



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**LIPOSOMAS NANOMAGNÉTICOS EN LA PURIFICACIÓN DE
BACTERIOCINAS: DETECCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS A
TRAVÉS DE UN MÉTODO RÁPIDO Y EFICAZ**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA**

AUTOR: YOHANA CAMPOS SÁNCHEZ

PROFESOR GUÍA: BLGA. MG. CS. OLGA LOBOS GILBERT

TALCA-CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bacteriocinas	5
1.2 Antecedentes Bacterias Ácido Láctica (BAL)	7
1.3 Clasificación bacteriocinas	8
1.4 Mecanismo de acción bacteriocinas	11
1.5 Resistencia de bacteriocinas	13
II. PURIFICACIÓN	17
2.1 Purificación de bacteriocinas	19
2.2 Purificación de proteínas con nanopartículas	22
III. LIPOSOMAS	27
3.1 Composición estructural de liposomas	29
3.2 Síntesis de liposomas	30
3.3 Clasificación de los liposomas	32
3.4 Liposomas nanomagnéticos	38
IV. NANOPARTÍCULAS EN BIOMEDICINA	40
4.1 Nanopartículas magnéticas	42
4.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas	44
4.3 Propiedades magnéticas de NPMs	46
V. CONCLUSION	50
VI. REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla N° 1. Clasificación de bacteriocinas	10
Tabla N° 2. Principales bacteriocinas y microorganismos productores	10
Tabla N° 3. Cuadro comparativo liposomas	37
Tabla N° 4. Ventajas y desventajas del uso de nanopartículas	48
Figura N° 1. Mecanismo de acción de nisina sobre la membrana bacteriana	13
Figura N° 2. Representación esquemática general de un método de purificación	19
Figura N° 3. Representación esquemática de uno de los protocolos más empleados en el proceso de purificación de las bacteriocinas	21
Figura N° 4. Estructura de un liposoma encapsulando una droga hidrofílica e hidrofóbica	28
Figura N° 5. Tipos de liposomas	34
Figura N° 6. Clasificación de liposomas según parámetros estructurales	35
Figura N° 7. Diferentes aplicaciones biomédicas de nanopartículas	41
Figura N° 8. Factores que influyen en la actividad biológica de nanopartículas	43
Figura N° 9. Representación métodos de síntesis de nanopartículas	45

RESUMEN

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas producidas por distintas bacterias, entre ellas, las bacterias ácido lácticas (BAL). Se caracterizan por su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, ya sean contaminantes o patógenos en alimentos. Especialmente, realizan su acción sobre aquellos que son similares genéticamente a la bacteria productora, poseen actividad bactericida y/o bacteriostática. Actualmente, se utilizan como una barrera en la biopreservación de alimentos para el reemplazo de aditivos químicos. Típicamente, son péptidos catiónicos, anfifílicas y difieren, principalmente, en peso molecular, presencia de aminoácidos, pH, y modificaciones post-traduccionales. Tienen un amplio espectro sobre bacterias Gram positivo y Gram negativo, incluyendo agentes etiológicos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y enfermedades humanas. Las bacteriocinas de BAL son de origen ribosomal y actúan, principalmente, formando poros en las membranas de las bacterias, causándoles la apoptosis. Son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria por su capacidad de conferir diferentes características sensoriales como textura, sabor y olor agradable a los alimentos fermentados ya que consiguen alargar la vida útil de estos y proporcionar seguridad contra bacterias que puedan afectar la salud del consumidor.

En esta investigación se indagará respecto de la purificación parcial de productos antimicrobianos basada en la utilización de liposomas nanomagnéticos que faciliten su extracción ahorrando tiempo y costos con el fin de obtener sustancias efectivas contra patógenos y contaminantes de alimentos.

Palabras claves: Bacteriocinas, purificación, nanopartículas, liposomas, magnetismo

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la industria alimentaria se ha visto afectada por la demanda de los consumidores que consideran que gran parte de los alimentos procesados presentan un bajo nivel nutritivo y cuyos aditivos sintéticos o conservantes químicos pueden volverse peligrosos para la salud. En respuesta a estas necesidades, ha surgido un gran interés en desarrollar alimentos mucho más naturales que no tengan un impacto negativo para la salud, sin conservantes químicos y libres de microorganismos patógenos. A raíz de esto, las bacteriocinas son una solución frente a esta problemática, las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosomalmente, segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores o alterantes de materia prima, por lo que pueden ser utilizadas como conservadores biológicos para la preservación de los alimentos.

Las bacteriocinas tienen una actividad antimicrobiana variable, sin embargo, las de mayor interés son las producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL), siendo éstas un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivo, aerotolerantes, no patógenas, ni toxigénicas que producen ácido láctico como el único producto de la fermentación de carbohidratos. Presentan un gran potencial biotecnológico lo que les permite tener diversas aplicaciones en la industria alimentaria.

Por otra parte, la purificación de proteínas o de péptidos, es un proceso que cuenta con varias etapas, cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la proteína o molécula en estudio, esto implica aislarlas a partir de su fuente, en base a diferencias en sus propiedades físicas para así obtener la mayor cantidad de producto funcional con el menor número de

contaminantes. La purificación es una etapa fundamental en la caracterización de la función, estructura e interacción de la proteína con otras moléculas.

La purificación de proteínas se puede lograr mediante diferentes protocolos experimentales, algunos de ellos largos y dificultosos. En este estudio, se abordará la purificación de estos productos utilizando liposomas nanomagnéticos formados por vesículas esféricas con una doble capa de fosfolípidos, cuya constitución es en base a compuestos de materiales biodegradables y no tóxicos para la célula, y capaces de proteger de la degradación enzimática.

Actualmente, el interés por los liposomas ha aumentado debido a su utilización como sistemas de transporte para las industrias farmacéutica y cosmética, principalmente, pues son estructuras biocompatibles para encapsular proteínas, ácidos nucleicos y fármacos. Presentan gran semejanza con las estructuras de la membrana celular, lo que permite absorber y transportar sustancias hidrosolubles como conservantes químicos favoreciendo su uso tanto en medicamentos como en cosméticos, incluso en biotecnología en casos de terapia genética.

Los liposomas ofrecen una nueva alternativa de purificación de sustancias antimicrobianas de origen natural como las bacteriocinas, cuyas formas de extracción y purificación, normalmente, conlleva protocolos largos y complejos para obtener productos de alta calidad.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el uso de liposomas nanomagnéticos como un nuevo método rápido y eficaz en la purificación parcial de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Las sustancias antimicrobianas son producidas por numerosas especies bacterianas presentando diversas capacidades letales o inhibitorias. Ya que estos compuestos antimicrobianos resultan ser efectivos para el control de microorganismos patógenos y contaminantes de alimentos, pueden además actuar como bioconservantes alimentarios. Lo anterior, hace que la purificación de este tipo de compuestos cobre vital importancia. Sin embargo, con los métodos actuales, el tiempo requerido es alto y con una gran cantidad de trabajo y protocolos normados. A través del uso de liposomas nanomagnéticos se busca purificar parcialmente productos antimicrobianos, como las bacteriocinas de manera mucho más rápida y eficaz. La metodología basada en la utilización de liposomas nanomagnéticos podría facilitar la extracción de estos productos, así como también ahorrar tiempo y costos obteniéndose sustancias antimicrobianas efectivas en el control de microorganismos patógenos y contaminantes de alimentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evidenciar la efectividad de liposomas nanomagnéticos en la purificación parcial de bacteriocinas.
2. Exponer, con base en la literatura, que el uso de liposomas nanomagnéticos permite el ahorro de tiempo y disminución de costos durante el proceso de purificación parcial de bacteriocinas.

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión bibliográfica con la información disponible acerca de "Liposomas nanomagnéticos en la purificación de bacteriocinas: Detección de sustancias antimicrobianas a través de un método rápido y eficaz". Para esta búsqueda se consultaron bases de datos nacionales e internacionales para asegurar la calidad de la información. Las bases de datos consultados fueron Web of Science, Pubmed, Scopus, Google académicos, entre otros. En este contexto, se consideraron solo referencias a investigaciones publicadas durante los últimos 10 años.

2. MARCO TEÓRICO

1.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de naturaleza proteica, de bajo peso molecular, termoestables, con diferentes niveles y espectros de actividad y sintetizadas en los ribosomas de las bacterias productoras cuando estas se encuentran bajo situaciones estresantes o que demanden mayor esfuerzo por parte del microorganismo (1). Se estima que el 99% de las bacterias son capaces de sintetizar al menos una bacteriocina, éstas pueden ser producidas por bacterias Gram positivo o Gram negativo (2), tales como: *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis* y algunas especies de *Bacillus*, entre las más comunes.

Los primeros reportes se publicaron hace más de 80 años, cuando se descubrió un antagonismo entre las cepas de *Escherichia coli*, donde estas sustancias fueron llamadas colicinas. El uso de las bacteriocinas fue inicialmente observado por Mechnikoff a principios del 1900, quien reportó los efectos benéficos de las bacterias productoras de ácido láctico en la prevención y tratamiento de enfermedades intestinales (3). Entre los años 1933 y 1947 se realizaron las primeras investigaciones sobre nisina, que actualmente es una bacteriocina reconocida como segura para la conservación de alimentos por organismos de importancia como la Food and Drug Administration FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) y la OMS (Organización Mundial de Salud) (4). Tradicionalmente, se ha considerado a estos péptidos como biológicamente activos con propiedades bactericidas contra especies estrechamente relacionadas a la cepa productora, sin embargo, recientemente esto ha ido cambiando ya que se han encontrado acciones bactericidas en cepas distintas filogenéticamente de la cepa productora.

Su producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de esta, presentando siempre una relación directa con la biomasa producida (5). Son secretadas extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o bacteriostática sobre microorganismos indeseados, asociados principalmente al deterioro de alimentos o causales de alguna enfermedad, dando como resultado productos estables y seguros para el consumo diario. Se caracterizan por tener una actividad antimicrobiana variable, actuando especialmente sobre bacterias Gram positivo ya que pueden desestabilizar los polímeros aniónicos de la pared celular (ácido teicoico y lipoteicoico), junto con la afectación de la síntesis de DNA y proteínas (6). Una de las formas más conocidas de caracterizar las bacteriocinas es por su estabilidad al calor y a pH ácidos, esto se atribuye a la formación de estructuras globulares pequeñas, presencia de regiones hidrofóbicas, y formación de enlaces cruzados (7) estables en su estructura. Lo anterior permite la fermentación y conservación de los alimentos, mejorando su calidad higiénica al inhibir total o parcialmente la microbiota competitiva presente.

Las bacteriocinas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Como ya se ha mencionado anteriormente, existe una gran cantidad de bacteriocinas y cada una con un espectro de inhibición particular, característica que es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos (8), mejorando la digestibilidad y aumentando la respuesta del sistema inmune. A raíz de esto, surge el término de bacteriocinogenicidad, el cual se refiere a la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagonicas de otros microorganismos (9), por lo que se deduce que las BAL (bacterias ácido-láctico) presentan esta característica bien definida.

1.2 Antecedentes Bacterias Ácido Láctica (BAL)

Las bacteriocinas de mayor interés son las producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), estos microorganismos, en su mayoría son bacilos o cocobacilos Gram positivo, aerotolerantes, no esporulados, anaerobios, con tolerancia a temperaturas elevadas y condiciones de pH bajo, catalasa y oxidasa negativo, con contenido de G+C inferior a 50mol%. (10). Diversos autores han demostrado que este grupo de bacterias es el más abundante y difundido en la naturaleza debido a la capacidad de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas (11), los géneros que constituyen este grupo son: *Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp*, *Lactococcus spp*, *Pediococcus spp* y *Carnobacterium spp*. El grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo (12). El crecimiento de BAL en aerobiosis conduce a la formación de varios metabolitos provenientes del oxígeno como; peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales libre los cuales según la concentración en la que se encuentren, tendrán un efecto bactericida o bacteriostático frente a la flora láctica y no láctica.

Algunas BAL han sido aisladas de alimentos como la carne, y productos lácteos, razón por la que actúan sobre microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) (13) como, por ejemplo; *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Salmonella spp*. Las BAL constituyen un grupo muy heterogéneo que producen solo ácido láctico como producto del proceso de fermentación (14), en simples palabras transforman la lactosa de la leche en ácido láctico que es el responsable del sabor “ácido/amargo” que toma la leche luego de unos días. Según su definición, las bacteriocinas se inactivan por enzimas de carácter proteolítico, como las de origen pancreático (tripsina, alfaquimiotripsina) y origen gástrico (pepsina, proteinasa K), por lo que estas luego serán inactivadas en el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar riesgos asociados al uso de antibióticos (15).

Al ser comparadas con las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram negativas, éstas presentan un espectro de inhibición mucho más amplio, puesto que las Gram negativo como *Escherichia coli* tienen un espectro de acción mucho más limitado (16) actuando sobre especies estrechamente relacionadas. Lo anterior, reduce las posibilidades de explotarse como bio-conservantes, además, las bacteriocinas de Gram positivo presentan una escasa toxicidad para la célula y son consideradas seguras para su consumo (GRAS, por sus siglas en inglés) (17). Últimamente, han sido estudiadas como cultivos probióticos ya que se complementan con las bacterias que se encuentran en la microbiota intestinal, contribuyendo con el buen funcionamiento del aparato digestivo.

1.3 Clasificación bacteriocinas

En función de los productos del proceso de fermentación, las bacteriocinas de BAL se pueden clasificar en 2 tipos: homo y heterofermentativas. Las homofermentativas son aquellas en que el único producto de fermentación de carbohidratos es el ácido láctico, dentro de esta clasificación se encuentran: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* (18). Por otro lado, están las BAL heterofermentativas que son capaces de producir ácido láctico (solo en un 50%), dióxido de carbono, etanol o ácido acético (19). Los géneros más comunes heterofermentativos son; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.

Los péptidos antimicrobianos producidos por BAL se han clasificado en 5 grupos o clases según su estructura, propiedades moleculares y bioquímicas:

- ✓ Clase I: Lantibióticos. Péptidos pequeños de bajo peso molecular, activos a nivel de membrana, termolábiles, contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina y dihidroalanina, debido a la deshidratación de serina y treonina producto de modificaciones posteriores a la traducción. Son los únicos que se producen en el ribosoma como un pre-péptido para luego formar un péptido activo. Los lantibióticos se subclasifican en clase Ia y clase Ib. La clase Ia son péptidos lineales/elongados, catiónicos, con carga neta positiva donde encontramos nisina, producida por *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, la cual es reconocida por la FDA como GRAS (20), su acción reside en la destrucción de la célula bacteriana por despolarización de la membrana. En el caso de la clase Ib, éstos son péptidos globulares, con carga neta negativa o neutra, que inhiben las reacciones enzimáticas, se destaca la bacteriocina mersacidina. (3)
- ✓ Clase II: No Lantibióticos. Péptidos pequeños y lineales, no modificables post-traduccionalmente, termoestables, actúan a nivel de membrana plasmática y se subdividen en 3 grupos; IIa, IIb y IIc. El primero, son péptidos activos con una importante actividad antimicrobiana contra *Listeria*, se destaca la Pediocina PA-1. La clase IIb, es formadora de complejos, está conformado por bacteriocinas con 2 péptidos para aumentar la actividad antimicrobiana, su acción consiste principalmente en formar poros en la membrana y se encuentra la lactococcina G. La clase IIc está compuesta por péptidos pequeños, termoestables, no modificables post-traduccionalmente y se encuentran las bacteriocinas divergicina A y acidocina B. (6)
- ✓ Clase III: Péptidos de alto peso molecular. Termolábiles, catalizan e hidrolizan la pared celular de las células sensibles, la bacteriocina más representativa es la helveticina J. (21)
- ✓ Clase IV: Péptidos cíclicos asociados a lípidos o carbohidratos. Presentan una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica, la más representativa es lactocina S (glicoproteína), sin embargo, aún no son profundamente caracterizadas. (4)
- ✓ Clase V: Péptidos de estructura circular. Son aquellos péptidos circulares no modificados post-traduccionalmente, dentro de esta clase se encuentran la enterocina AS-48 y gasericina A. (22)

Tabla N° 1: Clasificación de bacteriocinas (1)

Tomado y adaptado de Heredia (2017)

Clasificación	Característica	Subcategoría	Ejemplo
Clase I (lantibióticos)	-Péptidos que contienen aminoácidos modificados (lantionina, B-lantioninato).	-Tipo A (moléculas lineales) -Tipo B (moléculas globulares)	-Nisina, subtilina, epidermina. -Mersacidina.
Clase II	-Clase heterogénea de péptidos termoestables pequeños	-Subclase IIa (pediocina-antilisteria) -Subclase IIb (compuesto de dos péptidos) -Subclase IIc (otras bacteriocinas)	-Pediocina, enterocina, sakacina. -Plantaricina, lacticina F. -Lactococcina.
	-Grupo de péptidos lineales -Degradación de proteínas grandes.	-Subclase IId -Subclase IIe	-Lacticina Q. -Propionicina F.
Clase III	-Péptidos grandes termolábiles.		-Helvectina J, millericina B.
Clase IV	-Péptidos cíclicos (asociados con lípidos y carbohidratos)		-Reutericina 6, Lactocina S.
Clase V	-Péptidos de estructura circular		-Enterocina AS-48, gasericina A.

Tabla N° 2: Principales bacteriocinas y microorganismos productores (3)

Tomado y adaptado de Monroy (2012)

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum WHE92</i>
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici JD1-23</i>
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake 706</i>
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake LTH673</i>
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus LTH1174</i>
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum C11</i>
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris 9B4</i>
Lactatina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens LV13</i>
Helvectina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

La clasificación de las bacteriocinas se ha ido modificando con el transcurso del tiempo. Como punto inicial, se establecieron 4 grupos o clases distintas (I, II, III y IV) y eso se mantuvo hasta 1996 donde el grupo IV correspondiente a los péptidos cíclicos no se consideraron para una reclasificación. Luego en el año 2000 el grupo IV siguió siendo eliminado, pero la clase II fue la que tuvo mayores modificaciones. En estudios actuales, no se hace referencia a una clase IV, por lo que solo se mantienen las 3 primeras clases. En otros casos se vuelve a establecer la existencia de una clase IV o V para las bacteriocinas circulares. Cabe destacar que la clasificación de estos péptidos aún no llega a consenso, por lo que existe la posibilidad de volver a reclasificar las bacteriocinas.

1.4 Mecanismo de acción bacteriocinas

Dentro de los mecanismos de acción reportados se destacan varias características esenciales para que las sustancias puedan llevar a cabo su actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) independiente de la célula diana, membrana celular o pared celular (23), junto con la interacción de proteínas importantes que influyen en el metabolismo de la célula. Estos péptidos tienen una carga neta positiva que favorecen la interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos que se encuentran en la membrana de las bacterias Gram negativo y en el caso de las bacterias Gram positivo se ve favorecida la interacción con el ácido teicoico y lipoteicoico de la pared celular (24).

La hidrofobicidad es necesaria para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, la flexibilidad permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a un estado de interacción con la membrana (25). Los mecanismos de acción se basan en la

formación de poros, degradación del DNA e inhibición de la síntesis del péptidoglicano. La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana de las células a través de la formación de canales o poros (26), iniciándose la interacción de la bacteriocina hacia la bacteria diana, mediante fuerzas electrostáticas que comienzan con la unión de la región N-terminal (región hidrofílica) de la primera, con la parte polar de la membrana celular de la bacteria, luego de unidas, la región hidrofóbica (región C-terminal) penetra la región no polar de la membrana (27), formándose el poro, ya que estos péptidos antimicrobianos están cargados positivamente e interactúan con los fosfolípidos de membrana de las bacterias (cargados negativamente) desestabilizan y permeabilizan las células sensibles provocando la salida de iones y metabolitos (28) fundamentales para su supervivencia como fosfato, potasio, aminoácidos y ATP. Lo anterior, que tendrá como consecuencia la pérdida del potencial de membrana, consumo de reservas energéticas, junto con la disminución de la síntesis de macromoléculas, produciéndose de esta forma la muerte celular.

En el caso de nisina, se une al lípido II (principal transportador de las subunidades de péptidoglicano → molécula precursora de la síntesis de la pared celular) como acoplamiento molecular generando la pérdida del potencial de membrana y del contenido celular evitando la síntesis del péptidoglicano (4) y provocando la muerte de la bacteria.

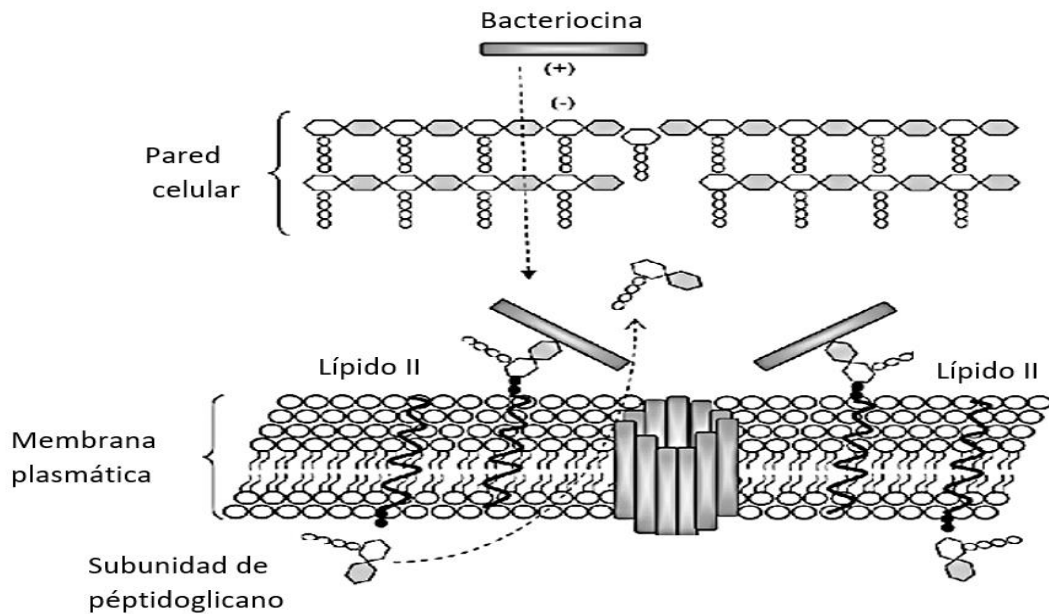


Figura N° 1. Mecanismo de acción de nisina sobre la membrana bacteriana (19).

Tomada de López (2008)

1.5 Resistencia de bacteriocinas

La resistencia contra las bacteriocinas se ha informado con frecuencia en aislamientos tanto naturales como clínicos, sin embargo, existen muy pocos reportes debiéndose, principalmente, a que presentan un mecanismo de acción rápido, ya que reconocen moléculas receptoras en la célula diana permitiendo una proximidad cercana a la membrana celular para la posterior formación de poros en la membrana de la bacteria incluso cuando se encuentran a bajas concentraciones, lo que les da una gran ventaja para poder ser aplicadas en la actualidad frente al control de patógenos de interés o en estudio. (29, 30, 31)

La resistencia innata puede deberse a la incapacidad de la cepa diana para unirse a la bacteriocina o a la producción de proteinasas que pueden proporcionar protección parcial al escindir moléculas de bacteriocina externas. Por otra parte, la resistencia espontánea puede ocurrir a partir de modificaciones en el ADN llevando a cambios en la unión con su receptor. (30).

Bien es sabido, que estos péptidos antimicrobianos son termoresistentes, ya que según diversos estudios no disminuyen de manera significativa su actividad cuando son expuestos a tratamientos térmicos, ya sean procesos de liofilización y congelación. No obstante, los criterios de termoestabilidad son difíciles de definir, ya que dependen de parámetros, tales como purificación, pH, fuerza iónica y presencia de moléculas protectoras. Dentro del grupo de bacteriocinas termolábiles, si bien son pocas, encontramos a Helvectina J y Caseicina 80, entre las más representativas (29).

De acuerdo con lo reportado, la exposición a una dosis alta de bacteriocina resulta en densidades celulares totales significativamente más bajas que en los tratamientos de no bacteriocina y bacteriocina de dosis baja. Esto, si bien es un punto a favor debido a la efectividad de la dosis alta para reducir la densidad celular total, también se impone como una fuerte selección para la resistencia a la bacteriocina. Por otro lado, con dosis bajas de bacteriocina, no hubo una fuerte selección de resistencia, pero fue menos efectiva para suprimir las densidades totales de la cepa objetivo que la dosis alta.

Acorde los resultados y datos obtenidos, se sugiere que la incorporación de una cepa competidora junto con dosis de bacteriocina puede disminuir de manera significativa la densidad de células resistentes, suprimiendo las densidades celulares y la pronta evolución de la resistencia contra los péptidos. Lo anterior, proporciona pistas favorables para sugerir el uso de un agente bioterapéutico como un competidor heteroespecífico que pudiese conferir una mayor sostenibilidad al uso de bacteriocinas como agentes terapéuticos alternativos. (31).

También, está el caso del uso de mezcla de bacteriocinas con distintos mecanismos de acción que reducen la probabilidad del desarrollo de resistencia. Se puede obtener una sinergia de estos productos al inhibir los microorganismos. Lo anterior, ha sido demostrado con ensayos de inhibición utilizando combinaciones de bacteriocinas con distintos modos de acción (30), las que presentan una mayor acción antibacteriana en población sensible que cuando se usan individualmente, dado que las células resistentes a una bacteriocina podrían ser destruidas por la otra bacteriocina que compone la combinación. Varios informes sugieren que la resistencia a una bacteriocina puede extenderse a otras, ya sea dentro de la misma clase o incluso en clases distintas. No obstante, los informes de resistencia cruzada indican que el uso de múltiples bacteriocinas para lograr una mayor eficacia antibacteriana podría no ser factible, dado que estos péptidos antimicrobianos actúan sobre las células sensibles mediante un mecanismo común que disipa el gradiente químico y energético a través de la membrana citoplasmática (32).

La bacteriocina mejor estudiada es nisina producida ribosómicamente por *Lactococcus lactis* y junto con otros lantibióticos que contienen el aminoácido lantionina ejercen principalmente efectos bactericidas a través de al menos dos mecanismos de acción conocidos. Uno de ellos, es el ataque al lípido II, precursor de la pared celular unida a la membrana, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de peptidoglucano y el segundo

mecanismo alude a la conocida formación de poros de la membrana, generando un daño y la posterior despolarización de la estructura producto de la inactivación del transportador de manosa fosfotransferasa (PTS) por las bacteriocinas clase IIa formadoras de poros (33,34).

La primera bacteriocina no antibiótica no modificada post-traduccionalmente es la Lcn972 o Lactococcin 972, secretada por *Lactococcus lactis* IPLA972 que inhibe la síntesis de la pared celular en dicha bacteria (34), esta se considera la bacteriocina activa de la pared celular puesto que genera cambios tales como remodelación de la envoltura celular hacia un peptidoglican (PG) más densamente empaquetado, producción de polisacáridos estructurales o de superficie junto con activación de genes que presentan funciones protectoras y una mayor tolerancia al oxígeno en mutantes resistentes a Lcn972 (35).

Las bacterias del género *Xenorhabdus* producen una bacteriocina llamada xenorhabdicina que tiene un mecanismo conocido en donde se requiere de la fijación de la célula objetivo para inducir la despolarización de la membrana celular. Existen las bacteriocinas de dos péptidos, como plantaricina JK, plantaricina EF y plantaricina S, que tienen dos péptidos diferentes, los cuales se requieren en cantidades aproximadamente iguales para una actividad antimicrobiana óptima y el mecanismo de acción de plantaricina JK y plantaricina EF es la destrucción de las células sensibles al disipar el potencial eléctrico y el gradiente de pH (36).

Lactobacillus brevis 174A, produce una bacteriocina denominada brevicina 174A, que inhibe el crecimiento de importantes bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*. Su expresión y resistencia está controlada por dos proteínas reguladoras de la transcripción, denominadas BreD y BreG,

donde BreD se expresa junto con BreE, el cual es el gen causal de la auto-resistencia de *Lactobacillus brevis* 174A (35,36).

Últimamente, se ha investigado el mecanismo de acción de las bacteriocinas con sistema Cdz que destruyen las células objetivo a través de la permeabilización de la membrana llevando a una pérdida del gradiente de protones a través de la membrana interna. La toxina Cdz, que se adhiere a las superficies de las células productoras, está compuesta por dos proteínas hidrofóbicas, CdzC y CdzD, que juntas inducen la despolarización de la membrana interna permitiendo la muerte dependiente del contacto de las células que carecen de la proteína de inmunidad CdzI. Estas proteínas se secretan a través de un sistema de secreción tipo I, pero a diferencia de la mayoría de las bacteriocinas secretadas por los sistemas de tipo I, CdzC y CdzD se acumulan en la superficie de las células productoras para mediar la destrucción de células diana dependiente del contacto (37).

2. Purificación

El proceso de purificación es vital para la caracterización de la función, estructura y rendimiento de la muestra con la cual se está trabajando. El material inicial por lo general, en el caso de las proteínas, son tejidos biológicos o cultivos microbianos. Este consta de una serie de pasos, a modo general, hay liberación de la proteína de la matriz que lo confina, separación de las partes proteicas y no proteicas de la mezcla y lo más importante o el objetivo final de la técnica es la separación diferencial de la proteína en estudio de todas las demás.

Se debe tener en cuenta que para cualquier proceso de purificación de proteínas se deben seguir los siguientes pasos: definir un ensayo específico que identifique la proteína, elegir la fuente o matriz biológica, extraer la proteína de la fuente, estabilización de la molécula, fraccionamiento y determinación de la pureza/calidad del producto final de acuerdo a su rendimiento (38).

El primer paso, es de suma importancia, ya que de este depende la calidad y rendimiento de pureza del producto final. Hoy en día, existe una variedad de técnicas de purificación proteica, las cuales deben mantener en un equilibrio el concepto de calidad, referido al porcentaje de pureza del producto, cantidad de muestra en estudio y los costos junto con la instrumentación. Cada técnica debe tener estos 3 conceptos muy presentes, sin embargo, las limitaciones de cada uno, han hecho muy difícil tener una técnica estándar para los procesos de purificación. Es por esto, que las nanopartículas han tomado un rol protagónico, dadas sus características físico-químicas que serán mencionadas en el transcurso de este informe (39).

La elección de la fuente o matriz, corresponde a donde se encuentra la proteína de interés para luego extraerla por medio de lisis osmótica (comúnmente se utilizan enzimas), molienda o a través de un sonicador de ultrasonido que eleva las vibraciones del material dada la agitación producida. Para la estabilización se debe tener en cuenta el pH, presencia de metales pesados, contaminantes, temperatura, actividad de la molécula entre otros. Finalmente, para el aislamiento se aprovecha de las características de la proteína de interés para separarla del resto de las moléculas de la mezcla (40).

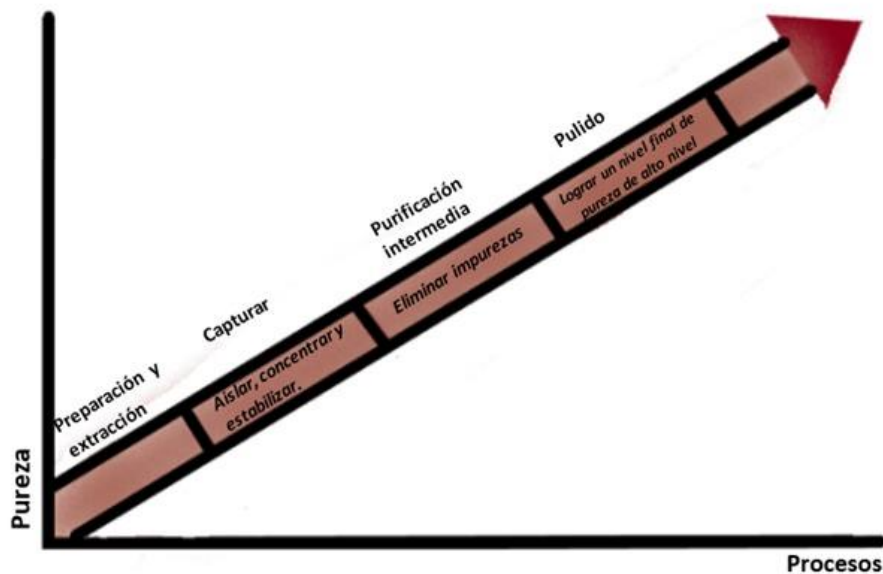


Figura N° 2. Representación esquemática general de un método de purificación

Creada por Y.C. 2020

2.1 Purificación de bacteriocinas

La purificación de bacteriocinas es un proceso que cuenta con varias etapas cuyo objetivo es lograr la concentración diferencial de la proteína o molécula de interés. Los aspectos por evaluar principalmente son calidad, cantidad y costos.

Previo al inicio de la purificación, es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos, ya que factores como la temperatura, pH,

disponibilidad de nutrientes y tiempo de incubación influyen en la producción de las sustancias (29). Con respecto al medio de crecimiento, este puede interferir o aumentar la purificación de bacteriocinas, como por ejemplo el Tween 80 que disminuye la actividad antimicrobiana de pediocina A y lactocina S (41).

En la generalidad, se han establecido 3 métodos principales para la purificación de bacteriocinas, el primero consta de un precipitado mediante sales (sulfato de amonio), intercambio iónico, interacción hidrofóbica, filtración en gel, y HPLC. El segundo método se considera simple ya que tiene 3 etapas (precipitación del sulfato de amonio, extracción/precipitación con cloroformo/metanol y HPLC) y en el tercer y último método las bacteriocinas se pueden aislar por una sola operación unitaria, usando un gel de interacción hidrofóbica, ajustando el pH del medio de producción (42). Luego de detectar la actividad antimicrobiana y de haber establecido las condiciones óptimas de cultivo que permitan una buena producción, se busca un protocolo de purificación lo más sencillo posible para obtener el grado de pureza deseado (total o parcial) con máximos rendimientos. Se han utilizado una gran variedad de procedimientos, todos con éxito diferente; esta variabilidad en los resultados se debe a la naturaleza heterogénea del grupo de las bacteriocinas (44). Por lo tanto, para obtener bacteriocinas con un alto grado de pureza, las muestras se deben someter a técnicas que permitan separar las bacteriocinas de las fracciones proteicas, basándose en sus propiedades y características fisicoquímicas.

Como se puede evidenciar, debido a la diversidad de las características de las bacteriocinas no es posible establecer un protocolo general para su purificación, sin embargo, es conveniente mencionar que las etapas básicas para su purificación, como es el caso de la precipitación de proteínas con sulfato de amonio para concentrarlas a partir de sobrenadantes de medios de cultivos. Otra etapa que no se ha podido estandarizar es la extracción con solventes como el cloroformo.

Actualmente, el protocolo de purificación con mayor difusión se basa en las propiedades de los agentes antimicrobianos, el cual consta de 4 etapas (45):

- ✓ Precipitación de proteínas con sulfato de amonio
- ✓ Cromatografía de intercambio iónico
- ✓ Cromatografía de interacción hidrofóbica
- ✓ Cromatografía de fase reversa en un sistema HPLC

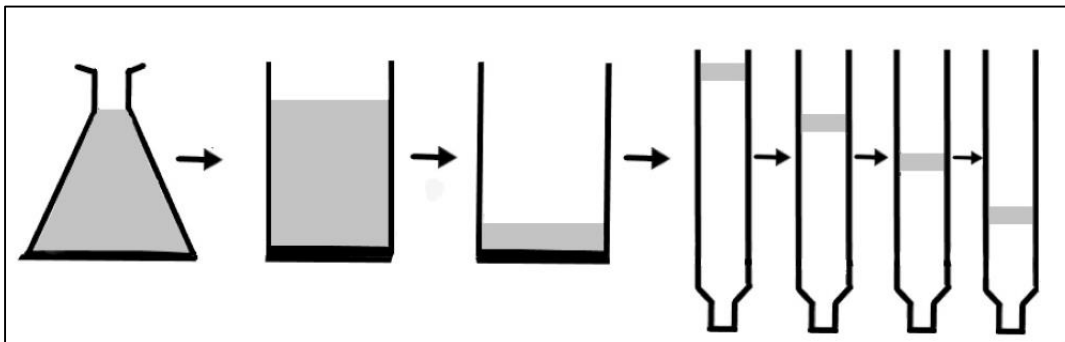


Figura N° 3. Representación esquemática de uno de los protocolos más empleados en el proceso de purificación de las bacteriocinas (43)

Tomada de Cardoso (2012)

En general, este método implica el poder ajustar el pH de los cultivos al valor en el que se produce la máxima adsorción de moléculas de bacteriocina, se recuperan las células por centrifugación, se reajusta el pH de la suspensión celular (46) hasta conseguir la liberación máxima de moléculas de bacteriocinas. Luego, se dializa, se concentra por liofilización y se aplica a una columna de fase reversa acoplado a un sistema HPLC.

Es importante destacar que mientras la bacteriocina esté más pura, esta se volverá más inestable, es decir, pierden fácilmente su actividad antimicrobiana, esto se debe a las distintas clases de bacteriocinas (mencionadas anteriormente) y sus modificaciones post-traduccionales y no precisamente a proteólisis (47), puesto que para conseguir una mayor estabilidad de la bacteriocina se necesitan pH bajo e incluso se puede adicionar proteínas como BSA (albúmina en suero bovino) (48). Por lo tanto, la eficiencia de este proceso se debe medir en cada una de sus etapas y determinar la capacidad inhibitoria de la bacteriocina estudiada y así establecer la ruta idónea para lograr una máxima purificación sin pérdida de actividad antimicrobiana (49).

2.2 Purificación de proteínas con nanopartículas

La necesidad actual de purificar proteínas en la proteómica, diagnóstico, terapéutica y otras áreas requiere de métodos de separación eficientes, que logren un buen rendimiento con una alta capacidad de unión y una buena relación costo-beneficio para la purificación proteica (50,51).

Se debe tener en consideración la existencia de un equilibrio o balance favorable entre una serie de parámetros que afectan el resultado del producto final. Estos parámetros son; velocidad de purificación, tasa de recuperación, capacidad y resolución (52).

Existen numerosos métodos convencionales para la purificación de proteínas, las más conocidas y comúnmente utilizadas son la cromatografía, precipitación, y centrifugación principalmente (51). Pero estas no están exentas de limitaciones como baja eficiencia, bajos

niveles de pureza, procesos complejos y estrictos, baja sensibilidad de detección, alta capacitación por parte de los operadores y una instrumentación de alto costo (53).

La cromatografía es la técnica de purificación principal para proteínas, pero esta presenta un rendimiento limitado y no es tan eficiente a la hora de procesar grandes cantidades de proteínas, aparte de ser una técnica compleja y que requiere de mucho tiempo (54,55).

Por otra parte, la separación magnética es considerada rápida y altamente eficiente que ofrece posibilidades únicas para la concentración simple, efectiva y rápida de proteínas, células u otras biomoléculas de interés purificadas sin exponerlas a tratamientos químicos y físicos de carácter nocivos y complejos (56).

Es a raíz de esto, que se han incorporado a las NP como estrategia para los procesos de purificación dadas sus características físico-químicas como una proporción mejorada de área de superficie a volumen, mayor bioactividad, sensibilidad, entre otros. Es por esto, que últimamente, varias nanopartículas como las magnéticas (NPM) han demostrado ser prometedoras en la extracción y purificación de proteínas. Dichas NPM han mostrado tener una notable selectividad, sensibilidad y una excelente capacidad de enriquecimiento, acortando el tiempo de los procesos y mejorando la recuperación de los productos (51,57).

En base a estudios, se ha demostrado que las nanopartículas magnéticas tienen excelentes capacidades físicas para purificar proteínas, incluyendo una alta eficiencia,

selectividad y rápida capacidad de purificación de proteínas recombinantes, junto con una alta capacidad de reciclaje y estabilidad del producto obtenido (58). La separación magnética en sí, proporciona una separación y purificación eficientes en términos de tiempo, trabajo y rendimiento mediante el uso de un campo magnético externo para capturar moléculas objetivo con NPM a través de interacción de afinidad (55).

La histidina (His) es comúnmente utilizada en separaciones de tipo magnéticas, ya que corresponde a un aminoácido que tiene tendencia a unirse a los metales, conocido como; metaloenzima. La unión entre las NPM y las proteínas etiquetadas con histidina generan enlaces fuertes y estables, lo que es favorable al momento de la separación de la proteína, pues que en la superficie de las NP hay abundantes sitios de acoplamiento para/con la histidina (53,56).

La separación de proteínas basadas en NPM, dependen del principio por afinidad magnética a través de la utilización de imanes. Básicamente se basa en la inmovilización de ligandos de afinidad con alta especificidad y selectividad en la superficie de las partículas hacia las proteínas objetivo (53,59).

Técnicas que incluyen la inmovilización de enzimas han sido ampliamente estudiadas debido a sus ventajas, ya que otorgan una estabilidad térmica, reutilización enzimática y fácil separación de la mezcla. No obstante, materiales como la magnetita (Fe_3O_4) se han considerado adecuadas para la inmovilización dadas sus características, tales como tamaño pequeño, gran superficie para la unión de las enzimas, superparamagnetismo y baja toxicidad, por lo tanto, el proceso es dependiente del magnetismo externo, sin necesidad de centrifugas, filtros u otros equipos costosos (60).

Según la afinidad magnética, se encuentran métodos directos e indirectos:

-El método directo incluye la inmovilización de los ligandos directamente a las muestras. Estos ligandos magnéticos de nanopartículas identifican y detienen las proteínas objetivo según su afinidad.

-El método indirecto o método directo inverso consiste en que los ligandos libres se mezclan con la muestra afín y conducen a la interacción de la proteína objetivo para formar un complejo. Este complejo es detectado por las nanopartículas magnéticas y posteriormente se desprende a través de un campo magnético externo.

Las alteraciones del pH o de la fuerza iónica provocan una disminución de la interacción entre las proteínas y el ligando inmovilizado en las nanopartículas, ya que comúnmente las alteraciones del pH impactan de manera significativa la elevación de la bioactividad de las proteínas (53,57).

Con respecto al rendimiento y la pureza del sistema magnético, se ha establecido que el tiempo de purificación se reduce considerablemente en comparación con los métodos convencionales. Se han utilizado MNP para purificar anticuerpos, y se ha demostrado que se puede obtener un 95% de pureza con buen rendimiento en un periodo relativamente corto (56).

Las nanopartículas magnéticas funcionalizadas de óxido de hierro Fe_3O_4 se unen al producto, según su afinidad y estos se separan a través de manipulación magnética que implica intensidades y gradientes de campo magnético apropiadamente incrementados para una separación mucho más efectiva, rápida y reutilizable sin necesidad de pasos de filtración ni centrifugación para separar el producto (61).

Según Masthoff, la adición de nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas seguidas de la separación magnética con imanes portátiles condujo a una pureza muy alta de $> 99.9\%$ con respecto a los compuestos proteicos, donde cada paso de separación fue rápido y reproducible. Incluso, las partículas se regeneraron y reutilizaron con éxito en cinco ciclos consecutivos.

Con este enfoque, varios pasos de purificación dejan de ser necesarios. Sin embargo, a través de este estudio se dejó entrever una de las desventajas del uso de nanopartículas, que es la pérdida de partículas debido a la desintegración de los aglomerados, por lo que debiese investigarse y mejorar en futuras investigaciones. Sin dejar de lado, la alta relación superficie-volumen otorgando un aumento en la tasa de unión con los ligandos y buena dispersabilidad en medios acuosos (54,61).

Las nanopartículas modificadas con anticuerpos permiten la obtención de una purificación por afinidad y enriquecimiento de proteínas integrales de membrana seleccionadas directamente de preparaciones de membranas celulares. La focalización de las nanopartículas permite el seguimiento simultáneo de cada proteína de forma individual, revelando la movilidad de estas cuando son transferidas de un entorno lipídico a otro. Por lo que, a través de esta purificación donde las NP tienen la capacidad de dirigirse a ligandos de alta afinidad y existe un enriquecimiento de diez mil veces de proteínas, se

excluyen pasos críticos como solubilización del detergente y reconstitución de la membrana tras una serie de ciclos de separación (62).

3. Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas muy pequeñas que oscilan entre los 20 nm y varias decenas de μm , pertenecen a una clase de vesículas coloidales compuestas por una bicapa de fosfolípidos, que se asemeja a la estructura de las membranas celulares. Los lípidos conformantes pueden ser de origen natural o sintético, y presentan una cabeza y una cola, de naturaleza polar y no polar o hidrófoba respectivamente, confiriéndoles propiedades anfifílicas o también denominadas anfipáticas (63). Tienen un núcleo de solución acuosa rodeado por una membrana hidrófoba que le confiere la forma de bicapa lipídica, por ende, la parte polar o cabeza se dispone de tal forma que encierra el compartimento acuoso, mientras que las colas apolares se orientan enfrentadas entre sí, para dar lugar a la formación de la bicapa. Los solutos hidrofílicos disueltos en el núcleo no pueden pasar fácilmente a través de la bicapa, mientras que los productos con carácter hidrófobo sí están posibilitados para ingresar a la bicapa fosfolipídica (64).

Se caracterizan por permanecer biológicamente inertes, ser biocompatibles y restringen la causa de reacciones tóxicas no deseadas, puesto que la mayoría de las formulaciones están diseñadas para reducir la toxicidad.

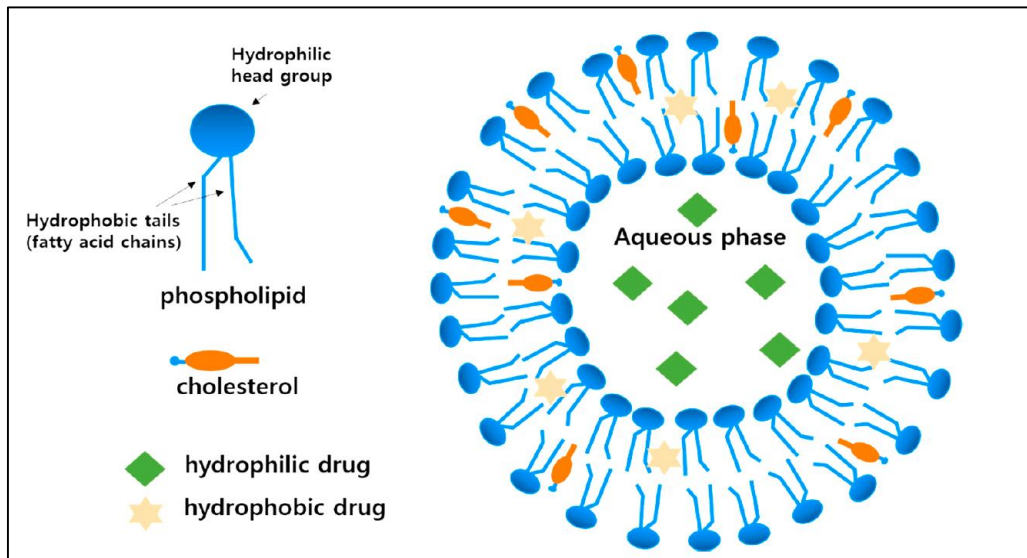


Figura N° 4. Estructura de un liposoma encapsulando una droga hidrofílica e hidrofóbica
Tomado y adaptado de Kyung-Lee (2020)

En la Figura N° 4 se observa la estructura de un liposoma, compuesto de fosfolípidos biológicamente inertes y débilmente inmunogénicos con una baja toxicidad inherente. También se muestra el encapsulamiento de fármacos de distinta naturaleza o lipofilicidad. En el caso de los fármacos lipofílicos estos quedan atrapados en la bicapa de fosfolípidos, mientras que los fármacos hidrófilos quedan insertos en el compartimento acuoso.

Los lípidos más comúnmente utilizados son los fosfolípidos para la elaboración de liposomas, dentro de estos, la lecitina (fosfatidilcolina) es la más utilizada, ya que se puede extraer de la yema de huevo y la semilla de soja, haciendo más fácil su extracción y obtención. La estructura de estas vesículas esféricas son dependientes de diversos factores, como; naturaleza química, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas presentes, pH y la carga iónica de la fase acuosa (65).

La elección de los componentes de la bicapa, es vital para determinar su rigidez o fluidez, en el caso de las especies de fosfatidilcolina insaturadas de fuentes naturales ya sea huevo o soja, estas proporcionan bicapas más permeables y menos estables (66). Los fosfolípidos saturados de cadena larga, por el contrario, forman una bicapa rígida e impermeable.

Su capacidad de encapsular activos de naturaleza muy diversa, su biodegradabilidad y la ya mencionada ausencia de toxicidad han favorecido la difusión de su utilización y aparición continuada de nuevas aplicaciones, ya que a medida que se fabrican grandes cantidades de liposomas estables y rentables, surcarán muchas aplicaciones nuevas (67).

3.1 Composición estructural de liposomas

Si bien se ha mencionado que los liposomas están formados por una bicapa de fosfolípidos que le confiere ciertas características, los principales componentes estructurales son:

-Fosfolípidos: Pueden ser de carácter natural o sintético. Son los más utilizados en la formulación de liposomas, y en las membranas biológicas representan más del 50% de su peso. Contienen glicerol el cual actúa como el “esqueleto” de la molécula. Para la obtención de vesículas estables se usan ácidos grasos saturados, dejando al descarte la utilización de ácidos grasos insaturados por su baja eficacia.

-Esfingolípidos: la columna vertebral es la esfingosina, se incluyen en los liposomas para proporcionar una capa de grupo cargado en la superficie y sirve como puente entre la parte polar y no polar.

-Esteroles: el colesterol y sus derivados influyen disminuyendo la fluidez de la bicapa y reducen la permeabilidad de la membrana, es útil para unir la estructura y “llenar” los espacios vacíos (63,66,67).

3.2 Síntesis de liposomas

La preparación de liposomas consta de 4 etapas clave para obtener un producto homogéneo y estable durante un tiempo determinado para sus funciones biológicas y/o médicas, los cuales son:

-Separación de lípidos del método orgánico

-Dispersión de lípidos en un ambiente acuoso

-Liposoma resultante de la purificación

-Analizar el liposoma manufacturado

Para lograr una buena síntesis y cumplir con las 4 etapas anteriormente mencionadas se debe tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas del material, naturaleza del medio en que se dispersan las vesículas lipídicas, concentración y nivel de toxicidad, tamaño, polidispersidad y vida útil de los liposomas para la obtención de resultados seguros y eficientes aplicadas a las nuevas tecnologías (68).

Preparación de vesículas unilaminares

- ✓ Inyección de etanol o éter. Los lípidos se disuelven en etanol o éter (disolvente orgánico), y se inyectan en una solución tampón dando lugar a la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUV), las que posteriormente se llevan a un proceso de ultrafiltración para eliminar los remanentes del disolvente orgánico utilizado.

- ✓ Diálisis con detergente. Es comúnmente empleada para preparar vesículas unilaminares grandes (LUV). Los fosfolípidos se mezclan con el detergente en una fase acuosa, dando lugar a la formación de micelas que se someten a un proceso de diálisis provocando la fusión de micelas ricas en fosfolípidos y la formación de LUV (69).

Preparación de vesículas multilaminares

- ✓ Hidratación de fosfolípidos bajo flujo hidrodinámico. Los fosfolípidos de bicapas apiladas que se encuentran depositadas en un sustrato, se rehidratan bajo fuertes flujos hidrodinámicos durante un par de horas, resultando vesículas con tamaño y número de capas heterogéneas.

- ✓ Método de esférulas solventes. Se tiene una fase orgánica compuesta de fosfolípidos y una fase acuosa que se mezcla durante un periodo de tiempo determinado, produciendo una emulsión que contiene pequeñas esférulas de solventes que contienen lípidos. Posteriormente, la fase orgánica se elimina por evaporación favoreciendo la conversión de las esférulas en MLV (70).

3.3 Clasificación de los liposomas

Dentro de las clasificaciones existentes, la más ampliamente aceptada es la que los categoriza según parámetros estructurales como lo son tamaño y número de bicapas. Según su tamaño se clasifican en liposomas grandes y liposomas pequeños, con diámetros mayores de 250 nm, e inferiores a 250 nm respectivamente. Con respecto al número de bicapas se clasifican en; unilamelares y plurilamelares. Los primeros, son aquellos compuestos por una sola bicapa. En los plurilamelares encontramos los oligolamelares (OLV), compuestos por dos o más bicapas y los multilamelares (MLV) con muchas bicapas fosfolípicas (68,71).

Los liposomas formados por una única bicapa de fosfolípidos se subclasifican en vesículas unilamelares pequeñas (SUV) y grandes (LUV), los cuales se diferencian en el diámetro, los primeros tienen un tamaño aproximado entre 20-80 nm y los unilamelares grandes miden entre 100 nm a 1 μ m. Las SUV dado su tamaño tienen una capacidad de encapsulación bajo, por lo que no se recomienda para moléculas hidrosolubles. Por el contrario, las LUV al tener un elevado volumen del compartimiento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles con mayor eficacia (72).

Por otra parte, se encuentran las vesículas plurilamelares conformadas por varias bicapas fosfolipídicas unilamelares, dando un aspecto de estructura de cebolla por la presentación de las bicapas. En este caso, se distinguen 2 tipos, oligolaminares y multilaminares. Las vesículas oligolaminares (OLV) se componen de 2 a 10 bicapas de tamaño pequeño con un rango de 100 nm hasta 1 μ m y las vesículas multilaminares (MLV) tienen más de 10 bicapas de gran diámetro rondando los 500 nm. Estas, generalmente pueden transportar fármacos acuosos o lipídicos, dependiendo de la naturaleza de esos fármacos (73).

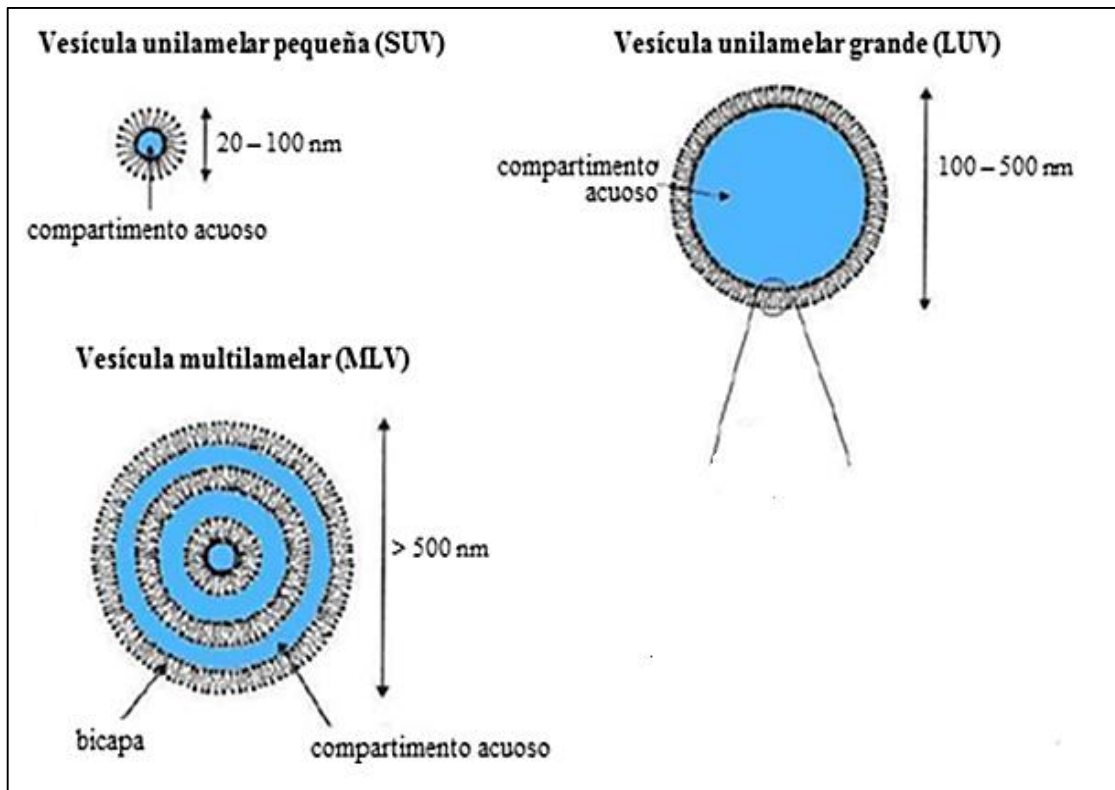


Figura N° 5. Tipos de liposomas (58)

Tomado de Ruano (2013)

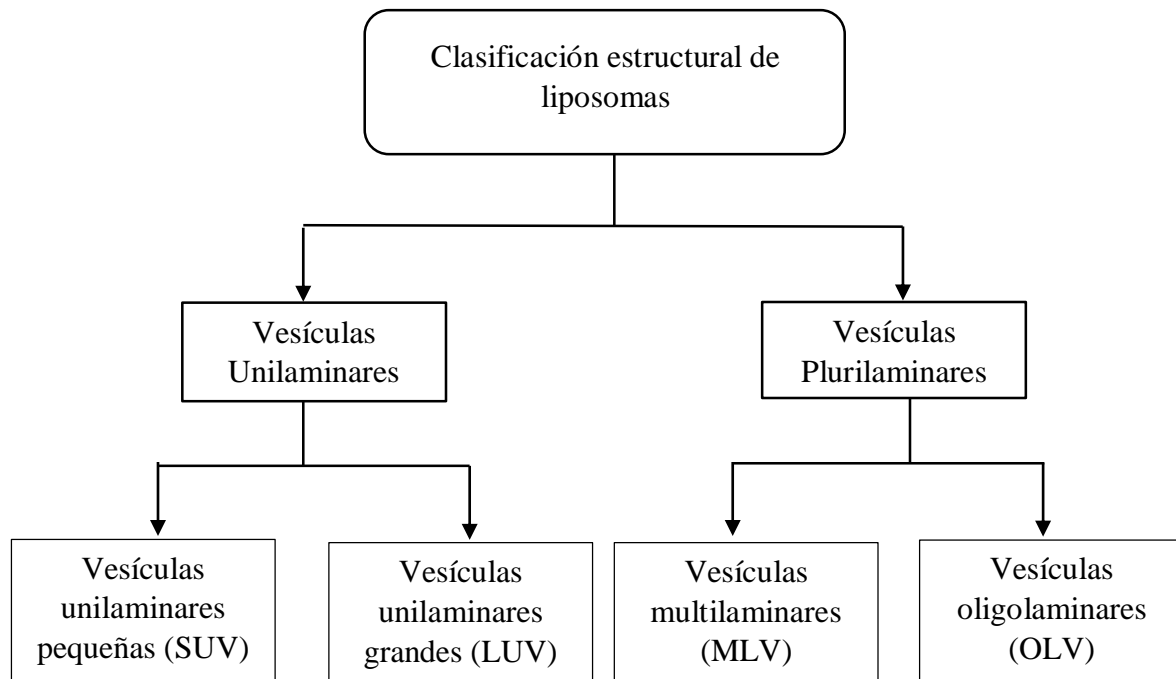


Figura N° 6. Clasificación de liposomas según parámetros estructurales

Creada por Y.C. 2020

Es importante tener en cuenta que el tamaño es útil para determinar la vida media de circulación de los liposomas y el número de bicapas afecta en la cantidad de fármaco que se va a encapsular. Dentro de las aplicaciones “in vivo”, los liposomas multilaminares son reconocidos como extraños por el sistema inmune, siendo una limitante importante para su uso, sin embargo, al ser administrados junto con un principio activo como adyuvante no provoca mayores riesgos para el sistema inmune. Por su parte, los liposomas unilaminares son de fácil producción y funcionalmente mucho más versátiles y polivalentes sobre todo en la encapsulación de principios activos.

Estas moléculas forman dispersiones coloidales, que corresponden a sistemas conformados por dos fases; una dispersa (solute) y una dispersante (solvente). Se definen como aquellos sistemas en los que un componente se encuentra disperso en otro. Caracterizadas por la presencia de partículas mayores que las moléculas ordinarias, pero no lo suficientemente grandes como para ser visibles al microscopio (74).

Además, los lípidos pueden contener un grupo esqueleto que sirve de puente entre la parte polar y apolar, comúnmente dicho grupo es glicerol o esfingosina, dando lugar a glicerolípidos o esfingolípidos respectivamente (75).

Gracias a las características de los liposomas, estos mejoran la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad del activo encapsulado, otorgándole un ambiente intacto y seguro penetrando directamente en la célula.

Los liposomas se usan principalmente para transportar principios activos de la forma más selectiva posible aumentando su eficacia, mejorando la absorción y penetración y prolongando su acción. Y además de las aplicaciones de administración de genes y medicamentos, se pueden usar como transportadores para la entrega de colorantes a textiles, pesticidas a plantas, enzimas y suplementos nutricionales a alimentos y cosméticos a la piel (76,77).

Tabla N° 3. Cuadro comparativo liposomas

Tomado y adaptado de Akbarzadeh (2013)

Ventajas de liposomas	Desventajas de liposomas
Biocompatible	Baja solubilidad
Biodegradable	Vida media corta
Toxicidad reducida	Reacciones de oxidación e hidrólisis de los fosfolípidos
No inmunogénico	Coste alto de producción
Estabilidad aumentada	
Efectos nocivos reducidos	
Reduce la exposición de tejidos sensibles a drogas tóxicas	
Protege la droga mediante la encapsulación	
Incrementan la eficacia e índice terapéutico de los medicamentos	

Tienen la capacidad de eludir los mecanismos de resistencia asociados con la disminución de la absorción o aumento del flujo de salida de los medicamentos de la célula bacteriana, formación de biofilms y localización intracelular de las bacterias (78).

Independiente del método de fabricación, este debe ser sencillo, estandarizado, reproducible y al menor costo posible.

3.4 Liposomas nanomagnéticos

La ciencia ha vivido una especie de revolución con el nuevo paradigma “nano” representado por las disciplinas de nanociencia y nanotecnología. En torno a esto, los liposomas se han convertido en una prometedora aplicación para ser utilizada en nanomedicina. Los liposomas son vesículas esféricas formadas por una membrana compuesta por una doble capa de fosfolípidos (79), que constan de partes hidrosolubles y liposolubles. Capturan en su interior parte del solvente en que se encuentran suspendidos, están hechos, normalmente, de lecitinas obtenidas de soja, yema de huevo y tejido cerebral (40). Además, para aumentar su estabilidad se le pueden agregar lípidos como fosfatidilserina y fosfatidilglicerol. El tamaño de un liposoma varía entre 20nm – 100 μ m, el tipo más utilizado para aplicaciones médicas debido a su estabilidad son los liposomas de tipo unilamelar que miden entre 80 – 200 nm (80).

Los liposomas se clasifican en base al número de bicapas; unilaminares y plurilaminares. los primeros son liposomas formados por una sola bicapa, mientras que los plurilaminares están formados por varias bicapas (81). En el interior y el exterior son hidrosolubles y el interior de la membrana es liposoluble. Las moléculas al interior de un liposoma pueden ser dirigidas a células específicas, siendo esto una posible respuesta de cómo llevar medicamentos a células enfermas disminuyendo los efectos tóxicos en células sanas (82), ya que los liposomas pueden evitar el reconocimiento y destrucción del sistema inmune. Gracias a su sistema de transporte pueden utilizarse, incluso, en biotecnología, en casos de terapia genética para introducir genes de un organismo a otro y junto con su biocompatibilidad con la membrana celular, son algunas de las razones de su aplicación en el campo de la cosmética y farmacéutica como vehículos transportadores.

La estructura de los liposomas depende de la naturaleza química, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas presentes (83), ya que son los fosfolípidos su componente más importante. Sobre esta estructura básica, principalmente constituida por fosfatidilcolinas se pueden insertar otros lípidos, proteínas, anticuerpos, biomoléculas marcadas con isótopos radiactivos, sustancias fluorescentes, etc. (84). Esta versatilidad estructural le permite al investigador diseñar los liposomas de acuerdo con los objetivos para los que serán utilizados, como, por ejemplo, transportar sustancias quimioterapéuticas anticancerígenas hacia órganos específicos, sin que afecten a otros órganos o tejidos corporales o ser utilizadas en el estudio de la preservación de los alimentos como las bacteriocinas.

En un ensayo colorimétrico reciente, se probó la interacción de distintas combinaciones de fosfolípidos con la bacteriocina nisina, ya que esta es la única aprobada para ser usada en la preservación de alimentos siendo reconocida como GRAS, este ensayo fue en base a vesículas de fosfolípidos/polidiacetileno. Las vesículas fueron sintetizadas usando 4 fosfolípidos diferentes; DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), DMPE (dimiristoilfosfenoetanolamina) y DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol) en combinación con el ácido TRCDA (ácido tricosadinóico), estas vesículas en un comienzo tenían un color azul, pero luego de la interacción con nisina viraban a un color rosado/rojo. Las vesículas DMPE/TRCDA mostraron un alto porcentaje de rendimiento o de respuesta colorimétrica después del tratamiento con nisina, por lo que estas eran las idóneas para realizar estudios posteriores junto con los cribados de las bacteriocinas. Con respecto a las condiciones de trabajo, solo bastaba con 5 minutos de incubación luego de la interacción vesícula/bacteriocina para obtener una respuesta colorimétrica significativa, por lo que este ensayo sugiere una alta sensibilidad dando una respuesta rápida y de fácil entendimiento (85,86).

En relación con la coloración de las vesículas, cuando éstas estaban azules, era un marcador de polimerización de lípidos y síntesis de vesículas, mientras que cuando se les hizo interaccionar con nisina a distintos pH, se tornaron de un color rosado (87), por lo que se concluyó que, a mayor concentración de nisina, mayor era la respuesta colorimétrica de la vesícula.

4. Nanopartículas en biomedicina

Para el uso del área de biomedicina, es necesario que las partículas magnéticas sean estables en agua a pH 7 y también en un entorno fisiológico, idealmente estas deben tener buena calidad cristalina, ser biocompatibles y presentar una uniformidad de forma y tamaño. La estabilidad del fluido dependerá de la carga y la química de la superficie (88), que dará lugar a repulsiones estéricas. Otro factor importante son las dimensiones de las partículas que deben ser suficientemente pequeñas para evitar o enlentecer la precipitación. Se encuentra ampliamente reportado que el tamaño, la forma, la tendencia a la agregación y la carga superficial de las partículas son determinantes en relación con su desempeño y eficiencia en las áreas de salud (89). Su importancia radica en el uso para la orientación magnética ya sean medicamentos, genes, radiofármacos, resonancia magnética, en diversas aplicaciones de diagnóstico ya sean inmunoensayos, purificación de ácidos nucleicos, clonación de genes, entre otros. Por ejemplo, las nanopartículas utilizadas por su actividad microbiana tienen una alta penetrabilidad en las membranas bacterianas, dándoles la capacidad de interrumpir la formación de biofilms, siendo además buenos portadores de antibióticos. Últimamente se han desarrollado distintas NPMs para demostrar su funcionamiento en estudios *in vitro* e *in vivo* (90,91).

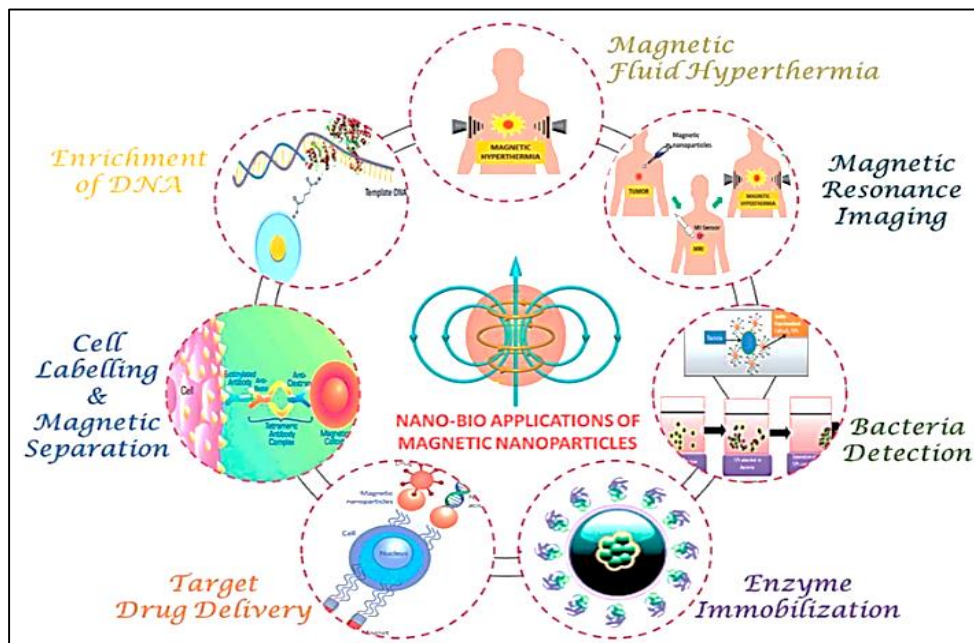


Figura N° 7. Diferentes aplicaciones biomédicas de nanopartículas (89)

Tomado de Katz (2016)

Con respecto a la forma de las nanopartículas, esta depende principalmente de la concentración de las especies precursoras. Si la concentración de los precursores es baja, el crecimiento es controlado termodinámicamente y la forma de las partículas tiende a ser esférica con el objetivo de minimizar su energía superficial. Por otro lado, si la concentración de los precursores es alta, el crecimiento de las partículas es controlado cinéticamente y los precursores se unen preferentemente a las caras cristalinas con mayor energía superficial dando lugar a partículas distintas a la esférica como cubos o tetraedros. El tamaño a su vez se ve influenciado por el efecto del precursor, disolvente y surfactante (92). La elección del surfactante es importante ya que son los responsables de regular el tamaño y la forma de las partículas, dentro de los surfactantes más comúnmente empleados se encuentran ácido oleico y la oleilamina (89,90).

4.1 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son una entidad física cuyo tamaño se encuentra en la nanoescala y posee un momento magnético neto que comprende la escala entre 1 y 100nm, es decir, son moléculas de tamaño nano (93). Tienen un alto nivel de interés, ya que son de vital importancia en la actualidad por sus ventajosas propiedades fisicoquímicas, además la relación de superficie/masa posibilita su utilidad en una variedad de aplicaciones químicas, biológicas y biomédicas. Son un tipo de partículas que pueden manipularse utilizando campos magnéticos externos y están constituidos por; metales, lípidos, sustancias antimicrobianas naturales, polímeros biodegradables, polímeros a base de carbono y surfactantes. Por lo tanto, consta de un material/elemento magnético, que comúnmente es hierro, níquel o cobalto, y un componente químico que tiene funciones asociadas a propiedades catalíticas o de bioreconocimiento utilizadas ampliamente para aplicaciones biomédicas, biocatalíticas, o protección ambiental, entre las principales (94). Comúnmente, están recubiertas con biopolímeros o capas inorgánicas de sílice o carbón, proporcionando un enfoque versátil con respecto a actividades biológicas, y el núcleo fabricado generalmente con hierro le confiere propiedades magnéticas pudiendo ser manipuladas a través de un campo magnético externo (95). El recubrimiento previene la oxidación de las nanopartículas, y puede disminuir la toxicidad de los materiales de soporte, por lo que son esenciales para la reutilización del biocatalizador a través de un campo magnético (96). Lo que permite interactuar e interferir con procesos biológicos, minimizando los efectos adversos y abriendo el camino a nuevos posibles paradigmas diagnósticos y terapéuticos (97). En este sentido, existe una gran variedad de materiales a partir de los cuales se pueden obtener:

-Metales de transición puros: Fe, Co, Ni

-Metales y compuestos de tierras raras: sulfuro y óxido de europio, Gadolinio, Disprobio, Terbio

-Óxidos metálicos: Hematita, Maghemita, Magnetita, Wustita

-Aleaciones: Fe-Co, Fe-Ni, Fe-Pt, Co-Pt (98)

A raíz de lo anterior, ha surgido un nuevo concepto denominado “biofuncionalización”, el cual permite que estas partículas tengan una mayor actividad biológica en el reconocimiento de moléculas como ADN, ARN, proteínas y lípidos, es decir, les confiere cierta especificidad molecular. Por ende, las NPMs biofuncionalizadas permiten capturar, concentrar y separar magnéticamente células de diferentes muestras, y dado sus propiedades eléctricas, se emite una señal de transducción a través de un biosensor (99). La magnetita (Fe_3O_4) es la nanopartícula más empleada, debido a su reducida toxicidad, es sensible a la oxidación y puede transformarse en maghemita, una de las formas polimórficas del Fe_2O_3 , en presencia de oxígeno (100).

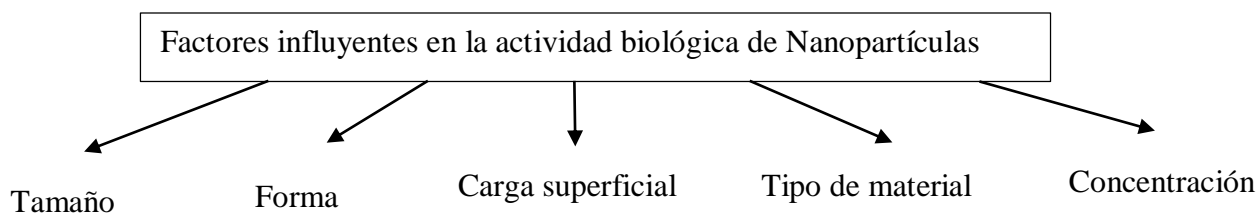


Figura N° 8. Factores que influyen en la actividad biológica de nanopartículas

Creada por Y.C. 2020

Mientras menor tamaño tenga la nanopartícula, mejor es la actividad antimicrobiana; sin embargo, no basta solo con eso ya que el tamaño por sí solo no es el determinante más relevante, la forma también tiene un rol importante, por ejemplo, para la destrucción de biofilms de bacterias productoras

4.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas

Actualmente elementos como, Au, Ag, Cu, Zn, Ni, Ti, Mn, Al, Si, Fe, Cl, Bi e Ir se usan comúnmente para sintetizar nanopartículas. Las condiciones de producción y reacción son cruciales para obtener nanopartículas deseadas de gran eficacia, para esto se debe considerar el tamaño, composición química, cristalinidad, forma, parámetros que se controlan por medio de la temperatura, pH, concentración y modificaciones superficiales (101).

Para la fabricación de las nanopartículas se han establecido 2 enfoques o estrategias que van de “arriba hacia abajo o Top-Down” y de “abajo hacia arriba o Bottom-Up”.

✓ De arriba hacia abajo. Top-Down (métodos físicos). Se refiere a la trituración mecánica del material, basado en principios de tecnología de microsistemas usando procesos de molienda. Implica la ruptura de grandes piezas de material para generar nanoestructuras, en simples palabras, consiste en dividir los sólidos másicos en porciones más pequeñas (102).

✓ De abajo hacia arriba. Bottom-Up (métodos químicos). Las partículas individuales se ensamblan en nanoestructuras más grandes, hasta conseguir un conglomerado de moléculas de tamaño nanométrico. Se fabrican mediante procesos químicos, a través de la condensación de las entidades moleculares (103).

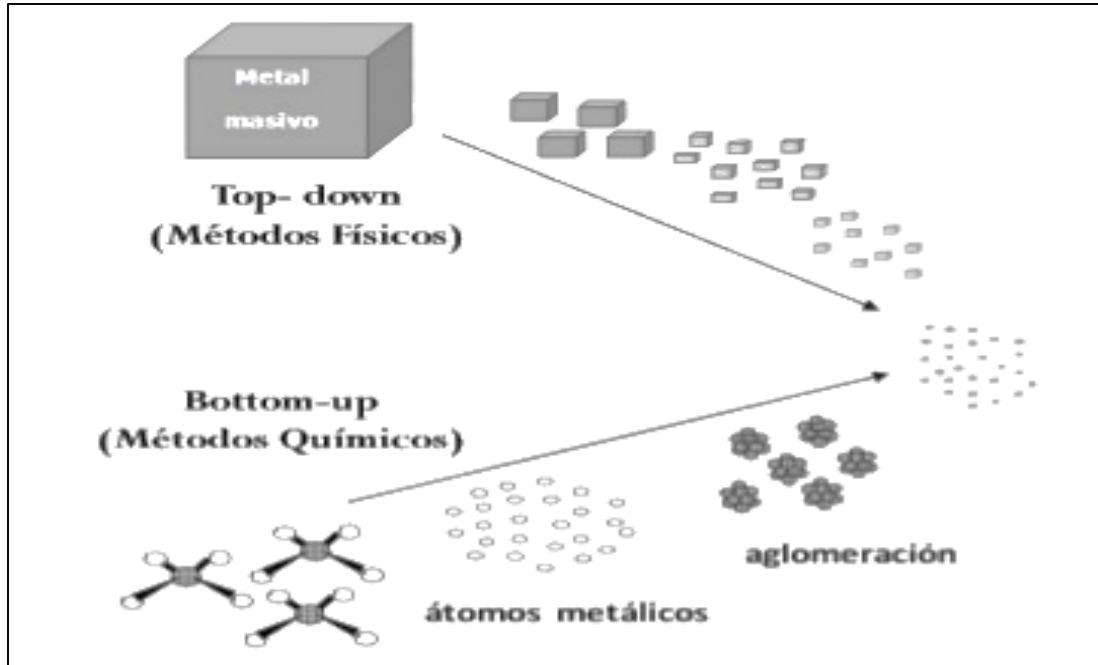


Figura N° 9. Representación métodos de síntesis de nanopartículas

Tomado de Colonia (2017)

Métodos Top-Down

- ✓ Molienda mecánica. Consiste en mezclar los polvos aprovechando la energía mecánica del molino de material de acero de alta dureza, para efectuar una suerte de aleación junto con la reducción del tamaño de la partícula, quedando atrapadas entre las bolas que chocan entre sí, favoreciendo la trituration. La principal ventaja el bajo coste de producción de las nanopartículas, sin embargo, esta técnica implica estrés térmico y requiere de mucha energía, por lo que un proceso más largo puede degastar los medios de molienda, contaminando las partículas (104).

- ✓ Condensación de gas inerte. Se utiliza para la síntesis de nanopartículas de Fe, Ni, Co a través de altas temperaturas de aproximadamente 1500°C, evaporando el metal utilizado hacia un gas no reaccionante de alta pureza. Al producirse el choque del gas inerte o no reaccionante con los metales, pierden su energía cinética y se condensan sobre una punta fría en forma de polvo de diámetro tamaño. A raíz de las altas temperaturas se puede regular la velocidad de evaporación, que permite obtener partículas con un nivel bajo de impurezas (105).

En cuanto a las técnicas empleadas para la formación de NPMs, los 2 métodos más establecidos son la co-precipitación y descomposición térmica. La co-precipitación consiste en la mezcla de sales de hierro en presencia de un medio básico y en ausencia de oxígeno. Se ha revelado, tras varios estudios, que la técnica de co-precipitación resulta ser la más adecuada para obtener NPMs con mejores propiedades de acuerdo a los requerimientos en cuanto al futuro empleo de las mismas. Mientras que la descomposición térmica consiste en la preparación de una mezcla de los reactivos de partida a temperatura ambiente, los cuales se calientan de forma progresiva, generando la descomposición de los reactivos y así formar nanopartículas de baja polidispersidad (106).

4.3 Propiedades magnéticas de NPMs

Dependiendo de la respuesta frente a la aplicación de un campo magnético externo, los materiales magnéticos pueden clasificarse en; diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos, ferrimagnéticos o superparamagnéticos (107).

Diamagnéticos: Si el sólido posee átomos con todos los electrones apareados, es decir, los átomos tienen sus orbitales completos. Algunos ejemplos son: Ag, Au y la mayoría de los elementos conocidos (108).

Paramagnéticos: Si el sólido posee átomos con electrones desapareados y las interacciones entre éstos son débiles y al aplicar un campo magnético externo aparecen dipolos que se alinean en la dirección y sentido del campo, o sea, los spins tienden a orientarse en el estado de más baja energía, por lo tanto, en la misma dirección que el campo. En este caso, el momento magnético es proporcional al campo aplicado. Dentro de este grupo podemos incluir a materiales constituidos por Ga, Mg, Li, Ta o Cu (109).

Ferromagnético: Cuando las interacciones existentes entre los electrones desapareados de los átomos vecinos son más fuertes. Los materiales compuestos por Fe, Ni o Co pertenecen a esta categoría.

Antiferromagnético: Es el caso de que todos los momentos magnéticos estén orientados en la misma dirección, los electrones pueden alinearse antiparalelamente (misma dirección, pero sentido contrario). Como consecuencia de ello, si el momento magnético se acaba anulando el sólido se considera antiferromagnético. Se incluyen MnO, CoO, NiO, CuCl₂

Ferrimagnético: corresponde a cuando el momento magnético resultante no se anula, dentro de esta categoría, encontramos: Magnetita (MAG, Fe₃O₄) y la Maghemita (MAGH, γ-Fe₂O₃)

Superparamagnético: Presentan imanación únicamente en presencia de un campo magnético externo, por lo que, una vez que se retira el campo magnético la magnetización vuelve a cero

Los materiales ferri, ferro y antiferromagnéticos tienen un comportamiento magnético cooperativo, esto para disminuir la energía magnetostática, es decir, la energía potencial producida por el campo magnético externo (110,111).

Tabla N° 4. Ventajas y desventajas del uso de nanopartículas

Creada por Y.C. 2020

Ventajas de nanopartículas	Desventajas de nanopartículas
Biocompatibilidad	Altamente reactivas
Menor susceptibilidad a resistencia bacteriana	Pueden inducir toxicidad sistémica
Pueden ser estimulados de varias maneras	
Resistentes a procesos de biodegradación	
Penetran las membranas bacterianas	
Mejoran la farmacocinética de los fármacos	

Tienen la capacidad de mejorar la eficiencia terapéutica de los fármacos incorporados y limitar sus efectos adversos permitiendo la mejora de la farmacocinética de los fármacos poco solubles en agua prolongando su vida media y el tiempo de circulación. Son susceptibles a la funcionalización y pueden ser estimulados con distintos parámetros como temperatura, pH o campos magnéticos. Además, tienen la facultad de penetrar la membrana celular bacteriana y cruzar barreras que generalmente son no permeables para los agentes terapéuticos convencionales (112). No obstante, pueden inducir cuadros de toxicidad, y se consideran reactivas, debido a su alta proporción de área de superficie a masa, aunque esto

está en boga ya que esta relación facilita una fuerte interacción con las membranas microbianas, ejerciendo actividad incluso en dosis mínimas, además de permitir una funcionalización eficiente de la superficie (113).

Dada la existencia de las distintas clases de bacteriocinas, se ha vuelto muy complicado tener un protocolo de purificación estándar, es por esto, que la utilización de las nanopartículas magnéticas son las idóneas para los procesos de purificación de los péptidos antimicrobianos, puesto que al ser un proceso tan metódico y protocolar es necesario el uso de “materiales” que aporten para lograr una correcta purificación y posteriores estudios (114). Actualmente las nanopartículas son consideradas esenciales para las tecnologías del hoy debido a sus características y propiedades físico-químicas y junto con el alcance que tienen las bacteriocinas son un impacto de gran relevancia para cada una de sus aplicaciones en biotecnología (115).

CONCLUSION

En las últimas décadas, la purificación de proteínas ha sido muy demandada, especialmente en áreas como la biomedicina, biociencia, alimentación, entre otras. Esto cobra mucha más importancia a la hora de trabajar con bacteriocinas, sustancias o péptidos antimicrobianos producidos por distintas bacterias, principalmente como las BAL, que tienen la capacidad de inhibir patógenos u otros microorganismos contaminantes.

Si bien existen diversos métodos convencionales y que aún son utilizados en la purificación de proteínas, estos, no dejan de tener ciertas limitantes como lo son protocolos de trabajo complejos y extensos, baja eficiencia, baja recuperación y bajo nivel de pureza. La nanomedicina, o más específicamente, las nanopartículas se han implantado como la técnica idónea para la purificación proteica. La aplicación de nanopartículas o partículas a nanoescala han demostrado ser favorables en base a eficiencia de separación, selectividad y resolución de los productos purificados, obteniendo un tiempo de proceso óptimo para la recuperación de producto o proteína purificada.

Las ventajas del uso de NP basadas principalmente en la separación magnética por afinidad con la presencia del núcleo superparamagnético (Fe_3O_4) en las nanopartículas permite que sean rápidamente separadas y purificadas por un campo magnético externo. Lo anterior, reduce las etapas del proceso y por ende, también economiza tiempo y costos. El empleo de las NPM que portan ligandos de afinidad al momento de realizar el proceso de purificación, hace que se eviten tiempos de espera largos y la realización de técnicas complejas y costosas. Además, son consideradas amigables con el medio ambiente y de fácil acceso.

Si bien a través de estudios se ha demostrado que el uso de NP como técnica purificadora de proteínas tiene mayor cantidad de ventajas con respecto a los métodos convencionales (cromatografía principalmente), no basta con lo reportado hasta el momento. Por ello, indagar e investigar sobre esta técnica nueva, caracterizada por ser eficaz, rápida, de bajo costo y significativamente favorable, sería interesante dadas sus apreciables ventajas para la purificación y el desarrollo de nuevos productos antimicrobianos para los cuales las bacterias

u otros microorganismos no presentan resistencia. En este sentido es importante ahondar mucho más para una mayor información y análisis.

Por lo tanto, pese a las ventajas y características únicas anteriormente mencionadas, la comunidad científica aún está al debe con respecto al tema abordado, ya que al ser un método nuevo y por lo visto muy prometedor para las industrias hay muy poca información para seguir con el entendimiento de esta.

REFERENCIAS

1. Heredia P, Hernández A, González F, et al. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en queso. *Interciencia*. 42(6):1844-378
2. Milena S, Suárez H, Zapata S. 2009. Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-73
3. Monroy M, Castro T, Fernández J, et al. 2012. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Research*. 73(3):318-856
4. Jutinico A. (Abril 19, 2018). Efecto de bacteriocinas de *Pediococcus pentosaceus* 147 incorporadas en recubrimientos comestibles para la preservación de queso campesino (on-line). *Ciencias agrarias Universidad Nacional de Colombia*, Vol 1: <http://bdigital.unal.edu.co/71935/2/AdrianaPaolaJutinicoShubach.2018.pdf>. [Consultado el 23 de julio, 2019]
5. Svetoslav T, Vaz-Velho M, Gibbs P, et al. 2014. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Microbio and Biotech*. 35(5):757-767
6. Yi L, Dang J, Zhang L, et al. 2016. Inhibitory effect of Lactococcin BZ against *Listeria innocua* and indigenous microbiota of fresh beef meat. *Food technology and biotechnology*. 54(3):317-323
7. Beristain-Bauza, Palou E, López-Malo A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla*. 6(2):64-78
8. Arqués J, Rodríguez E, Gaya P, et al. 2007. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *TESIA*. 15(1):893-900
9. Riley M, Wertz J. 2005. Bacteriocins: Evolution, Ecology and Application. *Microbiol*. 56(3):117-137
10. Hyuk J, Myung D, Chan W. 2010. Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actibobacillus ureae*. *Process Biochem*. 43(1):225-228
11. Murray P, Rosenthal K, et al. *Microbiología Médica*. Barcelona, España:ELSEVIER. 8° edición. 789 p.;2013
12. Morgan S, Ross R, Hill P, et al. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol*. 61:2995-3001
13. Ramírez J, Rosas P, Velázquez M, et al. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente ISSN*. 25(7):713-734
14. Parra, R. 2010. Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. *Revista cubana Alimentación y Nutrición*. 8(1):93-105
15. Lama P. (junio, 2002) Caracterización de una bacteriocina producida por una bacteria ácido láctica de en carne envasada al vacío (on-line). *Escuela de Ingeniería en Alimentos, Universidad Austral de Chile*, Vol 1: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fal213c/pdf/fal213c.pdf?fbclid=IwAR1PZ6>

mRSkC3zBqYHEEIJPgq29axoqToy8PQTRroAh8jQSI5LAjNi2bBuWs.

[Consultado el 15 de agosto, 2019]

16. Padilla C, Núñez M, Padilla A, et al. 2012. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Revista chilena de infectología*. 29(1):55-61
17. Peralta I, Gómez S, Salazar V. 2009. Impacto de las bacteriocinas, importancia como preservantes en la industria de alimentos. *Teoría y Praxis investigativa*. 4(2):27-31
18. Oscáriz J, Pisabarro A. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol*. 4:13-19
19. Mondragón G, Escalante P, Osuna J, et al. 2013. Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*. 59(4):64-70
20. Eijsink V, Skeie M, Middelhoven p, et al. 2003. Comparative studies of class IIa bacteriocins of Lactic acid bacteria. *Microbiol*. 64(2):3275-3281
21. Shene C, Bravo S. 2006. Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* for exopolysaccharide production in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 10 (1): 1006-1015
22. Amortegui J. (Junio, 2012). Purificación y caracterización de bacteriocinas producidas por dos cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* (on-line). *Ciencias médicas Pontificia Universidad Javeriana*, Vol 1: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11844/AmorteguiDiazJairoEmmanuel2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [Consultado el 7 de agosto, 2019]
23. Nishie M, Nagao J, Sonomoto K. 2012. Antibacterial peptides bacteriocins: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*. 17:1-16
24. Martín A. (septiembre, 2002). Capacidad antagonista frente a *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂. *Ciencias agrarias Universidad Austral de Chile*. Vol 1: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fam381c/doc/fam381c.pdf>. [Consultado el 26 de julio, 2019]
25. Gálvez A, Abriouel H, López L. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Food Microbiol*. 120(1):51-70
26. Rodi P. (octubre, 2010). Estructura y función de dominios lipídicos en biomembranas. *Ciencias biológicas Universidad Nacional del Litoral*. Vol 1: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/191/tesis1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. [Consultado el 03 de agosto, 2019]
27. Sablon E, Contreras V. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetic and biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 12:113-128
28. De la fuente N, Villareal J, Díaz M, et al. 2015. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 46(2):325-341
29. Macwana S, Muriana P. 2012. Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 88(1), p.7-13

30. Bhattacharya A, Stacy A, Basjey F. 2019. Suppression of bacteriocin resistance using live, heterospecific competitors. *Evolutionary approaches to environmental, biomedical and socio-economic issues*. Vol 12(6), p.1191-1200
31. Kaur G, Singh T, Malik R. 2013. Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol 44(1), p.63-71
32. Ky van H, Stern N, Saxton A, et al. 2011. Prevalence, development, and molecular mechanisms of bacteriocin resistance in *Campylobacter*. *Applied and environmental microbiology*. Vol 77(7), pp.2309-16
33. Roces C, Pérez V, Campelo A, et al. (noviembre 2012). The putative lactococcal extracytoplasmic function anti-sigma factor Iimg2447 determines resistance to the cell wall-active bacteriocin lcn972. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Vol 56(11), pp.5520-7
34. López M°, Campelo A, Picon A, et al. (julio 2018). Resistance to bacteriocin Lcn972 improves oxygen tolerance of *Lactococcus lactis* IPLA947 without compromising its performance as a dairy starter. *BMC Microbiology*. Vol 18, Art 76
35. Bie E, Nissen-Meyer J, Krinstensen T. (septiembre 2017). Whole-genome sequencing of mutants with increased resistance against the two-peptide bacteriocin plantaricin JK reveals a putative receptor and potential docking site. *PloS One*. Vol 12(9)
36. Noda M, Miyauchi R, Danshiitsoodol N, et al. 2018. Expression of Genes Involved in Bacteriocin Production and Self-Resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is Mediated by Two Regulatory Proteins. *Appl Environ Microbiol*. Vol 84(7):e02707-17
37. García-Bayona L, Gozzi K, Michael L. 2019. Mechanisms of Resistance to the Contact-Dependent Bacteriocin CdzC/D in. *Journal of bacteriology*. Vol 201(8)
38. Thomas L. 2019. Técnicas de la purificación de la proteína. *News Medical Life Sciences*. Vol 1. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Purification-Techniques-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Purification-Techniques-(Spanish).aspx). [Consultado el 12 de agosto, 2020]
39. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. 2002. La purificación de proteínas es un primer paso esencial para comprender su función. *Bioquímica*. Vol 5
40. Kumar P. 2020. Métodos de purificación de proteínas: 4 métodos. *Biology Discussion*. Vol 3:<https://www.biologydiscussion.com/biochemistry/protein-purification/methods-of-protein-purification-4-methods/12962>. [Consultado el 06 de agosto, 2020]
41. Youssef A, El-sayed S, Assem F. 2018. Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*. 9(1):1-7
42. De la fuente N. (septiembre, 2009). Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos. *Ciencias biológicas Universidad Autónoma de*

- Nuevo Leon. Vol 1: <http://eprints.uanl.mx/1931/1/1080190931.pdf>. [Consultado el 09 de septiembre, 2019]
43. Palacios J, Vignolo G, Farías M, et al. 1999. Purification and amino acid sequence of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus case 705*. 154(2):199-203
 44. Rogers A. 2013. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Bacteriol.* 24(2):321-325
 45. Herrea M. 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio. *Revista médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saénz Herrera.* 34(1):107-123
 46. Cardoso M. (octubre, 2012). Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de *Enterococcus*. *Ciencias biológicas Universidad Nacional del Litoral.* Vol 1: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/414/tesis.pdf?squence=3&isAllowed=y>. [Consultado el 10 de agosto, 2019]
 47. Vijay B, Sood S, Kumariya R, et al. 2012. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus NCDC 273* suitable for industrial application. *Microbiological research.* 167(9):544-549
 48. Ajay P, Ramana K. 2008. Purification and characterization of bacteriocin from *Weissella paramesenteroides* dfr-8, an isolate from cucumber. *Food Biotechnology Discipline.* 34(5):932-948
 49. Burianek L, Yousef A. 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Public health microbiology.* 31:193-97
 50. Jeevanandam J, Kumar P, Danquah M. 2019. Nanopartículas biofuncionales para la separación, purificación y detección de proteínas. Springer. Vol 1: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-29069-6_7. [Consultado el 30 de julio, 2020] ISBN: 978-3-030-29068-9
 51. Kim S, Sung D, Ho Chang J. 2018. Highly efficient antibody purification with controlled orientation of protein A on magnetic nanoparticles. *Royal Society Of Chemistry.* Vol1(1): <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/md/c7md00468k#!divAbstract>. [Consultado el 01 agosto, 2020]
 52. Mahmoodi S, Pourhassan-Moghaddam M, Wood D, et al. 2019. Enfoques actuales de la afinidad para la purificación de proteínas recombinantes. *Cogent Biology.* Vol5(1)
 53. Cao M, Li Z, Wang J, et al. 2012. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science & Technology.* Vol 27(1):47-56
 54. Chen W, Cheng T, Fa Khaw L, et al. 2020. Purificación de proteínas con cristalización mejorada por nanopartículas. *Tecnología de separación y purificación.* Vol 33: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138358662031858X>. [Consultado el 02 de agosto, 2020]
 55. Yildiz I. 2016. Aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en la separación y purificación biomédica. *Reseñas de nanotecnología.* Vol 5(3):331-340

56. Zhou Y, Yan D, Yuan S, et al. 2018. Selective binding magnetic separation and purification of histidine-tagged protein using biopolymer magnetic core-shell nanoparticles. *Protein Expression and Purification*. Vol 144(1):5-11
57. Rashid Z, Ghanhremanzadeh R, Nejadmoghaddam M, et al. 2017. Nickel-Salen supported paramagnetic nanoparticles for 6-His-target recombinant protein affinity purification. *Journal of Chromatography A*. Vol 1490(1):47-53
58. Imani S, Zand A, Saadati M, et al. 2011. Synthetics of NiFe₂O₄ nanoparticles for recombinant His-tag protein purification. *Int. J. Nano Dim*. Vol 2(2):129-135: http://www.ijnd.ir/article_632578_72b93c866ae385d3491700f45b8e6973.pdf. [Consultado el 03 de agosto, 2020] ISSN: 2008-8868
59. Zhou Y, Yuan S, Liu Q, et al. 2017. Purificación e inmovilización sincronizadas de B-glucosidasa marcada con his a través de nanopartículas magnéticas de núcleo/capa de Fe₃O₄/PMG. *Scientific reports*. Vol 7(41741)
60. Gadke J, Kleinfeldt L, Schubert C, et al. 2017. In situ affinity purification of his-tagged protein A from *Bacillus megaterium* cultivation using recyclable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Biotechnology*. Vol 242(1):55-63
61. Lundgren A, Johansson B, Block S, et al. 2018. Purificación por afinidad y análisis de una sola molécula de proteínas integrales de membrana de preparaciones crudas de membrana celular. ACS Publications. Vol 18(1)
62. Jeevanandam J, Kumar P, Danquah M. 2019. Nanopartículas biofuncionales para la separación, purificación y detección de proteínas. Springer. Vol 1: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-29069-6_7. [Consultado el 30 de julio, 2020] ISBN: 978-3-030-29068-9
63. Kim S, Sung D, Ho Chang J. 2018. Highly efficient antibody purification with controlled orientation of protein A on magnetic nanoparticles. *Royal Society Of Chemistry*. Vol1(1): <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/md/c7md00468k#!divAbstract>. [Consultado el 01 agosto, 2020]
64. Mahmoodi S, Pourhassan-Moghaddam M, Wood D, et al. 2019. Enfoques actuales de la afinidad para la purificación de proteínas recombinantes. *Cogent Biology*. Vol5(1)
65. Cao M, Li Z, Wang J, et al. 2012. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends in Food Science & Technology*. Vol 27(1):47-56
66. Chen W, Cheng T, Fa Khaw L, et al. 2020. Purificación de proteínas con cristalización mejorada por nanopartículas. *Tecnología de separación y purificación*. Vol 33: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138358662031858X>. [Consultado el 02 de agosto, 2020]
67. Yildiz I. 2016. Aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en la separación y purificación biomédica. *Reseñas de nanotecnología*. Vol 5(3):331-340

68. Zhou Y, Yan D, Yuan S, et al. 2018. Selective binding magnetic separation and purification of histidine-tagged protein using biopolymer magnetic core-shell nanoparticles. *Protein Expression and Purification*. Vol 144(1):5-11
69. Rashid Z, Ghanhremanzadeh R, Nejadmoghaddam M, et al. 2017. Nickel-Salen supported paramagnetic nanoparticles for 6-His-target recombinant protein affinity purification. *Journal of Chromatography A*. Vol 1490(1):47-53
70. Imani S, Zand A, Saadati M, et al. 2011. Synthetics of NiFe₂O₄ nanoparticles for recombinant His-tag protein purification. *Int. J. Nano Dim*. Vol 2(2):129-135: http://www.ijnd.ir/article_632578_72b93c866ae385d3491700f45b8e6973.pdf. [Consultado el 03 de agosto, 2020] ISSN: 2008-8868
71. Zhou Y, Yuan S, Liu Q, et al. 2017. Purificación e inmovilización sincronizadas de B-glucosidasa marcada con his a través de nanopartículas magnéticas de núcleo/capa de Fe₃O₄/PMG. *Scientific reports*. Vol 7(41741)
72. Gadke J, Kleinfeldt L, Schubert C, et al. 2017. In situ affinity purification of his-tagged protein A from *Bacillus megaterium* cultivation using recyclable superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Biotechnology*. Vol 242(1):55-63
73. Lundgren A, Johansson B, Block S, et al. 2018. Purificación por afinidad y análisis de una sola molécula de proteínas integrales de membrana de preparaciones crudas de membrana celular. *ACS Publications*. Vol 18(1)
74. Ivanova I, Kabadjova P, Pantev A, et al. 2012. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis subespecie lactis B14* isolated from boza-Bulgarian traditional cereal beverage. *Appl. Microbiol*. 50(1):79-90
75. M2 Presswire. (noviembre, 2016) Liposomes. Coventry. Vol 1: https://search-proquest-com.atalca.idm.oclc.org/docview/1836566157?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprimo. [Consultado el 27 de junio, 2020]
76. Smith Y. 2018. Fabricación del liposoma. *News Medical Life Sciences*. Vol 1
77. Li M, Akbarzadeh A. 2019. Diseño de la composición y uso médico de liposomas. *News medical life-sciences*. 164(1):640-653
78. González P. 2006. Oxidative stability and changes in the particle size of liposomes used in the Artemia enrichment. *Research paper*. Vol 1
79. Fernandez A, Martinez-Gomis J, Olivé S. 2016. Cariostatic effect of liposome-encapsulated sodium fluoride in hyposalivated rats. *Journal of Dental Research*. 133(77):253-260
80. Hernández A. 2017. El pequeño mundo de los Liposomas. *Biol. On-Line*. Vol 6(2), ISSN: 2339-5745. http://revistes.ub.edu/index.php/b_on/index. [Consultado el 03 de julio, 2020]
81. TOSKANI. (febrero, 2019). ¿Qué son los liposomas? TOSKANI COSMETICS. [Consultado el 02 de julio, 2020]
82. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Soodabeh D, et al. 2013. Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters*. Vol 8(102)

83. Shashi K, Satinder K, Bharat P. 2012. A complete review on: Liposomes. International Research Journal of Pharmacy. Vol 3(7), ISSN:2230-8407: https://www.researchgate.net/publication/285487882_A_complete_review_on_Liposomes. [Consultado el 15 de junio, 2020]
84. Torelló M, Viscasillas A, Pozo A. 2002. Liposomas: Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. ELSEVIER. 21(9):188-196
85. (Ruano M. 2013. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Universidad Complutense de Madrid. Vol 1: <https://eprints.ucm.es/18042/1/T34218.pdf>. [Consultado el 19 de junio, 2020])
86. (Patil Y, Jadhav S. 2014. Novel methods for liposome preparation. Chemistry and Physics of Lipids. Vol 188)
87. Boudemgh D. 2017. Síntesis de nanopartículas de liposomas. Universidad Ferhat Abbas de Steif. Vol 1
88. Foldvari M, Gesztes A, Mezei M. 2013. Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. ELSEVIER.7:479-500
89. Blume G, Cevc G. 2012. Liposomas para la liberación sostenida del fármaco in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. Vol 1: 92-97
90. Lassic D. 2008. Liposome research in drug delivery: The early days. Journal of Drug Targeting. 16(7-8):520-52
91. Roca A. 2009. Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina. Universidad Complutense de Madrid. Vol 1(1)
92. Schweiger C, Pietzonka C, Heverhagen J, et al. 2011. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly-g-poly for potential medical application. Int J Pharm. Vol 408(130)
93. Laurent S, Dutz S, Hafeli U, et al. 2013. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Adv Colloid Interface. Vol 8(23)
94. Mailander V, Landfester K. 2009. Interacción de nanopartículas con células. Biomacromolec. Vol 10
95. Mornet S, Vasseur S, Grasset F, et al. 2014. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. J Mater Chem. Vol 14:2161-2175
96. Zhou H, Tao K, Ding J, et al. 2016. A general approach for providing nanoparticles water-dispersibility by grinding with poly. Coll Surf A. Vol 389(18)
97. Yoo D, Lee J, Shin T, et al. 2011. Theranostic magnetic nanoparticles. Acc Chem Res. Vol 44(1):863-874
98. Naqvi S, Samim M, Abidin M, et al. 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. Int J Nanomed. Vol 5:983-989
99. Kumar M, Kumar V, Singh B, et al. 2016. Phospholipid/polydiacetylene vesicle-based colorimetric assay for high-throughput screening of bacteriocins and halocins. Appl Biochem Biotechnol. 182(5):142-154
100. Coral F, Mera J. 2017. Una guía para el estudio de nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro con aplicaciones biomédicas. Parte I. Revista de Ingeniería y Ciencia. Vol 13(25), pp.229-249:

- <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ingciencia/article/view/4572/pdf>.
[Consultado el 25 de mayo, 2020]
101. Katz E. 2020. Nanopartículas Magnéticas. Departamento de Química y Ciencias Biomoleculares, Universidad de Clarkson. Vol 6(1): <https://www.mdpi.com/2312-7481/6/1/6/htm>. [Consultado el 10 de junio, 2020]
 102. Garcia Jimeno S. 2012. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS. Universidad de Barcelona. Vol 1: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41856/2/SGJ_TESIS.pdf. [Consultado el 03 de junio, 2020]
 103. Khoshnevisan K, Poorakbar E, Baharifar H, et al. 2019. Recent Advances of Cellulase Immobilization onto Magnetic Nanoparticles: An Update Review. *Magnetochemistry*. Vol 5(2): <https://www.mdpi.com/2312-7481/5/2/36/htm>. [Consultado el 03 de junio, 2020]
 104. Piñeiro Y, González M, De Castro L, et al. 2020. Hybrid Nanostructured Magnetite Nanoparticles: From Bio-Detection and Theragnostics to Regenerative Medicine. Universidad de Santiago de Compostela. Vol 6(1): <https://www.mdpi.com/2312-7481/6/1/4>. [Consultado el 29 de mayo, 2020]
 105. Azcona P. 2019. Síntesis de Nanopartículas Magnéticas Multifuncionales y sus aplicaciones en Biomedicina. Universidad Nacional del Sur. Vol 1: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/97776/CONICET_Digital_Nro.57dbac74-e8f7-4d3e-8d9f-d7b92416a8d7_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y. [Consultado el 10 de junio, 2020]
 106. Gómez-Velasco A, León-Cortés J, Gordillo-Marroquín C, et al. 2019. Use of magnetic nanoparticles and a biosensor for the diagnosis and monitoring of emergent, re-emergent and neglected tropical infectious diseases. *Rev Enf Emerg*. Vol 18(1), pp:23-31
 107. Toyos C. 2019. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN BIOMEDICINA. Master in biotechnology of environment and health. Vol 1: http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/51714/3/TFM_CeliaToyosRodriguez.pdf. [Consultado el 03 de junio, 2020]
 108. Coral F, Mera J. 2017. Una guía para el estudio de nanoartículas magnéticas de óxidos de hierro con aplicaciones biomédicas. Parte II. *Revista de Ingeniería y Ciencia*. Vol 13(26), pp.207-232: <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ingciencia/article/view/4572/pdf>. [Consultado el 25 de mayo, 2020]
 109. Katz E. 2019. Síntesis, propiedades y aplicaciones de nanopartículas magnéticas y nanocables: una breve introducción. Departamento de Química y Ciencias Biomoleculares, Universidad de Clarkson. Vol 5(4): <https://www.mdpi.com/2312-7481/5/4/61/htm>. [Consultado el 30 de mayo, 2020]
 110. Ruiz P. (junio 2019). Nanopartículas Magnéticas para Tratamiento y Diagnóstico de Cáncer. Universidad Complutense. Vol 1: <https://eprints.ucm.es/50686/1/PAULA%20RUIZ%20BRIONES.pdf>. [Consultado el 27 de mayo, 2020]

111. Schafer W, Burgard M, Bouyer E, et al. 2006. Potential of albumin nanoparticles as carriers for interferon gamma. *Molecular pharmaceutics*. 31(2):271-280
112. Wannun P, Kafri R. 2016. Purification, characterization and optimum conditions of fermencin SD11, a bacteriocin produced by human orally *Lactobacillus fermentum SD11*. *Applied Biochemmistry and Biotechnology*. 179(4):572-582
113. Kolusheva S, Kafri R, Katz M, et al. 2001. Rapid colorimetric detection of antibody-epitope recognition at a biometric membrane interface. *Journal of the American Chemical Society*. 123(9):417-432
114. Wu W, Zhang J, Zheng M, et al. 2012. An aptamer-based biosensor for colorimetric detection of *Escherichia coli* O157:H7. *PloS One*. 7:9530-9550
115. Aguirre Y. (diciembre, 2016). ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE UNA BACTERIOCINA OBTENIDA DE *Lactobacillus graminis* CON POTENCIAL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS Y FITOPATÓGENAS. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Vol 1: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/734/1/Aguirre-Guzm%C3%A1n%20Y%20E_MC_2016.pdf. [Consultado el 23 de mayo, 2020]