

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE
Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I



ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara

PAP4G03 PAP Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
“Efecto prebiótico de los nanoliposomas con fructanos de *agave tequilana*
en lactobacilos.” Desarrollado en el Centro de Investigación y Asistencia en
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco.

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

[Ing. En Nanotecnología: Magali Edith García Novoa]

Profesor PAP: Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona, M.I.M. Fermín Castro Aragón

Tlaquepaque, Jalisco, mayo 2019

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP.....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	2
1. Introducción.....	3
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Justificación	4
1.3 Antecedentes.....	5
1.4. Contexto	6
2. Desarrollo.....	8
2.1. Sustento teórico y metodológico	8
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	12
3. Resultados del trabajo profesional.....	40
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	42
5. Conclusiones	46
6. Bibliografía	47
Anexos (en caso de ser necesarios)	49

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

Como objetivo inicial era encontrar lactobacilos que pudieran ser aislados de un producto comercial e identificar su especie genéticamente, para después utilizar esta cepa y probar durante el crecimiento de los lactobacilos, el efecto prebiótico de los fructanos libres y encapsulados a través de las curvas de crecimiento bacteriano y curvas de liberación de contenido fluorescente de los liposomas. Se encontró que los lactobacilos de fuentes comerciales como: Yakult y JustBiotics no presentaron crecimiento alguno bajo ninguna condición de caldo nutritivo, mientras que los lactobacilos contenidos en un suplemento alimenticio liofilizado de marca genérica, así como la cepa pura de *L. Plantarum* de Raff Lactoiingredientes, si tuvieron crecimiento adecuado, pero la viabilidad de la cepa pura *L. Plantarum* no fue adecuada, por eso se probó otra fuente comercial: Florify, que si presentó crecimiento pero quedó pendiente la clasificación genética. Las cepas de lactobacilos idóneos que crecieron favorablemente, se identificaron genéticamente como *L. Plantarum*.

Se caracterizó por dispersión de luz dinámica el tamaño de partícula de los liposomas y su estabilidad a través de los valores de potencial Z, y por espectrofluorometría se evaluó el tiempo de desestabilización de los liposomas, a través de la liberación de una concentración de fluoróforo del interior de los liposomas. Sin embargo, estos resultados solo pudieron ser estimados en base a dos trabajos que emplearon el mismo método de fabricación y caracterización de liposomas, debido a que para este proyecto no se pudo realizar, por consecuencia de la contingencia sanitaria provocada por el virus COVID-19.

1. Introducción

1.1. Objetivos

El objetivo del proyecto es identificar el efecto prebiótico de los fructanos de *agave tequilana* sobre los lactobacilos y evaluar la capacidad de los lactobacilos de la desestabilización de una vesícula liposomal. En el entendimiento que los lactobacilos son bacterias de forma alargada que forman parte de la microbiota intestinal, estos microorganismos son llamados así porque convierten la lactosa y otros azúcares en ácido láctico, estos lactobacilos son comúnmente llamados prebióticos. Así mismo se conoce que los fructanos son polímeros de fructuosa que se emplean algunas veces como prebióticos, es decir, fungen como alimento de los lactobacilos.

El primer paso para lograr el objetivo general es obtener lactobacilos de suplementos alimenticios para después identificarlos, a través de tinción gram y de la secuenciación de su ADN extraído usando fenol cloroformo y alcohol isomálico. El siguiente paso es encapsular los fructanos en liposomas -vesículas esféricas de una o más bicapas de fosfolípidos- por el método de hidratación y sonicación con punta. Además de los fructanos, se encapsula un fluoróforo (calceína) con el fin de evaluar la eficiencia de encapsulamiento por medio de espectrofotometría de UV visible con el NanoDrop 2000. Después, se deben caracterizar los liposomas con fructanos, para esto se emplea difracción de luz láser (DLS) y potencial Z.

Lo siguiente es evaluar tres curvas de crecimiento de lactobacilos. Las curvas a comparar son las siguientes: lactobacilos por sí solos, lactobacilos con liposomas no cargados y lactobacilos con liposomas cargados de fructanos. Finalmente, se debe evaluar la liberación de los fructanos o desestabilización de los liposomas observando el espectro de excitación y emisión de la calceína obtenido de la espectroscopia de fluorescencia.

El proyecto de aplicación profesional tiene como propósito, (además de que los estudiantes apliquen sus conocimientos en una institución y amplíen la visión de los alcances de su carrera) contribuir a la solución de un problema social. El apoyo a los centros de investigación es una forma de impulsar el avance y la innovación tecnológica y, si bien, los avances que los estudiantes logran en un semestre aparentan ser pequeños, todos unidos pueden resultar en una invención o descubrimiento que contribuya a la mejora económica y social del país.

1.2. Justificación

Los lactobacilos son probióticos que se encuentran a la biota del intestino y son microorganismos benéficos que ayudan durante el proceso de digestión y absorción de los nutrientes. Por otro lado, actualmente se está poniendo en duda si algunos alimentos comerciales realmente tienen los efectos probióticos que prometen, por lo que este trabajo pretende verificar que algunos productos como Yakult y JustBiotics puedan tener lactobacilos cultivables y que los probióticos tengan la capacidad de desestabilizar un vehículo de entrega de fármacos por la presencia de un prebiótico y si esa molécula prebiótica si favorece el crecimiento de ese tipo de bacteria.

Entre las características beneficiosas de los lactobacilos para el cuerpo, también está la prevención de infecciones gastrointestinales y estimulación de la respuesta inmune (1). Estas bacterias usadas como probióticos en niños, se ha comprobado que reducen el riesgo de contraer el frecuente rotavirus. En adultos, disminuye la inflamación intestinal por el síndrome del intestino irritable y la enfermedad de Crohn (2) (3), aunado a esto, la microbiota intestinal aparenta proteger al cuerpo del exceso de grasa y un desequilibrio en la proporción de bacterias que puede causar daños en el metabolismo desencadenando obesidad (4). Que como es sabido, México está en las primeras posiciones mundiales en cuanto a obesidad se refiere por lo que es urgente encontrar medidas para resolver o por lo menos aminorar este problema de salud pública, como lo serían los liposomas como alimentos funcionales.

Así que el tener un vehículo que entregue un fármaco y pueda ser benéfico para la biota intestinal contribuiría para una mejor calidad de vida durante la medicación y una entrega efectiva del fármaco en la zona de absorción de nutrientes y algunos fármacos.

Los beneficios de las investigaciones no se quedan solamente en la salud o economía pública, también impulsan las conexiones, integraciones e integración entre diversas áreas de conocimiento e instituciones, tal es el caso de este PAP (Proyecto de Aplicación Profesional) y el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), donde al conjuntar las diferentes áreas multidisciplinarias tanto de la Universidad como del Centro el avance sobre la entrega de fármacos de las nanoestructuras no habría tenido un avance significativo. La donación de lactobacilos por ITESO, validó que el sistema de cultivo implementado en el CIATEJ era correcto para el cultivo de lactobacilos y confirmó que muchas de las fuentes comerciales no favorecen la reproducción de los lactobacilos como lo estipula el producto. Por otra parte, estas fusiones posibilitan perfeccionar el proceso de aprendizaje y la formación de profesionales íntegros y

conscientes de su entorno, apoyándose de actividades complementarias propuestas por los investigadores del CIATEJ, como el biotaller, un proyecto que ha sido galardonado con el premio estatal de innovación, ciencia y tecnología en la categoría de divulgación y que consiste en ir a escuelas primarias públicas donde los estudiantes de licenciatura apoyan en clases dinámicas acerca de matrices poliméricas (usando alginato, cloruro de calcio, pintura vegetal y gelatina comestible como materiales didácticos), sembrando la inquietud en los niños sobre la ciencia y que en un futuro algunos de ellos les interese la ciencia como un área de desarrollo para su persona. Simultáneamente, los universitarios se sensibilizan y aprenden a convivir con personas con realidades distintas a las suyas y ponen en práctica sus habilidades para comprender un tema por completo y poder explicarlo de una manera adecuada, este último aprendizaje es posible especialmente con niños, ya que si una persona realmente entiende un tópico (por más complejo que sea), debe ser capaz de explicárselo a un niño de tal manera que el pequeño comprenda fácilmente.

1.3 Antecedentes

La Dra. Vallejo tiene veinte años investigando acerca de las aplicaciones de los liposomas, ha sido la autora de múltiples artículos al respecto, profesora PAP (Proyecto de Aplicación Profesional), así como directora de tesis de licenciatura, maestría y doctorado. Actualmente hay cinco proyectos a nivel licenciatura que involucran a los liposomas como transportadores de fármacos, sustancias activas y genes. Los trabajos involucran medicamentos para el tratamiento de cáncer de mama, cervicouterino y el glioma multiforme (un tipo de cáncer que genera tumores cerebrales de rápido crecimiento y metástasis), en estos proyectos se busca determinar el tiempo necesario para la liberación del fármaco, si los liposomas se funden a la membrana celular o se introducen a las células cancerígenas y si aniquilan o reducen los tumores. Cabe mencionar que el proyecto del glioma multiforme está por culminar a finales de febrero y se continuará con la misma metodología, por otro alumno, pero con nanoeritrositos fantasmas como medio de transporte de temozolamida (medicamento contra este tipo de cáncer).

El otro trabajo es encapsular genes para modificación genética. Finalmente la encapsulación de fructanos es la línea de investigación que trata este reporte y es la continuación de la tesis de licenciatura: “Evaluación de liposomas como sistemas de encapsulamiento y su estabilidad con fructanos de *agave tequilana* en un sistema de digestión *ex-vivo*” finalizada en el 2017 arrojando como resultados que los fructanos causan que los liposomas aumenten de tamaño (en comparación

con los liposomas cargados de ácido salicílico), sean estables y aptos como transporte vía oral de sustancias activas hasta el intestino delgado. Para este proyecto el procedimiento para producir liposomas seguirá siendo sonicación pero con los siguientes cambios: se usa calceína a una concentración de 1mM en vez de fluoresceína a 3.5 mM, lecitina de soja a 10mM en lugar de lecitina de yema de huevo a 20mM, todo esto para un volumen de 5ml y no de 3ml. El procedimiento con lecitina de soja es más rápido, pues se evitan la extracción, purificación de la lecitina de yema de huevo y el conteo de fosfatidilcolina por determinación de fosforo total. La razón para suplir la fluoresceína por la calceína es que cuando está encapsulada y las partículas están muy juntas entre sí (como lo sería en el caso del sistema coloidal de los liposomas) presenta auto apagado, lo que significa que se va a observar un pico en la fluorescencia hasta que la membrana del liposoma se desestabilice (rompa). Al contrario de la fluoresceína que siempre fluoresce.

La Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona es la titular, el estudiante de licenciatura que está a punto de terminar su estancia de investigación, debido a su próxima graduación, es el encargado actual del laboratorio y de enseñarle a los nuevos alumnos el procedimiento de la obtención de liposomas. Una estudiante de doctorado tiene a su cargo otros dos estudiantes de licenciatura.

1.4. Contexto

Lamentablemente en México se muestra una actitud de resolución inmediata hacia cualquier tipo de enfermedad por los profesionales del sector salud, ya que la sociedad generalmente tiene la idea de que este sector debe cumplir la función de curar diferentes enfermedades que se padecen a través de diversos tratamientos que no requieran de seguimiento u obligación alguna por parte del paciente, de hecho muchas de estas enfermedades pudieron haber sido evitadas, no obstante los ciudadanos no siempre están comprometidos con su salud dejando así una tarea muy difícil para el personal médico. Algunas de las medidas básicas de prevención de enfermedades están enfocadas hacia la una buena alimentación, higiene, ejercicio, entre otras, que lamentablemente pocos integrantes de la población las siguen, esto se afirma solo al ver los datos de obesidad en el país. El sector salud, al ver que los ciudadanos tienen enfermedades que pudieron ser prevenidas por actividades, ha propuesto llevar a cabo una atención preventiva sobre la correctiva, con el objetivo de poder disminuir en el gasto público de salud y disminuir la abundancia de tratamientos de enfermedades crónicas degenerativas, como la diabetes tipo 2, las cuales provocan una inversión anual de aproximadamente \$778,427,475 pesos (5). De igual, manera se busca que los efectos

secundarios económicos que tienen las enfermedades, se reduzcan pues las personas afectadas que están en edad de trabajar experimentan muerte prematura, discapacidad o bajo rendimiento en sus labores que representan elevados costos para las empresas y el gobierno, ya que tienen que cubrir los gastos ante asociaciones privadas por enfermedades que de haber sido tratadas con antelación podrían evitarse en su totalidad.

Es importante que en Jalisco se pueda contribuir a la reducción del gasto en el sector salud, es por eso que se promueve hacerlo mediante alternativas para prevenir enfermedades y entregar fármacos a medida que esto sea posible. Es por esto que se conlleva a las nuevas investigaciones a que dirijan el fármaco hacia el sitio blanco y que la cantidad que sea suministrada sea únicamente la necesaria para tratar el padecimiento, lo que se puede por medio de estrategias de entrega personalizada y dirigida, un ejemplo de esto son los liposomas. Estas vesículas, tienen la capacidad de encapsular diversas moléculas activas solubles o no en agua, además al ser vesículas fabricadas normalmente con fosfatidilcolina -fosfolípido estructural más común en las membranas biológicas- (7), son considerados biológicamente compatibles y no tóxicos.

Con el fin de poder implementar una medida preventiva de esta índole, actualmente, se está estudiando la posibilidad de emplear a los liposomas como alimentos funcionales, encapsulando en su interior agentes fermentadores de bacterias protectoras del tracto gastrointestinal como los lactobacilos, debido a que una microbiota intestinal equilibrada puede ser la clave en la prevención de algunos padecimientos importantes en nuestro país, como los son la obesidad, la diabetes o como ya se mencionó el rotavirus (4). De igual manera que se busca prevenir algunas enfermedades gastrointestinales, hay algunos tipos de cáncer que son también enfermedades no transmisibles degenerativas que representan un costo elevado para el sector salud. Estas afortunadamente también pueden ser curadas sin mayor desgaste físico para el paciente y a menor costo para el sector público, a través de los liposomas.

Según los datos más recientes, el gobierno mexicano destina al sector salud a nivel nacional únicamente aproximadamente \$622,937,399 miles de pesos (en Jalisco \$36,591,566 miles de pesos). Lo cual es muy poco considerando el nivel de población que tiene el país, por lo que es vital que se preocupe por la prevención, pero desafortunadamente no siempre se puede dar de forma rápida por que la aportación al sector de investigación pública alrededor de \$91,400,000 miles de

pesos (5), cantidad que se reparte entre varias áreas no solo en el sector salud, lo que limita el cuidado. Uno de los centros de investigación que se preocupa por el tema y se patrocina con el presupuesto anterior es el CIATEJ, donde se trabaja con desarrollos de vanguardia en busca de la mejora de la calidad de vida de la población creando productos que pueden ser ofertados a la industria farmacéutica y a su vez a la sociedad a costos accesibles. En el laboratorio de la Dra. Alba Adriana Vallejo precisamente se busca proponer una solución a estos problemas por medio de la innovación de la farmacéutica. Es así como nace el proyecto de investigación de la producción de liposomas como transportadores de medicamentos, que sean altamente compatibles para el organismo, que entreguen la cantidad efectiva hacia el sitio blanco, y que la mayor parte de sus desarrollos sean compatibles con el ambiente, de igual manera se busca que sean viables para ser ofertados al mercado con un costo menor al de los medicamentos ya existentes. El objetivo de esto hablando en términos gubernamentales y en términos de investigación: es hacer más con menos, lo que significa que buscan tener una tasa mayor de población sana, a un menor precio gracias a la prevención.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

Hablando concretamente de la nanotecnología, esta es una ciencia en la que se aplican diversas tecnologías para manipular los materiales a una escala de 0.1 a 100 nanómetros. Las estructuras nanométricas no son solamente únicas porque sean imperceptibles por el ojo humano, sino porque las propiedades de los materiales cambian debido a los efectos cuánticos (14). Es por esto que su aplicación se extiende a áreas como: la industria alimentaria (15), tecnología ambiental (16), electrónica (17) y farmacéutica (18).

Como parte de las investigaciones que se han realizado uniendo la nanotecnología, biotecnología y farmacéutica, está el desarrollo de nuevos sistemas transportadores de fármacos u otras sustancias activas, como los liposomas, ya que los sistemas actuales presentan efectos secundarios tóxicos graves, además de fallas en la liberación de la molécula activa sobre el sitio a tratar (7).

Los liposomas son estructuras biológicas que se han estudiado con gran interés porque son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos (19)- (20). También se ha demostrado que mejoran la farmacocinética¹ de los medicamentos y efectividad de liberación en el sitio de interés. Sus propiedades beneficiosas para el tratamiento de enfermedades se atribuyen a su composición de fosfolípidos (Figura 1) que se asemeja a la estructura de diversas membranas celulares (21).

Los fosfolípidos son lípidos anfipáticos² (Figura 1 a)), utilizados como materia prima para la formulación de liposomas, ya que son el principal elemento de todas las membranas celulares, y están adheridos a diferentes moléculas. Dependiendo de esta unión es el nombre específico que reciben. Así, los fosfolípidos con colina, se llaman fosfatidilcolina o lecitina, con serina: fosfatidilserina, con inositol: fosfatidilinositol, con glicerol: fosfatidilglicerol, con inositol: fosfatidilinositol, entre otros (22). Los fosfolípidos pueden ser obtenidos de fuentes naturales como aceite de girasol, yema de huevo, cerebro bovino, o de haba de soya (23). Para este proyecto se eligieron los fosfolípidos de la última fuente mencionada, es decir, lecitina de soya para la elaboración de liposomas.

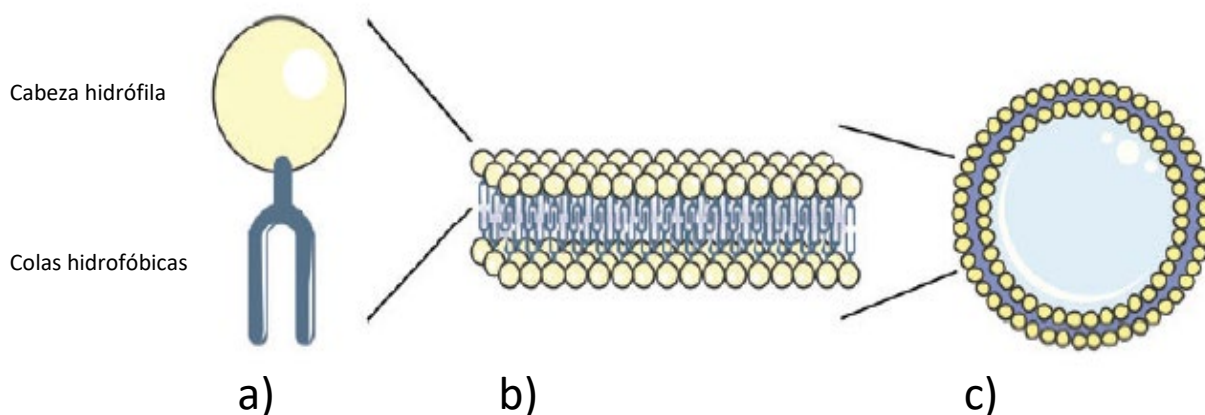


Figura 1 Estructura de un liposoma, el cual se forma apartir de varios fosfolípidos unidos, formando una bicapa y posteriormente una esfera (vesícula). a) Fosfolípido b) bicapa c) Liposoma. (21)

¹ Descripción cuantitativa como función del tiempo de la absorción, distribución y eliminación de un fármaco (24).

² Anfipático (a): moléculas que tienen un extremo hidrófilo y otro hidrofóbico. Los fosfolípidos tienen una cabeza hidrófila y dos colas hidrofóbicas (23).

Existen diversos métodos para la formulación de liposomas que pueden incluir solventes orgánicos, extracción de detergente de micelas, o procedimientos mecánicos (19) como lo son: sonicación en baño, con punta o canicas de cristal y extrusión (25). Todos estos procedimientos tienen en común que primero se debe crear una bicapa de fosfolípidos de la que posteriormente se forman los liposomas, no obstante, el protocolo a seguir depende del tamaño y función deseada de los liposomas, así como de la solubilidad en agua de la molécula activa que será encapsulada y si se les adicionará un fluoróforo para poder determinar la eficiencia de encapsulamiento (usando espectrofotometría), el tiempo necesario para que liberen la sustancia activa (con espectrofluorometría) y ser observados en un microscopio de fluorescencia para observar su interacción con células, bacterias u otros microorganismos (7), (19).

La solubilidad de la sustancia a encapsular y el fluoróforo determinan el orden de los pasos a seguir en la elaboración, ya que si son insolubles en agua (hidrofóbicos) deben quedar entre la bicapa fosfolipídica y ser agregados al inicio del proceso, por otro lado, si son solubles en agua (hidrófilos) deben añadirse en la mitad del proceso para que permanezcan en el “núcleo” acuoso de los liposomas (Figura 2 c)) (19), (26) . Por tamaño, se pueden elaborar liposomas unilaminares o multilaminares (con apariencia de cebolla). Dentro de las unilaminares están las SUV (*Small Unilamellar Vesicles*), las MUV (*Medium Unilamellar Vesicles*) y las LUV (*Large Unilamellar Vesicles*) (Figura 2 a) y b)) (27).

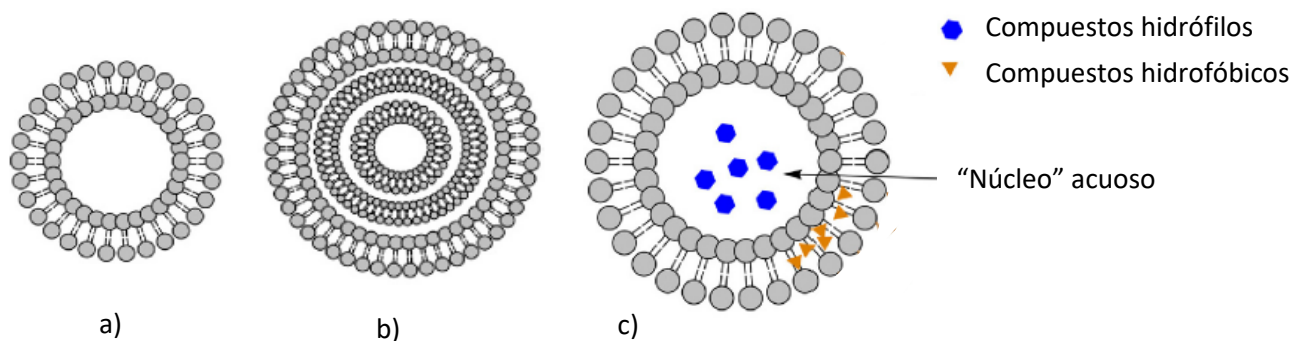


Figura 2 Clasificación de los liposomas a) Liposomas unilaminares, que pueden ser SUV (20-40nm), MUV (40-80nm) y LUV (100-1000nm) b) liposomas multilaminares (> 0.1 μm) c) ubicación de compuestos según su solubilidad en agua dentro de liposomas unilaminares (26).

El tamaño es determinado por el método de sonicación empleado, como se mencionó anteriormente, puede ser en baño, con punta o con canicas de vidrio. Si la sonicación es en baño, se obtienen LMV (*Large Multilamellar Vesicles*) (28), con canicas de vidrio (2mm de diámetro) los liposomas presentan un tamaño de 67.70 ± 25.50 nm (25), pero es un método recién desarrollado, que aún no se ha estandarizado, por lo que no sería la mejor opción. La sonicación con punta de titanio descrita por la Dra. Vallejo es la idónea y elegida para este proyecto, debido a que es sencilla, estandarizada y surgen liposomas SUVs y MUVs (29).

Los liposomas, no solamente pueden encapsular fármacos si no que otras moléculas activas, como es el caso de los fructanos de *agave tequilana*. Estos compuestos son oligosacáridos³ del tipo inulina, no digeribles en la primera parte del tracto gastrointestinal, sin embargo, resultan ser de gran interés pues se ha comprobado su eficacia para promover la fermentación selectiva de lactobacilos, así como la inhibición de bacterias patógenas, dentro del intestino delgado (30), (31). A través de la estimulación del crecimiento de lactobacilos se llega a un equilibrio óptimo en la microbiota intestinal, ya que los lactobacilos, son bacterias lácticas⁴ Gramm positivas en forma de bastones (32) encargadas de proteger la mucosa del intestino (favoreciendo la respuesta inmune), mejorar el metabolismo, reducir la inflamación producida por el síndrome de intestino irritable, prevenir diarrea por rotavirus -y por consiguiente disminuir las muertes por deshidratación- además de ayudar en la prevención y/o eliminación de otras patologías gastrointestinales (1)- (3).

El objetivo de este proyecto es encapsular fructanos en liposomas y se prevé que sean para administración vía oral. Esto quiere decir que deben resistir las condiciones de pH del estómago e intestinos sin ser degradados, además no deben ser fagocitados por los macrófagos⁵. En otra investigación, se produjeron unos *snacks* de manzana con fructo-oligosacáridos y *Lactobacillus Plantarum* combinados, dónde también se simularon las condiciones gastrointestinales, arrojando como resultado que a pesar del proceso de digestión se obtuvieron 10^6 UFC/g (Unidades Formadoras de Colonias) asegurando cantidad necesaria de lactobacilos para generar un efecto benéfico (probiótico) para el consumidor (33).

³ Oligosacáridos: Los carbohidratos se dividen en 3, monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos son azúcares simples que tienen un átomo de carbono en su estructura, de ahí el nombre monosacárido. Los oligosacáridos es la unión de 2-20 monosacáridos (32).

⁴ Bacterias lácticas: Bacterias que producen ácido láctico a partir de lactosa (32).

⁵ Macrófagos: células encargadas de llevar a cabo la fagocitosis, la cual es el proceso inmune por el cual una célula ingiere un microorganismo extraño en el cuerpo para evitar una infección (32).

El método de encapsulación de liposomas para este proyecto consiste en mezclar lecitina de soya con colesterol, ambos disueltos en cloroformo metanol para formar una capa lipídica, posteriormente se adiciona calceína (fluroforo), fructanos y se sonnica con punta de titanio para obtener liposomas SUVs y MUVs, seguido de eso se les agrega Laurdan (fluróforo) en la etapa de incubación (29). La caracterización de liposomas para determinar el tamaño de partícula, la eficiencia de encapsulamiento, y el tiempo de desestabilización, se realizan usando potencial Zeta, DLS (Dispersión dinámica de la luz) espectrofotometría UV-vis y espectrofluorometría respectivamente (7). (26), (34).

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto.

En esta sección se describe la metodología utilizada para el crecimiento y siembra de lactobacilos, así como de su identificación genética. Los lactobacilos fueron obtenidos de los siguientes tres diferentes productos: suplemento alimenticio de la marca JustBiotics, en presentación de gomas masticables (lactobacilos esporulados), suplemento alimenticio de marca genérica (lactobacilos liofilizados), y una alícuota presuntamente de Lactobacilos Plantarum donada Por el Dr. Óscar Rojas profesor del ITESO.

Crecimiento y siembra de lactobacilos

Todas las bacterias, tienen ciertos requerimientos para facilitar su crecimiento, y existen tres tipos de medio de cultivo, líquido, sólido (agar, solidificante proveniente de algas) y semi sólido (32). Los lactobacilos son bacterias anaeróbicas facultativas, esto significa que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero requieren de un medio especial llamado caldo MRS (Man. Rogosa. Sharpe, por los apellidos de sus inventores) para fermentar (35). En este medio de cultivo el extracto de lavadura, proteosa peptona y el extracto de carne son la fuente nutrición. Las sales de magnesio inhiben el crecimiento de otros microorganismos que puedan dañar a los lactobacilos. El citrato de amonio inhibe el crecimiento de bacterias Gramm negativas. La formulación de este medio también tiene incluido un regulador de pH (32), (36).

El caldo MRS utilizado fue de la marca DIBICO, las condiciones de pH, de esterilización e incubación fueron las recomendadas por la marca (36). La siguiente tabla muestra cómo se etiquetaron los cultivos de lactobacilos (mostrados en la Tabla 1). Posteriormente se explica el procedimiento para la preparación e inoculación de los lactobacilos plantarum (Figura 3) y los lactobacilos liofilizados (Figura 4).

Tabla 1 Etiquetas de dos tipos de lactobacilos.

Lactobacilos de la cepa L. Plantarum, provenientes de una alícuota.	L.P
Lactobacilos liofilizados, provenientes de un probiótico de marca genérica.	Polvo

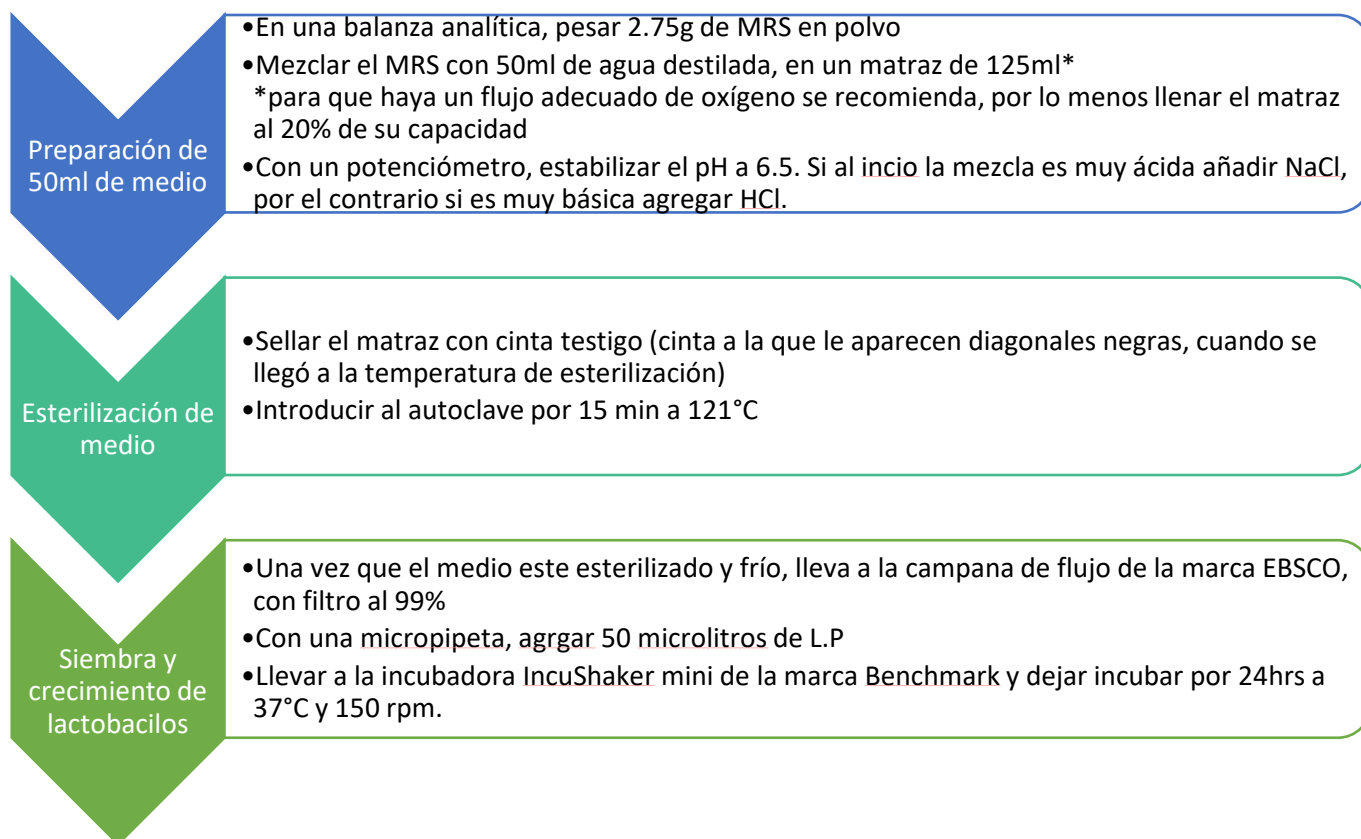


Figura 3 Procedimiento para el crecimiento de L.P

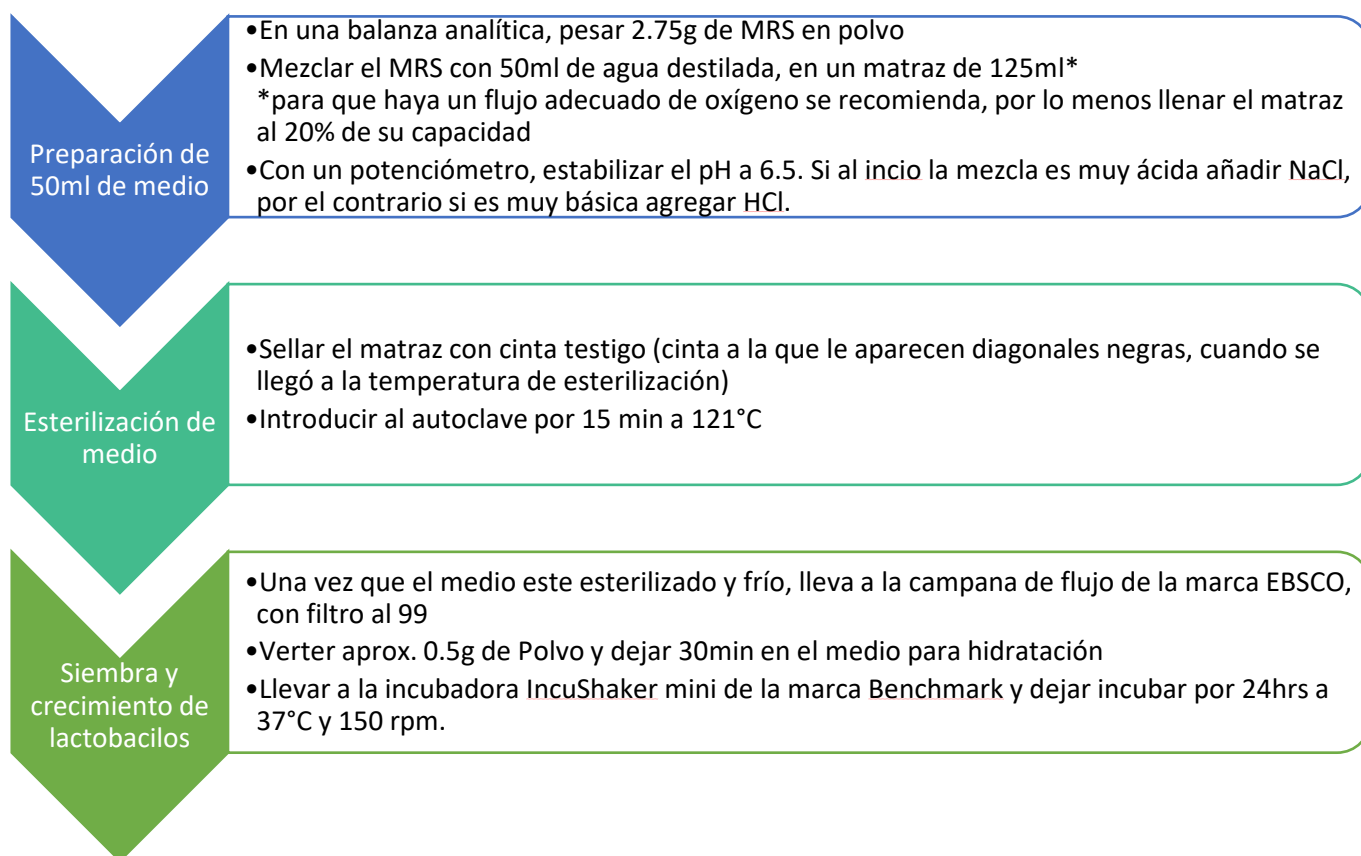


Figura 4 Procedimiento para el crecimiento de Polvo.

Al inicio del proyecto solo se contaban con los lactobacilos esporulados y no estaba disponible el medio MRS, por lo que se intentó sembrarlos en medio BD LBS, la cual es una formulación similar al caldo MRS, pero de precio menor ya que en el laboratorio se contaban con todos componentes para hacerlo excepto el extracto de carne que se sustituyó por jeringas de 2ml de la marca Bedoyecta Tri con vitamina B₁₂ 10,000mcg, vitamina B₁ 100mg y vitamina B₆ 50mg. El procedimiento de siembra fue similar a los procedimientos anteriores, con la modificación de que se agregó 1g de goma al matraz con 100ml de medio BD LBS y con las condiciones de pH establecidas por un fabricante comercial de este medio (37). Los lactobacilos esporulados no crecieron. Una vez adquirido el medio MRS, también se realizó el procedimiento de crecimiento, pero también fue sin éxito, esto es importante mencionarlo, ya que por esta razón los lactobacilos en se descartaron.

Una vez que se tuvo crecimiento de los lactobacilos liofilizado y los *L.Plantarum*, se utilizó el método de estriado por agotamiento con el propósito de aislar colonias individuales de las bacterias a partir de una mezcla con un número elevado de colonias, el aislamiento es la preparación para su identificación genética (38) (Figura 5).

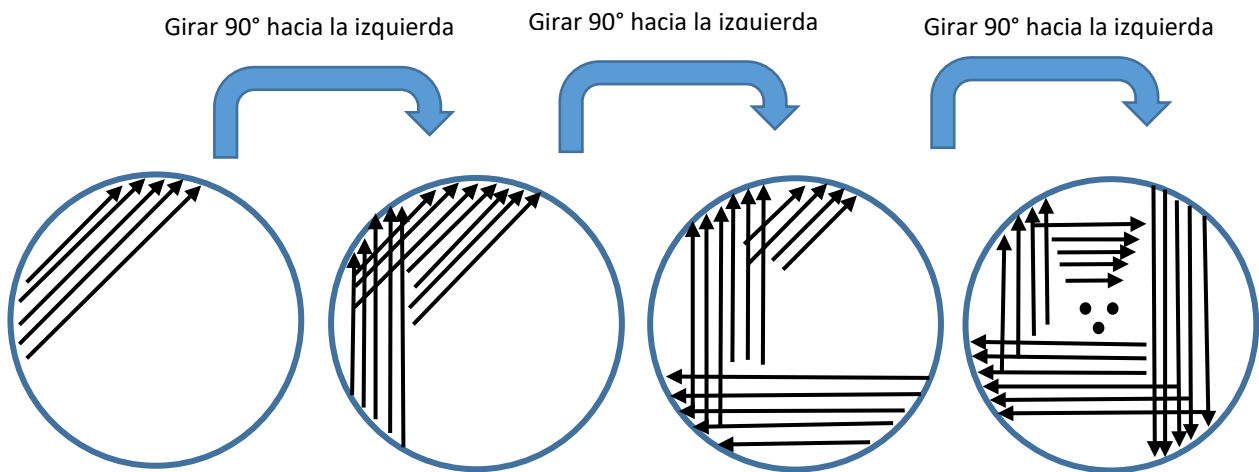


Figura 5 Estriado por agotamiento. Este método de inoculación se llama así pues tiene forma de estrías y se dice que es de agotamiento, pues la biomasa distribuida en la superficie va disminuyendo (32).

Identificación genética

Para poder corroborar que se contaba con *Lactobacilos L. Plantarum* e identificar las cepas que estaban contenidas en la mezcla de probióticos liofilizados de marca genética se asilaron colonias individuales de estos dos tipos de bacterias, en seguida se realizó el protocolo de extracción de ADN cromosomal, se examinó la pureza de la extracción, se observó la calidad del mismo con electroforesis con gel de agarosa y por último se realizó tinción Gram para identificar el tipo de células (32), (39). Todos los protocolos se describen a continuación.

- Extracción de ADN

La extracción de ADN, es un proceso que consiste en 18 pasos que deben ser meticulosamente realizados para evitar daños indeseados al ADN. La extracción con lisis alcalina promueve la exposición de las bacterias a un pH que rompe las paredes celulares, y libera el ADN cromosomal. Durante la lisis, las proteínas y las paredes celulares forman compuestos que son retirados con centrifugación, y el ADN se retira del sobrenadante (39).

El método de extracción empleado es una adecuación del protocolo 1 del libro: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, realizada por el Dr. Jesús Bernardino Velázquez, ya que el protocolo está hecho para bacterias modificadas genéticamente. Los cambios son la eliminación de antibiótico para dichas bacterias y variaciones en la temperatura, tiempos y revoluciones por minuto de las centrifugaciones.

Lo primero fue recolectar una colonia de L.P Y Polvo de las cajas Petri y sembrarlas en 5ml de medio MRS, a 37°C, 150rpm durante 24hrs en tubos SnapCap®. Una vez que los tubos presentaron crecimiento, se concentraron 4 ml de pellet bacteriano en un tubo Eppendorf® de 2ml, centrifugando a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de esto se agregó un 1ml de solución salina 0.85% para retirar cualquier resto de medio MRS del pellet bacteriano y centrifugar nuevamente con las condiciones ya mencionadas.

Después para liberar el material genético y desnaturalizar las proteínas, el pellet pasa por daño físico, químico y térmico. Del daño químico se encarga el buffer de lisis (600µl), el daño físico se hace contra gradilla 3 veces y el térmico en el ThermoBlock® en una incubación de 37°C.

El ADN se requiere llevar a una fase acuosa y separarlo de las proteínas, fosfolípidos, organelos, y otros compuestos que están dentro de las bacterias. La adición de 700µl de fenol cloroformo cumplen con esta función, lo siguiente es retirar el ADN de la fase acuosa (Figura 6), y agregarlo a 1.5ml de etanol a -20° durante 20 minutos, se centrifuga por 15 minutos a 4°C y 13000rpm, se descarta el sobrenadante, se resuspende en 1ml de etanol al 70%, se centrifuga de nuevo y se deja secar a temperatura ambiente. Para almacenarlo se resuspende en 50µl de TE (Tris HCl y EDTA (Ácido Tetracético Etilen Diamina) pH 8 y se almacena a -20°C.

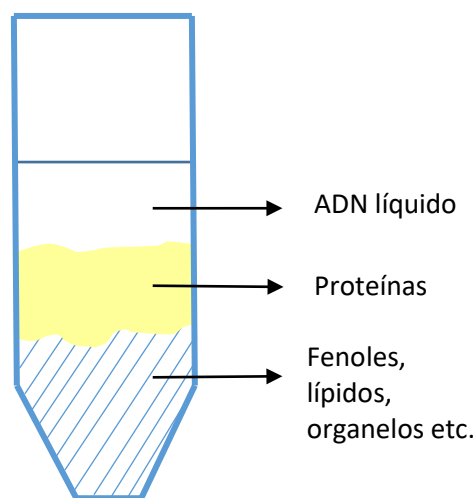


Figura 6 División esperada del pellet bacteriano después de añadir fenol cloroformo

- Medición de la pureza de ADN

La espectrofotometría determina la pureza y concentración (ng/μl) de ADN en una solución acuosa, ya que cada compuesto absorbe la máxima cantidad de luz en determinadas longitudes de onda. El ADN sin importar la especie presenta la máxima absorbancia a 260 nm, las proteínas a 280nm, los fenoles, compuestos aromáticos, péptidos, a 230nm. Por eso, cuando se analiza ADN, el cociente de las lecturas A260/A280 Y A260/A230 son una manera común de detectar contaminaciones según se muestra en la Tabla 2 (40).

Tabla 2 Pureza de ADN, según las relaciones A260/A280 Y A260/230 (41).

Relación	Valor	Pureza
A260/280	1.9-2	Óptima
	1.6-1.8	Aceptable
	< 1.6	Contaminación con proteínas
	>2.1	Contaminación con ARN
A260/230	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

El NanoDrop 2000/200c de ThermoScientific es el equipo para detectar la absorbancia de las muestras, porque solo con una gota (usando tensión superficial) de muestra puede realizar una celda por la que se irradiara luz, además que calcula automáticamente el camino óptimo de la longitud de onda que se incide en la muestra (42). La espectrofotometría es una técnica que se basa en las ondas electromagnéticas del espectro electromagnético UV visible que está en el rango de los 350 nm – 750nm, que son los colores que el ojo humano puede ver (43), (44).

Al colocar una muestra en el espectrofotómetro, lo que sucede es que se incide un haz de luz variando sus longitudes de onda y se va registrando la intensidad de la señal detectada, el equipo traduce esto como la radiación que se está absorbiendo (44).

Con las ecuaciones derivadas de la ley de Lambert- Beer, se calcula la transmitancia (ecuación 1) y la abosorbancia (ecuación 2).

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

Donde T = Transmitancia, P = Potencia o intensidad saliente y P_0 = Potencia incidente.

$$A = -\log \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (2)$$

Donde A = Absorbancia, P = Potencia o intensidad saliente, P_0 = Potencia incidente.

- Electroforesis con gel de agarosa

Con el fin de evaluar la integridad del ADN extraído se emplea la electroforesis, que es la técnica por la cual se dividen las moléculas según su tamaño al someterlas a un campo eléctrico producido por una diferencia de potencial, y se realiza en un gel o matriz. En el caso del ADN se pueden separar sus cadenas en un gel que disminuya su movilidad conforme a su peso. El gel más usado para este propósito es el de agarosa al 0.8% del volumen del buffer de corrida (Figura 7 a)), en estas experimentaciones se contaba con un cámara de electroforesis de 30ml de la marca Biorad (Figura 7 b)), por eso se mezclaron 30ml de TAE (Tris-Acetato-EDTA) con 0.24g de agarosa en polvo, para la disolución de la agarosa en TAE fue necesario el uso de un microondas. Una vez preparado el gel y el ADN extraído se preparó una mezcla de 1.4 μ l de buffer de carga (que le agrega peso molecular al ADN para poder precipitar), 0.7 μ l de GelRed (un colorante que reacciona con la luz UV) y 4 μ l de ADN, este proceso se hizo por triplicado de cada una de las extracciones (L.P y Polvo), dicha mezcla se agregó a cada uno de los pozos del gel de agarosa, dejando el primer pozo libre para ahí carga el control, es decir, 4 μ l de agua, 1.4 μ l de buffer de peso y 0.7 μ l de GelRed.

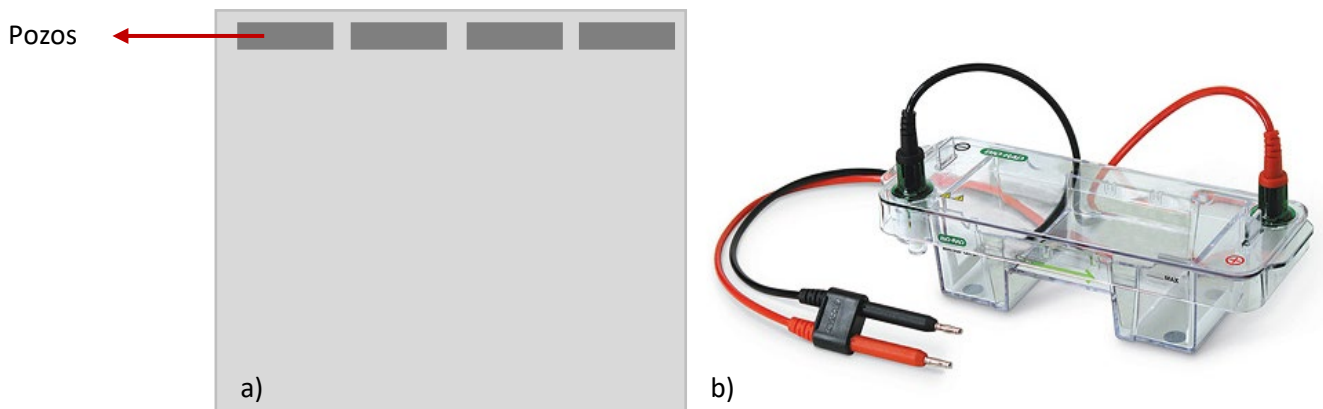


Figura 7 Elementos necesarios para la electroforesis a) Representación de un gel de agarosa, en los pozos de deposita el ADN junto con los buffers de carga y tinción b) Cámara de electroforesis de la marca BioRad (45).

Con el gel “cargado” se inició la electroforesis a 50V durante 70 minutos. Después el gel de agarosa se observó en el foto documentador y Fototransiluminador, que generan debido a la luz UV que irradian al gel, el GelRed reacciona haciendo florecer los fragmentos de ADN (bandas) bandas de ADN permitiendo que sean observados, los resultados esperados son bandas bien definidas a lo largo de todo el gel donde los fragmentos más pequeños de ADN (medidos en unidades de pares de bases pb) estén al final del gel y los más grandes arriba (Figura 8) (40), (46).

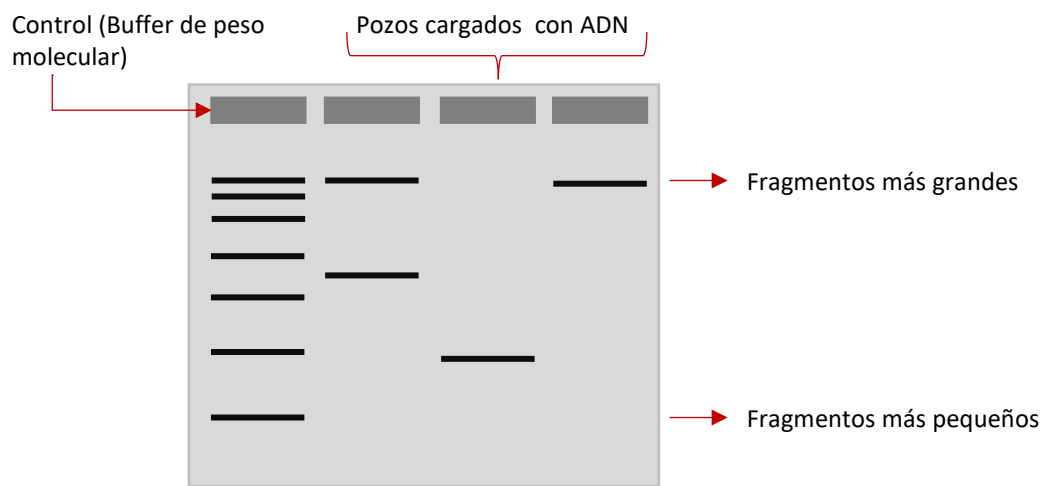


Figura 8 Ejemplo de gel observado en fotodocumentador y fototransiluminador.

- Tinción Gram

La tinción Gram diferencia a las bacterias en dos grupos: las bacterias Gram Positivas y negativas. Las Gram positivas son aquellas que retienen la tinción morado azulado del violeta de genciana, y las Gram negativas se decoloran y después se tiñen de rojo por la safranina. La diferencia en la coloración de las bacterias se debe a las diferentes propiedades de las paredes celulares. Las Gram positivas tienen una pared celular gruesa de polímeros, peptidoglucanos y es impermeable. Por otro lado, las Gram negativas la capa de peptidoglucanos es delgada, además que sus paredes contienen lipoproteínas (46). El proceso de tinción Gram es sencillo (Tabla 3), basta con solo añadir en orden los colorantes y solventes (47). El kit utilizado para la tinción fue de la marca Hycel.

Tabla 3 Protocolo para hacer la tinción gram.

Hacer el frotis sobre un portaobjetos, en campana de flujo EBSCO

Fijarlo a la flama con mechero

Cubrir con violeta de genciana durante 1 minuto y después lave ligeramente con agua destilada.

Cubrir con Yodo Gram por un minuto

Lavar con agua destilada

Lavar con acetona alcohol de 5-15 segundos para frotis delgados, 15-60 segundos para frotis gruesos.

Lavar con agua destilada

Agregar Safranina, esperar 1 minuto

Lavar con agua destilada

Observar en microscopio

Fabricación de liposomas con fructanos *agave tequilana* weber azul

Los liposomas se fabricaron con el método de sonicación con punta de titanio con el objetivo de obtener SUVs y MUVs (Figura 9). Este método inició con la disolución de fosfatidilcolina de soya y colesterol en cloroformo:metanol (9:1 v/v) en una concentración de 1mM. Posteriormente se mezclan en un tubo Falcon® de 50ml, la fosfatidilcolina, el colesterol (47%) y la rodamina B, los compuestos se incorporaron mediante agitación mecánica (vortex), posteriormente se realizó la evaporación de los solventes orgánicos en un flujo continuo pero suave de nitrógeno gas N₂ aproximadamente a una inclinación de 35° o bien hasta que el borde superior de la mezcla toque la línea de los 5 ml del tubo. Una vez que los solventes se evaporaron, se agrega ciclohexano para eliminar cualquier traza de cloroformo:metanol que haya podido quedar y se vuelve a evaporar. Con la capa delgada de fosfolípidos formada y adherida a las paredes del tubo, se hidrata en 5ml de PBS (solución buffer fosfato) pH 7.4, después se agregan los fructanos y la calceína previamente disueltos en agua, luego se lleva a sonicación con punta (Sonics Materials VCX 750 Ultrasonic Microprocessor, de la marca FischerScientific) durante a una hora, con pulsos de 10 segundos de sonicación y 5 segundos de pausa con una amplitud del 20% de 750 Watts. Como la sonicación libera una gran cantidad de calor y eso podría ser contraproducente, se hace en baño de hielo. Seguido de la sonicación se transfiere la solución de liposomas a un vial ámbar, se le añade un pedazo pequeño de clip y el laurdan, y se somete a anillación una hora. El penúltimo paso es retirar con un imán el

clip, verter los liposomas en un tubo con filtro Amicon® y centrifugar a 4°C durante 30 min a 9000 rpm. Lo último es separar los liposomas que encapsularon fructanos y calceína (la solución que queda dentro del filtro Amicon®) de los que no encapsularon nada (la solución que se va al fondo del tubo). Los liposomas “encapsulados” y “no encapsulados” se almacenan en viales ámbar a 4°C (29).

Cuando los fructanos fueron encapsulados, se pasó a la siguiente etapa del proyecto: realizar los experimentos para simular las condiciones gastrointestinales y evaluar si los fructanos promueven el crecimiento de los lactobacilos.

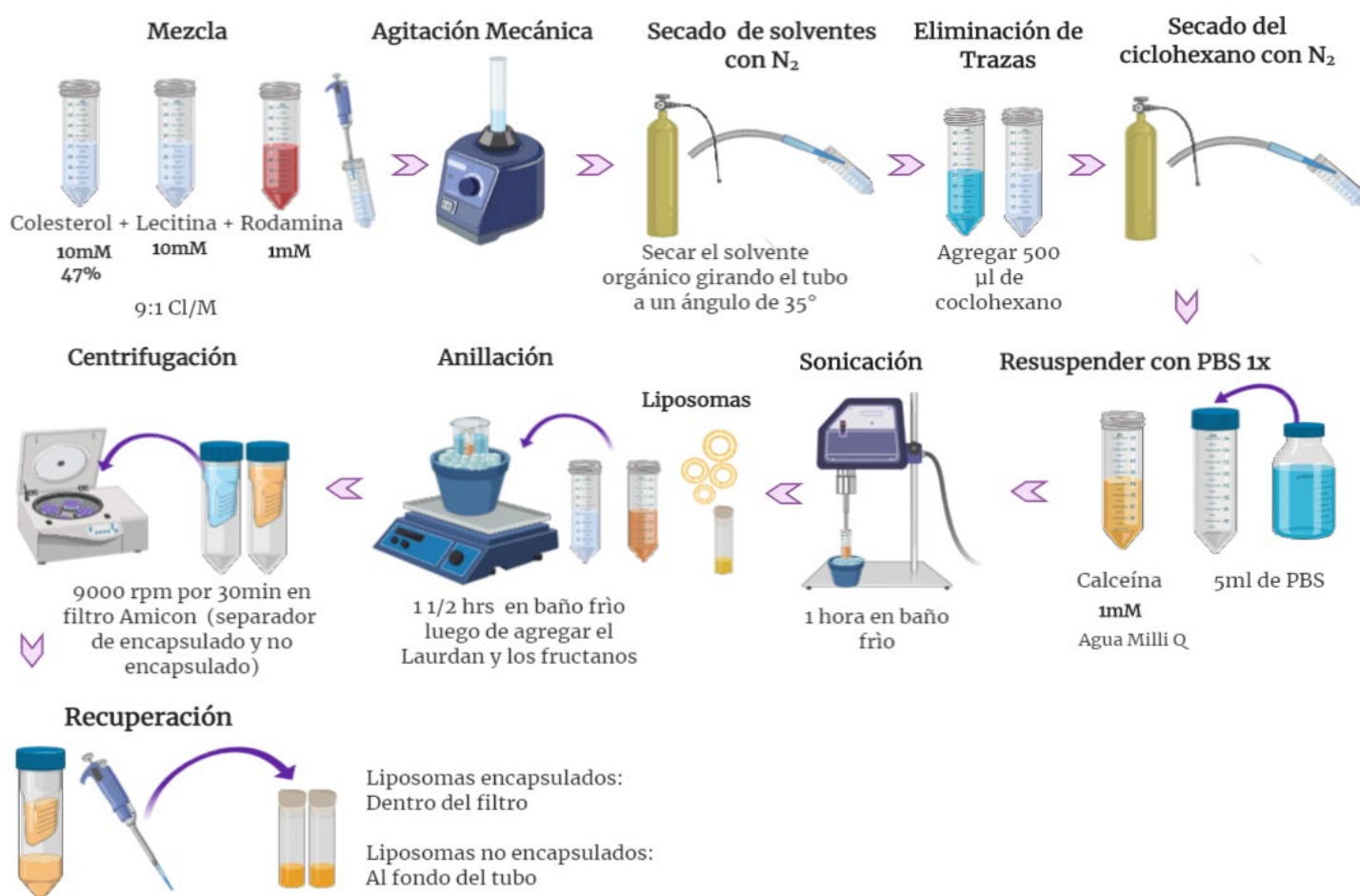


Figura 9 Diagrama del proceso de elaboración de liposomas

Caracterización de liposomas

Los coloides son sistemas conformados por dos o más fases, no obstante, por lo menos una de ellas debe ser continua y otra difusa, estos sistemas se clasifican en: soles, geles, emulsiones, espumas y sólidos porosos (48). La solución en donde se encuentran los liposomas es un sol, ya que los liposomas están en estado sólido (fase dispersa), mientras que el PBS en el que están suspendidos se encuentra en estado líquido (fase continua). El tamaño de los liposomas y su estabilidad a largo plazo se determinan por DLS (Dynamic Light Scattering) usando el equipo Zeta Sizer-ZS90. El tamaño de partícula es calculada en función de la intensidad y la estabilidad en función de la posibilidad de aglomeración determinada por el potencial zeta (49).

- Tamaño de partícula

En un sistema coloidal, las partículas que están suspendidas se mueven aleatoriamente debido que las partículas del solvente las “golpean” constantemente, a este movimiento aleatorio se le conoce como movimiento browniano. La técnica de dispersión dinámica de la luz, mide la velocidad con la que las partículas se mueven; las partículas pequeñas ($\leq 500\text{nm}$) se difunden rápidamente, por el contrario, las partículas grandes ($>500\text{nm}$) lo hacen lentamente. La velocidad del movimiento browniano se define como el coeficiente de difusión (D), el cual a través del teorema de Stokes-Einstein (ecuación 3) se convierte en un término más en la ecuación necesaria para calcular el tamaño de partícula (49), (50).

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

Donde d_H = Diámetro hidrodinámico, K = Constante de Boltzmann ($1.38064852 \times 10^{-23} \text{ J/K}$),

T = Temperatura absoluta, D = Coeficiente de difusión y η = Viscosidad.

La manera en la que el equipo opera y calcula el tamaño de partícula es la siguiente: un láser se incide 173° (backscattering) y las partículas suspendidas dispersan la luz en todas las direcciones, después el contador de fotones detecta puntos brillantes y oscuros que van cambiando su posición conforme transcurre el tiempo, estos puntos son las fluctuaciones de la intensidad (eje y) y se grafican en función de tiempo (eje x) (Figura 10).

Las fluctuaciones, como ya se mencionó, dependen del tamaño de partícula, así las partículas pequeñas hacen fluctuar la intensidad más rápido que las partículas grandes. Una vez que se tienen las gráficas de intensidad, el correlacionador construye el correlograma (ecuación 4), calculando la correlación de la intensidad en tiempo t con la intensidad a un $\Delta t = \tau$. La gráfica de correlación se extiende hasta $\tau \approx \infty$, esta función es lo que se conoce como una clásica decaída exponencial que posteriormente es llevada a la forma logarítmica y a partir de ahí se obtiene la distribución de tamaño de partícula por intensidad (Figura 11) (49), (50).

$$G(\tau) = \frac{I(t_0) * I(t_0 + \tau)}{I(t_\infty)^2} \quad (4)$$

Donde t = Tiempo, I = Intensidad, τ = Diferencial de tiempo

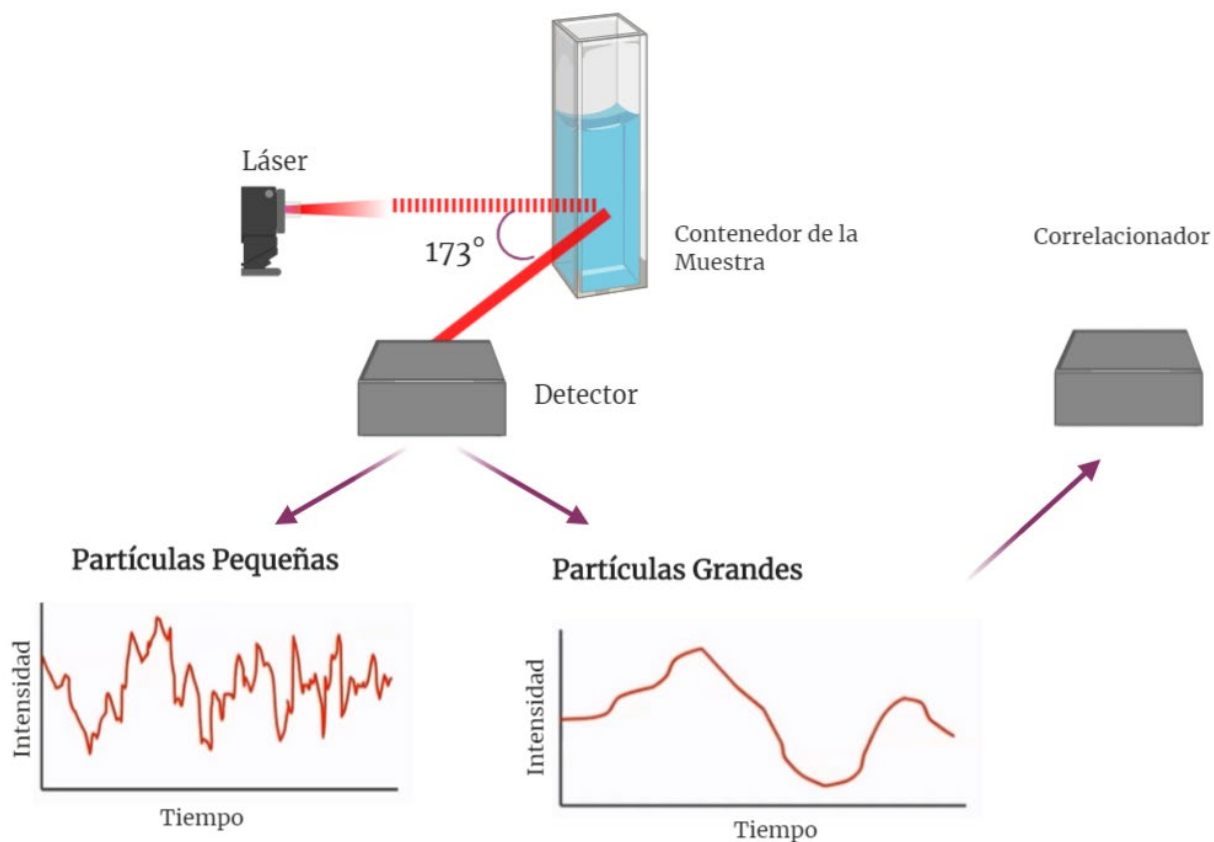
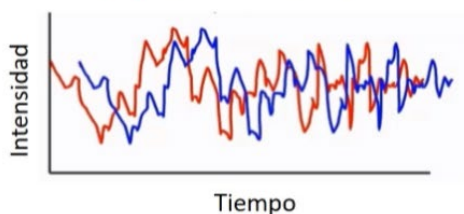


Figura 10 Obtención de la intensidad vs. Tiempo, en el Zetasizer ZS90.

Partículas Pequeñas

Partículas Grandes

Comparación de la intensidad en $t=0$ (rojo) vs $T \rightarrow \infty$ (azul)



Comparación de la intensidad en $t=0$ (rojo) vs $T \rightarrow \infty$ (azul)

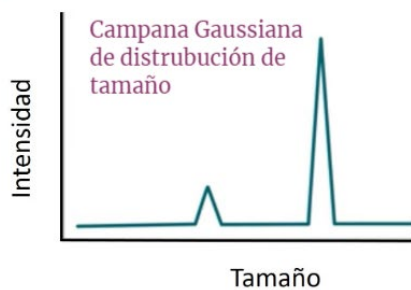
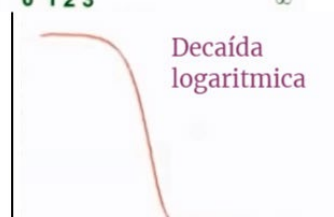
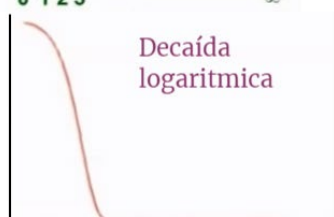
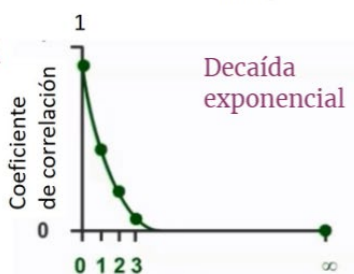
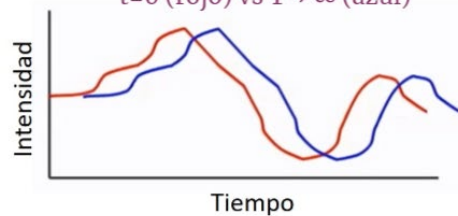


Figura 11 Obtención de la función de correlación y tamaño de partícula.

- Potencial Zeta

El potencial zeta es el voltaje de la doble capa eléctrica de las partículas suspendidas en un sistema coloidal (Figura 12). Cuando 2 partículas tienen un potencial zeta alto y del mismo signo ($\pm 30\text{mV}$), por fuerzas de repulsión no se aglomerarán. La medición del potencial zeta se lleva a cabo en un celda capilar que tiene dos “puntas” que conducen electricidad (Figura 13 a); dentro del Zetasizer, utilizando el láser se mide la velocidad de las partículas (por el procedimiento ya descrito), entonces entre más rápido se muevan más alto será su potencial zeta, este parámetro es dependiente del pH y de las sales contenidas en el solvente; un pH ácido produce un potencial zeta más positivo, un pH más básico el potencial zeta será más negativo (Figura 13 b). Por otra parte, las sales en exceso inducen el colapso de la doble capa eléctrica dejando a las partículas propensas a la aglomeración (49)- (51).

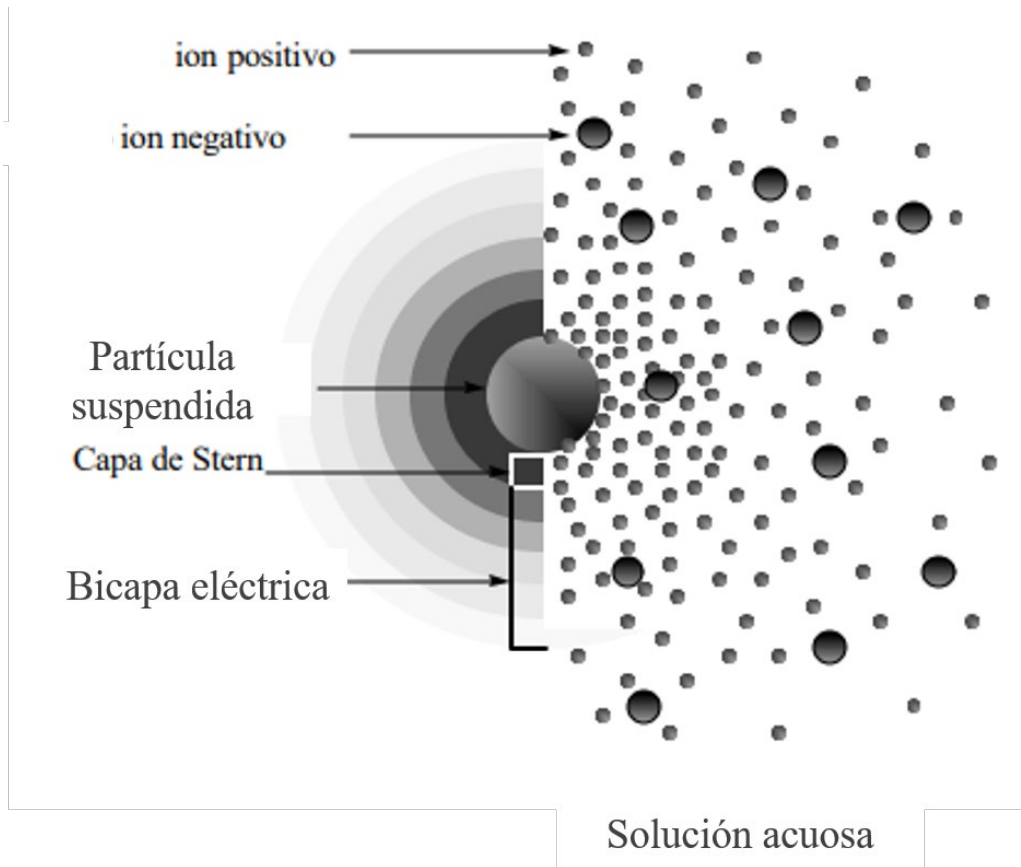


Figura 12 Estructura iónica de una partícula en un coloide (51).

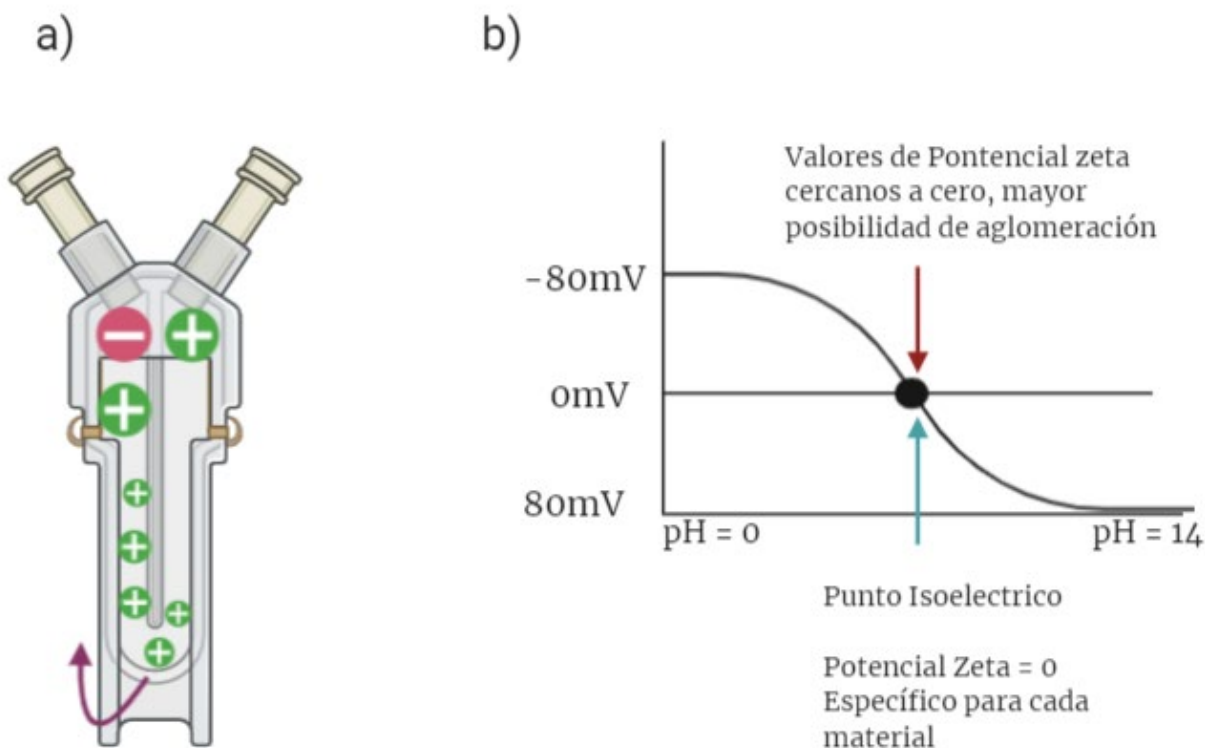


Figura 12 a) movimiento de las partículas en la celda capilar. b) Gráfica de la dependencia del potencial z al pH.

- Espectrofotometría de fluorescencia

La espectrofluorimetría es la técnica más empleada para detectar cambios en la estructura de la capa lipídica de los liposomas, como lo es su desestabilización o ruptura, que desencadena la liberación de la molécula activa dentro de su núcleo acuoso (7). El espectrofluorímetro empleado para este proceso es el Cytation 5 de la marca BioTek, que construye las gráficas del espectro de excitación y emisión de los fluoróforos contenidos en los liposomas (rodamina B, calceína y laurdan). Esta técnica de caracterización tiene su fundamento en la absorción de la luz, que ocurre cuando un fotón incidente promueve un electrón en el estado base a un estado con más energía (excitación), con el paso del tiempo los estados excitados pierden su energía y regresan al estado base (emisión) por medio de radiación, esta radiación es conocida como luminiscencia y se divide en fluorescencia y fosforescencia, la diferencia entre estas dos últimas radica en la naturaleza de los estados excitados. La fluorescencia proviene de los estados excitados singlete que tienen un electrón

apareado con un electrón en el estado base (Figura 13 b)), este apareamiento permite que el regreso al estado base sean tan rápido, que es el orden de los nanosegundos (Figura 13 a)) (52).

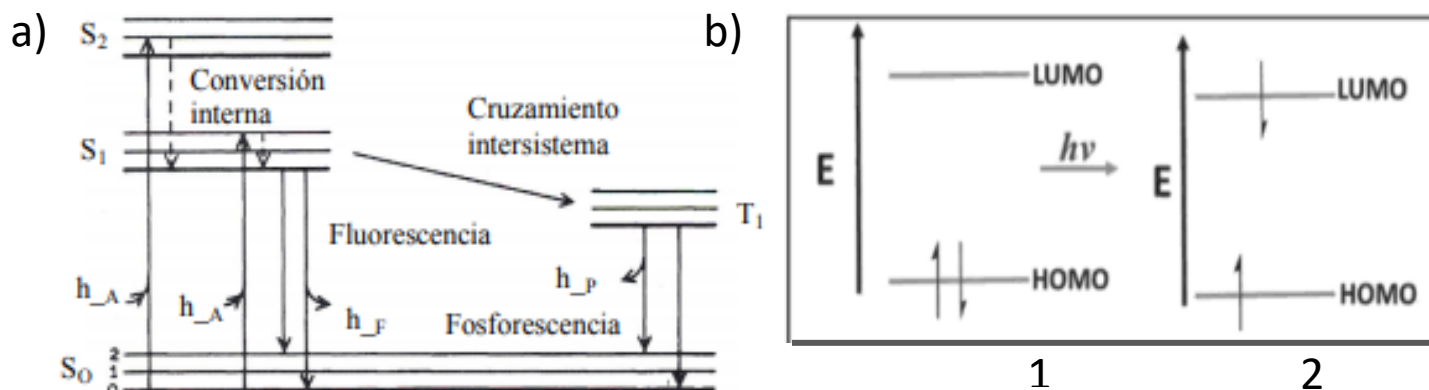


Figura 13 a) Diagrama de Jablonski que ilustra el proceso involucrado en la creación de un estado excitado singlete (S) por absorción óptica y subsecuente emisión de fluorescencia, la conversión interna se refiere al proceso por el cual se puede regresar al estado base, convirtiendo la energía de excitación en calor. b) Apareamiento de los electrones en los diferentes orbitales 1: Sin excitación 2: Singlete excitado HOMO es el orbital del que pasa el electrón y LUMO es el orbital al que llega el electrón excitado (52).

Los fluroforos extrínsecos como la calceína y el laurdan, son moléculas fluorescentes con espectros de absorción y emisión bien definidos, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia emitida varia con la longitud de onda de la excitación. El espectrofluorímetro adquiere y analiza los datos del espectro de emisión y excitación de los fluroforos agregados a los liposomas y construye las gráficas de la distribución del espectro. Cuando dos sondas fluorescentes están a una distancia aproximada de 20Å ocurre el FRET (Fluorescence Resonance Energy Tranfer), el cual es el proceso físico por el cual la energía es transmitida sin radiación de un fluroforo (donador) a otro (receptor). En este fenómeno físico el espectro de emisión del donador se sobrepone con el espectro de excitación del receptor, provocando así que el receptor emita a una longitud de onda mayor. En el caso de este proyecto, el laurdan que se encuentra en la membrana fosfolipídica de los liposomas es el donador y la calceína en el núcleo acuoso es el receptor, entonces cuando los liposomas están integros, la calceína tiene un aumento en su emisión, debido a su cercanía con el laurdan, y cuando los liposomas se “rompen” se va liberando y separando del laurdan, por lo tanto, el FRET deja de ocurrir, lo que se traduce en una disminución paulatina de la emisión de la calceína. Es así pues como a través de las gráficas del espectro de emisión, que se determina el tiempo de desestabilización de los liposomas (52).

- Eficiencia de encapsulamiento

Con el fin de conocer la concentración final de fructanos que tendrán los liposomas en su interior, se utiliza la espectrofotometría, que obtiene la cantidad de luz absorbida por un material (absorbancia), que depende de la cantidad de moléculas de la muestra analizada. La ley de Lambert-Beer relaciona proporcionalmente la concentración y la absorbancia (ecuación 5), usando esta relación es posible obtener la concentración de los fructanos encapsulados y como se conoce la concentración inicial se puede calcular la eficiencia de encapsulamiento con la ecuación 6.

$$A = \varepsilon \ell c \quad (5)$$

Donde A = Absorbancia, ℓ = Camino óptico (cm), ε = Coeficiente de extinción molar (L/mol*cm) y c = Concentración (mol/L)

$$E = 1 - \frac{C_f}{C_i} \quad (6)$$

Donde E = Eficiencia de encapsulamiento (%), C_f = Concentración final (mol), C_i = Concentración inicial (mol)

Curva de crecimiento de lactobacilos

Después de crecer exitosamente los lactobacilos, identificarlos genéticamente y tenerlos listos en medio líquido MRS, se realizaron las siguientes alícuotas para la experimentación

Tabla 4 Listado de experimentos con lactobacilos y liposomas.

pH ácido gástrico (estómago)	pH intestino delgado
3 tubos con lactobacilos solos en medio MRS	3 tubos con lactobacilos solos en medio MRS
3 tubos con lactobacilos + fructanos sin encapsular	3 tubos con lactobacilos + fructanos sin encapsular
3 tubos con lactobacilos + fructanos encapsulados + marcaodres	3 tubos con lactobacilos + fructanos encapsulados + marcaodres

Los lactobacilos al ser bacterias es esperado que tengan una curva de crecimiento logarítmica como todas las bacterias en donde se tienen 4 fases. La fase de retraso, crecimiento logarítmico o exponencial, estacionaria y de declinación o muerte. La fase de retraso se llama así porque siempre hay un margen de una hora en el que las bacterias no crecen, la fase exponencial de da entre las 2 y 8 horas de incubación, después se alcanza la fase estacionaria, donde sigue habiendo crecimiento pero ya es constante y es aproximadamente a las 16 horas de incubación. La fase de muerte depende la viabilidad de cada bacteria, existen bacterias que son viables por 30 días o bacterias que solo pueden vivir hasta 5 días y es necesario sembrarlas antes de que mueran (32). La manera de medir su curva de crecimiento es una vez más usando la absorbancia a través de la espectrofotometría usando una vez más el NanoDrop 2000/2000c, pero esta vez con una variación de la fórmula de absorbancia de la ley Lambert-Beer (ecuación 5).

- Plan de trabajo

Para llevar a cabo los objetivos planteados al principio del proyecto, se organizó el tiempo a modo de llevar control del tiempo que se le dedicaría a cada parte del proceso. La Tabla 5 muestra el plan de trabajo propuesto.

Tabla 5 Cronograma de actividades.

Actividades	Recursos	Semana															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Preparación teórica																	
Asesoría Grupal PAP	LM, ADV.CE, AGALF																
Curva de calibración de agua																	
Elaboración de liposomas																	
Revisión de literatura																	
Planeación de los objetivos y alcances del proyecto																	
Crecimiento y Siembra de lactobacilos																	
Crecimiento de lactobacilos en goma	LA, LM, ADV, ADJ, I, CF																
Crecimiento de lactobacilos en polvo (L.Polvo)																	
Crecimiento de L.Plantatum (L.P)																	
Crecimiento de L.Plantatum (L.P)																	
Identificación de los Lactobacilos	ADJ, LA,CF,																
Extracción de ADN de L.P y L.Polvo	I, C, ND, FD,																

[illegible]

Como se puede observar, en la Tabla 5 existen múltiples abreviaturas y dos diferentes tonalidades de azul. Las abreviaturas simplemente cumplen la función de optimizar espacios, el significado de las mismas se muestra en la Tabla 6. Por otro lado, los diferentes colores simbolizan que algunas actividades no pudieron ser realizadas (señaladas en azul más claro) por el periodo de resguardo impuesto a partir del 17 de marzo como medida de prevención del contagio masivo de COVID-19, tal y como se expresa en la Tabla 7.

Tabla 6 Significado de las siglas en el cronograma de actividades.

Siglas	Significado
AGALF	Asesoría Grupal PAP Alejandra López y Fermín
AIF	Asesoría Individual Fermín
ADV	Asesoría Doctora Vallejo
ADJ	Asesoría Doctor Jesús
WB	Webex
Z	Zoom
LM	Laboratorio de Materiales
LA	Laboratorios de Ambiental
CF	Campana de Flujo
CE	Campana de Extracción
I	Incubadora
C	Centrífuga
CE	Cámara de Electroforesis
ND	Nanodrop 2000/2000c
FD	Foto Documentador
FT	Foto Transiluminador
CO	Congelador
ZS	Zeta Sizer Nano- ZS90
CM	Calorímetro DSC Q2000

Tabla 7 Significado de los colores en el cronograma de actividades.

Colores	
	Actividades realizadas
	Actividades pendientes

- Desarrollo de propuesta de mejora

A continuación se muestran las evidencias de los procedimientos realizados hasta el momento en PAP.

Crecimiento y siembra de lactobacilos

Los lactobacilos marcados como L.P y Polvo se cultivaron en medio MRS, que después de la esterilización es de un color ámbar oscuro (Figura 14 a)) y cuando tiene crecimiento se observa turbidez y el color cambia a un café blanquecino (Figura 14 b)).

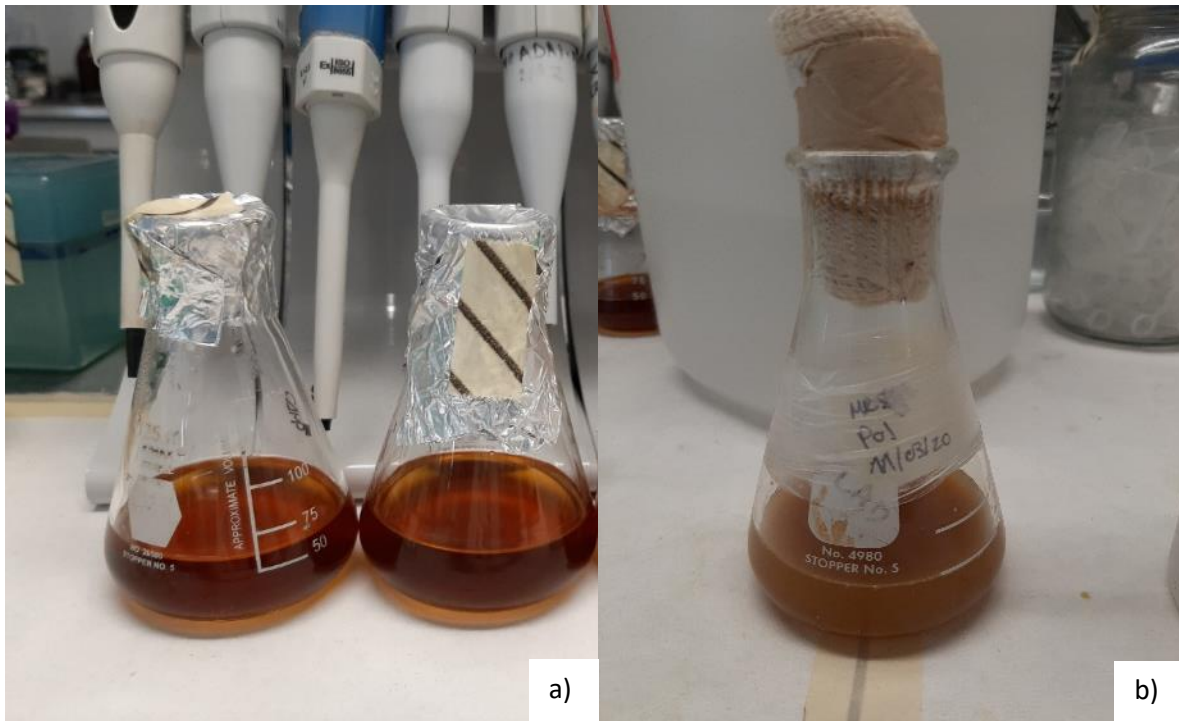


Figura 14 Medio MRS a) sin crecimiento b) con crecimiento de lactobacilos Polvo, los L.P presentaron el mismo tipo de apariencia

Como se mencionó en la descripción del proyecto los lactobacilos en goma se descartaron ya que no presentaron crecimiento en ninguno de los dos medios usados. Con los lactobacilos L.P y Polvo se procedió a inocularlos en cajar Petri con MRS agar, por el método de estriado por agotamiento y luego de 24hrs en incubación estacionaria a 30°C se observaron crecimientos de colonias individuales, que fueron vistas en el microscopio óptico para ver la morfología de colonia (Figuras 15 y 16).

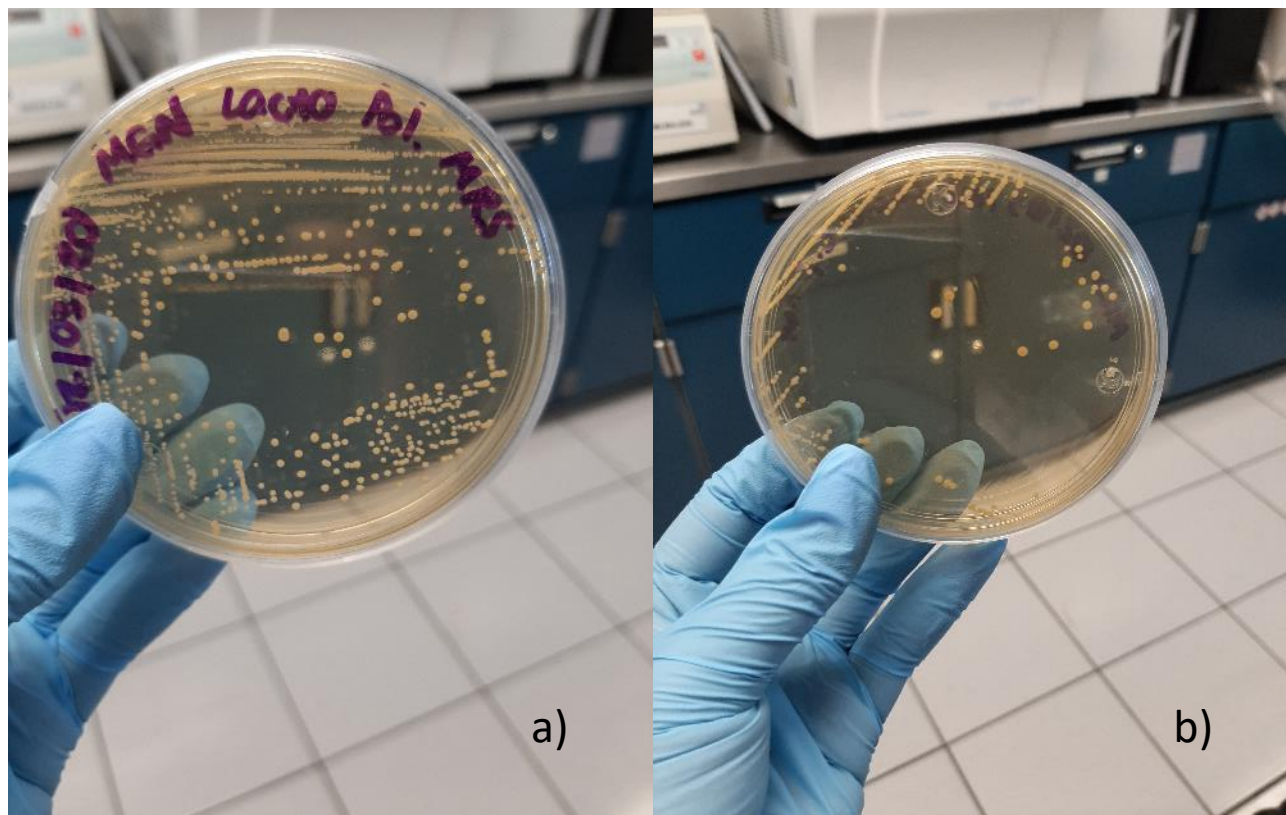


Figura 15 Lactobacilos inoculados en caja petri MRS agar a) Polvo b) L.P

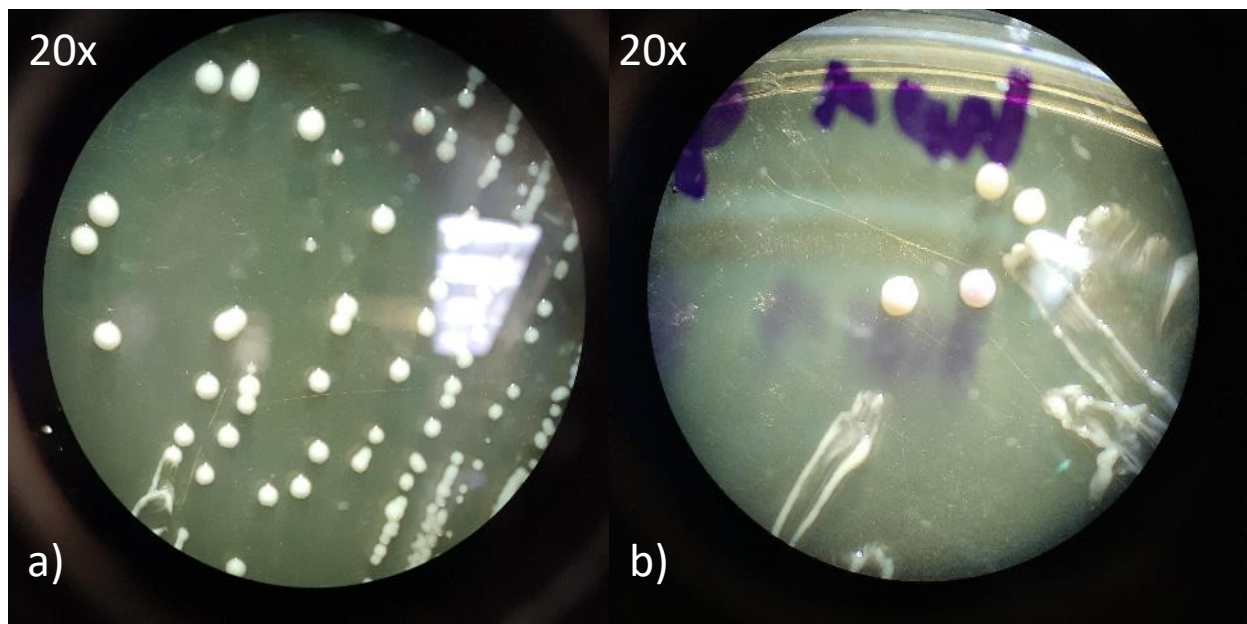


Figura 16 Lactobacilos inoculados en caja petri MRS vistos en el microscopio óptico agar a) Polvo b) L.P

Tinción Gram

Para la tinción gram se utilizó el Kit de Hycel con el procedimiento marcado por el instructivo y el recomendado por Moyes, Reynolds, Breakwell y Arenas (Figura 17).

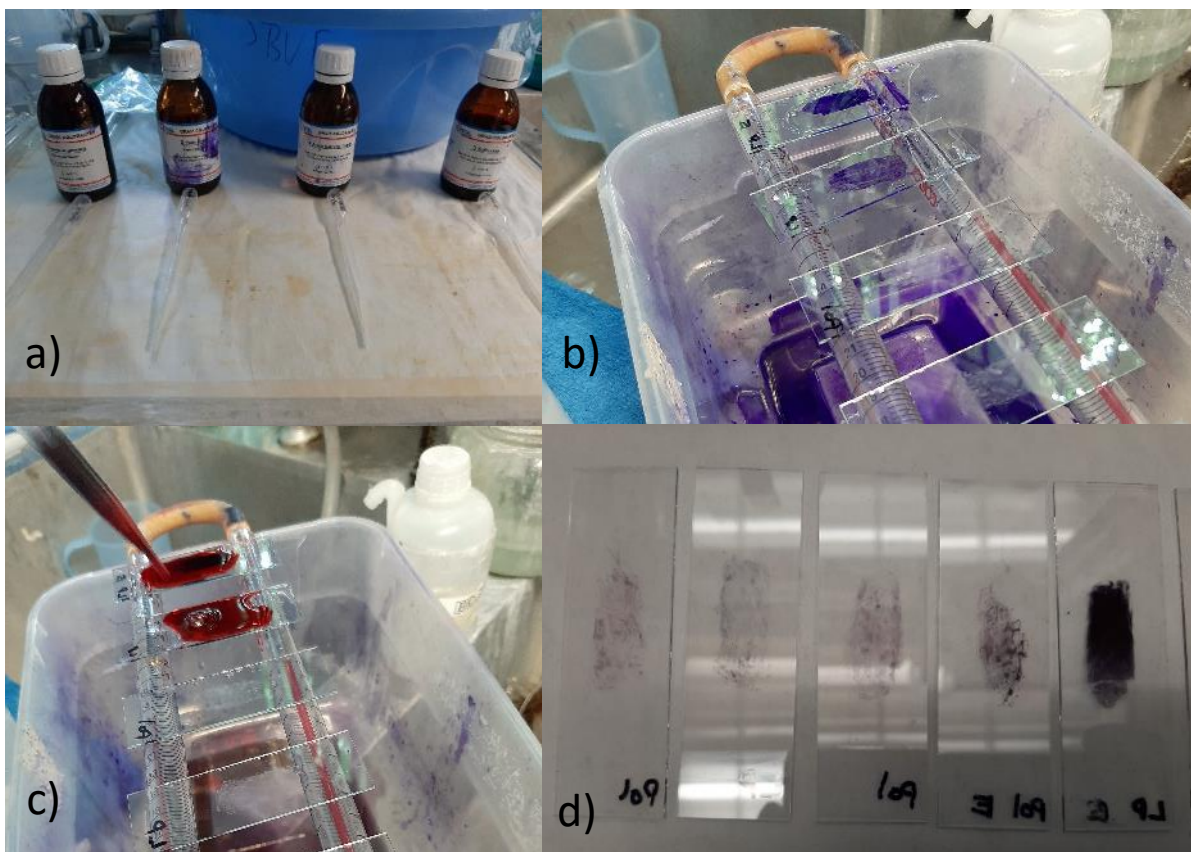


Figura 17 Tinción gram a) Kit de Hycel b) inicio del proceso (tinción con violeta de genciana) c) Final del proceso (safranina) d) Portaobjetos secos listos para ser observados en el microscopio.

Los lactobacilos L.P resultaron ser gram positivas, mientras que los lactobacilos Polvo fueron gram negativas (Figura 18)

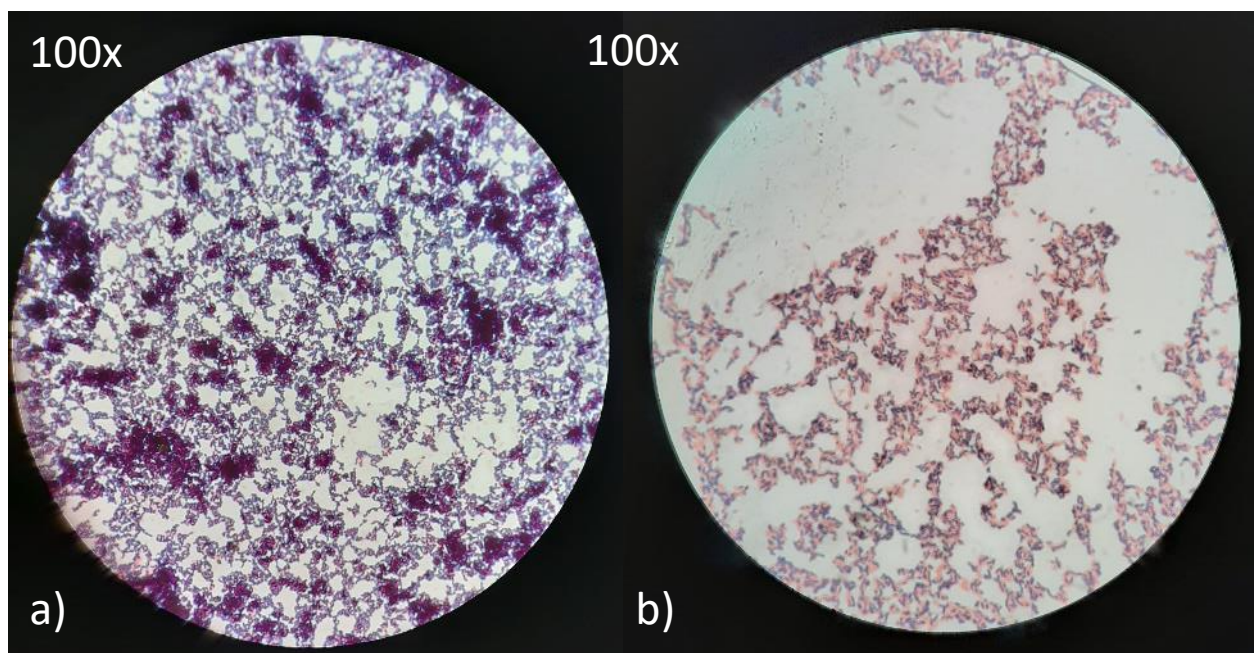


Figura 18 Clasificación de los lactobacilos L.P y Polvo a) L.P gram positivas b) Polvo gram negativas.

Extracción y observación del ADN en fotodocumentador y Fototransiluminador

La extracción de ADN se llevó a cabo por el protocolo del libro Molecular Cloning: A Laboratory Manual, este mismo se puede resumir en 4 grandes pasos: concentración de biomasa bacteriana (Figura 19 a)), lisis de la membrana celular (Figura 19b), y lavados con fenol cloroformo para separar el ADN en una fase acuosa y ser retirado (Figura 19 c y d).

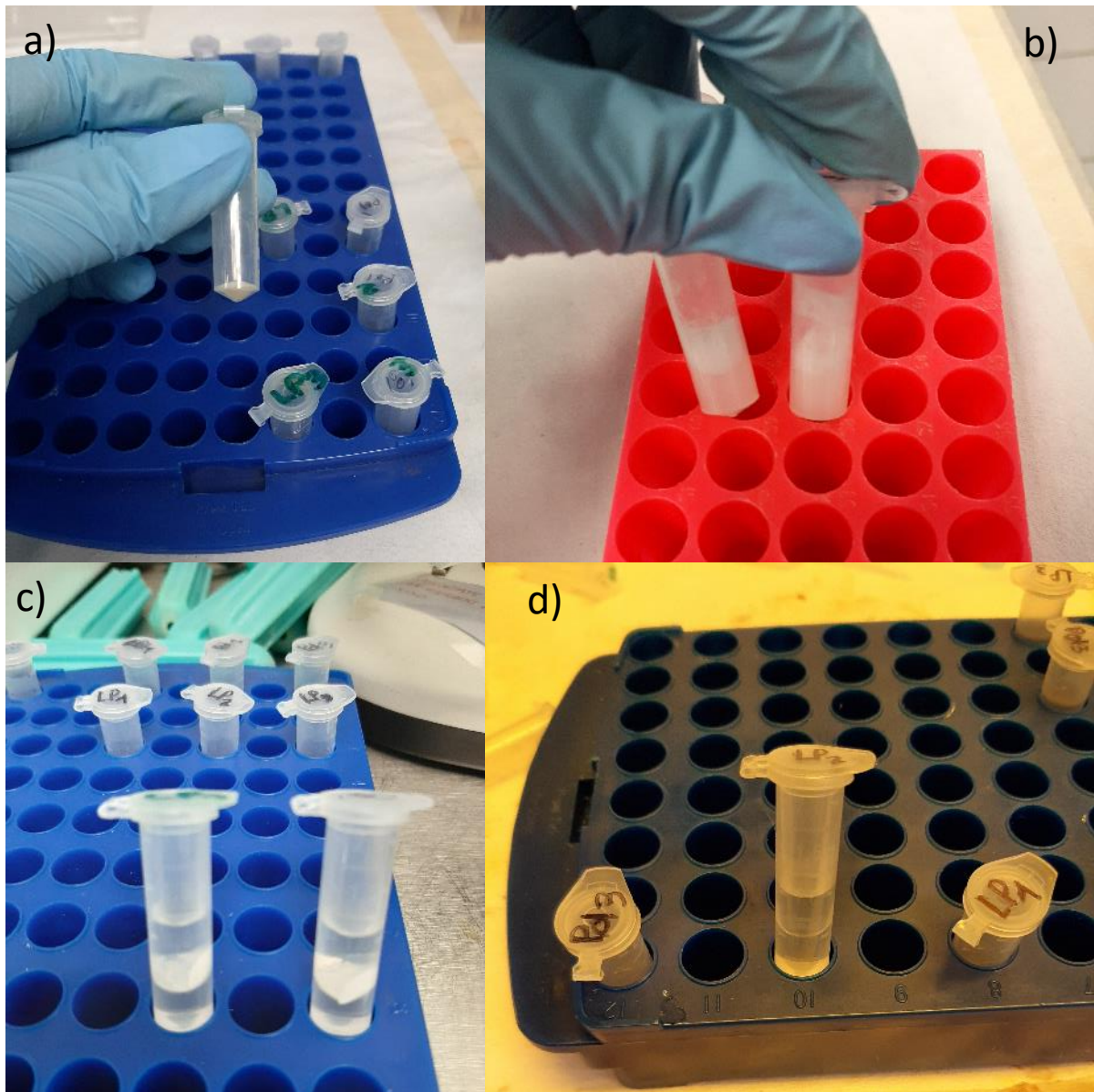


Figura 19 Extracción de ADN de L.P y Polvo a) concentración de pellet b) lisis de la membraba bacteriana c) primer lavado con fenol cloroformo d) segundo lavado con fenol cloroformo.

Una vez que se tuvo el ADN extraído se hizo la electroforesis según lo descrito en la descripción del proyecto (Figura 20), por último se observó el gel de agarosa en el fotodocumentador y en el fototransiluminador.



Figura 20 Cámara de electroforesis de 30 ml de la marca BioRad, con gel de agarosa al 0.8%.

Cuando se observó la integridad del ADN, se notó que las extracciones habían sido erróneas pues no hubo un claro bandeo en el gel (Figura 21), por lo que se decidió hacer 6 extracciones adicionales de lactobacilos Polvo, sin embargo, hubo un error en el proceso de extracción de una de ellas y se desechó, por eso en el gel de agarosa solo se aprecian 5 pozos cargados con ADN y uno que es el marcador (Figura 22).

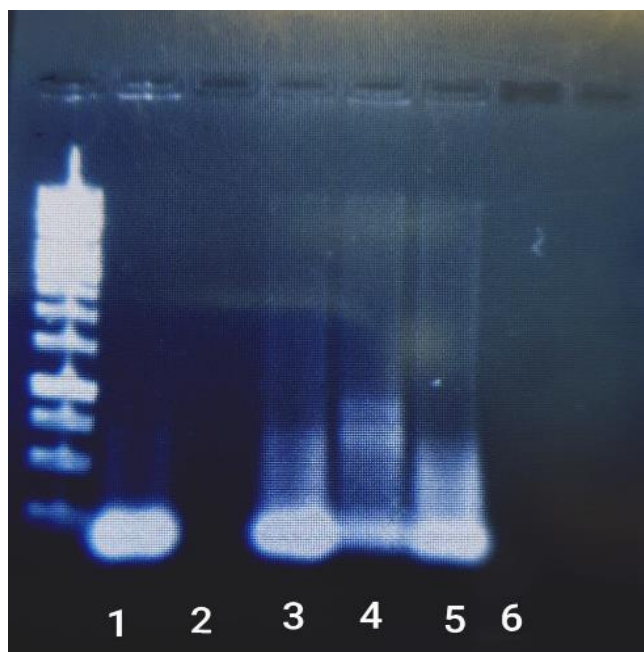


Figura 21 Bandeos de las extracciones de ADN. Del 1-3 Lactobacilos Polvo y del 4-6 Lactobacilos L.P

Debido a que el bandeo de las pares de bases no se mostró claro para las primeras extracciones, se optó por emplear el fototransiluminador (como instrumento complementario al fotodocumentador) para apreciar mejor el gel de agarosa con las nuevas 6 extracciones de los lactobacilos Polvo, porque este equipo se caracteriza por incrementar la fluorescencia de una muestra, que recordando, al adicionar el ADN a los pozos del gel se le agrega un colorante que reacciona con la luz UV. Lamentablemente el efecto fue el contrario al deseado y las extracciones de ADN se apreciaron mejor en el fotodocumentador (Figura 22 a)) que en el fototransiluminador (Figura 22 b)).

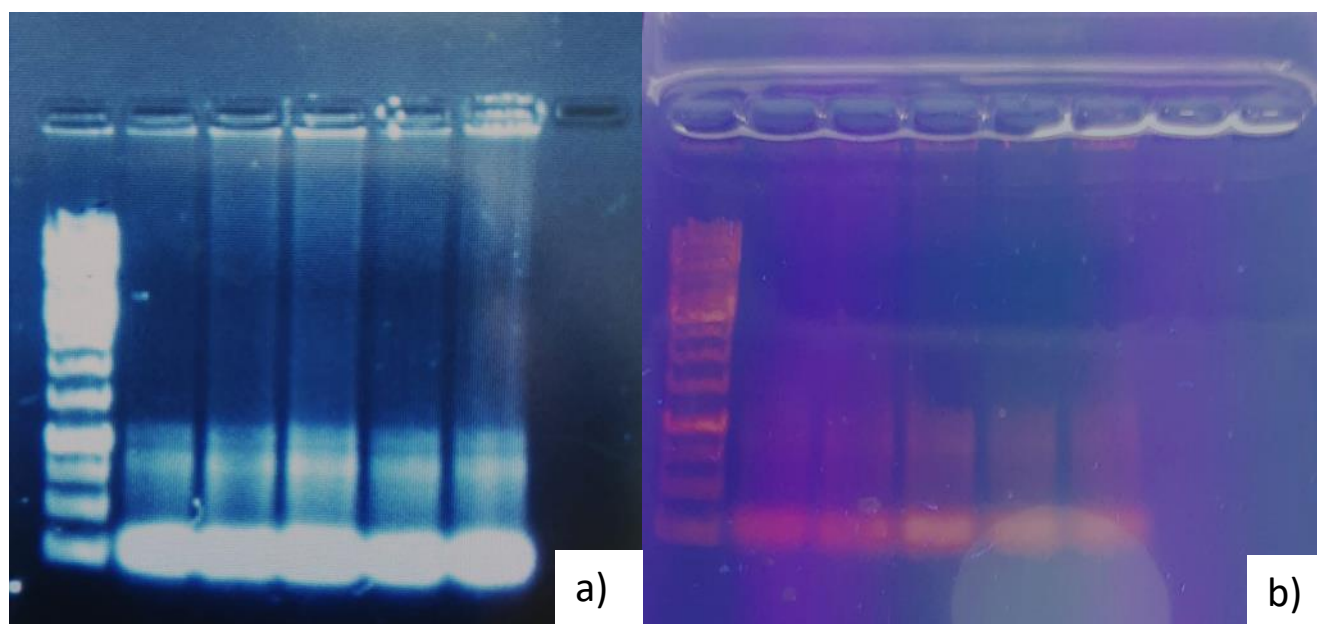


Figura 22 Bandeos de las extracciones adicionales de lactobacilos Polvo a) Fotodocumentador
b)Fototransiluminador.

3. Resultados del trabajo profesional

Como resultados, se destaca la identificación genética de lactobacilos a través de tinción Gram y secuenciación de ADN. Dichas bacterias son provenientes de fuentes diferentes: Polvo (lactobacilos liofilizados, de un suplemento alimenticio) y L.P (lactobacilos L. Plantarum, de una alícuota de la cepa Lyofast BG112 de Raff lactoingredientes). La secuenciación de bacterias se llevó a cabo en el laboratorio MacroGen; usualmente este procedimiento es la amplificación del segmento 16s rARN y el análisis de sus bases de pares. Los resultados demostraron que las dos bacterias del género lactobacilos, son de la cepa Plantarum. Este tipo de bacterias son gram positivas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la tinción gram (Figura 18). La identificación genética no hubiera sido posible sin una extracción de ADN exitosa, es decir, un ADN que se observe integro en el gel de agarosa, con una pureza aceptable ($A_{260}/_{280} = 1.6-1.8$) u óptima ($A_{260}/_{280} = 1.9-2$) y una concentración de por lo menos entre 200-300 ng/ μ l. En este proyecto el primer paso fueron 3 extracciones por triplicado de cada una de las cepas como se muestra en la Tabla 8. Las extracciones señaladas cumplen con los requerimientos de concentración y pureza mencionados anteriormente.

Tabla 8 Resultados de la pureza de la primera extracción de ADN.

Nombre de la Muestra	Concentración	Unidades	Relación 260/280	Relación 260/230	Tipo de muestra
Pol 1	243,1	ng/ μ l	1,85	1,8	DNA
Pol 1.2	279	ng/ μ l	1,87	1,76	DNA
Pol 1.3	257,9	ng/ μ l	1,85	1,78	DNA
Pol 2	73,1	ng/ μ l	1,28	1,01	DNA
Pol 2	74,9	ng/ μ l	1,25	0,96	DNA
Pol 2.3	78,7	ng/ μ l	1,33	1,02	DNA
Pol 2.3	0,3	ng/ μ l	0,45	1,66	DNA
Pol 3	348,7	ng/ μ l	1,91	1,8	DNA
Pol 3.2	336,6	ng/ μ l	1,9	1,74	DNA
Pol 3.3	344,4	ng/ μ l	1,91	1,8	DNA
L.P 1	241,1	ng/ μ l	2	1,8	DNA
L.P 1.2	237,7	ng/ μ l	1,99	1,8	DNA
L.P 1.3	240,1	ng/ μ l	2,01	1,77	DNA
L.P 2	253,9	ng/ μ l	1,9	1,59	DNA
L.P 2.2	271,7	ng/ μ l	1,92	1,61	DNA
L.P 2.3	264,6	ng/ μ l	1,91	1,59	DNA
L.P 3	138,6	ng/ μ l	1,26	1,21	DNA
L.P 3.2	153,1	ng/ μ l	1,32	1,24	DNA
L.P 3.3	157,4	ng/ μ l	1,33	1,26	DNA

Una vez que la calidad de la extracción había sido medida cuantitativamente, se procedió a la evaluación cualitativa, es decir, determinar si el ADN extraído estaba integro por medio de electroforesis. De este proceso se pudo concluir que la segunda extracción de los lactobacilos en polvo y la tercera de L.P habían sido erróneas, ya que en el fotodocumentador (Figura 21) se observa la ausencia del ADN.

Debido a la falla de las extracciones, se repitió una vez más el proceso, pero solo para los lactobacilos liofilizados (polvo). Esta vez se realizaron 6 extracciones (Tabla 9), y simplemente se etiquetaron del 1 al 6. La primera se descartó por un error en el procedimiento, a las 5 restantes se les hizo la prueba de absorbancia, obteniendo concentraciones de 400-600 ng/μl y con un valor de la relación A260/280 entre 1.9-2.04 (extracciones resaltadas), además que con la electroforesis se observó un ADN integro (Figura 22). Esto indica que estas muestras fueron aptas para la secuenciación.

Tabla 9 Resultados de la pureza de la segunda extracción de ADN de polvo (lactobacilos liofilizados).

Nombre de la Muestra	Concentración	Unidades	Relación 260/280	Relación 260/230	Tipo de muestra
2	393	ng/μl	1,94	1,41	DNA
2,2	507,7	ng/μl	1,94	1,4	DNA
2,3	411,8	ng/μl	1,9	1,31	DNA
3	464,3	ng/μl	2,03	1,48	DNA
3,2	471,7	ng/μl	2,04	1,5	DNA
3,3	178,1	ng/μl	1,9	1,21	DNA
4	141,6	ng/μl	1,99	1,6	DNA
4,3	168,8	ng/μl	1,96	1,55	DNA
5	490,4	ng/μl	1,98	1,5	DNA
5,3	468,6	ng/μl	2	1,55	DNA
6	462,8	ng/μl	2,03	1,59	DNA
6,2	503,5	ng/μl	2,03	1,58	DNA
6,3	490,9	ng/μl	2,04	1,61	DNA

Otro resultado importante acerca de los lactobacilos es su viabilidad. Los lactobacilos L.P tenían la instrucción de ser resembrados por lo menos cada 7 días. Para evitar el riesgo de perder la cepa, se resembró a los 5 días con las condiciones establecidas previamente y no hubo crecimiento, esto quiere decir que en realidad su viabilidad es menor a cinco días. Los lactobacilos Polvo siguieron presentando crecimiento por 4 semanas sin embargo, su viabilidad no se pudo seguir comprobando ya que el laboratorio fue cerrado por la contingencia COVID-19.

El cierre por el periodo de resguardo, también trajo como consecuencia que la producción de liposomas, así como su caracterización y la evaluación del efecto prebiótico de los fructanos encapsulados no se llevara a cabo. No obstante, en base a los resultados obtenidos en la tesis: “Evaluación cinética de la liberación de la temozolamida en células U87 y L929”, se estima que los liposomas sin funcionalizar tendrían un tamaño aproximado de 156nm, una carga aniónica promedio de -38.8mV y una eficiencia de encapsulamiento del 76.4%. Ahora bien, según lo reportado por el trabajo que antecede este proyecto: “Evaluación de los liposomas como sistemas de nanoencapsulamiento y su estabilidad con fructanos de *agave tequilana* en un sistema de digestión *ex vivo*”, los liposomas con fructanos presentarían una distribución media de tamaño de entre 700-890nm y un potencial Z promedio de -44.2mV, con una eficiencia de encapsulamiento del 85%. Estos resultados indican, que los fructanos causarían un aumento de tamaño en los liposomas así como una mejora en su estabilidad, que los hace resistentes a los 6 tiempos de digestión.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Una de las cosas que aprendemos desde que entramos a estudiar en el ITESO es que el objetivo de esta institución no es sólo propiciar el desarrollo individual de sus estudiantes, sino que estos también sean capaces de desarrollar proyectos integrales, es decir, que no sean de beneficio propio únicamente. “Crear a los mejores para el mundo”. Es decir, que el estudiante del ITESO no busque ser el mejor en un ramo a costa de cualquier cosa, sino que también sea consciente de los impactos que sus acciones y proyectos tienen en la sociedad. Además, de hacer uso de capacidades de comunicación social para llegar a acuerdos, así como hacer una planificación eficaz y realista de las tareas a realizar en todos los proyectos en los que se involucre el itesiano.

Mis conocimientos obtenidos en la carrera fueron puestos a prueba en repetidas ocasiones, por ejemplo, al momento de hacer estequiometrias para hacer concentraciones con la molaridad o gramos necesarios, o el uso de los equipos de espectrofotometría y espectrofluorometría, donde se implica la teoría de propagación de las ondas electromagnéticas, de los espectros de emisión y excitación de los electrones en sus diferentes niveles vibracionales y de la absorción de la luz. Por otra parte, mi capacidad de rápido aprendizaje también se vio retada cuando se me pidió cultivar e identificar genéticamente a los lactobacilos, así como fabricar liposomas para tratamiento de glioma multiforme, cosa que no sabía hacer y me complace haber aprendido microbiología, bioquímica, un poco de medicina y por ende, haber cumplido con mi tarea de manera exitosa.

Este proyecto también me ayudó para darme cuenta de algunos de los problemas a los que se enfrenta la comunidad científica mexicana, como lo pueden ser los recortes en el presupuesto, que provocan falta de insumos y obligan a los investigadores a improvisar experimentos con lo que se tiene, por ejemplo cuando no había medio MRS, se tuvo que preparar desde cero, pero sustituyendo el extracto de carne por vitamina B, lo cual fallo y retrasó el proyecto, o en el caso de los fluoroforos como la rodamina o el laurdan que son necesarios pero escasean por su elevado precio.

- Aprendizajes sociales

La finalidad de los proyectos PAP es que los alumnos apliques sus conocimientos para producir un bien en la sociedad. Los proyectos en centros de investigación externos (usualmente instituciones públicas) son idóneas para este propósito, ya que se impulsa el avance de la ciencia y tecnología, que como se revisó anteriormente, los países con más inversión en este rubro son los más prósperos.

Otro aspecto para el desarrollo de la ciencia es la difusión. Trabajando con la Dra. Vallejo tuve la oportunidad de formar parte del biotaller que consiste en ir a una escuela primaria para dar una clase del funcionamiento de las matrices poliméricas, en este año fue en el día de la mujer y la niña en la ciencia. Este tipo de actividades incitan poco a poco a los niños a interesarse en la ciencia como una carrera futura, y que a largo plazo beneficiará al país.

Además, la enseñanza a niños es la manera perfecta para poner en práctica la transmisión eficaz, concisa, puntual y adecuada de los conocimientos, que por mi experiencia en CIATEJ, la continuación de los proyectos depende de que los alumnos que ya trabajaron ahí, instruyan a los nuevos a través de sus tesis, bitácoras o se tomen el tiempo de explicar en el laboratorio todo los procesos. La

continuación de los proyectos desarrollados en los centros de investigación es de suma importancia, porque benefician a diferentes sectores de la población, por ejemplo, los liposomas pueden ayudar a pacientes con distintos tipos de cáncer, con trastornos gastrointestinales y hasta se pueden aplicar en purificación de agua. El trabajar en este centro me reafirmó que todo lo que haga en mi vida futura tanto profesional como personal tiene que ser apostando al bienestar y a la mejora social.

- Aprendizajes éticos

Desde que comencé a plantearme la idea de hacer mi PAP en apoyo a centros externos, como en el caso de CIATEJ, tuve que trabajar por mi cuenta buscando investigadores que tuvieran líneas que fueran de mi interés, buscar su aprobación para unirme a sus proyectos. En ese sentido, considero que la experiencia PAP en un centro de investigación externo, es muy enriquecedora.

A lo largo de este proyecto la mayoría de las veces me encontraba trabajando sola o con mis compañeros en el laboratorio, y siempre teníamos que tomar en cuenta que los doctores ponen su confianza en que haríamos buen uso de los reactivos y las instalaciones, no solo por el precio elevado de los mismos, sino que si algunos son manipulados incorrectamente como las campanas de extracción, o medicamentos como la temozolamida que pueden ser altamente tóxicos. En este sentido, se tenían que tomar decisiones acerca de la organización del equipo de investigación, de los tiempos, las concentraciones y tratamientos especiales de los compuestos.

Para evitar cualquier accidente y dañar a mis compañeros o a mí, siempre fue necesario documentarme y tener conocimiento de lo que estaba haciendo. Afortunadamente estas decisiones siempre fueron bien tomadas y no generaron fallos. Este trabajo me enseñó también que si se está trabajando en equipo, las actividades se deben repartir equitativamente y no recargarlas en una sola persona, solo porque sería más cómodo, también es importante asegurarse de que todos los integrantes del equipo tienen el conocimiento necesario para realizar los experimentos y si alguien no los tiene compartírselos, ya que de lo contrario puede fallar el experimento o ponerse en riesgo el bienestar de los compañeros, además que en cualquier ámbito profesional entre más se compartan los saberes más se progresa.

- Aprendizajes en lo personal

Más allá de lo anterior expuesto y de lo mucho que este PAP me ayudó para adquirir conocimiento en lo profesional (sobre todo en el área de farmacéutica y microbiología) y reafirmar lo que ya conocía, este proyecto también me dio experiencias que me fueron de utilidad para darme cuenta de lo mucho que me gusta la nanotecnología, y que, a pesar de que en el ITESO se le enfoca a la ciencia de materiales, es una carrera que tiene aplicaciones en áreas que yo no me imaginaba o no veía claro cómo sería posible, considero que, aunque tengo aspectos que mejorar, el haber tenido esta experiencia me demostró que voy por el buen camino, y que el futuro como nanotecnóloga no es para nada el incierto que predecía.

El haber trabajado con distintas personas a las que yo no conocía me hizo aprender cómo adaptarme y convivir con cada una de ellas, además de que todas me brindaron conocimiento para mi vida profesional y personal, que aprecio y agradezco bastante. Esto fue enriquecedor no sólo porque se trataba de compañeros que estudiaron cosas diferentes a mí, sino que en cada caso se trataba de una realidad bastante diferente a la mía, lo que me permitía poder apoyar a las problemáticas a las que nos llegamos a enfrentar desde una perspectiva distinta, lo cual me permitió corroborar mis aprendizajes de mi año en Alemania, donde vi que la diversidad de ideas, entornos culturales y áreas de conocimiento, son la clave para mejores resultados en un proyecto.

Por último, me gustaría agregar un aprendizaje que considero invaluable para un estudiante a punto de graduarse (que tal vez sería más una nota personal): la seguridad en uno mismo. La mayoría de los estudiantes que pronto empezarán su vida laboral, se preguntan si podrán ser exitosos, sobre todo si se les encomienda una tarea en un tema que no dominan al 100 por ciento, o no conocen, pero la respuesta es que sí, siempre y cuando se pierda el miedo a lo desconocido y se tenga la disposición de aprender.

5. Conclusiones

A lo largo de este proyecto se presentaron diversos obstáculos que fueron cambiando el curso y organización de las actividades, como lo fue la falta de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas genéticamente, y que se tuvo que adicionar como un objetivo principal, el cual se logró de manera satisfactoria, porque se obtuvieron *Lactobacilos Plantarum* listos para su estudio como probióticos.

Ahora al final del proyecto, esta dificultad en realidad fue diminuta a comparación con el cierre del centro debido a la contingencia producida por el COVID-19, razón por la cual el otro objetivo principal de evaluar el efecto prebiótico de los nanoliposomas con fructanos, lamentablemente no se concluyó, pero se pudieron hacer estimaciones de los resultados en cuanto al tamaño de los liposomas, sus interacciones entre sí y el tiempo de liberación de los fructanos. Estas predicciones fueron posibles, debido a mi participación en otros dos proyectos en los que se trabajó con liposomas como medio de transporte de medicamentos contra el glioblastoma multiforme y de la tesis de un proyecto anterior donde se observó la estabilidad de los liposomas a lo largo del tracto gastrointestinal.

Para finalizar, me gustaría agradecer a la Dra. Adriana Vallejo, al Dr. Jesús Velázquez, al Dr. Oscar Rojas y por su puesto a mi asesor PAP el Mtro. Fermín Castro Aragón, por tener la paciencia y disposición de enseñarme y apoyarme a lo largo del semestre (ya sea con insumos, clases o asesorías) para que la realización de este proyecto, mi crecimiento profesional y personal fueran posibles.

6. Bibliografía

1. *Probiotika und Präbiotika: Grundlagen, Einsatz und Wirkungen*. **Hammer, HF y Aichbichler, B.** 2, Viena : Krause & Pachernegg GmbH, 2003, Vol. 5.
2. *Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosos*. **Peña, A.S.** 11, Madris : Revista Española de Enfermedades Digestivas, 2007, Vol. 99. 1130-0108.
3. *Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad*. **Icaza-Chavez, M.E.** 4, Mérida : ELSEVIER, 2013, Vol. 78.
4. *Liposomes in drug delivery: progress and limitations*. **Sharma, Amarnath y Sharma, Uma.** 154, Buffalo : ELSEVIER, 1997, Vol. 24.
5. **Dirección general de información en salud.** Gasto en salud en el sistema nacional de salud. [En línea] 09 de mayo de 2019. [Citado el: 12 de Mayo de 2020.] http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinais/gastoensalud_gobmx.html.
6. *Adipocitólisis con fosfatidilcolina*. **Fonseca, Eduardo y Bouza, Eduardo.** s.l. : Piel, 2009, Vol. 24.
7. *Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications*. **Xing, H., Hwang, K. y Lu, Y.** 9, Illinois : Ivyspring. , 2016, Vol. 6. US National Library of Medicine.
8. **UNESCO.** Banco Mundial. *Gasto en investigación y desarrollo (% del PIB)*. [En línea] <https://datos.bancomundial.org/indicador/GB.XPD.RSDV.GD.ZS>.
9. **CONACyT.** *Actividad del CONAyT por entidad federativa, Jalisco*. Ciudad de México : s.n., 2017.
10. —. *Actividad del CONACYT por entidad federativo, Campeche*. Ciudad de México : s.n., 2017.
11. —. *Actividad del CONACYT por entidad federativa, Estado de México*. Ciudad de México : s.n., 2017.
12. *La nanotecnología en México: un desarrollo incierto*. **Záyago-Lau, E. y Foladori, G.** 32, s.l. : Sociedad y Territorio, vol. x, núm. 32, 2010, Vol. x.
13. *La Cooperación Universitaria para el fomento de la cultura científica*. **Sebastián, Jesús.** 8, Madrid : Programa de Cooperación Cultural OEI, 2006. 1683-3783.
14. *Nanotecnología Farmacéutica*. **Villafuente, L.** Ciudad de México : Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 2009. ISSN 1605-4806.
15. *Nanotecnología y sus aplicaciones en la industria alimentaria*. **Jaimes, J., Rios, I. y Severiche, C.** 41, Cartagena de indias : Alimentos Hoy, 2017, Vol. 25. ISSN 2027-291X.
16. *Umweltfreundlicher Strassenbelag - photokatalytischer Stickstoffdioxidabbau unter Nutzung der Nanotechnologie*. **Wang, D., y otros.** 310, Bremen : Carl Schuenemann Verlag GmbH, 2018. ISSN 0943-9331.
17. **Baldo, M.** Introduction to Nanoelectronics. *MIT OpenCourseWare*. Cambridge : MIT, 2011.
18. *La nanotecnología farmacéutica es una realidad*. **Guerrero-Arellano, H., Caicedo-Salazar, J. y Guerrero-Zambrano, E.** 2, Guayaquil : Dominio de las Ciencias, 2017, Vol. 3. ISSN 2477-8818.
19. *Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems*. **Alavi, M., Karimi, N. y Safei, M.** 1, Kermanshah : Advanced Farmaceutical Bulletin, 2017, Vol. 7. doi: 10.15171/apb.2017.002.
20. *Adapting liposomes for oral drug delivery*. **He, H., y otros.** Shangai : Acta Pharmaceutica Sinica B, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.06.005>.
21. *Stimuli-responsive liposomes for drug delivery*. **Lee, Y. y Thompson, D.H.** 5, s.l. : Wiley, 2017, Vol. 9. DOI: 10.1002/wnan.1450.
22. *Phospholipids in marine environments: a review*. **Shuzumura, M.** Tsukuba : Elsevier, 2005, Vol. 66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.027>.
23. *Phospholipids: Unique carriers for drug delivery systems*. **Singh, R., Gangadharappa, H.H. y Mruthunjaya, K.** s.l. : Elsevier. Journal of Drug Delivery Science and Technology , 2017, Vol. 39. DOI: doi:10.1016/j.jddst.2017.03.027 .

24. **Althaus, F., y otros.** Grundlagen der Pharmakologie. Zürich : s.n., 2013.
25. *A Cheap and Convenient Method of Liposome Preparation Using Glass Beads as a Source of Shear Force.* **A., Wang., y otros.** s.l. : AAPS PharmSciTech. Springer, 2017, Vol. 8. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0812-3>.
26. **Marasini, N., y otros.** Chapter Twelve - Liposomes as a Vaccine Delivery System. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development* . s.l. : Elsevier. William Andrew Publishing. ISBN 9780323399814, 2017.
27. *An Updated Review on: Liposomes as drug delivery system.* **Sharma, D. y Ali, A. 2,** s.l. : PharmaTutor, 2018, Vol. 6. ISSN 2347-7881.
28. *Liposome: Methods of preparation an applications.* **Dua, J., Rana, A.C. y Bhandari, A.K.** Jodhpur : International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, 2012. ISSN 2229-4619.
29. *Lateral organization of mixed, two-phosphatidylcholine liposomes as investigated by GPS, the slope of Laurdan generalized polarization spectra .* **Vallejo, A.A., Velázquez, J.B. y Fernández, M.** México D.F : Elsevier. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, Vol. 466.
30. *Non digestible oligosaccharides modulate the gut microbiota to control the development of leukemia and associated cachexia in mice.* **Bindelis, L., y otros.** 6, s.l. : PloSone, 2015, Vol. 10.
31. *Effect of Agave Fructans and Maltodextrin on Zn²⁺ Chlorophyll Microencapsulation by Spray Drying.* **Fermat, C., y otros.** s.l. : Wiley. Journal of Food Quality, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6312584>.
32. **Tortora, G., Funke, B. y Case, C.** *Introducción a la microbiología. 9a. Edición.* s.l. : Pearson Education. ISBN 978-950-06-0740-7, 2007.
33. **Gastón, N.** FRUCTO-OLIGOSACÁRIDOS DE CADENA CORTA COMO PROTECTORES DE BACTERIAS LÁCTICAS DESHIDRATADAS. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN. La plata : Universidad Nacional de La plata, 2016.
34. **A.A., Vallejo y Fernández, M.** FRET between non-sustrate probes lateral lipid domain formation during phopholipase A2 interfacial catlysis. s.l. : Elsevier. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. Vol. 480.
35. **Ansari, N., y otros.** EVALUATION OF WHEY WATER AS GROWTH MEDIUM FOR LACTOBACILLUS SPECIES. s.l. : International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2017. Vol. 8, 1. ISSN : 0976-4550.
36. **DIBICO.** Agar MRS. Ciudad de México : s.n., 2017.
37. **BD Diagnostic Systems Europe.** BD LBS (Lactobacillus Selection Agar). 2003.
38. **Sanders, E.** Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *Journal of Visualized Experiments.* s.l. : PunMed, 2012. DOI: 10.3791/3064.
39. **Sambrook, J. y Rusell, D.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* s.l. : Spring Harbor Laboratory Press, 2001. ISBN: 0-8769-577-3.
40. *Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues.* **Arseneau, J-R., Steeves, R. y Laflamme, M.** 4, s.l. : Wiley, 2017, Vol. 17. DOI: 10.1111/1755-0998.12616.
41. *Programa control de calidad de muestras.* **Banco Nacional de ADN Carlos III.** Salamanca : s.n., 2016.
42. *Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer.* **Desjardins, P., Hansen, J. y Allen, M.** 33, s.l. : Journal of Visualized Experiments , 2009. 10.391/1610.
43. *Nanosized tin dioxide: Spectroscopic (UV-VIS, NIR,EPR) annd electrical conductivity.* **Popescu, D., y otros.** 12, s.l. : Royal Society of Chemistry. Physicañ Chemistry Chemical Physics, 2001, Vol. 3. DOI: 10.1039/B100553G.

44. **Arenas, I. y López, J.** Espectrofotometría de absorción. Cuernavaca : Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
45. **BioRad.** Mini Sub-Cell GT Cell. [En línea] 2020. [Citado el: 26 de Marzo de 2020.] <https://www.bio-rad.com/es-mx/product/mini-sub-cell-gt-cell?ID=85b69e1d-8ee0-4184-96bc-cd47e87d42f6>.
46. **Arenas, R.** *Microbiología ilustrada*, 5a edición. s.l. : McGraw Hill, 2014. 9786071511256.
47. *Current Protocols in Microbiology. Differential Staining of Bacteria: Gram Stain.* **Moyes, R., Reynolds, J. y Breakwell, D.** 1, s.l. : Wiley, 2009, Vol. 15. DOI: 10.002/9780471729259.
48. **García, M.J.** *Efecto electroviscoso y caracterización de sistemas coloidales modelo y microgeles.* Granada : s.n., 2000.
49. *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?* **Bhattacharjee, S.** Págs. 337-351, Dublin : Elsevier. Journal of Controlled Release, 2016, Vol. 235. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.06.017 .
50. **Malvern.** *Zetasizer nano series.* Worcestershire : Spectris, 2014.
51. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. Chapter 6: Zeta Potential Measurement .* **Clogston, J. y Patri, A.** s.l. : Springer, 2010, Vols. págs. 63-70. DOI:10.1007/978-1-60327-198-1_6 .
52. **Mukbabiani, O., y otros.** *Composite Nanomaterials for Industry, Electronics and the Environment: Research and Applications.* Toronto : Apple Academic Press, 2020. ISBN: 978-0-42945-793-7.
53. *Prevención de intoxicación por medicamentos. Informe preliminar.* **Moscote, Sol Maria y Mazenett, Enrique.** 2, Granada, España : Pharmacy Practice, 2004, Vol. 2. 1885-642X.
54. *Panorama epidemiológico de las intoxicaciones en México.* **Pimentel, Leticia, y otros.** 2, Ciudad de México : Medicina interna de México, 2005, Vol. 21.
55. **Schulz, M., y otros.** *Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics.* Berlín : Critical Care, 2012. 16:R136.
56. **Rodríguez, N.** Evaluación de liposomas como sistemas de nanoencapsulamiento y su estabilidad con fructanos de agave tequilana. En un sistema de digestión ex vivo. 2017.
57. *México y el reto de las enfermedades crónicas no transmisibles. El laboratorio también juega un papel importante.* **Barba, J.** 1, Mérida : Revista latinoamericana de patología clínica, 2018, Vol. 65.
58. *Medicina del estilo de vida: trabajando juntos para prevenir la epidemia de las enfermedades crónicas en Latinoamérica.* **De La Cruz, J., y otros.** 2, s.l. : Ciencia e innovación en salud, 2017, Vol. 4. DOI: 10.17081/innosa.4.2.2870.

Anexos (en caso de ser necesarios)

[Es todo lo que soporte el documento; que no es necesario añadirlo en el cuerpo del reporte, pero que sirve para su mejor comprensión: materiales elaborados, bitácoras, fichas, fotografías, mapas, etc.]