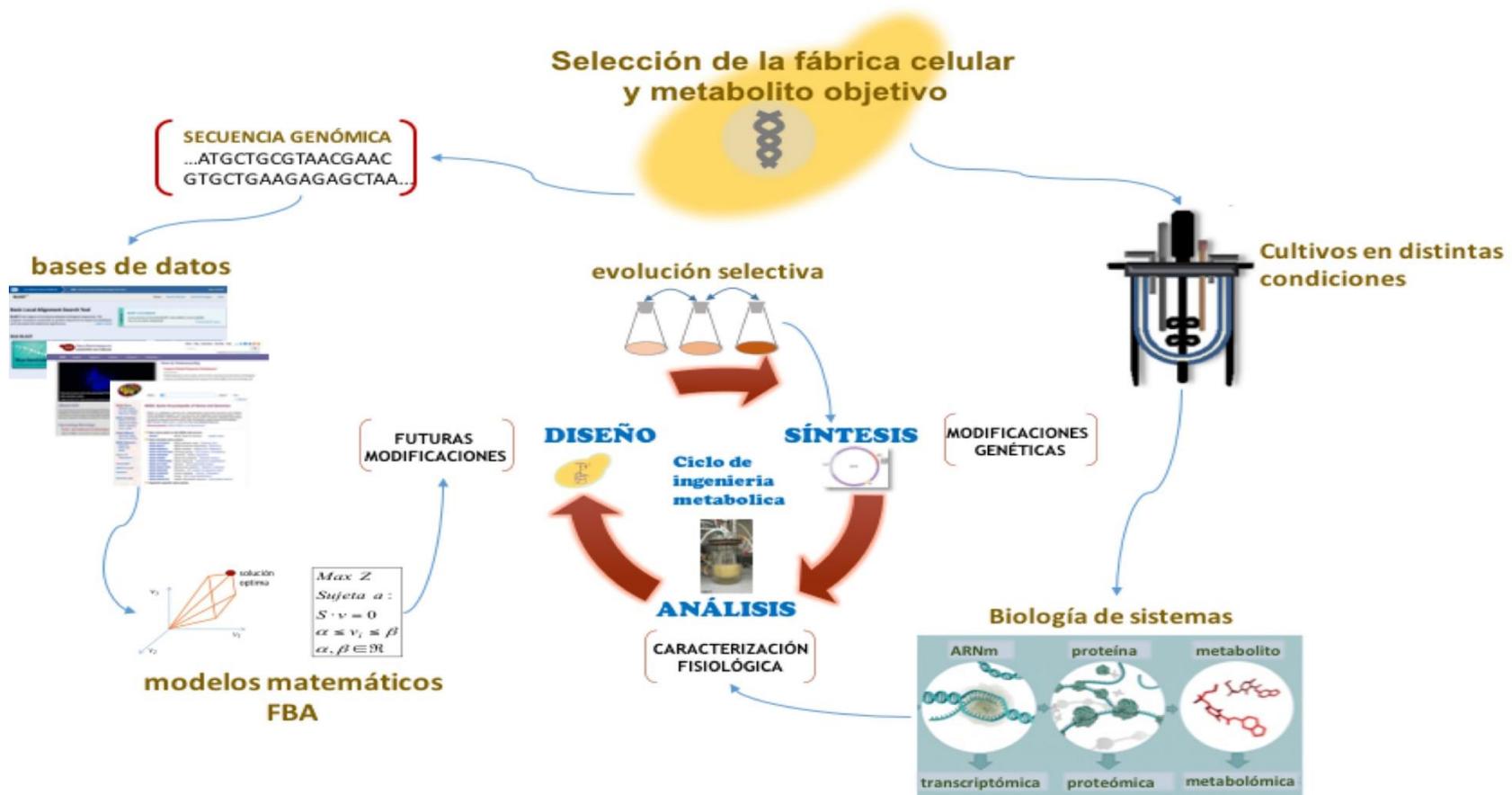


Fig. 7 La aplicación de modelos metabólicos en ingeniería metabólica requiere de la interacción con distintas fuentes de datos y disciplinas. El fundamento de los modelos a escala genómica es la disponibilidad de las secuencias genómicas para lograr una anotación completa del metabolismo. A partir de este listado se genera un marco matemático que interacciona con el ciclo de la ingeniería metabólica, proporcionando estrategias racionales para la producción de objetivos de producción de metabolitos.

Los modelos del metabolismo, herramientas computacionales y los datos ‘ómicos’

Los GSMM permiten una visión holística del sistema biológico con la cual es posible abarcar una caracterización más profunda del metabolismo. En consecuencia, el uso de los modelos metabólicos no se ha limitado sólo a llevar a cabo evaluaciones con la metodología de FBA. Los modelos han servido como andamios para la evaluación e interpretación de datos ómicos tales como, proteómica, metabolómica y transcriptómica, por mencionar algunos ejemplos. Con la ayuda de los modelos se logra analizar de manera sistemática los datos ómicos y lograr su integración en la interpretación de los resultados para dar mayor alcance a las predicciones y observaciones (Hyduke, Lewis *et al.* 2013).

Pero no solo se requieren fabricas celulares con mejor capacidad de producir metabolitos, también es necesario que tengan la posibilidad de consumir distintos sustratos provenientes de las materias primas renovables. La hidrólisis de los materiales de lignocelulosa provee una mezcla de xilosa y glucosa. Microorganismos como *Escherichia coli* presentan el efecto de represión catabólica cuando en las condiciones de cultivo se tienen múltiples sustratos; por ejemplo, existen casos donde la glucosa es el sustrato preferido. Para abordar esta problemática se desarrolló el método SIMUP con el cual es posible predecir grupos de genes que al deletarlos mejoran la co-utilización de sustratos (Gawand, Hyland *et al.* 2013).

Como se había mencionado, el modelado basado en FBA hace uso de algoritmos de optimización, en específico los de programación lineal. Pero también existen otros algoritmos de optimización no-lineal con los cuales se han desarrollado nuevas metodologías de modelado matemático y poder mejorar la capacidad predictiva. Basado en un algoritmo no lineal, la aproximación de minimización del ajuste metabólico (MOMA, siglas en Inglés) mejora la predicción en la distribución de flujos cuando se eliminan genes (Segre, Vitkup *et al.* 2002). Para cubrir la deficiencia de no incluir cuestiones regulatorias en los modelos metabólicos, se han aplicado aproximaciones de optimización basadas en decisiones booleanas, tal es el caso del algoritmo ROOM (Shlomi, Berkman *et al.* 2005).

En paralelo al incremento de la generación de datos sobre las reacciones existentes, se tienen métodos basados en un uso intensivo de cómputo. Los análisis de delección o inserción de genes se llevan a cabo de forma combinatoria entre una o más reacciones, lo que requiere una gran capacidad de cómputo. Algoritmos como Optstrain (Pharkya, Burgard *et al.* 2004, Pharkya, Burgard *et al.* 2005) permiten conducir el análisis de inserción de rutas metabólicas con tres o más genes y evaluar el incremento en la productividad. En el caso de explorar combinaciones para la eliminación de genes, las aplicaciones como Optnock (Burgard, Pharkya *et al.* 2003, Pharkya, Burgard *et al.* 2003) y OptGene (Rocha, Maia *et al.* 2008) generan una gran cantidad de resultados que podrían conducir a un diseño óptimo metabólico.

Perspectivas de aplicación de los modelos metabólicos

Los modelos metabólicos son una herramienta ampliamente utilizada para la caracterización y optimización de la capacidad productiva de un microorganismo. En particular, los modelos estequiométricos del metabolismo han sido ampliamente usados para generar estrategias de ingeniería metabólica. Se han aplicado para incrementar la capacidad de las fábricas celulares y lograr procesos sustentables para la producción de químicos de interés industrial y bioactivos. Su aplicación se fundamenta en describir a los microorganismos a partir de una visión integral de las reacciones que involucran el metabolismo celular. Es claro que esta visión puede limitar la capacidad predictiva de los modelos, ya que no considera otras funciones celulares de vital importancia; como lo es la síntesis de proteínas. No obstante, con la actual disponibilidad de técnicas de secuenciación de genomas, técnicas ómicas y el acceso a bases de datos, es posible incrementar la posibilidad de mejorar las aproximaciones matemáticas y computacionales que auxilien en el diseño de sistemas biológicos.

Bibliografía

- Agren, R., J. M. Otero and J. Nielsen (2013). "Genome-scale modeling enables metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **40**(7): 735-747.
- Alper, H., Y. S. Jin, J. F. Moxley and G. Stephanopoulos (2005). "Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*." Metab Eng **7**(3): 155-164.
- Alper, H., Y. S. Jin, J. F. Moxley and G. Stephanopoulos (2005). "Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*." Metabolic Engineering **7**(3): 155-164.
- Alper, H., K. Miyaoku and G. Stephanopoulos (2005). "Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets." Nat Biotechnol **23**(5): 612-616.
- Asadollahi, M. A., J. Maury, K. R. Patil, M. Schalk, A. Clark and J. Nielsen (2009). "Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through *in silico* driven metabolic engineering." Metabolic Engineering **11**(6): 328-334.
- Bantscheff, M. and B. Kuster (2012). "Quantitative mass spectrometry in proteomics." Anal Bioanal Chem **404**(4): 937-938.
- Blazier, A. S. and J. A. Papin (2012). "Integration of expression data in genome-scale metabolic network reconstructions." Front Physiol **3**: 299.
- Borodina, I., K. R. Kildegaard, N. B. Jensen, T. H. Blicher, J. Maury, S. Sherstyk, K. Schneider, P. Lamosa, M. J. Herrgard, I. Rosenstand, F. Oberg, J. Forster and J. Nielsen (2015). "Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via beta-alanine." Metab Eng **27**: 57-64.
- Bro, C., B. Regenber, J. Forster and J. Nielsen (2006). "*In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production." Metab Eng **8**(2): 102-111.
- Bro, C., B. Regenber, J. Forster and J. Nielsen (2006). "*In silico* aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production." Metabolic Engineering **8**(2): 102-111.
- Burgard, A. P., P. Pharkya and C. D. Maranas (2003). "Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization." Biotechnol Bioeng **84**(6): 647-657.
- Cameron, I. T. and K. Hangos (2001). Process modelling and model analysis, Academic Press.

Chuang, H. Y., M. Hofree and T. Ideker (2010). "A decade of systems biology." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 721-744.

Costanzo, M. C., S. R. Engel, E. D. Wong, P. Lloyd, K. Karra, E. T. Chan, S. Weng, K. M. Paskov, G. R. Roe, G. Binkley, B. C. Hitz and M. Cherry (2014). "Saccharomyces genome database provides new regulation data." Nucleic Acids Research **42**(D1): D717-D725.

Dobson, P. D., K. Smallbone, D. Jameson, E. Simeonidis, K. Lanthaler, P. Pir, C. A. Lu, N. Swainston, W. B. Dunn, P. Fisher, D. Hull, M. Brown, O. Oshota, N. J. Stanford, D. B. Kell, R. D. King, S. G. Oliver, R. D. Stevens and P. Mendes (2010). "Further developments towards a genome-scale metabolic model of yeast." Bmc Systems Biology **4**.

Famili, I., J. Forster, J. Nielson and B. O. Palsson (2003). "Saccharomyces cerevisiae phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(23): 13134-13139.

Famili, I. and B. O. Palsson (2003). "Systemic metabolic reactions are obtained by singular value decomposition of genome-scale stoichiometric matrices." Journal of Theoretical Biology **224**(1): 87-96.

Feist, A. M. and B. O. Palsson (2010). "The biomass objective function." Current Opinion in Microbiology **13**(3): 344-349.

Finn, R. D., B. L. Miller, J. Clements and A. Bateman (2014). "iPfam: a database of protein family and domain interactions found in the Protein Data Bank." Nucleic Acids Research **42**(D1): D364-D373.

Forster, J., I. Famili, P. Fu, B. O. Palsson and J. Nielsen (2003). "Genome-scale reconstruction of the Saccharomyces cerevisiae metabolic network." Genome Research **13**(2): 244-253.

Gawand, P., P. Hyland, A. Ekins, V. J. Martin and R. Mahadevan (2013). "Novel approach to engineer strains for simultaneous sugar utilization." Metab Eng **20**: 63-72.

Gottschalk, G. (2012). Bacterial metabolism, Springer Science & Business Media.

Haw, R., G. M. Wu, M. Milacic, K. Rothfels, D. Croft, H. Hermjakob, P. D'Eustachio and L. Stein (2014). "Reactome Knowledgebase: A Platform for Pathway and Network Analysis." Drug Metabolism Reviews **45**: 45-46.

Hyduke, D. R., N. E. Lewis and B. O. Palsson (2013). "Analysis of omics data with genome-scale models of metabolism." Mol Biosyst **9**(2): 167-174.

Illanes, A. (2008). Enzyme biocatalysis: principles and applications, Springer Science & Business Media.

- Ivanov, A. S., V. G. Zgoda and A. I. Archakov (2011). "Technologies of Protein Interactomics: A Review." Russian Journal of Bioorganic Chemistry **37**(1): 4-16.
- Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi and M. Tanabe (2014). "Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG." Nucleic Acids Research **42**(D1): D199-D205.
- Kell, D. B. (2006). "Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development." Drug Discovery Today **11**(23-24): 1085-1092.
- Keseler, I. M., A. Mackie, M. Peralta-Gil, A. Santos-Zavaleta, S. Gama-Castro, C. Bonavides-Martinez, C. Fulcher, A. M. Huerta, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse, L. Muniz-Rascado, Q. Ong, S. Paley, I. Schroder, A. G. Shearer, P. Subhraveti, M. Travers, D. Weerasinghe, V. Weiss, J. Collado-Vides, R. P. Gunsalus, I. Paulsen and P. D. Karp (2013). "EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology." Nucleic Acids Research **41**(D1): D605-D612.
- Kitano, H. (2002). "Computational systems biology." Nature **420**(6912): 206-210.
- Kitano, H. (2002). "Systems biology: a brief overview." Science **295**(5560): 1662-1664.
- Klipp, E., W. Liebermeister, C. Wierling, A. Kowald and R. Herwig (2016). Systems biology: a textbook, John Wiley & Sons.
- Lee, D., K. Smallbone, W. B. Dunn, E. Murabito, C. L. Winder, D. B. Kell, P. Mendes and N. Swainston (2012). "Improving metabolic flux predictions using absolute gene expression data." Bmc Systems Biology **6**.
- Lee, K. H., J. H. Park, T. Y. Kim, H. U. Kim and S. Y. Lee (2007). "Systems metabolic engineering of Escherichia coli for L-threonine production." Mol Syst Biol **3**: 149.
- Lee, S. Y. and S. H. Hong (2002). "Engineering of Escherichia coli central metabolic pathways for the production of succinic acid." Biological Systems Engineering **830**: 30-38.
- Lee, S. Y., S. H. Hong and S. Y. Moon (2002). "*In silico* metabolic pathway analysis and design: succinic acid production by metabolically engineered Escherichia coli as an example." Genome Inform **13**: 214-223.
- Link, H., D. Christodoulou and U. Sauer (2014). "Advancing metabolic models with kinetic information." Current Opinion in Biotechnology **29**: 8-14.
- Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 387-402.

- McAnulty, M. J., J. Y. Yen, B. G. Freedman and R. S. Senger (2012). "Genome-scale modeling using flux ratio constraints to enable metabolic engineering of clostridial metabolism *in silico*." BMC systems biology **6**(1): 1.
- Meijer, S., M. L. Nielsen, L. Olsson and J. Nielsen (2009). "Gene deletion of cytosolic ATP: citrate lyase leads to altered organic acid production in *Aspergillus niger*." J Ind Microbiol Biotechnol **36**(10): 1275-1280.
- Moreno-Sánchez, R., E. Saavedra, S. Rodríguez-Enríquez and V. Olín-Sandoval (2008). "Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways." BioMed Research International **2008**.
- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter (1990). Physiology of the bacterial cell: a molecular approach, Sinauer Sunderland.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2014). Principios de bioquímica de Lehninger, Artmed Porto Alegre.
- Neumann, R. S., S. Kumar, T. H. Haverkamp and K. Shalchian-Tabrizi (2014). "BLASTGrabber: a bioinformatic tool for visualization, analysis and sequence selection of massive BLAST data." BMC Bioinformatics **15**: 128.
- Nissen, T. L., U. Schulze, J. Nielsen and J. Villadsen (1997). "Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiology-Uk **143**: 203-218.
- Nookaew, I., R. Olivares-Hernández, S. Bhumiratana and J. Nielsen (2011). "Genome-scale metabolic models of *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast Systems Biology: Methods and Protocols: 445-463.
- Ohno, S., C. Furusawa and H. Shimizu (2013). "*In silico* screening of triple reaction knockout *Escherichia coli* strains for overproduction of useful metabolites." J Biosci Bioeng **115**(2): 221-228.
- Ohno, S., C. Furusawa and H. Shimizu (2013). "*In silico* screening of triple reaction knockout *Escherichia coli* strains for overproduction of useful metabolites." Journal of Bioscience and Bioengineering **115**(2): 221-228.
- Orth, J. D., R. M. Fleming and B. O. Palsson (2010). "Reconstruction and use of microbial metabolic networks: the core *Escherichia coli* metabolic model as an educational guide." EcoSal plus.
- Palsson, B. and B. Ø. Palsson (2015). Systems biology, Cambridge university press.
- Pappalardo, F., G. Russo, S. Candido, M. Pennisi, S. Cavalieri, S. Motta, J. A. McCubrey, F. Nicoletti and M. Libra (2016). "Computational Modeling of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Melanoma Cancer." PLoS One **11**(3): e0152104.

Park, J. H., K. H. Lee, T. Y. Kim and S. Y. Lee (2007). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7797-7802.

Pharkya, P., A. P. Burgard and C. D. Maranas (2003). "Exploring the overproduction of amino acids using the bilevel optimization framework OptKnock." Biotechnol Bioeng **84**(7): 887-899.

Pharkya, P., A. P. Burgard and C. D. Maranas (2004). "OptStrain: A computational framework for redesign of microbial production systems." Genome Research **14**(11): 2367-2376.

Pharkya, P., A. P. Burgard and C. D. Maranas (2005). "Optstrain: A computational framework for redesign of microbial production systems." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **229**: U237-U237.

Rocha, I., P. Maia, M. Rocha and E. C. Ferreira (2008). OptGene: a framework for *in silico* metabolic engineering. Book of Abstracts of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference-CHEMPOR.

Rose, P. W., C. X. Bi, W. F. Bluhm, C. H. Christie, D. Dimitropoulos, S. Dutta, R. K. Green, D. S. Goodsell, A. Prlic, M. Quesada, G. B. Quinn, A. G. Ramos, J. D. Westbrook, J. Young, C. Zardecki, H. M. Berman and P. E. Bourne (2013). "The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education." Nucleic Acids Research **41**(D1): D475-D482.

Schuetz, R., L. Kuepfer and U. Sauer (2007). "Systematic evaluation of objective functions for predicting intracellular fluxes in *Escherichia coli*." Molecular Systems Biology **3**.

Segre, D., D. Vitkup and G. M. Church (2002). "Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(23): 15112-15117.

Shen, C. R. and J. C. Liao (2013). "Synergy as design principle for metabolic engineering of 1-propanol production in *Escherichia coli*." Metab Eng **17**: 12-22.

Shlomi, T., O. Berkman and E. Ruppin (2005). "Regulatory on/off minimization of metabolic flux changes after genetic perturbations." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(21): 7695-7700.

Song, H., T. Y. Kim, B. K. Choi, S. J. Choi, L. K. Nielsen, H. N. Chang and S. Y. Lee (2008). "Development of chemically defined medium for *Mannheimia succiniciproducens* based on its genome sequence." Appl Microbiol Biotechnol **79**(2): 263-272.

Stephanopoulos, G., A. A. Aristidou and J. Nielsen (1998). Metabolic engineering: principles and methodologies, Academic press.

Sun, Z. Q., H. L. Meng, J. Li, J. F. Wang, Q. Li, Y. Wang and Y. S. Zhang (2014). "Identification of Novel Knockout Targets for Improving Terpenoids Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Plos One* **9**(11).

Swainston, N., K. Smallbone, P. Mendes, D. Kell and N. Paton (2011). "The SuBliMinaL Toolbox: automating steps in the reconstruction of metabolic networks." *J Integr Bioinform* **8**(2): 186.

Thiele, I. and B. O. Palsson (2010). "A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction." *Nature Protocols* **5**(1): 93-121.

Thiele, I. and B. O. Palsson (2010). "A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction." *Nat Protoc* **5**(1): 93-121.

Touw, W. G., J. R. Bayjanov, L. Overmars, L. Backus, J. Boekhorst, M. Wels and S. A. van Hijum (2013). "Data mining in the Life Sciences with Random Forest: a walk in the park or lost in the jungle?" *Brief Bioinform* **14**(3): 315-326.

Vallino, J. J. and G. Stephanopoulos (1993). "Metabolic Flux Distributions in *Corynebacterium-Glutamicum* during Growth and Lysine Overproduction." *Biotechnology and Bioengineering* **41**(6): 633-646.

van Gulik, W. M. and J. J. Heijnen (1995). "A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and product formation." *Biotechnol Bioeng* **48**(6): 681-698.

Varma, A. and B. O. Palsson (1994). "Stoichiometric Flux Balance Models Quantitatively Predict Growth and Metabolic by-Product Secretion in Wild-Type *Escherichia-Coli* W3110." *Applied and Environmental Microbiology* **60**(10): 3724-3731.

Villadsen, J., J. Nielsen and G. Lidén (2011). *Bioreaction Engineering Principles*, Springer US.

Wang, J., S. Guleria, M. A. G. Koffas and Y. J. Yan (2016). "Microbial production, of value-added nutraceuticals." *Current Opinion in Biotechnology* **37**: 97-104.

Winter, G. and J. O. Kromer (2013). "Fluxomics - connecting 'omics analysis and phenotypes." *Environmental Microbiology* **15**(7): 1901-1916.

Wishart, D. S. (2011). "Advances in metabolite identification." *Bioanalysis* **3**(15): 1769-1782.

9. ARIS: MODELO DE EVALUACIÓN *ex vivo*.

Marisela González Avila

Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, A.C.

mgavila@ciatej.mx

Introducción

En los últimos años el ritmo de vida de las personas ha cambiado bruscamente y se ha acelerado, la actividad física y sobre todo los hábitos alimenticios también han sido afectados, teniendo como consecuencia el padecimiento de enfermedades crónicas no transmisibles tales como la diabetes, obesidad e hipertensión, por lo que la Organización Mundial de la Salud ha implementado un plan estratégico 2013-2019 para combatir este tipo de enfermedades, dando énfasis en la atención a la industria farmacéutica y alimentaria.

Hacer evaluaciones de digestibilidad de alimentos funcionales, fármacos, determinar efecto pre y probiótico en pacientes se complica debido a la poca disponibilidad y compromiso que llegan a tener con el tratamiento, o por que las intervenciones suelen ser invasivas, resultando un problema bioético. También se usan modelos animales para estudiar la interacción de, sin embargo, aunque dan un acercamiento a los procesos fisiológicos de los humanos, recientes investigaciones realizadas por Ritchie L.E. y cols., en 2015, han señalado que la microbiota nativa de los modelos animales, no es comparable con la de los humanos. Por lo tanto, investigadores han simulado el tracto digestivo humano *in vitro* y *ex vivo*. Así el conocimiento de la fisiología del tracto digestivo humano resulta importante, para así poder llevar a cabo la simulación.

La definición *ex vivo* se refiere a tener fuera del cuerpo un órgano o sistema, viviendo en las condiciones lo más cercanas posibles a la fisiología que lo contiene. La microbiota intestinal se considera un órgano dado que se auto regula, es fundamental para la vida del ser que lo posee, lleva a cabo funciones que, si no son adecuadamente realizadas, llevan al ser

que la contiene a un estado de padecimiento o enfermedad, como cualquier otro órgano o sistema.

En el caso del aparato digestivo, específicamente del tracto digestivo, la función de éste es la transformación de las complejas moléculas de los alimentos en sustancias simples y fácilmente utilizables por el organismo. Estos procesos son auxiliados por la intervención de microorganismos presentes en la biota natural, localizada a lo largo del tracto gastrointestinal.

En la salud de los seres humanos, la microbiota intestinal (Fig. 1) juega un papel importante porque coloniza entre otras zonas, las diferentes regiones del colon, contribuyendo a la disponibilidad de nutrientes y energía mediante la fermentación de moléculas diversas principalmente carbohidratos no digeribles (Sekirov, 2010).

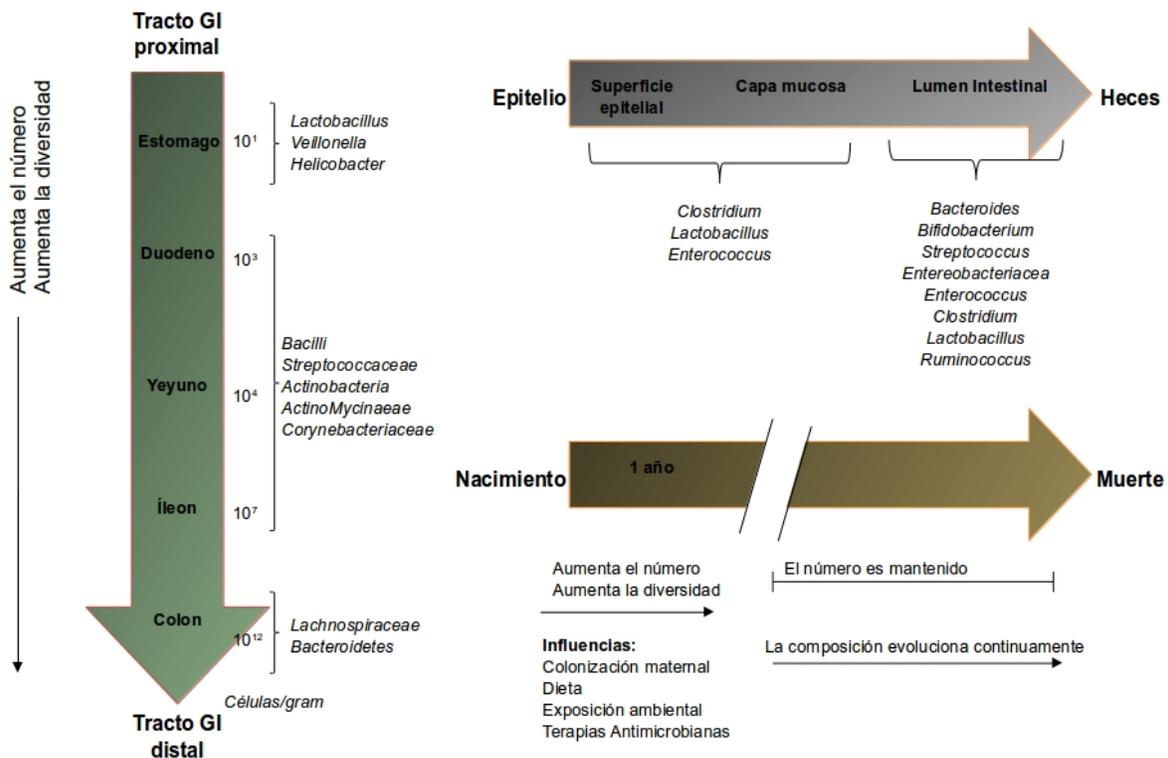


Fig. 1: Efectos espaciales y temporales en la composición de la microbiota, A) composición y variación en el número de microbios a lo largo del tracto gastrointestinal. B) variación de la composición microbiana en el intestino. C) Aspectos temporales de establecimiento y mantenimiento de la microbiota y factores influyen en su composición (tomado de Sekirov , 2010)].

Es requerido un balance adecuado de las especies de microorganismos en la microbiota para que el metabolismo y el sistema inmune funcionen de manera correcta. Un desequilibrio en la microbiota puede tener repercusiones negativas en la salud del huésped, tales como la inflamación e infección, procesos que contribuyen al desarrollo de diabetes y cáncer [7].

Se han desarrollado diversos modelos de digestión *in vitro*, atendiendo diferentes necesidades de evaluación, entre los existentes esta uno implementado por el Instituto Politécnico Nacional (IPN), en el cuál simularon únicamente al estómago y al intestino delgado, con sus respectivos valores de pH, pero sin tomar en cuenta a las enzimas pépticas y pancreáticas. El inicio de los modelos completos de digestión artificial fue con Molly *et al.*, en 1993, quienes simularon al intestino delgado en dos secciones y al intestino grueso en tres. Sin embargo, este modelo se ha ido modificando. El simulador más completo era el reportado por De Boever en el 2000, donde hace uso de biorreactores, en los cuales se inoculan con microbiota intestinal y simulan cinco partes del tracto digestivo humano, correspondientes a estómago, intestino delgado y tres secciones del colon; aquí se cumplen parámetros fisiológicos correspondientes a cada sección tales como pH, agitación continua, tiempo de retención y volumen de trabajo. En 2010, Possemiers *et al.*, describieron una adecuación para el proceso de simulación, donde reporta tres alimentaciones durante el día y los tiempos de retención modificados.

TIM-1 y TIM-2 son modelos gastrointestinales desarrollados por la Organización Holandesa para la Investigación Científica Aplicada (TNO). En los cuales TIM-1 simula al estómago e intestino delgado, TIM-2 simula al colon. Sin embargo, a pesar de que llega a simular parámetros fisiológicos, no están interconectados entre sí, adicionalmente su principal objetivo no es trabajar con microbiota intestinal.

Los sistemas de digestión artificial, han sido utilizados para describir procesos metabólicos ocurridos en los diferentes compartimentos que lo constituyen; así se han usado para cuantificar los metabolitos generados por la microbiota presente en el tracto digestivo y el potencial prebiótico de algunos compuestos (Gómez *et al.* 2010; Possemiers 2010). También se han usado para cuantificar e identificar los microorganismos presentes en la microbiota intestinal. Moreno-Ramos y Hernández-Moedano en el 2011 y 2012 respectivamente, mostraron avances en el establecimiento de un sistema de digestión

artificial preliminar, haciendo modificaciones sustanciales en el proceso con respecto del reportado por De Boever en el 2000 y Possemiers en el 2004 (solicitud de patente PA/A/2012/005418). Con este sistema preliminar se evaluó actividad prebiótica de diferentes fructanos derivados de agave. En éste se simularon cinco secciones del tracto digestivo con la ventaja de poder tomar muestras en el momento que se desea y de cualquier sección, haciendo más versátil este diseño (Arrizon *et al.* 2014).

Actualmente, se han desarrollado sistemas de digestión artificial en los cuales se han caracterizado metabolitos generados por la microbiota, así mismo se le ha dado seguimiento a microorganismos de interés: benéficos y no deseables (Hernández-Moedano *et al.* 2014).

ARIS

En México, específicamente en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco CIATEJ, se diseñó un sistema dinámico *ad hoc* que simula el tracto digestivo humano, para evaluar la digestibilidad de ingredientes, alimentos, suplementos, etc. donde se pueden simular diferentes partes del sistema gastrointestinal. El ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System) cumple con los requisitos de los sistemas dinámicos que incluyen las interacciones entre el vaciado gástrico, pH estomacal, acción enzimática, contenidos de agua, remoción de productos de la digestión o metabolitos de los microorganismos; tránsito del alimento a través de las diferentes secciones del tracto digestivo y la interacción entre los elementos bióticos y abióticos de la digestión en curso (Fig. 2).



Fig. 2 Simulador del Tracto Digestivo Humano ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System). Fotografía propiedad de Marisela González Avila

El interés por estudiar el comportamiento de las bacterias existentes en el aparato digestivo ha llevado a especialistas a diseñar diversas formas de simular cada una de sus regiones, tratando de asemejarse lo más posible a las condiciones existentes en esta parte del cuerpo. Los modelos *in vitro* pueden ser usados como una herramienta para estudiar interacciones microbiológicas y fisiológicas, sin embargo, es muy importante que incluyan los parámetros suficientes para obtener la información que se requiere, en un sistema de una manera tan simple como sea posible, es por ello que el sistema usado en CIATEJ es un sistema *ex vivo*. Cuando se usa un modelo *in vitro* del tracto digestivo, es necesario contar con información de los parámetros más relevantes *in vivo* como la morfología del tracto gastrointestinal, tiempos de residencia, rangos de secreción y composición de los jugos digestivos y biliares, perfiles de pH y composición de microflora, entre otros. Estos parámetros pueden variar entre especies, en individuos adultos y jóvenes y en personas con padecimientos metabólicos.

En el laboratorio de Digestión *ex vivo* se cuenta con una tecnología desarrollada y patentada por el CIATEJ, única en su tipo y comparable con dos tecnologías localizadas mundialmente, pero en concepto sustancialmente diferente de las otras dos, ofreciendo ventajas para la simulación, cuyos resultados son equivalentes a los obtenidos en humanos, ofreciendo la ventaja de ser más rápido, representar una población, más ecológico y más barato que realizar ensayos clínicos, incluso proporciona información direccionada a planificar éstos.

Conclusión

El uso de esta herramienta permitirá comprender algunos de los procesos de la digestión en humanos que no es posible seguir en los humanos mismos por cuestiones éticas. La biodisponibilidad de metabolitos y la transformación de los mismos a través de su paso por las diferentes zonas del tracto digestivo, podrán ir dilucidándose poco a poco, en la medida que estos modelos se acerquen a la mimetización de los procesos fisiológicos en humanos e migrándolos a otras especies con el objetivo final de reducir el uso de animales de experimentación y ahorrar energía, tiempo, dinero; así como ser procesos más ecológicos.

Referencias

- Armougom, F., *et al.*, *Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients.* PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7125.
- Arrizon, J., *et al.*, *in vitro prebiotic activity of fructans with different fructosyl linkage for symbiotics elaboration.* International Journal of Probiotics & Prebiotics, 2014. **9**(3): p. 69-76.
- Cummings, J.H., *The large intestine in nutrition and disease.* 1997: Institut Danone Brussels, Belgium.
- De Boever, P., Deplancke, B., & Verstraete, W. 2000. *Fermentation by Microbiota Cultured in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem is Improved by Supplementing a Soygerm Powder.* Nutritional Methodology, 2599-2606
- Ganong, W., *Gastrointestinal function.* 1991, New York: Mc Graw Hill.
- Gomez, E., *et al.*, *In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans.* Journal of Applied Microbiology, 2010. **108**(6): p. 2114-2121.
- Hernández-Moedano, A., Moreno-Ramos, E.F., Herrera-Rodríguez, S.E., González-Avila, M., *Changes in Intestinal Microorganisms Influenced By Agave Fructans in A Digestive Tract Simulator.* Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences 2014. **4**(Special): p. 19-25.
- Possemiers S, Verthé K, Uyttendaele S, Verstraete W. 2004. *PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem.* FEMS Microbiol Ecol. 1,49(3):495-507
- Possemiers, S., *et al.*, *Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery.* International Journal of Food Microbiology, 2010. **141**(1-2): p. 97-103.
- Sekirov, I., *et al.*, *Gut Microbiota in Health and Disease.* Vol. 90. 2010. 859-90.

10. NANOENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU IMPACTO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.

Gladys Páez Hernández

Hugo Espinosa-Andrews*

Tecnología alimentaria. CIATEJ, A.C

Alma Rosa Oaxaca Camacho

Rodolfo Hernández Gutiérrez⁺

Biología Médica y Farmacéutica. CIATEJ, A.C.

hspinos@ciatej.mx*; rhgutierrez@ciatej.mx⁺

Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, es una enfermedad caracterizada por la multiplicación acelerada y descontrolada de células de alguna parte del cuerpo, debido principalmente, a la acumulación de alteraciones genéticas en el ADN. A la fecha, se han reportado aproximadamente 200 tipos diferentes de cáncer. En otras palabras, cada órgano o tejido de nuestro cuerpo es susceptible de presentar o desarrollar algún tipo de cáncer.

Los niveles de incidencia y el número de nuevos casos se han incrementado en los últimos 20 años, aunque esa tendencia ha sido observada desde los años 70 del siglo pasado (BHGI, 2013), el incremento ha sido tan importante que la OMS ha declarado al cáncer, un problema de salud mundial. Según la OMS, el incremento en la ocurrencia de cáncer, se debe, entre otros factores, al envejecimiento y crecimiento de la población (en número), así como a los nuevos y mejores métodos de detección. Se estima, que cerca de la mitad de los hombres y una tercera parte de las mujeres serán diagnosticados con cáncer en algún momento de su

vida y que una cuarta parte de los adultos morirán a causa de esta enfermedad. Se menciona que, si para el año 2028 no se ha logrado encontrar o desarrollar terapias más efectivas para tratar esta enfermedad, los niveles de incidencia y mortalidad podrán alcanzarán niveles de epidemia mundial.

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) compila los datos de registro y la mortalidad a nivel mundial. En el 2012, la IARC reportó (IARC, 2012), 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes. Se estima, que para el año 2030, el número de casos nuevos se incrementará a 23.6 millones y el número de muertes será de al menos 13.8 millones (Fig. 1).

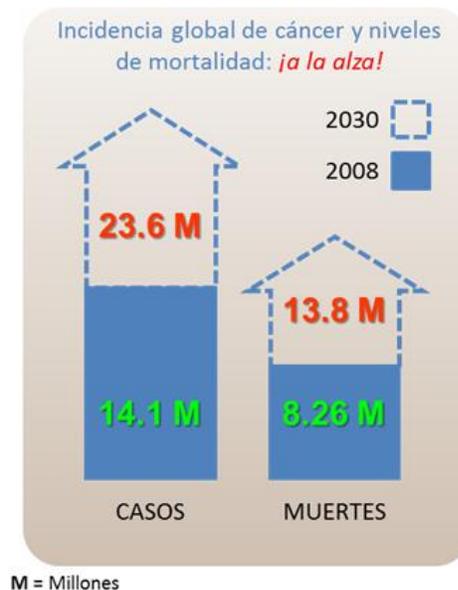


Fig. 1 Incidenca global de cáncer e índices de mortalidad.

En México, datos del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), registran 160 mil nuevos casos de cáncer cada año, 80 mil fallecimientos y cerca del 70 por ciento se diagnostica en etapas avanzadas de la enfermedad (Salud, 2016). Algunos de los principales factores de riesgo asociados con el desarrollo del cáncer, son los hábitos alimenticios, el sobrepeso/obesidad, la inactividad física o sedentarismo, el tabaquismo, el consumo de alcohol y algunos tipos de infecciones. No obstante, un número importante de casos y muertes por cáncer podrían ser prevenidos mediante la implementación de medidas de prevención efectivas, como el control del tabaquismo, reducir el consumo de alcohol, evitar

la exposición prolongada al sol, la vacunación, el uso de pruebas de detección oportuna y el tratamiento en etapas tempranas de la enfermedad.

Los cinco tipos de cáncer que causan el mayor número de fallecimientos a nivel mundial son: cáncer pulmonar con 1,69 millones de defunciones, cáncer hepático con 788 000 defunciones, cáncer colorrectal con 774 000 defunciones, cáncer gástrico con 754 000 defunciones y cáncer de mama con 571 000 defunciones. Mientras que, en México, en el caso de las mujeres el cáncer de mama se reporta con el mayor número de muertes (Fig. 2a) y para los hombres se atribuye el mayor número de muertes al cáncer de próstata (Fig. 2b).

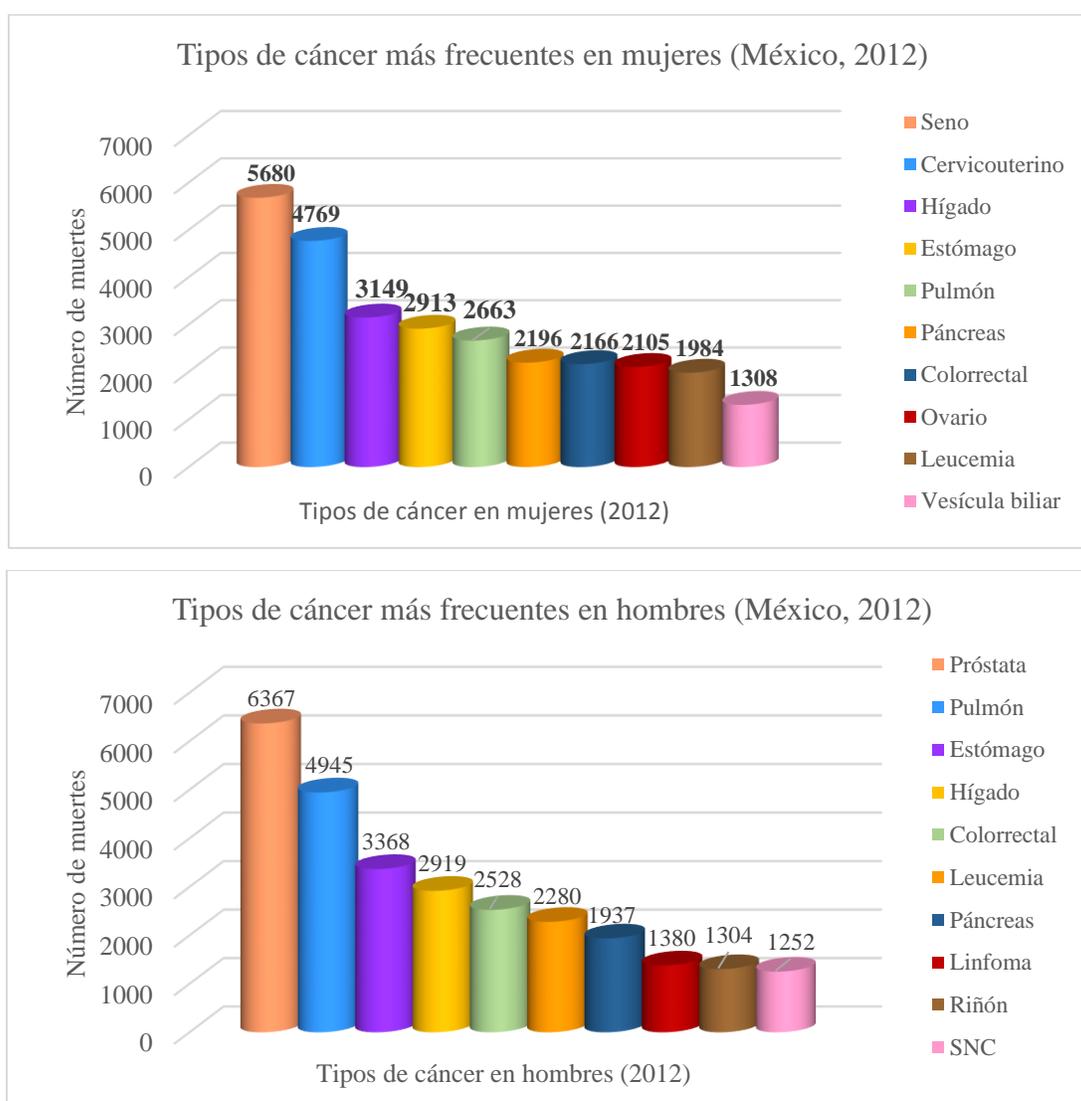


Fig. 2 Tipos de cáncer más frecuentes de México en el 2012: a) Incidencia en mujeres; y b) incidencia en hombres

En la infancia y adolescencia el cáncer es una enfermedad poco frecuente en comparación con los adultos; sin embargo, constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre la población menor a 20 años de edad (INEGI, 2016).

En general, no existen datos confiables sobre los costos que implica el tratamiento del cáncer a nivel mundial. En el año 2012, en Estados Unidos de América reportaron que los gastos anuales rondaban los 67 billones de dólares, y se estima, que en los próximos 20 años ese valor se incrementará hasta 1 trillón de dólares.

Tratamiento contra el cáncer.

Actualmente, existen diversos tipos de tratamiento contra el cáncer. Este depende del tipo y etapa de desarrollo de la neoplasia que presenta el paciente. Algunos pacientes son tratados con un solo tipo de tratamiento, como la quimioterapia o radiación; mientras que otros pacientes son sometidos a una combinación de tratamientos, como la cirugía combinada con la quimioterapia y/o radiación. En algunos casos, también es factible utilizar la inmunoterapia, terapia dirigida u hormonoterapia. Algunas terapias alternativas como el trasplante de células madre, la hipertermia (termoterapia), la terapia fotodinámica, el trasplante o donación de sangre y tratamiento con láser, se distinguen como algunas opciones más. El Instituto Nacional del Cáncer (NIC, por sus siglas en inglés) que depende del Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos de América, cita que existen cerca de 200 tipos de drogas antitumorales/anticancerosas, agentes quimioterapéuticos, citotóxicos e inmunomoduladores. Sin embargo, estas sustancias son asociadas con efectos secundarios graves y una elevada morbilidad. Debido a los efectos adversos y al poco éxito de los tratamientos contra el cáncer en etapas avanzadas, se continúa la búsqueda de tratamientos alternos de diferente acción que minimicen o eliminen los efectos secundarios y que presenten una mayor efectividad en pacientes con pronóstico grave. Algunos de los medicamentos utilizados hoy en día para el tratamiento del cáncer son: alquilantes, antraciclinas, alcaloides, anticuerpos monoclonales, cisplatino, antimetabolitos, inhibidores de mitosis, entre otros (Espinosa *et al.*, 2003). Dentro de estas clasificaciones algunos fármacos antineoplásicos, que impiden el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas, son extraídos de plantas medicinales.

La carencia de tratamientos efectivos y/o moléculas antitumorales para el tratamiento de algunos tipos de cánceres muy agresivos, identificados en etapas avanzadas en pacientes con pronóstico grave, no se debe a la falta de interés en el desarrollo o descubrimiento de nuevas alternativas de tratamiento. Los estudios sobre el valor del mercado global de drogas antineoplásicas, nos evidencian la relevancia económica de este mercado. Haciendo un análisis de este tema en particular, se puede observar que el mercado global de las drogas antineoplásicas, se ha incrementado a partir de inicios de éste siglo, y sobre todo, en la última década. En el año 2007 se reportó que el valor del mercado rondaba los 40 billones de dólares; para el año 2013, el valor se incrementó en más del 100%, presentando un valor aproximado de 110 billones de dólares y algunos expertos estiman un valor de 172 billones de dólares para el año 2020 (Fig. 2)

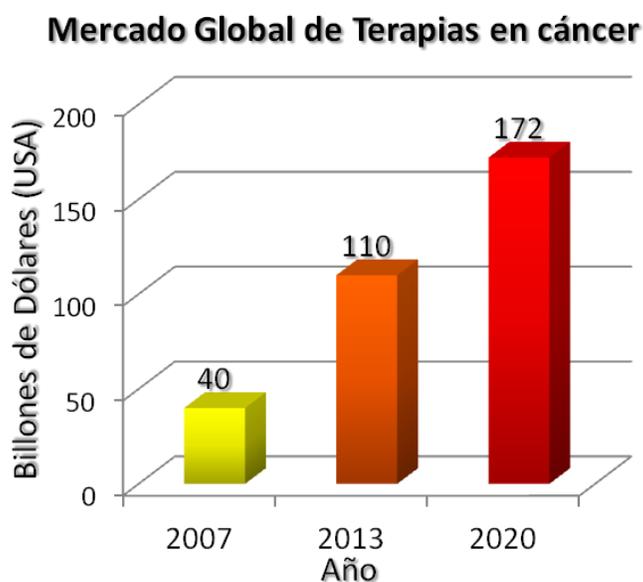


Fig. 2 Valor del mercado global de las terapias contra cáncer.

Aún con estos datos monetarios, en este momento, existe la necesidad de encontrar nuevos agentes, compuestos y/o formulaciones con actividad anticancerígena, que sean útiles para disminuir los altos índices de morbilidad y mortalidad causadas por el cáncer, y por supuesto reducir el costo originado por la enfermedad. Una excelente opción es el diseño y desarrollo de nuevas terapias basadas en fuentes naturales.

Biodisponibilidad

La Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) define la biodisponibilidad como la tasa a la cual el compuesto terapéutico se absorbe y llega al sitio de acción. Debido a las dificultades que implica tener acceso *in vivo* en los sitios de acción de cada fármaco, utilizar el término con precisión cuantitativa o para calcular los valores exactos en humanos, resulta ser un gran desafío. En la farmacología “clásica” la biodisponibilidad abarca varios procesos vinculados e integrados: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción. Existen muchos factores que afectan la biodisponibilidad de un compuesto, estos se dividen en factores exógenos, como la complejidad de la matriz en la que se encuentra el compuesto, la forma química del compuesto de interés, la estructura y cantidad de compuestos co-ingrididos; mientras que los factores endógenos incluyen la cantidad de mucosa, el tiempo de tránsito intestinal, velocidad de vaciado gástrico, metabolismo y unión a proteínas en sangre y tejidos (Holst y Williamson, 2008).

Durante la última década, el uso de fármacos antineoplásicos orales ha aumentado, debido a la preferencia del paciente, a los menores costos y a la eficacia comprobada. Sin embargo, la administración oral de fármacos antineoplásicos, a menudo se ve obstaculizada por una baja biodisponibilidad. La mayoría de los fármacos contra el cáncer tienen una estrecha ventana terapéutica y suelen ser dosificados en la dosis máxima tolerada o cercana a ella. Esta variabilidad en la biodisponibilidad del principio activo puede tener un impacto negativo en el resultado del tratamiento (Stuurman *et al.*, 2013).

Tecnologías de dosificación de sustancias activas

Los problemas antes mencionados suelen ser abordados mediante el incremento de la biodisponibilidad del compuesto activo, empleando menores dosis. Algunas técnicas de encapsulación que incluyen liposomas, micelas, dendrímeros, nanopartículas, complejos de fosfolípidos, complejos de anticuerpos monoclonales con un fármaco (Fay y Scott, 2011), complejos con ciclodextrinas y nanoemulsiones (Vecchione *et al.*, 2016) suelen ser empleadas para resolver el problema (Fig. 3).

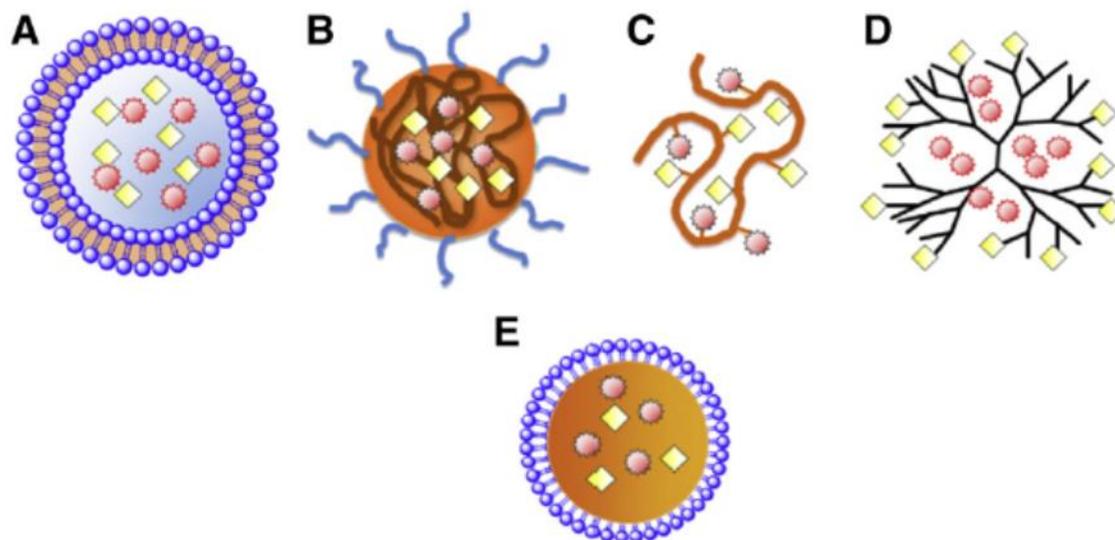


Fig. 3 Sistemas combinados con fármacos para el tratamiento de cáncer. A) Liposomas, B) micelas, C) polímero conjugado con fármacos, D) dendrímero, E) nanoemulsión (Iyer *et al.*, 2013)

Los símbolos y representan diferentes tipos de drogas.

Estas tecnologías son empleadas para la administración controlada de sustancias activas (Solans *et al.*, 2005). En muchas ocasiones, la sustancia activa se encuentra en estado cristalino, lo que hace difícil su incorporación en las formulaciones líquidas. De manera general, esta fase cristalina puede formar agregados y sedimentos, originando dificultades durante la dosificación. Algunos otros factores que pueden afectar la biodisponibilidad son relacionados con el tipo de estructura cristalina (polimorfismo), tamaño de partícula, grado de hidratación del cristal y forma de la sal o éster. Aunado a esto, la presencia de cristales puede afectar negativamente la apariencia, textura y palatabilidad en los productos comerciales, lo que puede originar que el consumidor no ingiera la dosis diaria recomendada (McClements, 2012).

La apropiada administración de estos compuestos, requiere un vehículo adecuado, que permita dosificar efectivamente el componente activo en el sitio apropiado (Qingrong *et al.*, 2010). Es por ello, que el uso de liposomas se vislumbra como una tecnología idónea. Sin embargo, la formación de liposomas requiere del uso de concentraciones muy altas del

surfactante, generalmente más del 20%, lo que puede ocasionar un incremento de la toxicidad en algunas aplicaciones. Una nueva estrategia son las nanoemulsiones, estas presentan ventajas de solubilidad, biodisponibilidad y perfiles farmacocinéticos apropiados en la liberación de compuestos bioactivos (Kaur *et al.*, 2015). Debido a su pequeño tamaño (< 300 nm) son estables a los procesos de agregación y separación gravitacional, en comparación con las emulsiones convencionales (McClements, 2011). El tamaño final de la partícula dependerá de la composición del sistema (relación surfactante: aceite, tipo de surfactante, fuerza iónica), método de preparación (orden de la adición de los componentes, velocidad de agitación) y condiciones ambientales (temperatura) (McClements, 2013). Por ejemplo, Jayaprakasha *et al.* (2016) evaluaron el efecto de las nanopartículas de curcumina en líneas celulares de cáncer de colon (SW480) y cáncer de próstata (LNCaP). Los nanoencapsulados presentaron una actividad tres veces mayor a bajas concentraciones (16.86 μM) en comparación con la concentración (50 μM) de la curcumina nativa. La tabla 1 presenta algunos estudios sobre el uso de agentes antineoplásicos en nanoemulsiones.

Tabla 1. Agentes antineoplásicos mejorados al emplearse en nanoemulsiones (Praveen y Dyvia, 2015).

Agentes antineoplásicos	Formulación	Resultado
Bencilistiocianato	Nanoemulsión de semillas de aceite de lino	Citotoxicidad <i>in vitro</i> en líneas celulares A549 y SKOV-3
Cúrcuma	Microemulsión con lecitina	Citotoxicidad <i>in vitro</i> en líneas celulares OSCC-4 y OSCC.
Melfalan	Nanoemulsión en MCM de Capmul	Duplicó la distribución en ovarios
Metotrexato	Microemulsión de soya	Citotoxicidad <i>in vitro</i> en líneas celulares MCF-7
Paclitaxel	Fármaco cargado en una nanoemulsión y co-administrado con cúrcuma	Incrementó la absorción 3.2 veces.

Compuestos bioactivos

En la actualidad, sólo un número limitado de compuestos bioactivos son utilizados para tratar el cáncer. Particularmente, el grupo de fenoles y carotenos destacan por su actividad anticancerígena (Aggarwal *et al.*, 2006). Estas moléculas cristalinas poseen una naturaleza hidrofóbica, baja solubilidad y permeabilidad en el tracto gastrointestinal, lo que, reduce su biodisponibilidad. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas más importantes se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos bioactivo.

Compuesto	Log P	pK _a	C _{sw} (g/L)	T _f (°C)
Curcumina	3.07	8.1	3.12×10 ⁻³	183
Quercetina	1.99	6.3	1.9	316.5
Capsaicina	3.20	9.9	0.14	65
Licopeno	14.50	-	3.7×10 ⁻⁹	185
β-caroteno	14.76	-	1.5×10 ⁻⁹	170

Log P: logaritmo del coeficiente de reparto aceite-agua, pK_a: contante de disociación, C_{sw}: solubilidad en agua T= 25 °C, y T_f: temperatura de fusión.

1. *Curcumina*

La cúrcuma es una especia extraída de la raíz de la *Curcuma longa*, un miembro de la familia del jengibre, ampliamente utilizada en la medicina tradicional de China e India (Vecchione *et al.*, 2016). Aproximadamente del 2 al 6% de la cúrcuma son curcuminoides: 80% curcumina, 18% demetoxicurcumina y 2% bisdemetoxicurcumina (Fig. 4). Estos compuestos fenólicos poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antibacterial, antifúngica y anticancerígena, se les atribuye un gran potencial contra enfermedades relacionadas con el cáncer, diabetes, alergias, artritis, Alzheimer, estrés oxidativo, entre otras (Aggarwal *et al.*, 2007).

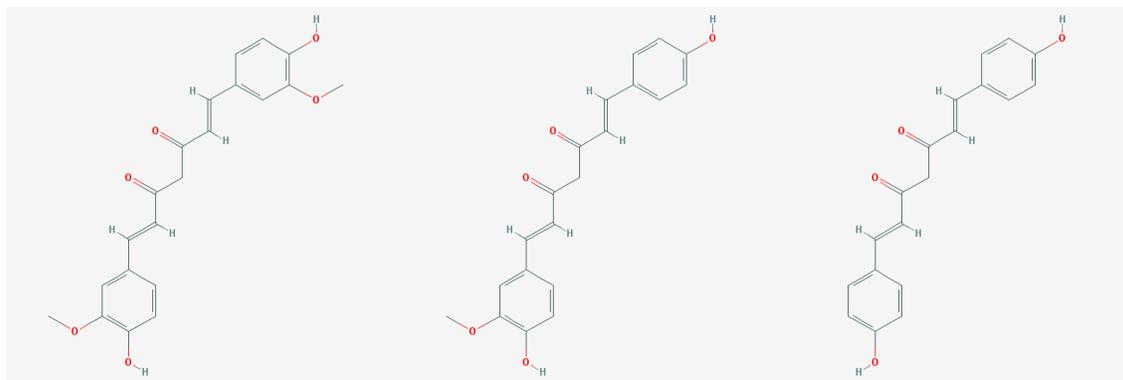


Fig. 4 Estructura química de curcuminoides: a) curcumina, b) demetoxicurcumina y c) bisdemetoxicurcumina (Pubchem).

El primer reporte clínico de la cúrcuma contra el cáncer fue realizado en 1987, en donde, 62 pacientes con lesiones cancerosas externas fueron tratados con curcumina tópica. Los participantes reportaron un notable alivio sintomático con evidencia en la reducción del olor, picazón, tamaño de la lesión y dolor. El efecto se prolongó durante varios meses en muchos pacientes, y solo una paciente presentó una reacción adversa (Gupta *et al.*, 2012). Desde entonces, la curcumina ha sido utilizada como un componente potencial para la prevención y tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo gastrointestinal, melanoma, genitourinario, mama, pulmón, hematológico, de cabeza y cuello, neurológico y sarcoma (Naksuriya *et al.*, 2014). Aunque se han realizado estudios en humanos con curcumina pura, la mayoría de los estudios fueron realizados con una mezcla de curcuminoides o de la raíz de cúrcuma de donde provienen los curcuminoides. Durante muchos siglos, la cúrcuma se ha utilizado en su forma cruda como especia y suplemento dietético.

En estudios relacionados con cáncer, se ha encontrado que la curcumina regula positivamente las proteínas de la familia de caspasas y negativamente los genes anti-apoptóticos (Bcl-2 y Bcl-X (L)). Esto se analizó en condiciones *in vitro* utilizando células cancerosas como células sanas (Adeeb *et al.*, 2004).

Ganta Srinivas *et al* (2010) administró vía oral a ratones con tumores SKOV3, nanoemulsiones que contenían una mezcla de curcumina y paclitaxel. La vida de los ratones portadores de tumores incrementó significativamente ($p < 0.05$) con la administración de la

nanoemulsión que contenía la mezcla de paclitaxel-curcumina después de 48 días, en comparación con los 37 días que sobrevivieron los ratones tratados con cada uno de los compuestos por separado.

Jithan *et al* (2011), realizó ensayos de proliferación en líneas celulares MDA-MB-231. Las nanopartículas de curcumina presentaron mayor potencial quimioterapéutico que la curcumina libre debido a una mayor biodisponibilidad, liberación selectiva y mejor actividad antiproliferativa en las células tumorales. Rejinold *et al* (2011), desarrollaron nanopartículas de curcumina con quitosano-poli-(N-vinilcaprolactano). Las nanopartículas de curcumina fueron aplicadas a células L929 y PC3 a 35 °C (por debajo de LCST) y 38 °C (por encima de LCST). Los autores reportaron un cambio morfológico en las células PC3 tratadas con las nanopartículas de curcumina. Los ensayos de apoptosis mostraron que la muerte celular fue dependiente de la concentración de la curcumina, observándose 95.8% de muerte celular, en dosis de 8.6 µg de curcumina presente en las nanopartículas. Los autores concluyeron que las nanopartículas de curcumina podrían ser benéficas para el tratamiento del cáncer mediante una combinación adecuada de terapia con hipertermia. Por sus propiedades mencionadas, está aprobada como sustancia GRAS ante la FDA, por lo que es empleada como suplemento alimenticio en diversos países (Gupta *et al.*, 2012). A pesar de sus numerosas aplicaciones, los aspectos más relevantes relativos a la farmacocinética de la curcumina son: la inestabilidad molecular, la baja solubilidad en agua, rápida conjugación de moléculas hidrófilas (p ej. ácido glucurónico y sulfato) en el hígado con la excreción biliar y la mala absorción enteral (Vecchione *et al.*, 2016).

2. *Quercetina*

La quercetina es un flavonoide que tiene en su estructura química un anillo de 5 carbonos con un oxígeno, este anillo se encuentra entre 2 anillos de benceno (Fig. 5). Este flavonoide se encuentra en varios alimentos, es por ello que está presente en la dieta humana.

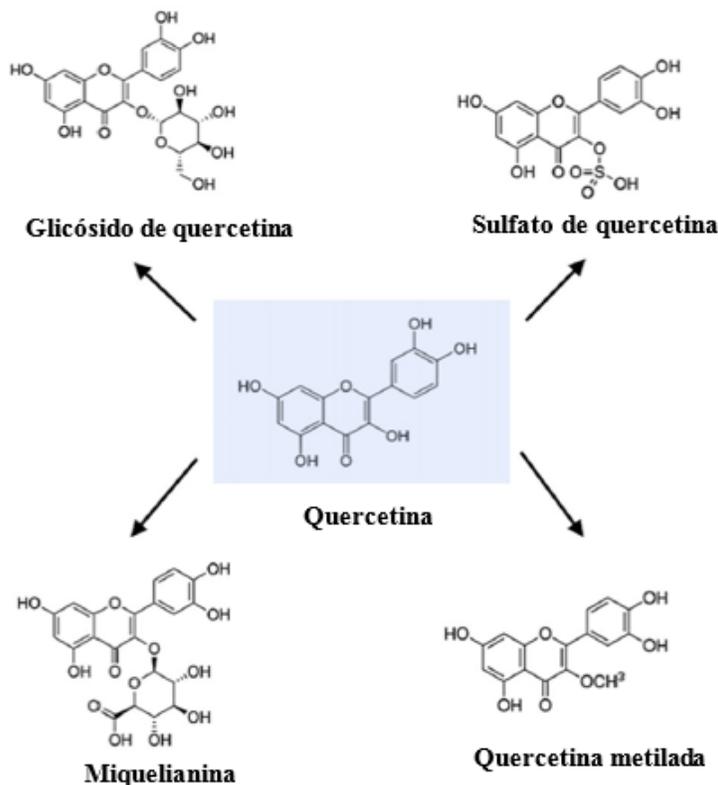


Fig. 5. Estructura química de la quercetina aglicona, quercetina glicósido y productos metabólicos comunes de la quercetina.

Naturalmente la quercetina se encuentra unida a un mono u oligosacárido vía un enlace glucosídico con el grupo hidroxilo 3' del anillo que contiene oxígeno. La presencia de los azúcares aumenta su solubilidad y facilita su absorción (Razavi *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos autores mencionan que la forma aglicona de la quercetina es menos eficiente para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Murakami *et al.*, 2008). Las fuentes más abundantes de quercetina son la alcaparra (*Capparis spinosa*) 2.33 mg/g, eneldo (*Anethum graveolens*) 0.55 mg/g, cilantro (*Coriandrum sativum*) 0.52 mg/g, hinojo (*Foeniculum vulgare*) 0.48 mg/g, cebolla (*Allium cepa L.*) 0.35 mg/g, chile amarillo (*Capsicum annuum L.*) 0.11 mg/g, y arandano (*Viburnum opulus L.*) 0.1 mg/g (Aherne y O'Brien, 2002; USDA, 2013).

Algunos autores mencionan que la quercetina no actúa directamente en los tumores cancerígenos, sino que su principal efecto es como quimioprotector, gracias a su potente actividad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria, la cual inhibe el crecimiento de las

células de cáncer de mama, colon, pulmón y ovario (Jae-Hoon *et al.*, 2009). Aunque su poder antioxidante es bien conocido, como muchos otros antioxidantes, la concentración de esta molécula dicta el nivel de actividad antioxidante. Así, a concentraciones menores de 1 μM , la quercetina muestra actividad antioxidante, pero a altas concentraciones 100 μM , actúa como un oxidante, y en ocasiones puede llegar a romper la doble cadena del ADN en células normales. Para células cancerosas se ha visto que actúa inhibiendo a la familia de las tirosina-kinasas, las cuales son responsables de activar la división de células cancerosas. Otro mecanismo propuesto es que, cuando se tiene altas concentraciones de esta molécula se conduce a la activación de p53 y por lo tanto a una vía apoptótica como se muestra en la Fig. 7 (Miles *et al.*, 2011).

Vicente-Vicente *et al.* (2013), realizaron una extensa revisión sobre el uso de la quercetina como un suplemento alimenticio. Ellos concluyeron que la quercetina es una sustancia con potenciales efectos terapéuticos en humanos y es necesario mejorar la biodisponibilidad oral de las formulaciones comerciales y evaluar la seguridad clínica y bioacumulación a dosis mayores y tiempos prolongados.

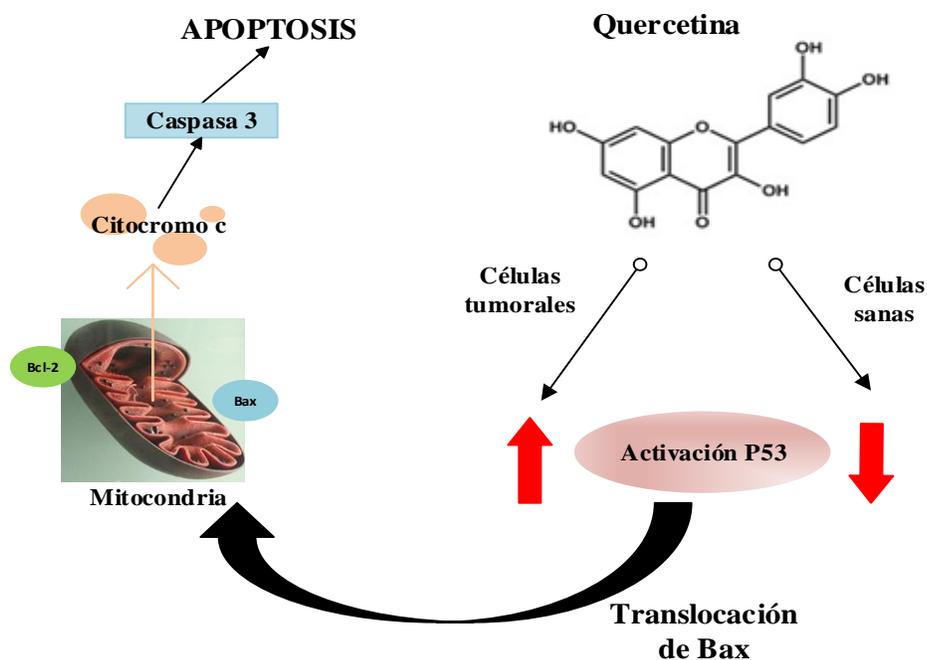


Fig. 6 Efecto de la quercetina sobre la actividad de p53. A altas concentraciones (100 μM), la quercetina puede actuar como un oxidante, dañando el ADN y llevando a la activación de p53.

Singh *et al.* (2015) observaron que al momento de acoplar el resveratrol y la quercetina inhibieron el cáncer de próstata en modelo murino. Demostrando así, que el uso de dos compuestos naturales puede tener un efecto sinérgico, en este caso la quercetina aumentó la biodisponibilidad del resveratrol. Por su parte, Caddeo *et al.* (2016) desarrollaron liposomas de quercetina y resveratrol para su aplicación de lesiones de cáncer de piel desarrollado en un modelo murino. La administración tópica de liposomas condujo a una notable mejoría en el daño del tejido. Se observó que la captación celular de los polifenoles fue mayor en liposomas, especialmente en mezclas de quercetina/resveratrol, en comparación con los agentes individuales, lo que resultó en una capacidad superior para recoger especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en los fibroblastos. Se observó una reducción significativa de la infiltración de leucocitos y edema. Suksiriworapong *et al.* (2016) formaron nanopartículas de poli-caprolactona con quercetina, que aplicaron en células de cáncer de mama SKBR3, se encontró un aumento de la toxicidad en las nanopartículas de 2.9 veces en comparación con la quercetina sin encapsular. Además de retardar la liberación de la quercetina en las nanopartículas que contenían una mayor concentración de poli-caprolactona población.

En este sentido la nanotecnología puede ayudar a resolver los problemas de dosificación y solubilidad de la quercetina. Kakran *et al.* (2011) desarrollaron nanopartículas de quercetina usando las técnicas de evaporación precipitación e inclusión molecular. La quercetina no encapsulada presentó una eficiencia de solubilidad del 10% en 120 min. Mientras que la quercetina nanoencapsulada en β -ciclodextrina incrementó a un 66% a una relación de [1:1], incrementándose hasta un 88% a una relación 1:4. Por su parte, las nanopartículas desarrolladas por el método de nanoprecipitación mostraron eficiencias de solubilidad hasta un 92% en PVP [1:4] y 94% en Pluronic F127 [1:4]. Kakran *et al.* (2012) prepararon nanocristales quercetina utilizando métodos homogeneización de alta presión, cavi-precipitación y molienda con perlas. Éste último produjo los nanocristales más pequeños de quercetina ($d(v)_{50\%} = 276.7$ nm), mientras que el proceso de cavi-precipitación exhibió tamaños de partícula $d(v)_{50\%} = 469$ nm en DMSO y $d(v)_{50\%} = 559$ nm en etanol. En general, las velocidades de disolución de las nanosuspensiones quercetina fueron más altas en comparación con la quercetina sin tratamiento.

3. Carotenoides

Los carotenoides pertenecen a la familia de los tetraterpenos, existen más de 600 estructuras reportadas de fuentes naturales como plantas, hongos, bacterias y algas. Los carotenos no son sintetizados por los animales y humanos, por lo que es necesario incorporarlos en su dieta. Comúnmente, se dividen en dos clases: i) los carotenoides, contienen átomos de carbono e hidrógeno, por ejemplo, licopeno y β -caroteno, y ii) las xantofilas, contienen átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, por ejemplo, luteína. (Fig. 7).

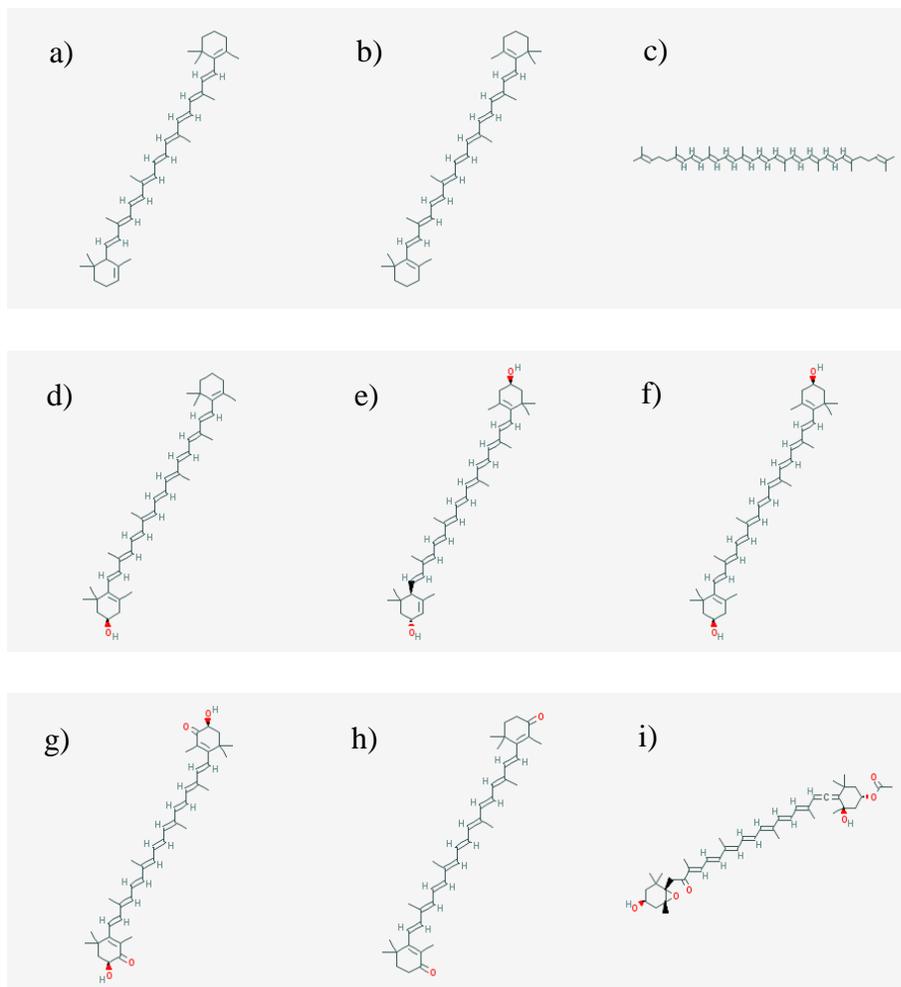


Fig. 7 Estructura química (PubChem) de a) α -caroteno; b) β -caroteno c) licopeno, d) β -criptoxantina e) luteína f) zeaxantina g) astaxantina h) cantaxantina y i) fucoxantina.

Los estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que algunos carotenoides tienen potentes efectos antitumorales. Por ejemplo, el licopeno es el carotenoide más

predominante en el plasma humano, tiene una vida media de 2 a 3 días. La alta concentración de licopeno en la sangre se asocia con un menor riesgo de cáncer de próstata, cáncer del tracto digestivo, cáncer de páncreas, neoplasia intraepitelial, cervical e infarto de miocardio. Estos efectos son atribuidos a su alta actividad antioxidante y su capacidad para bloquear el oxígeno libre. Sin embargo, la solubilidad y la absorción de estos grandes cristales en las células es limitada y no hay casi ninguna protección contra la degradación química (Tapiero *et al.*, 2004). Algunos efectos terapéuticos de los carotenos se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Fuentes, funciones y efectos de diferentes carotenoides (Tanaka *et al.*, 2012)

Carotenoide	Fuentes	Función	Efectos
α -caroteno	Vegetales amarillos, anaranjados y verdes oscuro	Actividad provitamina A; antioxidante	Estimula la comunicación celular y disminuye el riesgo de algunos tipos de cáncer.
β -caroteno	Frutas anaranjadas, vegetales verdes y amarillos.	Actividad provitamina A; actividad antioxidante	Disminuye el riesgo de algunos cánceres y enfermedades cardiovasculares.
Licopeno	Jitomate, sandía, albaricque y melocotones	Antioxidante	Disminuye el riesgo de algunos cánceres, diabetes y osteoporosis.
B-criptoxantina	Frutas anaranjadas, maíz, guisantes y yemas de huevo	Actividad provitamina A, antioxidante	Efectos antiinflamatorios, inhibición de algunos cánceres y efectos cardiovasculares.
Luteína Zeaxantina	Vegetales de hoja verde oscuro, pimientos rojos, jitomates, maíz, yemas de huevo	Agente anti-fotosensibilizante, fotosintético, antioxidante y filtro de la luz azul	Disminuye la degeneración macular, cataratas, riesgo de enfermedades cardiovasculares y ciertos cánceres.
Astaxantina	Algas verdes, salmón, crustáceos y trucha	Antioxidante; coloración	Prevé ciertos cánceres, cataratas, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares e inflamatorias.
Cantaxantina	Salmón y crustáceos	Antioxidante; coloración	Disminuye riesgo de algunos cánceres.
Fucoxantina	Algas marrones	Antioxidante	Anticancerígeno, anti-alérgico, antiinflamatorio y anti-osteoporosis

4. *Capsaicina*

La capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) es un derivado del ácido homovanílico y el componente pungente de los chiles (Fig. 8). Se consume como aditivo alimentario en todo el mundo, principalmente en países del sur de Asia y América Latina. Se ha utilizado para tratar la inflamación y el dolor asociados con diversas enfermedades incluyendo artritis reumatoide, neuropatía diabética, cefaleas, herpes zóster, etc. Recientes estudios han demostrado que la capsaicina tiene propiedades quimiopreventivas y terapéuticas contra ciertos mutágenos y carcinógenos, ya que, suprime el crecimiento de células cancerosas humanas mediante diferentes mecanismos, incluyendo la inactivación de NF-kB y la generación de especies reactivas de oxígeno (Zhang *et al.*, 2008).

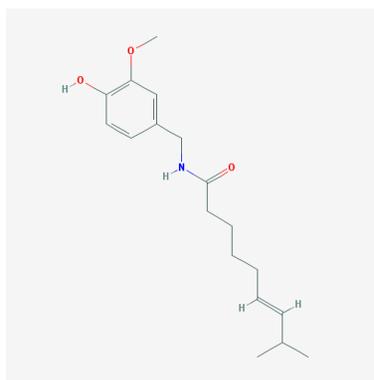


Fig. 8. Estructura química de la capsaicina (PubChem)

Aunque la capsaicina puede causar inflamación neurológica, se ha encontrado que tiene efecto antiinflamatorio y analgésico. Actualmente, se usa en cremas y geles como el Axsain y Zostrix para mitigar el dolor neurogénico (Young-Joon, 2002). Se ha estudiado como posible candidata para el tratamiento del cáncer de próstata, por su efecto antiproliferativo en este tipo de células, induciendo apoptosis en células con receptores de andrógenos positivos y negativos. A su vez se da un aumento en la expresión de p53, p21 y Bax (Mori *et al.*, 2006).

Zhang *et al.* (2008) demostraron que la capsaicina inhibe significativamente la proliferación de AsPC-1 y BxPC-3 líneas celulares de cáncer de páncreas, sin afectar la viabilidad de las células acinares derivadas del páncreas normal en humanos.

Conclusión

El cáncer es una enfermedad que afecta a gran parte de la población de México y el mundo. Actualmente, es tratada con agentes antineoplásicos/antitumorales que provocan severos efectos secundarios y son de alto costo. Sin embargo, existen diversos compuestos fenólicos de origen natural que tienen un alto potencial para su aplicación como terapia alternativa contra el cáncer. Además de que, el uso de la nanotecnología ha demostrado ser una buena alternativa para aumentar la biodisponibilidad y la aplicación de estos compuestos fenólicos. Durante la última década, se han realizado numerosos trabajos en el diseño y desarrollo de sistemas encapsulación de compuestos fenólicos. Sin embargo, aún faltan estudios que nos permitan comprender los impactos potenciales de los compuestos fenólicos encapsulados en el cuerpo humano, como se lleva a cabo su liberación y si el compuesto fenólico tiene el efecto deseado en el sitio de acción.

Agradecimiento

Los autores extienden su agradecimiento al fondo “Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales” PDCPN2013-01/0215412 y al “Fondo de Investigación Básica SEP-CONACYT” CB-2015-01-258118.

Referencias

- Adeeb Shehzad, Fazli Wahid, Young Sup. Lee, (2004). Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm (Weinheim)*, 343(9), 489-499.
- Aggarwal Bharat B, Ichikawa Haruyo, Garodia Prachi, Weerasinghe Priya, Sethi Gautam, Bhatt Indra D., Pandey Manoj K., Shishodia Shishir, Muraleedharan G. (2006). From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Oncologic, Endocrine & Metabolic*, 10(1), 87-118.
- Aggarwal Bharat B., Surh Young-Joon, Shishir Shishodia Shishir. (2007). The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease advances in experimental medicine and biology. (Vol. 595). New York: Springer Science+Business Media, LLC.

- Aherne S. Aisling, O'Brien Nora M. (2002). Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.
- BHGI. (2013). The Breast Health Global Initiative. Retrieved from www.bhgi.info
- Caddeo Carla, Nacher Amparo, Vassallo Antonio, Armentano Maria Francesca, Pons Ramon, Fernández-Busquets Xavier, Carbone Claudia, Valenti Donatella, Fadda Anna Maria, Manconi Maria. (2016). Effect of quercetin and resveratrol co-incorporated in liposomes against inflammatory/oxidative response associated with skin cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 513, 153–163.
- Espinosa Enrique, Zamora Pilar, Feliu Jaime, González. Manuel. (2003). Classification of anticancer drugs a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treatment Reviews*., 29(6), 515-523.
- Fay F, Scott C.J. (2011). Antibody targeted nanoparticles for cancer therapy. *Immunotherapy*, 3(3), 381-394.
- Ganta Srinivas, Devalapally Harikrishna, Amiji Mansoor. (2010). Curcumin Enhances Oral Bioavailability and Anti-Tumor Therapeutic Efficacy of Paclitaxel upon Administration in Nanoemulsion Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi:10.1002/jps.22157
- Jayaprakasha, G.K, Kotamballi N. Chidambara Murthy, Bhimanagouda S. Patil (2016). Enhanced colon cancer chemoprevention of curcumin by nanoencapsulation with whey protein. *European Journal of Pharmacology*, 789, 291-300.
- Gupta Subash Chandra, Patchva Sridev, Aggarwal.Bharat B. (2012). Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *The AAPS Journal*, 15(1), 195-218.
- Holst Birgit, Williamson Gary. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 73-82.
- IARC. (2012). International Agency for Research on Cancer Retrieved from www.iarc.fr
- INEGI. (2016). "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)". http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
- Iyer Arun K., Singh Amit, Ganta Srinivas, Amiji Mansoor M.(2013). Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 1784-1802.

- Jae-Hoon Jeong, Jee Young An, Yong Tae Kwon, Juong G. Rhee, Yong J. LeeJae-Hoon. (2009). Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Cellular Biochemistry*, 106(1), 73-82.
- Jithan A, Madhavi K, Madhavi M, Prabhakar K. (2011). Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1(2), 119-125.
- Kakran Mitali, Sahoo Nanda Gopal, Li Lin. (2011). Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation and solid dispersion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 121– 130.
- Kakran Mitali, Shegokar Ranjita, Sahoo Nanda Gopal, Gohla Sven, Li Lin, Müller Rainer H. (2012). Long-term stability of quercetin nanocrystals prepared by different methods. *Pharmacy and Pharmacology*, 64(10), 1394-1402.
- Kaur Khushwinder, Kumar Raj, Mehta S.K. (2015). Nanoemulsion: A new medium to study the interactions and stability of curcumin with bovine serum albumin. *Journal of Molecular Liquids*, 209, 62–70.
- McClements David Julian. (2011). Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7 (6), 2297-2316
- McClements David Julian. (2012). Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 174, 1-30.
- McClements David Julian. (2013). Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 52, 409–423.
- Miles Sarah L, McFarland Margaret, Niles Richard M. (2011). Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease Restricted access. *Nutrition Reviews*, 72(11), 720-734.
- Mori Akio, Lehmann Sören, O'Kelly James, Kumagai Takashi, Desmond Julian C., Pervan Milena, McBride William H., Kizaki Masahiro, Koeffler H. Phillip. (2006). Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(6).
- Murakami Akira, Ashida Hitoshi, Terao Junji. (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Letters*, 269, 315-325.

Naksuriya Ornchuma, Okonogi Siriporn, Schiffelers Raymond M., Hennink Wim E (2014).

Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*, 35, 3365-3383.

Praveen Kumar Gannu, Dyvia Ajmeera. (2015). Nanoemulsion Based Targeting in Cancer Therapeutics. *Medicinal Chemistry*, 5, 272-284.

Qingrong Huang, Hailong Yu, Qiaomei Ru. (2010). Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75.

Razavi Seyed Mehdi, Zahri Saber, Zarrini Gholamreza, Nazemiyeh Hossein, Mohammadi. (2009). Biological activity of quercetin-3-Oglucoside, a known plant flavonoid. *Bioorg Khim*, 35, 376-378.

Rejinold Sanoj, Muthunarayanan M., Divyarani V.V., Sreerexha P.R., Chennazhi K.P., Nair S.V., Tamura H., Jayakumar R. (2011). Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 360, 39-51.

Salud,. (2016). 160 mil nuevos casos de cáncer al año en México. Retrieved from <http://www.gob.mx/salud/prensa/160-mil-nuevos-casos-de-cancer-al-ano-en-mexico>

Singh Chandra K., Ndiaye Mary A., Ahmad Nihal. (2015). Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852, 1178-1185.

Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Garcia-Celma M.J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10, 102 – 110.

Stuurman Frederik E., Nuijen Bastiaan, Beijnen Jos H., Schellens Jan H. M (2013). Oral anticancer drugs: mechanisms of low bioavailability and strategies for improvement, *Clinical Pharmacokinetics*, 52(6), 399-414.

Suksiriworapong Jiraphong, Phoca Kittisak, Ngamsom Supakanda, Sripha Kittisak, Moongkarndi Primchanien, Junyaprasert Varaporn Buraphacheep. (2016). Comparison of poly(e-caprolactone) chain lengths of poly(e-caprolactone)-co-d-a-tocopheryl-poly(ethylene glycol) 1000 succinate nanoparticles for enhancement of quercetin delivery to SKBR3 breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 101, 15-24.

Tanaka Takuji, Shnimizu Masahito, Moriwaki Hisataka. (2012). Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules*, 17, 3202-3242.

Tapiero H., Townsend D. M., Tew K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 100-110.

USDA (2013). Database for the Flavonoid Content of Selected Foods.

Vecchione Raffaele, Quagliariello Vincenzo, Calabria Dominic, Calcagno Vincenzo, De Luca Elisa, Iaffaioli Rosario V, Netti Paolo A. (2016). Curcumin bioavailability from oil in water nano-emulsions: *In vitro* and *in vivo* study on the dimensional, compositional and interactional dependence. *Journal of Controlled Release*, 233, 88–100.

Vicente-Vicente L., Prieto, M.; Morales, A. I. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Toxicología*, 30, 171-181.

Young-Joon Surh. (2002). More Than Spice: Capsaicin in Hot Chili Peppers Makes Tumor Cells Commit Suicide. *Journal of the National Cancer Institute*, 94 (17).

Zhang Ruifen, Humphreys Ian, Sahu Ravi P., Shi Yan, Srivastava Sanjay K. (2008). *In vitro* and *in vivo* induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, 13, 1465-1478. doi:10.1007/s10495-008-0278-6..

11. BIODISPONIBILIDAD EN UN MODELO MURINO: ANTIOXIDANTES DE GRANADA Y COENZIMA Q10 NANOENCAPSULADOS.

Flores-Hernández Flor Y.

Bravo Madrigal Jorge

Marino-Marmolejo Erika N.*

Biología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, A. C.

emarino@ciatej.mx

Introducción

El aumento de las enfermedades crónico-degenerativas se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Lo que ha provocado un aumento en el interés por investigar posibles factores preventivos. Un rubro importante en la investigación radica en los compuestos bioactivos derivados de frutas, verduras y plantas. Los antioxidantes, son un grupo de compuestos bioactivos con capacidad de prevenir los procesos degenerativos asociados con un exceso de radicales libres en el organismo, como sucede en la enfermedad cardiovascular, ciertos tipos de cáncer, patologías asociadas a un deterioro del sistema cognitivo, como el Alzheimer, entre otros (De la fuente *et al.*, 2002; Stanner *et al.*, 2004).

Los radicales libres son moléculas que pierden electrones a causa de procesos bioquímicos normales en los organismos o debido a causas medioambientales a la cuales estamos expuestos generalmente, como la contaminación, el humo del cigarro, radiaciones, entre otras. Estos radicales libres son moléculas inestables que tienden a quitar electrones a

moléculas cercanas oxidándolas y haciendo que pierdan función, convirtiéndolas en un nuevo radical libre, proceso que se repite consecutivamente, provocando daño, el cual puede incluso afectar el material genético y provocar la aparición de ciertas enfermedades y el envejecimiento (Huang *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de los antioxidantes se basa en cederle un electrón a los radicales libres, el cual posteriormente se estabiliza, lo cual evita la reacción en cadena que generalmente se produce. El antioxidante al donar su electrón se oxida y se convierte en una sustancia inocua (Delgado-Olivares *et al.*, 2010). Los antioxidantes provenientes de los alimentos vegetales incluyen distintos grupos de compuestos de naturaleza química diversa, estos compuestos pueden actuar como antioxidantes primarios, reaccionando directamente con los radicales libres, o como antioxidantes secundarios potenciando otros sistemas antioxidantes, como algunas enzimas. En la actualidad existe una gran diversidad de antioxidantes, pero sin duda la coenzima Q10 (CoQ10) y los antioxidantes provenientes de los extractos de la cáscara de la granada son algunos de los antioxidantes más importantes disponibles en el mercado de este tipo de productos. La CoQ10 (Fig. 1) es una ubiquinona con alto poder antioxidante producida por todas las células del cuerpo (endógena).

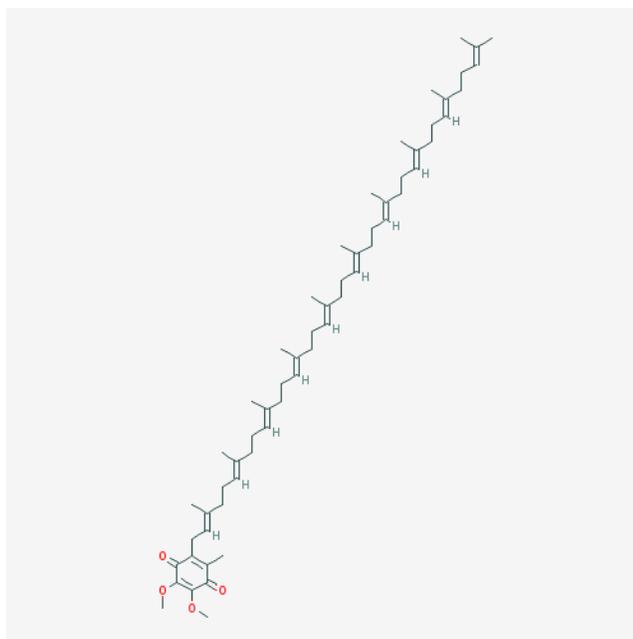


Fig. 1. Estructura química de la coenzima Q10. (PubChem)

Su importancia radica en que esta molécula participa en una amplia variedad de funciones (Cuadro 1); pero con el paso del tiempo su producción disminuye (Quinzii *et al.*, 2010), razón por la que este antioxidante recientemente se ha incorporado en diversos productos farmacéuticos, cosméticos y suplementos (Littarru *et al.* 2007); su uso en los suplementos ayuda a disminuir los efectos de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades de arteria coronaria (Bor-Jen Lee *et al.*, 2012).

Cuadro. 1. Propiedades terapéuticas de la coenzima Q10 y antioxidantes de granada

Coenzima Q10	Granada
Electrón acarreador en la cadena respiratoria mitocondrial	Antioxidante
Electrón transportador Extra-mitocondrial	Anticarcinogénico
Antioxidante	Antinflamación
Regulación de la permeabilidad y transición mitocondrial de los poros	Arteroesclerosis
Regulación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas	Hiperlipidemia
Modulación de la cantidad de b-integrinas sobre la superficie de los monocitos en la sangre	Hipertensión
Modulador de las funciones endoteliales	Estenosis de la arteria carótida
Oxidación de sulfito en levaduras	Disfunción eréctil
Introducción de enlaces disulfido en bacterias	Enfermedad de Alzheimer
	Estomatitis dental

Sin embargo y a pesar ser potentes antioxidantes la CoQ10 y los antioxidantes de granada, al igual que la mayoría de los antioxidantes obtenidos de manera natural o de manera sintética presentan una serie de problemas a la hora de que son ingeridos (Aljadi *et al.*, 2004), como:

1. Inestabilidad (oxidación): La inestabilidad en los antioxidantes puede presentarse ante diversos factores químicos y fisicoquímicos, resaltando entre estos, el aire, la humedad, la luz, el calor, los iones metálicos, el oxígeno y el pH.

2. Acción quelante: Este problema es propio de los antioxidantes hidrófilos y generalmente de los polifenoles, los cuales a su llegada al intestino tienden a unirse al hierro y forman compuestos quelatos que, al no absorberse en el intestino, son eliminados a través de las heces. Esta unión no solo hace que se eliminen todos los polifenoles consumidos, sino que también se pierda el hierro presente en este órgano, posicionando de manera indirecta a los polifenoles como compuestos con propiedades antinutrimientales.

3. Absorción: La baja absorción de los antioxidantes es y probablemente seguirá siendo, la propiedad más importante por mejorar. Este problema depende principalmente de la naturaleza del antioxidante de la molécula activa, la cual puede ser de tipo hidrófila o lipófila.

En el caso de los antioxidantes hidrófilos, este problema se debe principalmente a que, al entrar al cuerpo de forma libre a través de vía oral, los antioxidantes presentan incompatibilidad con las membranas celulares del intestino (lipídicas). Esto no permite que se adhieran y/o penetren las células intestinales, por lo cual continúan su paso por el tracto intestinal hasta su eliminación. Los antioxidantes de naturaleza hidrófila de mayor importancia económica que presentan este problema son la vitamina C y algunos compuestos polifenólicos, entre ellos los antioxidantes extraídos de la cáscara de granada. Por otra parte, los antioxidantes hidrófobos, los cuales constituyen la mayor parte de los antioxidantes conocidos, gracias a su condición lipídica tienen un menor problema de adhesión y de compatibilidad con las membranas celulares. Sin embargo, estos presentan un segundo inconveniente debido a que la mayoría de este grupo tiene un peso molecular alto. Se sabe que los antioxidantes de cadena corta y mediana se absorben fácilmente, debido a que pueden ser degradados por lipasas, mientras que los lípidos cristalinos y de cadenas largas (arriba de C18) en estado sólido son difíciles de degradar y en consecuencia son pobremente absorbidos (Pabbisetty *et al.*, 2007). Entre los antioxidantes hidrófobos de mayor importancia se encuentra la CoQ10, los carotenoides y el alfa-tocoferol.

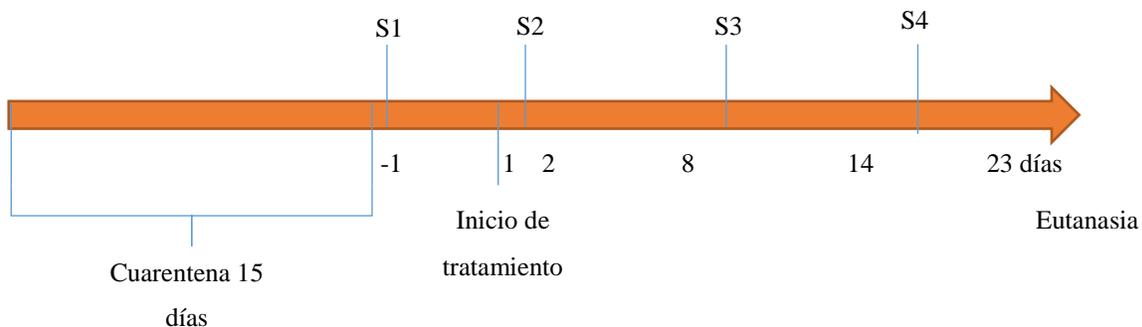
Los antioxidantes de la cáscara de granada son compuestos de alto peso molecular y de carácter hidrófilo. A la fecha existen muy pocos productos y estudios sobre su absorción y disponibilidad, ya que la mayoría se ha enfocado en sus propiedades terapéuticas. Se ha observado que esta es relativamente baja en comparación con la concentración consumida.

Comúnmente, éste tipo de antioxidantes son comercializados como jugos y tabletas, pero se pretende, que en un futuro se lance al mercado su presentación en forma de nanopartículas, las cuales ya se están estudiando y han mostrado resultados favorecedores (Jiao *et al.*, 2014).

Con respecto a la CoQ10, a pesar de su naturaleza hidrófoba, presenta problemas de absorción debido a su alto peso molecular. Tal motivo ha llevado a que se recurra a diversas estrategias que mejoren su absorción, entre las cuales se distinguen en orden de lanzamiento: las tabletas, cápsulas de dos piezas, cápsulas de gelatina blanda con suspensión de aceite, micropartículas y finalmente nanopartículas. En estas últimas, se ha demostrado tener una mayor biodisponibilidad del principio activo. En el caso de las tabletas y cápsulas, generalmente se acompañan de compuestos adyuvantes o formulaciones lipídicas, que se sirven de vehículo en el transporte de sustancias. No obstante, dichas presentaciones tienen un porcentaje de disolución muy bajo, siendo sólo útiles para proteger a la CoQ10 de las condiciones del tracto digestivo, pero no para mejorar su biodisponibilidad. Las microcápsulas, son constituidas de macromoléculas de origen natural, lípidos o polímeros sintéticos, que mejoran la adhesión, absorción y protección en el tracto digestivo. Sin embargo, su tamaño sigue siendo muy grande para incrementar la absorción, a diferencia de los productos nanotecnológicos, los cuales muestran significativamente una mejor biodisponibilidad.

Biodisponibilidad en modelo murino *in vivo*.

Con la finalidad de evaluar en un sistema *in-vivo* la disponibilidad del CoQ10 y extracto de cáscara de granada en el plasma de ratas cepa Wistar tratadas con antioxidantes nanoencapsulados y no nanoencapsulados, se planteó el siguiente tratamiento para comparar la biodisponibilidad (Esquema 1). Grupos: 1) Control sin tratamiento (Agua y alimento). 2) Tratadas con 100 mg de antioxidantes nanoencapsulados. 3) Tratadas con 100 mg de antioxidantes no nanoencapsulados. 4) Tratadas con 100 mg de nanopartículas (vehículo). Dosis diarias de 100 mg durante 14 días.



Esquema 1. Toma de muestra sanguínea: Muestra basal, S1 (previo al tratamiento); 24 h después de inicio de tratamiento, S2; al catorceavo día del tratamiento, S3; al octavo día después de finalizado el tratamiento, S4. Nota: el protocolo realizado para este ensayo se sometió a revisión y se autorizó por el CICUAL bajo la convocatoria C (28 de septiembre 2015) amparando el desarrollo del protocolo bajo la NOM-062-ZOO-1999.

Para este fin se desarrollaron y validaron dos métodos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de antioxidantes en muestras de plasma para CoQ10 y ácido elágico, componente principal de los antioxidantes del extracto de cáscara de granada (Fig. 2).

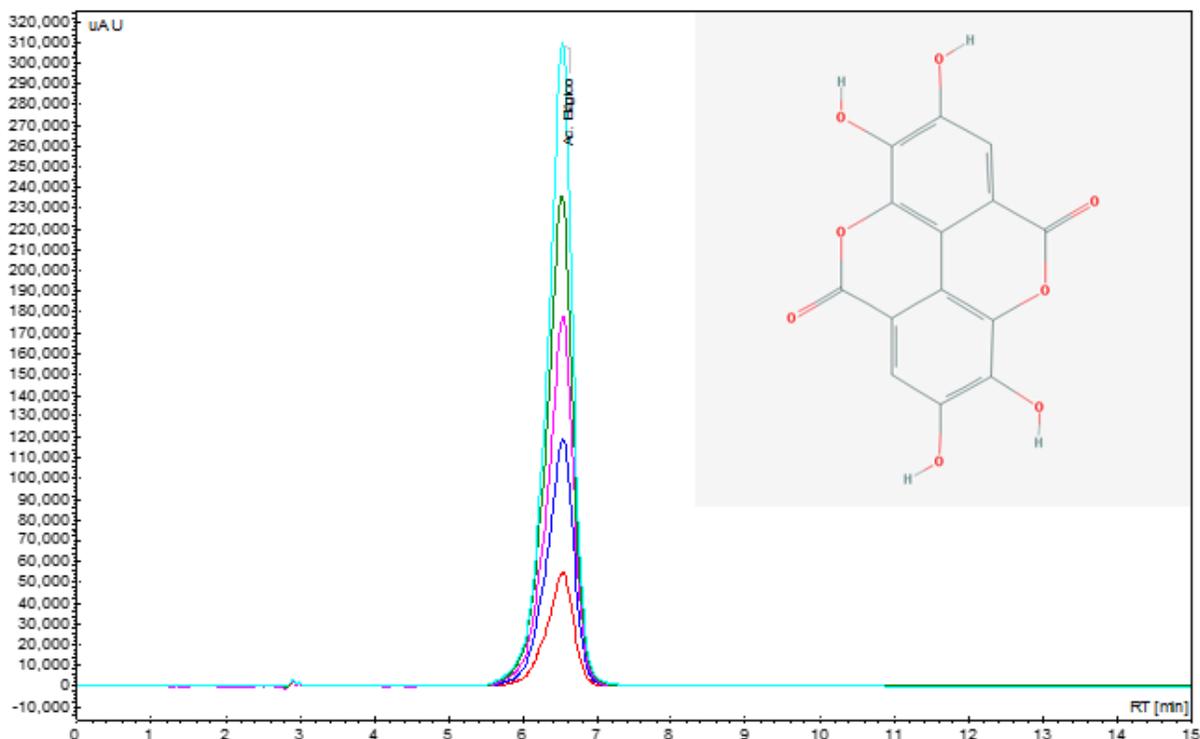


Fig. 2 A) Cromatograma del ácido elágico y B) ácido elágico (Pubchem).

Los resultados obtenidos mostraron que la CoQ10 nanoencapsulada presentó una mayor concentración en el plasma de las ratas durante el tratamiento, a pesar del aumento, esta concentración no fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en comparación al tratamiento con la CoQ10 no nanoencapsulada. Con respecto al ácido elágico, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el plasma de las ratas tratadas con extracto de granada nanoencapsulado, con respecto al extracto de granada no nanoencapsulado. Se observó que los antioxidantes de granada nanoencapsulados presentaron una concentración mayor durante el tratamiento y que se mantuvo por más tiempo después de concluir éste. Lo que podría darnos indicios de que el extracto nanoencapsulado aumentó el tiempo de la disponibilidad en sangre de los antioxidantes del extracto de granada.

Conclusiones

Estos resultados nos permitieron concluir que los antioxidantes nanoencapsulados ofrecen una mejora en la biodisponibilidad de los compuestos en un organismo vivo. Es necesario comprobar el mantenimiento de la propiedad antioxidante dentro del organismo para complementar la información la generación de este tipo de productos de alto valor agregado por su beneficio a la salud.

Bibliografía.

- De la Fuente M. "Effects of antioxidants on immune system aging" *European Journal of Clinical Nutrition*, (2002) 56 Supplement 3: S5-8
- Stanner S, Hughes J, Buttriss J. "A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis" *Public Health Nutrition*, (2004) 7(3): 407-22
- Huang D, Ou B, Prior RL. "The chemistry behind antioxidant capacity assays" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2005) 53: 1841-56
- Delgado-Olivares L., Betanzos G., Soumaya T. "Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo". *Investigación y Ciencia*, (2010) 50: 10-15
- Quinzii C., Hirano M. "Coenzyme Q and mitochondrial disease". *Dev Disabil Res Rev.* (2010) 16(2): 183-188

- Litarru G., Tiano L. "Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments". *Molecular Biotechnology*. (2007). 37: 31-37
- Lee BJ., Huang YCh., Chen SJ., Lin PT. "Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease". *Nutrition*. (2012). 28(3): 250-255
- Aljadi A., Kamaruddin M. "Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malasyan floral honeys". *Food Chemistry*. (2004). 85: 513-518
- Pabbisetty L., Carvalho P., Avery M., Avery B. "Analysis of CoQ10 in rats serum by ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry after oral administration." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2008). 46: 137-142
- Jiao M., Panichayupakaranant P., Kaewnopparat N., Nitiruangjaras Aa., Reanmongkol W. "Wound healing activities of standardized pomegranate rind extract and its major antioxidant ellagic acid in rat dermal wounds". *J Nat Med*. (2014). 68: 377-386

12. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE UN EXTRACTO DE SEMILLAS DE AGUACATE (*Persea americana* mill.) EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER.

Moisés Martínez Velázquez

Elizabeth Cortés Pérez

Eduardo Padilla Camberos

Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ, A. C.

Socorro Villanueva Rodríguez

Tecnología Alimentaria, CIATEJ, A. C.

María del Refugio Ramos-Jerz

Peter Winterhalter

Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Alemania

mmartinez@ciatej.mx

Introducción

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2012 (Torre *et al.*, 2015). En el caso de México, los tipos de cáncer más comunes en las mujeres son el de mama y el cervicouterino, con 16,000 y 12,000 diagnósticos nuevos al año, respectivamente. La población masculina padece en mayor medida cáncer de próstata, testicular y de colon. Además, el pulmonar flagela por igual a ambos sexos. Hoy en día existen varias opciones para combatir o contrarrestar los efectos de esta enfermedad como son la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, y las innovadoras terapias biológicas.

Las plantas han formado la base de los sistemas tradicionales de la medicina y se ha recurrido a terapias conocidas como alternativas con productos principalmente de uso tradicional. Trabajos realizados con antitumorales de origen natural han demostrado que actúan sobre células con alta tasa de división mediante la inhibición del crecimiento y la proliferación. El aguacate es una fruta con forma de pera. Su nombre científico es *Persea americana* Mill. y pertenece a la familia de las lauráceas (Ochse *et al.*, 1986).

Algunos de los principales componentes químicos de las diversas partes de la planta de aguacate son los alcoholes (a veces también denominados acetogeninas alifáticas), glucósidos terpenoides, diversos derivados que contienen anillo de furano, flavonoides y una cumarina. Los alcoholes altamente funcionalizados de aguacate han mostrado muy diversas propiedades biológicas (Yasir *et al.*, 2010).

En México, el aguacate se incluye en la dieta regular y se utiliza como acompañamiento, como parte de ensaladas, como guarnición, entre muchos otros usos. Se cultivan distintas variedades con características distintas como el color y grosor de la cáscara y de distintos tamaños del fruto. Sus hojas frescas o secas se emplean como condimento de varios platillos.

Posee un alto contenido en aceites vegetales, por lo que se le considera un excelente alimento en cuanto a nutrición en proporciones moderadas, ya que posee un gran contenido calórico y graso. Los extractos de frutos de aguacate poseen un efecto supresor de la poderosa toxina para el hígado D-galactosamina (Kawagishi *et al.*, 2001), insecticida (Rodríguez-Saona *et al.*, 1998; Rodríguez-Saona *et al.*, 1999), antibacteriano (Sugiyama *et al.*, 1982), así como actividades anti-fúngicas (Bull y Carman, 1994; Domergue *et al.*, 2000). Además, el consumo de aguacate puede reducir los niveles de colesterol. Este efecto reductor, así como los efectos curativos en la piel pueden deberse al alto contenido de ácidos grasos insaturados (Carranza *et al.*, 1995).

Los extractos de frutos de aguacate tienen actividad anti-inflamatoria a través de la inhibición de la actividad de la proteasa neutra, de citocinas pro-inflamatorias y de prostaglandina E₂ (Henrotin *et al.*, 1998). Los extractos de las hojas de aguacate también han mostrado efectos analgésicos (Adeyemi *et al.*, 2002), así como fuertes efectos inhibidores contra el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) y adenovirus tipo 3 (AD3) (de Almeida *et al.*, 1998). Los extractos de las hojas de *P.*

americana mostraron, además, actividades antidiuréticas y anti-inflamatorias (Adeyemi *et al.*, 2002).

Cabe mencionar que, las semillas de aguacate son desechadas y desaprovechadas provocando una fuente de contaminación. Éstas se pueden procesar y así, convertirse en una fuente de moléculas con diversas aplicaciones. En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad citotóxica de un extracto de semillas de aguacate en un panel de líneas celulares de cáncer.

Materiales y métodos

1. Extracto de semillas de aguacate

Se realizó una extracción de semillas de aguacate utilizando éter de petróleo. Para los detalles del procedimiento consultar la referencia Ramos-Jerz (2007).

2. Líneas celulares

En este estudio se utilizaron las líneas celulares humanas HeLa (cáncer cervicouterino), A-549 (adenocarcinoma de pulmón) y PC-3 (cáncer de próstata).

3. Propagación de las líneas celulares

Todos los procedimientos para trabajar directamente con las líneas celulares se realizaron dentro de una cabina de flujo laminar, clase II tipo A2. El medio de cultivo que se utilizó fue DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GIBCO® que fue suplementado con: 10% de suero fetal bovino (SFB; GIBCO®) y 1% de SNP 100x (5mg/ mL penicilina-5mg/ mL estreptomocina-10mg/ mL neomicina; Invitrogen®). Las líneas celulares se mantuvieron en crioviales, almacenadas en ultracongelador a temperatura de -70°C para preservar sus características.

Una vez descongelado el criovial, el contenido fue vertido en frascos para cultivo celular de 75 cm², a los que previamente se les agregó 10 mL del medio suplementado. Terminada esta operación los frascos se llevaron a incubar a 37°C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, por al menos 24 horas hasta observar la confluencia necesaria con ayuda de un microscopio invertido (Leica DMI). Durante el transcurso de los días de incubación se realizaron varios lavados a los cultivos celulares para desechar restos celulares y células muertas que no se adhirieron a la superficie de los frascos. Para los lavados se utilizó un buffer salino de fosfatos (PBS).

4. *Tripsinización celular*

Para realizar los lavados con el PBS fue necesario retirar el medio de los frascos correspondientes para depositar de 5 a 10 mL del buffer y se aplicaron suaves movimientos en los frascos para desprender y/o traerse consigo los elementos no deseados en el cultivo, y posteriormente desecharlos para verter medio nuevo.

Una vez que se obtuvo la confluencia celular suficiente para los ensayos, se procedió a realizar la técnica de tripsinizado, para lo cual se utilizó la enzima tripsina (0.25% trypsin1x GIBCO®). El procedimiento se realizó de la siguiente manera: Al haber observado al microscopio la confluencia requerida, se procedió a realizar el lavado correspondiente con PBS. Una vez desechado el buffer se agregaron al frasco de 2 a 4 mL de la enzima tripsina dando suaves movimientos y golpeteos al frasco con las palmas de las manos. Una vez que se observó la monocapa desprendiéndose del frasco, se agregaron aproximadamente 7 mL de medio de cultivo DMEM para inactivar la enzima, mismos que se depositaron en un tubo de 15 mL y fueron centrifugados a 1500 rpm por 5 min; concluido el tiempo de centrifugación se desechó el sobrenadante y se re-suspendió el botón celular en 1 mL de medio DMEM para luego hacer las diluciones necesarias y realizar el conteo correspondiente en cámara de Neubauer (hemocitómetro), para hacer las siembras correspondientes en microplaca.

5. *Ensayo de citotoxicidad*

La técnica utilizada para evaluar la citotoxicidad fue el ensayo colorimétrico con MTT (Bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol). Para este ensayo se requirió sembrar 10,000 células por pozo, en un volumen de 100 µL de medio DMEM, en microplacas de 96 pozos. Las células se incubaron por 24 horas a 37°C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Pasando las 24 horas se realizaron los ensayos de citotoxicidad con las diferentes concentraciones del extracto, retirando el medio de cada pozo, y agregando la concentración de trabajo. Estos ensayos se realizaron hasta encontrar la Concentración Letal 50 (CL50), para lo cual se partió de un stock de 100 mg de cada muestra por 1 mL de vehículo y realizando diluciones seriales. Para preparar esta solución stock se utilizó por única vez el reactivo dimetilsulfóxido (DMSO), y para las subsecuentes diluciones requeridas se utilizó el medio de cultivo DMEM (López *et al.*, 2002). La duración de los tratamientos fue de 24 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

6. *Ensayo colorimétrico MTT*

Una vez transcurridas 20 horas de tratamiento se aplicaron 20 μL de MTT (5mg/ mL) a cada pozo y se dejó incubando por 4 horas; pasadas las 4 horas de incubación, se desechó el medio de cultivo de las células tratadas. Finalmente, se agregaron 100 μL de DMSO en cada pozo para disolver la sal de formazán e inmediatamente se hizo la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm en el lector de placas XMark Microplate Spectrophotometer. Se determinó la Concentración Letal 50 (CL50) por medio de una curva dosis-respuesta, tomando como 100% de viabilidad la absorbancia de las células control (sin tratamiento con el extracto) (López *et al.*, 2002).

Resultados

En el presente trabajo se analizó el efecto citotóxico de un extracto de éter de petróleo de semillas de aguacate (*Persea americana Mill.*) en las líneas celulares HeLa, A-549 y PC-3, por medio del ensayo colorimétrico MTT. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de viabilidad, tomando como 100% la absorbancia de las células control, que fueron expuestas al vehículo DMSO a una concentración no mayor a 0.5%, concentración que no afectó su viabilidad durante las 24 horas de incubación.

En la Fig. 1 se muestra una fotografía representativa de la apariencia de las células, después de ser incubadas con el MTT.

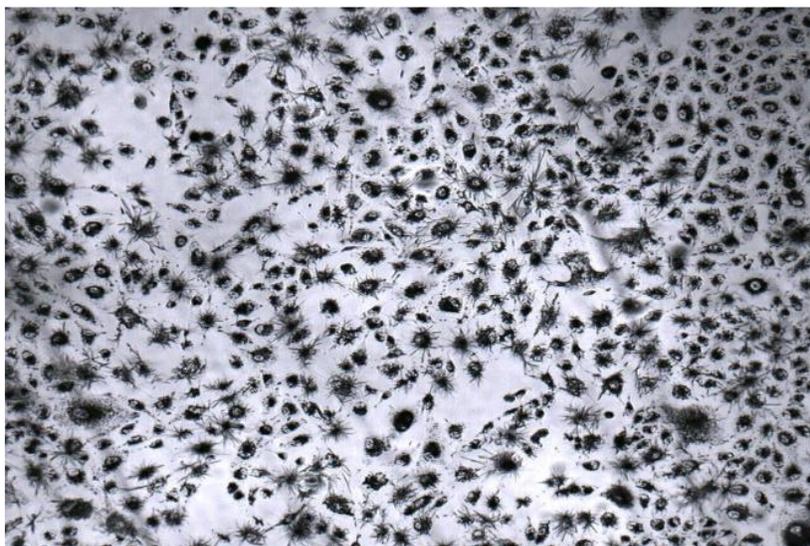


Fig. 1 Células HeLa incubadas con MTT.

Como control positivo se utilizó el antineoplásico cisplatino, el cual indujo cambios morfológicos evidentes en las células tratadas (Fig. 2). Se observa la morfología normal característica de células epiteliales HeLa, antes de recibir el tratamiento (Fig. 2A) y 24 horas después del tratamiento con cisplatino (Fig. 2B). Es evidente la muerte celular, las células pierden su forma alargada, reducen su tamaño y adquieren una forma redondeada, morfología típica de células apoptóticas; también aparecen los llamados cuerpos apoptóticos, además de una especie de “explosión” en algunas de las células. Se observaron los mismos efectos en las células de las líneas A-549 y PC-3 (resultados no mostrados).

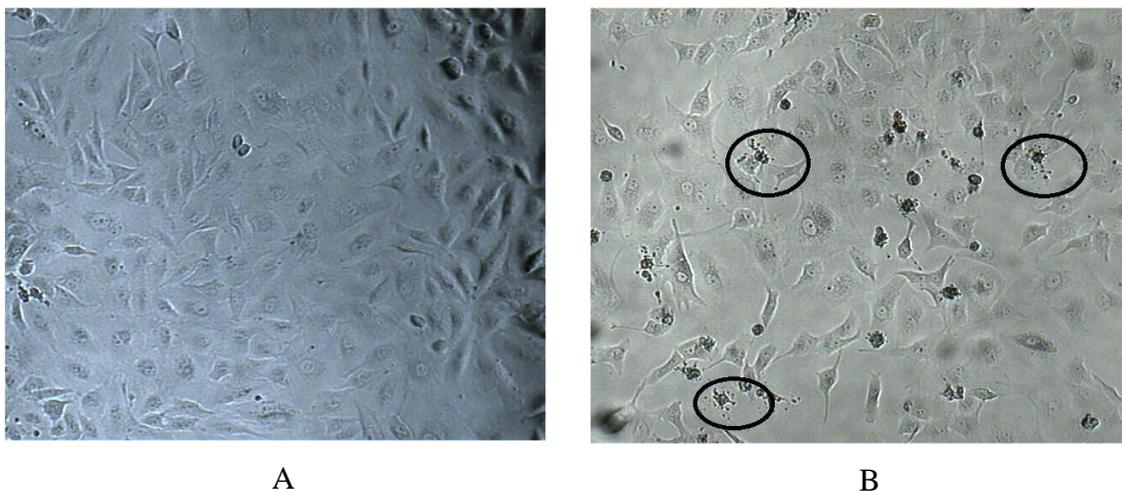


Fig. 2. Células HeLa no tratadas (A) y tratadas (B) con cisplatino.

La Fig. 3 muestra la viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de cisplatino.

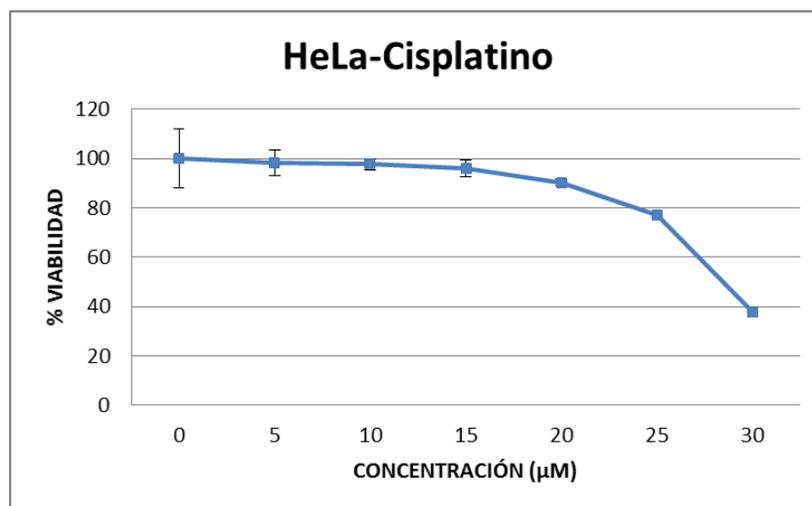


Fig. 3. Efecto citotóxico del cisplatino en la línea celular HeLa.

En la Fig. 4 se presenta la morfología de células HeLa no tratadas (4A) y tratadas con el extracto de éter de petróleo de semillas de aguacate. Se observa una disminución del volumen celular y aparición de cuerpos apoptóticos en las células tratadas.

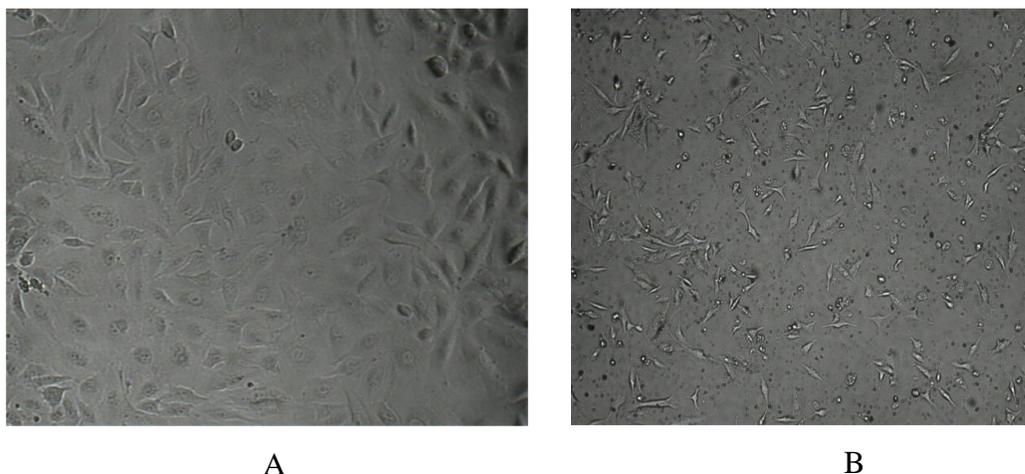


Fig. 4 Células HeLa no tratadas (A) y tratadas (B) con el extracto de semillas de aguacate.

El extracto fue capaz de inhibir la proliferación e inducir muerte celular, después de 24 horas de incubación, dependiendo de la concentración de dicho extracto. La citotoxicidad fue observada en las tres líneas de cáncer tratadas, HeLa (Fig. 5), A-549 (Fig. 6) y PC-3 (Fig. 7), aunque la primera fue más susceptible a los efectos del extracto, mientras que la segunda mostró mayor resistencia a sus efectos.

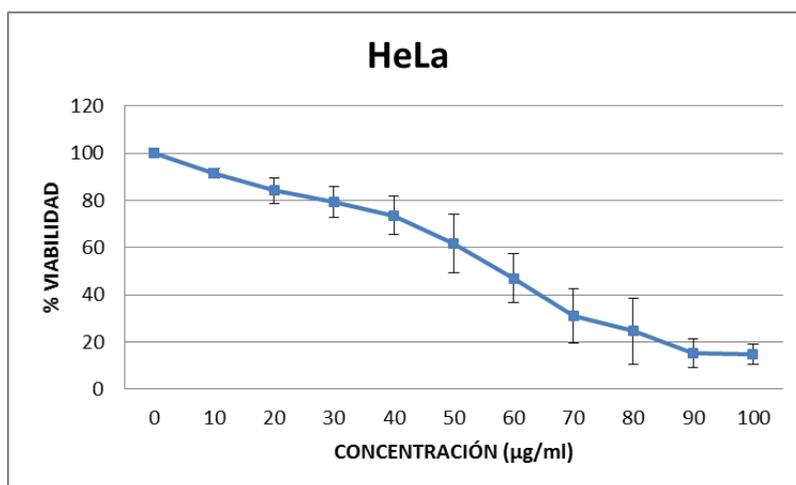


Fig. 5 Efecto citotóxico del extracto de semillas de aguacate en la línea celular HeLa.

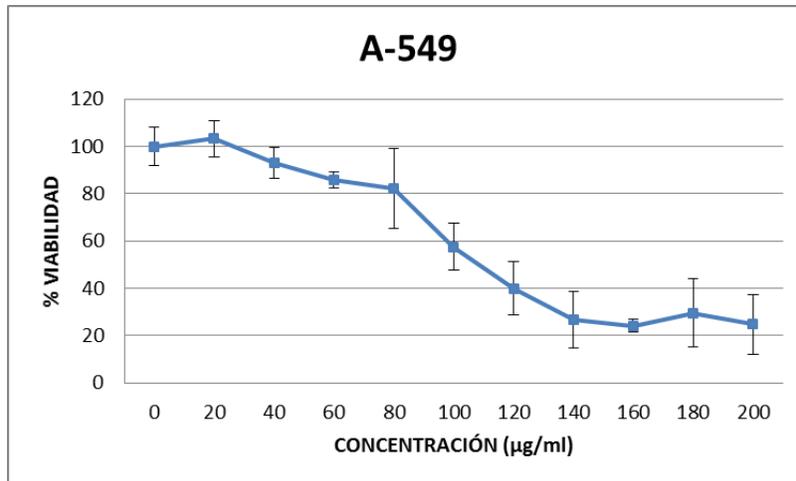


Fig. 6 Efecto citotóxico del extracto de semillas de aguacate en la línea celular A-549.

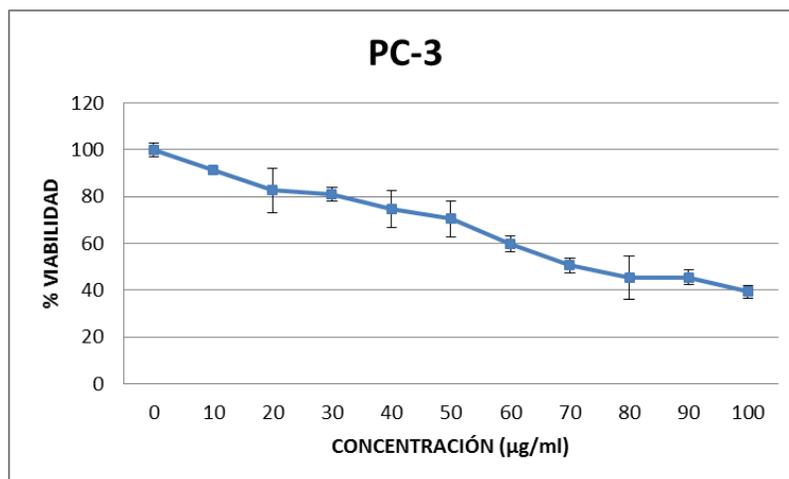


Fig. 7. Efecto citotóxico del extracto de semillas de aguacate en la línea celular PC-3.

Aunque la semilla del aguacate representa un porcentaje considerable de la masa total del fruto, la investigación científica sobre la fitoquímica y los efectos biológicos de la semilla del aguacate está apenas en sus inicios. Actualmente, la semilla representa un recurso subutilizado y un desecho en el procesamiento del aguacate. Investigaciones recientes han mostrado que las semillas del aguacate pudieran mejorar la hipercolesterolemia y ser útil en el tratamiento de la hipertensión, condiciones inflamatorias y diabetes. Adicionalmente, se ha demostrado que las semillas también poseen actividad insecticida, fungicida y antimicrobiana. Con respecto a sus efectos anti-cáncer se ha reportado que el tratamiento de células de cáncer de mama MDA-MB-231 con un extracto metanólico de semillas de

aguacate provocó la inducción de apoptosis, evaluada por un incremento en la proteólisis de caspasa 3, caspasa 7 y PARP. El extracto de cáscara de aguacate tuvo un efecto similar, aunque fue más potente (Dabas *et al.*, 2013). Por otra parte, se encontró que extractos etanólicos de endocarpio, semilla, semilla completa y hojas de aguacate indujeron apoptosis en células de leucemia linfoblástica Jurkat (Bonilla-Porras *et al.*, 2014). En nuestro estudio se encontró que un extracto de éter de petróleo de semilla de aguacate fue citotóxico para células de cáncer cervicouterino HeLa, para células de cáncer de pulmón A-549 y para células de cáncer de próstata PC-3, aunque las células HeLa fueron más sensibles a los efectos. En su conjunto, estos hallazgos sugieren que la semilla de aguacate puede ser una fuente importante de moléculas bioactivas y se puede realizar un aprovechamiento de este recurso actualmente desechado.

Referencias

- Adeyemi O.O., Okpo S.O. and Ogunti O.O. (2002) Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). *Fitoterapia*. 73: 375-380.
- Bonilla-Porras A.R., Salazar-Ospina A., Jimenez-Del-Rio M., Pereañez-Jimenez A. and Velez-Pardo C. (2014) Pro-apoptotic effect of *Persea americana* var. *Hass* (avocado) on Jurkat lymphoblastic leukemia cells. *Pharm. Biol.* 52(4): 458-465.
- Bull S.D. and Carman R.M. (1994) Synthesis of the avocado antifungal, (Z, Z)-2-Hydroxy-4-oxoheneicosa-12, 15-dien-1-yl-Acetate. *Aust. J. Chem.* 47: 1661-1672.
- Carranza J., Alvizouri M., Alvarado M.R., Chavez F., Gomez M. y Herrera J.E. (1995) Efectos del aguacate sobre los niveles de lípidos séricos en pacientes con dislipidemias fenotipo II y IV. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 65(4): 342-348.
- Dabas D., Shegog R.M. Ziegler G.R. and Lambert J.D. (2013) Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*. 19: 6133-6140.
- de Almeida A.P., Miranda M.M.F.S., Simoni I.C., Wigg M.D., Lagrota M.H.C. and Costa S.S. (1998) Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytother. Res.* 12: 562-567.
- Domergue F., Helms G.L., Prusky D. and Browse J. (2000) Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry*. 54: 183-189.

- Henrotin Y.E., Labasse A.H., Jaspar J.M., De Groote D.D., Zheng S.X., Guillou G.B. and Reginster J.Y.L. (1998) Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes. *Clin. Rheumatol.* 17: 31-39.
- Kawagishi H., Fukumoto Y., Hatakeyama M., He P., Arimoto H., Matsuzawa T., Arimoto Y., Suganuma H., Inakuma T. and Sugiyama K. (2001) Liver injury suppression compounds from avocado (*Persea americana*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 2215-2221.
- López L., Villavicencio M.A., Albores A., Martínez M., De la Garza J., Meléndez Zajgla J. and Maldonado V. (2002) *Cupressus lusitanica* (Cupressaceae) leaf extract induces apoptosis in cancer cells. *J. Ethnopharmacol* 80: 115-120.
- Ochse J.J., Soule M.J., Dijkman M.J., y Wehlburg C. (1986) Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Ed. Limusa, México.1.
- Ramos-Jerz M.R. (2007) Phytochemical analysis of avocado seeds (*Persea americana* Mill., c.v. *Hass*). Ed. Cuvillier Verlag. Göttingen, 319 pp. ISBN 978-3-86727-389-3.
- Rodríguez-Saona C., Millar J.G. and Trumble J.T. (1998) Isolation, identification, and biological activity of isopersin, a new compound from avocado idioblast oil cells. *J. Nat. Prod.* 61: 1168-1170.
- Rodríguez-Saona C., Maynard D.F., Phillips S. and Trumble J.T. (1999) Alkylfurans: effects of alkyl side-chain length on insecticidal activity. *J. Nat. prod.* 62: 191-193.
- Sugiyama T., Sato A. and Yamashita K. (1982) Synthesis of all four stereoisomers of antibacterial component of avocado. *Agric. Biol. Chem.* 46(2): 481-485.
- Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J. and Jemal A. (2015) Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65: 87-108.
- Yasir M, Das S. and Kharya M.D. (2010) The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacognosy Review.* 4: 77-84.

13. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y/O ANTIINFLAMATORIAS DE NUEVAS MOLÉCULAS, MEDICAMENTOS Y/O SUSTANCIAS DE ORIGEN NATURAL SOBRE UN MODELO “*IN VIVO*”.

Jorge Bravo Madrigal.

Biología, Médica y Farmacéutica, CIATEJ, A. C.

jbravo@ciatej.mx

Introducción

A partir del descubrimiento, producción y uso terapéutico de los antibióticos, durante la primera mitad del siglo pasado, la industria farmacéutica no ha cesado en la búsqueda y modificación de nuevas moléculas con actividad terapéutica. El uso amplio e indiscriminado de los antibióticos, ocasionó el surgimiento de cepas con multiresistencia [1]. La respuesta fue el diseño y búsqueda de los llamados antibióticos de amplio espectro, que en cierta medida han facilitado y mejorado el pronóstico y probabilidad de éxito en el combate de infecciones, pero también han ocasionado efectos colaterales como la pérdida y/o desequilibrio de la microbiota humana[2]. Estos efectos ejercen un fuerte impacto en la salud del paciente, ya que lo hacen más propenso a ser colonizado por microorganismos indeseables tales como el género *Clostridium*. En el caso de la microbiota respiratoria, está también se ve afectada tras la administración de antibióticos para tratar estas enfermedades [3, 4]. Por otra parte, se conoce ampliamente que, los efectos secundarios de muchos de los

antibióticos y antiinflamatorios sintéticos, representen un problema adicional, ya que algunos causan daños cuya gravedad está relacionada con el tiempo de uso.

Si bien México cuenta con la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), entidad que regula y aprueba el uso de nuevas sustancias para uso humano, es frecuente escuchar o encontrar diversos productos que ofrecen al público tratamientos diversos, cuya seguridad y eficacia no ha sido completamente demostrada, muchos de ellos son derivados de productos naturales. También se conoce que muchos de los fármacos actuales se desarrollaron a partir del conocimiento tradicional, por tanto, no se debe descartar la capacidad de un producto de esta naturaleza para tratar alguna enfermedad [5, 6].

En este sentido, lo que hace falta más bien, es una adecuada valoración de las propiedades presumidas por los fabricantes de estos productos [7]. El tipo de evaluación que se debe llevar a cabo, depende del objetivo de uso y su vía de administración. Existen modelos que emulan distintas patologías desde metabólicas, genéticas e infecciosas, el seleccionar el modelo adecuado para una evaluación de efectividad farmacológica permitiría aportar evidencia de funcionabilidad de los productos derivados de conocimientos tradicionales y/o de origen natural y redundaría a la larga en la generación de nuevas moléculas.

En CIATEJ, se han desarrollado métodos para evaluar la capacidad de penetración de nuevos vehículos sobre cornea tanto “*in vivo*” como “*ex vivo*”, en los cuales se pueden empaquetar las moléculas con actividad terapéutica. También se ha desarrollado un modelo *in vivo* de evaluación de actividad anti-inflamatoria y antibacteriana en ratón, que emula las características propias de la infección dérmica humana, y sobre el cual se pueden evaluar, desde el punto de vista cuantitativo, la efectividad de extractos y/o moléculas de origen natural.

Evaluación inhibitoria en oído

El método desarrollado consiste en infectar el pabellón auricular de ratones BALB/c mediante un inóculo bacteriano obtenido con una cepa de *Streptococcus pyogenes* que está disponible en el ARS (Culture and Patent Culture Collections). Esta cepa fue aislada de un caso de Impétigo en humanos, pero fue adaptada en CIATEJ para permanecer e infectar el pabellón auricular de los ratones. De tal manera que es factible evaluar la capacidad inhibitoria o bactericida de sustancias antimicrobianas. Para lograr establecer la infección se debe realizar una lesión sobre el pabellón auricular, dicha lesión consiste de tres perforaciones equidistantes una con otra por 2 mm de separación.

La infección generada por este modelo, ocasiona desde las 24hrs un incremento en el grosor del pabellón auricular, mismo que puede medirse utilizando un micrómetro digital. Los resultados han mostrado reproducibilidad entre diversos experimentos y es muy clara la diferencia de la inflamación generada en pabellones infectados en comparación con los controles inoculados con Regulador de Fosfatos (PBS) (Fig. 1A).

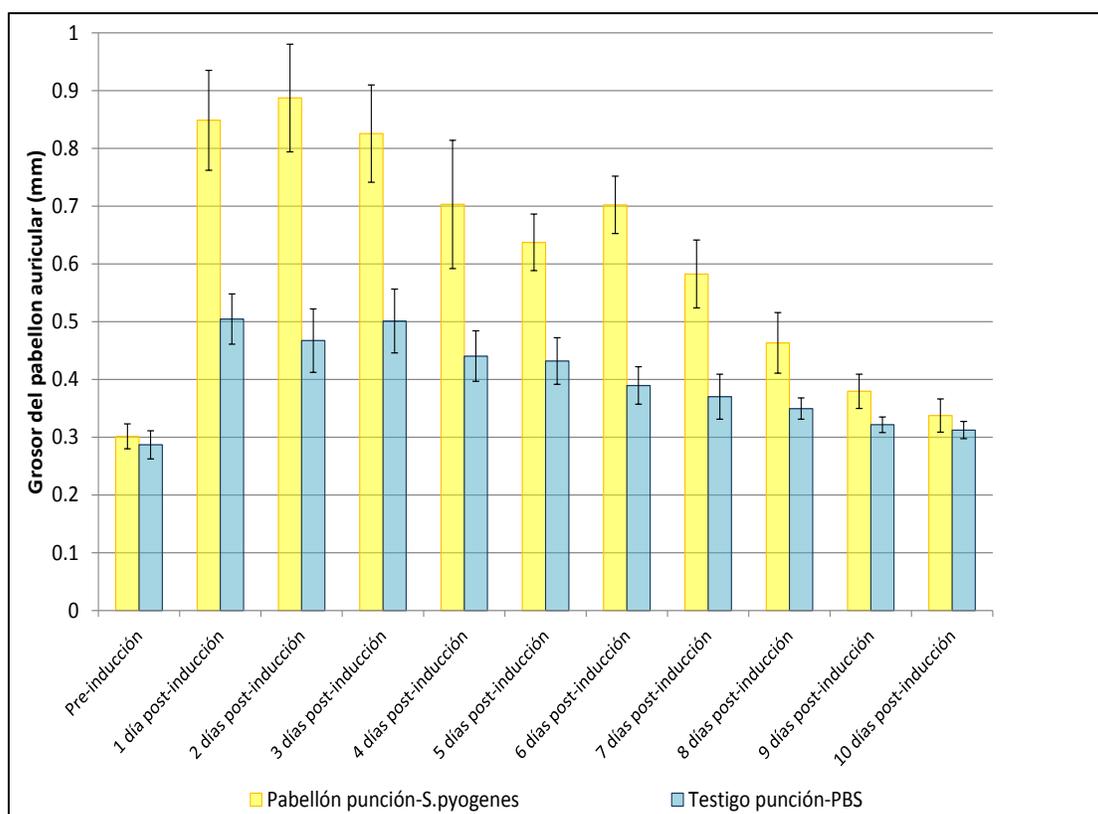


Fig. 1 Edema inducido tras la inoculación de *Streptococcus pyogenes* en pabellón auricular.

Por otra parte, hemos confirmado que el incremento en el grosor observado es compatible con los hallazgos encontrados en una dermatitis infecciosa, ya que observamos en cortes de tejido infectado, abundantes leucocitos polimorfonucleares, hiperplasia, así como aumento de la permeabilidad vascular. Así como este método permite cuantificar el edema o inflamación, también permite cuantificar el tiempo de infección, basado esto en la capacidad de persistencia del patógeno inoculado, para esto se evalúa la presencia de *S. pyogenes* en los pabellones infectados. El aislamiento bacteriano claramente muestra una mayor permanencia del patógeno sobre el sitio de la lesión en comparación con el tiempo que permanece la bacteria en pabellones intacto, es decir, sin la lesión requerida para causar la infección (Fig. 2).

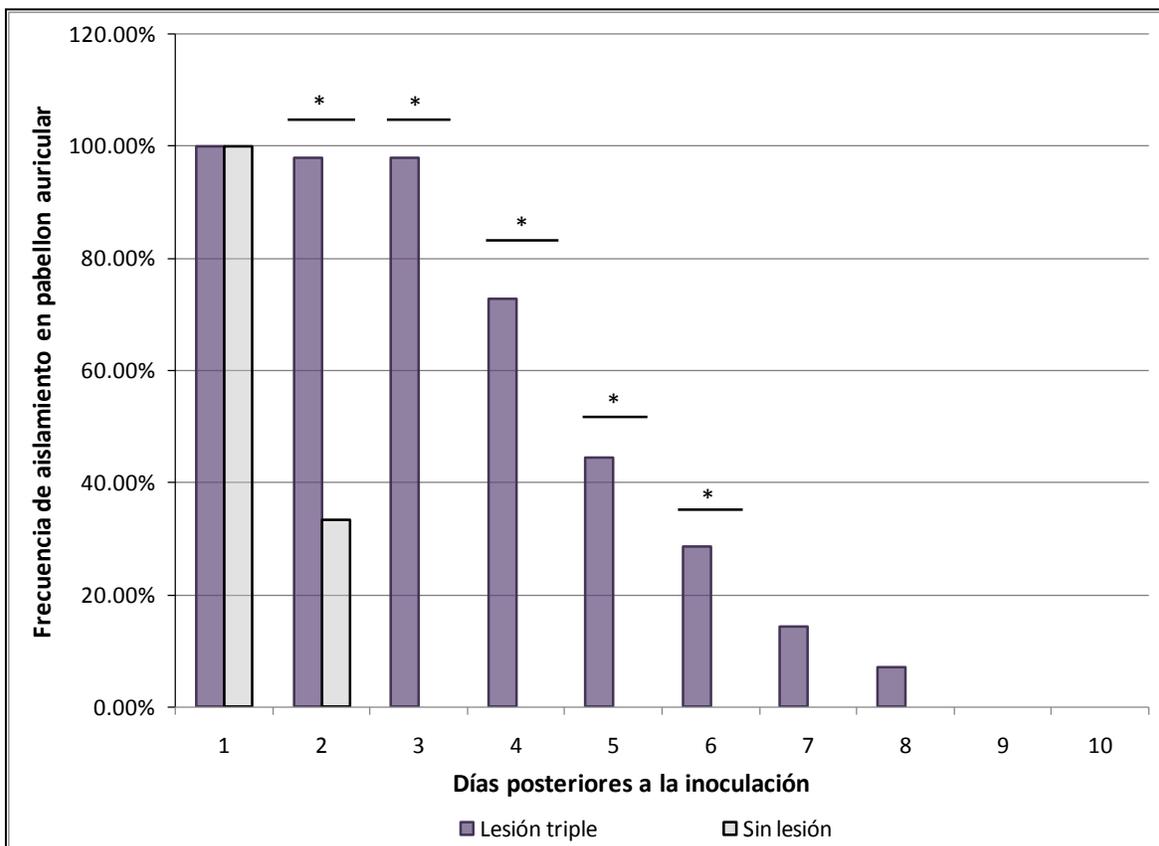


Fig. 2 Persistencia de *S. pyogenes* en pabellón auricular.

El edema inducido tras la inoculación (Fig. 2), se detectó como un incremento en el grosor del pabellón auricular, en este experimento, ratones BALB/c (n=14) fueron inoculados

en uno de los pabellones con 1×10^8 ufc de *S. pyogenes*, mientras que el pabellón contralateral fue inoculado con PBS. La Fig. 1 muestra el incremento promedio del grosor auricular tras la inoculación. Desde el primer día al séptimo, se observó diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.05$ (T Student pareada), las barras de desviación muestran el error estándar de la media.

Se evaluó la persistencia de *S. pyogenes* en pabellón auricular (Fig. 2), los ratones se inocularon con la bacteria como se mencionado antes, a un grupo de ratones ($n=50$) previo a la inoculación, se les realizó una lesión triple, mientras que el otro grupo ($n=6$), únicamente recibieron el inoculo sobre la superficie intacta del pabellón, 24 h después se realizaron diariamente cultivos de exudado de pabellón todos los individuos de cada grupo, y observamos que a partir del segundo día, hubo una mayor frecuencia de aislamiento del patógeno, en aquellos a los que se les realizó la inoculación sobre la lesión, lo cual implica que el éxito en infección de este modelo depende de la vía de inoculación (χ^2 $p < 0.0001$).

Evaluación terapéutica

Con el fin de determinar si las características del modelo desarrollado, permiten la evaluación tópica de moléculas con propiedades terapéuticas, hemos evaluado el uso de un medicamento comercial con probado efecto anti-inflamatorio y antimicrobiano, que incluye en su formulación ciprofloxacina, benzocaína e hidrocortisona en comparación con un placebo, la comparación del efecto se realizó en ratones ($n=6$) en dos ocasiones diferentes, todos los ratones se inocularon con *S. pyogenes* para inducir la dermatitis infecciosa en ambos pabellones, los tratamientos se realizaron a doble ciego, considerando que uno de los pabellones de cada ratón recibiera el tratamiento y el otro el placebo. Los resultados mostraron que el modelo es útil para evaluar la efectividad antibacteriana y anti-inflamatoria (Fig. 3).

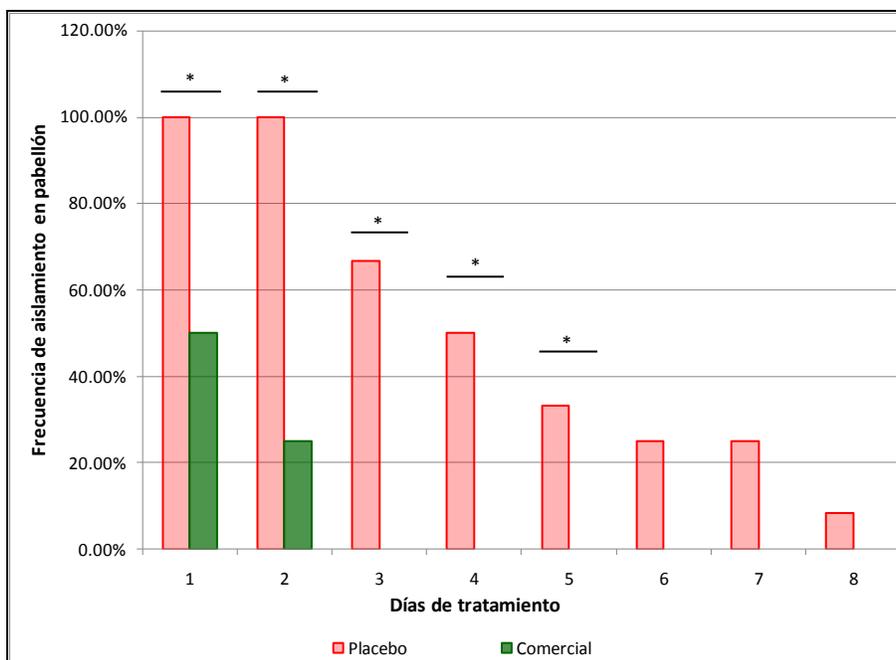


Fig. 3. Evaluación de actividad anti-inflamatoria y antimicrobiana de un medicamento comercial sobre el modelo *in vivo* de dermatitis infecciosa (fuente: Marino-Marmolejo et, al 2016) [8].

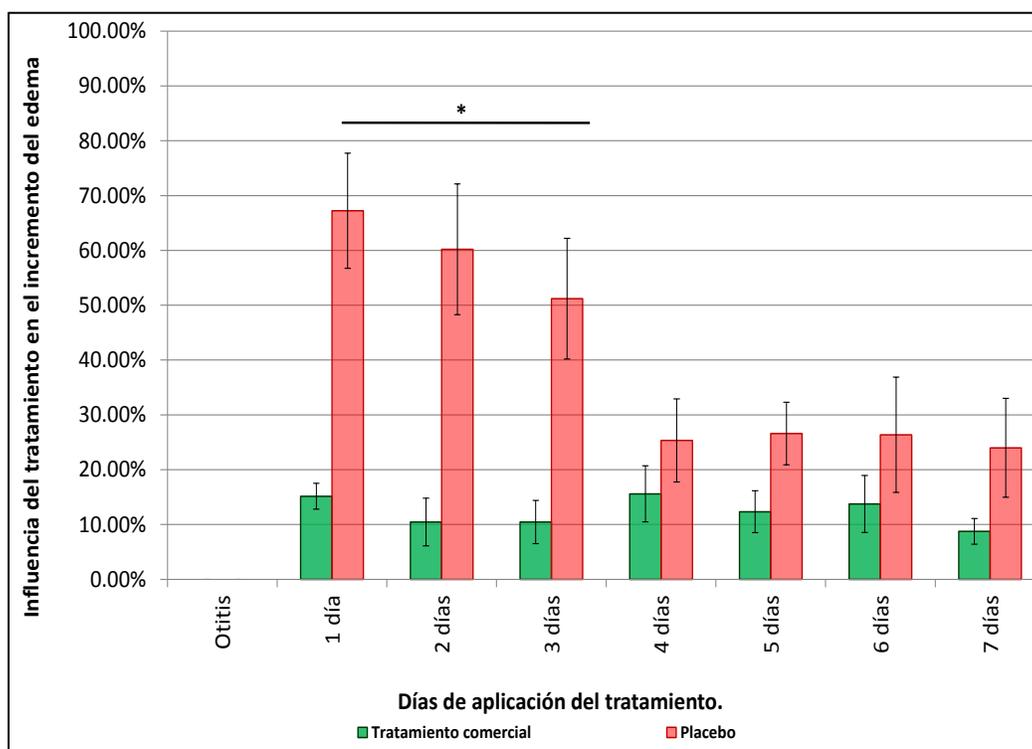


Fig. 4. Evolución del edema de actividad anti-inflamatoria y antimicrobiana de un medicamento comercial sobre el modelo *in vivo* de dermatitis infecciosa.

Así como evaluar la efectividad antimicrobiana (Fig. 4). Un grupo de ratones (n=12) fueron infectados en ambos pabellones con un inóculo ajustado a 1×10^8 ufc/mL, 1 hora después, se aplicó un tratamiento comercial en un pabellón, mientras que en el otro se aplicó un placebo. A) La gráfica muestra el incremento en el grosor del pabellón auricular causado por el edema inducido y su efecto con el placebo, por otra parte, se observa que la aplicación del medicamento comercial evito el edema, observándose diferencia estadísticamente significativa en comparación con el placebo durante los tres días posteriores a la inoculación, ($p < 0.003$ t student pareada). B) La aplicación del medicamento comercial mostró efecto bactericida sobre el pabellón auricular inoculado con *S. pyogenes*. Un día después de la aplicación del medicamento, se realizaron cultivos de exudado ótico diariamente durante los siguientes 8 días. Observamos que desde primer día de aplicación del tratamiento y hasta el día 5, hay un diferencia significativa en la frecuencia de aislamiento del patógeno (χ^2 $p < 0.0285$).

Conclusiones

Los resultados muestran la utilidad del modelo, en la evaluación tópica de tratamientos antimicrobianos o anti-inflamatorios, con la ventaja de mostrar resultados cuantitativos, reproducibles y objetivos, cualidades requeridas para la evaluación de efectividad. Dada la utilidad prevista de este modelo en la evaluación de las continuas formulaciones que llevan a cabo la industria farmacéutica, se ha solicitado desde 2013 la patente de este método, la cual aún está en evaluación, adicionalmente se ha enviado una publicación del método a fin de que pueda difundirse el método en el campo de la investigación experimental [8]. En CIATEJ contamos con la infraestructura y capacidad para la evaluación preclínica de moléculas y extractos naturales mediante esta tecnología.

Referencias

- 1 Chang HH, Cohen T, Grad YH, Hanage WP, O'Brien TF, Lipsitch M (2015) Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 79 (1):101-116

- 2 Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heure OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liebana E, Lopez-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodriguez-Bano J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Taconelli E, Wellington E, Vila J (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect* 6:22-29
- 3 Struthers JK, Westran RP (2003) *Clinical bacteriology*. CRC Press
- 4 Khan HA, Ahmad A, Mehboob R (2015) Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5 (7):509-514
- 5 Dehdari S, Hajimehdipoor H (2016) Herbal Medicines for Leucorrhea According to Iranian Traditional Medicine. *Iran J Med Sci* 41 (3):S36
- 6 Chibli LA, Rodrigues KC, Gasparetto CM, Pinto NC, Fabri RL, Scio E, Alves MS, Del-Vechio-Vieira G, Sousa OV (2014) Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J Ethnopharmacol* 154 (2):330-338
- 7 Liang W, Yew DT, Hon KL, Wong CK, Kwok TC, Leung PC (2014) Indispensable value of clinical trials in the modernization of traditional Chinese medicine: 12 years' experience at CUHK and future perspectives. *Am J Chin Med* 42 (3):587-604
- 8 Marino-Marmolejo EN, Flores-Hernandez FY, Flores-Valdez MA, Garcia-Morales LF, Gonzalez-Villegas AC, Bravo-Madrigal J (2016) A quantitative model for dermal infection and oedema in BALB/c mice pinna. *BMC Microbiol* 16 (1):290

14. CONTROL DE *Helicobacter pylori* CON EXTRACTOS VEGETALES

Jesús Rafael Trinidad-Cruz

Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar*

Gabriel Rincón-Enríquez

Biología Vegetal, CIATEJ, A.C.

*equinones@ciatej.mx

Resumen

Helicobacter pylori, es una bacteria Gram negativa que infecta aproximadamente al 50% de la población mundial. Su descubrimiento y aislamiento hace 33 años por Robin Warren y Barry Marshall marcó el inicio de una serie de investigaciones enfocadas a la comprensión de patologías gástricas asociadas a esta bacteria y a sus tratamientos. *H. pylori* es considerada como el agente causal de la gastritis crónica y se relaciona con las úlceras pépticas duodenal y gástrica, cáncer gástrico o adenocarcinoma, linfoma gástrico MALT y otras patologías. Sus diversos mecanismos de virulencia le proporcionan la capacidad de colonizar el estómago en condiciones adversas. Existen variados tratamientos y terapias que se enfocan a su erradicación en pacientes infectados, sin embargo, la resistencia que la bacteria genera a los antibióticos, sus altos costos y los efectos secundarios que se suscitan en el hospedero, con frecuencia conducen al abandono del tratamiento, de tal forma que la infección reincide de manera recurrente pudiendo devenir en patologías de mayor gravedad. Ante esta problemática y ante la búsqueda de terapias alternativas, varios grupos de investigación en el mundo basados en los conocimientos de la medicina tradicional sobre el uso de productos naturales para el tratamiento de patologías como la gastritis y la úlcera, han realizado investigaciones encauzadas hacia el uso de extractos de hierbas medicinales o de varias especies vegetales para la erradicación de la bacteria y su incidencia en la sintomatología. En México, un ejemplo del empleo de extractos para el tratamiento de problemas con gastritis y úlceras es el uso del axihuitl (*Eupatorium aschembornianum* Sch.)

en municipios cercanos al eje neo-volcánico del estado de Morelos, como son Tepoztlán y Huitzilac. Los pobladores de estos lugares emplean en decocciones de hojas de axihuitl para el tratamiento de problemas con gastritis, en CIATEJ se determinó que los extractos de esta especie vegetal tienen propiedades bactericidas contra bacterias Gram negativas patógenas de plantas (*Pseudomonas* spp., *Dickeya* spp.), por lo cual se tiene la hipótesis de que este extracto tiene efecto bactericida contra *H. pylori*.

Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que coloniza el epitelio o mucosa gástrica del ser humano y puede causar un amplio espectro de lesiones gástricas. Su infección es asociada a enfermedades como gastritis crónica, úlceras pépticas (gástricas y duodenales), adenocarcinoma, linfoma gástrico MALT y otros problemas de salud con los que se le relaciona. Esta bacteria patógena infecta aproximadamente a la mitad de la población mundial y en México se ha reportado una seroprevalencia del 66%. *H. pylori* ha desarrollado mecanismos de colonización y virulencia que aseguran el éxito en el establecimiento de su nicho, lo que desencadena una respuesta local y sistémica por parte del sistema inmune, no obstante, la bacteria puede modular esta reacción e infectar a su hospedero de manera crónica (Espinosa y Romero, 2014). La gastritis crónica, es una de las principales enfermedades que causa la bacteria en personas infectadas y en algunos casos puede devenir en lesiones precancerosas y posteriormente en cáncer gástrico, siendo más vulnerables a este tipo de enfermedades personas que habitan en algunas regiones de bajo nivel socioeconómico (Correa y Piazuolo, 2008), donde determinados factores como el hospedero y el tipo de cepa bacteriana influyen en la prevalencia de la enfermedad. Las patologías asociadas a *H. pylori* se manifiestan principalmente en adultos, sin embargo, estudios epidemiológicos sugieren que es por lo general durante la infancia que la infección se adquiere (Torres *et al.*, 2000), por lo que la detección precisa y el diagnóstico en esta etapa son importantes para tomar acciones tempranas que permitan detener la evolución a patologías más graves. No obstante, la detección no es fácil debido a que una infección aguda puede producir una gastritis superficial y la infección persistente conduce a una gastritis crónica que puede ser asintomática (Torres *et al.*, 2000). En casi todas las personas infectadas por *H. pylori* hay gastritis, pero la mayoría permanecen asintomáticas. Uno de los problemas en el control de

H. pylori es la generación de resistencia a antibióticos, además de que una vez eliminada la infección suele haber reinfecciones (O'Connor, 1992), pues el tratamiento de *H. pylori* por antibióticos no asegura en todos los casos el fin en pacientes ya tratados, habiendo reincidencia de la infección. Ante esta problemática, una alternativa viable a las terapias existentes es el empleo de extractos vegetales con actividad antibacteriana contra *H. pylori* (Sharma *et al.*, 2016). El empleo de extractos vegetales tiene la ventaja de que existen diversas especies de plantas estudiadas con actividad anti *H. pylori* por lo que el acceso a la población de alguna(s) de las plantas eficientes es mayor, además de que este tipo de tratamiento sería mucho menos tóxico para el organismo humano que el empleo de terapias que incluyen grandes cantidades de antibióticos para el tratamiento del padecimiento. En México el grupo de la Dra. Irma Romero Álvarez de la Facultad de ciencias de la UNAM, es pionera en el estudio de la actividad anti *H. pylori in vitro* empleando plantas medicinales mexicanas. Espinosa y Romero (2014), con el objetivo de usar extractos o compuestos aislados como posibles fármacos para el control de enfermedades asociadas a esta bacteria, analizaron extractos acuosos y metanólicos de diversas especies vegetales medicinales encontrando que, de éstas, el 77% presentan actividad contra *H. pylori* en al menos uno de los extractos ensayados, también aislaron algunos compuestos activos contra la bacteria y estudiaron los extractos de una manera integral. Una de las especies evaluadas por sus efectos en el tratamiento de gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico es el “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*) de la cual identificaron que son los ácidos anacárdicos los principales compuestos activos contra la bacteria.

En el CIATEJ se ha evaluado la actividad antimicrobiana de extractos de *E. aschembornianum*, planta medicinal empleada tradicionalmente para el tratamiento de la gastritis en algunas regiones del estado de Morelos contra bacterias fitopatógenas, obteniéndose buenos resultados. Dentro de este contexto, se iniciaron investigaciones enfocadas a la evaluación de extractos de axihuitl, por su actividad antimicrobiana, contra *H. pylori*

Generalidades de *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria microaerofílica Gram-negativa que vive en la mucosa gástrica humana, causante de diferentes lesiones gástricas y asociada al riesgo de padecer cáncer de estómago (Ohsaki *et al.*, 1999; Wang, 2014). Esta bacteria fue descubierta por Robin Warren

en el tejido inflamado de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica, y posteriormente, se logró su cultivo por Barry Marshall. Por estos hallazgos, a ambos investigadores les fue concedido el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2005 (Espinosa y Romero, 2014). La información sobre el descubrimiento y cultivo de la bacteria encontrada en la mucosa gástrica y asociada a la gastritis y úlcera fue publicada en 1984 en un artículo en *The Lancet* (Marshall y Warren, 1984) denominado “*Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*”. Este bacillo fue inicialmente llamado *Campylobacter pylori* y en 1989 fue reclasificado como *H. pylori* (Goodwin *et al.*, 1989). Sus mecanismos de virulencia han permitido que esta bacteria tenga la capacidad de colonizar el estómago en condiciones adversas. Uno de los primeros mecanismos que juega un papel importante en la colonización de *H. pylori* es la producción de la enzima ureasa, que le permite hidrolizar la urea en amonio y CO₂ para generar un microambiente alcalino alrededor de ella, así como, del citoplasma y el periplasma, permitiendo la supervivencia de la bacteria al ambiente ácido del estómago (Escobedo-Hinojosa y Romero, 2011; Marcus y Scott, 2016; Praszkie *et al.*, 2016). La enzima ureasa es de gran importancia para *H. pylori* que representa el 10% de las proteínas celulares y es altamente conservada en todas las cepas (Moble *et al.*, 1991; Escobedo-Hinojosa y Romero, 2011). Posteriormente, *H. pylori* es capaz de atravesar el viscoso gel del mucus que cubre el epitelio gástrico con ayuda de su motilidad flagelar y su forma espiral curveada, con la finalidad de llegar hacia las células del epitelio gástrico en donde las condiciones de pH le son más favorables (Escobedo-Hinojosa y Romero, 2011; Marcus y Scott, 2016). Otro paso importante durante el proceso de colonización es la interacción estrecha de *H. pylori* con las células gástricas que es mediada a través de diferentes adhesinas, muchas de las cuales son proteínas de la membrana externa y que reconocen distintas proteínas, proteolípidos o carbohidratos sobre la superficie de las células epiteliales (Testerman *et al.*, 2001). Otro factor de virulencia importante durante la colonización de *H. pylori*, es la citotoxina vacuolizante (*VacA*), la cual es codificada por el gen *vacA* que posee cuatro regiones variables, cada región variable posee variantes alélicas que están implicadas en el riesgo de desarrollar enfermedades gástricas (úlceras pépticas y cáncer de estómago) (Cover *et al.*, 2016). La citotoxina *VacA* es secretada a través de un sistema de secreción tipo V y tiene la capacidad de formar canales en la membrana de las células epiteliales permitiendo la salida de aniones y pequeñas moléculas orgánicas (urea),

además posee otros efectos de importancia como la actividad vacuolizante, inducción de la autofagia, apoptosis y la actividad inmunosupresora (Kim, 2016; Nakano *et al.*, 2016). La citotoxina asociada al gen A (*CagA*) es otro de los factores de virulencia de importancia en la patogenicidad de *H. pylori*. El gen *cagA* que, codifica a la proteína CagA, esta codificada dentro de la isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI) que es un conjunto de alrededor de 32 genes, dentro de ellos se encuentran los genes del conjunto de proteínas encargadas de formar Sistema de Secreción Tipo IV (SST4) que transporta el material presente en el citoplasma de *H. pylori* dentro de la célula hospedera (Kim, 2016). La CagA es transportada a través del SST4 hacia el interior de las células del epitelio gástrico, dentro de ella tiene efectos importantes como cambios en el citoesqueleto, elongación celular, en la motilidad, respuestas pro-inflamatorias y la apoptosis (Escobedo-Hinojosa y Romero, 2011).

Extractos vegetales con actividad anti-*Helicobacter pylori*

En todo el mundo, diferentes especies de plantas fueron utilizadas de manera común por los antepasados del hombre para el tratamiento de diversas afecciones, lesiones y malestares. Sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos y el desarrollo de nuevas moléculas sintéticas se dio paso a un mejor tratamiento de estas problemáticas, así como de la enfermedad misma, dejando a un lado el uso de estas plantas medicinales (Safavi *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2016). A pesar de ello, durante las últimas décadas se ha registrado la aparición de bacterias resistentes a un amplio espectro de antibióticos generando así una problemática alarmante para la salud humana a nivel mundial. Debido a ello, se necesitan nuevos tratamientos para el control de bacterias resistentes, como el caso de *H. pylori* y el uso de extractos vegetales ofrece una alternativa para su control (Sharma *et al.*, 2016).

En los últimos años, se han evaluado diferentes especies de plantas para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *H. pylori* en condiciones *in vitro*, el cual es uno de los pasos a seguir en la búsqueda de extractos vegetales con potencial para generar nuevas terapias para el control de esta bacteria (Cos *et al.*, 2006). En la literatura se encuentran numerosos estudios que comprueban el potencial de los extractos vegetales en el control de *H. pylori*, en este trabajo sólo se consideraron los estudios de plantas en donde se evaluó el efecto anti-*H. pylori* a partir de sus extractos crudos (Tabla 1). En resumen, se han evaluado más de 102 diferentes especies de plantas utilizando varias partes como hojas, raíz, rizomas,

corteza, tallos, flores, frutos y semillas a través de la extracción con diferentes solventes como metanol, etanol, agua, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano y dietil éter (Tabla 1). Se consideró un extracto con fuerte actividad a aquellos cuya concentración inhibitoria mínima (CIM) fuera $< 0.001 \text{ mg mL}^{-1}$, aunque esta referencia se hace para las pruebas *in vitro* (Wang, 2014). Los extractos de plantas registrados en la Tabla 1, sólo el 8% presenta esta fuerte actividad anti-*H. pylori*. Por ejemplo, Escobedo-Hinojosa *et al.* (2014) encontraron que los extractos crudos metanólicos de hojas, tallos y raíces de *Hippocratea celastroides*, utilizados en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la gastritis, presentaron una CIM de $0.0078 \text{ mg mL}^{-1}$ en contra de *H. pylori* ATCC 43504. En el mismo sentido, Mahady *et al.* (2003) encontraron que el extracto crudo metanólico de rizoma de *Hydrastis canadensis*, utilizada por los indígenas nativos americanos para el tratamiento de la gastritis e indigestión, mostró una CIM de $0.00078 \text{ mg mL}^{-1}$ en contra de un aislado clínico de *H. pylori*, pero al ser probado contra *H. pylori* ATCC 43504 mostró una CIM de 0.05 mg mL^{-1} . Los estudios mostrados en la Tabla 1 indican un amplio intervalo de la CIM de los extractos vegetales de diferentes especies que van de 0.00078 a 1500 mg mL^{-1} contra diferentes aislados clínicos y cepas de referencia de *H. pylori*.

Un aspecto importante durante la selección de extractos vegetales con potencial anti-*H. pylori* es la evaluación *in vivo* en un modelo animal para conocer la seguridad, calidad y efectividad de los extractos vegetales como terapias alternativas para el control de *H. pylori*, para su posterior estudio clínico (Cos *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2016). Basado en los estudios revisados sólo el 21% fueron en modelo animal (ratas o ratones), de los cuales el 18% presentó pruebas de citotoxicidad y/o gastroprotector (anti-úlceras) de los extractos vegetales. Escobedo-Hinojosa *et al.* (2012) demostraron que la administración oral de extracto metanólico de la corteza del tallo de *Cyrtocarpa procera* en ratones CD-1 a dosis de 0.1 a 300 mg kg^{-1} tuvo un efecto gastroprotector significativo, mostrando la reducción del área de la lesión de úlceras inducidas por etanol con respecto al control, además determinaron que la dosis letal media (DL_{50}) del extracto fue mayor a 5000 mg kg^{-1} . Kushima *et al.* (2009) evidenciaron que la administración oral de los extractos metanólicos de hoja de *Davilla elliptica* y *D. nitida* en ratones Swiss y ratas Wistar a dosis de 500 mg kg^{-1} tuvo un efecto gastroprotector significativo en contra de las lesiones ulcerosas inducidas por etanol con respecto al control no tratado, así también, indicaron que dosis orales de 5000 mg kg^{-1} de

ambos extractos no mostraron toxicidad o cambios en el comportamiento de los ratones.

Las pruebas de efectividad anti-*H. pylori* de extractos vegetales en roedores fueron realizadas en al menos el 2% de los estudios; Souza *et al.* (2009) encontraron que el tratamiento oral de ratas albinas Wistar con el extracto etanólico de la corteza del tallo de *Calophyllum brasiliense* a dosis de 50, 100 y 200 mg kg⁻¹ durante 14 días mostró una reducción significativa (> 50%) en la detección de *H. pylori* en el tejido gástrico a través de la prueba de ureasa, además, no se observaron efectos tóxicos o cambios en el comportamiento en los ratones Swiis-Webster tratados oralmente con el extracto a dosis de 250, 500, 1000 y 3000 mg kg⁻¹. Así también, Kouitcheu *et al.* (2016) encontraron que la administración oral del extracto metanólico de hojas de *Eryngium foetidum* a dosis de 500 mg kg⁻¹ en ratones albinos Swiss, una vez al día durante una semana, redujo la detección de *H. pylori* en el tejido gástrico en un 100% a través de las pruebas de catalasa, ureasa y tinción de Gram, sin embargo, el conteo en placa Petri de la carga bacteriana demostró que la concentración de *H. pylori* fue disminuida significativamente en el tejido gástrico debido al extracto de *E. foetidum* (381 ± 239.5 ufc) con respecto a los ratones no tratados (14350 ± 690 ufc). Estos estudios muestran el potencial que tienen los extractos vegetales como terapia alternativa para el control de *H. pylori*.

Existe una gran variedad de extractos vegetales con actividad anti-*H. pylori* (Tabla 1) de los cuales el 79% de los estudios no tienen una evaluación *in vivo* en modelos animales. Estos extractos vegetales podrían tener potencial como terapias alternativas para el control de *H. pylori* adicionados de manera integral con el uso de la nanotecnología para el desarrollo de sistemas de entrega de fármacos o extractos más eficientes. Pan-in *et al.* (2014) probaron el uso de nanopartículas mucoadhesivas cargadas con el extracto de *Garcinia mangostana*, las pruebas preliminares de la administración oral del extracto encapsulado en ratones mostraron un mayor efecto en el combate de *H. pylori* con respecto al extracto no encapsulado, aunque sin una erradicación completa. Es por ello, que el uso de terapias triples (omeprazol, amoxicilina y claritromicina o metronidazol) o cuádruples (subcitrato de bismuto, tetraciclina, metronidazol y omeprazol) aunado al uso de micro o nanoformulaciones de extractos vegetales en combinación con antiadherentes y gastroprotectores podrían ayudar a la erradicación de esta bacteria que afecta a más del 50% de la población mundial (Graham y Mohammadi, 2016).

Tabla 1. Estudios de extractos vegetales que muestran actividad anti-*Helicobacter pylori* en distintas condiciones experimentales.

Referencia	Especie vegetal	Solvente del extracto	Concentración (mg mL ⁻¹) *
Kouitcheu <i>et al.</i> (2016) ^a	<i>Bidens pilosa</i>	AE	CIM 0.256-1.024; CBM 0.512-1.024
	<i>Eryngium foetidum</i>	MeOH	CIM 0.064- > 1.024; CBM 0.064
	<i>Galinsoga ciliata</i>	AE	CIM 0.128- > 1.024; CBM 0.512
Abreu-Miranda <i>et al.</i> (2015) ^a	<i>Solanum cernuum</i>	EtOH 70%	CIM > 0.4; CBM > 0.4
Espinosa-Rivero <i>et al.</i> (2015)	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Hex	CIM 0.015-0.031
Garro <i>et al.</i> (2015) ^a	<i>Lithraea molleoides</i>	MeOH	CIM 0.008-0.125
Hamad <i>et al.</i> (2015) [†]	<i>Punica granatum</i>	H ₂ O	CI 120
	<i>Syzygium aromaticum</i>	H ₂ O	CI 50.6
Périco <i>et al.</i> (2015) ^a	<i>Serjania marginata</i>	EtOH 70%	CIM 0.075
Pinheiro-Silva <i>et al.</i> (2015) ^a	<i>Terminalia catappa</i>	EtOH/ H ₂ O (Fr)	CIM 0.125
Boyanova (2014) [†]	<i>Aspalathus linearis</i>	H ₂ O	CI 0.6 mg/micropozo
	<i>Hypericum perforatum</i>	H ₂ O	CI 0.6 mg/micropozo
	<i>Hippocratea celastroides</i>	MeOH	CIM 0.0078-0.125
Escobedo-Hinojosa <i>et al.</i> (2014) ^a	<i>Agave lechuguilla</i>	MeOH	CI 5-10
González-Cantú (2014)	<i>Agave lophantha</i>	MeOH	CI 10
	<i>Morinda citrifolia</i>	EtOH 95%	CIM 5; CBM 10
Huang <i>et al.</i> (2014)	<i>Theobroma cacao</i>	MeOH	CIM 80
Lawal <i>et al.</i> (2014)	<i>Magnolia sieboldii</i>	MeOH/Hex (Fr)	CI 0.1-1 mg/disco
Lee <i>et al.</i> (2014)	<i>Origanum minutiflorum</i>	MeOH	CI 2
Ozen <i>et al.</i> (2014)	<i>Cuphea aequipetala</i>	H ₂ O	CIM 0.125
Palacios-Espinosa <i>et al.</i> (2014) ^a	<i>Anthriscus sylvestris</i>	MeOH/DM (Fr)	CI 0.05 mg/disco
Cho <i>et al.</i> (2013)	<i>Paeonia suffruticosa</i>	EtOH 70%	CBM 0.1
Jung <i>et al.</i> (2013) ^a	<i>Anisomeles indica</i>	EtOH 95%	CI 0.5
Lien <i>et al.</i> (2013)	<i>Caesalpinia pyramidalis</i>	EtOH 90%	CIM 0.625; CBM 10
Ribeiro <i>et al.</i> (2013) ^a	<i>Geranium wilfordii</i>	EtOH 95%	NI (moderadamente efectivo)
Zhang <i>et al.</i> (2013) ^a	<i>Cyrtocarpa procera</i>	Hex	CIM 0.0078
Escobedo-Hinojosa <i>et al.</i> (2012) ^a	<i>Paeonia lactiflora</i>	MeOH/Hex (Fr)	CI 1-10 mg/disco
Ngan <i>et al.</i> (2012)	<i>Phyllanthus niruri</i>	H ₂ O	CI 5-10 mg/disco
Ranilla <i>et al.</i> (2012)	<i>Anisomeles indica</i>	EtOH	CBM 0.4
Rao <i>et al.</i> (2012)	<i>Garcinia cowa</i>	AE	CIM 1.25; CBM 5
Sakunpak y Panichayupakaranant (2012) [†]			
Shahani <i>et al.</i> (2012)	<i>Geum iranicum</i>	MeOH	CI 0.001 mg/disco

Tabla 1. Continuación....

Referencia	Especie vegetal	Solvente del extracto	Concentración (mg mL ⁻¹)*
Silva <i>et al.</i> (2012)	<i>Terminalia macroptera</i>	EtOH 80%	CIM ₅₀ 0.2
Henao <i>et al.</i> (2011)	<i>Lippia alba</i>	H ₂ O	CI 0.5
Moon <i>et al.</i> (2011)	<i>Hypericum erectum</i>	MeOH/AE (Fr)	CIM ₅₀ 0.038-0.063; CIM ₉₀ 0.098- > 0.1
Njume <i>et al.</i> (2011a)	<i>Garcinia kola</i>	EtOH	CIM ₅₀ 0.63-5.0
Njume <i>et al.</i> (2011b)	<i>Sclerocarya birrea</i>	Ac/AE (FC)	CIM ₅₀ 0.31
Njume <i>et al.</i> (2011c) †	<i>Combretum molle</i>	Ac	CIM ₅₀ 0.08-2.5
	<i>Garcinia kola</i>	EtOH	CIM ₅₀ 0.63-5
Njume <i>et al.</i> (2011d)	<i>Sclerocarya birrea</i>	Ac	CIM ₉₀ 0.06-2.5
Njume <i>et al.</i> (2011e)	<i>Combretum molle</i>	Ac	CIM ₉₀ 1.25-5
Okeleye <i>et al.</i> (2011)	<i>Bridelia micrantha</i>	AE	CIM ₅₀ 0.0048-0.156; CIM ₉₀ 0.0048-2.5
Robles-Zepeda <i>et al.</i> (2011) †	<i>Ambrosia confertiflora</i>	MeOH	CIM ₅₀ < 0.2
	<i>Ibervillea sonora</i>	MeOH	CIM ₅₀ < 0.2
Tan <i>et al.</i> (2011) ^a	<i>Ocimum suave</i>	H ₂ O	CIM 1.17; CBM 2.34
Cwikla <i>et al.</i> (2010) †	<i>Agrimonia eupatoria</i>	EtOH 45%	CI 0.8 (97% AA)
	<i>Taraxacum officinale</i>	EtOH 35%	CI 0.8 (26% AA)
Fock <i>et al.</i> (2010)	<i>Cinnamomum verum</i>	NI	CIM 60-750; CIM ₅₀ 0.125
	<i>Solanum nigrum</i>	NI	CIM 125-1500; CIM ₅₀ 0.25
Hsu <i>et al.</i> (2010)	<i>Solanum lyratum</i>	EtOH 50%	CI 2 mg/disco
Tan <i>et al.</i> (2010)	<i>Enantia chlorantha</i>	H ₂ O	CIM 0.39; CBM 1.56
Yang <i>et al.</i> (2010) †	<i>Lespedeza</i> spp.	EtOH 50%	CI 6.3-100 (20-80% AA)
Adeniyi <i>et al.</i> (2009)	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	CHCl ₃	CIM < 0.0125-0.1
	<i>Eucalyptus torelliana</i>	CHCl ₃	CIM < 0.0125-0.4
Bonacorsi <i>et al.</i> (2009)	<i>Byrsonima crassa</i>	CHCl ₃	CIM 1.024
Brown <i>et al.</i> (2009)	<i>Vitis vinifera</i>	Ac:H ₂ O:AcA	CIM 0.512-1.024
	<i>Vitis rotundifolia</i>	Ac:H ₂ O:AcA	CIM 0.256-1.024
Castillo-Juárez <i>et al.</i> (2009) †	<i>Annona cherimola</i>	MeOH	CIM < 0.0156
Kushima <i>et al.</i> (2009) ^a	<i>Davilla elliptica</i>	MeOH	CIM 0.25
	<i>Davilla nitida</i>	MeOH	CIM 0.125
Lee <i>et al.</i> (2009a)	<i>Alpinia officinarum</i>	MeOH/CHCl ₃ (Fr)	CI 0.1-1 mg/disco
Lee <i>et al.</i> (2009b) ^a	<i>Gardenia jasminoides</i>	EtOH 70%	CBM 0.1
Moleiro <i>et al.</i> (2009) ^a	<i>Mouriri elliptica</i>	MeOH	CIM 0.025
Souza <i>et al.</i> (2009) ^a	<i>Calophyllum brasiliense</i>	EtOH 75%	CIM 0.031

Tabla 1. Continuación....

Referencia	Especie vegetal	Solvente del extracto	Concentración (mg mL ⁻¹)*
Stoicov <i>et al.</i> (2009) ^a	<i>Camellia sinensis</i>	EtOH 50%	CI 9.3 mg/disco
Vega <i>et al.</i> (2009)	<i>Artemisia douglasiana</i>	CHCl ₃	CIM 60-120
Zhou <i>et al.</i> (2009)	<i>Apium graveolens</i>	EtOH	CIM 0.3
Ito <i>et al.</i> (2008)	<i>Gymnaster koraiensis</i>	MeOH	CIM 0.25
	<i>Lactuca sativa</i>	MeOH	CIM > 1
Lai <i>et al.</i> (2008)	<i>Phyllanthus urinaria</i>	CHCl ₃	CBM 0.097
Wu <i>et al.</i> (2008)	<i>Scutellaria baicalensis</i>	EtOH	CIM ₅₀ 2.60; CBM 3.26
Claros <i>et al.</i> (2007)	<i>Calendula officinalis</i>	DM/EtOH 75% (Fr)	CI 0.6 (disco impregnado)
	<i>Clinopodium bolivianum</i>	DM	CI 0.6 (disco impregnado)
	<i>Piper angustifolium</i>	DM/EtOH 75% (Fr)	CI 0.6 (disco impregnado)
Narayan <i>et al.</i> (2007)	<i>Pterocarpus santalinus</i>	EtOH	CIM 0.02
Ndip <i>et al.</i> (2007) [†]	<i>Lycopodium cernua</i>	MeOH	CIM 0.182; CBM 1.87
Buruk <i>et al.</i> (2006) [†]	<i>Heracleum platytaenium</i>	MeOH	CIM 0.019
Nostro <i>et al.</i> (2006)	<i>Zingiber officinale</i>	EtOH 95%	CIM 0.01-0.08
Park <i>et al.</i> (2006)	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	MeOH	CI 0.05-5 mg/disco
Stege <i>et al.</i> (2006)	<i>Larrea divaricata</i>	H ₂ O	CIM 0.04-0.1
Chun <i>et al.</i> (2005)	<i>Origanum vulgare</i>	EtOH 60%	CI 0.05 mg de fenoles/disco
Li <i>et al.</i> (2005) [†]	<i>Eugenia caryophyllata</i>	EtOH 95%	CIM 0.04
Ochi <i>et al.</i> (2005) [†]	<i>Santalum sp.</i>	MeOH	CI 100 mg/disco
	<i>Salvia sp.</i>	AE	CI 100 mg/disco
Wang y Huang (2005a)	<i>Plumbago zeylanica</i>	AE	CIM 0.32-1.28
Wang y Huang (2005b) [†]	<i>Paederia scandens</i>	EtOH 95%	CIM 0.64-5.12
Adeniyi y Anyiam (2004)	<i>Allium ascalonicum</i>	MeOH	CIM 6.25-12.5
Chatterjee <i>et al.</i> (2004)	<i>Vaccinium corymbosum</i>	NI	CI 10 (100% AA)
Nariman <i>et al.</i> (2004)	<i>Trachyspermum copticum</i>	MeOH	CIM 0.031-0.25
	<i>Xanthium brasiliicum</i>	MeOH	CIM 0.062-0.25
Shin <i>et al.</i> (2004)	<i>Wasabia japonica</i>	DE	CBM 1.05
Goel <i>et al.</i> (2003)	<i>Bacopa monniera</i>	MeOH	CI > 1
Konstantinopoulou <i>et al.</i> (2003)	<i>Anthemis altissima</i>	NI	CIM 0.312-1.25
Mahady <i>et al.</i> (2003a)	<i>Sanguinaria canadensis</i>	MeOH 95%	CIM 0.0125-0.05
	<i>Hydrastis canadensis</i>	MeOH 95%	CIM 0.00078-0.05
Mahady <i>et al.</i> (2003b)	<i>Zingiber officinale</i>	MeOH	CIM 0.00625-0.05
Stamatis <i>et al.</i> (2003) [†]	<i>Anthemis melanolepsis</i>	MeOH 70%	CIM 0.625-2.5

Tabla 1. Continuación

	Especie vegetal	Solvente del extracto	Concentración (mg mL ⁻¹)*
Fukai <i>et al.</i> (2002)	<i>Glycyrrhizin uralensis</i>	MeOH	CI 10
Gadhi <i>et al.</i> (2001)	<i>Aristolochia paucinervis</i>	MeOH	CIM 32-128
Malekzadeh <i>et al.</i> (2001)	<i>Terminalia chebula</i>	H ₂ O	CI 0.4 mg/disco
Hamasaki <i>et al.</i> (2000)	<i>Evodia rutaecarpa</i>	DE	CI 0.016-0.031
Annuk <i>et al.</i> (1999)	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	H ₂ O	CI 1.5 mg de taninos/pozo
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	H ₂ O	CI 0.59 mg de taninos/pozo
Ohsaki <i>et al.</i> (1999)	<i>Myroxylon perviferum</i>	MeOH/AE (Fr)	CIM 0.03
Tabak <i>et al.</i> (1999)	<i>Cinnamomum cassia</i>	DM	CI 0.025-0.1 mg/disco
Germanò <i>et al.</i> (1998) ^a	<i>Pteleopsis suberosa</i>	MeOH	CIM 0.031-0.25
Kadota <i>et al.</i> (1997)	<i>Rabdosia trichocarpa</i>	MeOH	CI 0.001-0.01
Sivam <i>et al.</i> (1997)	<i>Allium sativum</i>	H ₂ O	CIM 0.04
Cellini <i>et al.</i> (1996)	<i>Allium sativum</i>	H ₂ O	CIM 2-5; CBM 2-5

Los estudios presentados en esta tabla muestran la actividad anti-*Helicobacter pylori* de los extractos crudos únicamente.

^a Indica que estos estudios presentaron pruebas en modelo animal.

[†] Indica que estos autores probaron más de tres extractos de plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*.

* En la mayoría de los estudios la CIM y la CBM fueron determinadas por el ensayo de dilución (microdilución) en caldo de cultivo o por el ensayo de dilución en agar, en otros trabajos sólo se determinó la CI a través del ensayo de difusión en disco de papel filtro.

Solventes: MeOH: Metanol; EtOH: Etanol; AE: Acetato de etilo; Hex: Hexano; Ac: Acetona; DM: Diclorometano; AcA: Ácido acético; DE: Dietil éter; CHCl₃: Cloroformo; H₂O: Extracto acuoso; NI: No indicado; Fr: Una fracción de la primera extracción.

Concentraciones: CI: Concentración inhibitoria, solo se observó inhibición del crecimiento; CIM: Concentración inhibitoria mínima; CBM: Concentración bactericida mínima; AA: Actividad antibacteriana.

Perspectivas sobre el control de *Helicobacter pylori* con extractos vegetales

Como se observa en la tabla presentada en el desarrollo de este capítulo, los estudios realizados para enfrentar un problema de salud pública mundial son amplios y diversos respecto al uso de plantas de uso medicinal tradicional, así como, otras alternativas no tratadas en este capítulo tales como aceites esenciales, péptidos con actividad antimicrobiana, propóleos, extractos de miel y compuestos puros (aislados de extractos vegetales). A pesar de lo anterior, aún no son claras las alternativas más viables para enfrentar estos graves problemas de salud, que de manera individual permitan la erradicación de *H. pylori*. Las diversas especies vegetales evaluadas poseen compuestos bioactivos con amplia actividad antimicrobiana o incluso bactericida contra *H. pylori*, pero hace falta extender aún más los estudios *in vivo* en modelos animales, clínicos y determinar con mayor precisión los mecanismos de la actividad biológica de los extractos, para posteriormente diseñar estrategias a base de micro o nanoformulaciones con el fin de hacer significativamente mayor el control de *H. pylori* sin causar efectos secundarios importantes en la salud humana. Finalmente, también será de vital importancia combinar distintas terapias de control de la bacteria patógena, como se hace actualmente, con el fin de evitar la resistencia de *H. pylori* a los compuestos bioactivos contenidos en las especies vegetales, es decir, las micro o nanoformulaciones tendrían que proponer una amplia gama de acción en contra del patógeno. Esta amplia gama de acción, proveniente de la diversidad de especies vegetales, pueden tener efecto bactericida, antiadherente, gastroprotector e inhibidores de ureasa que combinados con las terapias actuales permitan la erradicación de *H. pylori* en población mundial, así por ejemplo en el grupo interdisciplinario del CIATEJ, conformado por investigadores de Biotecnología Vegetal y Biotecnología Médica y Farmacéutica se está por determinar la actividad biológica a nivel *in vitro* e *in vivo* de extractos del axihuitl con el fin de preparar alguna nanoformulación que pueda ser empleada potencialmente en el tratamiento de esta infección bacteriana.

Conclusión

Las infecciones causadas por la bacteria patógena *H. pylori* son un problema de salud pública en México y el mundo, que puede complicarse por la capacidad de la bacteria a adquirir resistencia al tratamiento con multi-antibióticos que actualmente se emplean para su

tratamiento a nivel médico. Sin embargo, el uso de extractos de vegetales de la medicina tradicional puede ser una fuente de moléculas anti-*H. pylori* y su posterior puesta en formulaciones a partir de estos extractos, aunado a un mejor diseño y elaboración de micro y nanoformulaciones novedosas que provean de innovadores productos que combatan este problema de salud pública a nivel internacional. En CIATEJ, actualmente se trabaja en el desarrollo de uno de estos productos con el fin de ser propuesto como una alternativa para incorporarse potencialmente en el tratamiento de *H. pylori*.

Referencias

- Abreu-Miranda, M.; Lemos, M.; Alves C., K.; Rodenburg, D.; McChesney, J. D.; Radwan, M. M.; Furtado, N. A. J. C.; Kenupp B., J. Gastroprotective Activity of the Hydroethanolic Extract and Isolated Compounds from the Leaves of *Solanum cernuum* Vell. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 172, 421-429.
- Adeniyi, C. B. A.; Lawal, T. O.; Mahady, G. B. *In vitro* Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus torelliana*. *Pharm. Biol.* 2009, 47, 99-102.
- Adeniyi, B. A.; Anyiam, F. M. *In vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Potential of Methanol Extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) Leaf: Susceptibility and Effect on Urease Activity. *Phytother. Res.* 2004, 18, 358-361.
- Annuk, H.; Hirno, S.; Türi, E.; Mikelsaar, M.; Arak, E.; Wadström, T. Effect on Cell Surface Hydrophobicity and Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Medicinal Plant Extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 172, 41-45.
- Bonacorsi, C.; Raddi, M. S. G.; Carlos, I. Z.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Anti-*Helicobacter pylori* Activity and Immunostimulatory Effect of Extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). *BMC Complementary Altern. Med.* 2009, 9.
- Boyanova, L. Comparative Evaluation of the Activity of Plant Infusions against *Helicobacter pylori* Strains by Three Methods. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 30, 1633-1637.
- Brown, J. C.; Huang, G.; Haley-Zitlin, V.; Jiang, X. Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 848-852.
- Buruk, K.; Sokmen, A.; Aydin, F.; Erturk, M. Antimicrobial Activity of some Endemic Plants Growing in the Eastern Black Sea Region, Turkey. *Fitoterapia* 2006, 77, 388-391.

- Castillo-Juárez, I.; González, V.; Jaime-Aguilar, H.; Martínez, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Plants Used in Mexican Traditional Medicine for Gastrointestinal Disorders. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 122, 402-405.
- Cellini, L.; Di Campli, E.; Masulli, M.; Di Bartolomeo, S.; Allocati, N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by Garlic Extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 13, 273-277.
- Chatterjee, A.; Yasmin, T.; Bagchi, D.; Stohs, S. J. Inhibition of *Helicobacter pylori* *in vitro* by Various Berry Extracts, with Enhanced Susceptibility to Clarithromycin. *Mol. Cell. Biochem.* 2004, 265, 19-26.
- Cho, E. J.; Choi, J. M.; Kim, H. M.; Choi, K.; Ku, J.; Park, K.-W.; Kim, J.; Lee, S. Antibacterial Activity and Protective Effect against Gastric Cancer by *Anthriscus sylvestris* Fractions. *Hort. Environ. Biotechnol.* 2013, 54, 326-330.
- Chun, S.-S.; Vattem, D. A.; Lin, Y.-T.; Shetty, K. Phenolic Antioxidants from Clonal Oregano (*Origanum vulgare*) with Antimicrobial Activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 2005, 40, 809-816.
- Claros P., M.; Bilbao R., P.; Damiani M., E.; Gonzalez D., E.; Estensoro C., M.; Alvarez A., M. T. Actividad Anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Calendula officinalis* y *Piper angustifolium* por el Método de Difusión de Disco. *Biofarbo* 2007, 15, 37-42.
- Correa P, Piazuolo MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2014,40: 490-496.
- Cos, P.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V.; Maes, L. Anti-Infective Potential of Natural Products: How to Develop a Stronger *in vitro* 'Proof-of-Concept'. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 106, 290-302.
- Cover, T. L.; Holland, R. L.; Blanke, S. R. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin. In *Helicobacter pylori Research*; Backert, S.; Yamaoka, Y., Eds.; Springer Japan: Tokyo, 2016, pp 113-142.
- Cwikla, C.; Schmidt, K.; Matthias, A.; Bone, K. M.; Lehmann, R.; Tiralongo, E. Investigations into the Antibacterial Activities of Phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phyther. Res.* 2010, 24, 649-656.
- Escobedo-Hinojosa, W.; Romero, I. Panorama Actual del Estudio de las Plantas con

- Actividad Anti-*Helicobacter pylori*. TIP, *Rev. Espec. Cienc. Quim.-Biol.* 2011, 14, 51-61.
- Escobedo-Hinojosa, W. I.; Díaz del Carpio, J.; Palacios-Espinosa, J. F.; Romero, I. Contribution to the Ethnopharmacological and Anti-*Helicobacter pylori* Knowledge of *Cyrtocarpa procera* Kunth (Anacardiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 2012, 143, 363-371.
- Escobedo-Hinojosa, W. I.; Acevedo-Quiróz, M.; Romero-Álvarez, I.; Escobar-Castañeda, P.; Villareal, M. L.; Taketa, A. Anti-*Helicobacter pylori*, Gastroprotective, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Methanolic Extracts of Five Different Populations of *Hippocratea celastroides* Collected in Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 2014, 155, 1156-1163.
- Espinosa, J., Romero, I. 30 Years since the Discovery of *Helicobacter pylori*. Use of Medicinal Plants as Source of Therapies. Butanda Ochoa, A.; Guevara Flores, A.; Guevara Fonseca, J.; Matuz Mares, D.; Lara Lemus, R.; Torres Durán, P. V. Mensaje Bioquímico, Vol. XLI. , Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>). 2014, 85-102.
- Espinosa-Rivero, J.; Rendón-Huerta, E.; Romero, I. Inhibition of *Helicobacter pylori* Growth and its Colonization Factors by *Parthenium hysterophorus* Extracts. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 174, 253-260.
- Fock, K. M.; Subbiah, D.; Ang, T. L.; Teo, E. K.; Lim, K. B.; Lu, S. Effect of Traditional Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. *Gastrointest. Endoscopy* 2010, 71, AB261.
- Fukai, T.; Marumo, A.; Kaitou, K.; Kanda, T.; Terada, S.; Nomura, T. Anti-*Helicobacter pylori* Flavonoids from Licorice Extract. *Life Sci.* 2002, 71, 1449-1263.
- Gadhi, C. A.; Benharref, A.; Jana, M.; Lozniewski, A. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel Extracts. *J. Ethnopharmacol.* 2001, 75, 203-205.
- Garro, M. F.; Ibáñez, A. G. S.; Vega, A. E.; Sosa, A. C. A.; Pelzer, L.; Saad, J. R.; Maria, A. O. Gastroprotective Effects and Antimicrobial Activity of *Lithraea molleoides* and Isolated Compounds Against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 176, 469-474.
- Germanò, M. P.; Sanogo, R.; Guglielmo, M.; De Pasquale, R.; Crisafi, G.; Bisignano, G. Effects of *Pteleopsis suberosa* Extracts on Experimental Gastric Ulcers and *Helicobacter pylori* Growth. *J. Ethnopharmacol.* 1998, 59, 167-172.

- Goel, R. K.; Sairam, K.; Dora Babu, M.; Tavares, I. A.; Raman, A. *In vitro* Evaluation of *Bacopa monniera* on Anti-*Helicobacter pylori* Activity and Accumulation of Prostaglandins. *Phytomedicine* 2003, 10, 523-527.
- González-Cantú, M. G. Aislamiento y Caracterización de Compuestos Derivados de Plantas de la Familia Agavaceae con Efecto Antimicrobiano Sobre *Helicobacter pylori*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, Mayo 2014.
- Goodwin C. S., Armstrong J. A., Chilvers T., Peters M., Collins M. D., Sly L., McConnel W., Harper W. E. S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989;39:397–405.
- Graham, D. Y.; Mohammadi, M. Synopsis of Antibiotic Treatment. In *Helicobacter pylori*; Kim, N., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2016, pp 417-425.
- Hamad, G. M.; Taha, T. H.; El-Deeb, N. M.; Alshehri, A. M. A. Advanced Trends in Controlling *Helicobacter pylori* Infections Using Functional and Therapeutically Supplements in Baby Milk. *J. Food Sci. Technol.* 2015, 52, 8156-8163.
- Hamasaki, N.; Ishii, E.; Tominaga, K.; Tezuka, Y.; Nagaoka, T.; Kadota, S.; Kuroki, T.; Yano, I. Highly Selective Antibacterial Activity of Novel Alkyl Quinolone Alkaloids from a Chinese Herbal Medicine, Gosyuyu (Wu-Chu-Yu), against *Helicobacter pylori* *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 2000, 44, 9-15.
- Henao, S. C.; Martínez, J. D.; Pacheco, N. L.; Marín, J. C. Actividad Bactericida de Extractos Acuósos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. *Rev. Colomb. Gastroenterol.* 2011, 26, 82-87.
- Hsu, Y.-M.; Lai, C.-H.; Su, C.-H.; Kuo, W.-W.; Kuo, C.-L.; Hsu, C.-K.; Wang, C.-K.; Chang, C.-Y.; Chung, J.-G. *Solanum lyratum* Extract Inhibits *Helicobacter pylori*-mediated Apoptosis in Human Gastric Epithelial Cells. *Anticancer Res.* 2010, 30, 1189-1194.
- Huang, H.-L.; Ko, C.-H.; Yan, Y.-Y.; Wang, C.-K. Antiadhesion and Anti-inflammation Effects of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Extracts on AGS Cells during *Helicobacter pylori* Infection. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 2374-2383.
- Ito, H.; Yazawa, S.; Nishiyama, T.; Nonaka, M. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by Several Dietary Plant Agents. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2008, 32, 89-98.
- Jung, J.; Bae, K. H.; Jeong, C.-S. Anti-*Helicobacter pylori* and Antiulcerogenic Activities of

- the Root Cortex of *Paeonia suffruticosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 2013, 36, 1535-1539.
- Kadota, S.; Basnet, P.; Ishii, E.; Tamura, T.; Namba, T. Antibacterial Activity of Trichorabdol A from *Rabdosia trichocarpa* against *Helicobacter pylori*. *Zbl. Bakt.* 1997, 286, 63-67.
- Kim, J. M. *H. pylori* Virulence Factors: Toxins (CagA, VacA, DupA, OipA, IceA). In *Helicobacter pylori*; Kim, N., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2016, pp 77-88.
- Konstantinopoulou, M.; Karioti, A.; Skaltsas, S.; Skaltsa, H. Sesquiterpene Lactones from *Anthemis altissima* and their Anti-*Helicobacter pylori* Activity. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 699-702.
- Kouitcheu M., L. B.; Bille, B. E.; Nguépi, E. *In vitro* and *in vivo* Anti-*Helicobacter* Activities of *Eryngium foetidum* (Apiaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae), and *Galinsoga ciliata* (Asteraceae) Against *Helicobacter pylori*. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 1-7.
- Kushima, H.; Nishijima, C. M.; Rodrigues, C. M.; Rinaldo, D.; Sassá, M. F.; Bauab, T. M.; Di Stasi, L. C.; Carlos, I. Z.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: Gastroprotective, Anti-Inflammatory immunomodulatory and Anti-*Helicobacter pylori* Action. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 123, 430-438.
- Lai, C.-H.; Fang, S.-H.; Rao, Y. K.; Geethangili, M.; Tang, C.-H.; Lin, Y.-J.; Hung, C.-H.; Wang, W.-C.; Tzeng, Y.-M. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced Inflammation in Human Gastric Epithelial AGS Cells by *Phyllanthus urinaria* Extracts. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 118, 522-526.
- Lawal, T. O.; Olorunnipa, T. A.; Adeniyi, B. A. Susceptibility Testing and Bactericidal Activities of *Theobroma cacao* Linn. (Cocoa) on *Helicobacter pylori* in an *in vitro* Study. *J. Herb. Med.* 2014, 4, 201-207.
- Lee, H.-B.; Lee, H.-K.; Kim, J.-R.; Ahn, Y.-J. Anti- *Helicobacter pylori* Diarylheptanoid Identified in the Rhizome of *Alpinia officinarum*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 2009a, 52, 367-370.
- Lee, J.-H.; Lee, D.-U.; Jeong, C.-S. *Gardenia jasminoides* Ellis Ethanol Extract and its Constituents Reduce the Risks of Gastritis and Reverse Gastric Lesions in Rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009b, 47, 1127-1131.
- Lee, H.-K.; Song, H. E.; Lee, H.-B.; Kim, C.-S.; Koketsu, M.; Ngan, L. T. M.; Ahn, Y.-J. Growth Inhibitory, Bactericidal, and Morphostructural Effects of Dehydrocostus Lactone

- from *Magnolia sieboldii* Leaves on Antibiotic-Susceptible and -Resistant Strains of *Helicobacter pylori*. *Plos One* 2014, 9, 1-10.
- Li, Y.; Xu, C.; Zhang, Q.; Liu, J. Y.; Tan, R. X. *In vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Action of 30 Chinese Herbal Medicines Used to Treat Ulcer Diseases. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 98, 329-333.
- Lien, H. M.; Wang, C. Y.; Chang, H. Y.; Huang, C. L.; Peng, M. T.; Sing, Y. T.; Chen, C. C.; Lai, C. H. Bioevaluation of *Anisomeles indica* Extracts and their Inhibitory Effects on *Helicobacter pylori*-mediated Inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 2013, 145, 397-401.
- Mahady, G. B.; Pendland, S. L.; Stoia, A.; Chadwick, L. R. *In vitro* Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Isoquinoline Alkaloids from *Sanguinaria canadensis* and *Hydrastis canadensis*. *Phytother. Res.* 2003a, 17, 217-221.
- Mahady, G. B.; Pendland, S. L.; Yun, G. S.; Lu, Z.-Z.; Stoia, A. Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the Gingerols Inhibit the Growth of Cag A+ Strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer Res.* 2003b, 23, 3699-3702.
- Malekzadeh, F.; Ehsanifar, H.; Shahamat, M.; Levin, M.; Colwell, R. R. Antibacterial Activity of Black Myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2001, 18, 85-88.
- Marcus, E. A.; Scott, D. R. Gastric Colonization by *H. pylori*. In *Helicobacter pylori*; Kim, N., Ed.; Springer Singapore: Singapore, 2016, pp 23-34.
- Marshall, B.J, Warren R.M. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984, 16, 1311-1315.
- Mobley, H. L.; Hu, L. T.; Foxal, P. A. *Helicobacter pylori* Urease: Properties and Role in Pathogenesis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1991, 187, 39-46.
- Moleiro, F. C.; Andreo, M. A.; dos Santos, R. C.; Moraes, T. M.; Rodrigues, C. M.; Carli, C. B. A.; Lopes, F. C. M.; Pellizzon, C. H.; Carlos, I. Z.; Bauab, T. M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. *Mouriri elliptica*: Validation of Gastroprotective, Healing and Anti-*Helicobacter pylori* Effects. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 123, 359-368.
- Moon, H.-I.; Lee, Y.-C.; Lee, J.-H. Phenol Glycosides with *in vitro* Anti- *Helicobacter pylori* Activity from *Hypericum erectum* Thunb. *Phytother. Res.* 2011, 25, 1389-1391.
- Nakano, M.; Hirayama, T.; Moss, J.; Yahiro, K. *Helicobacter pylori* VacA Exhibits Pleiotropic Actions in Host Cell. In *Helicobacter pylori*; Suzuki, H.; Warren, R.; Marshall,

- B., Eds.; Springer Japan: Tokyo, 2016, pp 49-66.
- Narayan, S.; Veeraraghavan, M.; Shyamala Devi, C. S. *Pterocarpus santalinus*: An *in vitro* Study on its Anti-*Helicobacter pylori* Effect. *Phytother. Res.* 2007, 21, 190-193.
- Nariman, F.; Eftekhari, F.; Habibi, Z.; Falsafi, T. Anti-*Helicobacter pylori* Activities of Six Iranian Plants. *Helicobacter* 2004, 9, 146-151.
- Ndip, R. N.; Malange Tarkang, A. E.; Mbulah, S. M.; Luma, H. N.; Malongue, A.; Ndip, L. M.; Nyongbela, K.; Wirmum, C.; Efange, S. M. N. *In vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Extracts of Selected Medicinal Plants from North West Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 114, 452-457.
- Ngan, L. T. M.; Moon, J.-K.; Shibamoto, T.; Ahn, Y.-J. Growth-Inhibiting, Bactericidal, and Urease Inhibitory Effects of *Paeonia lactiflora* Root Constituents and Related Compounds on Antibiotic-Susceptible and -Resistant Strains of *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 9062-9073.
- Njume, C.; Afolayan, A. J.; Clarke, A. M.; Ndip, R. N. Crude Ethanolic Extracts of *Garcinia kola* Seeds Heckel (Guttiferae) Prolong the Lag Phase of *Helicobacter pylori*: Inhibitory and Bactericidal Potential. *J. Med. Food* 2011a, 14, 1-6.
- Njume, C.; Afolayan, A. J.; Green, E.; Ndip, R.N. Volatile Compounds in the Stem Bark of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Possess Antimicrobial Activity against Drug-Resistant Strains of *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011b, 38, 319-324.
- Njume, C.; Afolayan, A. J.; Ndip, R. N. Aqueous and Organic Solvent-Extracts of Selected South African Medicinal Plants Possess Antimicrobial Activity against Drug-Resistant Strains of *Helicobacter pylori*: Inhibitory and Bactericidal Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 2011c, 12, 5652-5665.
- Njume, C.; Afolayan, A. J.; Ndip, R. N. Preliminary Phytochemical Screening and *in vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Acetone and Aqueous Extracts of the Stem Bark of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae). *Arch. Med. Res.* 2011d, 42, 252-257.
- Njume, C.; Afolayan, A. J.; Samie, A.; Ndip, R. N. Inhibitory and Bactericidal Potential of Crude Acetone Extracts of *Combretum molle* (Combretaceae) on Drug-resistant Strains of *Helicobacter pylori*. *J. Health Popul. Nutr.* 2011e, 29, 438-445.
- Nostro, A.; Cellini, L.; Di Bartolomeo, S.; Cannatelli, M. A.; Di Campli, E.; Procopio, F.; Grande, R.; Marzio, L.; Alonzo, V. Effects of Combining Extracts (from Propolis or

- Zingiber officinale*) with Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* 2006, 20,187-190.
- Ochi, T.; Shibata, H.; Higuti, T.; Kodama, K.-H.; Kusumi, T.; Takaishi, Y. Anti-*Helicobacter pylori* Compounds from *Santalum album*. *J. Nat. Prod.* 2005, 68, 819-824.
- O'Connor, H, J. Eradication of *Helicobacter pylori*: therapies and clinical implications. *Postgraduate medical journal*, 1992, vol. 68, no 801, p. 549-557.
- Ohsaki, A.; Takashima, J.; Chiba, N.; Kawamura, M. Microanalysis of a Selective Potent Anti-*Helicobacter pylori* Compound in a Brazilian Medicinal Plant, *Myroxylon peruiferum* and the Activity of Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999, 9, 1109-1112.
- Okeleye, B. I.; Bessong, P. O.; Ndip, R. N. Preliminary Phytochemical Screening and *in vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Extracts of the Stem Bark of *Bridelia micrantha* (Hochst., Baill., Euphorbiaceae). *Molecules* 2011, 16, 6193-6205.
- Ozen, F.; Ekinci, F. Y.; Korachi, M. The Inhibition of *Helicobacter pylori* Infected Cells by *Origanum minutiflorum*. *Ind. Crop Prod.* 2014, 58, 329-334.
- Palacios-Espinosa, J. F.; Arroyo-García, O.; García-Valencia, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. Evidence of the Anti-*Helicobacter pylori*, Gastroprotective and Anti-Inflammatory Activities of *Cuphea aequipetala* Infusion. *J. Ethnopharmacol.* 2014, 151, 990-998.
- Pan-in, P.; Tachapruetinun, A.; Chaichanawongsaroj, N.; Banlunara, W.; Suksamrarn, S.; Wanichwecharungruang, S. Combating *Helicobacter pylori* Infections with Mucoadhesive Nanoparticles Loaded with *Garcinia mangostana* Extract. *Nanomedicine* 2014, 9, 457-468.
- Park, B.-S.; Lee, H.-K.; Lee, S.-E.; Piao, X.-L.; Takeoka, G. R.; Wong, R. Y.; Ahn, Y.-J.; Kim, J.-H. Antibacterial Activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 105, 255-262.
- Périco, L. L.; Heredia-Vieira, S. C.; Beserra, F. P.; dos Santos, R. C.; Weiss, M. B.; Resende, F. A.; dos Santos R., M. A.; Bonifácio, B. V.; Bauab, T. M.; Varanda, E. A., Fratucci G., J. I.; da Rocha, L. R.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. Does the Gastroprotective Action of a Medicinal Plant Ensure Healing Effects? An Integrative Study of the Biological Effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in Rats. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 172, 312-324.

- Pinheiro-Silva, L.; de Angelis, C.; Bonamin, F.; Kushima, H.; Mininel, F. J.; dos Santos, L.; Delella, F. K.; Felisbino, S. L.; Vilegas, W.; da Rocha, L. R.; Ramos, M. A.; Bauab, T. M.; Toma, W.; Hiruma-Lima, C. A. *Terminalia catappa* L.: A Medicinal Plant from the *Caribbean pharmacopeia* with Anti-*Helicobacter pylori* and Antiulcer Action in Experimental Rodent Models. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 159, 285-295.
- Praszquier, J.; Sutton, P.; Ferrero, R. L.; Virulence Mechanisms of *Helicobacter pylori*: An Overview. In *Helicobacter pylori Research*; Backert, S.; Yamaoka, Y., Eds.; Springer Japan: Tokyo, 2016, pp 57-87.
- Ranilla, L.; Apostolidis, E.; Shetty, K. Antimicrobial Activity of an Amazon Medicinal Plant (Chancapiedra) (*Phyllanthus niruri* L.) against *Helicobacter pylori* and Lactic Acid Bacteria. *Phytother. Res.* 2012, 26, 791-799.
- Rao, Y. K.; Lien, H.-M.; Lin, Y.-H.; Hsu, Y.-M.; Yeh, C.-T.; Chen, C.-C.; Lai, C.-H.; Tzeng, Y.-M. Antibacterial Activities of *Anisomeles indica* Constituents and their Inhibition Effect on *Helicobacter pylori*-Induced Inflammation in Human Gastric Epithelial Cells. *Food Chem.* 2012, 132, 780-787.
- Ribeiro, A. R. S.; Diniz, P. B. F.; Estevam, C. S.; Pinheiro, M. S.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; Thomazzi, S. M. Gastroprotective Activity of the Ethanol Extract from the Inner Bark of *Caesalpinia pyramidalis* in Rats. *J. Ethnopharmacol.* 2013, 147, 383-388.
- Robles-Zepeda, R. E.; Velázquez-Contreras, C. A.; Garibay-Escobar, A.; Gálvez-Ruiz, J. C.; Ruiz-Bustos, E. Antimicrobial Activity of Northwestern Mexican Plants Against *Helicobacter pylori*. *J. Med. Food* 2011, 14, 1280-1283.
- Safavi, M.; Shams-Ardakani, M.; Foroumadi, A. Medicinal Plants in the Treatment of *Helicobacter pylori* Infections. *Pharm. Biol.* 2015, 53, 939-960.
- Sakunpay, A.; Panichayupakaranant, P. Antibacterial Activity of Thai Edible Plants against Gastrointestinal Pathogenic Bacteria and Isolation of a New Broad Spectrum Antibacterial Polyisoprenylated Benzophenone, Chamuangone. *Food Chem.* 2012, 130, 826-831.
- Shahani, S.; Monsef-Esfahani, H. R.; Saeidnia, S.; Saniee, P.; Siavoshi, F.; Foroumadi, A.; Samadi, N.; Gohari, A. R. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Methanolic Extract of *Geum iranicum* and its Main Compounds. *Z. Naturforsch.* 2012, 67, 172-180.
- Sharma, A.; Flores-Vallejo, R. C.; Cardoso-Taketa, A.; Villareal, M. L. Antibacterial Activities of Medicinal Plants Used in Mexican Traditional Medicine. *J. Ethnopharmacol.*

2016, doi:/10.1016/j.jep.2016.04.045.

- Shin, S. I.; Masuda, H.; Naohide, K. Bactericidal Activity of Wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 94, 255-261.
- Silva, O.; Viegas, S.; Mello-Sampayo, C.; Costa, M. J. P.; Serrano, R.; Cabrita, J.; Gomes, E. T. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Terminalia macroptera* Root. *Fitoterapia* 2012, 83, 872-876.
- Sivam, G. P.; Lampe, J. W.; Ulness, B.; Swanzy, S. R.; Potter, J. D. *Helicobacter pylori*-in vitro Susceptibility to Garlic (*Allium sativum*) Extract. *Nutr. Cancer* 1997, 27, 118-121.
- Souza, M. C.; Beserra, A. M. S.; Martins, D. C.; Real, V. V.; dos Santos, R. A. N.; Rao, V. S.; da Silva, R. M.; Martins, D. T. O. In vitro and in vivo Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 123, 452-458.
- Stamatis, G.; Kyriazopoulos, P.; Golegou, S.; Basayiannis, A.; Skaltsas, S.; Skaltsa, H. In vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Greek Herbal Medicines. *J. Ethnopharmacol.* 2003, 88, 175-179.
- Stege, P. W.; Davicino, R. C.; Vega, A. E.; Casali, Y. A.; Correa, S.; Micalizzi, B. Antimicrobial Activity of Aqueous Extracts of *Larrea divaricata* Cav (Jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine* 2006, 13, 724-727.
- Stoicov, C.; Saffari, R.; Houghton, J. M. Green Tea Inhibits *Helicobacter* Growth in vivo and in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, 33, 473-478.
- Tabak, M.; Armon, R.; Neeman, I. Cinnamon Extracts' Inhibitory Effect on *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 1999, 67, 269-277.
- Tan, P. V.; Boda, M.; Etoa, F.-X. In vitro and in vivo Anti-*Helicobacter/Campylobacter* Activity of the Aqueous Extract of *Enantia chlorantha*. *Pharm. Biol.* 2010, 48, 349-356.
- Tan, P. V.; Mezui, C.; Boda, M. Anti-*Helicobacter* and Gastroduodenal Cytoprotective Actions of the Leaf Aqueous Extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae). *J. Med. Plants Res.* 2011, 5, 5958-5966.
- Testerman, T. L.; McGee, D. J.; Mobley, H. L. T. Adherence and Colonization. In *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics* [Online]; Mobley, H. L. T.; Mendz, G. L.; Hazell, S. L., Eds.; ASM Press: Washington, DC., 2001, Chapter 34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2437/> (consultado Octubre 24, 2016).
- Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR, et al. A

- comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res.* 2000;31:431-69.
- Vega, A. E.; Wendel, G. H.; Mari, A. O. M.; Pelzer, L. Antimicrobial Activity of *Artemisia douglasiana* and dehydroleucocodine against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 124, 653-655.
- Wang, Y.-C. Medicinal Plant Activity on *Helicobacter pylori* Related Diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014, 20, 10368-10382.
- Wang, Y.-C.; Huang, T.-L. Anti-*Helicobacter pylori* Activity of *Plumbago zeylanica* L. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005a, 43, 407-412.
- Wang, Y.-C.; Huang, T.-L. Screening of Anti-*Helicobacter pylori* Herbs Deriving from Taiwanese Folk Medicinal Plants. *Immunol. Med. Microbiol.* 2005b, 43, 295-300.
- Wu, J.; Hu, D.; Wang, K. X. Study of *Scutellaria baicalensis* and Baicalin against Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori* Strains *in vitro*. *Zhongyaocai* 2007, 31, 707-710.
- Yang, J.-K.; Yeo, H.-D.; Baik, S.-C.; Jung, J.-Y.; Kim, B.-M.; Jeong, M.-J.; Lee, C.-H.; Karigar, C. S.; Park, H.-M.; Choi, M.-S. Antibacterial and Immuno-Modulatory Activity of Ethanol Extracts from *Lespedeza* sp. during *Helicobacter pylori* Infections. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 2010, 15, 1077-1083.
- Zhang, X.-Q.; Gu, H.-M.; Li, X.-Z.; Xu, Z.-N.; Chen, Y.-S.; Li, Y. Anti-*Helicobacter pylori* Compounds from the Ethanol Extracts of *Geranium wilfordii*. *J. Ethnopharmacol.* 2013, 147, 204-207.
- Zhou, Y.; Taylor, B.; Smith, T. J.; Liu, Z.-P.; Clench, M.; Davies, N. W.; Rainsford, K. D. A novel Compound from Celery Seed with a Bactericidal Effect against *Helicobacter pylori*. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009, 61, 1-11.0

15. ENCAPSULACIÓN APLICADA A LA PROTECCIÓN Y VIABILIDAD DE PROBIÓTICOS

Alonso-Villegas Rodrigo

Universidad Autónoma de Baja California

Figueroa-Hernández Claudia

Catedrática CONACYT- ITVER

Fabela-Morón Miriam Fabiola

Catedrática CONACYT-CIATEJ, Unidad Sureste

claudia.figueroa@itver.edu.mx

Introducción

Diversos estudios han demostrado que los probióticos son microorganismos que tienen la capacidad de modular la microbiota intestinal y, por lo tanto, pueden aportar beneficios en la salud cuando se consumen. Una de las definiciones más aceptadas del término probiótico, es la acuñada por la FAO en 2002, en la que define a los probióticos como: “Microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto en la salud del huésped”.¹

En 2015, el mercado global de los probióticos generó ganancias por casi 33.2 billones de dólares, igualmente este mercado presenta un crecimiento anual aproximado entre el 7 y 8%.² Se estima que para 2020, el mercado de probióticos estará valuado en 96 billones de dólares. Esto ha generado la atención del sector alimentario e investigadores hacia la producción de nuevos alimentos funcionales adicionados con microorganismos probióticos.

³ A nivel mundial, se sabe que existen más de 500 alimentos con probióticos y la lista

continúa creciendo.⁴ Los microorganismos probióticos han sido añadidos a diversos productos alimenticios, la gran mayoría son productos lácteos, como quesos, helados, leches fermentadas, yogur y postres con leche.³ Los microorganismos probióticos más utilizados en la elaboración de productos alimenticios comerciales pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.³

Durante el proceso de producción, almacenamiento y distribución, se debe garantizar que los microorganismos probióticos se encuentren viables en el alimento hasta su consumo; lo que representa un gran desafío porque estos microorganismos son muy sensibles a pH ácido, presencia de oxígeno y compuestos antimicrobianos, entre otros factores. Por otro lado, también se ha observado que algunos microorganismos probióticos pueden generar sabores desagradables cuando crecen en la matriz alimentaria, produciendo una baja aceptación del producto.

Para lograr los beneficios atribuidos de los probióticos a los consumidores, se requiere garantizar su viabilidad durante la vida de anaquel del producto y durante su paso a través del tracto gastrointestinal.⁵ Sin embargo, se ha visto que la viabilidad de los probióticos es limitada en una gran cantidad de productos comerciales, además que la sobrevivencia de los probióticos en el tracto gastrointestinal humano es cuestionable.⁶ Por lo tanto, se han propuesto varias tecnologías para aumentar la resistencia de los probióticos en condiciones adversas (durante la producción, almacenamiento y distribución del producto, así como su liberación en el tracto gastrointestinal). Entre las propuestas destacan: a) la selección apropiada de cepas probióticas que sean tolerantes a ácidos y sales biliares, b) el uso de contenedores impermeables al oxígeno, c) las fermentaciones en dos etapas, d) adecuación al estrés de los probióticos, e) la incorporación de micronutrientes como péptidos y aminoácidos y f) la microencapsulación.^{7,8}

Del grupo de métodos para la encapsulación de probióticos, la microencapsulación es una de las opciones más adecuadas para lograr un aumento en la viabilidad de los probióticos en un alimento, además que este proceso brinda estabilidad y no permite el crecimiento del probiótico en la matriz alimentaria.^{5,9} La encapsulación es un mecanismo fisicoquímico

empleado para atrapar un compuesto bioactivo o microorganismo en un material para producir partículas (o cápsulas) con diámetros que varían desde milímetros hasta nanómetros. La encapsulación de los probióticos se utiliza para proteger las células microbianas de las condiciones ambientales adversas que permiten una liberación controlada de los microorganismos probióticos en el intestino.^{3,10-12}

Las técnicas de encapsulación son aplicadas a los probióticos con la intención de proteger a los microorganismos de los efectos perjudiciales del pH, oxígeno, luz, entre otros. Al mismo tiempo, se disminuyen las reacciones de los microorganismos con las condiciones ambientales y enmascara los sabores y olores desagradables que se pueden generar en la matriz alimentaria.^{3,13} Los métodos de encapsulación pueden ser clasificados en dos grupos: métodos físicos o mecánicos y métodos químicos. Los principales métodos físicos utilizados para la encapsulación de probióticos son los siguientes: i) extrusión, ii) emulsión, iii) lecho fluidizado, iv) encapsulación por gelificación con proteína, v) liofilización, vi) aspersión en caliente, vii) aspersión en frío, viii) técnicas combinadas, ix) aerosol incidente y x) electrohilado.¹¹ Los métodos químicos de encapsulación empleados son: i) la coacervación, ii) la encapsulación por liposomas y iii) la inclusión molecular.¹¹

Microencapsulación

La microencapsulación es el confinamiento de pequeñas partículas sólidas, líquidas o gaseosas dentro de un material de recubrimiento o encapsulante, los tamaños de las microcápsulas obtenidas se encuentran en el intervalo de 1-1000 μm .¹⁴ El proceso de encapsulación se utiliza en la industria alimentaria por varias razones entre las cuales se destacan: a) estabilización de la sustancia o microorganismo encapsulado, b) control de las reacciones oxidativas, c) permite una liberación controlada de la sustancia o microorganismo de interés (liberación temporal o liberación controlada por tiempo), enmascara sabores, colores y olores, d) extiende la vida de anaquel y f) evita pérdida de nutrientes.^{7,15} Para realizar el diseño adecuado de un encapsulado de un probiótico o un compuesto bioactivo se requiere conocer: a) las propiedades del compuesto bioactivo y/o microorganismo que será encapsulado, b) las propiedades fisicoquímicas del material encapsulante, c) las posibles interacciones entre el microorganismo, el material encapsulante y la matriz alimentaria, d) la

estabilidad del microorganismo durante el almacenamiento y la incorporación al alimento y e) los mecanismos que controlan la liberación del microorganismo de la cápsula.¹⁵ Las microcápsulas y las microesferas pueden ser modificadas para permitir la liberación controlada de las sustancias bioactivas que se encuentran en su interior. Existen varias formas de liberar los compuestos bioactivos o microorganismos que se encuentran en su interior, por calor, solvatación, difusión y presión. El material de pared (o encapsulante) está diseñado para permitir la liberación de su contenido en áreas específicas del cuerpo. Por ejemplo, un material encapsulante utilizado para la encapsulación de probióticos o compuestos bioactivos debe resistir las condiciones de acidez del estómago para permitir que los agentes activos contenidos dentro de la cápsula pasen del estómago al intestino.^{7,16,17} La inmovilización de células microbianas fue la primera forma de encapsulación de microorganismos y se utilizó por primera vez hace aproximadamente 50 años con fines médicos.¹⁸ Los fundamentos de la microencapsulación se basaron en la metodología empleada para la tecnología de inmovilización de células (ICT, por sus siglas en inglés). La tecnología de inmovilización celular fue empleada a partir de los años 80 para inmovilizar los cultivos iniciadores utilizados para la fermentación de productos lácteos principalmente (yogur, quesos y producción de ácido láctico).¹⁹ En el caso particular de los probióticos, la microencapsulación tiene como objetivo proteger a los microorganismos probióticos durante el procesamiento, almacenamiento y distribución de los productos alimenticios o farmacéuticos de los siguientes factores: a) condiciones en el proceso (temperatura, oxidación, pH, fuerza de cizalla, entre otros); b) deshidratación (cuando se presenta en productos alimenticios en polvo); c) condiciones de almacenamiento (humedad, oxígeno disponible, temperatura); d) degradación en el tracto gastrointestinal (condiciones de pH bajo en el estómago y sales biliares en el intestino delgado).^{20,21}

La microencapsulación de probióticos presenta dos grandes retos: el tamaño de los microorganismos probióticos (que miden entre 1 a 5 μm) y las dificultades de mantener el probiótico viable durante el almacenamiento y el tránsito gastrointestinal.²¹ En la Fig. 1 se muestran los diferentes tipos de materiales de núcleo (compuesto bioactivo y/o microorganismo), pared y vehículos más utilizados para la microencapsulación de probióticos.²²

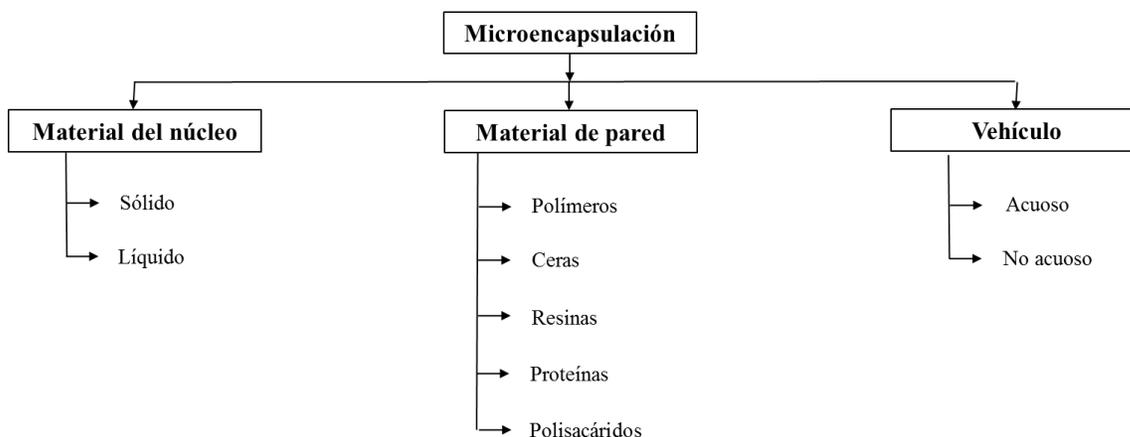


Fig. 1 Materiales de núcleo, pared y vehículos utilizados en la microencapsulación de probióticos.

Métodos de microencapsulación empleados para probióticos

Actualmente, existen una gran variedad de técnicas de microencapsulación. Algunas de ellas se basan en procesos químicos (como la coacervación, la inclusión molecular y la encapsulación con liposomas) y en procesos físicos o mecánicos (extrusión, emulsión, lecho fluidizado, liofilización, etc.). Por lo general, estas técnicas involucran tres principales etapas: a) la formación de la cubierta sobre el compuesto y/o microorganismo que será encapsulado, b) examinación de posibles fugas del compuesto y/o microorganismo de la cápsula y c) revisión de ausencia de materiales contaminantes dentro de la cápsula.¹⁵ En la Tabla 1, se muestran las ventajas y desventajas de los métodos más empleados para la encapsulación de probióticos y en la Tabla 2 se muestran algunos de los métodos más utilizados para la encapsulación de probióticos, etapas del proceso, morfología y tamaño de las cápsulas obtenidas.¹²

Tabla 1. Características, ventajas y desventajas de los métodos de encapsulación.

Métodos	Características	Ventajas	Desventajas
Secado por aspersión	Células encapsuladas individualmente en el medio de secado Carga celular media (10^{10} - 10^{11} UFC g ⁻¹)	Diversas alternativas de uso de materiales de pared Liberación rápida de células si los ingredientes se disuelven fácilmente	Temperaturas altas en el proceso pueden eliminar muchas cepas microbianas
Emulsificación	Homogenización de la fase líquida y gaseosa	Fácil escalamiento, ajuste flexible del tamaño de cápsula	El uso de emulsificantes puede ser perjudicial para la viabilidad
		Sistemas lipídicos basados en la protección de ácidos y oxígeno	Pérdidas en la fase líquida Encapsulante lipídico puede ser inestable en procesos térmicos prolongados
Extrusión	Varios polímeros se mezclan con las células y después se realiza la extrusión Carga celular baja (10^9 - 10^{10} UFC g ⁻¹)	Diversas alternativas de uso de materiales de pared Las partículas pueden ser secadas con aire Fácil y simple preparación del proceso	Difícil escalamiento
Lecho fluidizado	Capa protectora: células en el interior del núcleo de polvo Pared de base lipídica Carga celular alta (> 10^{11} UFC g ⁻¹)	Fácil escalamiento Se pueden adicionar varias membranas para controlar los parámetros de liberación y densidad	Separación de fases en bebidas si el material de pared es lipídico Liberación lenta de células a baja temperatura

Tabla 2. Resumen de métodos comunes de microencapsulación.²¹

Métodos	Etapas del proceso	Morfología	Tamaño de partícula (µm)
Secador por aspersión	1. Dispersar o disolver el ingrediente activo en una solución acuosa 2. Atomizar 3. Deshidratar	Matriz	10-400
Lecho fluidizado	1. Fluidizar el ingrediente activo 2. Secado por aspersión 3. Deshidratar o enfriar	Reserva	5-5,000
Spray-chilling/cooling	1. Dispersar o disolver en caliente el ingrediente activo en una solución lipídica 2. Atomizar 3. Enfriar	Matriz	20-200
Emulsificación	1. Disolver el ingrediente activo y los emulsificantes en la fase acuosa u oleosa 2. Mezclar ambas fases bajo esfuerzo de corte	Matriz	1-100
Preparación de emulsiones con multicapas	1. Preparar emulsiones (w/o) con la parte lipídica activa en la fase oleosa y emulsificantes iónicos 2. Mezclar con la solución acuosa que contiene polielectrolitos con la carga opuesta 3. Remover exceso de polielectrolitos libres (opcional)	Reserva	0,2-5,000
Coacervación	1. Preparar emulsiones (w/o) con la parte lipídica activa en la fase oleosa 2. Mezclar bajo condiciones de flujo turbulento 3. Inducir tres fases inmiscibles 4. Enfriar 5. Entrecruzamiento	Reserva	10-800

Preparación de microesferas vía extrusión o goteo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolver o dispersar el ingrediente activo en la solución de alginato 2. Goteo en el baño gelificante 	Matriz	200-5,000
Preparación de microesferas vía emulsificación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Emulsificar agua con el biopolímero en la fase oleosa 2. Adicionar agente gelificante bajo esfuerzo de corte 	Matriz	10-1,000
Co-extrusión	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolver o dispersar el ingrediente en aceite 2. Preparar la capa protectora acuosa u oleosa 3. Usar una boquilla concéntrica, y presionar simultáneamente la fase oleosa a través de la boquilla interior y la fase acuosa a través de la boquilla exterior <p>Goteo en el gel o baño de enfriamiento</p>	Reserva	150-8,000
Trampa de liposomas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dispersar moléculas lipídicas en agua, con el agente activo en la fase acuosa u oleosa 2. Reducir tamaño por esfuerzo de corte alto o extrusión 3. Remover ingrediente activo libre 	Varios	10-1,000
Enfriamiento o secado al vacío	<ol style="list-style-type: none"> 1. Disolver o dispersar el ingrediente activo y el acarreador en agua 2. Enfriar la muestra 3. Secar a presión baja 4. Pulverizar 	Varios	20-5,000

En la Fig. 2 se muestran los rangos de tamaños de partícula obtenidos con algunos de los métodos más empleados para la encapsulación de probióticos.^{11,23}

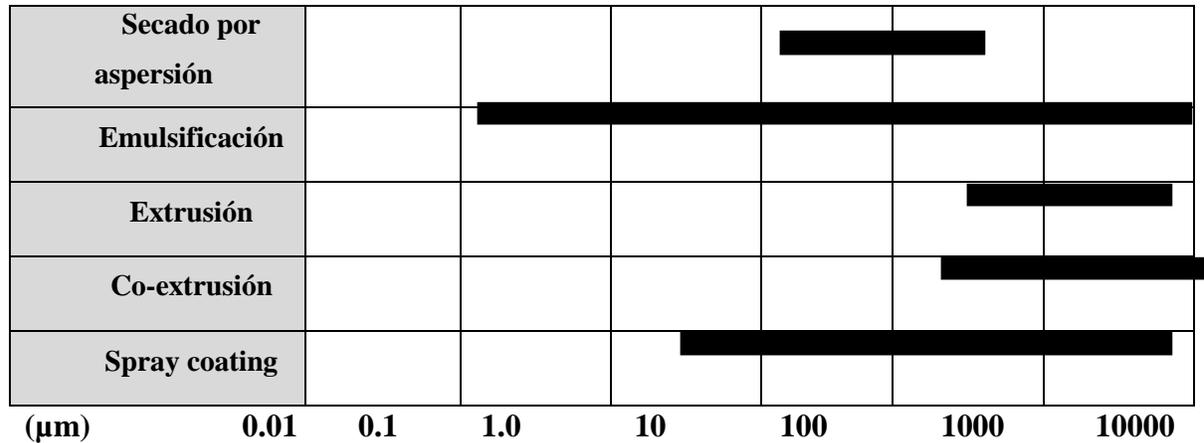


Fig. 2 Rango de tamaño de partícula obtenido con algunos métodos de encapsulación de probióticos.¹¹

Antes de seleccionar algún método de encapsulación, se deben considerar ciertos parámetros: a) condiciones que afectan la viabilidad de los probióticos, b) condiciones de proceso empleadas en cada una de las etapas de la producción del alimento, c) condiciones de almacenamiento del alimento que contendrá el microorganismo probiótico d) tamaño de partícula y densidad para su incorporación en el producto, e) mecanismo de liberación adecuado para el probiótico y f) limitaciones en el presupuesto.¹¹

En este sentido, existen diversos métodos que son aplicados para la protección de probióticos contra factores ambientales y condiciones adversas, lo cual permitirá su liberación en el intestino a las concentraciones requeridas para ejercer su efecto benéfico.¹² A continuación se describen las metodologías más empleadas para la encapsulación de microorganismos probióticos.

Microencapsulado por extrusión

Es la técnica de microencapsulación más empleada para los microorganismos probióticos porque es una técnica sencilla, de bajo costo, no se requiere el empleo de altas temperaturas ni el uso de solventes, además se puede efectuar en condiciones aerobias y anaerobias.^{5,24}

Este método de encapsulación se basa en la solidificación de un polisacárido aniónico cuando entra en contacto con el calcio u otro ion multivalente (Sr^{+2} o Ba^{+2}). Este gel es muy estable en medios ácidos, pero no en medios alcalinos.⁵ La técnica de encapsulado por extrusión implica la preparación de una solución acuosa de un hidrocoloide y la suspensión concentrada de los microorganismos. Posteriormente, la mezcla del hidrocoloide-microorganismo es extruida por una boquilla que forma las gotas que caen sobre una solución endurecedora. Cuando se emplea alginato de sodio, la solidificación se logra al gotear la mezcla de alginato-microorganismo en una solución de cloruro de calcio (CaCl_2).^{19,25} La concentración de alginatos usados para formar el gel varía entre el 0.6 al 2% y la concentración del cloruro de calcio varía entre 0.05-1.5 M.⁵

El tamaño de las microcápsulas depende del tamaño del orificio de la boquilla, distancia entre la salida de la mezcla (hidrocoloide-probiótico) y la solución endurecedora.^{7,19} Los valores de tamaño oscilan entre 0.5 y 3 mm si se compara con otros métodos.^{19,25} Se ha estudiado que mientras más pequeña es la cápsula más fácil es la dispersión en el alimento, igualmente mientras mayor sea el tamaño de la cápsula más perjudicial será el efecto que tendrá sobre la textura del alimento.⁵ De acuerdo con Imai y colaboradores en 1999, la presencia de partículas grandes es indeseable en la mayoría de los alimentos entre los que destacan la leche condensada, el chocolate y el helado.²⁶ No obstante, esta técnica de microencapsulación no produce muchos daños a los microorganismos por lo que conserva la viabilidad de los probióticos, casi en un 100%.^{25,27-29} Por ejemplo, se ha observado que este método logra incrementar la tasa de sobrevivencia de los probióticos en un 95%.²⁵ La desventaja principal de esta metodología de encapsulado para probióticos radica en que es difícil el escalamiento a nivel industrial debido a la lenta formación de las cápsulas.^{12,27,29}

Para esta técnica de microencapsulación, los materiales de pared más utilizados son los siguientes: alginatos, proteínas del suero de la leche, pectinas, leche y colágeno recombinante tipo humano.¹¹

1. *Microencapsulado por emulsión*

Es una de las técnicas más usadas para la encapsulación de microorganismos probióticos.⁶ Esta técnica fue desarrollada a principios de la década de los 80 por Nilsson³⁰ y fue utilizada para inmovilizar células microbianas sensibles.²⁷ Este método de encapsulación puede ser utilizado para producir cápsulas con un diámetro que va de 25 μm a 2 mm. En esta técnica, un volumen pequeño de suspensión polímero-probiótico (fase discontinua) es añadida a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua), este aceite puede ser de soya, de girasol, de canola o de maíz. La mezcla es homogenizada en presencia de un emulsificante con el fin de formar una solución del tipo agua en aceite (w/o).⁵ También se pueden utilizar emulsiones dobles las cuales tienen la ventaja de que las macropartículas pueden ser solubilizadas en soluciones acuosas.⁵

Una vez que la emulsión agua en aceite se forma, la mezcla hidrocoloide-probiótico debe de ser insolubilizada para formar pequeñas cápsulas en la fase oleosa. Cuando se obtienen estas cápsulas, se endurecen con la adición lenta de una solución de CaCl_2 a la emulsión en constante agitación.¹⁹ En algunos casos se puede adicionar un agente entrecruzador para lograr una mejor solidificación de las microcápsulas. Frecuentemente, se utilizan soluciones de Tween[®]80 para mejorar la formación de las microcápsulas; además que disminuye la tensión interfacial del agua en la fase oleosa, con la adición de este emulsificante se pueden obtener cápsulas con un tamaño de 25 a 35 μm .^{27,29} El tamaño de la microcápsula dependerá del flujo de la corriente eléctrica suministrada durante la preparación de la emulsión, la adición de agentes emulsificantes y la relación de las viscosidades de la fase dispersa y la fase continua.^{19,27} Los materiales de pared más utilizados para la encapsulación de probióticos por esta metodología son los siguientes: carragenina, carboximetil-celulosa de sodio, ftalato acetato de celulosa, alginatos y sus combinaciones, quitosano, gelatina y proteína de haba.¹¹

La producción de cápsulas por la técnica de emulsión es un proceso de fácil escalamiento y aporta una tasa alta de sobrevivencia microbiana.^{12,31} Sin embargo, la producción de cápsulas por esta metodología, es más costosa que el proceso de extrusión porque requiere una fase oleosa (aceite) para la formación del encapsulado.^{27,29}

2. *Microencapsulado por lecho fluidizado*

La tecnología de lecho fluidizado es una herramienta muy eficiente para la aplicación de capas uniformes de cualquier material de pared sobre partículas sólidas. El lecho fluidizado es una de las pocas metodologías capaces de recubrir partículas con cualquier tipo de material de pared (polisacáridos, proteínas, emulsificantes, grasas, formulaciones complejas, formulaciones entéricas, recubrimientos en polvo, extractos de levadura, etc.).³²

El lecho fluidizado como método de encapsulación es utilizado también para revestir partículas de polvo en lotes o en forma continua. Las partículas de polvo son suspendidas en una corriente de aire a una temperatura específica y son atomizadas con el material protector (Fig. 3). Esta tecnología está basada en la separación de partículas individuales en una corriente gaseosa y la fijación a capas de materiales de pared por medio de polimerización, secado o cristalización alrededor de un núcleo sólido.

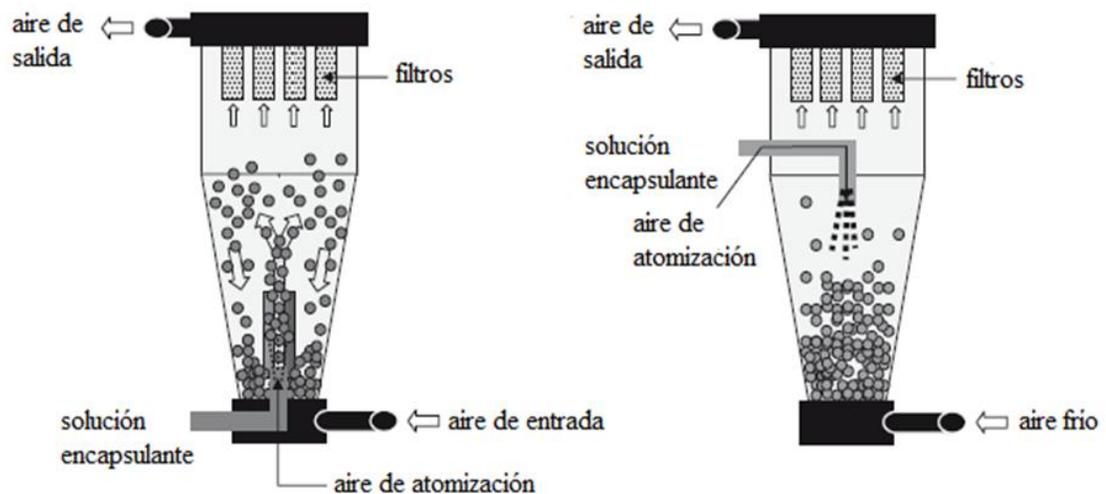


Fig. 3. Microencapsulación por lecho fluidizado.²¹

Una ventaja de este método es que la etapa de solvatación y secado pueden evitarse y por ello, es usado para la encapsulación de materiales termolábiles.^{33,34} La aglomeración y la retención en el sistema de filtros son algunas de las desventajas que presenta el sistema de lecho fluidizado en productos con una alta adhesividad.³³

Para esta técnica se requiere que el probiótico sea encapsulado con un material de soporte como leche descremada, alginato o grasa.¹¹ Además, los probióticos deben estar en forma sólida, esto puede lograrse por medio del secado por aspersión o liofilización.²¹ En esta tecnología, el material de pared (en estado líquido) es asperjado a través de una boquilla sobre el material sólido (probiótico) en un ambiente con temperatura alta. La formación de películas del material de soporte empieza con etapas cíclicas consecutivas de humectación y secado o bien por etapas de solidificación. Esto conlleva a la formación de capas solidas homogéneas sobre la superficie del probiótico. Las pequeñas gotas del líquido asperjado tocan y se extienden sobre toda la superficie de la partícula sólida (probiótico). Se puede utilizar cualquier material comestible que posea una estabilidad alta para ser asperjado a una tasa alta de deposición, que permita la formación de cápsulas con grosores de 100 μm a 10 mm. Existen tres equipos de lecho fluidizado, que difieren en el tipo de fluidización del aire utilizado y el sitio del recipiente en donde el material de recubrimiento será asperjado: a) asperjado ascendente, b) asperjado descendente y c) asperjado tangencial.

Para lograr la encapsulación por este método, el microorganismo probiótico debe estar en forma de partículas finas de polvo, que pueden ser preparadas por métodos tradicionales (fermentación, concentración, liofilización, aspersión, etc.). El material de recubrimiento debe de ser introducido al lecho por medio de aire comprimido. En el caso de la encapsulación de probióticos, los materiales de pared más empleados son de naturaleza lipídica (ceras, ácidos grasos, aceites especiales, etc.); además, se han utilizado algunas proteínas (caseína y gluten) y carbohidratos (derivados de la celulosa, carrageninas y alginatos).^{21,35} La técnica de recubrimiento asperjado es adecuada para las partículas con un diámetro de 50 μm hasta 5mm. La homogeneidad del recubrimiento está influenciada por la pegajosidad del material de cobertura, la humectabilidad de las partículas por el líquido de cobertura y las condiciones de operación. El grosor de la cápsula está determinado por el número de ciclos de recubrimiento.²¹ Las principales ventajas de esta metodología son el control de la temperatura y el bajo costo al ser comparado con otros métodos. La tecnología de lecho fluidizado es de fácil escalamiento, por esta razón es una de las tecnologías de encapsulación de probióticos que tienen un mejor costo-beneficio a nivel comercial. No

obstante, es una metodología compleja y que requiere de mucho tiempo para su ejecución.

11,12

La elección del material de pared debe realizarse cuidadosamente en función del método de encapsulación, generalmente puede ser una solución acuosa de celulosa, almidón, proteína o alguna goma y además, un agente emulsificante. Regularmente, el núcleo de la cápsula es sólido. Este método puede ser aplicado para colocar una segunda capa protectora a los productos secados por aspersión o para productos que poseen núcleos sensibles. Igualmente, es utilizado para crear capas adicionales de moléculas para su liberación específica en el intestino³⁶. En *Bifidobacterium breve* encapsulado con alginato y quitosano por lecho fluidizado, se ha encontrado que el material protector no afecta su habilidad de proteger a la bacteria a pH bajos.³⁷

Albadran y colaboradores (2015) estudiaron la estabilidad de las microcápsulas de quitosano que contenían a la bacteria probiótica *Lactobacillus plantarum*. Las microcápsulas fueron producidas por lecho fluidizado y liofilización. Se probaron los efectos de la actividad de agua de la microcápsula (0.11, 0.23 y 0.70) y la temperatura de almacenamiento (4, 30 y 37 °C). En este estudio se encontró que los probióticos encapsulados por el método de lecho fluidizado presentaban una mayor sobrevivencia que los probióticos encapsulados por liofilización.³⁸

3. *Microencapsulado por gelificación con proteína*

Este tipo de encapsulado se basa en la solidificación de la leche por la acción enzimática de la quimosina, la cual produce cápsulas capaces de proteger ingredientes funcionales y probióticos.³⁹ La quimosina es una enzima proteolítica que hidroliza la kappa-caseína produciendo la agregación de las micelas de caseínas.^{11,19} Esta agregación de la micela de caseína se forma cuando se ha alcanzado cierto nivel de hidrólisis de la kappa-caseína, y es resultado de la disminución de la carga neta y la alta hidrofobicidad del fragmento de la para-kappa-caseína. El gel se forma por la unión de los enlaces no covalentes y las cadenas de las micelas de caseína floculadas (enlaces entrecruzadores). Si este proceso se produce a bajas temperaturas la kappa-caseína es hidrolizada pero no se coagulan las micelas de caseína hasta que se alcanza una temperatura superior a 18 °C y entonces el gel

se forma instantáneamente.^{40,41} Este efecto de la gelificación de la caseína por la baja temperatura puede emplearse para la producción de microcápsulas en combinación con el método de formación de emulsiones. Para el uso de este tipo de material de pared en la encapsulación de probióticos, primero se debe dispersar la solución de probióticos en aceite frío y segundo, esperar que se forme la emulsión agua en aceite. Finalmente, si hay un aumento de la temperatura por encima de 18 °C para formar las cápsulas de forma instantánea; el siguiente paso sería recolectar las cápsulas que contienen el probiótico y separarlas de la fase oleosa.⁴⁰

Heidebach y colaboradores en 2009 propusieron este método para lograr la encapsulación de microorganismos probióticos. Ellos lograron la encapsulación de las bacterias probióticas *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 y *Bifidobacterium lactis* Bbl2 y obtuvieron altas tasas de sobrevivencia con respecto a los probióticos no encapsulados después de la incubación a un pH de 2.5 durante 90 min.⁴⁰ Como se mencionó anteriormente, la quimosina puede ser utilizada para la preparación de microcápsulas a partir de las proteínas de la leche que son insolubles y pueden proteger probióticos sin pérdidas importantes en su viabilidad.³⁹ Se ha visto que la alta viabilidad de las células probióticas encapsuladas por este método puede deberse a la capacidad amortiguadora que tienen las proteínas de la leche lo que permite el equilibrio del pH en el interior de la cápsula. Esto brinda protección a los probióticos durante la simulación del tránsito gástrico (condiciones de pH bajo). Además, las proteínas de la leche facilitan la regulación del tamaño de la cápsula, que es un factor importante en el proceso de encapsulación debido a que las cápsulas con un tamaño mayor a 100 µm pueden causar un impacto sensorial negativo en los alimentos. En conclusión, esta técnica tiene un gran potencial para la formulación de una gran variedad de alimentos funcionales adicionados con probióticos encapsulados.¹¹

4. *Microencapsulado por secado por aspersión*

El secado por aspersión es el método más utilizado por la industria alimentaria para la obtención de encapsulados de compuestos y/o microorganismos con actividad biológica porque es barato, reproducible, rápido, continuo y flexible. Aproximadamente un 90% de los encapsulados comerciales son producidos por este método.^{42,43}

Este proceso consiste en la transformación de los microorganismos probióticos suspendidos en una matriz polimérica líquida a un polvo que contiene las cápsulas del probiótico.²⁴ Esto se consigue, atomizando la suspensión del microorganismo-material, que se encuentra en estado líquido sobre una corriente de aire caliente. Cuando las gotas de la suspensión hacen contacto con el aire caliente se produce una rápida evaporación del solvente formándose una película fina con el material que fue seleccionado como encapsulante. Durante la realización de este proceso se involucran tres etapas: preparación de la dispersión o emulsión, homogenización y atomización.⁴⁴

El tamaño de las microcápsulas obtenidas oscila entre 10 y 400 μm , que depende del flujo de alimentación de la solución del probiótico y de las condiciones de operación utilizadas durante el proceso.²⁴ Los parámetros más importantes a controlar en esta metodología son: temperatura de entrada y salida del aire de secado, flujo de alimentación del producto a encapsular, tiempo de residencia y acondicionamiento de la materia prima.^{45,46} En comparación con otras metodologías, el secado por aspersion aporta una eficiencia de encapsulación relativamente alta. La mayor eficiencia de encapsulación es del 96 al 100%, valores superiores a los obtenidos con otros métodos. Sin embargo, se ha reportado que temperaturas elevadas del flujo de entrada del aire de secado favorecen la ruptura de las membranas de las células y afectan la viabilidad de las mismas, debido a la deshidratación de las células microbianas y la inactivación de proteínas y enzimas esenciales que mantienen el balance osmótico celular. El empleo de agentes termoprotectores antes de realizar el secado aumenta la viabilidad de los probióticos durante el proceso de encapsulación y almacenamiento. Los agentes termoprotectores más utilizados son la trehalosa, almidones modificados, prebióticos y leche descremada.⁴⁶

Los principales materiales encapsulantes utilizados en la microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersion son polímeros solubles en agua, como almidones modificados, proteínas, prebióticos y gomas. De mayor importancia son la goma arábica y algunos almidones modificados porque tienden a formar partículas esféricas durante el proceso de secado.¹²

Recientemente, diversos estudios han demostrado que la proteína del suero de leche es una buena opción para encapsular probióticos mediante el secado por aspersión. En 2012, De Castro y colaboradores evaluaron la viabilidad del probiótico *Bifidobacterium* Bb-12 encapsulado con suero de leche mediante secado por aspersión durante el proceso de simulación del tracto gastrointestinal y su posterior almacenamiento a 4 °C. Los resultados obtenidos mostraron un pequeño descenso en la viabilidad del probiótico encapsulado debido al pH bajo y la exposición con las sales biliares durante el proceso de simulación del tracto gastrointestinal; sin embargo, la viabilidad del probiótico encapsulado se mantuvo por encima de 10⁶ UFC/g y estable durante ocho semanas a la temperatura de almacenamiento de 4 °C.⁴⁷ En otro estudio, realizado por Khem y colaboradores en 2016, se observó que las cápsulas de *Lactobacillus plantarum* A17 y B21 mostraron una alta viabilidad durante ocho semanas de almacenamiento a 20 °C. Las cápsulas fueron obtenidas mediante secado por aspersión utilizando aislados proteicos de suero de leche como material encapsulante.

5. *Microencapsulado por aspersión en frío (Spray chilling/Spray cooling)*

Estos métodos de encapsulación se utilizan en el sector farmacéutico y alimentario. La técnica de ambos métodos, consiste en mezclar el compuesto y/o microorganismo a encapsular con el material de pared y atomizarlo con aire frío. Estos métodos son ampliamente empleados para la encapsulación de compuestos termolábiles. El fundamento de estos métodos es contrario al empleado en el secado por aspersión, debido a que el compuesto bioactivo y/o probiótico se disuelve en lípidos y el material encapsulante es sometido a un proceso de fusión, que se pulveriza a bajas temperaturas mientras que en el secado por aspersión sólo se atomiza el material encapsulante sobre el probiótico y/o compuesto bioactivo. Ambos métodos tienen rendimientos altos y pueden realizarse en *batch* y en modo continuo.³⁶

Los métodos de spray-chilling y spray-cooling son usados para encapsular productos con lípidos como materiales protectores en función de su punto de fusión. La temperatura de fusión en spray chilling se encuentra en el intervalo de 34 a 42 °C y en spray-cooling es más elevada. Los materiales encapsulantes empleados en estas técnicas generalmente tienen bajo punto de fusión, por ejemplo: ceras, ácidos grasos, polímeros solubles e insolubles en agua

y aceites vegetales. Las microcápsulas son producidas por nebulización de la emulsión o suspensión que contiene el material encapsulante y el compuesto bioactivo y/o probiótico, ya sea en forma sólida o líquida. La reducción de la temperatura produce una solidificación del líquido de pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula.^{21,46}

La encapsulación de probióticos por spray chilling, es un método que permite reducir el daño a la célula microbiana, debido a la exposición a altas temperaturas del secado por aspersion. El proceso se realiza con un equipo similar al secado por aspersion, excepto por el uso de aire de convección en vez de aire caliente y una cámara fría.⁴⁸ Pedroso y colaboradores en el 2012 lograron encapsular bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* mediante el método de spray-chilling utilizando como material encapsulante lípidos interesterificados de palma. Las microcápsulas obtenidas en este estudio mostraron tener estabilidad al proceso de simulación de digestión gastrointestinal y almacenamiento por 30 días a 7 ° C.⁴⁸

6. *Microencapsulado por liofilización*

La liofilización es un método rápido y económico. El proceso está basado en la sublimación a alta presión por congelación y secado. Este método se ha utilizado para encapsular compuestos sensibles al calor porque la etapa de encapsulamiento se realiza a una temperatura de congelación mayor que la del solvente.⁴⁹ Se ha observado que la adicción de diferentes materiales de pared antes de realizar el proceso de liofilización puede incrementar la viabilidad de los probióticos encapsulados. Algunos de los materiales de pared más utilizados en esta metodología son proteínas del suero de leche, sólidos totales de leche, caseína, glucosa, maltodextrina y trehalosa.

Este método es más efectivo para encapsular probióticos que el secado por aspersion, ya que no se emplean altas temperaturas. Sin embargo, cuando se trabaja a bajas temperaturas, puede ocasionar daños a las células microbianas; es por ello que se requiere la adicción de agentes crioprotectores en este proceso.^{11, 21, 50} La liofilización presenta algunas desventajas como elevados costos energéticos, tiempos prolongados de proceso, uso de alto vacío y formación de cápsulas porosas. La formación de encapsulados porosos puede brindar una

protección limitada del compuesto bioactivo y/o microorganismo. Con este método se han logrado encapsular *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*.^{37,51}

7. *Combinación de varias técnicas*

En algunos casos para lograr mejorar la viabilidad de los probióticos encapsulados se requiere el uso de varias técnicas de encapsulación. Por ejemplo, se ha reportado la encapsulación de las bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. lactis* mediante extrusión y liofilización, usando glicerol al 10% como agente crioprotector.⁵⁰ Dolly y colaboradores en 2011 realizaron la encapsulación de *L. plantarum* mediante el método de Spray-freeze-drying (SFD) y liofilización, logrando obtener una mayor viabilidad microbiana en comparación con el método de secado por aspersión.⁵²

8. *Microencapsulado por aerosol incidente*

En este método de encapsulación se emplean dos aerosoles, uno de ellos contiene la suspensión de microorganismos en solución de alginato y otro cloruro de calcio. La mezcla de alginato/microorganismo es inyectada en la parte superior del cilindro, mientras que el cloruro de calcio es inyectado en la base. Este método produce una gran cantidad de volumen y las microcapas obtenidas pueden ser asperjadas en frío, liofilizadas o extrudidas adicionalmente.¹¹ Las microcapas de alginato son de un tamaño promedio menor a 40 μm . En esta técnica no se emplea calor ni solventes y es adecuada para encapsular productos lábiles y materiales sensibles a solventes.⁵³ Con este método se ha logrado encapsular a las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* GG, y *L. acidophilus* NCFM., que muestran estabilidad en condiciones ácidas a 25 °C y 4 °C durante 9 y 34 días de almacenamiento, respectivamente. Además, muestran buena viabilidad al adicionarlas en jugo de naranja y frambuesa.¹¹

9. *Microencapsulado por electrohilado*

Este método es de reciente aplicación y su fundamento se basa en la aplicación de campos eléctricos entre el hilador y el colector a través del suministro de alto voltaje, lo que permite solidificar polímeros y fibras con tamaños de partícula desde 10 nm hasta μm . Se obtienen

partículas sin la necesidad de algún tratamiento posterior al proceso, facilitando la incorporación de los componentes bioactivos y/o microorganismos dentro de las fibras como materiales encapsulantes en un solo paso, sin pérdida de los mismos.^{11,54}

Para la elaboración de fibras existen dos modalidades: a) electrohilado co-axial, que involucra el uso de doble aguja para la formación de la coraza protectora y b) electrohilado por emulsión, que favorece la formación de fibras con morfología controlada. Las fibras producidas por este método pueden presentar diversas morfologías de acuerdo al peso molecular del polímero utilizado, la viscosidad de la solución, tensión superficial, densidad de caga neta, el voltaje aplicado para su formación, condiciones de proceso y tipo de solvente usado.⁵⁵ Se han utilizado matrices proteicas (aislados y concentrados de proteína del suero de leche) y matrices elaboradas con carbohidratos (pululanos) para la encapsulación de probióticos mediante la técnica de electrohilado. Además, se ha visto que los encapsulados que presentan mayor viabilidad en comparación con los pululanos son los encapsulados con proteína del suero de leche.⁵⁶

10. *Microencapsulado por coacervación*

La coacervación es un proceso físico que involucra la separación de fases y consiste en tres etapas, todas realizadas bajo agitación constante. La primera etapa incluye la formación de una solución compuesta por tres fases inmiscibles: el centro (compuesto bioactivo y/o microorganismo), el material encapsulante (polímero) y el solvente. Después de la adición del tercer componente o la variación en alguno de los parámetros (temperatura, pH, fuerza iónica) se forman dos fases. Una de las fases está compuesta principalmente por el polímero (coacervado) mientras que la otra está compuesta principalmente por el solvente. La segunda etapa incluye la deposición del polímero sobre el microorganismo. Finalmente, en la tercera etapa, la capa del material encapsulante se solidifica mediante evaporación. Este método de encapsulación es un proceso eficiente; sin embargo, es costoso y su aplicación es limitada.²⁴ Los materiales encapsulantes más empleados en esta técnica son gelatina, goma acacia y oligosacáridos.⁵⁷ Los parámetros que se monitorean en los coacervados son: estructura dinámica, capacidad de respuesta a cambios ambientales de pH, fuerza iónica y temperatura, re-arreglos estructurales y modificaciones durante el almacenamiento.⁵⁸ Cuando se encapsuló el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 mediante coacervación

empleando pectina y proteína de suero como materiales encapsulantes presentó mayor viabilidad durante la simulación de la digestión gastrointestinal con respecto a la bacteria sin encapsular. Adicionalmente, se observó que la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* mediante coacervación empleando alginato de calcio y proteína del suero de leche como material de pared mejoró la viabilidad durante el proceso de simulación de la digestión en comparación con la bacteria sin encapsular.^{59,60}

Materiales encapsulantes más empleados en la microencapsulación de probióticos

Uno de los aspectos más importantes a considerar cuando se pretende encapsular probióticos es la selección adecuada del material de pared, considerando su naturaleza química.⁹ Se ha visto que las técnicas de microencapsulación pueden incrementar la sobrevivencia de los probióticos que se encuentran presentes en algunos alimentos durante su paso por el tracto gastrointestinal.^{9,63} A pesar de esto, los materiales de pared o encapsulantes presentan distintos comportamientos y, por lo tanto, su capacidad de proteger a los probióticos y/o liberación de sustancias bioactivas es variable.^{9,64} Asimismo, la eficiencia del material encapsulante no sólo depende de su capacidad de formación de cápsulas, de la fuerza y el aumento en la viabilidad del probiótico encapsulado, sino también intervienen otros factores como el costo, la biodisponibilidad y la biocompatibilidad.⁹ Para la encapsulación de microorganismos probióticos se han utilizado muchos materiales encapsulantes entre los que destacan polisacáridos (almidón modificado, carboximetilcelulosa, alginatos, pectinas, carregeninas y quitosano), proteínas (proteínas de la leche, soya, gelatina) y lípidos (ceras, aceites).⁹

Los materiales encapsulantes más utilizados para la microencapsulación de *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* son los siguientes: polisacáridos iónicos (principalmente alginato y quitosano), exo-polisacáridos de origen microbiano (goma xantana y gelana), proteínas de la leche (caseínas y proteínas del suero de la leche). Mientras que para la encapsulación de *Bacillus sp.* se han utilizado como material de pared diferentes emulsiones lipídicas.⁹ La selección adecuada del material de pared es específica para cada cepa y depende de varios factores como las propiedades fisicoquímicas de los materiales empleados

y de las interacciones moleculares existentes entre los materiales encapsulantes, los probióticos y el tejido epitelial del tracto gastrointestinal del huésped.^{9,65} Actualmente, se busca que los materiales de pared aporten protección al probiótico durante el tránsito gastrointestinal y que tengan otras propiedades bioquímicas deseables como, por ejemplo, mucoadhesividad (característico en los polímeros hidrofílicos como el alginato y quitosano), porque esta propiedad es útil para mejorar la liberación *in situ* de los probióticos a lo largo del tracto gastrointestinal.^{9,66} Los polímeros hidrofílicos poseen grupos cargados y/o no iónicos que pueden formar puentes de hidrógeno con la superficie de la mucosa gastrointestinal.^{9,67,68} A continuación, se describirán algunos de los materiales de pared más empleados en la encapsulación de probióticos.

1. *Alginato*

El alginato es un heteropolisacárido lineal que se extrae de varias especies de algas y está compuesto por los ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico. La composición de la cadena polimérica varía con respecto a la cantidad y la distribución secuencial de acuerdo a la fuente de alginato. Esto influye en las propiedades funcionales del alginato como material de pared. Los hidrogeles de alginato son muy usados en la microencapsulación de probióticos,^{12,27,69} siendo el alginato de calcio uno de los más empleados para encapsular probióticos debido a su simplicidad, biocompatibilidad, no toxicidad y bajo costo.^{12,25,27} Las desventajas que tiene el alginato como material encapsulante es que las cápsulas de alginato son sensibles cuando se utilizan a un pH ácido; por lo tanto, no son muy resistentes bajo condiciones estomacales, lo cual limita su uso. Otra desventaja, es que el escalamiento del proceso es difícil porque las cápsulas que se obtienen son muy porosas y es un inconveniente cuando se quiere proteger a los probióticos de condiciones ambientales adversas^{12,32}. Sin embargo, estas desventajas pueden ser compensadas con estas opciones: a) mezclar el alginato con otros compuestos poliméricos, b) recubrir las cápsulas con otro material de pared y c) aplicar modificaciones estructurales al alginato por medio del uso de diferentes aditivos.^{12,25}

2. *Exopolisacáridos microbianos (goma xantana y gelana)*

La goma gelana es un exopolisacárido microbiano producido por la bacteria *Pseudomonas elodea*. Este polisacárido está constituido por unidades repetidas de cuatro monómeros, con

la siguiente distribución: glucosa, ácido glucurónico, glucosa y ramnosa.¹² La goma xantana es un exopolisacárido microbiano producido por la bacteria *Xanthomonas campestris*. Esta goma es un heteropolisacárido conformado por unidas repetidas de pentasacáridos, que a su vez están conformadas por dos glucosas, dos manosas y un ácido glucurónico, con la siguiente proporción molar 2.8:2.0:2.0.⁷⁰ Se han utilizado mezclas de estas gomas para la encapsulación de probióticos. Se ha observado que estas mezclas presentan buena resistencia en ambientes ácidos.^{10,12}

3. Carrageninas

La kappa-carragenina es un polímero natural que es empleado en la industria alimentaria. Se requieren temperaturas elevadas (60–80 °C) para disolver el polímero en concentraciones que van del 2 al 5 % del polímero. La gelificación de la kappa-carragenina depende de la temperatura.⁷ Para la adición del probiótico se requiere que la temperatura de este polímero se encuentre entre los 40 y 50 °C. La solidificación de la mezcla polímero-probiótico se consigue cuando se enfría la mezcla a temperatura ambiente. Estas micropartículas son estabilizadas por la adición de iones de potasio.^{12,25} La encapsulación de probióticos con perlas de carragenina mantiene la viabilidad microbiana pero los geles producidos son frágiles y no tienen resistencia ante condiciones de estrés.¹²

4. Ftalato acetato de celulosa

El ftalato acetato de celulosa es utilizado para controlar la liberación de fármacos en el intestino porque que es un compuesto inocuo.²⁹ La ventaja de este compuesto es que no es soluble en condiciones ácidas (pH menor a 5), pero es soluble a un pH mayor a 6. La encapsulación de bacterias probióticas utilizando este compuesto permite una mayor protección para los microorganismos en condiciones que simulan el tránsito gastrointestinal.^{12,71} Se han encapsulado bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus acidophilus* utilizando el ftalato acetato de celulosa como material encapsulante y el secado por aspersión como método de encapsulación. Las microcápsulas obtenidas en este estudio lograron proteger a los probióticos durante la simulación de su paso por el estómago y mostraron una liberación rápida del microorganismo en condiciones que simulaban al intestino.⁷¹

5. *Quitosano*

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de unidades de glucosamina, que pueden polimerizarse mediante entrecruzamientos cuando se encuentran presentes aniones y polianiones en solución. El quitosano puede obtenerse de las conchas de crustáceos, cutículas de insectos y en las membranas de los hongos. Las propiedades del quitosano dependen de la fuente extracción.⁷ El quitosano no ha mostrado tener buena eficiencia en el aumento de la viabilidad de microorganismos probióticos cuando se utiliza como material encapsulante, por lo que se prefiere utilizar este material como recubrimiento adicional y no como material de pared.²⁹ Se ha visto que el quitosano puede inhibir el crecimiento de algunas bacterias ácido lácticas¹² y tiene una baja solubilidad cuando se encuentra en ambientes con pH mayor de 5.4, lo que limita su uso como material encapsulante. Sin embargo, el quitosano presenta varias ventajas como biocompatibilidad, biodegradabilidad y no es tóxico²⁷. Se ha reportado que *Lactobacillus bulgaricus* KFRI encapsulado con alginato-quitosano presentó una mayor sobrevivencia bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal y una mayor estabilidad durante el almacenamiento a 4 y 22 °C cuando fue comparado con el microorganismo sin encapsular.⁷²

6. *Almidón modificado*

El almidón es un polisacárido conformado por una cadena larga de moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos. El almidón está compuesto principalmente por amilosa, un polímero lineal de D-glucopiranosas unidas por un enlace glucosídico (α -1,4) y por amilopectina que es un polímero ramificado de glucosas unidas por enlaces glicosídicos (α -1,4 y α -1,6). El almidón modificado es el polímero que se emplea usualmente como material encapsulante porque este tipo de almidón no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado, lo que permite llegar intacto al colon en donde puede ser fermentado.^{12,73} Esta propiedad de resistencia es fundamental para la liberación entérica y por lo tanto, una mejor liberación de las células probióticas en el intestino grueso. Igualmente, posee características prebióticas por lo que puede ser utilizado por los probióticos para aumentar su población en el intestino grueso.^{12,29} De igual manera, se ha observado que el almidón modificado es la superficie ideal para adherir células probióticas

y esto puede aumentar la tasa de liberación probiótica en el intestino.¹² Esta propiedad de adhesión bacteriana proviene de los gránulos de almidón de diversos alimentos como la tapioca, la papa, la avena y el trigo.^{74,75}

7. *Gelatina*

La gelatina es un polímero de alto peso molecular que se encuentra en los tejidos conectivos de los animales (huesos y piel).⁷⁶ Es una goma de origen proteico, tiene la propiedad de formar un gel termoreversible y puede ser utilizado para la encapsulación de probióticos. Por sus características anfóteras es un excelente candidato para encapsular células probióticas ya sea sólo o mezclado con otro compuesto. Generalmente, se utiliza en sinergia con un polisacárido aniónico como las gomas gelanas. Esta combinación es miscible a valores de pH mayor a 6, porque ambos tienen cargas negativas y se repelen mutuamente. Sin embargo, la carga neta de la gelatina se vuelve positiva cuando se ajusta el pH a un valor por debajo del punto isoeléctrico y esto causa una fuerte interacción con la goma gelana, que está cargada negativamente.^{7,12,25}

8. *Proteínas de la leche*

Las proteínas de la leche son los vehículos naturales de las células probióticas por sus características fisicoquímicas y estructurales. Las proteínas de la leche (caseínas y proteínas del suero de la leche) pueden ser utilizadas como sistemas de liberación de microorganismos probióticos.^{12,77} Las proteínas de la leche presentan excelentes propiedades gelificantes, esto ha sido utilizado por Heidebach y colaboradores en 2009 para diseñar una metodología con el objetivo de encapsular células probióticas. Esta nueva metodología de encapsulación es prometedora e interesante debido a la biocompatibilidad de las proteínas de la leche.^{12,40}

Conclusión

Actualmente, los microorganismos probióticos son incorporados a una gran cantidad de productos alimenticios, debido a que estos microorganismos pueden desempeñar diversas actividades fisiológicas en el organismo, las cuales tienen un impacto positivo en la salud de los consumidores. Sin embargo, para que puedan ejercer sus efectos benéficos, se debe garantizar la viabilidad de los probióticos durante la vida de anaquel del alimento y durante

el tránsito gastrointestinal. Una de las alternativas más viables para lograr mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos es la microencapsulación. La microencapsulación es una metodología que permite retener pequeñas partículas sólidas, líquidas o gaseosas dentro de un material de recubrimiento o encapsulante. Hoy en día, existen numerosas técnicas para la encapsulación de microorganismos probióticos. Sin embargo, las técnicas más empleadas para la encapsular probióticos son la encapsulación por extrusión y emulsión. No obstante, se requieren más investigaciones para poder estudiar a las variables involucradas en el proceso de encapsulación y así poder optimizar el proceso, logrando conservar la viabilidad de los probióticos durante un tiempo mayor.

Referencias

- (1) Fao, J., Working, W. H. O., Report, G., Guidelines, D., London, F., and FAO WHO working group. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm> 1–11.
- (2) Markets and Markets. (2015) Probiotic Ingredients Market by Function, Application, Region - 2020 Markets and Markets. *July 2015*.
- (3) Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., and Otoni, C. G. (2016) Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Res. Int.* 90, 42–52.
- (4) Tripathi, M. K., and Giri, S. K. (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9, 225–241.
- (5) Favaro-Trindade, C. S., Heinemann, R. J. B., and Pedroso, D. L. (2011) Developments in probiotic encapsulation. *CAB Rev. Perspect. Agric. Veterinary Sci. Nutr. Nat. Resour.* 6, 1–8.
- (6) Kailasapathy, K. (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 3, 39–48.
- (7) Anal, A. K., and Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 240–251.
- (8) Gismondo, M. ., Drago, L., and Lombardi, A. (1999) Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrob. Agents* 12, 287–292.

- (9) Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A., and Wall-Medrano, A. (2013) Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 614–628.
- (10) Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., and Kailasapathy, K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 47–55.
- (11) Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., and Morales, M. E. (2015) Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 15–25.
- (12) Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., and Scher, J. (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* 104, 467–483.
- (13) Vieira da Silva, B., Barreira, J. C. M., and Oliveira, M. B. P. P. (2016) Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends Food Sci. Technol.* 50, 144–158.
- (14) Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., and Coppola, R. (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 182–6.
- (15) Irvani, S., Korbekandi, H., and Mirmohammadi, S. V. (2015) Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J. Food Sci. Technol.* 52, 4679–4696.
- (16) Anal, A. K., and Stevens, W. F. (2005) Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* 290, 45–54.
- (17) Anal, A. K., Bhopatkar, D., Tokura, S., Tamura, H., and Stevens, W. F. (2003) Chitosan-Alginate Multilayer Beads for Gastric Passage and Controlled Intestinal Release of Protein. *Drug Dev. Ind. Pharm.*
- (18) Chang, T. M. S. (1964) Semipermeable Microcapsules. *Science.* 146, 524–525.
- (19) Heidebach, T., Först, P., and Kulozik, U. (2012) Microencapsulation of probiotic cells

for food applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 291–311.

(20) Chávarri, M., Marañón, I., and Villarán, M. C. (2012) Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics* 501–540.

(21) Zuidam, N. J., and Nedovic, V. (Eds.). (2010) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer New York, New York, NY.

(22) Prakash, K. S., and Chavan, R. (2016) Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology 33–44.

(23) Dong, Q.-Y., Chen, M.-Y., Xin, Y., Qin, X.-Y., Cheng, Z., Shi, L.-E., and Tang, Z.-X. (2013) Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48, 1339–1351.

(24) Tolve, R., Galgano, F., Caruso, M. C., Tchuenbou-Magaia, F. L., Condelli, N., Favati, F., and Zhang, Z. (2016) Encapsulation of health-promoting ingredients: applications in foodstuffs. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 888–918.

(25) Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* 13, 3–13.

(26) Imai, E., Saito, K., Hatakeyama, M., Hatae, K., and Shimada, A. (1999) Effect of physical properties of food particles on the degree of graininess perceived in the mouth. *J. Texture Stud.*

(27) Feucht, A., and Kwak, H.-S. (2013) Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 33, 229–238.

(28) Gbassi, G. K., and Vandamme, T. (2012) Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics* 4, 149–63.

(29) Mortazavian, A., Razavi, S., Ehsani, M., and Sohrabvandi, S. (2007) Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran. J. Biotechnol* 5, 1–18.

(30) Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder, U., Jeppsson, U., Larsson, P.-O., Mosbach, K., and Brodelius, P. (1983) A general method for the immobilization of cells with preserved viability. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 319–326.

- (31) Lakkis, J. M. (Ed.). (2007) Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- (32) Gouin, S. (2004) Microencapsulation. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 330–347.
- (33) Guignon, B., Duquenoy, A., and Dumoulin, E. D. (2002) Fluid bed encapsulation of particles: principles and practice. *Dry. Technol.* 20, 419–447.
- (34) Charalampopoulos, D., and Rastall, R. A. (Eds.). (2009) Prebiotics and Probiotics Science and Technology. Springer New York, New York, NY.
- (35) Champagne, C. P., and Fustier, P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 184–90.
- (36) de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., and Sikkema, J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* 20, 292–302.
- (37) Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., and Khutoryanskiy, V. V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control. Release* 162, 56–67.
- (38) Albadran, H. a., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V. V., and Charalampopoulos, D. (2015) Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Res. Int.* 74, 208–216.
- (39) Vidhyalakshmi, R., Bhakyaraj, R., and Subhasree, R. (2009) Encapsulation “The future of probiotics”-A review. *Adv Biol Res.*
- (40) Heidebach, T., Först, P., and Kulozik, U. (2009) Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll.* 23, 1670–1677.
- (41) Bansal, N., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (2007) Aggregation of rennet-altered casein micelles at low temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3120–6.
- (42) Ray, S., Raychaudhuri, U., and Chakraborty, R. (2016) An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci.* 13, 76–83.
- (43) Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., Desobry, S.,

Scher, J., and Gaiani, C. (2017) Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *J. Food Eng.* 193, 10–19.

(44) Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., and Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107–1121.

(45) Vega, C., and Roos, Y. H. (2006) Invited review: spray-dried dairy and dairy-like emulsions--compositional considerations. *J. Dairy Sci.* 89, 383–401.

(46) Menezes, C. R. de, Barin, J. S., Chicoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Fries, L. L. M., and Terra, N. N. Microencapsulation of probiotics: progress and prospects. *Ciênc. Rural* 43, 1309–1316.

(47) De Castro-Cislaghi, F. P., Silva, C. D. R. E., Fritzen-Freire, C. B., Lorenz, J. G., and Sant'Anna, E. S. (2012) Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *J. Food Eng.* 113, 186–193.

(48) Pedroso, D. de L., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., and Favaro-Trindade, C. S. (2012) Protection of Bifidobacterium lactis and Lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray-chilling. *Int. Dairy J.* 26, 127–132.

(49) Bilensoy, E., and Hincal, A. A. (2009) Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.*

(50) Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., and Heng, P. W. S. (2013) Microencapsulation of microbial cells. *J. Food Eng.* 116, 369–381.

(51) Dianawati, D., Mishra, V., and Shah, N. P. (2013) Survival of Bifidobacterium longum 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Res. Int.* 51, 503–509.

(52) Dolly, P., Anishaparvin, A., Joseph, G. S., and Anandharamakrishnan, C. (2011) Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *J. Microencapsul.*

(53) Sohail, A., Turner, M. S., Prabawati, E. K., Coombes, A. G. A., and Bhandari, B. (2012)

Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 162–6.

(54) Camerlo, A., Vebert-Nardin, C., Rossi, R. M., and Popa, A.-M. (2013) Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *Eur. Polym. J.* 49, 3806–3813.

(55) Lavielle, N., Popa, A.-M., de Geus, M., Hébraud, A., Schlatter, G., Thöny-Meyer, L., and Rossi, R. M. (2013) Controlled formation of poly(ϵ -caprolactone) ultrathin electrospun nanofibers in a hydrolytic degradation-assisted process. *Eur. Polym. J.* 49, 1331–1336.

(56) López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., and Lagaron, J. M. (2012) Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocoll.* 28, 159–167.

(57) Bosnea, L. A., Moschakis, T., and Biliaderis, C. G. (2014) Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses. *Food Bioprocess Technol.* 7, 2767–2781.

(58) Moschakis, T., Murray, B. S., and Biliaderis, C. G. (2010) Modifications in stability and structure of whey protein-coated o/w emulsions by interacting chitosan and gum arabic mixed dispersions. *Food Hydrocoll.* 24, 8–17.

(59) Gerez, C. L., Font de Valdez, G., Gigante, M. L., and Grosso, C. R. F. (2012) Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 552–6.

(60) Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., and Marchioni, E. (2009) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 103–5.

(62) Yáñez, J., Salazar, J., Chaires, L., and Jiménez, J. (2002) Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Av. y Perspect.*

(63) Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., and Jones, M. (2004) An improved

method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Methods* 56, 27–35.

(64) Riaz, Q. U. A., and Masud, T. (2013) Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 231–44.

(65) Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., and Cantor, A. (2011) The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 981214.

(66) Gombotz, W. R., and Wee, S. F. (2012) Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 194–205.

(67) Dhawan, S., Singla, A. K., and Sinha, V. R. (2004) Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech* 5, e67.

(68) Khutoryanskiy, V. V. (2011) Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* 11, 748–64.

(69) Rowley, J. A., Madlambayan, G., and Mooney, D. J. (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20, 45–53.

(70) García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., and Gómez, E. (2000) Xanthan gum: Production, recovery, and properties. *Biotechnol. Adv.* 18, 549–579.

(71) Fávaro-Trindade, C. S., and Grosso, C. R. F. (2008) Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J. Microencapsul.*

(72) Lee, J. S., Cha, D. S., and Park, H. J. (2004) Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7300–5.

(73) Sajilata, M. G., Singhal, R. S., and Kulkarni, P. R. (2006) Resistant Starch? A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5, 1–17.

(74) Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Forssell, P., and Myllärinen, P. (2007)

Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 500–5.

(75) Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Mättö, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., and Myllärinen, P. (2001) Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3469–75.

(76) Meiners, J. (2009) Micro-Encapsulation of Probiotics. *Prebiotics Probiotics Sci. Technol.* 18.

(77) Livney, Y. D. (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15, 73–83.

