

Título del proyecto: “Síntesis de nanoacarreadores biopoliméricos para la encapsulación de moléculas bioactivas extraídas de cianobacterias con potencial aplicación en las áreas de alimentos y salud”

Línea de investigación del Cuerpo Académico o Grupo de Investigación, o de Posgrado:

1. Fisicoquímica e Interacciones de Biomoléculas
2. Biosistemas en Medio Ambiente y Energía
3. Fisiología Celular y Tisular

Responsable y participantes del proyecto:

Responsable

Dra. Izlia Jazheel Arroyo Maya

Profesora Titular de Tiempo Completo

Departamento de Procesos y Tecnología

División de Ciencias Naturales e Ingeniería

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Participantes

UAM Unidad Cuajimalpa

Dra. Marcia Morales Ibarría

Profesora Titular de Tiempo Completo

Departamento de Procesos y Tecnología

División de Ciencias Naturales e Ingeniería

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dra. Elena Aréchaga Ocampo

Profesora Titular de Tiempo Completo

Departamento de Ciencias Naturales

División de Ciencias Naturales e Ingeniería

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dra. María de los Dolores Reyes Duarte

Profesora Titular de Tiempo Completo
Departamento de Procesos y Tecnología
División de Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dr. José Campos Terán

Profesor Titular de Tiempo Completo
Departamento de Procesos y Tecnología
División de Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Dr. Sergio Revah Moiseev

Profesor Titular de Tiempo Completo
Departamento de Procesos y Tecnología
División de Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

Orientación:

- Investigación básica (X)
- Investigación aplicada (X)
- Otros (), especificar: Investigación clínica

Fecha de inicio y duración

Abril 2024-Marzo 2028. Duración 4 años.

Resumen

En este proyecto se desarrollará, en primer lugar, la optimización del método para la síntesis de nanoacarreadores derivados a partir de proteína de aislado de suero de leche y el polisacárido pectina funcionalizados como vehículos para la encapsulación de la proteína C-FC (derivada de la cianobacteria cepa *Desertifilum tharense* UAM-C/S02) y se estudiará como éste influye sobre ciertas características fisicoquímicas de los nanoacarreadores, por ejemplo, tamaño y distribución de tamaño, morfología, potencial electrostático de superficie y estabilidad coloidal. Posteriormente, se determinará el mecanismo de degradación enzimática y química de los nanoacarreadores en el tracto gastrointestinal, y se evaluará su actividad biológica en términos de actividad antioxidante y captación celular.

Antecedentes

En los próximos años, el sector de la salud en México enfrentará una población con un gran número de pacientes crónicos que demandarán tratamientos costosos y prolongados que pondrán a prueba la capacidad del gobierno para generar esfuerzos destinados a reducir el rezago en materia de salud pública. Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), existen diez enfermedades con mayor incidencia entre la población mexicana. Además, estas condiciones son las que cobran el mayor número de vidas y exigen al gobierno mayores recursos presupuestarios para su atención cada año. Las enfermedades cardíacas, la diabetes, el cáncer y las enfermedades cerebrovasculares son las principales causas de muerte dentro de la población mexicana [1].

Una alternativa al problema mencionado anteriormente implica una mejora en la salud de la población. Compuestos biológicamente activos pueden ser agregados a formulaciones alimenticias para prevenir enfermedades como las mencionadas anteriormente. En este sentido, la proteína C-FC se considera como un compuesto nutracéutico que posee actividad biológica. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la C-FC tiene actividades antiinflamatorias, antiplaquetarias, anticancerígenas, neuroprotectoras y hepatoprotectoras [2]. Sin embargo, preservar la estabilidad química y aumentar la biodisponibilidad de las moléculas bioactivas representan desafíos tecnológicos significativos. El uso de nanoacarreadores para el desarrollo de alimentos funcionales puede ser beneficioso para el tratamiento o prevención de ciertas enfermedades debido a su precisión nanoestructural. La morfología de las nanoestructuras, como el tamaño y la química superficial, son los principales factores que rigen su comportamiento en el sistema circulatorio y la biodistribución [3].

Con base en lo anterior, se desprende que este proyecto supone un futuro promisorio en el estudio y síntesis de nanoestructuras con propiedades interesantes para diversos desarrollos tecnológicos en el campo de los alimentos. Para la aplicación eficiente de los nanoacarreadores biopoliméricos conjugados con compuestos bioactivos, hay preguntas muy importantes para resolver como son: ¿Cómo influye la selección/optimización del método de síntesis en las características fisicoquímicas (tamaño, distribución de tamaño, potencial electrostático de superficie, estabilidad coloidal, etc.) de los nanoacarreadores obtenidos a partir de biopolímeros como el aislado de proteína de suero de leche y el polisacárido pectina,

funcionalizados como vehículos para la encapsulación de C-FC? Además, ¿Cuáles son los mecanismos de degradación enzimática y química en el tracto gastrointestinal (ensayo *in vitro*), y cómo estos factores afectan la actividad biológica, específicamente la actividad antioxidante y la captación celular (ensayo *in vitro*) de los nanoacarreadores conjugados con C-FC?

Para responder estas preguntas, en esta propuesta de investigación, se desarrollará, en primer lugar, la optimización del método para la síntesis de nanoacarreadores a partir de aislado de proteína de suero de leche (APS) y el polisacárido pectina (Pec) funcionalizados como vehículos para la encapsulación de la proteína C-FC. Además, se desea elucidar cómo el método de síntesis influye en las características fisicoquímicas de los nanoacarreadores, por ejemplo, el tamaño y la distribución del tamaño, el potencial electrostático superficial y la estabilidad frente a diferentes variables fisicoquímicas (por ejemplo, temperatura, pH, fuerza iónica). Posteriormente, se evaluará el efecto de los procesos de digestión gastrointestinal sobre la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica (en términos de actividad antioxidante) de los nanoacarreadores a través de un estudio *in vitro*. Asimismo, se estudiará el mecanismo de captación celular de los nanoacarreadores y su actividad biológica mediante un análisis masivo de la abundancia de proteínas y la activación de vías de señalización relacionadas con sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias en células humanas del colon (es decir, T84, CaCo-2 y SK-CO15) que se utilizan como modelos *in vitro* de la función de barrera epitelial.

Cabe mencionar que para lograr lo anterior, se propone utilizar la proteína C-FC derivada de la cianobacteria cepa *Desertifilum tharense churincensis* (este microorganismo fue aislado y caracterizado por el Grupo de Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Metropolitana Autónoma Unidad Cuajimalpa). El grupo de bioprocesos de la UAM Cuajimalpa tiene cianobacterias de diversos géneros como *Arthrospira*, *Desertifilum*, *Synechococcus* con gran potencial para la obtención de C-FC. La cepa *Desertifilum tharense* muestra una liberación fácil del pigmento, lo que las hace atractivas para el procesamiento *downstream*. Además, crece en una amplia variedad de condiciones de irradiación, pH y temperatura [4].

Objetivo general

Optimizar el método de síntesis de nanoacarreadores derivados de APS y Pec funcionalizados como vehículos para la encapsulación de C-FC y evaluar su impacto en las características y estabilidad fisicoquímica, así como en las propiedades bioactivas de los nanoacarreadores obtenidos.

Objetivos específicos

1. Extracción, purificación y caracterización de la proteína C-FC a partir de la cianobacteria cepa *Desertifilum tharense*.
2. Optimización del método de síntesis de nanoacarreadores derivados de APS y Pec funcionalizados para la encapsulación de C-FC.
3. Evaluación de las características fisicoquímicas de los nanoacarreadores (tamaño de partícula, distribución de tamaño, carga superficial, morfología).
4. Evaluación de la estabilidad coloidal de los nanoacarreadores frente a diversos parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, fuerza iónica).
5. Evaluación de la actividad antioxidante de los nanoacarreadores por el método ABTS^{•+}.
6. Evaluación de la degradación enzimática proteolítica de los nanoacarreadores a través de un estudio de digestibilidad *in vitro*.
7. Evaluación de la captación celular de los nanoacarreadores a través de un estudio *in vitro* con células epiteliales intestinales.
8. Caracterización de las respuestas celulares asociadas con el efecto bioactivo de los nanoacarreadores (en términos de actividades antioxidantes y antiinflamatorias) a través de un estudio *in vitro* con células epiteliales intestinales.

Hipotesis

El método de síntesis para la obtención de nanoacarreadores derivados de APS y Pec funcionalizados para la encapsulación de la proteína C-FC determinará sus características fisicoquímicas (tamaño, distribución de tamaño, carga superficial, morfología) y de estabilidad (frente a factores ambientales y biológicos), lo que influye en su posible captación celular, degradación enzimática, biodisponibilidad y las respuestas celulares asociadas con un posible efecto bioactivo.

Protocolo de investigación

- 1) **Cultivo y extracción de la proteína C-FC.** El uso potencial de *Desertifilum tharense* en función de la calidad, facilidad de extracción y purificación, así como la supervivencia y prevalencia en condiciones no estériles será evaluada. Se realizará un análisis proximal de la biomasa y se analizará la estructura de la pared celular de las diferentes cepas. El procedimiento de extracción de la C-FC se llevará a cabo mediante un protocolo ya reportado [4]. Los perfiles de proteínas de los extractos de ficobiliproteínas se analizarán en condiciones desnaturalizantes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las proteínas también se analizarán en condiciones nativas utilizando cromatografía líquida de alta resolución por exclusión de tamaño (HPLC-SEC).
- 2) **Síntesis de los nanoacarreadores a partir de APS-Pec y su funcionalización como vehículos para la encapsulación de C-FC.** Se utilizará la proteína C-FC (de la cianobacteria *Desertifilum tharense*) aislado de proteína de suero de leche y pectina de grado alimenticio. Los nanoacarreadores se sintetizarán mediante la técnica de acidificación posterior al calentamiento [5].
- 3) **Caracterización estructural de los nanoacarreadores.** Para la determinación del tamaño de partícula, distribución de tamaño y el potencial eléctrico superficial, se utilizará un dispositivo Zetasizer (Nano ZS90, Malvern Instruments) [5]. Por otro lado, la morfología de los nanoacarreadores se estudiará utilizando un microscopio electrónico (JEOL JEM1010TEM) con un voltaje de 60 kV [5].

- 4) **Evaluación de la estabilidad coloidal y térmica de los nanoacarreadores.** La estabilidad coloidal (cambios en el tamaño, potencial electrostático de superficie y morfología) se estudiará utilizando un equipo Zetasizer (Nano ZS90, Malvern Instruments) de dispersión dinámica y estática de luz. [6].
- 5) **Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de los nanoacarreadores.** En este proyecto, se utilizará un método *in vitro* que intenta simular el tránsito gástrico e intestinal, con algunas modificaciones [7]. Los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los nanoacarreadores se analizarán con las técnicas de dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de barrido, como se ha mencionado.
- 6) **Evaluación de la actividad antioxidante de los nanoacarreadores.** La actividad antioxidante se evaluará utilizando el método de decoloración del radical monocatión ABTS•+ [8]. Los resultados del ensayo se expresarán en términos de la capacidad antioxidante del estándar de Trolox (TEAC).
- 7) **Evaluación de la captación celular *in vitro* y respuesta celular antioxidante y antiinflamatoria.** Los experimentos de captación celular, tanto cuantitativos como cualitativos, utilizando células Caco-2 y se estudiará el posible papel del efecto antiinflamatorio y antioxidante de la C-FC [9]. La respuesta celular al tratamiento con C-FC se evaluará mediante ensayos de citotoxicidad, proliferación celular y apoptosis, y se utilizará el análisis proteómico para evaluar las vías biológicas relacionadas con la función antioxidante y antiinflamatoria de la C-FC. Estos estudios se realizan a través de la caracterización de los efectos biológicos y moleculares de la C-FC, para lo cual se utilizarán líneas celulares humanas de colon T84, CaCo-2 y SK-CO15 [10]. Para el análisis estadístico, en todos los experimentos se utilizarán células sin tratamiento como control negativo, células tratadas como control positivo, células tratadas con nanoacarreadores funcionalizados con C-FC y células tratadas con C-FC libre (no encapsulada). Los resultados de los experimentos se expresarán como promedio \pm del error estándar. Se utilizará la prueba estadística de Mann-Whitney T-test. Los valores con un $P < 0.05$ se considerarán estadísticamente significativos.

Formación de recursos humanos

En cuanto a los recurso humanos, se espera que el desarrollo del proyecto propuesto fomente la participación de estudiantes de servicio social y/o proyecto terminal de las licenciaturas asociadas con los departamentos de la DCNI (por ejemplo, Ingeniería Biológica y Biología Molecular), y también los programas de posgrado involucrados (Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería). Para este proyecto se contempla la participación de 2 estudiantes de proyecto terminal y 1 alumno de servicio social por año. Además, se contempla un proyecto para tesis de maestría e iniciar con una tesis de doctorado.

Productos esperados

Dentro de los productos esperados, se considera la difusión del conocimiento generado a partir de esta propuesta de investigación, por ejemplo, participando en 2 congresos especializados por año. También se considera la redacción y envío de 1 artículo científico especializado y 1 artículo de difusión por año. Asimismo, se proyecta generar 2 documentos de memorias o proceedings en total.

Impacto esperado del proyecto (problemática nacional abordada)

Este proyecto se alinea con la Agenda del Desarrollo sostenible 3030 de la siguiente manera: Objetivo 2. Poner fin al hambre. Lograr seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible. En la medida que se logre el desarrollo de alimentos nutritivos, sustentables y sostenibles en el largo plazo.

Recursos necesarios para el proyecto

Esta propuesta de investigación se llevará a fundamentalmente en los laboratorios de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa e incluye a los Departamentos de Procesos y Tecnología y Ciencias Naturales. Vale la pena mencionar que estos laboratorios cuentan con el equipo científico necesario para llevar a cabo actividades de investigación (equipo de dispersión de luz dinámica, calorímetro de barrido diferencial, cromatógrafo, ultracentrífuga, microscopio de fluorescencia, microscopio electrónico de barrido y equipo menor de laboratorio).

Presupuesto

El desglose financiero para este proyecto se presenta a continuación. Se consideran dos rubros principales para gasto corriente (Materiales y consumibles y Otros). Dentro del apartado gasto de inversión, ya que los laboratorios de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la UAM Cuajimalpa cuenta con el equipo necesario para las actividades de investigación, no se incurre en gastos. El gasto total del proyecto es de \$150,000.00 pesos mexicanos. Es importante destacar que este proyecto fue seleccionado para recibir financiamiento en la Convocatoria para la Postulación de Proyectos de Investigación por Personal Académico de Ingreso Reciente, con un monto total de \$150,000.00 pesos mexicanos.

Rubro	Descripción	Justificación	Gasto Corriente	Gasto inversión
Materiales y consumibles	Material de uso común (viales, micropipetas, puntas pipetas, agitadores magnéticos, material de vidrio, solución para electrodos, guantes, sales fosfato, acetato de sodio, ácido acético, HCl, NaOH, biopolímeros, enzimas, kits biología molecular, celdas para potencial zeta, celdas espectrofotómetro, cinta de carbono.	Materiales y consumibles requeridos para iniciar con la fabricación de nanoacarreadores biopoliméricos.	\$ 120,000.00	No se incurre en gastos de inversión debido a que la DCNI de la UAM-C cuenta con el equipo científico necesario.
Otros	Cuotas de inscripción a congresos.	Asistencia y presentación de trabajo en congreso científico especializado de reconocido prestigio nacional	\$ 5,000.00	
	Viáticos para congresos.		\$ 10,000.00	
	Gasto de edición y publicación.	Para publicación de un artículo original en revista indexada en JCR	\$ 15,000.00	
			Total \$ 150,000.00	

Calendario de actividades en períodos trimestrales

Período	Año 1			Año 2			Año 3			Año 4		
Actividades	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Extracción, purificación y caracterización de la proteína C-FC a partir de la cianobacteria cepa <i>Desertifilum tharense</i> .												
Optimización del método de síntesis de nanoacarreadores derivasos de aislado de proteína de suero de leche y el polisacárido pectina funcionalizados para la encapsulación de C-FC.												
Evaluación de las características fisicoquímicas de los nanoacarreadores (tamaño de partícula, distribución de tamaño, carga superficial, morfología).												
Evaluación de la estabilidad coloidal de los nanoacarreadores frente a diversos parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, fuerza iónica).												
Evaluación de la actividad antioxidante de los nanoacarreadores por el método ABTS ^{•+}												
Evaluación de la degradación enzimática proteolítica de los nanoacarreadores a través de un estudio de digestibilidad <i>in vitro</i> .												
Evaluación de la captación celular de los nanoacarreadores a través de un estudio <i>in vitro</i> con células epiteliales intestinales.												
Caracterización de la respuesta celular asociada con el efecto bioactivo de los nanoacarreadores (en términos de actividad antioxidante y antiinflamatoria) a través de un estudio <i>in vitro</i> con células epiteliales intestinales.												

Información para el seguimiento del proyecto

Producto	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4
Formación de recursos humanos nivel licenciatura				
Servicio Social	1	1	1	1
Proyecto Terminal	2	2	2	2
Tesis de licenciatura				
Formación de recursos humanos nivel posgrado				
Especialización				
Maestría	1			
Doctorado			1	
Publicaciones				
Artículos científico especializado	1	1	1	1
Capítulos de libro				
Memorias o Proceedings		1		1
Difusión o Divulgación				
Congresos	2	2	2	2
Conferencias				
Otros (artículos de divulgación científica)	1	1	1	1

Referencias

1. Recuperado de:
<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/EDR/EDR2022-Dft.pdf>
2. Hassan, S., et al., Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. *Journal of Basic Microbiology*, 2022. 62(9): p. 999-1029.
3. Manning, L., Systems for sustainability and transparency of food supply chains, in *Sustainable food systems from agriculture to industry*. 2018, Elsevier. p. 153-187.
4. Hernández-Martínez, I., et al., C-phycoerythrin production with high antioxidant activity of a new thermotolerant freshwater *Desertifilum tharense* UAM-C/S02 strain. *Bioresource technology*, 2023. 369, 128431.
5. Arroyo-Maya et al., Biopolymer particles as potential delivery systems for anthocyanins: fabrication and properties. *Food Research International*. 2015. 69:1-8.
6. Reyes-Lopez et al., The conserved SALT bridge linking two C-terminal β/α units in homodimeric triosephosphate isomerase determines the folding rate of the monomer. *Proteins*. 2008. 72:972-979.
7. Ji, Y., et al., Pickering emulsions stabilized by pea protein isolate-chitosan nanoparticles: fabrication, characterization and delivery EPA for digestion in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 2022. 378: p. 132090.
8. Re R, et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999. 26(9-10):1231-7.
9. Araki et al., In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis. *Oncol Rep*. 2006. 16(6):1357-62.)
10. Hao et al., Transcriptome Analysis of Phycocyanin-Mediated Inhibitory Functions on Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cell Growth. *Mar Drugs*. 2018. 15; 16 (12).