

**SÍNTESIS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS CON POSIBLE ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE SU MECANISMO DE ACCIÓN FRENTE A  
*Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A  
METICILINA (SARM)**

**MARLON YESID CÁCERES ORTIZ.**

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE SALUD**

**ESCUELA DE MEDICINA-MICROBIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2015**

**SÍNTESIS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS CON POSIBLE ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE SU MECANISMO DE ACCIÓN FRENTE A  
*Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A  
METICILINA (SARM)**

**Autor:**

**MARLON YESID CÁCERES ORTÍZ  
Bacteriólogo y Laboratorista Clínico**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar a título de:**

**MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**Directora:**

**CLAUDIA CRISTINA ORTÍZ LÓPEZ  
PhD. MICROBIOLOGÍA**

**Codirector:**

**RODRIGO GONZALO TORRES SAÉZ  
PhD. BIOQUÍMICA**

**LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA-MICROBIOLOGÍA  
BUCARAMANGA**

**2015**

## DEDICATORIA

*A todas aquellas personas que luchan cada día por un mundo nuevo en el  
que podamos vivir como hermanos*

*A los indígenas y campesinos que día a día nos dan ejemplo de humanidad*

*A todas las personas que creen en mis  
ideales*

*A mi familia por estar siempre*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Claudia Cristina Ortíz por toda su confianza, por su tolerancia infinita, su apoyo incondicional, por haber se convertido en mi segunda madre

Al Dr Rodrigo Torres por su guía, conocimiento, sabiduría y gran motivación en la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Fanny Guzmán Quimbayo por ese empuje que la caracteriza, por sus valiosos conocimientos, por su excelente disposición siempre para enseñar y apoyar.

A mi familia que siempre ha creído en mí.

A todos mis estudiantes de la Facultad de Salud que con sus ojos llenos de esperanza me impulsan a seguir cada día luchando por un mundo más equitativo para todos.

A todos mis compañeros de laboratorio por su tolerancia y apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	18
<b>1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES</b>	20
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE A METICILINA (SARM)	20
1.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	22
1.3 RESISTENCIA BACTERIANA	24
1.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)	26
1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PAMs	26
1.6 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LOS PAMs	29
1.7 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPFS)	36
1.8 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	38
1.9 ENCAPSULACIÓN DE PAMs	40

<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
2.1	OBJETIVO GENERAL	44
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	44
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
3.1	MATERIALES	45
3.2	METODOLOGÍA	45
3.2.1	Diseño bioinformático de PAMs	47
3.2.2	Síntesis química de PAMs	48
3.2.3	Purificación de los PAMs	51
3.2.3.1	Desalinización	51
3.2.3.2	Microextracción en fase sólida	51
3.2.4	Caracterización de los PAMs	51
3.2.4.1	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	51
3.2.4.2	Espectrometría de masas	52
3.2.4.3	Dicroísmo Circular	52
3.2.4.4	Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los PAMs libres	53

3.2.5	Síntesis de nanopartículas de PLGA-Péptido antimicrobiano	55
3.2.6	Caracterización de las nanopartículas de PLGA-Péptido antimicrobiano	55
3.2.6.1	Dispersión de luz en modo dinámico y Potencial Zeta	55
3.2.6.2	Microscopía Electrónica de Barrido en modo Transmisión (STEM)	56
3.2.6.3	Eficiencia de encapsulación de los péptidos M3 y M7 cargados en nanopartículas de PLGA por RP-HPLC	56
3.2.7	Estudio de la Interacción de los PAMs encapsulados frente a las membranas bacterianas	58
3.2.7.1	Ensayo de permeabilidad de la membrana interna bacteriana de <i>E. coli ML35</i>	58
3.2.7.2	Microscopía Confocal	58
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
4.1	DISEÑO DE PÉPTIDOS	60
4.2	SÍNTESIS QUÍMICA DE PAMs	64
4.3	CARACTERIZACIÓN DE LOS PAMs	65
4.3.1	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	65
4.3.2	Espectrometría de masas	65
4.3.3	Dicroísmo Circular	68
4.3.4	Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los PAMs libres	69
4.3.4.1	Actividad antibacteriana de los péptidos libres frente a <i>E.coli O157:H7</i>	70

4.3.4.2	Actividad antibacteriana de los péptidos libres frente a <i>SARM</i>	76
4.4.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA-PÉPTIDO ANTIMICROBIANO	82
4.5	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA-PÉPTIDO ANTIMICROBIANO	84
4.5.1	Microscopía electrónica de barrido en modo transmisión (STEM)	86
4.5.2	Dispersión de luz en modo dinámico	87
4.5.3	Potencia Zeta	89
4.5.4	Eficiencia de encapsulación de los péptidos M3 y M7 cargados en nanopartículas de PLGA por RP-HPLC	91
4.5.5	Actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M3 y PLGA-M7	92
4.6	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS PAMs ENCAPSULADOS FRENTE A LAS MEMBRANAS BACTERIANAS	97
4.6.1	Ensayo de permeabilidad de la membrana interna bacteriana de <i>E. coli ML35</i>	97
4.6.2	Microscopía Confocal	99
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	103
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	104
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	105
	<b>ANEXOS</b>	130

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Modelos de acción de los PAMs A. Modelo toroidal. B. Modelo de alfombra. C. Modelo de ruptura por barril. D. Modelo de canal agregado.	29
<b>Figura 2</b> Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS)	37
<b>Figura 3.</b> Metodología general de la propuesta de investigación	46
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de reacciones de activación y acople con DCC y HoBT.	49
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de desprotección del grupo Fmoc.	50
<b>Figura 6.</b> Visualización por <i>PyMol</i> del modelamiento de la estructura secundaria de los PAMs diseñados. A) M1. B) M2. C) M3. D) M4. E) M5. F) M6. G) M7. H) M8.	64
<b>Figura 7.</b> Espectros de masas. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5 F) M6 G) M7 H) M8	67
<b>Figura 8.</b> Espectros de dicroísmo circular de los péptidos M1 a M8. Solución de TFE al 30% (v/v). Concentración del PAM: 1mg/mL.	69
<b>Figura 9.</b> Efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos sobre el crecimiento de <i>E. coli O157:H7</i> . A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, F) M6, G) M7, H) M8. Todos los ensayo se	72

realizaron por triplicado. La densidad óptica del cultivo se determinó cada hora a 595nm durante 8 horas de incubación.

- Figura 10.** Efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos sobre el crecimiento de *SARM*. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, F) M6, G) M7, H) M8. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La densidad óptica del cultivo se determinó cada hora a 595nm durante 8 horas de incubación. 76
- Figura 11** Diagrama de rueda helicoidal de los péptidos y sus respectivos análogos. Los residuos hidrofílicos se representan como círculos, los hidrofóbicos como diamantes, los cargados negativamente como triángulos y los residuos con carga positiva como diamantes. (A) M1, (B) M2, (C) M3, (D) M4, (E) M5, (F) M6, (G) M7 (H) M8. 82
- Figura 12** Micrografía por FE-STEM en modo de transmisión de NPs PLGA-M3. Con un voltaje de aceleración de 30KV y magnificación de 200000x. 85
- Figura 13** Micrografía por FE-STEM en modo de transmisión de NPs PLGA-M7. Con un voltaje de aceleración de 30KV y magnificación de 160000x. 86
- Figura 14** Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de NPs de PLGA-M3. Condiciones: Fase Orgánica: PLGA: 10mg/mL y péptido M3: 1mg/mL disueltos en un 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Fase acuosa: polímero catiónico polietilenimina (PEI) a una concentración 0,1% v/v Y poloxámero 407 (0,5 p/v) disueltos en 5mL de agua. 88

<b>Figura 15</b>	Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de NPs de PLGA-M7. Condiciones: Fase Orgánica: PLGA: 10mg/mL y péptido M3: 1mg/mL disueltos en un 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Fase acuosa: polímero catiónico polietilenimina (PEI) a una concentración 0,1% v/v Y poloxámero 407 (0,5 p/v) disueltos en 5mL de agua.	88
<b>Figura 16</b>	Medida de potencial Zeta de las NPs de PLGA-M3 utilizando PEI 0.1% v/v como agente catiónico. Las mediciones se realizaron por triplicado.	90
<b>Figura 17</b>	Medida de potencial Zeta de las NPs de PLGA-M7 utilizando PEI 0.1% v/v como agente catiónico. Las mediciones se realizaron por triplicado.	91
<b>Figura 18</b>	Actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M7 frente a <i>E. coli</i> O157:H7.	93
<b>Figura 19</b>	Actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M3 frente a <i>SARM</i>	94
<b>Figura 20</b>	Concentración mínima bactericida de las NPs de PLGA-M3 sobre <i>SARM</i> .	94
<b>Figura 21</b>	Efecto de las NPs de PLGA sobre <i>E. coli</i> ML35. Los controles incluyeron la acción del reactivo ONPG en ausencia de las NPs de PLGA-M3, la acción del complejo NPs de PLGA-ONPG (ausencia del péptido M3), estos ensayos dieron incóloros, lo cual evidencia la acción del péptido M3.	98
<b>Figura 22</b>	Ensayo de permeabilización de la membrana de <i>E.coli</i> ML35 producida por las NPs de PLGA-M3 a diferentes concentraciones.	99

- Figura 23** Interacción de las NPs de PLGA-M7 con *E.coli* O157:H7. 100  
A) NPs de PLGA-M7. B) *E.coli* O157:H7. C) Interacción de las NPs de PLGA-M7 con *E.coli* O157:H7.
- Figura 24** Interacción de las NPs de PLGA-M3 con *SARM*. 100  
A) NPs de PLGA-M3. B) *SARM*. C) Interacción de las NPs de PLGA-M3 con *SARM*

## LISTA DE TABLAS

		pág.
<b>Tabla 1.</b>	Actividad antibacteriana de MccJ25 y derivados de péptidos sintéticos (1 y 6) contra Cepas bacterianas Gram-negativas.	30
<b>Tabla 2.</b>	Actividad bactericida de LFcin17e30, LFampin265e284 y LFchimera.	31
<b>Tabla 3.</b>	Actividad de SB041 y sus derivados frente a bacterias Gram-negativas. MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	32
<b>Tabla 4.</b>	Actividad antimicrobiana de los análogos de Buforin III.	33
<b>Tabla 5.</b>	Actividades antimicrobianas de BMAP-27, BMAP-18 y sus análogos	34
<b>Tabla 6.</b>	Actividad antimicrobiana de los péptidos cortos sintetizados y sus respectivos análogos, MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ).	35
<b>Tabla 7.</b>	Proteínas encapsuladas con su rendimiento y tipo de encapsulación respectivo.	43
<b>Tabla 8.</b>	Dominios conservados en el alineamiento múltiple	60
<b>Tabla 9</b>	Propiedades fisicoquímicas de los PAMs diseñados	63
<b>Tabla 10</b>	Valores de masa determinados mediante la herramienta CAMP y valores experimentales determinados mediante espectrometría de masas. PM representa el peso molecular expresado en $\text{g/mol}$ y $m/z$ es la relación masa-carga expresada en Daltons (Da).	67
<b>Tabla 11</b>	Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos y sus respectivos análogos frente a <i>E.coli O157:H7</i>	74

<b>Tabla 12</b>	Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos y sus respectivos análogos frente a <i>SARM</i>	79
<b>Tabla 13</b>	Características de las NP de PLGA-M3 y PLGA-M7: Tamaño, morfología y carga. ND: no se determinó. DS: Desviación estándar.	84
<b>Tabla 14</b>	CMI <sub>90</sub> y CMB del péptido libre y encapsulado M7 frente a <i>E. coli</i> O157:H7 , y del péptido libre y encapsulado M3 frente a <i>SARM</i> . ND: No determinado	95

## RESUMEN

**TITULO:** SÍNTESIS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE SU MECANISMO DE ACCIÓN FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)<sup>1</sup>

**AUTOR:** Marlon Yesid Cáceres Ortíz \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Péptidos antimicrobianos, *E. coli* O157:H7, SARM, Nanoprecipitación, encapsulación.

**DESCRIPCIÓN:** En este trabajo de investigación se llevó a cabo el diseño y la síntesis de ocho péptidos con posible actividad antibiótica frente a *E. coli* O157:H7 y SARM. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) se sintetizaron en fase sólida empleando la estrategia Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Los PAMs se obtuvieron con una pureza del 95% y un perfil típico de  $\alpha$ -Hélice, de acuerdo con los espectros de dicroísmo circular. Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de los péptidos sintetizados frente a *E. coli* O157:H7 y SARM, las secuencias que exhibieron las actividades antimicrobianas más altas fueron encapsuladas en nanopartículas de PLGA y evaluados nuevamente frente a *E. coli* O157:H7 y SARM. Los péptidos nanoestructurados se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido en modo de Transmisión (STEM), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y RP-HPLC. El péptido encapsulado M3 alcanzó una CMB de 25  $\mu$ M frente a SARM, mientras el péptido encapsulado M7 exhibió una CMI<sub>90</sub> de 50  $\mu$ M frente a *E. coli* O157:H7. Finalmente se analizó la interacción de los péptidos sintéticos con las membranas bacterianas mediante Microscopía Confocal y ensayos de integridad de la membrana interna, los resultados obtenidos muestran la permeabilización de la membrana bacteriana e indican que los PAMs sintetizados nanoestructurados se constituyen en una alternativa viable para enfrentar el desafío de la resistencia bacteriana.

---

\*Tesis de Maestría

\*\* Facultad de Salud, Escuela de Medicina-Microbiología. Directora: Claudia Cristina Ortiz López, Microbióloga. Co-director: Rodrigo Gonzalo Torres Saez, Bioquímico.

## ABSTRACT

**TITLE:** SYNTHETIC PEPTIDE SYNTHESIS WITH POSSIBLE ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND STUDY OF ACTION MECHANISM AGAINST *Escherichia coli* 0157:H7 AND *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA).

**AUTHOR:** Marlon Yesid Cáceres Ortíz

**KEYWORDS:** Antimicrobial peptides, *E. coli* O157:H7, MRSA, nanoprecipitation, encapsulation.

**DESCRIPTION:** In this research project the design and synthesis of 8 peptides with possible antimicrobial activity against *Escherichia Coli* 0157:H7 and MRSA were carried out. The antimicrobial peptides, AMPs, were synthesized in solid phase using the Fmoc strategy (9-fluorenylmethoxycarbonyl). The AMPs were obtained with 95% purity and a typical  $\alpha$ -Helix profile, according to its circular dichroism spectra. Afterwards the peptides antimicrobial activity was evaluated. Then the sequences with higher activity were encapsulated in PLGA nanoparticles and evaluated again against *E.coli* 0157:H7 and MRSA. The nanostructured peptides were then characterized using Scanning Transmission Electron Microscopy, STEM, Dynamic Light Scattering and RP-HPLC. The M3 peptide reached a CMB of 25 $\mu$ M with MRSA, while the M7 peptide showed a CMI<sub>90</sub> of 50  $\mu$ M with *E.coli* 0157:H7.

Finally the interaction between the synthetic peptides and the bacterial membranes were analyzed through Confocal Microscopy and integrity assays to the inner membrane. The results obtained showed permeabilization of the bacterial membrane and indicate that the nanostructured AMPs synthesized represent a viable alternative facing the bacterial resistance challenge.

\*master's thesis

\*\* Faculty of health, Medical microbiology school, Director: Claudia Cristina Ortiz López, Microbiology. Co-director: Rodrigo Gonzalo Torres Saez, Biochemical

## INTRODUCCIÓN

El aumento progresivo de la resistencia que han desarrollado los microorganismos frente a los antibióticos está ocasionando graves implicaciones en la salud pública a nivel mundial (Hawkey & Jones, 2009; Livermore, 2003) . Dentro de este grupo de microorganismos la *United States Food and Drug Administration* (FDA) ha identificado una larga lista de bacterias patógenas. Entre ellas destacan *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* (SARM) (Johnson, Thorpe, & Sears, 2006).

Por lo tanto, se hace indispensable el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que eviten los mecanismos de resistencia que han desarrollado bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* (SARM). Una prometedora alternativa la constituyen los péptidos antimicrobianos (PAMs). Los PAMs constituyen un grupo de biomoléculas presentes en todos los sistemas vivos como una línea de defensa frente a microorganismos patógenos. Los PAMs juegan un papel importante en procesos anticancerígenos, inmunomoduladores e inflamatorios, desempeñando una función significativa en la patogénesis de muchas enfermedades (Ezzati-tabrizi, Farrokhi, Talaei-hassanloui, Alavi, & Hosseininaveh, 2013).

Los PAMs se presentan como una posible alternativa para reemplazar los antibióticos tradicionales. Sin embargo presentan una reducida biodisponibilidad que impiden la administración oral. Además son vulnerables frente a la acción proteolítica y la baja estabilidad en medios de alta fuerza iónica. Para una efectiva utilización de los PAMs es necesario el uso de estrategias que permitan mejorar algunas propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, el diseño y síntesis de péptidos permite el aumento de su carga positiva y la disminución de la hidrofobicidad (Bahar & Ren, 2013; Bowdish, Davidson, & Hancock, 2005).

Con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad y biocompatibilidad de los péptidos hacia células y tejidos, se ha desarrollado la estrategia de encapsulación en nanopartículas poliméricas. Esta alternativa ha permitido a su vez aumentar la actividad antimicrobiana de los PAMs (Yadav, Kumari, & Yadav, 2011).

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos en el diseño y síntesis de nuevos péptidos con actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *SARM*. Los nuevos péptidos y sus respectivos análogos fueron diseñados mediante herramientas bioinformáticas integrando parámetros fisicoquímicos inherentes a su actividad antimicrobiana.

Las secuencias diseñadas fueron sintetizadas empleando el método de síntesis en fase sólida (SFS), usando la estrategia Fmoc. Los péptidos fueron desalinizados empleando Cromatografía de Exclusión de tamaño y analizados por cromatografía líquida con detector fotométrico de arreglo de diodos (LC-PDA) acoplado a un espectrómetro de masas (MS). La estructura secundaria del péptido fue analizada por la técnica de dícroísmo circular (DC). Luego se realizaron ensayos de actividad antibacteriana de los péptidos sintetizados frente a los microorganismos ya mencionados.

Los péptidos que presentaron mayor actividad antimicrobiana fueron encapsulados y evaluados nuevamente frente a *E.coli* O157:H7 y *SARM*. Los péptidos nanoestructurados se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido en modo de Transmisión (STEM), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y RP-HPLC.

Finalmente se analizó la interacción de los péptidos sintéticos con las membranas bacterianas mediante Microscopía Confocal y ensayos de integridad de la membrana interna. Los resultados obtenidos de los ensayos antibacterianos y las pruebas de integridad de la membrana realizados en los péptidos encapsulados indican que esta nueva generación de fármacos los convierte en candidatos promisorios para formar parte de la nueva familia de agentes antimicrobianos

## 1. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

### 1.1 *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)

SARM es un patógeno que causa una amplia gama de infecciones en diferentes grados, desde leves (ej. infecciones localizadas de piel) hasta las graves (ej. sepsis bacteriana) (Paganini et al., 2009).

Lo anterior se debe a que *S. aureus* es un patógeno versátil que puede expresar una serie de factores de virulencia, entre los que se encuentran: las adhesinas (por ejemplo, de unión a proteínas de fibronectina (FnBPs) y proteína A que median la adherencia a las células huésped; enzimas (por ejemplo proteasas y lipasas), modulinas solubles en fenol; y polisacáridos capsulares (Kaplan et al., 2005).

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distantes del foco de infección. La expresión de éstas proteínas se encuentra regulada por un gen accesorio regulador de proteínas (agr) y pueden ser codificadas por el ADN cromosómico o plasmídico. Entre las más destacadas se encuentran (Dinges, Orwin, & Schlievert, 2000):

- *Leucocidina de Panton-Valentine*: Sintetizada por el 2 a 3% de las cepas y está compuesta por dos subunidades proteicas, la F y S, que actúan en forma sinérgica sobre las membranas de células fagocíticas (Löffler et al., 2010).
- *Enterotoxinas*: Estas proteínas son producidas por el 30 al 50% de las cepas de *S. aureus*; son proteínas termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, siendo responsables de intoxicaciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis (Vandenesch et al., 2003).

- *Toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1)*: Es una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos. Actúa como un superantígeno, induciendo la liberación de citocinas por linfocitos T y macrófagos (Otto, 2012).
- *Hemolisinas*: Se conocen cuatro proteínas denominadas *alfa*, *beta*, *gamma* y *delta*. Poseen capacidad hemolítica y citolítica actuando sobre determinadas células eucariotas del huésped como plaquetas, macrófagos, fibroblastos y leucocitos. La toxina *alfa* ha sido la más estudiada; interviene en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de los cambios de permeabilidad inducidos en las células endoteliales (Miller & Diep, 2008).

Por otro lado, la resistencia a meticilina de *Staphylococcus aureus*, implica resistencia intrínseca a todos los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, incluidos cefalosporinas y carbapenemes. La resistencia es mediada la mayoría de veces por un gen denominado *mecA* que codifica para la síntesis de una proteína de unión a penicilina (PBP2A) de la bacteria (Kaplan, 2005). Este gen se encuentra localizado en una isla genética llamada *cassette* cromosómico *mec* (SCC*mec*). Las cepas adquiridas en la comunidad poseen el gen SCC*mec* IV a diferencia de las circulantes dentro del hospital donde prevalecen los genes SCC*mec* del I al III (Hososaka et al., 2007; Mcdougal et al., 2003). Las cepas que tienen el gen SCC*mec* IV tienen un patrón de susceptibilidad antimicrobiano diferente a las cepas de origen hospitalario, éstas presentan resistencia únicamente frente a meticilina y buen nivel de susceptibilidad a clindamicina, cotrimoxazol y tetraciclinas (Lindsay, 2013), provocando infecciones de la piel en el 85-90% de los casos e infecciones graves en un 10% de los casos. Estos últimos pueden llevar a sepsis o neumonía, e incluso ocasionar la muerte (Ochoa, Mohr, Wanger, Murphy, & Heresi, 2005; Salgado, Farr, & Calfee, 2003).

La resistencia a meticilina no mediada por el gen *mecA*, se explica mediante dos mecanismos. El primero es debido a la hiperproducción de penicilinasa, la cual sintetiza una cantidad importante de  $\beta$ -lactamasa. El segundo mecanismo de

adquisición de resistencia a meticilina no mediado por el gen *mec A*, es mediante la modificación de las proteínas de anclaje de penicilinas (PBPs) habituales en *S. aureus*. Estas cepas presentan una modificación en la afinidad de sus PBPs normales frente a los  $\beta$ -lactámicos, lo cual puede ser debido a la hiperexpresión de algunas de estas PBPs o a la consecuencia de mutaciones genéticas que alteran la afinidad de la proteína final por el antibiótico (Garau, Bouza, Chastre, Gudiol, & Harbarth, 2009).

## **1.2 *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), especialmente la del serotipo O157:H7, constituye un importante patógeno emergente para los seres humanos. Es capaz de provocar desde una diarrea no sanguinolenta hasta una colitis hemorrágica (CH) acompañada de síndrome urémico hemolítico (SUH) o de púrpura trombocitopénica trombótica. Desde su reconocimiento como patógeno en 1982, *E. coli* O157:H7 se ha identificado como responsable de innumerables brotes y casos esporádicos de CH y de SUH (Syndrome et al., 2004).

La presentación clínica más común es la CH, caracterizada por un cuadro grave de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta que cursa generalmente sin fiebre y que aproximadamente en el 15% de los pacientes culmina con el desarrollo del SUH (Tarr, Gordon, & Chandler, 2005). Este síndrome afecta fundamentalmente a los niños y se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo, que puede requerir diálisis e incluso trasplante, con una mortalidad de entre el 5 y el 10% y graves secuelas en el 12 al 30% de los pacientes (Gupta et al., 2004; Johnson et al., 2006; Scheiring, Andreoli, & Zimmerhackl, 2008).

ECEH es un microorganismo no invasivo. Las verotoxinas de *E. coli* deben absorberse a través del epitelio intestinal para acceder a la circulación sistémica (Alborzi et al., 2008), donde se transportan unidas a los leucocitos polimorfonucleares (te Loo et al., 2000). De esta manera, la toxina absorbida a través del epitelio intestinal es transportada en la circulación desde el colon hasta sus órganos diana. Las verotoxinas se unen al glucoesfingolípidio globotriaosilceramida (receptor Gb3) (Gamage, Mcgannon, & Weiss, 2004), circunstancia que tiene lugar en las células endoteliales, mesangiales y epiteliales de los glomérulos renales, además de otros tipos celulares, como macrófagos, monocitos y neutrófilos (Thorpe, 2004), y en otros órganos como el cerebro (Paton & Paton, 1998). Por otro lado, La acción de las verotoxinas sobre las células endoteliales microvasculares dan lugar a una disminución de su actividad antitrombótica y fibrinolítica, el daño de la célula endotelial conduce a la formación de multímeros anormales del factor de Von Villebrand y la consecuente agregación plaquetaria y trombocitopenia (Law, 2000).

Los mecanismos de resistencia antibiótica en *E. coli* O157:H7 hacia meticilina, trimetropim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico son múltiples. Estos mecanismos se adquieren mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes facilitada por algunos elementos móviles tales como los integrones. Esta transferencia horizontal permite que los mecanismos se trasladen entre diferentes cepas de *E.coli* enterohemorrágicas y que se diseminen rápidamente a nivel mundial. Para cada familia de antibióticos existe más de un mecanismo de resistencia antibiótica descrito, como en el caso de la quinolonas que presentan mutaciones cromosómicas, proteínas que impiden la unión del antibiótico y las recientemente descritas bombas de eflujo específicas. En general, entre los tipos de mecanismos moleculares de resistencia más comunes se encuentran: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones

de la permeabilidad (Alekshun & Levy, 2015; Carone, Xu, Murphy, & Marinus, 2014; Laxminarayan et al., 2014).

El control molecular de la resistencia antibiótica es parte transcendental de la política de control de la vigilancia antibiótica como lo recomienda la OMS. Este mecanismo representa el futuro de la vigilancia de resistencia, debido a que si bien los mecanismos de resistencia surgen ante el uso de un antibiótico específico, generan también resistencia cruzada hacia otros antibióticos de la misma clase o con el mismo mecanismo de acción y e incluso a compuestos de familias diferentes. Por lo que son pieza clave para las políticas de control y uso de antibióticos a nivel nacional (Memish et al., 2014).

### **1.3 RESISTENCIA BACTERIANA**

Los agentes antibacterianos se clasifican según la forma de acción, de la siguiente forma; inhibición de la síntesis de la pared bacteriana ( $\beta$ -lactámicos y glicopéptidos), inhibición de la síntesis de proteínas (macrólidos y tetraciclinas), interferencia con la síntesis de los ácidos nucleicos (fluoroquinolonas y rifampicinas), inhibición de rutas metabólicas (trimetoprim-sulfametoxazole) y daño de la estructura de la membrana bacteriana (polimixinas y daptomicina) (Canizalez-Roman, Gonzalez-Nunez, Vidal, Flores-Villasenor, & Leon-Sicairos, 2013).

Se ha hecho evidente que el uso intenso, prolongado e inadecuado de los antibióticos ha provocado la distribución de bacterias patógenas altamente resistentes en todo el mundo (Fig. 1) (Aarestrup, 2005; Cabello, 2006; Lindsay, 2013; Pasberg-Gauhl, 2014).

Las bacterias presentan múltiples formas de resistencia. Algunas presentan resistencia intrínseca o natural y otras la presentan de forma adquirida. Entre los mecanismos de resistencia adquirida más descritos en la literatura se encuentran: 1). Adquisición de genes que codifican para enzimas que inactivan los fármacos antes de que de que puedan cumplir su efecto. El ejemplo más claro son las  $\beta$ -lactamasas, que han sido clasificadas dependiendo de su espectro de acción; una de ellas son las penicilasas, cefalosporinasas, carbapenemasas. 2). Formación de bombas de flujo que les permite a los microorganismos la eliminación del agente antimicrobiano antes de que pueda unirse al blanco. 3). Adquisición de genes que pueden intervenir en rutas metabólicas produciendo cambios en la pared. Un ejemplo de este último mecanismo es la disminución de la formación de porinas o generación de cambios en los receptores (Kumar & Varela, 2013). Para los tres mecanismos mencionados las bacterias utilizan varias estrategias genéticas, algunas se basan principalmente en la transferencia de genes de resistencia mediante plásmidos y su estabilización en el cromosoma bacteriano por medio de integrones y otras realizan mutaciones en genes de importancia o modificaciones a nivel traduccional (Binnewies et al., 2006; Purrello et al., 2014). Otro aspecto importante que ha favorecido el desarrollo de resistencia bacteriana es la habilidad que tienen algunas bacterias para formar biofilms o micro colonias; debido a su prevalencia abrumadora, los biofilms han sido reconocidos progresivamente como factores importantes en la patogenia de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal, neumonía por *Pseudomona*, fibrosis quística, cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis, y prostatitis crónica. También se ha demostrado que los biofilms se desarrollan en una variedad de dispositivos médicos implantables, provocando infecciones asociadas, destacándose entre ellas la sepsis por catéteres endovenosos y arteriales. Además se han descrito en catéteres urinarios, sigmoidoscopios y lentes de contacto. Constituyen también un problema serio en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos y prótesis ortopédicas las cuales, una vez infectadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver

mediante antibióticos (Acker, Dijck, & Coenye, 2014; Forier et al., 2014; Smith, 2005; Taylor, Yeung, & Hancock, 2014).

#### 1.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas efectoras del sistema inmune innato, con un amplio espectro de actividad antibiótica sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y parásitos. Algunos de estos péptidos son producidos, mientras que otros son consecuencia de las citoquinas proinflamatorias y agentes exógenos; pueden manifestarse en procesos de cicatrización contribuyendo a la eliminación de infecciones y la reparación de tejidos (Boulangier, Bulet, & Lowenberger, 2006; Ong, Wiradharma, & Yang, 2014).

La masa molecular de los PAMs es menor de 10 KDa. son moléculas catiónicas, que tienen una carga positiva a pH fisiológico, debido al gran contenido de arginina y lisina (residuos cargados positivamente) en relación con el de ácido aspártico y ácido glutámico (residuos cargados negativamente), generalmente, con una carga neta entre +2 y +9 (Povey, Howard, Williamson, & Smales, 2008). Los PAMs se caracterizan por tener cadenas laterales hidrofílicas e hidrofóbicas que en medio acuoso tienden a doblarse adoptando estructuras secundarias de baja energía, ya sean  $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -plegada, dando lugar a un comportamiento anfipático (Park, Park, & Hahm, 2011).

Los PAMs se han clasificado de acuerdo con la estructura tridimensional en los siguientes grupos: a) *PAMs con estructura  $\beta$ -plegada*, b) *PAMs de  $\alpha$ -hélice*, c) *PAMs ricos en cisteína* d) *PAMs ricos en aminoácidos regulares* y e) *PAMs compuestos de aminoácidos modificados* (Epand & Vogel, 1999).

## 1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PAMs

Existen diferentes estudios sobre la relación estructura-función de los PAMs (Jang et al., 2012; Sibel Akalin, 2014) Las propiedades biofísicas de los PAMs: estructura secundaria, carga total e hidrofobicidad, influyen en la interacción con membranas modelo y membranas biológicas. La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente es favorecida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas o los lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativos (Shai, 1999). Después de esta interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o internamente (Zhang et al., 2010).

Teniendo en cuenta la información disponible, se han propuesto cuatro modelos que explican el mecanismo de acción de los PAMs y que se ilustran en la figura 1. (Guaní-Guerra, Santos-Mendoza, Lugo-Reyes, & Terán, 2010; Zhu et al., 2014):

- **Modelo toroidal**

En este modelo, los péptidos se unen a la membrana al alcanzar una concentración límite que hace que los lípidos se doblen formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos, formando un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana. Este tipo de

mecanismo se ha encontrado en péptidos como magainina y mellitina (Imura, Nishida, & Matsuzaki, 2007).

- **Modelo de alfombra**

En el mecanismo de alfombra, los péptidos no se insertan en la membrana, sino que permanecen asociados con la cara externa y, al alcanzar un punto crítico, forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar su colapso en una configuración de micelio; eventualmente, se produce la muerte celular por pérdida del citoplasma. Este tipo de mecanismo se ha encontrado en péptidos como laticín Ltc2a, derivado del veneno de la araña *Lachesana tarabaei* (Vorontsova, Egorova, Arseniev, & Feofanov, 2011).

- **Modelo de ruptura por barril**

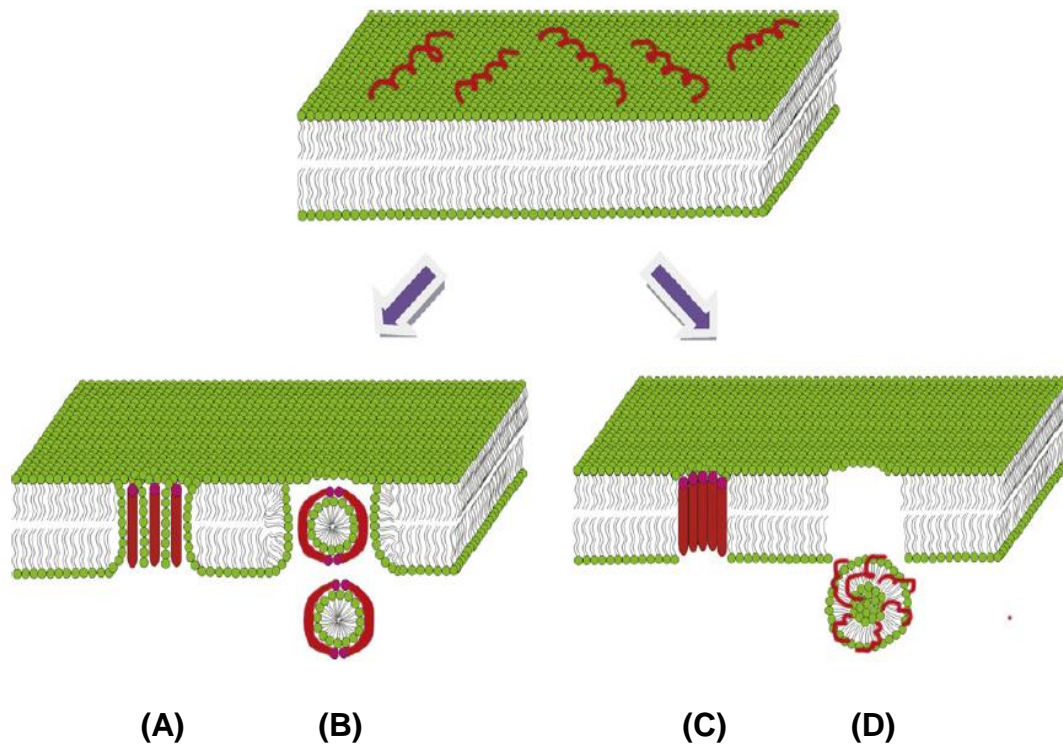
En este mecanismo, luego de interactuar con la membrana y alcanzar un nivel crítico entre péptido y lípido, los péptidos se reorientan de forma perpendicular formando una empalizada con sus cadenas laterales hidrofóbicas que encaran el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares, y enfrentan el centro creando un poro hidrofílico. La formación de este tipo de poros es irregular en tamaño y duración, lo que genera, finalmente, una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana (Mihajlovic & Lazaridis, 2010a, 2010b).

- **Modelo de canal agregado**

Este mecanismo es similar al que utilizan los detergentes, el péptido se une a la membrana y, a una concentración suficiente, se reorienta, lo que permite la formación de estructuras parecidas a los micelios que se extienden en la bicapa

en un complejo péptido lipídico. Estos agregados aleatorios transmembrana de lípido péptido y agua, forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático; o pueden desintegrarse espontáneamente, lo que lleva a la translocación de los péptidos hacia el citoplasma donde pueden afectar blancos de acción interna (H. W. Huang, 2006).

**Figura 1.** Modelos de acción de los PAMs A. Modelo toroidal. B. Modelo de alfombra. C. Modelo de ruptura por barril. D. Modelo de canal agregado.



Fuente: Yanmei li et al 2012.

## 1.6 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LOS PAMs

Los PAMs se presentan en la actualidad como una de las moléculas más prometedoras en la lucha contra las bacterias debido a sus múltiples zonas de acción y a su toxicidad reducida (G. Wu, Deng, Wu, Shen, & Xu, 2012). A continuación se presentan algunos estudios relevantes relacionados con los péptidos antimicrobianos sintéticos más importantes:

En el año 2011, Soudy y colaboradores sintetizaron 6 péptidos análogos de la Microcina J25 (MccJ25), un péptido antimicrobiano de 21 residuos aminoacídicos con estructura de lazo, altamente efectivo frente a bacterias Gram-negativas. Se evaluó la actividad de éstos análogos de la MccJ25, mostrando valores destacados de inhibición bacteriana para el análogo 1 y el 6 (las secuencias no son mostradas debido a la confidencialidad de las secuencias que pueden ser patentadas), como se muestra en la tabla 1 (Soudy, Wang, & Kaur, 2012):

**Tabla 1.** Actividad antibacteriana de MccJ25 y derivados de péptidos sintéticos (1 y 6) contra Cepas bacterianas Gram-negativas.

Cepas	MccJ25 ( $\mu\text{M}$ )	1 ( $\mu\text{M}$ )	6 ( $\mu\text{M}$ )
	GGAGHVPEYFVVGIGTPISFYG		
<i>Salmonella. Newport</i>	0.5 $\pm$ 0.05	25 $\pm$ 3.0	30 $\pm$ 4.0
<i>Salmonella. enteritidis PT8</i>	1.5 $\pm$ 0.8	80 $\pm$ 3.0	-
<i>S. enteritidis ATCC 13076</i>	1.8 $\pm$ 0.7	-	-
<i>S. enteritidis AFLB 11</i>	2.0 $\pm$ 0.6	-	-
<i>S. enteritidis AFLB 41</i>	1.6 $\pm$ 1.0	-	-
<i>S. enteritidis AFLB 81</i>	1.7 $\pm$ 1.2	-	-
<i>Salmonella. typhimurium AFLB 25</i>	2.8 $\pm$ 0.8	85 $\pm$ 5.2	-
<i>S. typhimurium ATCC 13311</i>	-	75 $\pm$ 6.5	-
<i>S. heidelberg ATCC 8326</i>	-	83 $\pm$ 6.1	-

<i>S. montevideo 20</i>	-	-	-
<i>S. paratyphi</i>	1.5 ± 1.0	-	-
<i>S. choleresius ATCC 10708</i>	1.5 ± 0.6	90 ± 5.7	-
<i>E. coli DH5</i>	5.0 ± 1.0	-	-
<i>E. coli MC4100</i>	5.0 ± 2.0	-	-

En otro estudio realizado en el año 2008, Bolscher y colaboradores diseñaron y sintetizaron una estructura química que contiene aminoácidos de lactoferrina (17-30) y aminoácidos de la lactoferrampina (265-284). Los resultados evidencian que la actividad bactericida de este nuevo péptido sintetizado es más fuerte en comparación con los péptidos que lo constituyen, lo cual se demostró por la necesidad de una dosis más baja para alcanzar el mismo efecto y una menor dependencia de fuerza iónica. En la tabla 2 se muestra la actividad bactericida de la LF chimera y de sus constituyentes por separado (Bastos et al., 2011):

**Tabla 2:** Actividad bactericida de LFCin17e30, LFampin265e284 y LFchimera.

Cepas Bacterianas	LFCIN 17-30 (μM) FKCRRWQWRMKKLG	LFamp 265-284 (μM) DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR	LFchimera (μM) DLIWKLLSKAQEKFGKNKSR FKCRRWQWRMKKLG —K
Agr. <i>actinomycetemcomitans</i>	nd	nd	nd
<i>Streptococcus. mutans</i>	>50	25	1.3
<i>Streptococcus. sanguis</i>	>50	9.5	1.4
<i>E. coli K12</i>	>50	>50	2.7

<i>Pseudomona. aeruginosa Pak</i>	1.6	5.1	0.9
<i>P. aeruginosa Pao</i>	nd	nd	nd

Posteriormente, Bruschi y colaboradores (2010), sintetizaron péptidos multiméricos, los cuales presentaron ventajas con respecto a sus homólogos monoméricos, entre las cuales se destacan una mayor actividad antimicrobiana y un incremento en la estabilidad frente a proteasas y peptidasas. El péptido multimérico sintetizado denominado SBO41, tiene una estructura dendrímica formado por un tetrámero de pyrEKKIRVRLSA unido por un núcleo de lisina. El péptido fue especialmente activo contra cepas Gram-negativas, con una potencia comparable (en base molar) a la de los lipopéptidos colistina y polimixina B. Los resultados de la actividad antibacteriana del péptido SB041 y sus derivados son presentados en la tabla 3 (Bruschi et al., 2010):

**Tabla 3 :** Actividad de SB041 y sus derivados frente a bacterias Gram-negativas. MIC ( $\mu\text{M}$ ).

Microorganismo	SB041	CL	PB	AMI	CIP	ERY	GEN
<i>A.. Baumannii</i>	8	1	1	16	>16	32	>16
<i>E. cloacae</i>	8	0.5	1	1	>16	>128	16
<i>E. coli</i>	4	0.5	0.5	2	<0.125	32	1
<i>K. pneumoniae</i>	8	2	1	16	>16	>128	>16
<i>K. pneumoniae</i>	16	1	4	>16	>16	>128	>16
<i>P. aeruginosa 27853</i>	8	1	1	2	0.25	128	1

<i>P. aeruginosa</i>	16	2	2	>16	16	>128	>16
<i>P. aeruginosa</i>	4	0.5	0.5	4	4	128	2
<i>S. maltophilia</i>	8	1	1	4	2	>128	2

En una investigación realizada por Jang y colaboradores en 2012, se sintetizaron análogos sintéticos del péptido Buforin III, mediante la sustitución de aminoácidos en la región bisagra del péptido, sustitución de residuos hidrófobos y de los primeros cuatro aminoácidos del péptido (RAGL), como resultado la actividad antimicrobiana aumentó 2 veces y el índice terapéutico de los análogos Buforin IIIb y IIIc mejoraron 7 veces en comparación con el Buforin IIb. Los resultados de la actividad antimicrobiana de los análogos de Buforin III se presentan en la tabla 4 (Jang et al., 2012):

**Tabla 4:** Actividad antimicrobiana de los análogos de Buforin III.

Microorganismo	Minimal inhibitory concentration ( $\mu\text{M}$ )					
	Buforin IIb RAGLOQFPVGR LLRLLRRLLR	Buf IIIa RAGLOQWPIGR LLRLLRRLLR	Buf IIIb RVVRQWPIGR VRRRVRRVVR	Buf IIIc KLLKQWPIK LLKKLLKCLK	Buf III d KVVKQWIK VVKKVVKKK	Maga inin II
<b>Bacterias Gram- Negativas</b>						
<i>E. coli</i>	1	1	0.5	0.5	2	64
<i>S. enteritidis</i>	2	2	1	1	2	64
<i>P. putida</i>	2	2	1	1	1	32
<b>Bacterias Gram – Positivas</b>						

<i>B. subtilis</i>	1	2	1	1	2	32
<i>S. mutans</i>	2	2	1	1	2	64
<i>S aureus</i>	2	1	1	0.5	1	32
<b>Fungi</b>						
<i>Candida albicans</i>	1	2	1	1	1	32
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	1	1	1	2	32
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	2	1	1	2	64

Por otro lado Kyu Lee y colaboradores en 2011, sintetizaron un péptido de 18 residuos N-terminal (BAMP-18) y sus análogos (BMAP-18-W, BMAP-18-L, BMAP-18-I y-BMAP 18-f). éstos péptidos mostraron una disminución de la actividad hemolítica manteniendo la actividad antimicrobiana, lo cual se evidencia en la tabla 5 (E. K. Lee, Kim, Nan, & Shin, 2011):

**Tabla 5:** Actividades antimicrobianas de BMAP-27, BMAP-18 y sus análogos

Peptide	Minimal Inhibitory Concentration (MIC) (µM)					
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S.aureus</i>
BMAP-27 GRFKRFRKKFKK LFKKLSPVIPLH L	4	2	1	2	2	4
BMAP-18 GRFKRFRKKFKK LFKKLS	4	4	2	4	4	4
BMAP-18-W GRWKRWRKKW KKLWKKLS	4	4	2	2	8	4
BMAP-18-L GRLKRLRKKLKK	8	4	2	4	8	4

LLKKLS						
BMAP-18-I GRIKRIRKKIKKLI KKLS	4	4	2	4	8	4
BMAP-18-F GRfKRfRKKfKfKf KKLS	4	4	2	2	4	4

Más adelante Xiabao Qi y colaboradores (2010), diseñaron péptidos antimicrobianos cortos de nueve a once residuos de aminoácidos. Sintetizaron 11 péptidos análogos de las secuencias KWRRWVRWI y KKLfKKILKfL, los cuales fueron probados frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, obteniéndose MICs entre 4 a 10 veces menores que los péptidos diseñados inicialmente. En la tabla 6 se registran las MICs de los péptidos cortos sintetizados (Qi et al., 2010):

**Tabla 6:** Actividad antimicrobiana de los péptidos cortos sintetizados y sus respectivos análogos, MIC ( $\mu\text{M}$ ).

Peptide name	Peptide Sequence	<i>E. coli</i> .	<i>P.aeruginasa</i>	<i>S. aureus</i>
P9-0 (Pac-525)	KWRRWVRWI	12.5	50	25
P9-1	KLRRWVRWI	25	50	50
P9-2	KWRRWVRWL	12.5	25	12.5
P9-3	KLRRWVRWL	50	50	25
P9-4	KWRRWLRWL	6.2	6.2	3.1
P9-5	KWRRWIRWW	12.5	12.5	6.2
P9-6	KLRLiRLL	12.5	25	50
P11-0 (BP76)	KKLfKKILKfL	8	16	62.3
P11-1	KKLfKKILKKfL	16	8	500
P11-2	KKLfKKALKfL	16	62.3	500
P11-3	KKLfKKGLKfL	125	500	500
P11-4	GKLfKKLKfL	8	16	31.3
P11-5	GKLfKKILKIL	3.1	12.5	12.5

P11-6	KKLIKKILKIL	3.1	6.25	6.25
-------	-------------	-----	------	------

Los anteriores estudios demuestran el potencial uso que pueden llegar a tener los PAMs como agentes antimicrobianos. Sin embargo, estos compuestos son susceptibles a la desnaturalización y pérdida de actividad durante el proceso de transporte hacia su sitio de acción debido a agregación, degradación con tiempo de vida media corta por proteólisis y rápida eliminación del torrente sanguíneo, lo cual requiere administración repetida que restringe en ocasiones su uso terapéutico, además los PAMs pueden presentar citotoxicidad en células humanas, baja estabilidad, entre otras (Friedrich, Moyles, & Beveridge, 2000; Imura, Choda, & Matsuzaki, 2008). La encapsulación de los péptidos sintéticos en nanopartículas poliméricas surge como una alternativa para mejorar las propiedades de los péptidos.

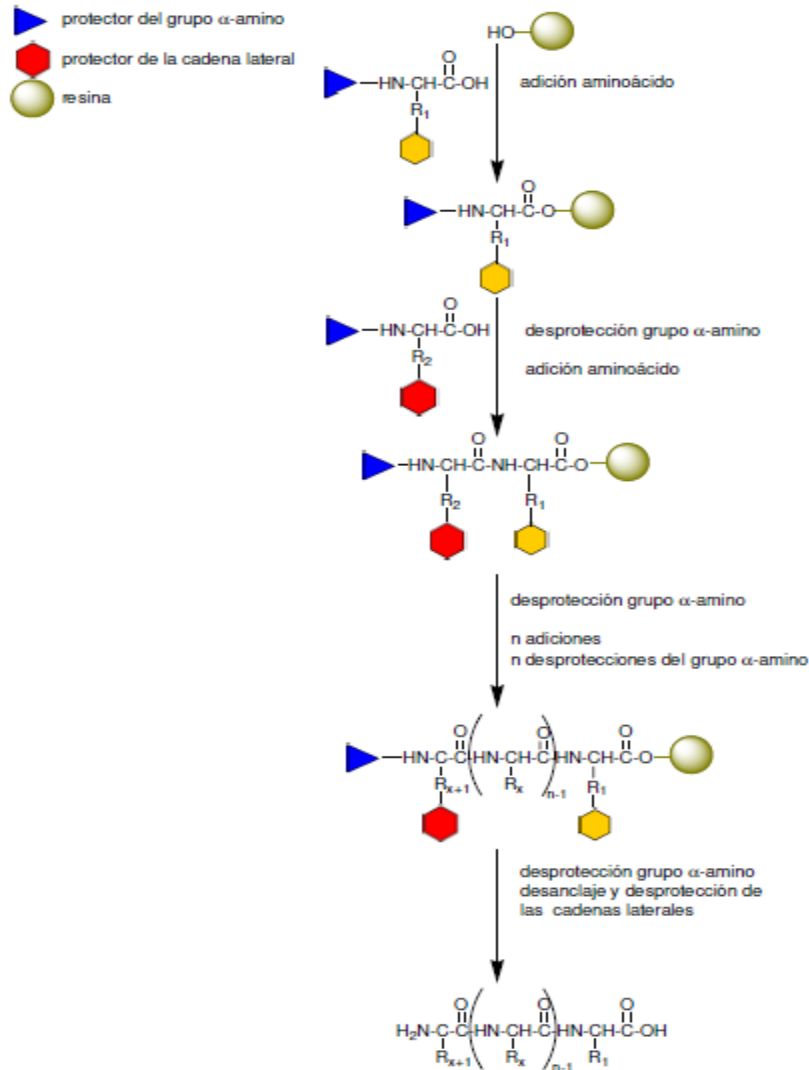
### **1.7 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPFS)**

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) es en la actualidad uno de los métodos más robustos y eficientes para obtener secuencias peptídicas de hasta 50 aminoácidos, disminuyendo el rendimiento en la medida que aumenta el número de residuos. Esta metodología descrita inicialmente por Merrifield se basa en el anclaje de un aminoácido desde su extremo C-terminal a los sitios activos de un soporte polimérico inerte al medio de reacción (Merrifield, 1958). Entre los soportes o resinas más comunes se encuentran la 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) y la hidroximetilfenilacetamidometil (PAM). El crecimiento de la cadena se lleva a cabo adicionando uno a uno los aminoácidos correspondientes. La elongación de la cadena tiene lugar desde el extremo C-terminal al N-terminal, siendo la adición del siguiente aminoácido sobre el grupo  $\alpha$ -amino del residuo

previamente enlazado. Los aminoácidos se encuentran debidamente protegidos en sus cadenas laterales para asegurar la formación del enlace peptídico evitando posibles productos secundarios (Yangl et al., 1995).

La SPFS utiliza dos estrategias diferentes, una de ellas emplea el terbutoxi-carbonil y el benzil (Boc/Bzl) como protectores de grupo  $\alpha$ -amino y de las cadenas laterales respectivamente. En la segunda se usan los grupos: 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) como grupo protector del  $\alpha$ -amino y terc-butil (tBu) como protector de cadenas laterales. En ambos casos el grupo protector del  $\alpha$ -amino se elimina antes de unir el siguiente aminoácido, como se muestra en la figura 2. La estrategia Boc/Bzl se lleva a cabo en medio ácido mientras que la FMoc/tBu se realiza en medio básico (Dixon, Bourré, MacRobert, & Eggleston, 2007).

**Figura 2.** Esquema de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS)



Para la formación del enlace peptídico se requiere la previa activación del grupo  $\alpha$ -carboxilo que se adicionara a la cadena, distinguiéndose así diferentes aditivos para el acoplamiento como la N,N-diciclohexilcarbodimida (DCC) que es quizás el agente activador más empleado, seguido de tetrafluoroborato de O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) y hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-

il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) (Sureshbabu, Venkataramanarao, Naik, & Chennakrishnareddy, 2007).

Por otra parte, se distinguen otros grupos de reactivos que son adicionados durante el acoplamiento, generalmente benzotriazoles como: el, 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HoAT) y la oxyma que se usan para evitar la racemización y acelerar la reacción al convertir al carboxilato formado una especie altamente reactiva. Además se utiliza DIEA como base para la neutralización in situ (Alsina, Rabanal, Chiva, Giralt, & Albericio, 1998; Chinchilla, Dodsworth, Nájera, & Soriano, 2000).

Una vez concluida la síntesis del péptido de interés se procede a desanclar el péptido desde la resina y a eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales; esto se lleva a cabo en un mismo paso realizando una hidrólisis ácida. Para el caso de la estrategia FMoc/tBu se emplea ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de triisopropilsilano (TIS) y 1,2-etanoditiol (EDT). Estos dos últimos reactivos se conocen como *scavengers* y cumplen la función de capturar las especies generadas en la desprotección, generalmente carbocationes que eventualmente pueden reaccionar con las cadenas laterales ya desprotegidas (López & Salazar, 2013).

## 1.8 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

El desarrollo de sistemas con características de liberación controlada y específica de un medicamento ha generado interesantes vehículos de transporte como liposomas, dendrómetros, nanopartículas cerámicas y poliméricas entre otras, gracias a los esfuerzos obtenidos en la nanotecnología y la biotecnología, uno de los campos de la nanomedicina es la nanoencapsulación de los medicamentos, la

cual aumenta la eficacia, la especificidad, la tolerancia y el índice terapéutico del medicamento correspondiente.

Las nanopartículas poliméricas se definen como vehículos coloidales conformados por sistemas poliméricos, las nanopartículas de proteína y péptidos han sido desarrolladas utilizando métodos de adsorción sobre las superficies de nanotransportadores, encapsulación en nanopartículas, bioconjugación sobre nanopartículas y en auto-ensamble molecular de péptidos pequeños al tamaño de la nanopartícula. Su estructura se basa en polímeros sintéticos o semisintéticos con un tamaño entre 10-1000 nm, dependiendo del método de preparación (He et al., 2014).

La encapsulación de proteínas permite aumentar la actividad terapéutica, mejorando estabilidad, tiempo de retención y penetración intracelular, debido a la capacidad de traspasar barreras fisiológicas. Las nanopartículas proporcionan propiedades de liberación controlada/sostenida tales como disminución del tamaño y aumento de la biocompatibilidad con el tejido y las células. Por otro lado, los nanocompuestos conformados por polímeros sintéticos son estables en la sangre, no tóxicos, no trombogénicos, inmunogénicos, no inflamatorios, no activan los neutrófilos, biodegradables, evitan el sistema retículo endotelial y son aplicables a diversas moléculas tales como fármacos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos (Carter, 2011; Putney, n.d.).

Se han usado sistemas poliméricos biodegradables como ácido Poli- Láctico (PLA), ácido Poli- glicólico (PGA) y ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) (Prior, Gamazo, Irache, Merkle, & Gander, 2000). El PLGA es uno de los polímeros sintéticos más utilizados para la administración de fármacos (Anderson & Shive, 2012). Dentro de sus principales características se encuentran: 1) Biodegradabilidad y biocompatibilidad, 2) copolímero aprobado por la FDA y la Agencia Europea de Medicina (EMA) para sistemas de administración de fármacos por vía parental, 3) capacidad para encapsular una gran variedad de

fármacos o moléculas con actividad biológica, 4) posibilidad de proteger al fármaco frente a la degradación, 5) habilidad para generar sistemas de liberación sostenida, 6) posibilidad de modificar las propiedades superficiales para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos, 7) Direccionamiento del principio activo hacia órganos o células específicas (Wischke & Schwendeman, 2008).

### **1.9 ENCAPSULACIÓN DE PAMs**

Entre los principales métodos viables para la adsorción o encapsulación de proteínas y péptidos sobre nanovehículos se encuentran: Polimerización emulsión, polimerización interfacial, evaporación de solvente, precipitación por sales, coacervación, combinación de sonicación, tecnología capa por capa, difusión de solvente/ desplazamiento de solvente, gelación ionotrópica, nanoprecipitación, entre otras (Furier et al., 2014).

Cada una de las proteínas y péptidos requieren condiciones específicas de estabilización, solubilización, y liberación controlada. Entre los métodos de encapsulación de proteína y péptidos más destacados se encuentran:

1. Polimerización-Emulsificación: este método está basado en el uso de una fase continua acuosa u orgánica. En la fase continua acuosa, los fármacos de proteínas y los polímeros son disueltos en un solvente acuoso sin surfactante o emulsificador mediante el uso del mecanismo de polimerización aniónico con radiación de alta energía. En la fase continua orgánica, los polímeros son disueltos en disolventes orgánicos por surfactantes vía dispersión en disolventes (Yin & Yates, 2009).
2. Evaporación de solvente: en este método los polímeros junto con las proteínas son disueltas en solventes orgánicos volátiles (DCM, acetona, CHCl<sub>3</sub>, Etilacetato, etc) y se vierten en la fase acuosa con agitación

continua con o sin emulsificador/estabilizador y sonicación. La sonicación intermitente y lenta a baja temperatura es eficiente para retener la estructura terciaria y secundaria de fármacos de proteínas. El método de desplazamiento de solvente es similar a evaporación de solvente que es basado en la emulsificación espontánea de la fase interna orgánica dentro de la fase externa acuosa (Nabi-Meibodi et al., 2013).

3. Precipitación por sales: Las proteínas y los péptidos son sensibles a desplegamiento o inactivación. Este método se basa en la separación de un solvente miscible en agua mediante adición de cloruro de magnesio, cloruro de calcio, entre otros, a la mezcla de solventes. La ventaja más significativa del proceso de precipitación por sales es que este minimiza el estrés de desplegamiento (inestabilización) de la proteína al ser encapsulada (Miladi, Sfar, Fessi, & Elaissari, 2013).
4. Polimerización interfacial: este método usa el monómero de cianoacrilato y los fármacos de péptido son disueltos en una mezcla de un aceite y etanol absoluto. Esta mezcla lentamente se extruye a través de una aguja en una solución acuosa bien agitada, con o sin algo de etanol que contiene un surfactante. Los aceites tienen influencia positiva para reducir el desplegamiento de las proteínas por el etanol, y además, una alta eficiencia de encapsulación del fármaco (Ji, Childs, & Mehta, 2001).
5. Coacervación: es un procedimiento durante el cual una solución homogénea de macromoléculas cargadas experimenta una separación de fases líquido-líquido, generando una fase densa rica en polímero. Este método ha sido clasificado en procesos simple y complejo, dependiendo del número de macromoléculas participantes. En la coacervación simple de poli-electrolito, la adición de sal o alcohol inician normalmente la coacervación. En la coacervación compleja, dos macromoléculas cargadas opuestamente (o un poli-electrólito y un coloide cargado opuestamente) puede experimentar un proceso de coacervación a través de interacciones asociativas. Las cargas sobre los electrolitos deben ser lo suficientemente

grandes para permitir interacciones electrostáticas significativas pero no lo suficiente para causar precipitación. La fase líquida diluida, (usualmente el sobrenadante), permanece en equilibrio con la fase coacervada. Estas dos fases líquidas son incompatibles e inmiscibles (Dong & Bodmeier, 2006).

6. Difusión de solvente/ emulsificación: Esta es una técnica muy eficiente para la encapsulación de proteínas en nanopartículas poliméricas, que proporciona muchas ventajas como máxima eficiencia de encapsulación sin homogenización, alta reproducibilidad lote por lote, facilidad para escalamiento, simplicidad y una distribución estrecha de tamaño de nanoencapsulados de proteína. Los polímeros con el fármaco de proteína son disueltos en un solvente parcialmente soluble en agua y saturado con agua. Posteriormente, la fase solvente agua-polímero saturada es emulsificada con una solución acuosa que contiene un estabilizador, resultando en la difusión de solvente a la fase externa y la formación de las nanopartículas (Jaiswal, Gupta, & Kreuter, 2004).
7. Nanoprecipitación: El método de nanoprecipitación permite la encapsulación de fármacos ( hidrófobos e hidrófilos) y la formación de NPs pequeñas ( 100-300 nm) con un bajo índice de polidispersión (Miladi, Sfar, Fessi, & Elaissari, 2015). Sin embargo este tipo de propiedades van a depender de parámetros como: La naturaleza del solvente o mezcla de solventes, la concentración del polímero, el peso molecular del polímero y el pH de la fase acuosa (Steinhilber et al., 2013). Además la técnica de nanoprecipitación involucra la presencia de dos fases miscibles denominadas solvente y no solvente, llamadas en la mayoría de los casos fase orgánica y fase acuosa. En la fase orgánica el polímero, el fármaco, y de manera opcional un estabilizante lipofílico son disueltos en un solvente polar miscible en agua (Bilati, Allémann, & Doelker, 2005).

Durante la síntesis, la fase orgánica es añadida gota a gota a la fase acuosa, la cual contiene un surfactante como alcohol polivinílico (PVA) o

Poloxámero-407, provocando la precipitación del polímero debido a la rápida difusión del solvente orgánico en el medio acuoso y a la formación de la emulsión de manera espontánea (Cheow & Hadinoto, 2011).

La selección del método de encapsulación se basa principalmente en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y sus aplicaciones. En la Tabla 7 se exponen algunas de las proteínas que se han conseguido encapsular (Steinchen, Sefiane, & Sanfeld, 2011).

**Tabla 7.** Proteínas encapsuladas con su rendimiento y tipo de encapsulación respectivo.

<b>Nanotransporte</b>	<b>Proteína</b>	<b>Tipo de encapsulación</b>	<b>de EE (%)</b>
<b>PLA Acido poli-láctico</b>	hGF2	Encapsulación	77
	Proteína C	Encapsulación	65
	Tetanus toxoid	Encapsulación	36.7
	Neurotoxin	Encapsulación	35.5
	BSA	Encapsulación	71.6
<b>PLA-TPGS</b>	BSA	Encapsulación	75.6
<b>PLGA</b>	hGF2	Encapsulación	77
	BSA	Encapsulación	76-77
<b>PCL</b>	Insulina	Encapsulación	96
<b>Ciclodextrin-PLA</b>	BSA	Encapsulación	71.6-83.5
<b>Polimetilmetacrilato</b>	Lysozyme	Encapsulación	20
<b>Ter-butil acrilato</b>	BSA	Bioconjugación	50-60

## 2. OBJETIVOS

### General.

Obtener análogos nanoestructurados de péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana (AMPs) mejorada contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

### Específicos.

1. Diseñar y sintetizar análogos de péptidos sintéticos con posible actividad antimicrobiana con una estructura alfa-hélice anfipática
2. mejorar la biodisponibilidad y acción antimicrobiana de los péptidos sintetizados mediante la encapsulación con nanopartículas orgánicas (PGLA).
3. Evaluar las propiedades físico-químicas (Tamaño, carga, forma) de los péptidos nanoestructurados sintetizados
4. Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de los péptidos nanoestructurados en cepas infectivas de *Escherichia coli* O157:H7, y *Staphylococcus.aureus* resistente a meticilina.
5. Determinar el sitio de interacción entre los péptidos nanoestructurados sintetizados y las bacterias *E coli* O157:H7, y SARM..

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

Los L-aminoácidos protegidos en el extremo N-terminal por el grupo Fmoc fueron adquiridos de IRIS Biotech GmbH; los agentes activadores como el TBTU, HBTU y la DCC; y la DIEA como base fueron obtenidos de Alfa Easer y la resina Rink amida 4MBHA de Merck Novabiochem.

Los medios de cultivo Luria Bertani, Mueller Hinton y el agar bacteriológico fueron obtenidos de Oxoid. Los disolventes grado analítico como el acetonitrilo, metanol, diclorometano e isopropanol fueron adquiridos en Merck; el ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA 50:50, PM 38000 - 54000 Da), el poloxámero 497 y la polietilenimina (50% v/v en solución acuosa, PM 2000) fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

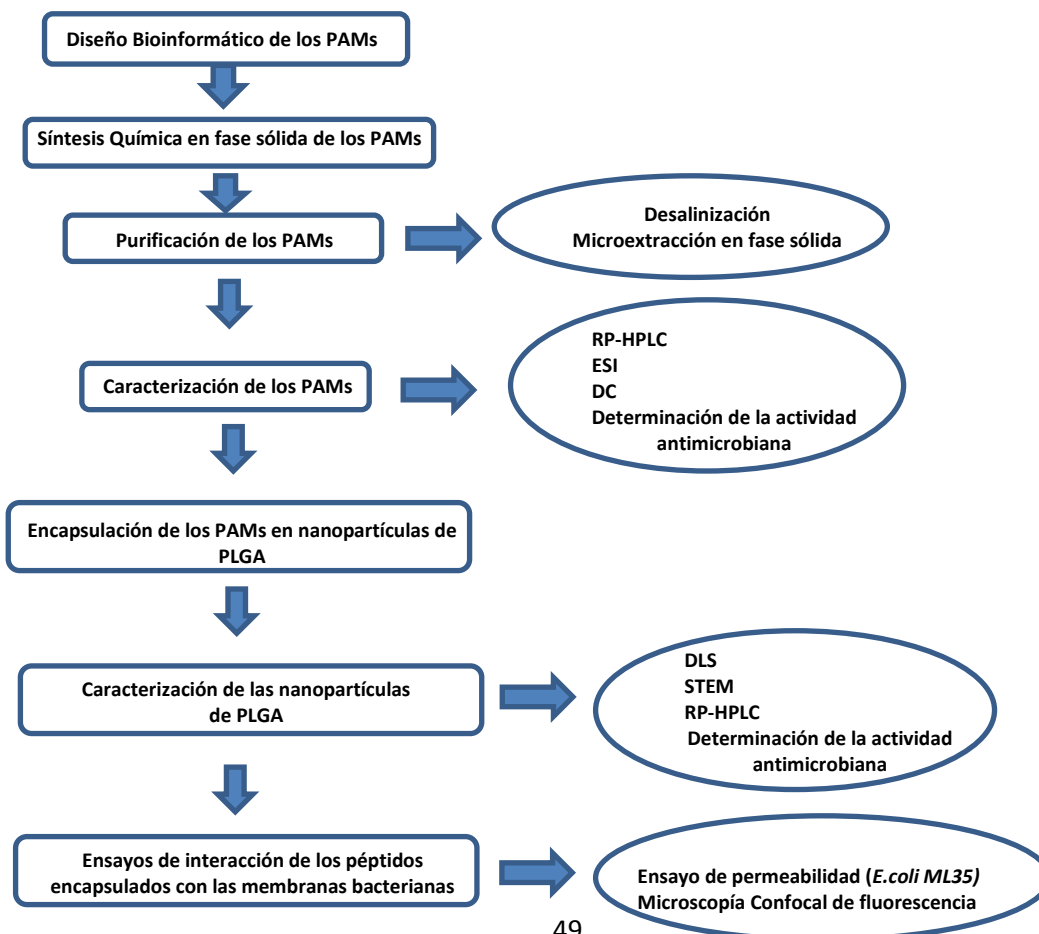
La cepa bacteriana *E. coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia. *S. aureus* resistente a meticilina fue obtenida de la Escuela de Microbiología y Bioanálisis de la Universidad Industrial de Santander. *E. coli* ML35 fue donada por el cepario de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso de Chile.

Todas las reacciones y ensayos de actividad antimicrobiana fueron realizados empleando agua MilliQ de resistividad 18,2  $\Omega$  adquirida en el laboratorio de Instrumentación Química de la UIS.

### 3.2 METODOLOGÍA

Inicialmente se realizó el diseño bioinformático de los PAMs y sus respectivos análogos; luego se sintetizaron y caracterizaron los PAMs y sus análogos. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana de los PAMs sintetizados y aquellos que exhibieron el mayor potencial antimicrobiano fueron encapsulados en nanopartículas de PLGA. A continuación se realizó la caracterización de las nanopartículas de PLGA-Péptido y se determinó la actividad antimicrobiana de los péptidos encapsulados. Finalmente, se realizaron ensayos de permeabilización de la membrana frente a modelos de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la figura 3 se muestra el esquema de la metodología general.

**Figura 3. Metodología general de la propuesta de investigación**



### 3.2.1 Diseño bioinformático de PAMs

El diseño de nuevos péptidos con potencial antimicrobiano se realizó mediante el uso de máquinas de soporte vectorial (SVM) utilizando el modelo denominado Relación Cuantitativa entre Estructura-Actividad (QSAR), para realizar el reconocimiento de patrones y crear algoritmos que permitieron identificar la actividad antibacteriana (Lan, Bozic, Keong, August, & Brusica, 2007; Perez-riverol et al., 2012; Povey et al., 2008; Trindade et al., 2014) .

A partir del uso de otras herramientas como las bases de datos en línea y de acceso libre como son *National Center for biotechnology information* (NCBI) cuyo sitio en internet es <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> , y la base *Collection of Antimicrobial Peptides* (CAMP). Se establecieron los valores correspondientes para las propiedades adicionales como hidrofobicidad, índice alifático, carga eléctrica total punto isoeléctrico, peso molecular, entre otras (Conlon et al., 2011; Termén et al., 2008).

Las secuencias peptídicas **LLKNIGLLSVFKGVLKG** y **ATARGWLKKIGKKIERV** fueron alineadas contra diferentes proteínas homólogas, todas publicadas en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Luego se utilizó la base de datos denominada de la CAMP para determinar teóricamente los valores de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos diseñados, como hidrofobicidad, índice alifático, carga neta, punto isoeléctrico, peso molecular y el porcentaje teórico de ser un péptido antimicrobiano de acuerdo con las características fisicoquímicas exhibidas

Las secuencias fueron alineadas usando la herramienta BLASTP y el método de alineamiento múltiple de secuencia Clustal W con el fin de obtener residuos conservados en los nuevos péptidos diseñados y a su vez poder cambiar aminoácidos de la secuencia del péptido para dar origen a péptidos análogos también con propiedades antimicrobianas.

Mediante el análisis descrito anteriormente se lograron 8 secuencias con potencial actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se empleó el programa PEP-FOLD y el visualizador Pymol para modelar y elucidar la estructura secundaria de cada péptido diseñado (Porto, Souza, Nolasco, & Franco, 2012; Zahn et al., 2013).

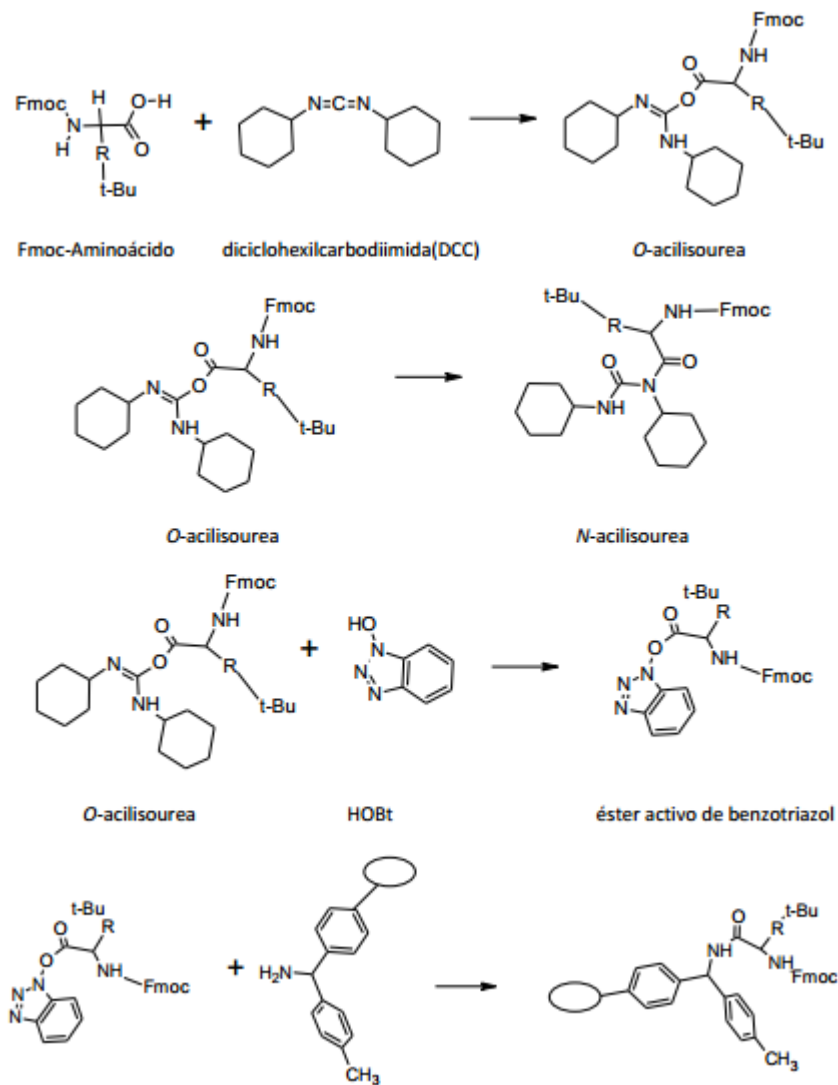
### **3.2.2 Síntesis química de PAMs**

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida (SPPS), empleando la estrategia Fmoc en bolsas de polipropileno, para realizar la elaboración del péptido desde su extremo C-terminal fue empleada una Resina Rink amida 4MBHA (capacidad 0.63 mmol/gramo). Las bolsas con 100 mg de resina fueron marcadas y selladas. Los aminoácidos correspondientes en cada secuencia fueron acoplados con O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N,N-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) como agente activador y DIEA como base para neutralización in situ. (7 equivalentes DIPEA/ 5 equivalentes TBTU) para acoples de menos de 3 horas y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) como agente antiracémico para los acoples de 12 horas. [8,9]. El indicador azul de bromofenol (1% en DMF) se añadió a la solución al finalizar cada etapa de acoplamiento para verificar de forma cualitativa la eficiencia de los acoples en la reacción. La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo por piperidina al 20% en DMF en dos lavado de 10 minutos cada uno (Babu & Gopi, 1998).

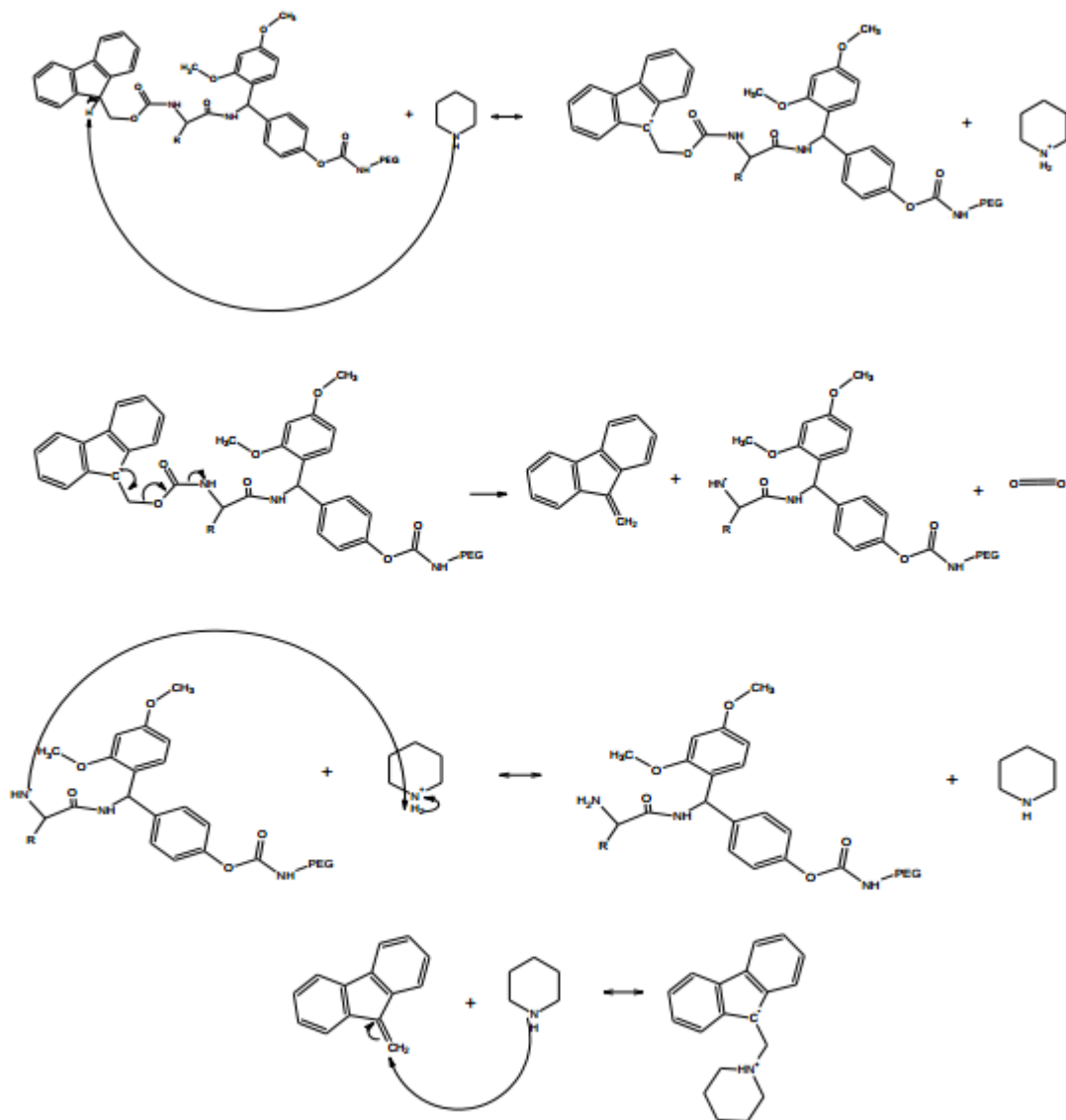
Finalizada la elongación del péptido se realizó el clivaje con el objetivo de desprender el péptido desde la resina usada como soporte de la síntesis. Los péptidos fueron clivados de la resina con Ácido Trifluoroacético / agua/ Trihidroxopropilsilano (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS) (95:2.5:2.5), posteriormente se dejaron en agitación durante 1 hora, luego la resina fue filtrada y por último se precipitó la solución filtrada con 5 mL de éter frío. La aparición de un sólido blanco lechoso correspondiente al péptido sintetizado fue centrifugado a 3500 rpm a 4°C durante

15 minutos (Broekman et al., 2011). En las figuras 4 y 5 se presentan los diferentes mecanismos de acción para las reacciones de acoplamiento y desprotección del grupo Fmoc en la metodología SPFS.

**Figura 4.** Mecanismos de reacciones de activación y acople con DCC y HoBT.



**Figura 5.** Mecanismo de desprotección del grupo Fmoc.



Después de realizada la síntesis de los péptidos y su respectivo clivaje, estos fueron purificados mediante desalinización y/o microextracción en fase sólida.

### **3.2.3 Purificación de los PAMs**

Después de realizada la síntesis de los péptidos y su respectivo clivaje, estos fueron purificados mediante desalinización y/o microextracción en fase sólida.

#### **3.2.3.1 Desalinización**

Los péptidos fueron desalinizados utilizando una columna pasteur previamente cargada con lana de vidrio y el gel Sephadex G10 o Sephadex G15 de acuerdo con el peso molecular de cada péptido. La columna fue equilibrada con agua Tipo I durante 30 minutos. Aproximadamente 1mg/mL de péptido fue eluido con 2 mL de agua y posteriormente recolectados a la salida de la columna (Lloyd, Millichip, & Watkins, 2002).

#### **3.2.3.2 Microextracción en fase sólida**

Esta técnica preparativa consistió en la elución de los péptidos de acuerdo a su hidrofobicidad (afinidad) empleando una microcolumna Sepack C-18 usando como eluyente una mezcla ACN/H<sub>2</sub>O con un flujo aproximado de 1mL/min. Los porcentajes de la mezcla trabajados fueron 10%,20%,30%,60% y 100% (Husband, Mant, & Hodges, 2000)

### **3.2.4 Caracterización de los PAMs**

Posterior a la purificación, se realizó la caracterización de los péptidos sintetizados y sus respectivos análogos mediante cromatografía líquida de alta resolución, espectrometría de masas y dicroísmo circular.

#### **3.2.4.1 Cromatografía Líquida en fase reversa**

Los péptidos sintéticos fueron purificados en una columna C-18 con una fase móvil constituida por: (A) H<sub>2</sub>O con 0.01% de Ácido Trifluoroacético (TFA) y (B) acetonitrilo (ACN) y 0.01% TFA. Se utilizó un método por gradiente desde 0% H<sub>2</sub>O a 100% ACN en un tiempo de 20 minutos; volumen de inyección 20µL; detector fotométrico de arreglo de diodos (PDA) a 220nm. Los resultados obtenidos permitieron analizar el grado de pureza de cada uno de los péptidos sintéticos (Amarouche et al., 2014).

#### **3.2.4.2 Espectrometría de masas**

Los espectros de masas se registraron utilizando el equipo LCMS-20 con analizador de Cuadrupolo acoplado a un cromatografo líquido, en el Núcleo Biotecnológico Curauma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Los ensayos se llevaron a cabo con una fuente de ionización dual DUIS, la cual ioniza la muestra usando simultáneamente dos métodos de ionización: Ionización por electrospray (ESI). El volumen de muestra usado para el análisis fue de 1mg/mL de cada uno de los 8 péptidos sintetizados químicamente (Nishikaze & Takayama, 2007).

#### **3.2.4.3 Dicroísmo Circular**

El análisis por Dicroísmo Circular (DC) se llevó a cabo a temperatura ambiente en celdas lavadas con nitrógeno y usando un Espectropolarímetro Jasco J-815. El espectro se tomó en un intervalo de longitud de onda entre 190-260 nm usando una celda rectangular de 1mm. Cada espectro fue obtenido como un promedio de tres escáneres tomados a una velocidad de 20 nm/min con un ancho de banda espectral de 1nm. El perfil de DC de cada péptido fue obtenido de cada disolución liofilizada en una solución acuosa del 30% de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en un volumen final de 500µL [99]. Una concentración de 1mg/mL del péptido se

estabilizó en una mezcla de TFE como se ha descrito anteriormente (Joshi et al., 2010). Los resultados fueron expresados como el grado de elipticidad ( $\theta$ ):

$$(\theta) = \frac{\theta_{\lambda}}{100 * l * c * n} (\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1})$$

Donde:

$l$ = Longitud del camino óptico (cm)

$c$ = Concentración del péptido (mg/mL)

$n$ = número de residuos de aminoácidos en la secuencia

Posterior a la caracterización de los PAMs sintetizados y sus respectivos análogos, se determinó la actividad antimicrobiana de los PAMs frente a *E.coli* O157:H7 y *SARM* mediante microdilución en caldo.

#### **3.2.4.4 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los PAMs libres**

Para determinar la actividad antimicrobiana de los 8 péptidos diseñados frente a *E.coli* O157:H7 y *SARM* se utilizó el método de microdilución para la estimación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CIM) fue realizado en placas de 96 pozos de acuerdo con los protocolos descritos por varios autores (Abercrombie, Leung, Chai, & Hicks, 2015; Cruz et al., n.d.; Yoon et al., 2014).

Para determinar la CMI, las medidas de absorbancia de las microplacas se realizaron en un espectrofotómetro de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm, a 37°C y 200rpm. Inicialmente se preparó un preinóculo tomando 2-3 colonias de *E.coli* O157:H7 y *SARM*, previamente sembradas en agar BHI a incubación de 37°C durante 24 horas. El preinóculo de *E.coli* O157:H7 se inoculó en caldo Luria Bertani (LB) durante 14h y el preinóculo de *SARM* en caldo Muller Hinton (MH)

durante 12 horas a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración de  $4,6 \times 10^8$  de unidades formadoras de colonia/mL (UFC/mL) en *Escherichia coli* O157:H7 y de  $7 \times 10^8$  UFC/mL en SARM.

Se realizó la cinética de crecimiento durante 8h adicionando 100µL del inóculo bacteriano, iniciando cuando la medición de la absorbancia se mantuviera en un rango comprendido entre 0,08-0,13, las microplacas contienen diluciones seriadas de los PAMs libres (0.5, 5, 10,25, 50, 75 y 100µM). NPs de PLGA-péptido (0.5, 5, 10, 25 y 50µL). La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la menor concentración de PAM o NPs PLGA-Péptido que produce una inhibición del crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> corresponden a las dosis que inhiben el 50% y el 90% del crecimiento, respectivamente.

Para determinar la CMB, posterior a la cinética de crecimiento, se tomó una alícuota de 100µL de cada pozo que contenía las diferentes concentraciones de los PAMs y se incubó en 900µL de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) en tubos eppendorf a 37°C durante 12 a 14 horas. A continuación, se tomó una alícuota de 5µL de cada tubo y se transfirió a placas de agar BHI con el objetivo de confirmar si existe un efecto bactericida, demostrado en aquellas placas de agar donde no hubo crecimiento bacteriano. La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración en la cual hubo 100% del crecimiento bacteriano en comparación con el control positivo utilizado (La bacteria creciendo en el medio de cultivo apropiado)(Yoon et al., 2014).

A continuación se realizaron dos ensayos de permeabilidad de membrana, en el primero se utilizó la bacteria *E.coli* ML35, aprovechando la deficiencia en la expresión de la permeasa y la función normal de la enzima β-Galactosidasa para determinar la interacción del péptido encapsulado con la membrana bacteriana. El segundo ensayo se realizó mediante microscopia confocal con el objetivo de visualizar la interacción del péptido encapsulado frente a *E.coli* O157:H7 y SARM.

### **3.2.5 Síntesis de nanopartículas de PLGA-Péptido antimicrobiano**

La síntesis de nanopartículas (NPs) de PLGA-PAM se realizó mediante el método de nanoprecipitación con algunas modificaciones (Alshamsan, 2014; Lepeltier, Bourgaux, & Couvreur, 2014). Se utilizó el polímero catiónico polietilenimina (PEI) a una concentración 0,1% v/v. Para la obtención de las nanopartículas se preparó una fase orgánica compuesta por 10,0 mg de PLGA ( 38000-54000 Da) y 1,0 mg de péptido a una concentración de 1mg/mL disueltos en un 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A continuación, se añadió el mililitro de la fase orgánica empleando una jeringa sin émbolo, ubicando directamente la aguja sobre 5 mL de medio acuoso, el cual contiene poloxámero 407 (0,5 p/v) y el polímero catiónico PEI, manteniendo agitación magnética, hasta formar una solución turbia de aspecto lechoso.

### **3.2.6 Caracterización de las nanopartículas de PLGA-Péptido antimicrobiano**

Finalmente, las NPs fueron purificadas y lavadas para eliminar los reactivos en exceso de la síntesis. Las NPs PLGA-Péptido fueron caracterizadas por DLS, STEM y RP-HPLC.

#### **3.2.6.1 Dispersión de luz en modo dinámico y Potencial Zeta**

Las nanopartículas de PLGA- Péptido fueron caracterizadas por dispersión de luz en modo dinámico (DLS) para determinar el tamaño hidrodinámico y carga superficial en un equipo NanoZetasizer-90 (Malvern, USA) del Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander. Se depositaron 520µL de la solución de NPs PLGA-Péptido en una celda plástica de volumen reducido con el equipo en modo tamaño, el cual opera con un ángulo de incidencia de luz de 90°. Para la determinación de la carga superficial el equipo se

colocó en modo Zeta, 1mL de la muestra se adicionó en una celda capilar plástica DST 1060 con electrodo de oro, los ensayos se realizaron con un potencial de 148V. Todos los ensayos se realizaron por triplicado a pH 7,4 y temperatura ambiente (Peça, Petrova, Cardoso, & Barros, 2012; Xu, 2015).

### **3.2.6.2 Microscopía electrónica de Barrido en modo transmisión (STEM)**

Para caracterizar la morfología y el tamaño de las NPs PLGA-Péptido se depositaron 5µL de la muestra en un *grid* con recubrimiento de oro (100-400Mesh) para ser analizados por Microscopía electrónica de Barrido con cañón de emisión de campo en modo de transmisión (FE-STEM, QUANTA FEG 650), equipo localizado en el Parque tecnológico de Guatigará de la Universidad Industrial de Santander. Este funciona con un dispositivo (filamento, 30KV) que genera un haz de electrones para iluminar la muestra y con un detector de electrones secundarios, donde se recolectan los electrones generados de la interacción con la superficie de la muestra, con el fin de generar una imagen que refleja las características superficiales de la misma (Shariat, Badiee, Reza, & Alireza, 2014)

### **3.2.6.3 Eficiencia de encapsulación de los péptidos M3 y M7 cargados en nanopartículas de PLGA por RP-HPLC**

Para la cuantificación de la cantidad de péptido nanoencapsulado en nanopartículas de PLGA, 1000µL de la suspensión de partículas fueron centrifugadas (14000 rpm, 30 minutos) y 900µL del sobrenadante fueron removidos. Se adicionaron 450µL de acetonitrilo al precipitado para disolver el polímero PLGA y después la misma cantidad de agua para disolver el péptido hidrofílico y precipitar el polímero. La suspensión fue agitada, centrifugada otra vez, y 900µL del sobrenadante que contiene el péptido fue analizado por RP-

HPLC a las mismas condiciones de corrida para el péptido libre (Ohnishi, Yamamoto, Tomida, Hyodo, & Ishihara, 2013).

Los patrones de la curva de calibración de los péptidos M3 y M7 libres se realizaron en un rango de concentraciones de 0 a 500ppm, que junto con las muestras obtenidas de cada extracción de las NPs se cuantificaron por RP-HPLC. La concentración inicial de péptido utilizado fue de 1mg/mL en la metodología de nanoprecipitación. El sistema cromatográfico fue equilibrado utilizando dos soluciones: (A) H<sub>2</sub>O con 0,01% de TFA y (B) ACN con 0,01% de TFA. Se utilizó un método isocrático 70:30 de ACN-TFA y H<sub>2</sub>O.TFA respectivamente durante 15 minutos, volumen de inyección 40μL y detección ultravioleta a 220 nm en una columna C-18 (Tavano, Pinazo, Abo-riya, Infante, & Manresa, 2014).

La eficiencia de encapsulación (%EE) y péptido cargado (PC) en el sistema nanométrico de PLGA fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones (1)-(2), respectivamente (Mun, Choi, Shim, Park, & Kim, 2011; Nii & Ishii, 2005).

$$\%EE = \frac{\text{masa de péptido efectivo en el sistema de PLGA - LA6 (mg)}}{\text{masa de péptido inicial en el sistema de PLGA - LA6 (mg)}} * 100 \quad (1)$$

$$PC = \frac{\text{cantidad de péptido encapsulado (mg)}}{\text{cantidad total de polímero (mg)}} \quad (2)$$

Posteriormente a la caracterización de las nanopartículas de PLGA-Péptido antimicrobiano se realizó la determinación de la actividad antimicrobiana como se detalló en el numeral 3.6.

Luego se determinó la interacción del péptido encapsulado frente a los microorganismos utilizados en el estudio y el modelo bacteriano *E.coli ML35*.

### **3.2.7 Estudio de la Interacción de los PAMs encapsulados frente a las membranas bacterianas**

#### **3.2.7.1 Ensayo de permeabilidad de la membrana interna bacteriana de *E. coli* ML35**

El ensayo de permeabilidad bacteriana se realizó utilizando la bacteria *E.coli* ML35, la cual presenta una mutación genética que causa deficiencia de la expresión de la permeasa, pero expresa actividad  $\beta$ -galactosidasa citoplasmática. La actividad  $\beta$ -galactosidasa de *E.coli* ML35 se midió a 415nm mediante un ensayo cromogénico con O-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido [110]. Inicialmente se preparó un preinóculo tomando 2-3 colonias de *E.coli* ML35 en caldo Luria Bertani (LB) estéril durante 14h a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una concentración de  $4,6 \times 10^8$  UFC/mL, cuando se alcanzó la fase logarítmica después de 3 horas, la suspensión se centrifugó y se obtuvo un precipitado (el cual corresponde a las células bacterianas), finalmente se resuspenden en un volumen de 2 mL y se lavó con buffer Tris 10mM a pH 7. Luego se tomó una alícuota de 100 $\mu$ L del cultivo bacteriano y se depositó en un pocillo de placa de Elisa junto con 100 $\mu$ L de buffer Tris 10mM que contienen 2.5mM ONPG y 100 $\mu$ L de diferentes concentraciones del péptido encapsulado comprendidas entre 0,5 $\mu$ M y 75 $\mu$ M que había presentado la mayor actividad frente a *E.coli* O157:H7. La hidrólisis de ONPG a O-Nitrofenol (ONP) en cada pocillo fue seguido por la medición de la absorbancia a 415nm a intervalos de 5 minutos durante 60 minutos, en un ensayo colorimétrico dependiente de la absorbancia medida.

#### **3.2.7.2 Microscopía Confocal**

Para el estudio de permeabilización de la membrana bacteriana se utilizó el Microscopio Confocal TCS SP5 de Leica Mycrosistem de la Pontificia Universidad

Católica de Valparaíso, para este ensayo las bacterias usadas en el presente estudio se dejaron incubando hasta su fase exponencial, luego se centrifugó el cultivo a 4000 gravedades durante 5 minutos y se realizaron lavados con PBS 10mM. Después se resuspendió el cultivo en PBS 10mM hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC. Se preparó una solución Stock de sytox Green a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  y se colocaron  $5 \mu\text{L}$  en presencia de  $90 \mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana (Mccall & Sirianni, 2013). Después de esto la solución de la suspensión bacteriana y el sitox Green se pusieron en contacto con las nanopartículas de PLGA-péptido (el péptido previamente se marcó con rodamina) durante una hora. Por último se adicionaron  $10 \mu\text{L}$  en una lámina portaobjetos y se fijó con calor para luego ser observado en el microscopio confocal. Se evaluó la interacción de los péptidos encapsulados con mayor actividad antimicrobiana frente a *E.coli* O157:H7 y *SARM* a las concentraciones de mayor actividad antimicrobiana.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 DISEÑO DE PÉPTIDOS

Se obtuvieron dos secuencias peptídicas base usando el software DEPRAMPS [24]. Se realizó un BLASTP de estas secuencias en la base de datos CAMP para determinar la similitud estructural con familias de proteínas y polipéptidos reportados con actividad antibiótica que presentan una identidad superior al 80%, luego se realizó el alineamiento múltiple utilizando la herramienta ClustalW, con el fin de obtener residuos conservados en los nuevos péptidos diseñados y a su vez, determinar los aminoácidos que podían ser cambiados en la secuencia de los péptidos, para originar péptidos análogos a las secuencias nativas con propiedades antimicrobianas mejoradas. Los resultados son presentados a continuación en la **Tabla 8**:

**Tabla 8.** Dominios conservados en el alineamiento múltiple

Nombre	Secuencia base	Familia cercana
M1	LLKNIGLLSVFKGVLKG	Cecropinas
M5	ATARGWLKIKGKIERV	Magaininas

**Rojo:** Aminoácido conservado; **Azul:** Aminoácido con características iguales; **Morado:** Aminoácido con características similares; **Negro:** Aminoácido no conservado.

Como resultado del alineamiento múltiple se obtuvieron los residuos aminoacídicos conservados que se relacionan con la función biológica que se mantiene a lo largo de la evolución con mínimas variaciones, por lo tanto sobre los aminoácidos conservados no se pueden realizar modificaciones estructurales. La

secuencia base M1 presentó 5 aminoácidos conservados y otros aminoácidos similares a la familia de péptidos antimicrobianos cecropinas, que son péptidos aislados de la hemolinfa de la larva del lepidóptero *Hyalophora cecropia*, están cargados positivamente y forman estructuras secundarias  $\alpha$ -hélice en solución. Las principales cecropinas derivadas de insectos (cecropinas A, B y D) tienen 35 a 37 residuos, también se ha descrito un péptido similar a las cecropinas de 31 residuos, aislado del intestino delgado del cerdo y que se conoce como cecropina, lo cual sugiere que, aunque se encuentren en insectos, pueden estar ampliamente distribuidos en todo el reino animal (Cerón et al., 2010; S. Wu et al., 2012; K. Yang, Su, Li, Sun, & Yang, 2012).

Por otra parte, en el péptido M5 se observó la presencia de ocho aminoácidos conservados y la prevalencia de residuos similares a la familia de péptidos antimicrobianos magaininas, una familia de péptidos con amplio espectro de actividad antimicrobiana que se han aislado de la piel de la rana africana *Xenopus laevis*. Se compone de péptidos estrechamente relacionados de 23 aminoácidos, son solubles en agua, no hemolíticos a sus concentraciones antimicrobianas eficaces, y potencialmente anfifílicos (Kim, Spano, Park, & Wi, 2009).

Éstas secuencias base fueron modificadas sistemáticamente con el fin de mejorar la actividad antimicrobiana y obtener péptidos análogos. Las variaciones realizadas incluyeron solo aquellos residuos aminoacídicos que en el alineamiento múltiple (Clustal W) con otros polipéptidos y proteínas de la base de datos CAMP no fueron conservados.

Los péptidos análogos fueron producto de las variaciones en aminoácidos de las secuencias inicialmente obtenidas. En la secuencia base M1 se sustituyó una leucina por glicina con el objetivo de aumentar la hidrofobicidad del péptido para elevar su comportamiento anfipático al entrar en contacto con la membrana bacteriana, también se sustituyó un residuo de glicina por un residuo de lisina con el objetivo de aumentar la carga positiva neta del péptido para dar origen a la

secuencia M2 (M. J. Yang et al., 2013). En la misma secuencia M1 se reemplazó glicina por lisina con el mismo objetivo de incrementar la carga positiva neta del péptido, y de esta manera obtener la secuencia M3. Como última modificación del péptido M1 se cambió glicina y valina por dos residuos de lisina y de esta manera formar el péptido M4. Con respecto al péptido base M5, se reemplazó arginina por triptófano para mejorar el anclaje del péptido a la membrana celular bacteriana y por lo tanto incrementar su actividad antibacteriana, con esa modificación se originó el péptido M6. De igual manera en el péptido M5 se sustituyeron las dos alaninas de la secuencia por glicina y triptófano para crear la secuencia M7 con las finalidades expuestas previamente de acuerdo al aminoácido reemplazado. Por último, se cambiaron dos alaninas y una arginina por dos glicinas y un triptófano, y de esta manera originar el péptido M8. Cabe destacar que se hicieron otras sustituciones en diferentes zonas del péptido base pero la actividad antimicrobiana teórica no se incrementó, por lo tanto se sintetizaron las explicadas anteriormente (Zayed & Ammar, 2014).

Las propiedades fisicoquímicas como carga neta, hidropatía, volumen, peso molecular, número de residuos e índice de inestabilidad (predicción realizada por la CAMP) se calcularon para cada una de las secuencias base y sus respectivos análogos, los resultados se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Propiedades fisicoquímicas de los PAMs diseñados

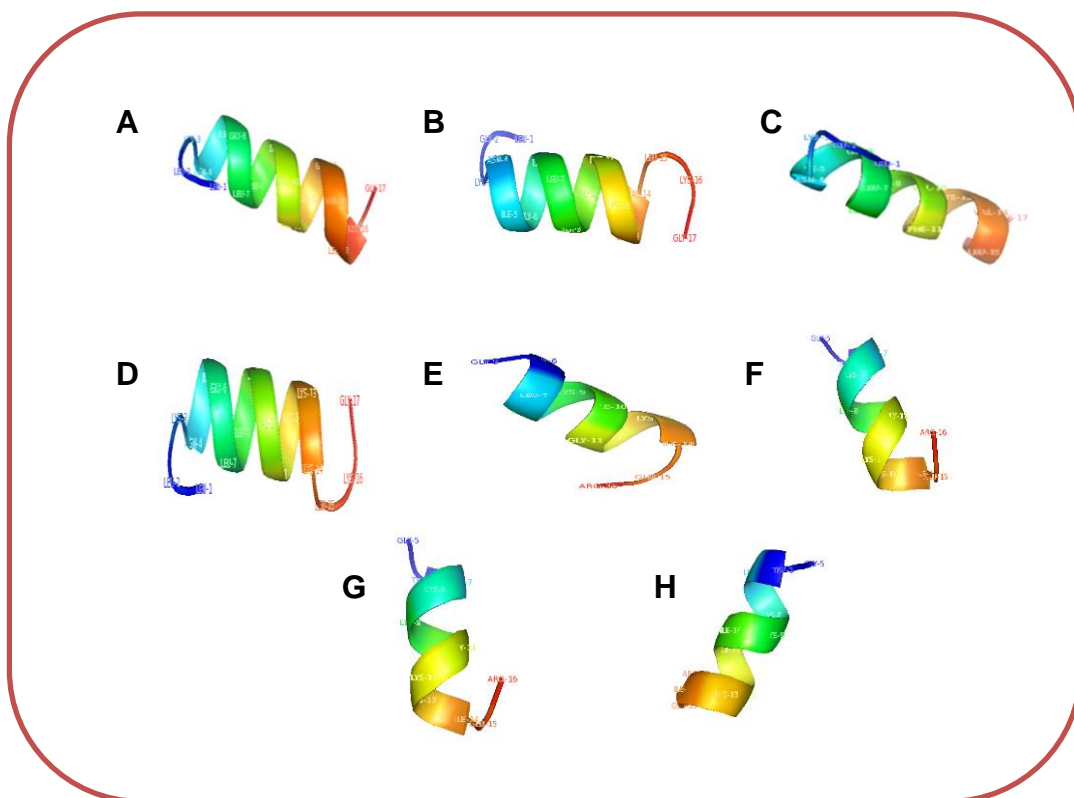
Péptido	MW (Da)	<i>m/z</i>	#AA	Carga	Hidrofobicidad (%)	Volumen (A <sup>3</sup> )	Índice de inestabilidad
<b>LLKNIGLLSVFKGVKLG M1</b>	1798.27	1798.5	17	+3	52	2177	6.44
<b>LGKNIGLLSVFKVVLKG M2</b>	1813.28	1813.5	17	+4	47	2195	6.44
<b>LLKNIGLLSVFKVVLKG M3</b>	1869.38	1869.6	17	+4	52	2263	6.44
<b>LLKNIGLLSVFKKVLKG M4</b>	1898.42	1898.7	17	+5	47	2298	6.44
<b>ATARGWLKIGKKIERV M5</b>	1953.38	1953.6	17	+5	41	2364	24.81
<b>ATAWGWLWKKIGKKIERV M6</b>	1983.41	1983.7	17	+4	47	2401	23.70
<b>GTWRGWLWKKIGKKIERV M7</b>	2056.49	2056.8	17	+5	45	2488	10.97
<b>GTWGGWLWKKIGKKIERV M8</b>	1955.31	1955.6	17	+4	45	2367	17.12

Los resultados obtenidos mediante la modificación teórica de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos base M1 y M5 permitió en el caso de los análogos del péptido M1 incrementar la carga neta de las secuencias de los péptidos, lo cual estuvo acompañado de un aumento en el volumen manteniendo constante el índice de inestabilidad. Las secuencias análogas del péptido M5 se caracterizaron por el aumento del porcentaje de hidrofobicidad con el objetivo de incrementar el contacto con la membrana bacteriana, de igual manera se aumentó el volumen de las secuencias y la carga neta se disminuyó en los péptidos M6 y M8 con respecto a la secuencia base M5. Estos resultados son coherentes con diversos estudios realizados en los cuales la modificación de las características fisicoquímicas permitieron mejorar la actividad antibacteriana frente a diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas (Jang et al., 2012; E. K. Lee et al., 2011; Qi et al., 2010; Yang et al., 1995).

La predicción de la estructura secundaria de los PAMs y sus análogos se realizó con el programa PEP FOLD, posteriormente las estructuras se visualizaron

usando el programa PyMol como se muestra en la figura 6. Todas las secuencias diseñadas se caracterizaron por adquirir teóricamente la conformación  $\alpha$ -hélice.

**Figura 6.** Visualización por *PyMol* del modelamiento de la estructura secundaria de los PAMs diseñados. A) M1. B) M2. C) M3. D) M4. E) M5. F) M6. G) M7. H) M8.



## 4.2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Las ocho secuencias de péptidos diseñadas en el numeral 4.1 se sintetizaron en fase sólida empleando la estrategia Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), posterior a esto se realizó la purificación y caracterización de las secuencias sintetizadas.

### **4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PAMs DISEÑADOS**

Concluida la síntesis en fase sólida de los péptidos diseñados y su purificación en columnas Sepak C-18 utilizando gradientes desde 10%ACN/H<sub>2</sub>O hasta 100% ACN/H<sub>2</sub>O, los péptidos sintetizados se obtuvieron a una concentración de 30%ACN/H<sub>2</sub>O, lo cual se correlaciona directamente con la hidrofobicidad de los péptidos sintetizados. Los péptidos se caracterizaron los péptidos sintetizados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, espectrometría de masas y dicroísmo circular (Ver anexo1).

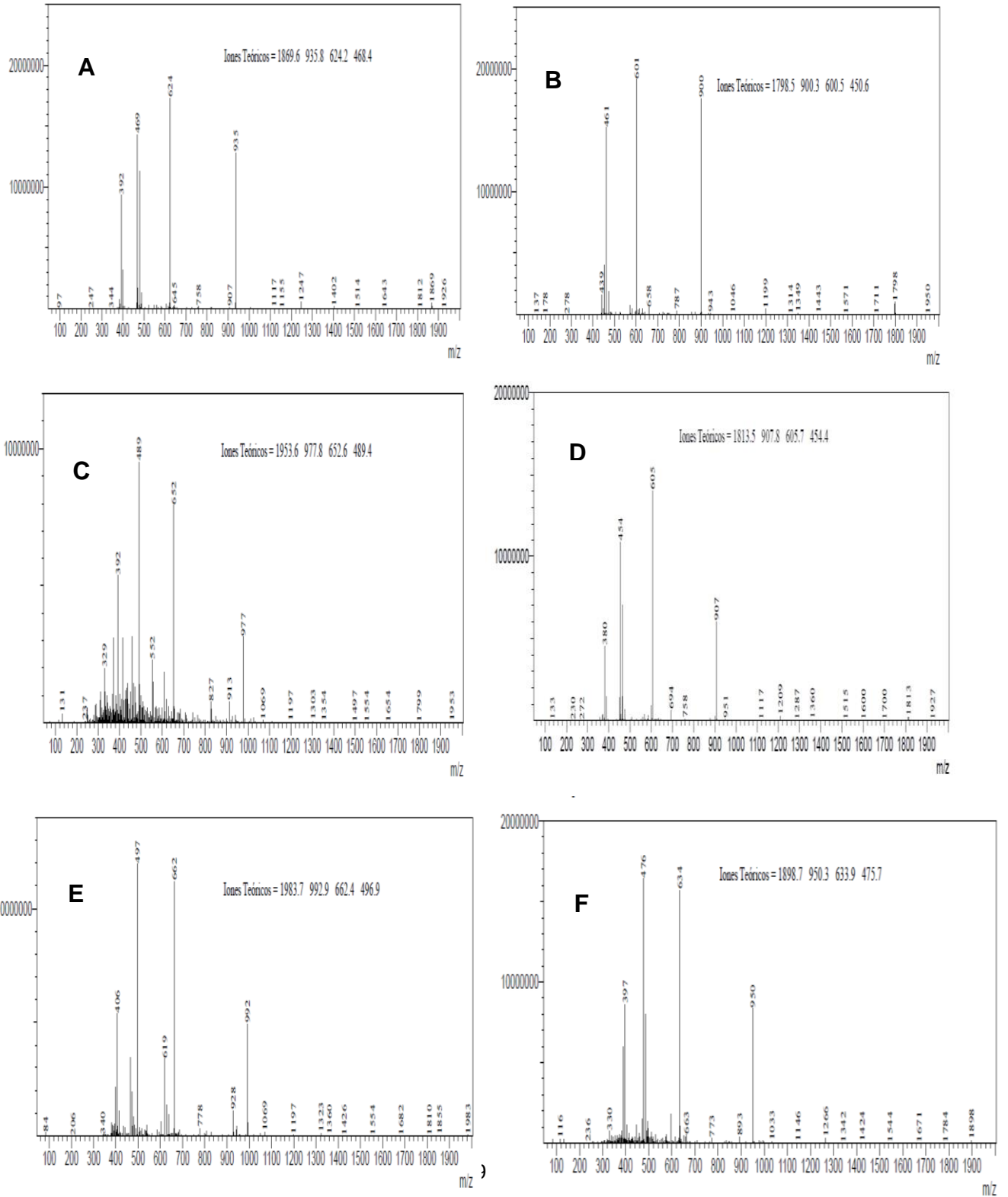
#### **4.3.1 Determinación de la pureza mediante cromatografía líquida**

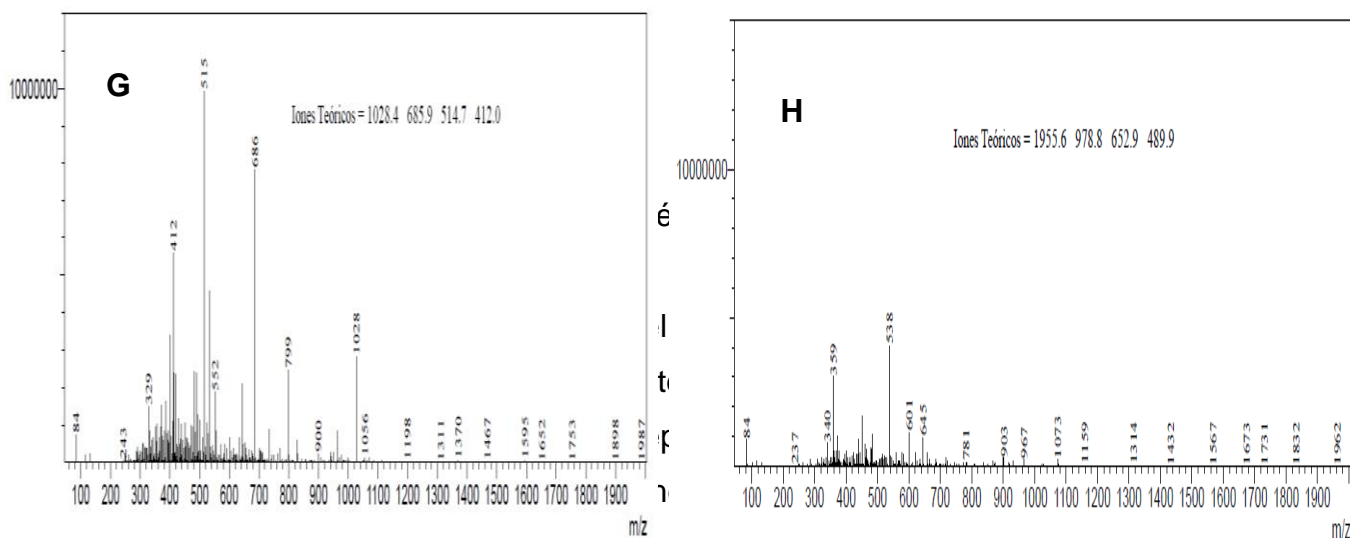
Mediante RP-HPLC se determinó la pureza de los PAMs utilizando una curva de calibración con BSA, obteniéndose en todos los cromatogramas un pico cromatográfico definido sin deleciones (Anexo 1). El producto final se obtuvo con un grado de pureza superior al 95%. Los tiempos de retención obtenidos de los PAMs fueron cercanos entre sí (menos de un minuto), debido a que las modificaciones sistemáticas realizadas fueron conservando la estructura secundaria, por lo tanto los péptidos interactuaron con la fase estacionaria (Columna C-18) de manera similar.

#### **4.3.2 Análisis de espectrometría de masas**

En todos los casos fue posible confirmar la secuencia primaria de los péptidos base y sus respectivos análogos mediante el análisis de espectrometría de masas (ESI) como se muestra en la figura 7.

**Figura 7.** Espectros de masas. A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5 F) M6 G) M7 H) M8





por encima de la masa molecular del péptido las cuales corresponden a aductos positivos que se forman en el proceso de ionización por la interacción con la matriz, sales y metales presentes. Sin embargo esta señales son minoritarias en relación a la intensidad del pico del ión molecular del péptido de interés; en la tabla 10 se resumen los resultados obtenidos por espectrometría de masas.

**Tabla 10.** Valores de masa determinados mediante la herramienta CAMP y valores experimentales determinados mediante espectrometría de masas. PM representa el peso molecular expresado en g/mol y  $m/z$  es la relación masa-carga expresada en Daltons (Da).

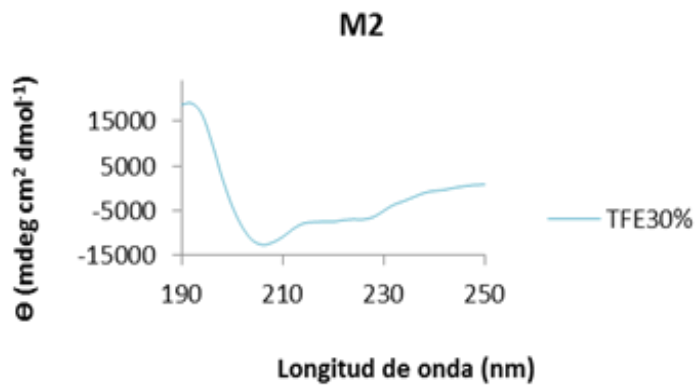
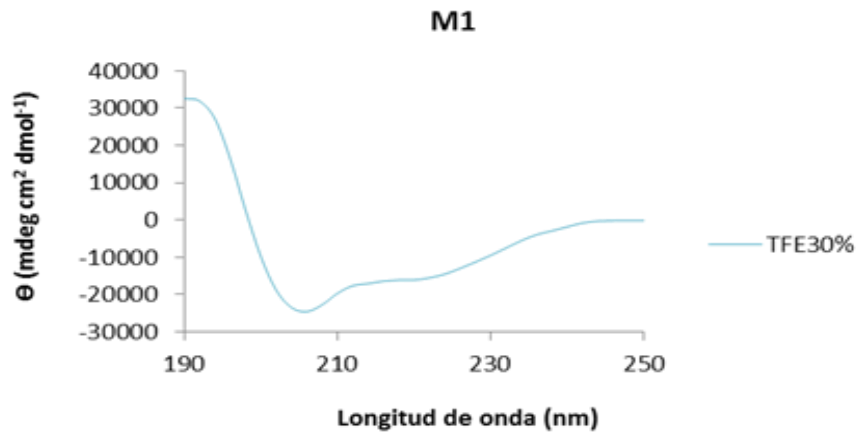
<b>Nombre</b>	<b>Masa teórica Da</b>	<b>Masa experimental</b>
	<b>[M+H]</b>	<b>[M+H]</b>
<b>M1</b>	1798.27	1798.5
<b>M2</b>	1813.28	1813.5
<b>M3</b>	1869.38	1869.6
<b>M4</b>	1898.42	1898.7

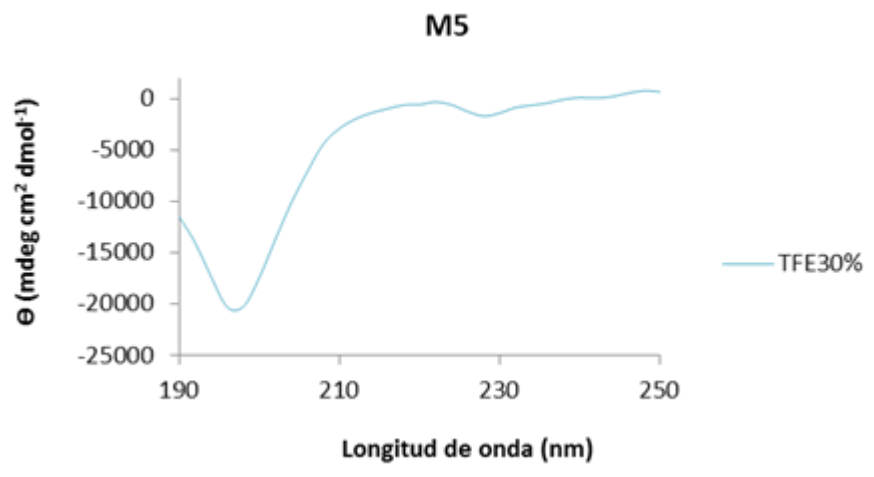
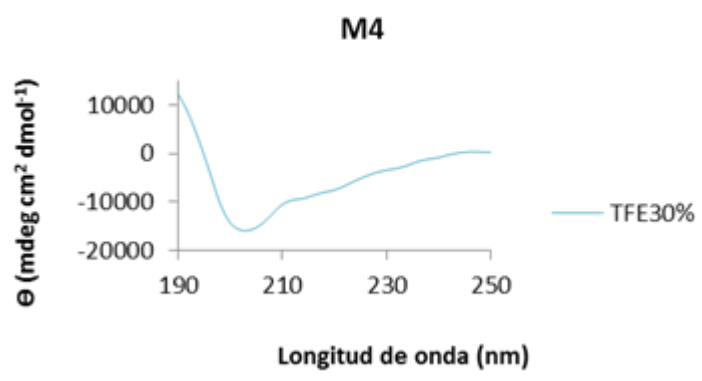
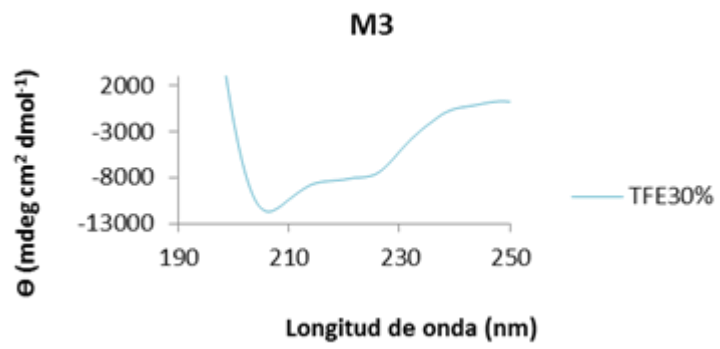
<b>M5</b>	1953.38	1953.6
<b>M6</b>	1983.41	1983.7
<b>M7</b>	2056.49	2056.4
<b>M8</b>	1955.31	1955.6

### 4.3.3 Dicroísmo Circular

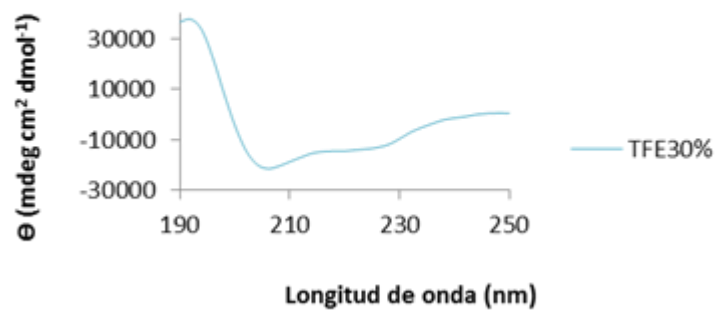
Para determinar la estructura secundaria de los péptidos base y sus respectivos análogos se determinó el espectro de DC en condiciones simuladas de membrana en solución de TFE al 30 (v/v), realizando ensayos por triplicado. En los espectros de DC (Ver figura 8) se presentaron las bandas características de absorción en el ultravioleta lejano de perfil  $\alpha$ -hélice, exhibiendo una banda positiva con un máximo entre 190 y 195 nm y adicionalmente mostraron dos mínimos cercanos a 205 y 217 nm (Green, Johnson, & Lane, 1999). El DC es útil en la determinación de la estructura secundaria de los péptidos, debido a que el espectro muestra la disposición espacial de las unidades quirales de la cadena peptídica. Un péptido con estructura helicoidal genera un perfil de DC fácilmente diferenciable exhibiendo una banda positiva cerca de 192 nm la cual corresponde a transiciones electrónicas de tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  y dos máximos negativos cerca de 222 y 208 nm correspondiente a transiciones de tipo  $n \rightarrow \pi^*$  y respectivamente (Nehira et al., 2012). Esto confirmó experimentalmente que todos los PAMs sintetizados mostraron perfil  $\alpha$ -hélice, de acuerdo con las estructuras secundarias modeladas por CPH models 3.2, a excepción de la secuencia peptídica M5 que no mostró una estructura secundaria definida, lo cual se correlacionó con la menor actividad antimicrobiana de éste péptido frente a *E.coli* O157:H7 y MRSA.

**Figura 8.** Espectros de dicroísmo circular de los péptidos M1 a M8. Solución de TFE al 30% (v/v). Concentración del PAM: 1mg/mL.

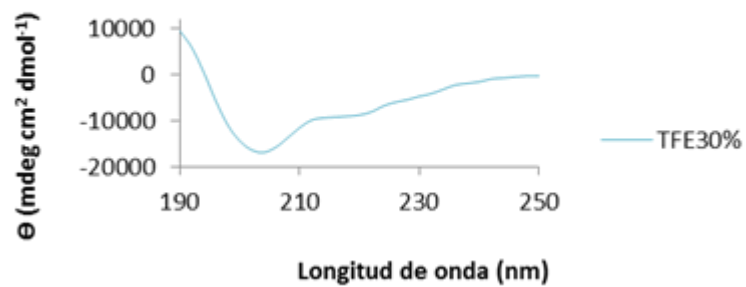




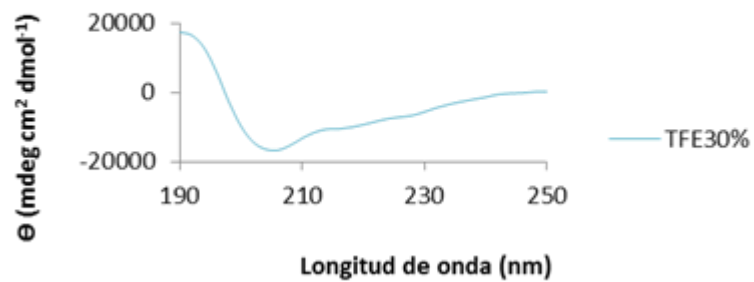
### M6



### M7



### M8



#### **4.3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los PAMs libres**

Se evaluó la actividad antibacteriana de todos los péptidos (M1 a M8) frente a *E.coli* O157H7 y *SARM*, como modelos de bacteria Gram-negativa y Gram-positiva respectivamente. Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron por el método de microdilución en caldo para la determinación del efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano. Los resultados del efecto antibacteriano se detallan a continuación:

##### **4.3.4.1 Actividad antibacteriana de los péptidos libres frente a *E.coli* O157:H7**

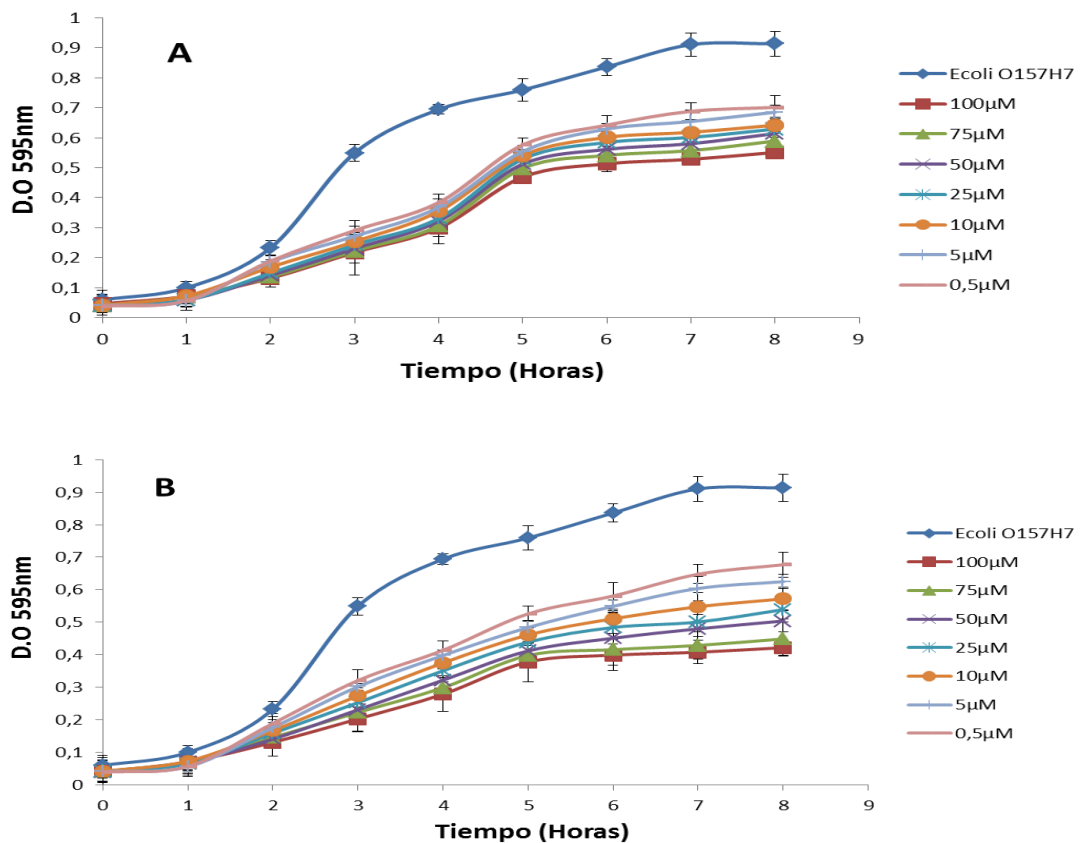
Se evaluó la cinética de crecimiento de *E.coli* O157H7 y *SARM* en presencia de diferentes concentraciones (desde 0,5µM hasta 100µM) de los péptidos sintetizados. En las figuras 9 y 10 se observa un efecto dosis-respuesta, debido a que a medida que se incrementa el valor de la concentración hasta 100µM de cada uno de los péptidos sintetizados frente a cada una de las cepas utilizadas, la inhibición aumenta con respecto a las concentraciones menores.

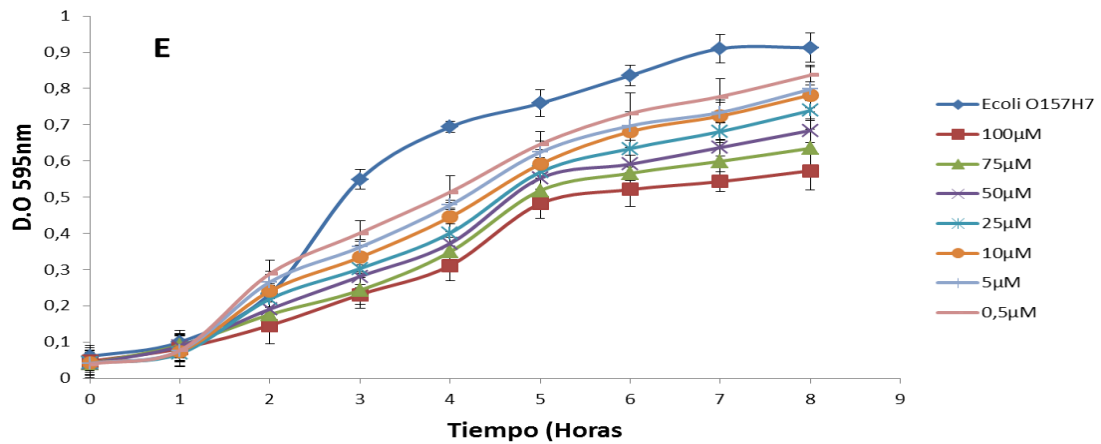
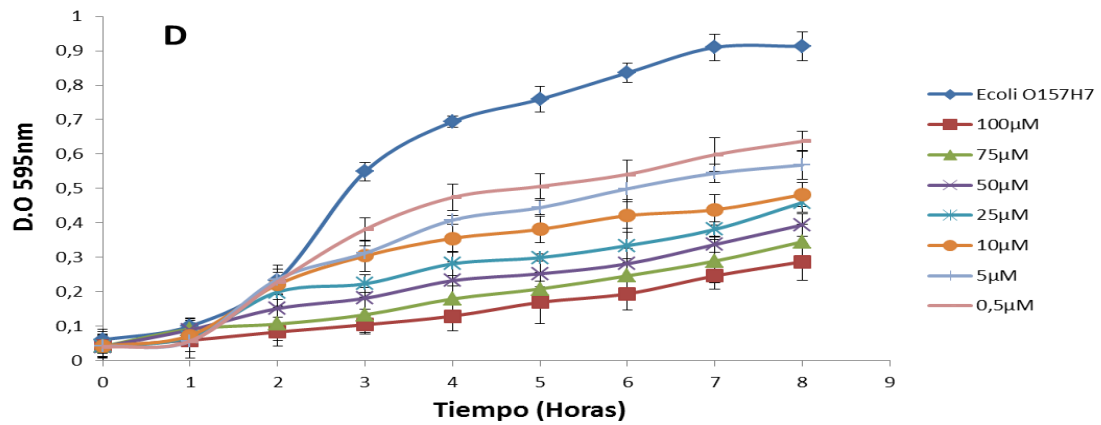
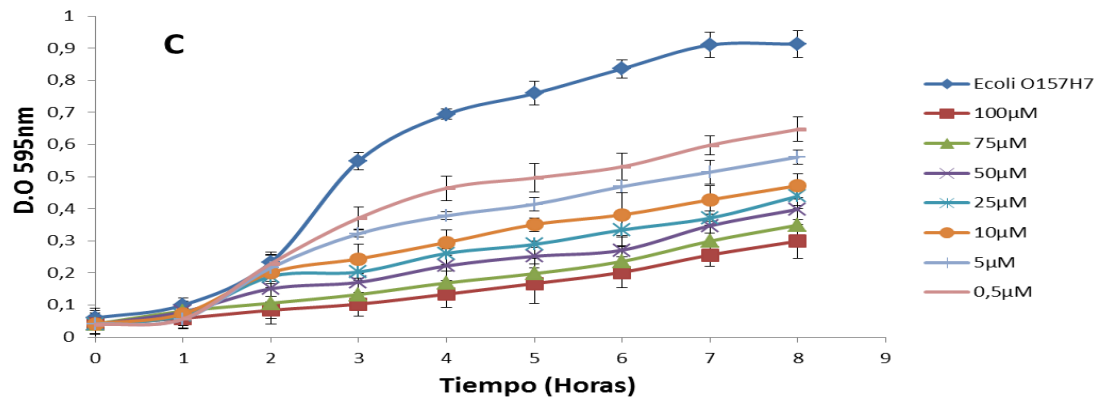
En la figura 9 se muestra la cinética de crecimiento de todos los péptidos sintéticos frente a *E.coli* O157:H7 donde se determinó que los péptidos M1 y M5, los cuales son los péptidos base, inhiben menos del 50% del crecimiento bacteriano. Por el contrario, se observó una mayor actividad antibacteriana en los análogos de estos péptidos, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del 50% a una concentración de 75µM en el péptido M2, 50µM en los péptidos M4 y M6, y 25µM en los péptidos M3, M7 y M8.

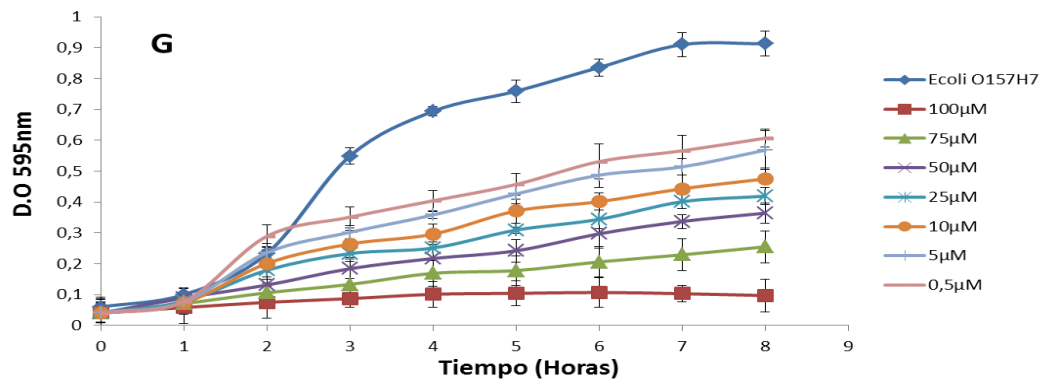
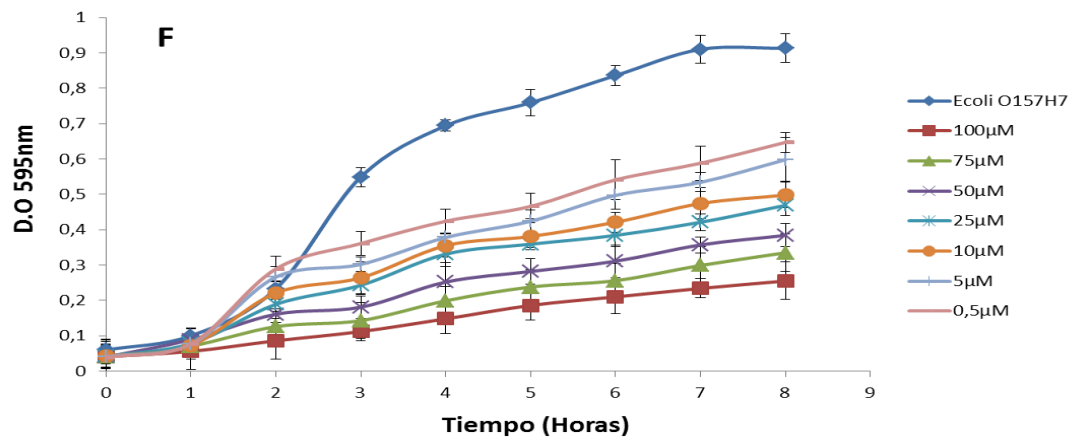
El péptido M7 alcanzó valores de CMI del 90% a una concentración de 100µM después de 8 horas de interacción con *E.coli* O157:H7 . Estos resultados son similares a los documentados por varios autores, en los cuales la modificación estructural de un péptido sintético se constituye como una alternativa en el diseño

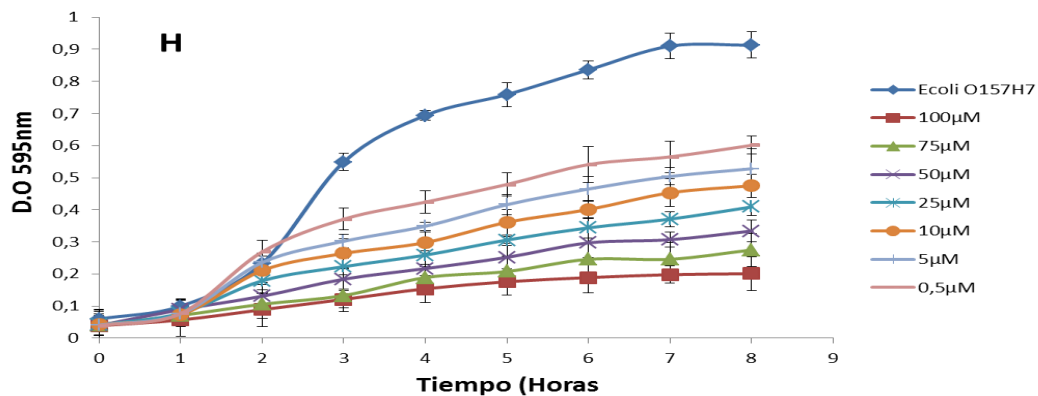
de nuevos agentes terapéuticos con mayor efecto antibacteriano (Haney, Nathoo, Vogel, & Prenner, 2010; Ili et al., 2013; Nguyen, Haney, & Vogel, 2011).

**Figura 9. Efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7.** A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, F) M6, G) M7, H) M8. Todos los ensayo se realizaron por triplicado. La densidad óptica del cultivo se determinó cada hora a 595nm durante 8 horas de incubación.









Se ha determinado que la interacción inicial del PAM con la membrana de las bacterias Gram-negativa como *E. coli* 157:H7 se inicia con la asociación entre el péptido y la membrana a través de interacciones electrostáticas entre PAMs catiónicos y Lipopolisacáridos aniónicos. Estos compuestos se encuentran entre los principales componentes de las bacterias Gram-negativas y se estabilizan por interacciones con los cationes divalentes como  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , los cuales puede ser eliminados o desplazados por PAMs catiónicos facilitando, zonas de desestabilización que genera la translocación de la membrana exterior en un proceso denominado captación auto-promovida (Straus & Hancock, 2006).

La inhibición alcanzada por el análogo M7 a la concentración evaluada es mayor que la publicada por otros autores contra el mismo microorganismo (Olmo, Calzada, & Nuñez, 2012; Strauss, Kadilak, Cronin, Mello, & Camesano, 2010). El efecto antibacteriano del péptido M7 se puede atribuir a la modificación de dos residuos de alanina por un residuo de glicina y otro de triptófano. La glicina es un aminoácido alifático al cual se le atribuye una disminución del volumen y una mejor estabilidad de la estructura alfa-hélice (Olmo et al., 2012). Por su parte, el triptófano es un aminoácido importante para la actividad antibacteriana debido a que su estructura molecular presenta una nube electrónica  $\pi$  en el anillo aromático indol, lo cual da lugar a un momento cuadrupolar significativo a medida que se introduce más en el núcleo de hidrocarburos que constituyen la bicapa lipídica

(Ladokhin, Selsted, & White, 1997). En consecuencia se ocasiona una interrupción en las interacciones hidrofóbicas de las cadenas acil-lípicas (S. Lee et al., 2011). Estudios recientes han revelado que la eliminación de los primeros residuos incluyendo el Trp, disminuye notoriamente la actividad antimicrobiana (Ladokhin et al., 1997).

Además de la modificación de los aminoácidos, la carga neta del péptido M7 también contribuyó a incrementar la actividad antibacteriana al facilitar las interacciones electrostáticas con los componentes cargados negativamente de la membrana celular bacteriana (Russell et al., 2011). Sin embargo, se ha documentado que aunque la carga neta positiva y la estructura alfa-hélice son determinantes para la actividad antimicrobiana de los AMP, es posible que los efectos de la carga sean menos significativos en la interacción con las membranas que la capacidad de formar una estructura alfa-hélice definida (Strandberg & Ulrich, 2015). Lo anterior se evidenció al comparar las actividades del péptido base M5, el cual tiene una carga neta de +5 y no posee una estructura secundaria definida, con el análogo M7 que posee la misma carga y una estructura alfa-hélice; el péptido M5 no posee CMI<sub>50</sub> a una concentración de 100µM, mientras el péptido M7 a la misma concentración presenta una inhibición del 90% de *E.coli O157:H7*

En la tabla 11 se resumen los valores de la CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, CMI<sub>99</sub> y CMB de cada péptido frente a *E.coli O157:H7*. El péptido M7 mostró la mayor actividad bacteriostática con una inhibición del 90% a una concentración de 100µM, ninguno de los péptidos evaluados evidenció tener actividad bactericida frente a *E.coli O157:H7*.

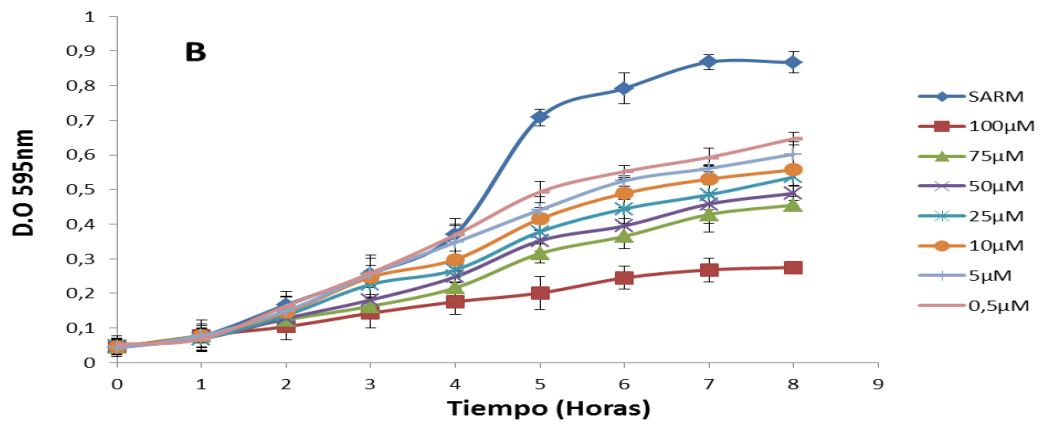
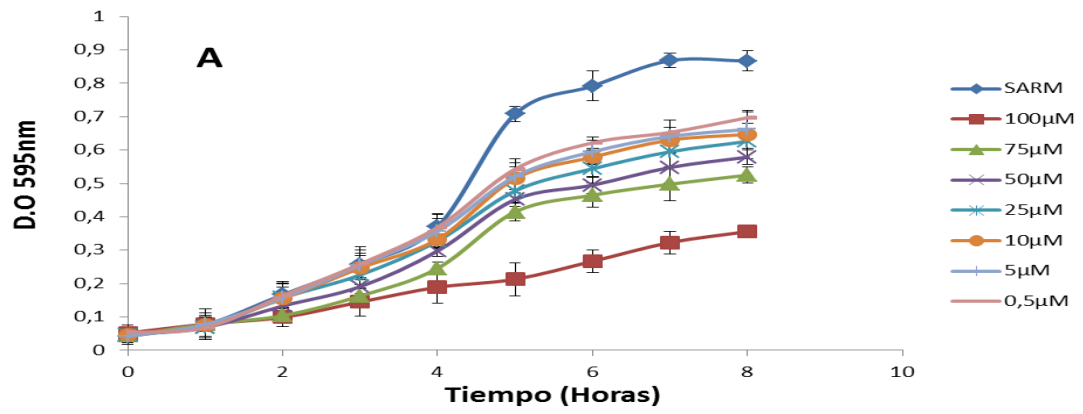
**Tabla 11. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos y sus respectivos análogos frente a *E.coli* O157:H7**

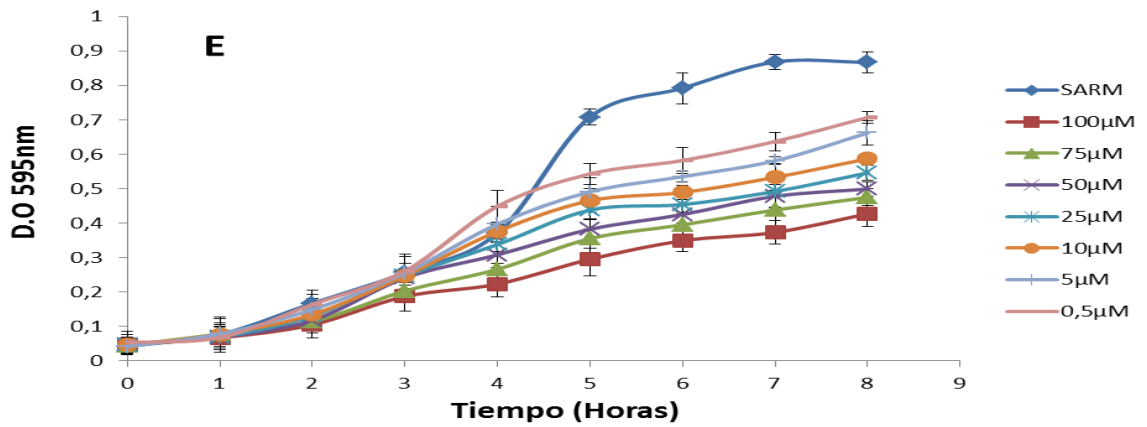
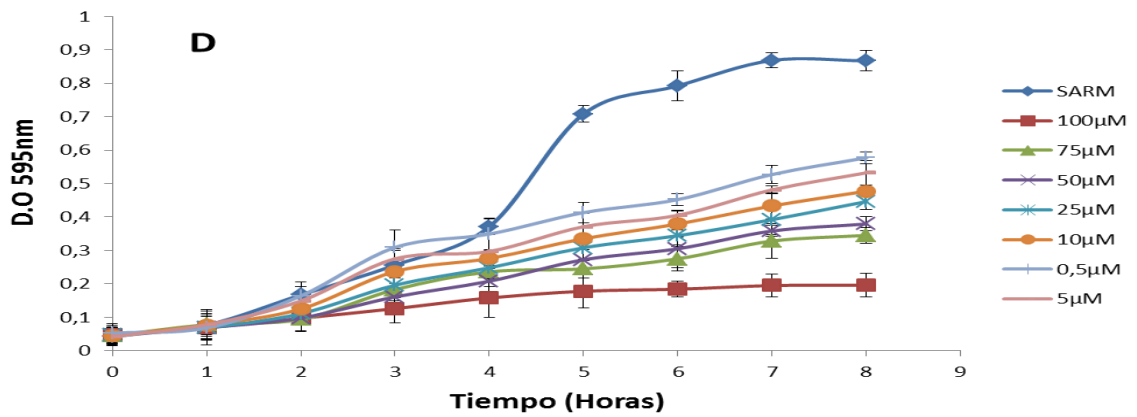
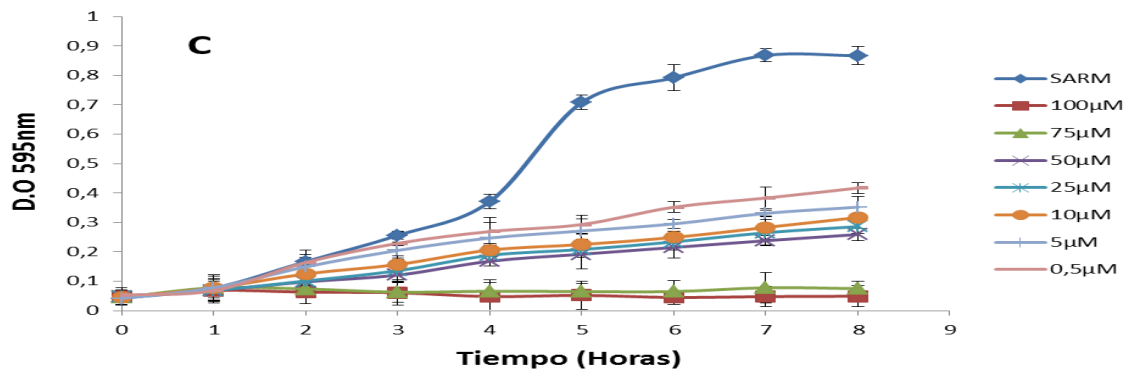
Péptido antimicrobiano				
	CMI <sub>50</sub> ±DS (µM)	CMI <sub>90</sub> ±DS (µM)	CMI <sub>99</sub> ±DS (µM)	CMB±DS (µM)
M1	>100	>100	>100	>100
M2	75 ±0.05	>100	>100	>100
M3	25 ±0.02	>100	>100	>100
M4	50 ±0.03	>100	>100	>100
M5	>100	>100	>100	>100
M6	50 ±0.03	>100	>100	>100
M7	25 ±0.03	100 ±0.05	>100	>100
M8	25 ±0.03	>100	>100	>100

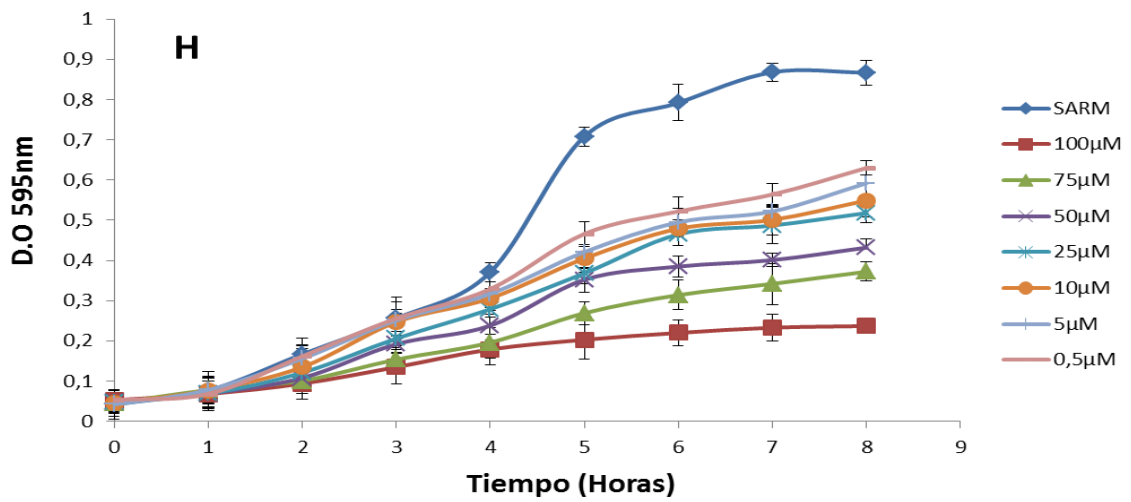
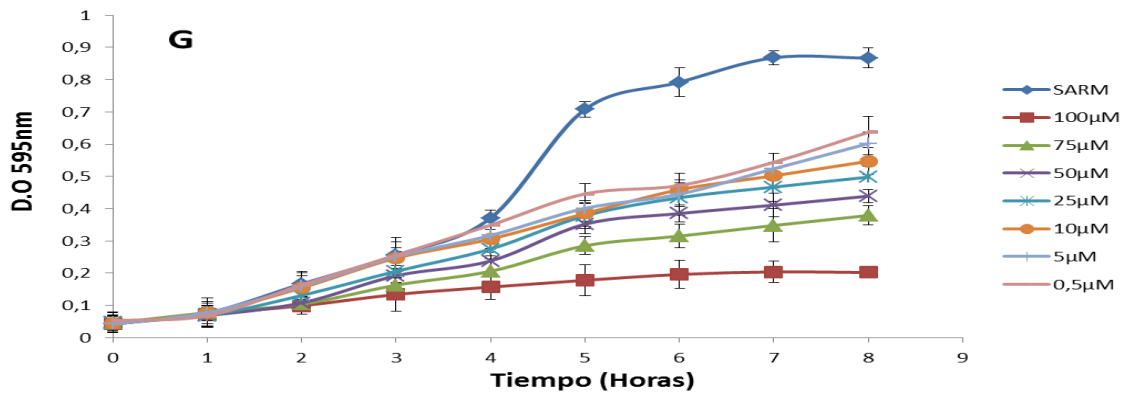
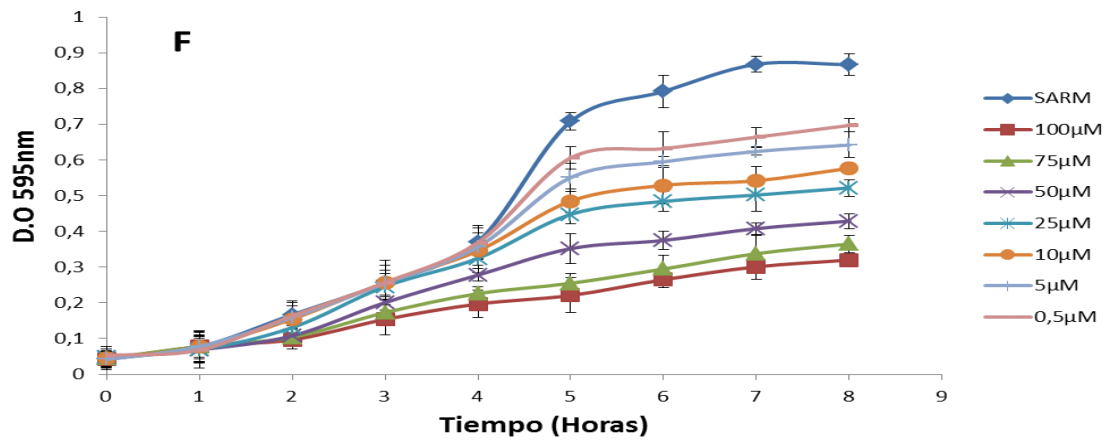
#### **4.3.4.2 Actividad antibacteriana de los péptidos libres frente a *SARM***

Por otro lado se evaluaron las mismas concentraciones de los PAMs frente a *SARM*, donde se observó un 50% de inhibición del crecimiento bacteriano a concentraciones de 100µM en los péptidos M1, M2, y M5; de 75µM en el péptido M7; de 50µM en los péptidos M4, M6 y M8; y de 0.5µM en el péptido M3, tal como se muestra en la figura 10 y se resume en la tabla 12.

**Figura 10. Efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos sobre el crecimiento de *SARM*.** A) M1, B) M2, C) M3, D) M4, E) M5, F) M6, G) M7, H) M8. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La densidad óptica del cultivo se determinó cada hora a 595nm durante 8 horas de incubación







**Tabla 12. Actividad antibacteriana de los péptidos sintéticos y sus respectivos análogos frente a *SARM***

Péptido antimicrobiano				
	CMI <sub>50</sub> ±DS (µM)	CMI <sub>90</sub> ±DS (µM)	CMI <sub>99</sub> ±DS (µM)	CMB±DS (µM)
M1	100 ±0.02	>100	>100	>100
M2	100 ±0.02	>100	>100	>100
M3	0.5 ±0.02	50 ±0.02	75± 0.02	75 ±0.02
M4	50 ±0.02	>100	>100	>100
M5	100 ±0.04	>100	>100	>100
M6	50 ±0.02	>100	>100	>100
M7	75 ±0.02	>100	>100	>100
M8	50 ±0.02	>100	>100	>100

El mecanismo de acción exacto de los PAMs sobre bacterias Gram-positiva como *SARM* es desconocido. Sin embargo, se ha propuesto que los péptidos interactúan con la membrana citoplasmática y hacen disrupción sobre ésta, lo cual conduce a la disolución de la fuerza motriz de protones y la pérdida de moléculas esenciales, lo que termina en la muerte celular (H. Huang, Rajanbabu, Pan, & Chan, 2013).

Un factor crucial para cualquier AMP terapéuticamente relevante es que presenta selectividad en sus interacciones de membrana, por lo tanto elimina bacterias de manera eficiente, pero sin causar daños en las células humanas. Tal selectividad de la membrana se ve facilitada por las diferencias de composición entre membranas humanas y bacterianas (Rintoul, Morero, & Dupuy, 2015). A diferencia de las membranas de las bacterias, la membrana celular contiene una cantidad insignificante de cargas negativas, por tanto las interacciones

hidrofóbicas son más importantes que las interacciones electrostáticas cuando los péptidos interactúan con la membrana celular (J. Li, Liu, Lakshminarayanan, Bai, & Pervushin, 2013).

El péptido M3 fue el único péptido que presentó actividad bactericida frente a *SARM* a una concentración de 75µM, resultado que evidencia una mayor actividad frente a este microorganismo en comparación con lo publicado por otros autores en péptidos antimicrobianos como la Apiadecina IA, Clavanina B, Desetcolina, Drosocina, Isracidina, Latarcina 3<sup>a</sup>, Mastoparan M, Pseudina-1, Spinigerina, Ponericina L2, Misgurina, Parasina I, y Styelina A; los cuales presentan CMB frente a *SARM* mayores a 75µM (Q. Li et al., 2012; Lin, Hui, Chen, & Wu, 2013; Venugopal et al., 2010). Por lo tanto éste péptido se convierte en una alternativa en el tratamiento contra *SARM*.

La actividad bactericida del péptido análogo M3 se puede atribuir a las interacciones catión- $\pi$  que se producen entre residuos básicos (Lys y Arg) y aromáticos (Phe, Tyr y Trp), que son importantes para la libre asociación del péptido dentro de las membranas y facilitan la inserción más profunda en las membranas mediante el blindaje de las cadenas catiónicas laterales (Teixeira, Feio, & Bastos, 2012). Se ha propuesto además que para eliminar eficientemente bacterias Gram positivas por un mecanismo de membrana dependiente, el péptido debe ser capaz de dirigirse a membranas aniónicas a través de interacciones electrostáticas, realizar una partición en las zonas de interface agua-lípido de las membranas a través de interacciones hidrofóbicas y enlaces de H, y ser capaz de insertarse más profundamente en el medio ambiente hidrófobo de la membrana, donde la capacidad de establecer interacciones de cationes  $\pi$  parece ser importante para proteger la carga de los residuos catiónicos y perturbar los fosfolípidos de membrana (Gromiha & Suwa, 2005). Si la membrana se compone sobre todo de lípidos zwitterionicos, luego de la fuerte atracción iónicos que existen entre las membranas lipídicas aniónicas y los PAMs; éstas se sustituyen por interacciones relativamente más débiles entre los dipolos de la

membrana neutral y las cargas de los PAMs. En este caso, la hidrofobicidad del péptido puede convertirse en un significativo factor en la determinación de la actividad antimicrobiana, lo cual se correlaciona con el elevado porcentaje de hidrofobicidad (52%) del péptido M3 (Amarouche et al., 2014).

Finalmente, la actividad antibacteriana de los PAMs diseñados y sintetizados se le atribuye en gran parte a su estructura secundaria  $\alpha$ -hélice, lo cual ha sido ampliamente reportado en la literatura como una relación estructura-actividad para PAMs (Amarouche et al., 2014; Maria-neto et al., 2015). Usando el programa Helical Wheel Projections se obtuvo el diagrama helicoidal de Edmunson, (Ver figura 11) en éste se observa la distribución de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de los aminoácidos presentes en cada uno de los péptidos que muestra su naturaleza anfipática. La capacidad de formar una estructura anfipática es una importante fuerza para la unión del péptido, ya que la formación de estructura secundaria permite la remoción de los residuos hidrófobos del agua. Para las estructuras  $\alpha$ -hélices, el grado de anfipaticidad se expresa por el momento hidrófobo ( $\mu H$ ), que es la suma del vector medio de las hidrofobicidades de las cadenas laterales de aminoácidos en una secuencia peptídica. Los PAMs altamente anfipáticos son a menudo más hemolíticos y sin mejora alguna en la actividad antimicrobiana, lo que sugiere que las interacciones electrostáticas dominan la energía libre de Gibbs de unión a las bicapas cargadas (Schiffer & Edmundson, 1964).

La figura 11 proporciona una proyección de aminoácidos perpendicular al largo del eje de la hélice suponiendo que existe el péptido en una estructura  $\alpha$ -helicoidal secundaria. Dado que la  $\alpha$ -hélice contiene 3,6 residuos por vuelta, los residuos adyacentes en el péptido son separados por  $100^\circ$  en la rueda helicoidal.

**Figura 11. Diagrama de rueda helicoidal de los péptidos y sus respectivos análogos.** Los residuos hidrofílicos se representan como círculos, los hidrofóbicos como diamantes, los cargados negativamente como triángulos y los residuos con



mediante el método de nanoprecipitación, ésta técnica presenta numerosas ventajas. Es una técnica sencilla, rápida y fácil de realizar, no requiere cizallamiento, velocidades de agitación extendidos, sonicación o temperaturas muy altas, y se caracteriza por la ausencia de interfaces oleosas acuosa, condiciones que podrían dañar la estructura de la proteína. Además, los tensioactivos no son siempre necesarios y los disolventes orgánicos tóxicos están excluidos de este procedimiento (Montanheiro et al., 2013)

La formación de nanopartículas es instantánea y la totalidad del procedimiento se lleva a cabo en un solo paso. La Nanoprecipitación ocurre por una rápida desolvatación del polímero cuando la solución del polímero es añadida a la sustancia no disolvente. Es decir, tan pronto como el disolvente que contiene el polímero se ha difundido en el medio de dispersión, el polímero (PLGA) precipita, con la resultante encapsulación inmediata del péptido. La formación rápida de nanopartículas se rige por el llamado efecto Marangoni, que es debido a turbulencias interfaciales que tienen lugar en la interfase del disolvente y el no disolvente y resultan de fenómenos complejos y acumulados como el flujo, la difusión y las variaciones de la tensión de superficie (Mora-huertas, Garrigues, Fessi, & Elaissari, 2012).

Se utilizó PEI como polímero catiónico, tal como se ha descrito en el numeral 3.5.2. Cada uno de los péptidos encapsulados en NPs de PLGA en presencia del polímero catiónico generaron emulsiones de apariencia lechosa, con propiedades fisicoquímicas diferentes. El polímero catiónico PEI se empleó con el fin de mejorar la interacción de las NPs de PLGA-Péptido antimicrobiano frente a *E.coli* O157:H7 y SARM, debido a la posibilidad de localizar cargas positivas sobre los encapsulados de PLGA-Péptido, favoreciendo así la interacción de éstos con la pared celular de las bacterias con carga negativa. Además, el polímero catiónico empleado en la síntesis presenta una baja toxicidad (Khayata, Abdelwahed, Chehna, Charcosset, & Fessi, 2012).

#### 4.5 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA-PÉPTIDO ANTIMICROBIANO

La caracterización de las NPs de PLGA-Péptido antimicrobiano se estudió en función del tamaño promedio de las partículas, expresado como el diámetro hidrodinámico; distribución de tamaño, expresado como índice de polidispersión (IP); estudios de morfología, carga de las NPs por la medida del potencial zeta y eficiencia de encapsulación.

Mediante Dispersión de luz en modo Dinámico (DLS) se determinó el tamaño hidrodinámico promedio de las NPs de PLGA sintetizadas, el tamaño hidrodinámico promedio de NPs de PLGA-M3 fue de alrededor de 209.7nm con un índice de polidispersión de 0.107, que se interpreta como una distribución estrecha de tamaño en la población de nanopartículas sintetizadas, con una carga superficial de +10.5mV, lo cual le otorga una buena estabilidad (Ghaouar, Elmissaoui, Aschi, & Gharbi, 2010; Nita, Chiriac, Bercea, & Wolf, 2013). De igual manera se determinó el tamaño hidrodinámico promedio de las NPs de PLGA-M7, que fue alrededor de 222.4nm con un índice de polidispersión de 0.077 y una carga superficial de +7.68mV. Las micrografías de FE-STEM mostraron vehículos en el rango de tamaño nanométricos (200-300nm) como se resume en la tabla 13.

**Tabla 13.** Características de las NP de PLGA-M3 y PLGA-M7: Tamaño, morfología y carga. ND: no se determinó. DS: Desviación estándar.

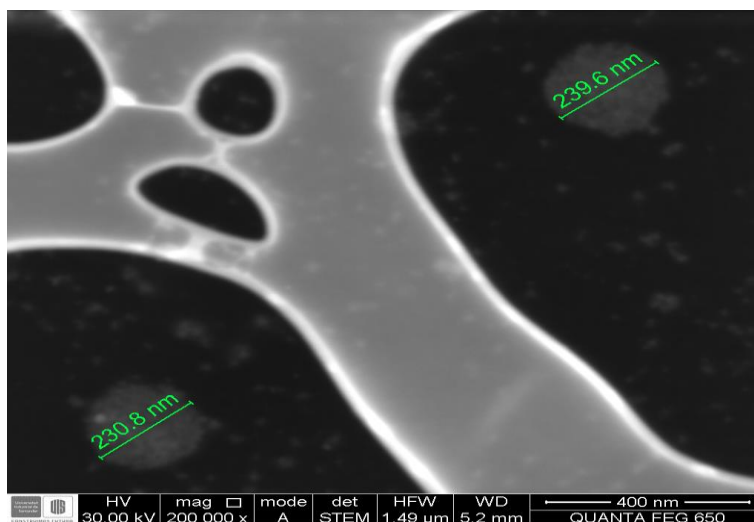
<b>NPs de PLGA</b>	<b>FE-STEM ± DS (nm)</b>	<b>Tamaño hidrodinámico promedio ± DS (nm)</b>	<b>Potencial Zeta ± DS (nm)</b>
NPs de PLGA vacías	ND	195.4 ±2.65	-0.09 ±0.52

NPs de PLGA-M3	235.2 ± 24	209.7 ± 1.58	+ 10.5 ± 0.42
NPs de PLGA-M7	266.3 ± 28	222.4 ± 2.34	+ 7.68 ± 0.12

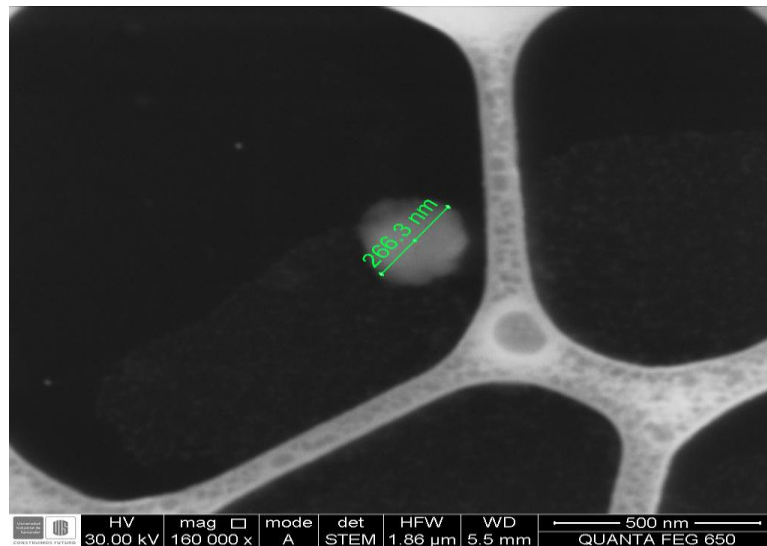
#### 4.5.1 Microscopía electrónica de barrido en modo transmisión (STEM)

Se realizó la caracterización de las NPs por microscopía de barrido electrónico (FE-STEM) en modo transmisión con un voltaje de 30KV, donde se observó una superficie homogénea. Las NPs no presentaron aglomeraciones, como se observa en las figuras 12 y 13 correspondientes a las NPs de PLGA-M3 Y PLGA-M7 respectivamente.

**Figura 12.** Micrografía por FE-STEM en modo de transmisión de NPs PLGA-M3. Con un voltaje de aceleración de 30KV y magnificación de 200000x.



**Figura 13.** Micrografía por FE-STEM en modo de transmisión de NPs PLGA-M7. Con un voltaje de aceleración de 30KV y magnificación de 160000x.



La morfología observada en las micrografías 12 y 13 de las NPs de PLGA-M3 y PLGA-M7 respectivamente, fue ovalada con tamaños entre 200-300nm con una estrecha distribución unimodal, el tamaño final de partícula medio fue claramente dependiente de la naturaleza del disolvente utilizado y de la velocidad de difusión del disolvente en el no disolvente, ya que a mayor velocidad de difusión, las nanopartículas serán más pequeñas, por lo tanto mayor es el rendimiento de polímero transformado en nanopartículas, los tamaños obtenidos por STEM son mayores en aproximadamente 50nm en comparación a un estudio realizado en el cual se utilizaron las mismas soluciones solventes (S) y no solventes (NS), es decir DMSO y agua respectivamente, pero con la diferencia de las relaciones de volumen utilizadas, el estudio de *Bilati* y colaboradores utiliza una relación 0,05 S/NS, mientras en el presente estudio se utilizó una relación de 0.2 S/NS, debido a que en otras relaciones de volumen la formación de las nanopartículas no se llevó a cabo, las soluciones fueron inestables y el polímero se precipitó rápidamente impidiendo la formación de las nanopartícula (*Bilati et al., 2005*).

El incremento en el tamaño se puede deber a la adsorción del polímero catiónico PEI dentro y sobre la superficie del péptido nanoencapsulado durante la formación de las NPs a través de interacciones electroestáticas entre la interfase hidrófoba de las NPs de PLGA y el polímero catiónico en el medio acuoso.

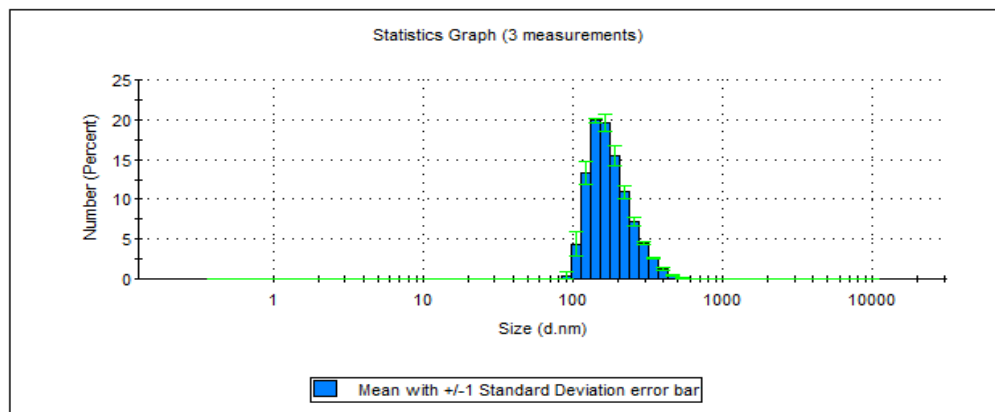
Las nanopartículas de PLGA-Péptido obtenidas mediante nanoprecipitación no formaron aglomerados como se puede observar en las figuras 12 y 13. Esta característica de las NPs es determinante para la actividad antimicrobiana como se ha reportado en estudios de inhibición de crecimiento bacteriano debido a nanopartículas (Chin, Pang, & Tay, 2011; Moorthi & Kathiresan, 2013).

#### **4.5.2 Determinación de diámetro hidrodinámico promedio y la distribución de tamaños**

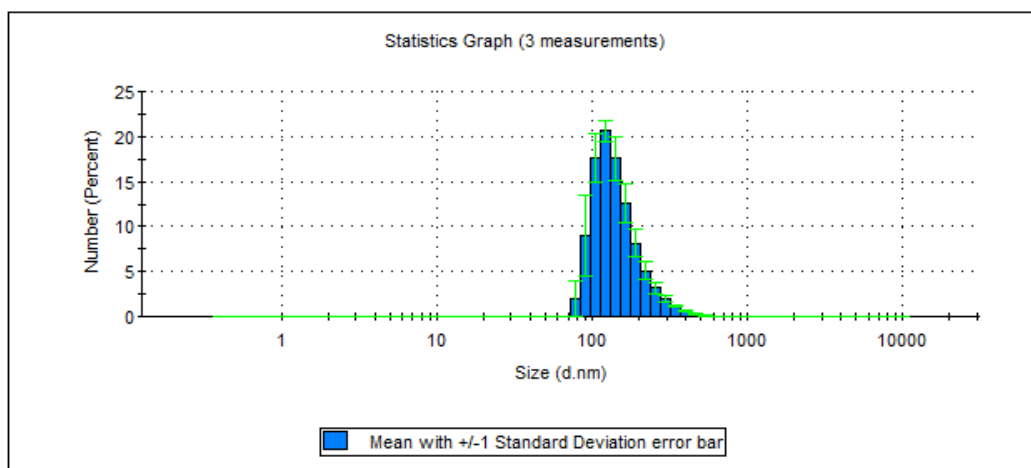
En el histograma de la distribución de tamaño hidrodinámico promedio de las NPs de PLGA-M3 sintetizadas por nanoprecipitación (ver figura 14), se observan poblaciones de tamaño a partir de 100 nm como tamaño inferior hasta 300nm de tamaño superior, con una población de tamaño hidrodinámico en promedio de 209.7nm y un índice de polidispersión de 0.107; mientras en las NPs de PLGA-M7 sintetizadas por el mismo método (ver figura 15) se obtuvieron poblaciones de tamaño a partir de 100nm como tamaño inferior hasta 350nm de tamaño superior, con un tamaño hidrodinámico promedio de 222.4 y un índice de polidispersidad de 0.077.

Las NPs sintetizadas presentaron una distribución monomodal de tamaños como se ilustra en los histogramas [121,122]. Los tamaños promedio de las NPs se encuentran en los rangos de uso terapéutico en equilibrio con la carga neta [123,124]. De esta manera se obtuvieron NPs con tamaños de acuerdo a la literatura entre 150-400nm utilizando la metodología de nanoprecipitación (Yordanov, Skrobanska, & Evangelatov, 2012).

**Figura 14. Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de NPs de PLGA-M3.** Condiciones: Fase Orgánica: PLGA: 10mg/mL y péptido M3: 1mg/mL disueltos en un 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Fase acuosa: polímero catiónico polietilenimina (PEI) a una concentración 0,1% v/v Y poloxámero 407 (0,5 p/v) disueltos en 5mL de agua.



**Figura 15. Histograma del tamaño hidrodinámico promedio de NPs de PLGA-M7.** Condiciones: Fase Orgánica: PLGA: 10mg/mL y péptido M3: 1mg/mL disueltos en un 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Fase acuosa: polímero catiónico polietilenimina (PEI) a una concentración 0,1% v/v Y poloxámero 407 (0,5 p/v) disueltos en 5mL de agua.



### 4.5.3. Potencial Zeta

El potencial zeta ( $\zeta$ ) es el potencial eléctrico en el plano de corte, y se expresa normalmente en milivoltios (mV). Es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción eléctrica entre las partículas que componen un coloide. Su medición confirma el mecanismo de estabilización de un coloide, sea electrostático o estérico. Un potencial Zeta de gran magnitud se correlaciona con una buena estabilidad coloidal; las nanopartículas con un alto potencial zeta, ya sea positivo o negativo, se repelen unas con otras. Valores de  $\zeta < 30\text{mV}$  o  $\zeta > 30\text{ mV}$  son considerados altos (Honary, Ghajar, Khazaeli, & Shalchian, 2011).

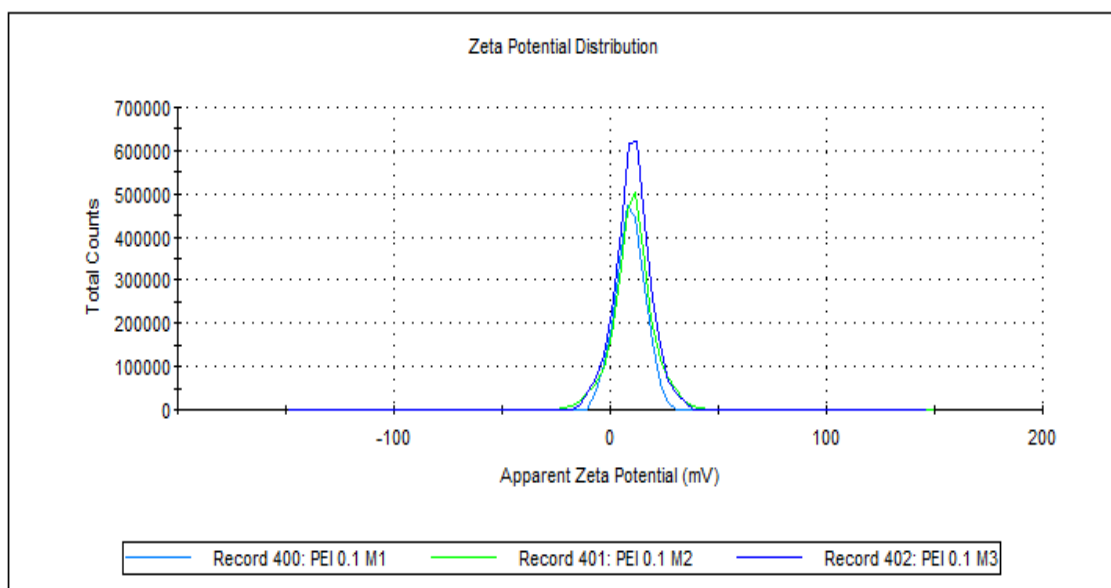
Se ha publicado en la literatura que NPs de PLGA tienden a presentar valores de potencial Zeta negativos debido a la presencia de grupos ácidos en el polímero precursor (PLGA-COOH) (Shameli, Ahmad, Jazayeri, Shabanzadeh, & Sangpour, 2012). En este caso, los grupos carboxilo de las NPs de PLGA son disociados a pH 7.4 en el medio acuoso confiriéndole una carga negativa a la superficie de las NPs (Hf, Kam, & Ma, 2011).

Al adicionar el polímero catiónico PEI, los valores de potencial Zeta fueron positivos para las dos NPs sintetizadas (entre +7.68 y +10.5mV), esto se debe esencialmente a la naturaleza policatiónica del PEI, en cuya estructura se encuentra una alta densidad de grupos amino primarios, los cuales pueden ser protonados a pH 7.4 (Wang, Zhou, Ma, Li, & Gu, 2009). Por otra parte una carga superficial alta (positiva o negativa), es un parámetro para medir la estabilidad de las partículas en el medio, debido a que una carga superficial alta conduce a una mayor repulsión electrostática entre las mismas, previniendo así su aglomeración inmediata (Seo, Won, Kim, Mishig-ochir, & Lee, 2012).

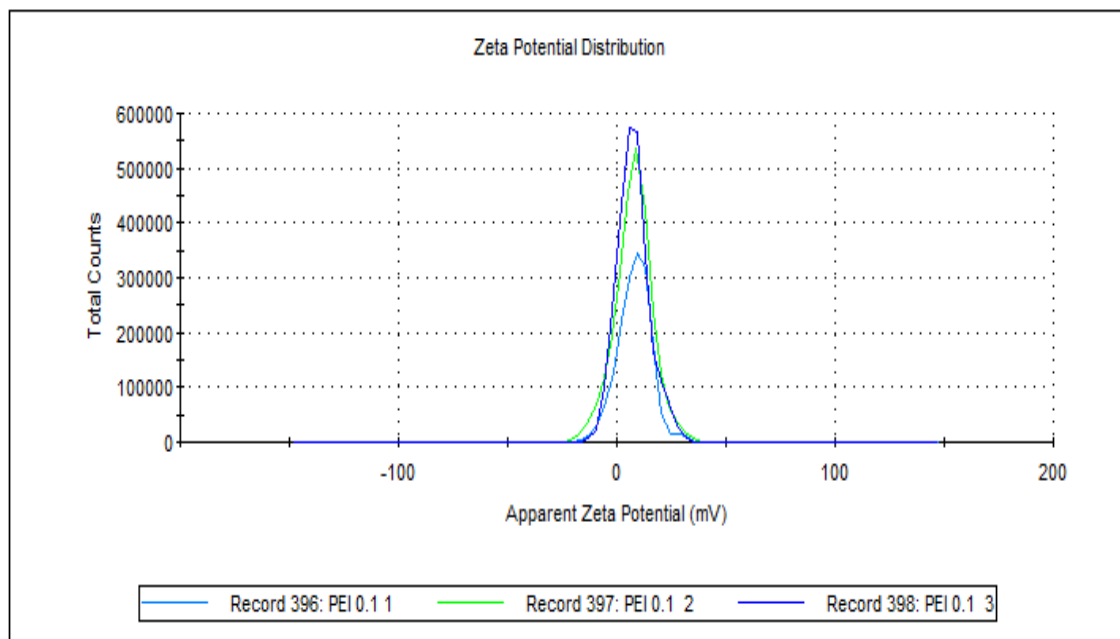
En las figuras 16 y 17 se observa la distribución de la carga superficial, determinado mediante la medición del potencial zeta de las NPs de PLGA-M3 y PLGA-M7 respectivamente. Las NPs de PLGA-M3 presentaron una carga superficial promedio de +10.5mV, mientras las NPs de PLGA-M7 tuvieron una

carga superficial promedio de +7.68mV, éstos valores de potencial zeta se han correlacionado en la literatura con una estabilidad aceptable a corto plazo, con una rápida agregación (Joshi et al., 2010). En este sentido las NPs sintetizadas mostraron una estabilidad a corto plazo (3 días) y una fácil agregación.

**Figura 16.** Medida de potencial Zeta de las NPs de PLGA-M3 utilizando PEI 0.1% v/v como agente catiónico. Las mediciones se realizaron por triplicado.



**Figura 17.** Medida de potencial Zeta de las NPs de PLGA-M7 utilizando PEI 0.1% v/v como agente catiónico. Las mediciones se realizaron por triplicado



#### 4.5.4. Eficiencia de encapsulación de los péptidos M3 y M7 cargados en nanopartículas de PLGA por RP-HPLC

La cantidad de péptido M3 y M7 encapsulado en NPs de PLGA se cuantificó por RP-HPLC. En el péptido M3 se observó una señal con un tiempo de retención de 1.917 min que corresponde al tiempo determinado previamente del péptido libre. El tiempo de retención del péptido M7 fue de 2.015 min que corresponde con el tiempo de retención del péptido libre.

Se determinó la concentración del péptido M3 cargado fue de 57ppm en las NPs de PLGA mediante una curva de calibración del péptido entre 0 y 500ppm (ver anexo 2). Esta concentración representa 34 $\mu$ g de PAM cargado en el sistema de liberación nanométrico de PLGA, a partir de este valor se determinaron las concentraciones a evaluar en la actividad antibacteriana frente a *SARM*.

La eficiencia de encapsulación de M3 en el sistema de liberación de PLGA fue de 34%, resultado similar a diferentes estudios que han encapsulado moléculas por nanoprecipitación en una relación de péptido/polímero 1:10 (mg de PAM/mg de PLGA) (Mccall & Sirianni, 2013; Shariat et al., 2014).

Con relación a la concentración del péptido M7, la carga fue de 43ppm en las NPs de PLGA, determinado mediante una curva de calibración del péptido entre 0 y 500ppm (ver anexo 3). La concentración del péptido cargado representa 25.8µg de PAM cargado en el sistema de liberación nanométrico de PLGA, a partir de este valor se determinaron las concentraciones para realizar la actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7 La eficiencia de la encapsulación del péptido M7 en el sistema de liberación fue de 25.8%, lo cual se ajusta a lo reportado por otros estudios teniendo en cuenta la relación péptido-polímero (Carmona-ribeiro, Dias, & Carrasco, 2014; Carone et al., 2014).

Posterior a la caracterización de los péptidos encapsulados, se determinó la actividad antibacteriana de las nanopartículas de PLGA-Péptido frente a *E.coli* O157:H7 y SARM.

#### **4.5.5 Actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M3 y PLGA-M7**

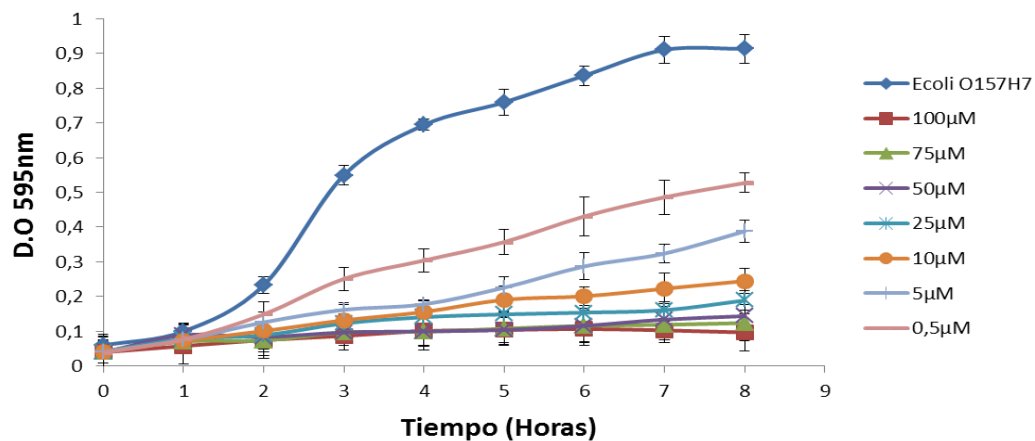
Los péptidos sintetizados M7 y M3, los cuales tuvieron mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7 y SARM respectivamente, fueron encapsulados en NPs de PLGA por el método de nanoprecipitación. Para cada ensayo se realizaron controles de NPs de PLGA en ausencia de péptido para atribuir la acción antibacteriana únicamente a los péptidos M3 y M7. De igual manera, se realizaron controles de Polietilenimina y Poloxamer 407 a las diferentes diluciones utilizadas en la síntesis de las NPs de PLGA-Péptido, éstos controles no presentaron inhibición significativa (<10%) en el crecimiento

bacteriano de las cepas utilizadas en el presente estudio, en las concentraciones finales esperadas en la suspensión de NPs de PLGA-Péptido.

Para realizar la actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M7 se tomó como referencia la concentración de máxima actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7, es decir 100µM, para evaluar si al encapsular el péptido se alcanzaba la CMB y se conseguía disminuir el CMI<sub>90</sub> obtenida con el péptido M7 libre. Con referencia a las NPs de PLGA-M3 se utilizaron concentraciones en orden descendente desde 75µM, valor con el que se obtuvo la CMB frente a *SARM*.

En la figura 18 se observa la cinética de crecimiento de las NPs de PLGA-M7 frente a *E. coli* O157:H7 donde se observa una CMI del 90% de 50µM, que en comparación al péptido libre fue dos veces más activo frente al microorganismo evaluado.

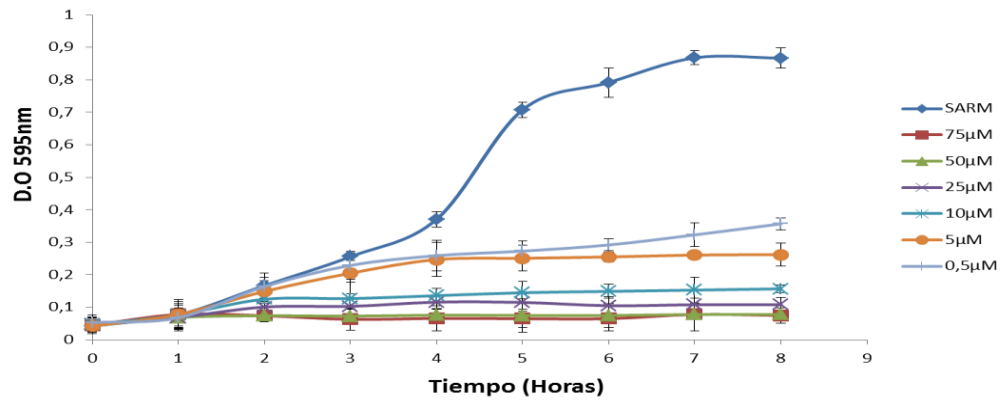
**Figura 18. Actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M7 frente a *E. coli* O157:H7.**



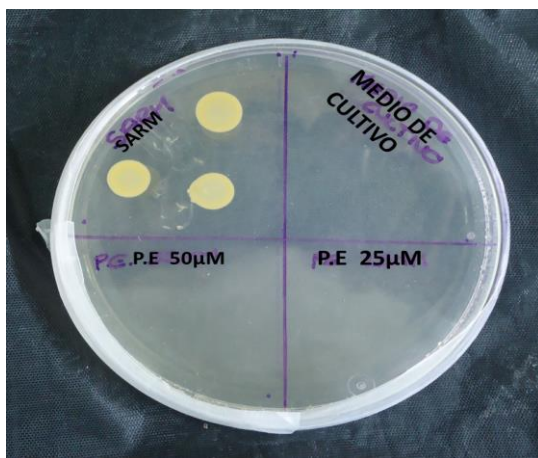
También se pudo determinar que a una concentración de 100µM, las NPs de PLGA-M7 no ejercen un efecto bactericida frente a *E. coli* O157:H, por lo tanto el efecto de éstas NPs es bacteriostático frente a la cepa evaluada.

Con respecto a las NPs de PLGA-M3 frente a *SARM*, en la figura 19 se observa una CMB de 25 $\mu$ M en la cinética de crecimiento bacteriano en el péptido encapsulado y una CMI<sub>90</sub> de 10 $\mu$ M, lo cual respecto al péptido libre disminuye 3 veces la actividad bactericida de este péptido al estar encapsulado, en la figura 20 se muestra la actividad bactericida de las NPs de PLGA-M3 a una concentración de 25 $\mu$ M, realizada en Agar BHI.

**Figura 19. Actividad antibacteriana de las NPs de PLGA-M3 frente a *SARM***



**Figura 20. Concentración mínima bactericida de las NPs de PLGA-M3 sobre *SARM*.**



De esta manera, se demostró que las Nps de PLGA-péptido inhiben significativamente el crecimiento bacteriano a concentraciones más bajas respecto a los péptidos M3 y M7 libres en las cepas estudiadas, lo que posiblemente se puede inferir que es debido a un aumento en la biodisponibilidad del PAM en su diana de acción antimicrobiana y a que las Nps de PLGA permiten mantener la integridad conformacional del PAM (Malheiros, Sant, Yasmine, & Serafini, 2011).

En la tabla 14 se presenta la comparación de las CMI<sub>90</sub> y la CMB de los péptidos libres y encapsulados, en la cual se evidencia la disminución de éstos valores cuando el péptido se encuentra encapsulado en las NPs de PLGA, confirmando la efectividad de la nanoprecipitación como un vehículo adecuado para el transporte de moléculas hacia sus objetivos diana.

**Tabla 14. CMI<sub>90</sub> y CMB del péptido libre y encapsulado M7 frente a *E. coli* O157:H7 , y del péptido libre y encapsulado M3 frente a SARM. ND: No determinado.**

	<i>E. coli</i> O157:H7		SARM	
	CMI <sub>90</sub> ±DS (µM)	CMB±DS (µM)	CMI <sub>90</sub> ±DS (µM)	CMB ±DS (µM)
<b>M7</b>	100 ±0.05	>100	ND	ND
<b>Nps de PLGA-M7</b>	50 ±0.03	>100	ND	ND
<b>M3</b>	ND	ND	50 ±0.02	75 ±0.02
<b>Nps de PLGA-M3</b>	ND	ND	10 ±0.03	25 ±0.02

Debido a que este estudio es pionero en encapsular péptidos antimicrobianos hidrofílicos por la metodología de nanoprecipitación, no es comparable con otros estudios, y se convierte por lo tanto como un punto de referencia en la búsqueda de estrategias que permitan hacer más efectivas las propiedades antibacterianas de los péptidos sintetizados.

La utilización de nanosistemas biodegradables presenta una serie de ventajas entre las cuales se destaca el uso como nanovehículos de moléculas activas, aprovechando que estos polímeros se someten a hidrólisis en el cuerpo produciendo monómeros de metabolitos biodegradables, reportando por consiguiente una mínima toxicidad sistémica asociada al ser biocompatibles con células y tejidos, ser estables en sangre, no trombogénicos, no producen respuesta inmunogénica ni inflamatoria y tampoco activan moléculas del Sistema Reticuloendotelial (Kumari, Singla, Guliani, & Yadav, 2014; Mu, Yue, & Feng, 2003; Narang et al., 2007).

Un factor que posiblemente influyó significativamente sobre las propiedades antibacterianas de las NPs de PLGA-péptido es la carga superficial. Existen publicaciones en la literatura que muestran que la atracción electrostática entre la carga negativa de la membrana exterior de la bacteria y la carga positiva de las nanopartículas es crucial para la actividad antibacteriana (Danhier et al., 2012; Silva et al., 2013). La carga global de las células bacterianas es negativa a valores de pH biológicos, lo cual se debe al exceso en número de grupos carboxílicos, y además, a la presencia de residuos de varios aminoácidos (especialmente arginina) cuyas cargas no están neutralizadas por residuos ácidos (Jain, Das, Swarnakar, & Jain, 2011).

Recientemente Makadia (Makadia & Siegel, 2011), ha sugerido que las NPs de PLGA podrían penetrar la pared celular de la bacteria, mejorando el envío del agente microbiano al sitio de acción. Los resultados de este estudio refleja el

potencial no explotado del método de nanoprecipitación para fármacos hidrófilicos, el efectivo uso del polímero biodegradable PLGA para el atrapamiento efectivo de moléculas peptídicas y el uso de DMSO como un disolvente útil para mantener la integridad del péptido en la formación de la nanopartículas de PLGA, por lo tanto el método de nanoprecipitación modificado utilizado en el presente estudio se constituye como una alternativa prometedora para incrementar la acción antibacteriana de péptidos sintéticos hidrofílicos (Soppimath, Aminabhavi, & Kulkarni, 2001).

Finalmente se determinó la interacción de los péptidos encapsulados frente al modelo bacteriano *E.coli ML35* y las bacterias utilizadas en el presente estudio.

#### **4.6 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS PAMs ENCAPSULADOS FRENTE A LAS MEMBRANAS BACTERIANAS**

Mediante ensayos de Microscopia Confocal de fluorescencia y ensayos de permeabilidad de membrana con la bacteria modificada genéticamente *Escherichia coli ML35* se evaluó la interacción de los péptidos encapsulados sobre las membranas de las bacterias utilizadas en el presente estudio.

Mediante estos ensayos se pudo evidenciar que el mecanismo de acción de los péptidos sintetizados sobre la membrana consiste en la irrupción de ésta y la posterior penetración del péptido en el citoplasma de las bacterias estudiadas.

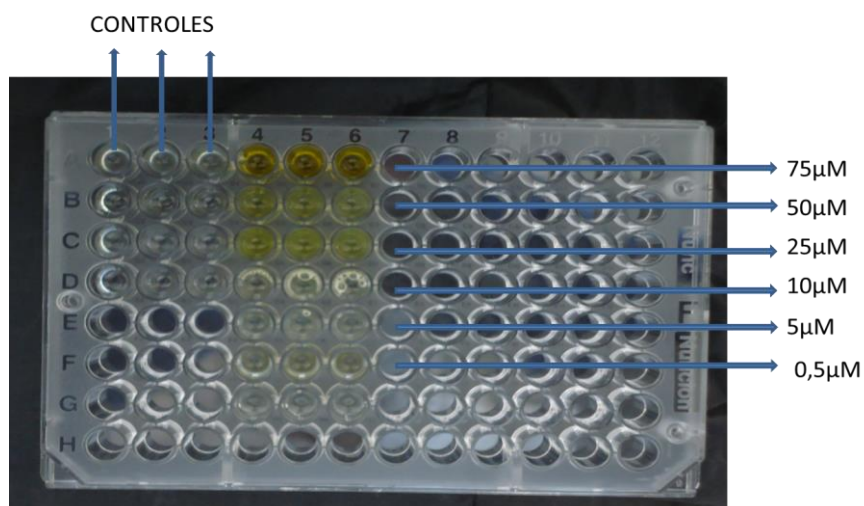
##### **4.6.1 Ensayo de permeabilidad de la membrana interna bacteriana de *E. coli ML35***

Mediante la medición de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa de *E. coli ML35*, utilizando el reactivo o-nitrofenil- $\beta$ -D-Galactopiranósido (ONPG) como sustrato, se determinó

la interacción de la membrana de una bacteria Gram-negativa con las NPs de PLGA-M7 sintetizadas.

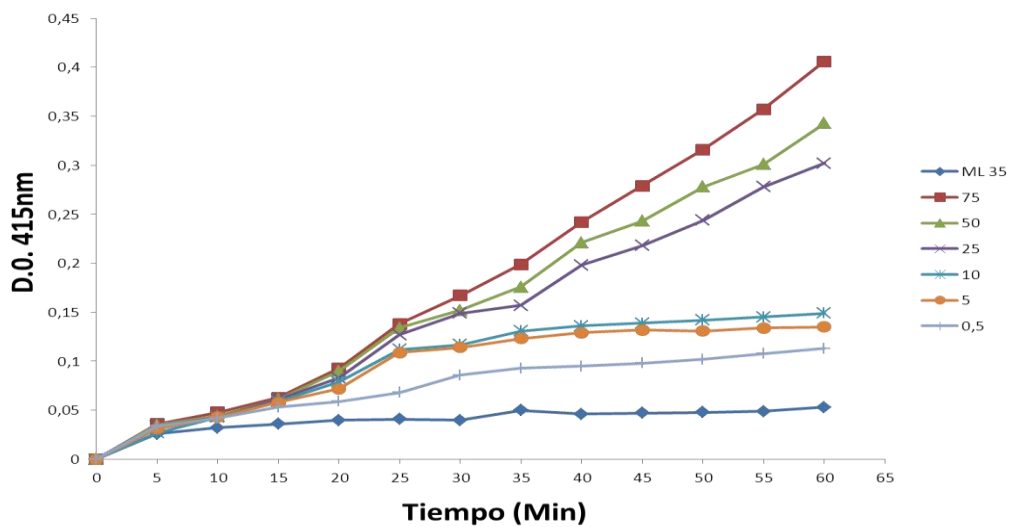
*E. coli ML35* es una cepa bacteriana mutante con deficiencia en la función permeasa y actividad citoplasmática  $\beta$ -galactosidasa normal. En el ensayo realizado se pudo determinar que las NPs de PLGA-M3 penetran la membrana e ingresan al citoplasma, lo cual se evidencia debido a que el complejo incoloro formado entre las NPs de PLGA-M3 y el ONPG es hidrolizado para liberar un compuesto cromógeno amarillo llamado *O*-nitrofenol (ONP). El ONP liberado sufre un cambio tautomérico a pH alcalino y por esta razón la producción del color amarillo; el tautómero ácido es prácticamente incoloro. En la figura 21 se observan los resultados obtenidos que evidencian la penetración de la membrana por parte de las NPs de PLGA-M3, desde una concentración de 25 $\mu$ M.

**Figura 21. Efecto de las NPs de PLGA sobre *E. coli ML35*.** Los controles incluyeron la acción del reactivo ONPG en ausencia de las NPs de PLGA-M3, la acción del complejo NPs de PLGA-ONPG (ausencia del péptido M3), estos ensayos dieron incóloros, lo cual evidencia la acción del péptido M3.



De acuerdo con los resultados obtenidos se puede inferir que el objetivo de las NPs de PLGA-M3 catiónicas sintetizadas es la membrana citoplasmática y la despolarización de ésta, conduce a la disolución del gradiente de potencial eléctrico, lo cual resulta en muerte celular, presumiblemente a través de la pérdida de la integridad de la membrana. Esto se ha demostrado anteriormente en estudios realizados con péptidos como las magaininas, defensinas y lantibioticos (Friedrich et al., 2000; Imura et al., 2008). La permeabilización de la membrana se llevó a cabo desde una concentración de 25 $\mu$ M, lo cual se correlacionó con el incremento de la densidad óptica a 415nm debido a la hidrólisis del ONPG, con el resultante color amarillo. La permeabilización se produjo después de los 20 minutos de interacción como se muestra en la figura 22.

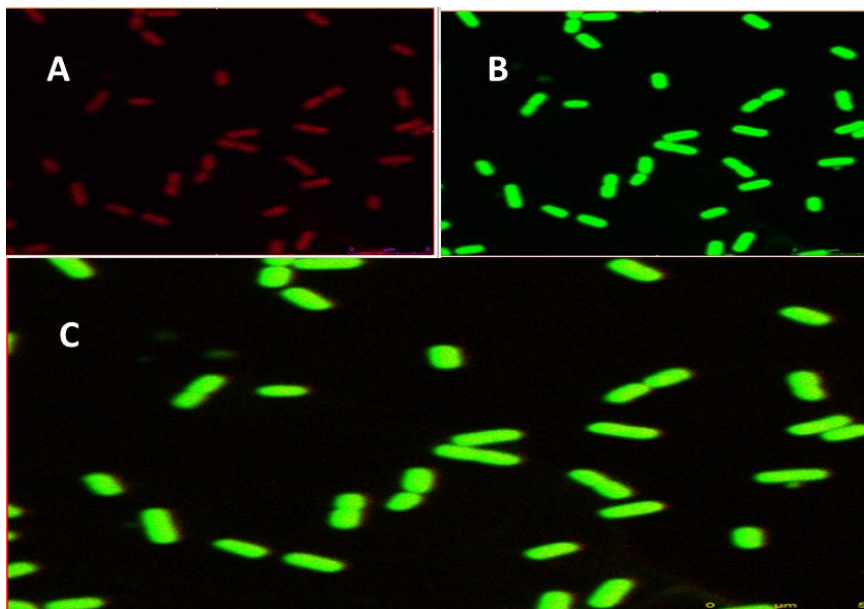
**Figura 22. Ensayo de permeabilización de la membrana de *E.coli* ML35 producida por las NPs de PLGA-M3 a diferentes concentraciones.**



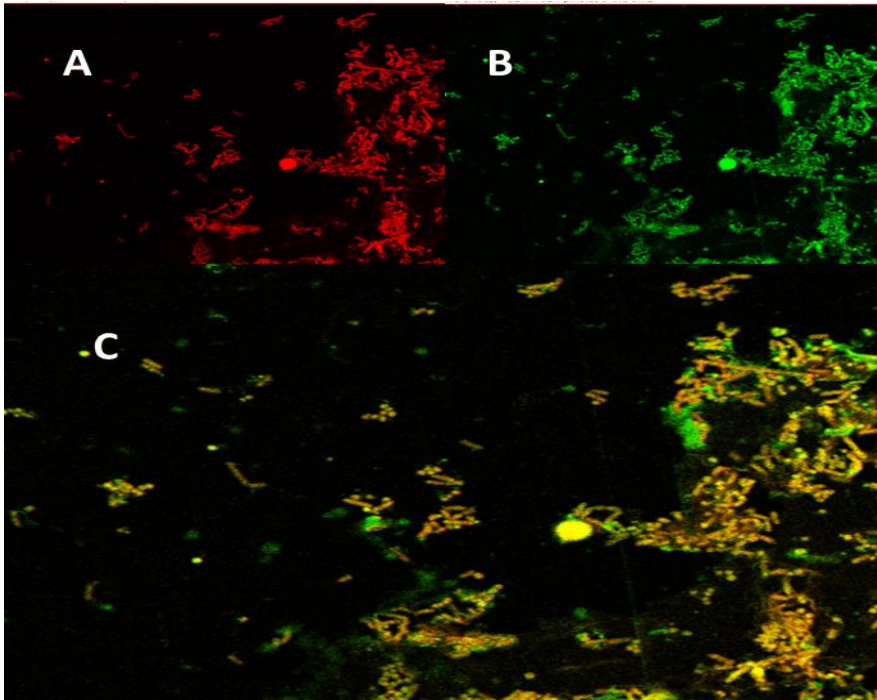
#### 4.6.2 Microscopia Confocal

Mediante el marcaje fluorescente de *E.coli* O157:H7 y SARM con Sytox Green y el marcaje del péptido sintético con rodamina, se pudo determinar que la interacción de los péptidos con la membrana de las bacterias permite la penetración del péptido al interior de los microorganismos, esto se evidenció porque la microscopia confocal detecta y recoge la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano focal del espacio tridimensional. Esto es posible porque, por una parte, la fuente de iluminación utilizada es luz láser en la que el haz monocromático se mantiene perfectamente lineal al propagarse. El haz de luz ilumina las muestras con una intensidad muy elevada y estable, y mediante el uso de tres filtros se puede visualizar el comportamiento del péptido encapsulado en el filtro rojo, el comportamiento del microorganismo en el filtro verde y la interacción de los dos en el tercer filtro, como se visualiza en las figuras 23 y 24.

**Figura 23. Interacción de las NPs de PLGA-M7 con *E.coli* O157:H7.** A) NPs de PLGA-M7. B) *E.coli* O157:H7. C) Interacción de las NPs de PLGA-M7 con *E.coli* O157:H7.



**Figura 24. Interacción de las NPs de PLGA-M3 con SARM.** A) NPs de PLGA-M3. B) SARM. C) Interacción de las NPs de PLGA-M3 con SARM



Las sustancias fluorescentes utilizadas para marcar la membrana de los microorganismos y los péptidos no tienen actividad antibacteriana ni mostraron capacidad para penetrar las membranas. Los resultados obtenidos son similares a los mostrados en otros estudios realizados en los cuales se ha comprobado la interacción de diferentes moléculas antimicrobianas con bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante irrupción de las membranas y formación de poros (Benincasa, Pacor, Gennaro, & Scocchi, 2009; Torrent, Nogués, & Boix, 2010; Tripathi, Kathuria, Kumar, Mitra, & Ghosh, 2015).

Los PAMs, tras la unión en las bicapas lipídicas, muy a menudo cambian la temperatura de transición de fase hexagonal inversa (TH). Se sugiere que las NPs de PLGA-Péptido sintetizadas modulan la curvatura de la membrana, el

incremento de la TH se correlaciona con la presencia de una curvatura positiva dentro de la bicapa lipídica que inhibe la formación de estructuras no lamelares. La curvatura positiva conduce a la construcción de un poro toroidal a través de la membrana. Se ha observado tal comportamiento en magainina-2 y cecropinas, lo cual se correlaciona con el análisis filogenético realizado inicialmente a las secuencias peptídicas diseñadas (Acker et al., 2014). Muy a menudo, las altas concentraciones de PAMs causan la micelarización de una bicapa lipídica, que de hecho puede ser considerado como un ejemplo extremo de una curvatura positiva (Taylor et al., 2014).

La actividad del péptido antimicrobiano comienza con la unión desde la solución acuosa, que es rápida aunque la difusión es limitada, un equilibrio de unión se establece rápidamente. Si disociación de la membrana es lenta, los péptidos se pueden acumular en la superficie en un grado suficiente y se observará actividad antibacteriana. Parece probable que un componente significativo de la especificidad bacteriana surge de la estabilización de la membrana asociada al péptido catiónico por el contenido significativo de lípidos aniónicos de las membranas bacterianas, lo que mejora el equilibrio de unión principalmente mediante la reducción de la velocidad de disociación del péptido (Mccall & Sirianni, 2013).

## CONCLUSIONES

- Se diseñaron y sintetizaron ocho secuencias de péptidos (denominados M1-M8) mediante la metodología en fase sólida F-moc con una pureza mayor del 95%.
- Los análogos M3 y M7 mostraron mayor actividad antibacteriana frente a *SARM* y *E.coli O157:H7* respectivamente. M3 mostró una concentración mínima bactericida a 75 $\mu$ M y M7 tuvo una concentración mínima inhibitoria del 90% a una concentración de 100 $\mu$ M.
- Los péptidos M3 y M7 fueron encapsulados mediante nanoprecipitación en nanopartículas de PLGA, obteniendo tamaños de 235.2nm y 266.3nm respectivamente, y cargas superficiales catiónicas.
- La encapsulación de los péptidos M3 y M7 mediante el método de nanoprecipitación con el polímero biodegradable PLGA permitió incrementar su actividad antibacteriana 3 y 2 veces respectivamente, alcanzando M3 una CMB de 25 $\mu$ M frente a *SARM* y M7 una CMI<sub>90</sub> de 50 $\mu$ M.
- Mediante ensayos de interacción celular se pudo determinar que las NPs de PLGA-Péptido permeabilizan la membrana celular e ingresan al citoplasma, lo cual contribuyó notoriamente al incremento de la actividad antibacteriana.

## RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de citotoxicidad en modelos celulares de los péptidos libres y encapsulados sintetizados.
- Realizar ensayos de liberación controlada de las nanopartículas de PLGA-Péptido antimicrobiano.
- Utilizar membranas sintéticas bacterianas para profundizar en el estudio del mecanismo de interacción de los PAMs.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin, 271–281.
- Abercrombie, J. J., Leung, K. P., Chai, H., & Hicks, R. P. (2015). Bioorganic & Medicinal Chemistry Spectral and biological evaluation of a synthetic antimicrobial peptide derived from 1-aminocyclohexane carboxylic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(6), 1341–1347. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.027>
- Acker, H. Van, Dijck, P. Van, & Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*, 22(6), 326–333. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.001>
- Alborzi, A., Aelami, M. H., Astaneh, B., Pourabbas, B., Farshad, S., Kalani, M., ... Rashidi, M. (2008). Is Escherichia coli O157:H7 a common pathogen in children with bloody diarrhea in Shiraz, Iran? *Turkish Journal of Pediatrics*, 50(4), 349–353.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2015). Review Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance, 1037–1050. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
- Alshamsan, A. (2014). Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(3), 219–222. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.002>
- Alsina, J., Rabanal, F., Chiva, C., Giralt, E., & Albericio, F. (1998). Active carbonate resins: Application to the solid-phase synthesis of alcohol, carbamate and cyclic peptides. *Tetrahedron*, 54(34), 10125–10152.
- Amarouche, N., Giraud, M., Forni, L., Butte, A., Edwards, F., Borie, N., & Renault, J. (2014). Two novel solvent system compositions for protected synthetic peptide purification by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1337, 155–161. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.052>
- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 72–82. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>

- Babu, V. V. S., & Gopi, H. N. (1998). Rapid and Efficient Synthesis of Peptide Fragments containing a . Aminoisobutyric acid using Fmoc-Amino acid Chlorides / Potassium salt of 1-Hydroxybenzotriazole, 39, 1049–1050.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575. <http://doi.org/10.3390/ph6121543>
- Bastos, M., Silva, T., Teixeira, V., Nazmi, K., Bolscher, J. G. M., Funari, S. S., & Uhríková, D. (2011). Lactoferrin-derived antimicrobial peptide induces a micellar cubic phase in a model membrane system. *Biophysical Journal*, 101(3), 20–22. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.038>
- Benincasa, M., Pacor, S., Gennaro, R., & Scocchi, M. (2009). Rapid and Reliable Detection of Antimicrobial Peptide Penetration into Gram-Negative Bacteria Based on Fluorescence Quenching □, 53(8), 3501–3504. <http://doi.org/10.1128/AAC.01620-08>
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67–75. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.09.011>
- Binnewies, T. T., Motro, Y., Hallin, P. F., Lund, O., Dunn, D., La, T., ... Ussey, D. W. (2006). Ten years of bacterial genome sequencing: Comparative-genomics-based discoveries. *Functional and Integrative Genomics*, 6(3), 165–185. <http://doi.org/10.1007/s10142-006-0027-2>
- Boulanger, N., Bulet, P., & Lowenberger, C. (2006). Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology*, 22(6), 262–268. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.003>
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., & Hancock, R. E. W. (2005). A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 35–51.
- Broekman, D. C., Frei, D. M., Gylfason, G. A., Steinarsson, A., Jörnvall, H., Agerberth, B., ... Maier, V. H. (2011). Cod cathelicidin : Isolation of the mature peptide , cleavage site characterisation and developmental expression. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(3), 296–303. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2010.10.002>
- Bruschi, M., Pirri, G., Giuliani, A., Nicoletto, S. F., Baster, I., Scorciapino, M. A., ... Rinaldi, A. C. (2010). Synthesis, characterization, antimicrobial activity and

LPS-interaction properties of SB041, a novel dendrimeric peptide with antimicrobial properties. *Peptides*, 31(8), 1459–1467. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.04.022>

Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137–44. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>

Canizalez-Roman, a, Gonzalez-Nunez, E., Vidal, J. E., Flores-Villasenor, H., & Leon-Sicairos, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 36–45. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.020>

Carmona-ribeiro, A. M., Dias, L., & Carrasco, D. M. (2014). Novel Formulations for Antimicrobial Peptides, 18040–18083. <http://doi.org/10.3390/ijms151018040>

Carone, B. R., Xu, T., Murphy, K. C., & Marinus, M. G. (2014). Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis High incidence of multiple antibiotic resistant cells in cultures of in enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 759, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.11.008>

Carter, P. J. (2011). Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, 317(9), 1261–9. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.013>

Cerón, J. M., Contreras-moreno, J., Puertollano, E., Cienfuegos, G. Á. De, Puertollano, M. A., & Pablo, M. A. De. (2010). Peptides The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells, 31, 1494–1503. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.05.008>

Cheow, W. S., & Hadinoto, K. (2011). Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 214–220. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.033>

Chin, S. F., Pang, S. C., & Tay, S. H. (2011). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1817–1819. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.012>

- Chinchilla, R., Dodsworth, D. J., Nájera, C., & Soriano, J. M. (2000). Polymer-bound TBTU as a new solid-supported reagent for peptide synthesis. *Tetrahedron Letters*, *41*(14), 2463–2466.
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Coquet, L., Jouenne, T., Leprince, J., Vaudry, H., ... King, J. D. (2011). Peptides Characterization of antimicrobial peptides in skin secretions from discrete populations of *Lithobates chiricahuensis* ( *Ranidae* ) from central and southern Arizona. *Peptides*, *32*(4), 664–669. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.01.018>
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzm, F., Constanza, C., Fernandez-lafuente, R., Torres, R., ... Torres, E. C. (n.d.). Design and Activity of Novel Lactoferrampin Analogues Against O157:H7 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *101*(4), 319–328. <http://doi.org/10.1002/bip.22360>
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le, A., & Pr eat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles : An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, *161*(2), 505–522. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *13*(1), 16–34.
- Dixon, M. J., Bourr e, L., MacRobert, A. J., & Eggleston, I. M. (2007). Novel prodrug approach to photodynamic therapy: Fmoc solid-phase synthesis of a cell permeable peptide incorporating 5-aminolaevulinic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *17*(16), 4518–4522. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.095>
- Dong, W., & Bodmeier, R. (2006). Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. *International Journal of Pharmaceutics*, *326*(1-2), 128–138. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.013>
- Epand, R. M., & Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1462*(1-2), 11–28.
- Ezzati-tabrizi, R., Farrokhi, N., Talaei-hassanloui, R., Alavi, S. M., & Hosseininaveh, V. (2013). Insect Inducible Antimicrobial Peptides and their Applications, 698–710.
- Forier, K., Raemdonck, K., De Smedt, S. C., Demeester, J., Coenye, T., & Braeckmans, K. (2014). Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to

bacterial biofilms. *Journal of Controlled Release*, 190, 607–623.  
<http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.055>

Friedrich, C. L., Moyles, D., & Beveridge, T. J. (2000). Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria, *44*(8), 2086–2092.

Garage, S. D., Mcgannon, C. M., & Weiss, A. A. (2004). Escherichia coli Serogroup O107 / O117 Lipopolysaccharide Binds and Neutralizes Shiga Toxin 2, *186*(16), 5506–5512. <http://doi.org/10.1128/JB.186.16.5506>

Garau, J., Bouza, E., Chastre, J., Gudiol, F., & Harbarth, S. (2009). Management of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2), 125–136.

Ghaouar, N., Elmissaoui, S., Aschi, A., & Gharbi, A. (2010). International Journal of Biological Macromolecules Concentration regimes and denaturation effects on the conformational changes of  $\alpha$ -chymotrypsin by viscosity and dynamic light scattering measurements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 425–430. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.08.001>

Green, N. J., Johnson, U. W., & Lane, H. (1999). Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis, *18*(4), 236–244.

Gromiha, M. M., & Suwa, M. (2005). Structural analysis of residues involving cation- $\pi$  interactions in different folding types of membrane proteins, *35*, 55–62. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.12.001>

Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., & Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 135(1), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.clim.2009.12.004>

Gupta, A., Hunter, S. B., Bidol, S. A., Dietrich, S., Kincaid, J., Salehi, E., ... Brooks, J. T. (2004). Evaluation, *10*(10), 1856–1858.

Haney, E. F., Nathoo, S., Vogel, H. J., & Prenner, E. J. (2010). Induction of non-lamellar lipid phases by antimicrobial peptides : a potential link to mode of action, *163*, 82–93. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.09.002>

Hawkey, P. M., & Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64 Suppl 1, i3–10. <http://doi.org/10.1093/jac/dkp256>

- He, H., Ye, J., Wang, Y., Liu, Q., Chung, H. S., Kwon, Y. M., ... Yang, V. C. (2014). Cell-penetrating peptides mediated encapsulation of protein therapeutics into intact red blood cells and its application. *Journal of Controlled Release*, 176(1), 123–132. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.019>
- Hf, S., Kam, E., & Ma, S. (2011). Formulation and evaluation of silver nanoparticles as antibacterial and antifungal agents with a minimal cytotoxic effect, 3, 293–304.
- Honary, S., Ghajar, K., Khazaeli, P., & Shalchian, P. (2011). Preparation , Characterization and Antibacterial Properties of Silver-Chitosan Nanocomposites Using Different Molecular Weight Grades of Chitosan, 10(January), 69–74.
- Hososaka, Y., Hanaki, H., Endo, H., Suzuki, Y., Nagasawa, Z., Otsuka, Y., ... Sunakawa, K. (2007). Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 13(2), 79–86. <http://doi.org/10.1007/s10156-006-0502-7>
- Huang, H., Rajanbabu, V., Pan, C., & Chan, Y. (2013). Biomaterials Use of the antimicrobial peptide Epinecidin-1 to protect against MRSA infection in mice with skin injuries. *Biomaterials*, 34(38), 10319–10327. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.037>
- Huang, H. W. (2006). Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1292–302. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.001>
- Husband, D. L., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2000). Development of simultaneous purification methodology for multiple synthetic peptides by reversed-phase sample displacement, 893, 81–94.
- Ili, N., Novkovi, M., Guida, F., Xhindoli, D., Benincasa, M., Tossi, A., & Jureti, D. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Selective antimicrobial activity and mode of action of adepantins , glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences, 1828, 1004–1012. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.017>
- Imura, Y., Choda, N., & Matsuzaki, K. (2008). Magainin 2 in Action : Distinct Modes of Membrane Permeabilization in Living Bacterial and Mammalian Cells, 95(December), 5757–5765. <http://doi.org/10.1529/biophysj.108.133488>

- Imura, Y., Nishida, M., & Matsuzaki, K. (2007). Action mechanism of PEGylated magainin 2 analogue peptide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(10), 2578–2585. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.013>
- Jain, A. K., Das, M., Swarnakar, N. K., & Jain, S. (2011). Engineered PLGA Nanoparticles : An Emerging Delivery Tool in Cancer Therapeutics, 28(1), 1–45.
- Jaiswal, J., Gupta, S. K., & Kreuter, J. (2004). Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. *Journal of Controlled Release*, 96(1), 169–178. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.017>
- Jang, S. a., Kim, H., Lee, J. Y., Shin, J. R., Kim, D. J., Cho, J. H., & Kim, S. C. (2012). Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. *Peptides*, 34(2), 283–289. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.015>
- Ji, J., Childs, R. F., & Mehta, M. (2001). Mathematical model for encapsulation by interfacial polymerization. *Journal of Membrane Science*, 192(1-2), 55–70.
- Johnson, K. E., Thorpe, C. M., & Sears, C. L. (2006). The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin - producing Escherichia coli. *Clinical Infectious Diseases*, 43(12), 1587–1595. Retrieved from <Go to ISI>://000242126300011
- Joshi, S., Singh, G., Rawat, D. S., Kumar, A., Kumar, R., Maiti, S., & Pasha, S. (2010). Biochimica et Biophysica Acta Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and E . coli ATCC 11775. *BBA - Biomembranes*, 1798(10), 1864–1875. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.016>
- Kaplan, S. L. (2005). Implications of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a community-acquired pathogen in pediatric patients. *Infectious Disease Clinics of North America*, 19(3), 747–757. <http://doi.org/10.1016/j.idc.2005.05.011>
- Kaplan, S. L., Hulten, K. G., Gonzalez, B. E., Hammerman, W. A., Lamberth, L., Versalovic, J., & Mason, E. O. (2005). Three-Year Surveillance of Community-Acquired Staphylococcus aureus Infections in Children, 77030(May), 1785–1791.
- Khayata, N., Abdelwahed, W., Chehna, M. F., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation

method : From laboratory scale to large scale using a membrane contactor.  
*International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 419–427.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.016>

Kim, C., Spano, J., Park, E., & Wi, S. (2009). Biochimica et Biophysica Acta Evidence of pores and thinned lipid bilayers induced in oriented lipid membranes interacting with the antimicrobial peptides , magainin-2 and aurein-3 . 3. *BBA - Biomembranes*, 1788(7), 1482–1496.  
<http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.017>

Kumar, S., & Varela, M. F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, 522–534.

Kumari, A., Singla, R., Guliani, A., & Yadav, S. K. (2014). Review article : NANOENCAPSULATION FOR DRUG DELIVERY, 265–286.

Ladokhin, A. S., Selsted, M. E., & White, S. H. (1997). Bilayer Interactions of Indolicidin , a Small Antimicrobial Peptide Rich in Tryptophan , Proline , and Basic Amino Acids Kx []. *Biophysical Journal*, 72(2), 794–805.  
[http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78713-7](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78713-7)

Lan, G., Bozic, I., Keong, C., August, J. T., & Brusica, V. (2007). Prediction of supertype-specific HLA class I binding peptides using support vector machines, 320, 143–154. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2006.12.011>

Law, D. (2000). Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E . coli, 729–745.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., ... Aires, B. (2014). Antibiotic resistance — the need for global solutions, 13(December). [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)

Lee, E. K., Kim, Y. C., Nan, Y. H., & Shin, S. Y. (2011). Cell selectivity, mechanism of action and LPS-neutralizing activity of bovine myeloid antimicrobial peptide-18 (BMAP-18) and its analogs. *Peptides*, 32(6), 1123–1130.  
<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.03.024>

Lee, S., Kim, S., Lee, Y., Song, M., Kim, I., & Won, H. (2011). Regulatory Peptides De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. *Regulatory Peptides*, 166(1-3), 36–41.  
<http://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.08.010>

- Lepeltier, E., Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect” : Application to drug delivery devices ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *71*, 86–97. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>
- Li, J., Liu, S., Lakshminarayanan, R., Bai, Y., & Pervushin, K. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability. *BBA - Biomembranes*, *1828*(3), 1112–1121. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.12.015>
- Li, Q., Huang, J., Guo, H., Guo, X., Zhu, Y., & Dong, K. (2012). International Journal of Antimicrobial Agents Bactericidal activity against meticillin-resistant Staphylococcus aureus of a novel eukaryotic therapeutic recombinant antimicrobial peptide. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *39*(6), 496–499. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.03.003>
- Lin, M., Hui, C., Chen, J., & Wu, J. (2013). Peptides Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant Staphylococcus aureus. *Peptides*, *44*, 139–148. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.04.004>
- Lindsay, J. a. (2013). Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance-What have we learned from genomics? *International Journal of Medical Microbiology*, *303*(6-7), 318–323. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.005>
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial Resistance : Origins , Epidemiology , and Impact, *36*(Suppl 1), 11–23.
- Lloyd, L. L., Millichip, M. I., & Watkins, J. M. (2002). Reversed-phase poly ( styrene – divinylbenzene ) materials optimised for large scale preparative and process purification of synthetic peptides and recombinant proteins, *944*, 169–177.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., ... Peters, G. (2010). Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathogens*, *6*(1). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000715>
- López, S. E., & Salazar, J. (2013). Trifluoroacetic acid: Uses and recent applications in organic synthesis. *Journal of Fluorine Chemistry*, *156*, 73–100. <http://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2013.09.004>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier, 1377–1397. <http://doi.org/10.3390/polym3031377>

- Malheiros, S., Sant, V., Yasmine, A., & Serafini, M. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34 : physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*, (Stein 2005). <http://doi.org/10.1007/s11051-011-0278-2>
- Maria-neto, S., Caroline, K., Almeida, D., Ligia, M., Macedo, R., & Luiz, O. (2015). *Biochimica et Biophysica Acta* Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides : From the surface to deep inside ☆. *BBA - Biomembranes*. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.017>
- Mccall, R. L., & Sirianni, R. W. (2013). PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-emulsion with Vitamin E- TPGS, (December), 1–8. <http://doi.org/10.3791/51015>
- Mcdougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., Mcallister, S. K., & Tenover, F. C. (2003). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States : Establishing a National Database, *41*(11), 5113–5120. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5113>
- Memish, Z. A., Zumla, A., Alhakeem, R. F., Assiri, A., Turkestani, A., Harby, K. D. Al, & Alyemni, M. (2014). Lancet mass gatherings medicine 1 Hajj : infectious disease surveillance and control, *383*, 2073–2082. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60381-0](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60381-0)
- Merrifield, B. (1995). *Solid-Phase Peptide Synthesis*.
- Mihajlovic, M., & Lazaridis, T. (2010a). Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1798*(8), 1494–1502. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.023>
- Mihajlovic, M., & Lazaridis, T. (2010b). Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1798*(8), 1485–1493. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.04.004>
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, a. (2013). Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *445*(1-2), 181–195. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.031>
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, a. (2015). Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. *Industrial Crops and Products*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.079>

- Miller, L. G., & Diep, B. A. (2008). Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(5), 752–60. <http://doi.org/10.1086/526773>
- Montanheiro, C., Ferreira, A., Matos, S., Carvalho, D., Calegari, R., Vinicius, M., ... Barreto, M. (2013). Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops & Products*, 50, 896–903. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.015>
- Moorthi, C., & Kathiresan, K. (2013). Fabrication of highly stable sonication assisted curcumin nanocrystals by nanoprecipitation method. *Drug Invention Today*, 5(1), 66–69. <http://doi.org/10.1016/j.dit.2013.02.003>
- Mora-huertas, C. E., Garrigues, O., Fessi, H., & Elaissari, A. (2012). European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification – diffusion methods : Comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(1), 235–239. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.09.013>
- Mu, L., Yue, C. Y., & Feng, S. S. (2003). Pharmaceutical Properties of Nanoparticulate Formulation Composed of TPGS and PLGA for Controlled Delivery of Anticancer Drug, (65).
- Mun, S., Choi, Y., Shim, J., Park, K., & Kim, Y. (2011). Effects of enzymatically modified starch on the encapsulation efficiency and stability of water-in-oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 128(2), 266–275. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.014>
- Nabi-Meibodi, M., Vatanara, A., Najafabadi, A. R., Rouini, M. R., Ramezani, V., Gilani, K., ... Azadmanesh, K. (2013). The effective encapsulation of a hydrophobic lipid-insoluble drug in solid lipid nanoparticles using a modified double emulsion solvent evaporation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 408–414. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.013>
- Narang, A. S., Delmarre, D., Gao, D., R, C. P., Innovation, P., Stimmer, R. T., & Cedex, I. G. (2007). Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, 345, 9–25. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.057>
- Nehira, T., Ishihara, K., Matsuo, K., Izumi, S., Yamazaki, T., & Ishida, A. (2012). A sensitive method based on fluorescence-detected circular dichroism for protein local structure analysis. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 430(2), 179–184. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.020>

- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–472. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>
- Nii, T., & Ishii, F. (2005). Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method, 298, 198–205. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.029>
- Nishikaze, T., & Takayama, M. (2007). Study of factors governing negative molecular ion yields of amino acid and peptide in FAB , MALDI and ESI mass spectrometry, 268, 47–59. <http://doi.org/10.1016/j.ijms.2007.08.004>
- Nita, L. E., Chiriac, A., Bercea, M., & Wolf, B. A. (2013). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Synergistic behavior of poly ( aspartic acid ) and Pluronic F127 in aqueous solution as studied by viscometry and dynamic light scattering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 544–549. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.054>
- Ochoa, T. J., Mohr, J., Wanger, A., Murphy, J. R., & Heresi, G. P. (2005). aureus in Pediatric Patients, 11(6), 11–13.
- Ohnishi, N., Yamamoto, E., Tomida, H., Hyodo, K., & Ishihara, H. (2013). Rapid determination of the encapsulation efficiency of a liposome formulation using column-switching HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1-2), 67–74. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.019>
- Olmo, A. Del, Calzada, J., & Nuñez, M. (2012). Effect of lactoferrin and its derivatives , high hydrostatic pressure , and their combinations , on Escherichia coli O157 : H7 and Pseudomonas fl uorescens in chicken fi lets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 51–56. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.016>
- Ong, Z. Y., Wiradharma, N., & Yang, Y. Y. (2014). Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 28–45. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.013>
- Otto, M. (2012). MRSA virulence and spread. *Cellular Microbiology*, 14(10), 1513–1521. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01832.x>
- Paganini, H., L, M. P. Della, O, B. M., Ezcurra, G., Uranga, M., Aguirre, C., ... Maninno, L. (2009). Infecciones por, 26(5), 406–412.

- Park, S. C., Park, Y., & Hahm, K. S. (2011). The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(9), 5971–5992. <http://doi.org/10.3390/ijms12095971>
- Pasberg-Gauhl, C. (2014). A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, *11*(1), 109–116. <http://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.04.001>
- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Infections, *11*(3), 450–479.
- Peça, I. N., Petrova, K. T., Cardoso, M. M., & Barros, M. T. (2012). Reactive & Functional Polymers Preparation and characterization of polymeric nanoparticles composed of poly ( DL -lactide-co-glycolide ) and poly ( DL -lactide-co-glycolide ) -co-poly ( ethylene glycol ) -10 % -Triblock end-capped with a galactose moiety, *72*, 729–735. <http://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.06.019>
- Perez-riverol, Y., Audain, E., Millan, A., Ramos, Y., Sanchez, A., Antonio, J., ... Besada, V. (2012). Isoelectric point optimization using peptide descriptors and support vector machines. *Journal of Proteomics*, *75*(7), 2269–2274. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.029>
- Porto, W. F., Souza, V. A., Nolasco, D. O., & Franco, O. L. (2012). Peptides In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. *Peptides*, *38*(1), 127–136. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.025>
- Povey, J. F., Howard, M. J., Williamson, R. A., & Smales, C. M. (2008). The effect of peptide glycation on local secondary structure, *161*, 151–161. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.10.004>
- Prior, S., Gamazo, C., Irache, J. M., Merkle, H. P., & Gander, B. (2000). Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *International Journal of Pharmaceutics*, *196*(1), 115–125.
- Purrello, S. M., Daum, R. S., Edwards, G. F. S., Lina, G., Lindsay, J., Peters, G., & Stefani, S. (2014). Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *2*(2), 61–69. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.02.003>
- Putney, D. (n.d.). Encapsulation, 548–552.

- Qi, X., Zhou, C., Li, P., Xu, W., Cao, Y., Ling, H., ... Chan-Park, M. B. (2010). Novel short antibacterial and antifungal peptides with low cytotoxicity: Efficacy and action mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), 594–600. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.131>
- Rintoul, M. R., Morero, R. D., & Dupuy, F. G. (2015). bacterial model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.048>
- Russell, A. L., Kennedy, A. M., Spuches, A. M., Gibson, W. S., Venugopal, D., Klapper, D., ... Hicks, R. P. (2011). Determining the effect of the incorporation of unnatural amino acids into antimicrobial peptides on the interactions with zwitterionic and anionic membrane model systems. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(8), 740–758. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.09.003>
- Salgado, C. D., Farr, B. M., & Calfee, D. P. (2003). Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus : A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors, 22908(January), 131–139.
- Scheiring, J., Andreoli, S. P., & Zimmerhackl, L. B. (2008). Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology*, 23(10), 1749–1760. <http://doi.org/10.1007/s00467-008-0935-6>
- Schiffer, M., & Edmundson, A. B. (1964). USE OF HELICAL WHEELS TO REPRESENT THE STRUCTURES OF PROTEINS AND TO IDENTIFY SEGMENTS WITH HELICAL POTENTIAL. *Biophysical Journal*, 7(2), 121–135. [http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(67\)86579-2](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(67)86579-2)
- Seo, M., Won, H., Kim, J., Mishig-ochir, T., & Lee, B. (2012). Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review, 12276–12286. <http://doi.org/10.3390/molecules171012276>
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by ??-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1-2), 55–70.
- Shameli, K., Ahmad, M. Bin, Jazayeri, S. D., Shabanzadeh, P., & Sangpour, P. (2012). Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1752-153X-6-73>

- Shariat, S., Badiee, A., Reza, M., & Alireza, S. (2014). Optimization of a Method to Prepare Liposomes Containing HER2 / Neu- Derived Peptide as a Vaccine Delivery System for Breast Cancer, *13*(November 2013), 15–25.
- Sibel Akalin, a. (2014). Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends in Food Science and Technology*, *36*(2), 79–95. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.002>
- Silva, A. L., Rosalia, R. A., Sazak, A., Carstens, M. G., Ossendorp, F., Oostendorp, J., & Jiskoot, W. (2013). European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles : Low-burst release is crucial for efficient CD8 + T cell activation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *83*(3), 338–345. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.006>
- Smith, A. W. (2005). Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(10), 1539–50. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.007>
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., & Kulkarni, A. R. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *70*, 1–20.
- Soudy, R., Wang, L., & Kaur, K. (2012). Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *20*(5), 1794–1800. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.061>
- Steinchen, a, Sefiane, K., & Sanfeld, a. (2011). Nano-encapsulation as high pressure devices for folding-unfolding proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, *355*(2), 509–11. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.12.001>
- Steinhilber, D., Witting, M., Zhang, X., Staegemann, M., Paulus, F., Friess, W., ... Haag, R. (2013). Surfactant free preparation of biodegradable dendritic polyglycerol nanogels by inverse nanoprecipitation for encapsulation and release of pharmaceutical biomacromolecules. *Journal of Controlled Release*, *169*(3), 289–295. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.12.008>
- Strandberg, E., & Ulrich, A. S. (2015). Biochimica et Biophysica Acta AMPs and OMPs : Is the folding and bilayer insertion of  $\beta$  -stranded outer membrane proteins governed by the same biophysical principles as for  $\alpha$  -helical antimicrobial peptides ? ☆. *BBA - Biomembranes*. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.02.019>

- Straus, S. K., & Hancock, R. E. W. (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin : Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides, *1758*, 1215–1223.  
<http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.009>
- Strauss, J., Kadilak, A., Cronin, C., Mello, C. M., & Camesano, T. A. (2010). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Binding , inactivation , and adhesion forces between antimicrobial peptide cecropin P1 and pathogenic E . coli, *75*, 156–164. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.08.026>
- Sureshbabu, V. V., Venkataramanarao, R., Naik, S. a., & Chennakrishnareddy, G. (2007). Synthesis of tetrazole analogues of amino acids using Fmoc chemistry: isolation of amino free tetrazoles and their incorporation into peptides. *Tetrahedron Letters*, *48*(39), 7038–7041.  
<http://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.07.129>
- Syndrome, U., Ethelberg, S., Olsen, K. E. P., Scheutz, F., Jensen, C., Schiellerup, P., ... Mølbak, K. (2004). Virulence Factors for Hemolytic, *10*(5).
- Tarr, P. I., Gordon, C. a, & Chandler, W. L. (2005). Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, *365*(9464), 1073–1086.
- Tavano, L., Pinazo, A., Abo-riya, M., Infante, M. R., & Manresa, M. A. (2014). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Cationic vesicles based on biocompatible diacyl glycerol-arginine surfactants : Physicochemical properties , antimicrobial activity , encapsulation efficiency and drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *120*, 160–167.  
<http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.009>
- Taylor, P. K., Yeung, A. T. Y., & Hancock, R. E. W. (2014). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms : Towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, *191*, 121–130.  
<http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>
- Te Loo, D. M., Monnens, L. a, van Der Velden, T. J., Vermeer, M. a, Preyers, F., Demacker, P. N., ... van Hinsbergh, V. W. (2000). Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*, *95*(11), 3396–3402.
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Progress in Lipid Research Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *PROGRESS IN LIPID RESEARCH*, *51*(2), 149–177.  
<http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>

- Termén, S., Tollin, M., Rodriguez, E., Sveinsdóttir, S. H., Jóhannesson, B., Cederlund, A., ... Gudmundsson, G. H. (2008). PU.1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells. *Molecular Immunology*, 45(15), 3947–3955. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.06.020>
- Thorpe, C. M. (2004). Shiga Toxin – Producing Escherichia coli Infection, 38.
- Torrent, M., Nogués, M. V, & Boix, E. (2010). Assessment of antimicrobial compounds by microscopy techniques, 1115–1126.
- Trindade, F., Amado, F., Pinto, J., Ferreira, R., Maia, C., Henriques, I., ... Vitorino, R. (2014). ScienceDirect Salivary peptidomic as a tool to disclose new potential antimicrobial peptides. *Journal of Proteomics*, 115, 49–57. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.004>
- Tripathi, J. K., Kathuria, M., Kumar, A., Mitra, K., & Ghosh, J. K. (2015). An Unprecedented alteration in mode of action of IsCT resulting its translocation into bacterial cytoplasm and inhibition of, 1–10. <http://doi.org/10.1038/srep09127>
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., ... Etienne, J. (2003). Community-acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus carrying panton-valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 978–984.
- Venugopal, D., Klapper, D., Srouji, A. H., Bhonsle, J. B., Borschel, R., Mueller, A., ... Hicks, R. P. (2010). Bioorganic & Medicinal Chemistry Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(14), 5137–5147. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.05.065>
- Vorontsova, O. V., Egorova, N. S., Arseniev, A. S., & Feofanov, A. V. (2011). Haemolytic and cytotoxic action of laticin Ltc2a. *Biochimie*, 93(2), 227–241. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.09.016>
- Wang, X., Zhou, L., Ma, Y., Li, X., & Gu, H. (2009). Control of Aggregate Size of Polyethyleneimine-Coated Magnetic Nanoparticles for Magnetofection.
- Wischke, C., & Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 298–327. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>

- Wu, G., Deng, X., Wu, P., Shen, Z., & Xu, H. (2012). Subacute toxicity of antimicrobial peptide S-thanatin in ICR mice. *Peptides*, 36(1), 109–113. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.04.005>
- Wu, S., Zhang, F., Huang, Z., Liu, H., Xie, C., Zhang, J., ... Qiao, S. (2012). Peptides Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. *Peptides*, 35(2), 225–230. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.030>
- Xu, R. (2015). Particuology Light scattering : A review of particle characterization applications. *Particuology*, 18, 11–21. <http://doi.org/10.1016/j.partic.2014.05.002>
- Yadav, S. C., Kumari, A., & Yadav, R. (2011). Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, 32(1), 173–187. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.003>
- Yang, K., Su, Y., Li, J., Sun, J., & Yang, Y. (2012). Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION*, 85(2), 200–203. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.007>
- Yang, M. J., Lin, W., Lin, C., Shyu, C., Hou, R. F., & Tu, W. (2013). Journal of Asia-Pacific Entomology Enhancing antimicrobial activity of mastoparan-B by amino acid substitutions. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16(4), 349–355. <http://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.05.002>
- Yangl, Y., Sweeney, W. V, Thomqvist, S., Schneider, K., Chait, B. T., & Tam, J. P. (1995). Characterization of a Side Reaction Using Stepwise Detection in Peptide Synthesis with Fmoc Chemistry, 555–562.
- Yin, W., & Yates, M. Z. (2009). Encapsulation and sustained release from biodegradable microcapsules made by emulsification/freeze drying and spray/freeze drying. *Journal of Colloid and Interface Science*, 336(1), 155–161. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.03.065>
- Yoon, J. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, K. H., Lee, S. H., Park, Y. K., ... Chae, B. J. (2014). Effects of dietary supplementation of synthetic antimicrobial peptide-A3 and P5 on growth performance , apparent total tract digestibility of nutrients , fecal and intestinal microflora and intestinal morphology in weanling pigs. *Livestock Science*, 159, 53–60. <http://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.10.025>
- Yordanov, G., Skrobanska, R., & Evangelatov, A. (2012). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Entrapment of epirubicin in poly ( butyl cyanoacrylate ) colloidal

nanospheres by nanoprecipitation : Formulation development and in vitro studies on cancer cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 98–105. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.029>

Zahn, M., Berthold, N., Kieslich, B., Knappe, D., Hoffmann, R., & Sträter, N. (2013). Structural Studies on the Forward and Reverse Binding Modes of Peptides to the Chaperone DnaK. *Journal of Molecular Biology*, 425(14), 2463–2479. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.041>

Zayed, M. E., & Ammar, R. A. (2014). Some transition metal ions complexes of tricine ( Tn ) and amino acids : pH-titration , synthesis and antimicrobial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 774–782. <http://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.08.006>

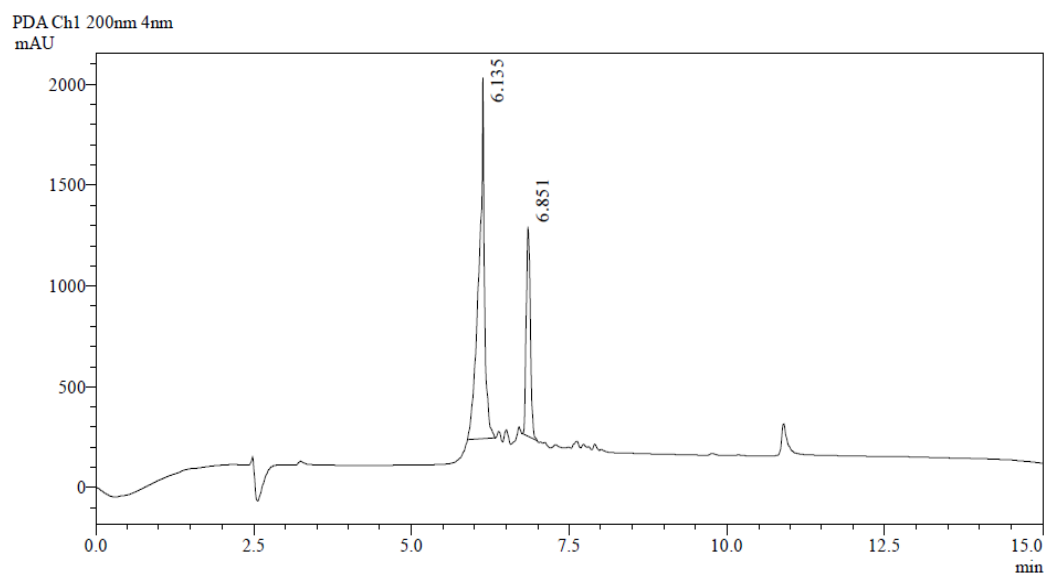
Zhang, X., Oglęcka, K., Sandgren, S., Belting, M., Esbjörner, E. K., Nordén, B., & Gräslund, A. (2010). Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37- Target membrane perturbation and host cell cargo delivery. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(12), 2201–2208. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.011>

Zhu, X., Dong, N., Wang, Z., Ma, Z., Zhang, L., Ma, Q., & Shan, A. (2014). Design of imperfectly amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomaterialia*, 10(1), 244–257. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.043>

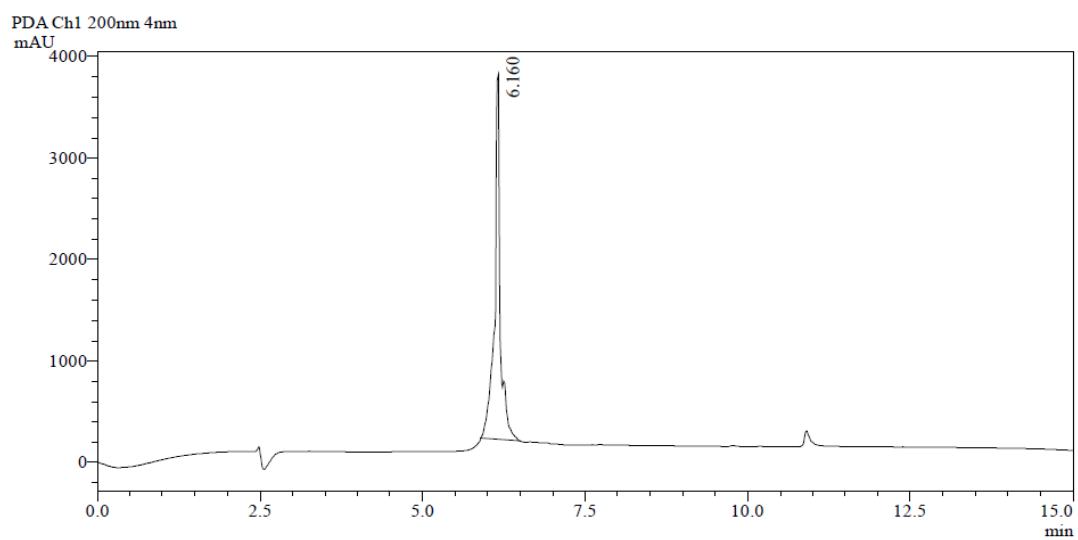
## ANEXOS

### Anexo1. Cromatogramas de las ocho secuencias de péptidos sintetizados

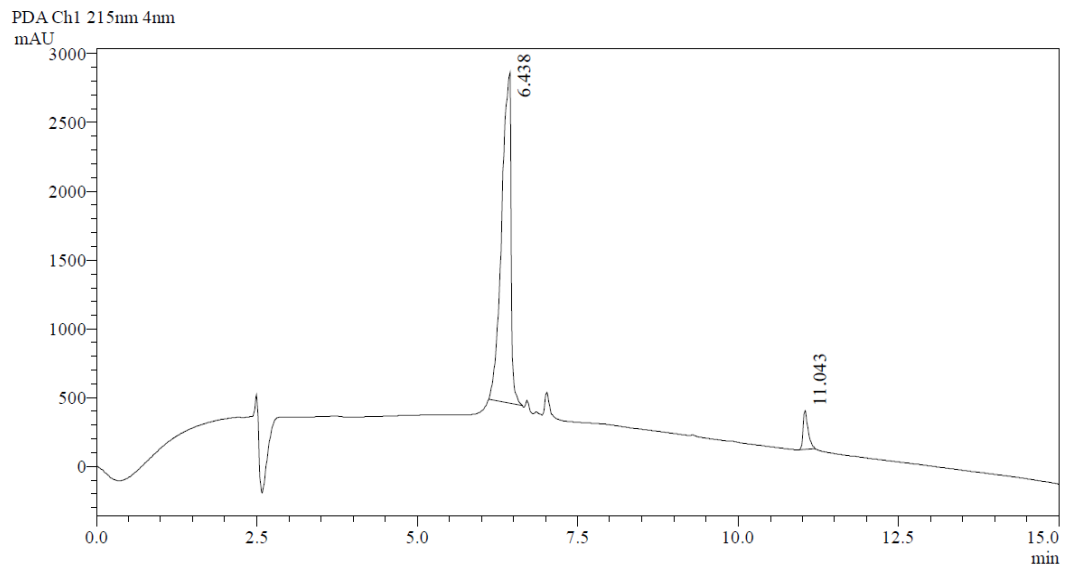
#### M1



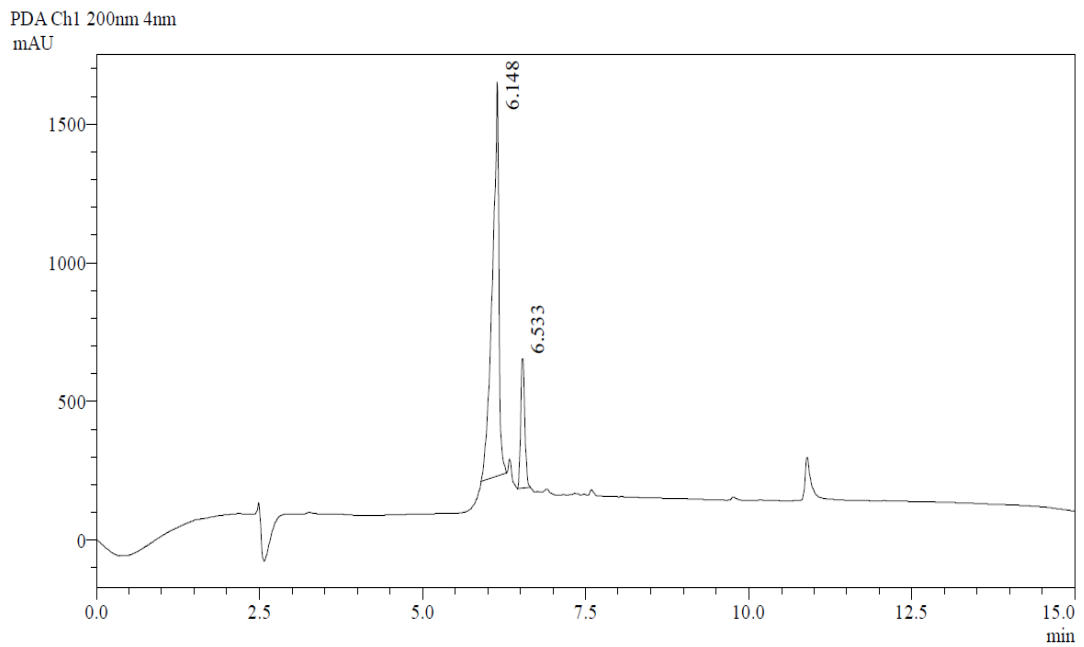
#### M2



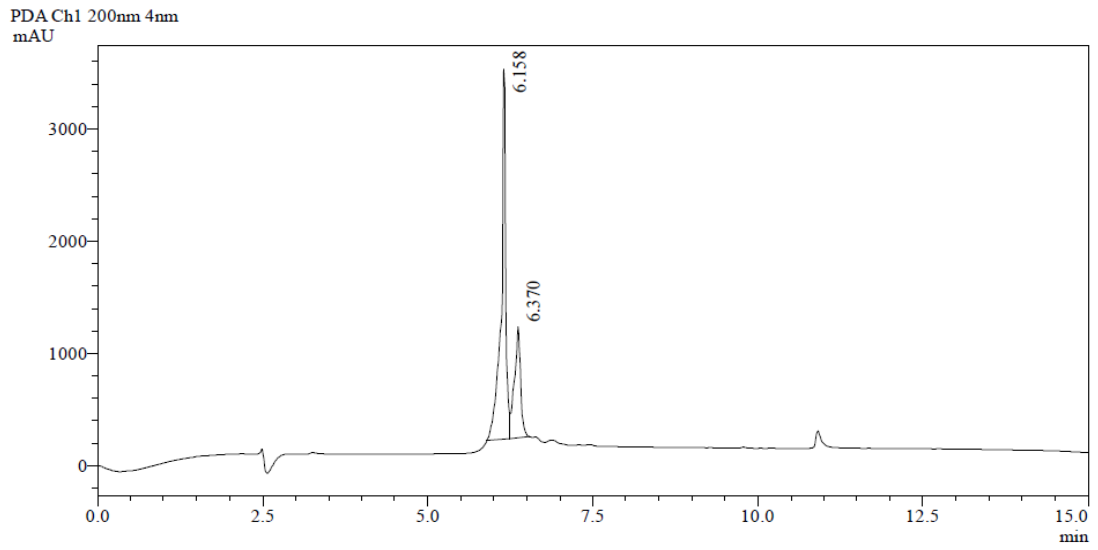
M3



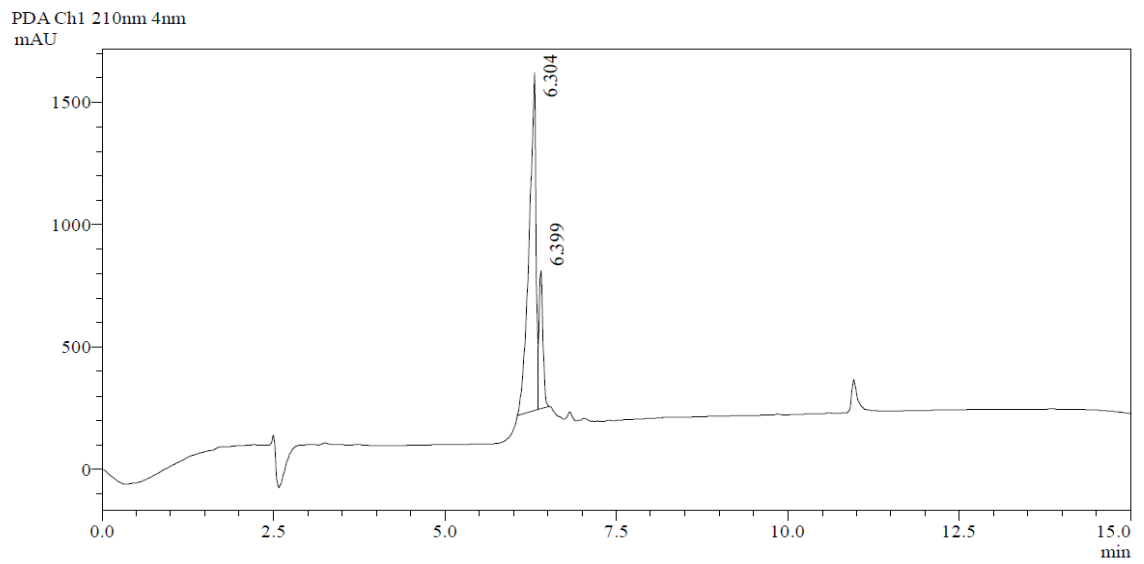
M4



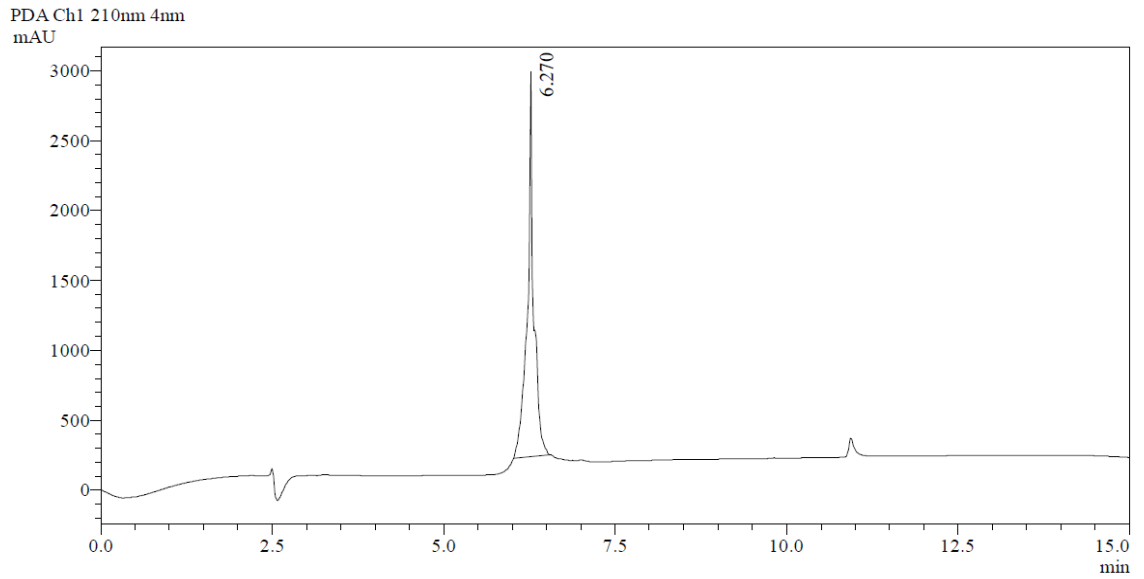
M5



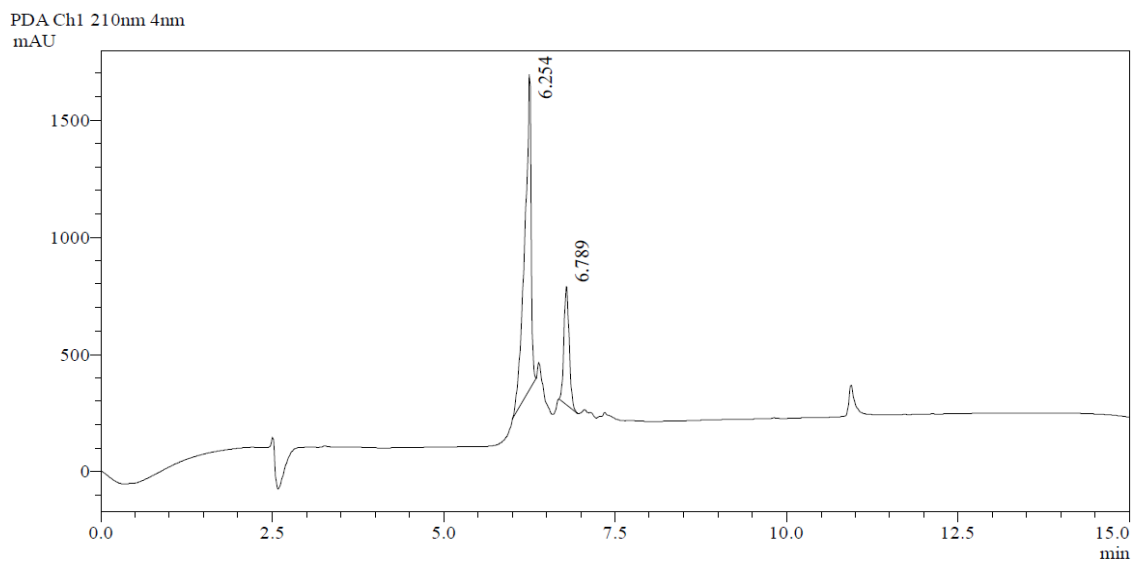
M6



M7

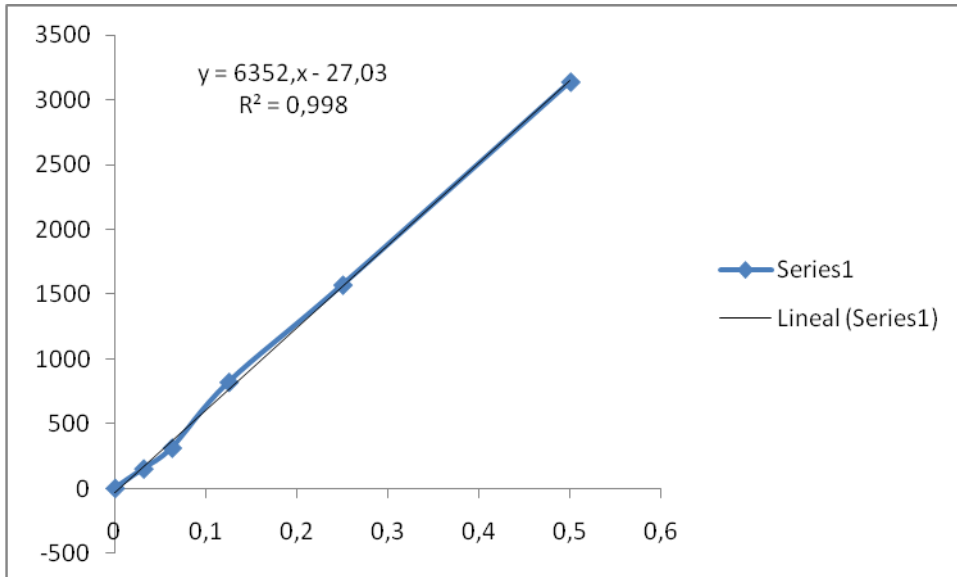


M8



**ANEXO 2. Curvas de calibración para la cuantificación de los péptidos encapsulados en nanopartículas de PLGA. A) M3, B) M7**

**A)**



**B)**

